



HAL
open science

Impact de la pollution plastique sur les communautés microbiennes de rivière

Lucie Laffet

► **To cite this version:**

Lucie Laffet. Impact de la pollution plastique sur les communautés microbiennes de rivière. Microbiologie et Parasitologie. Université Clermont Auvergne, 2023. Français. NNT : 2023UCFA0149 . tel-04600690

HAL Id: tel-04600690

<https://theses.hal.science/tel-04600690>

Submitted on 4 Jun 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Clermont Auvergne

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE, SANTE, AGRONOMIE, ENVIRONNEMENT

Thèse

Présentée à l'Université Clermont Auvergne pour l'obtention du grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITE

Spécialité : Ecologie Microbienne

Soutenue le 21 décembre 2023 à Clermont-Ferrand

Par

Lucie LAFFET

Impact de la pollution plastique sur les communautés microbiennes de rivière

Devant le Jury composé de :

Rapporteurs : Dr. Stéphane Pesce (président du jury de thèse) Directeur de Recherche Unité de recherche Riverly, INRAE, Villeurbanne

Dr. Helena Guasch Directrice de Recherche
CEAB-CSIC, Espagne

Examineurs : Dr. Eugènia Martí Directrice de Recherche
CEAB-CSIC, Espagne

Dr. Boris Eyheraguibel Ingénieur de Recherche
ICCF, UMR SIGMA UCA CNRS 6296 Clermont-Ferrand

Directeur : Dr. Joan Artigas Maître de Conférence des Universités
LMGE UMR UCA CNRS 6023 Clermont-Ferrand

Co-directrice : Dr. Anna M. Romaní Maître de Conférence des Universités
GRECO, Institute of Aquatic Ecology, Espagne

Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement (LMGE)
UMR UCA CNRS 6023 – Equipes : Communautés Microbiennes Ecotoxicologie Santé (CMES) et Biodiversité microbienne et adaptations fonctionnelles (BioADAPT)

La thèse n'est pas un long fleuve tranquille

Remerciements :

Joan,

Un grand merci à toi **Joan**, mon encadrant durant ces trois ans. Tu as pris le pari de m'accepter en thèse avec mon parcours universitaire orienté microbiologie et non écologie. Le pari fut d'autant plus grand qu'entre mon Master Microbiologie et le début de ma thèse, je suis sortie du monde académique pour aller travailler en entreprise dans un tout autre domaine. Cependant, le choix du sujet de thèse dont nous avons discuté courant décembre 2019 était motivé par une détermination sans faille, d'autant que tu as commencé à me préparer au concours de l'École Doctorale pendant que je travaillais. J'espère avoir été à la hauteur du défi en faisant ce pari. En tout cas merci pour cela.

J'aime à penser que notre collaboration a été le reflet d'une certaine complémentarité, où nos caractères ont parfois divergé et, malgré quelques moments d'incompréhension, il a fallu faire preuve d'adaptabilité et de communication, ce qui a enrichi mon parcours académique et renforcé ma façon de gérer des relations professionnelles. Cette expérience m'a non seulement permis de progresser sur le plan scientifique, mais elle m'a aussi enseigné des leçons inestimables sur la collaboration, l'écoute et la persévérance.

Anna,

Merci **Anna** pour tes conseils très précieux, tes corrections avisées sur mes articles malgré la distance qui nous sépare. Merci d'avoir accepté de corriger ce manuscrit, que ce soient les parties rédigées en français ou celles rédigées en anglais. Au cours de nos réunions, ou de nos rencontres, j'ai ressenti une certaine sagacité et une appréhension des questions liées à la recherche un peu différente et, de fait, ce fut une rencontre très enrichissante. Merci à toi Anna d'avoir accepté de co-diriger cette thèse.

Mes parents,

Ma mère. Je te préviens d'avance, ces quelques mots ne seront pas à la hauteur de mes sentiments et de ma gratitude, tu connais ma pudeur vis-à-vis de cela... Merci pour ton indéfectible soutien, même dans les nombreux moments où je ne disais rien, mais dans lesquels tu savais. Oui, en un simple « *Allô* » au téléphone, tu savais déjà la météo de mon humeur. Toi, tu sais combien mon parcours a été houleux, semé d'embûches et parfois bien sombre ou au contraire lumineux, l'ascenseur émotionnel comme je dis. Tu as toujours été là pour moi, merci pour ça.

Mon père. A toi aussi un grand merci. Malgré une certaine distance, je sais que j'avais ton soutien, à ta façon et quand j'en ai eu le plus besoin, tu as été là. Comme tu le sais, cette fin de thèse a particulièrement été difficile pour de nombreuses raisons et tu as été là pour m'écouter et partager ton expérience, le fruit de certains passages de ta propre vie. Aussi éclairée que cette expérience puisse être, il faut que nous aussi, vos enfants, nous expérimentions notre propre chemin pour en tirer les meilleures leçons.

Mes parents, oui tomber fait mal, mais c'est grâce à cela et à votre soutien, votre présence que j'ai pu grandir et me forger avant tout. Merci de m'avoir fait évoluer surtout dans ces moments difficiles, mais aussi dans tous les autres bons moments passés et à venir...

Ma famille

Eve,

Les mots me manquent, l'émotion m'étouffe. Cette thèse, je l'ai faite certes pour moi, mais la personne qui m'a transmis l'amour et l'envie de la Recherche c'est toi, et ca, depuis des années. Cette thèse, c'est grâce à toi, pour toi et je te la dédie. Je te dois tellement et ce, depuis mes 10 ans... Ton sourire, ta bonne humeur, ta résilience, ta force de vie, ton humour me manquent. Une personne exceptionnelle à bien plus d'un titre, un des piliers fondamentaux de ma vie. Je suis si fière et heureuse de t'avoir eu dans ma vie, tu m'as tant donné, tant appris...

Frère, si ma jeune nièce souhaite entreprendre ce genre de parcours dans quelques années, super Tata sera là !

Mes amis,

Maurine, nous nous sommes connu en Master, promotion 2016/2018, sept ans déjà... Je t'ai vue entrer en thèse, galérer en thèse et enfin sans surprise, brillamment réussir cette thèse. Tu m'as vue également rentrer en thèse, évoluer dans ce parcours et maintenant, c'est l'heure aussi pour moi de clore ce chapitre. Au cours de toutes ces étapes tu as été à l'écoute, toujours présente quand j'en ai eu besoin. Ta présence, ton soutien et ton amitié inestimable m'ont apporté un réconfort immense dans les moments de doute et de stress. Ta bienveillance et tes encouragements ont été essentiels pour la réussite de ce projet, depuis le concours à l'Ecole Doctorale et jusqu'à cette soutenance. Ah, il s'en est passé des choses pendant ce laps de temps, des joies, des rires, des larmes, du sang (bon ok peut-être pas le dernier)... Et tout ça ponctué de sorties « drink » régulières (avec la plus grande des modérations bien entendu). Tu as été et resteras une amie très précieuse à mes yeux, et pour tout ça, merci Maurine.

Au cours de ces trois années, j'ai rencontré des collègues, des Doctorants, des PhD, je pense notamment à Clémentine alias *philosophie* ; Eugénie alias *culture* et Juliette alias *la bamboche*, Régi *la saucisse*, et j'en passe beaucoup... J'ai eu de très bonnes relations avec beaucoup d'entre eux, tous enrichissants à leur manière. Quelles qu'ont été les conclusions de ces expériences ça a toujours, toujours été enrichissant, tant sur le plan personnel que sur le plan professionnel. J'y ai trouvé des collègues et pour certaines de ces relations, j'y ai également trouvé bien plus, des amis. Oui, je parle de toi **Vincent** (tu pensais peut-être que j'allais dévoiler ton nom de scène...) non pas ici, juste devant tes étudiants hé hé hé... Merci cher Vincent pour ta joie, ton entrain et ta bonne humeur, heu non pardon c'était pas pour toi ça ! Aller, j'arrête de te taquiner, enfin pour le moment. Toi qui n'as jamais bronché alors que je t'ai tant charrié avec une certaine insistance... « *Vincent la force tranquille* », ce surnom te va bien lui aussi ; car en effet, il se dégage un certain stoïcisme de toi. Voilà si tu n'avais pas encore trouvé ton courant philosophique, tu l'as maintenant, en complément d'une analyse de numérologie approfondie dont toi seul a le secret bien entendu. Ah, et merci d'avoir écouté mes innombrables plaintes quand je débarquais dans ton bureau le bec enfariné, ou en voiture lors des séances « psy » grand format ! Voisin de Thèse, voisin de bureau, voisin d'appartement aussi, cher camarade Bourbonnais merci à toi !

Tu croyais peut-être que je t'avais oublié **Damien** ? Fidèle courtes-pattes ! Nous nous sommes connus au moment de ton embauche au LMGE. A l'échelle d'une vie cela fait peu de temps et pourtant, j'ai bien l'impression que ça fait plus longtemps que nous nous sommes liés d'amitié. Tu as été là dans les moments difficiles de la thèse. Malgré les coups de pieds au fessier (au sens figuré) que j'ai pu te donner – en toute bienveillance bien entendu – nous avons su rester amis. Ces randonnées, ces moments de partage, ces cafés au labo et j'en passe. Tous ces moments qui ont jalonné ces années et qui m'ont aidé, accompagné, pour tout cela, merci Damien ! Et merci aussi pour tous ces moments passés à démêler de petits pépins sur R, mais qui prenaient tellement de temps ! Merci pour ton aide si précieuse pour certaines de mes analyses de diversité, car même avec une semaine de formation, les questions étaient encore nombreuses et en tout cas ton aide fut infiniment précieuse !

Allez, le meilleur pour la fin de cette sous-section : merci à toi chère **vieille chaussette**, ô grand Balai Barrissant ! Depuis le choix heureux de mon bureau en début de thèse, bureau dans lequel tu te trouvais, nous nous connaissons. Je pense pouvoir dire sans trop me tromper que ça a matché directement entre nous (*Laffet à Paris*). Deux caractères faits pour s'entendre on dirait bien. Je voulais te remercier pour tous tes conseils et tes bons tuyaux tout au long de cette thèse. Quelle que soit la question, tu as toujours su y répondre de façon rapide et efficace, avec cette volonté réelle d'aider. Ta personnalité solaire et ton enthousiasme m'ont apporté bien plus que de conseils avisés, comme une réelle écoute, une vraie oreille attentive dans les moments difficiles. Lors de ces moments, certains de tes mots ont eu un impact positif d'espoir et de résilience qui ont fait que certains de mes regrets étaient moindres... Ne serait-ce que pour cela, merci **Laurianne**. Merci pour tous ces moments de franche rigolade, et même des fous rires qui font tant de bien (et tant de bruit aussi...) ! Je suis heureuse de te compter dans ma vie aujourd'hui.

Des amitiés qui me sont précieuses et que j'espère sincèrement durables malgré la probabilité que la distance géographique nous sépare dans un futur proche.

Ceci, c'était pour les amitiés en blouse blanche, mais je souhaite remercier d'autres personnes qui ont compté pour moi.

Hülya, Thomas, nous nous sommes connus en Licence, et chacun dans des parcours différents. Toi Hülya aux résidences, toi Toto, en Licence comme. Evidemment, j'ai eu de nombreux copains pendant la période universitaire, mais vous, vous êtes restés des amis, car malgré la distance, malgré des jours, des semaines passés sans tellement communiquer, nous sommes restés amis et le lien ne s'est jamais rompu.

Nous nous connaissons depuis un bon bout de temps, et avec cette période si particulière qu'est la thèse, il y a eu trop peu de moments au cours desquels j'ai pris le temps de venir

vous voir, mais j'ai très souvent pensé à nous tous, à vos parcours et à vos réussites qui m'ont inspiré, tout comme vos personnalités que j'adore et que j'admire sincèrement.

Membre de l'équipe **CMES**, l'équipe **BioAdapt** et le **LMGE**,

C'est au sein de l'équipe **CMES** que j'ai effectué mes deux premières années de thèse. Je remercie particulièrement **Florence** et **Yoann** pour leur aide précieuse au cours de manips et de sorties terrain. Je remercie vivement **Philippe**, que j'ai connu il y a bien longtemps maintenant, en Licence lors de mes premiers pas relativement chaotiques à la fac. Tu as été de loin mon prof préféré ! Et assez Rock and Roll je dois dire ! Phi, des discussions aussi longues qu'intéressantes et enrichissantes ! Un prof, un vrai de vrai comme on en fait plus ! Merci aussi à **Geneviève** notre *chaman du désert* pour sa bonne humeur agréable autour de café, comment dire... Boostant, rafraîchissant et non sans une bonne dose d'humour ! Je remercie également les membres l'équipe **BioAdapt** pour leurs participations à mes entraînements des différents oraux que j'ai eus l'occasion de faire.

Membres du jury et **membres de mes comités** de thèse,

Aux membres de ce jury de thèse, le **Dr. Stéphane Pesce**, le **Dr. Helena Guasch**, le **Dr. Eugènia Martí**, le **Dr. Boris Eyheraguibel**, que je remercie, pour avoir accepté d'évaluer ces travaux de thèse tant l'écrit que l'oral. Je les remercie également pour leurs commentaires constructifs et leurs questions enrichissantes.

Je souhaite également remercier les chercheurs qui ont accepté de me suivre au cours de mes comités de thèses, le **Dr. Chloé Bonnineau** et le **Dr. Eugènia Martí**, pour leurs questions et leurs critiques très constructives.

La fin de cette thèse clôt un chapitre de ma vie très riche. Riche en expériences scientifiques, professionnelles et personnelles, et très riches en émotions. A tous les stades de la vie on en apprend sur les autres, sur le monde qui nous entoure, sur son travail et sur sa propre façon d'appréhender les problèmes, mais il faut bien souligner que la thèse est un condensé de tout cela avec une succession de hauts et de bas, semé de périodes de doute et de moments géniaux partagés avec nos proches, et à ces différents égards, on en apprend avant tout sur soi.

Il est temps pour moi de tourner une page de ma vie qui aura été aussi enrichissante que difficile. Des petites victoires aux petits tracassés du quotidien ; des déceptions solitaires aux joies partagées, des belles rencontres aux pertes des gens que j'ai aimé... Les maîtres mots pour parcourir cette expérience sont l'adaptabilité, la ténacité et la résilience.

La thèse peut être vue comme un aboutissement accompagné d'une certaine nostalgie. Pour ma part, j'essaie de voir cela comme le début de quelque chose d'autre, pour la suite de ma vie professionnelle et personnelle.

L'aventure continue !

A mon grand-père

et

A Eve

Vue d'ensemble de ce manuscrit

Après avoir donné un aperçu des travaux effectués dans cette thèse dans le **résumé étendu** (le résumé court se situe à la fin de la thèse), ce manuscrit commence par une introduction de contexte générale précédant la partie de **synthèse bibliographique** ; un état de l'art qui permet de mettre en exergue l'importance des écosystèmes fluviaux au niveau de la biosphère ainsi que le rôle prépondérant des biofilms au sein de ces écosystèmes. Cette partie met également en avant l'omniprésence de la pollution plastique et notamment dans les cours d'eau qui ont même été qualifiés de « point chaud » de cette pollution plastique sur les continents. Enfin, cette analyse bibliographique met en lumière les effets avérés de cette pollution sur les microorganismes, et soulève le fait que ces analyses ont été abordées principalement en milieu marin plutôt qu'en eaux douces. Cette section fait suite aux **principaux objectifs et hypothèses** de cette thèse. Ces derniers permettent d'introduire les deux sections suivantes : le premier article publié « *Comparison of microbial colonization between natural and plastic substrata in a polluted watershed* » intitulé « **COLONIZATION** », et le deuxième article « *Assessing the effects of plastics contamination on the structure and functions of stream microbial communities* » intitulé « **IMPACT** ». Ensuite, une autre grande partie fera l'état des lieux de ce travail avec une **discussion générale** suivie d'une partie dédiée aux **perspectives et prévention/gestion** de la pollution plastique dans les bassins versants. Enfin, une courte section fera état des lieux des **principales communications orales, posters, publications et formations** que j'ai effectué avant la liste des **références bibliographiques** de ce manuscrit et **annexes**.

Résumé étendu

La pollution plastique constitue une pollution d'origine anthropique particulièrement présente au niveau de toute la biosphère. Cette omniprésence est la résultante d'un ensemble multifactoriel incluant la production et l'utilisation massive de plastiques depuis le 20^e siècle ainsi que la surconsommation des produits emballés dans des matériaux plastiques. Cela passe aussi par la gestion inadéquate des déchets à base de plastique, entraînant un déversement dans les rivières, les océans et d'autres écosystèmes. Les plastiques traditionnels élaborés à base de pétrole et conçus pour être résistants, en font une pollution particulièrement persistante dans l'environnement, mettant des décennies voire des siècles à se décomposer. De plus, les petites fractions de tailles de plastique, issues de la production directe ou de la fragmentation de plus grosses, rendent ces matériaux omniprésents dans l'environnement ; du fond des océans jusqu'au sommet des montagnes.

Lorsque les plastiques pénètrent dans le milieu aquatique, un biofilm – connu sous le nom de « plastisphère » – se forme à leur surface. Cette communauté microbienne qui colonise les débris plastiques est similaire aux biofilms aquatiques sur substrats naturels. Bien que certains facteurs puissent différer entre les deux types de supports, le développement de la plastisphère est susceptible de suivre des schémas similaires.

Les écosystèmes marins sont particulièrement étudiés en matière de quantification et d'identification de la nature des pollutions plastiques. L'impact de la présence de plastiques, et notamment de microplastiques, sur les communautés microbiennes est aussi étudié dans cet écosystème. En ce qui concerne les écosystèmes d'eau douce (lentique et lotique), les recherches sont beaucoup plus récentes et concernent principalement les plastiques de petite taille telle que les microplastiques. En comparaison avec le milieu marin, il y a un manque de connaissances sur les aspects de quantification et surtout d'impact de la présence de macroplastique sur les communautés microbiennes de rivière.

La première partie des travaux de cette thèse visait à comparer la colonisation microbienne benthique entre substrats plastiques (un plastique traditionnel élaboré à base de pétrole dit « non biodégradable » et un plastique biosourcé dit « biodégradable ») et substrats

naturels (les sédiments, les rochers et les feuilles) sur deux sites de rivières (*in situ*) avec une différence marquée de pollution aux macroplastiques.

Nous nous sommes demandé si les microorganismes de rivière colonisaient de la même façon les substrats naturels (feuilles, sédiments et rochers) et les substrats macroplastiques, et s'il pouvait y avoir des différences de colonisation entre les deux types de plastiques. Nous avons donc mesuré cette colonisation de biofilms microbiens sur les différents substrats au travers de descripteurs : (i) **fonctionnels** tels que les activités enzymatiques extracellulaires : β -glucosidase (GLU), N-acétyl-glucosaminidase (NAG) et phosphatase (PHO), responsables respectivement de l'acquisition de carbone, d'azote et de phosphore organique ; (ii) **structuraux** tels que les densités bactériennes, fongiques, algales, et la diversité microbienne eucaryote et procaryote. Les sites que nous avons étudiés le long de la rivière de l'Artière ont été choisis de manière délibérée. Nous avons même quantifié la présence de macroplastique sur ces sites. En particulier, nous avons sélectionné un site sans influence humaine significative et dépourvu de macroplastiques en amont, par opposition à un site fortement touché par les activités humaines et présentant une pollution importante due aux macroplastiques en aval. De façon globale, les densités microbiennes et les activités enzymatiques extracellulaires étaient plus élevées au niveau des trois substrats naturels à savoir les sédiments et les feuilles, probablement dues à une plus grande disponibilité de carbone organique et de nutriments pour les communautés microbiennes dans ces substrats. Nous avons observé des différences de colonisation microbienne entre les deux plastiques mais uniquement au niveau du site en aval, où la densité bactérienne et les activités enzymatiques étaient plus élevées sur le plastique biodégradable que sur le plastique non biodégradable. Un pattern de colonisation semble se dégager au niveau des plastiques car nous avons constaté que la colonisation du plastique biodégradable ressemblait à celle des feuilles et des sédiments tandis que la colonisation du plastique non biodégradable ressemblait davantage à celle des rochers. En conséquence, la présence de macroplastiques de nature biodégradable augmenterait davantage l'hétérotrophie dans l'écosystème fluvial.

La seconde partie des travaux de ma thèse visait à évaluer l'impact structurel et fonctionnel des deux mêmes types de plastiques utilisés lors de la première étude, sur les communautés microbiennes benthiques naturelles (sédiments et rochers) en microcosmes de rivière. L'impact des plastiques a été évalué avec les mêmes descripteurs que précédemment.

Nous avons créé des microcosmes de rivière dans des conditions de laboratoire contrôlées dans lesquelles nous avons installé chacune de nos conditions, avec ou sans plastiques, avec ou sans feuilles, mais à chaque fois avec des sédiments et des rochers. Ces substrats ont été préalablement mis à coloniser dans le site en aval de l'Artière (le même que pour notre première étude) qui était un site fortement anthropisé et pollué par les macroplastiques. Deux questions de recherche ont été posées dans cette étude : A) évaluer l'impact fonctionnel et structurel de la présence des plastiques, selon l'ajout ou non de litière de feuille, sur les communautés naturelles des sédiments et des rochers, et B) évaluer l'impact fonctionnel et structurel de la présence des plastiques, selon l'ajout ou non de litière de feuille, à l'échelle de l'écosystème (*upscaling*), c'est-à-dire en prenant en compte toutes des communautés de chaque substrat présent dans les microcosmes.

Cette étude a révélé des effets contrastés des plastiques en fonction de l'échelle de l'étude (substrat *versus* microcosme). Au niveau du substrat, l'ajout de plastique non biodégradable a augmenté l'activité enzymatique GLU ainsi que les rapports d'activités enzymatiques GLU:NAG et GLU:PHO, et réduit la diversité alpha des communautés bactériennes des rochers. L'ajout de plastique biodégradable a réduit la densité fongique et la diversité alpha de la communauté bactérienne dans ces mêmes biofilms des rochers. Les communautés microbiennes des rochers se sont révélées être sensibles, pour certains des descripteurs, à la présence du plastique tandis que les communautés des sédiments ne l'étaient pas. Lorsque l'étude s'est étendue à l'échelle du microcosme, la présence de plastiques, qu'ils soient biodégradables ou non, a réduit l'activité globale des enzymes N-acétyl-glucosaminidase et phosphatase, ainsi que les biomasses fongique et algale dans les microcosmes. Plus particulièrement, la présence de plastique biodégradable a entraîné une diminution globale de l'activité enzymatique β -glucosidase. Il est particulièrement intéressant de noter que quelle que soit l'échelle d'étude (au niveau des substrats ou au niveau du microcosme entier) et quel que soit le descripteur, l'ajout de feuille a inversé l'impact des plastiques et a restauré un certain équilibre.

En résumé, cette étude met en lumière des effets plus prononcés des plastiques observés au niveau du microcosme qu'à l'échelle des substrats. Le remplacement de substrats naturels par des plastiques a réduit la biomasse fongique et algale dans le benthos du microcosme et par conséquent diminué les activités enzymatiques d'acquisition d'azote et de phosphore organique. Cette observation suggère que les effets des plastiques peuvent se

propager à l'échelle du microcosme mais une validation de terrain devrait être faite pour affirmer ou infirmer ces résultats.

Dans un contexte global d'écologie microbienne et d'écotoxicologie, cette thèse contribue à la compréhension de l'impact de la pollution plastique dans les écosystèmes fluviaux. Alors que la pollution plastique est largement reconnue comme un problème environnemental majeur, cette étude se distingue en examinant la colonisation microbienne des macroplastiques en rivière, un écosystème relativement peu exploré par rapport aux écosystèmes marins. Nos résultats révèlent que les macroplastiques, sont rapidement colonisés par des communautés microbiennes en eau douce, élargissant ainsi notre compréhension de la « plastisphère » au-delà de son contexte marin bien étudié. Cette recherche met en évidence l'importance cruciale de prendre en compte les écosystèmes d'eau douce dans la problématique de la pollution plastique car les biofilms microbiens formés sur les plastiques peuvent avoir un impact sur la qualité de l'eau, la biodiversité, la chaîne alimentaire et les fonctions de l'écosystème fluvial. Ceci souligne l'importance de ne pas négliger les macroplastiques dans la recherche sur la pollution plastique, malgré la prédominance actuelle des études sur les microplastiques. En démontrant l'impact significatif des macroplastiques sur la structure et la fonction des communautés microbiennes, cette étude appelle à un équilibre dans les efforts de recherche pour mieux comprendre l'ampleur totale de la pollution plastique.

Mot clefs : pollution macroplastique ; plastique biosourcé ; polyéthylène ; impact ; communautés microbiennes ; rivière ; microcosmes, *upscaling*

Extended abstract

Plastic pollution of anthropogenic origin is present in all compartments of the biosphere. Such an ubiquitous contamination is the result of a multifactorial combination including i) the production and massive use of plastics since the 20th century, ii) the overconsumption of products packaged with plastics, and iii) the inadequate management of plastic waste, leading to contamination of natural environments such as rivers and oceans. Traditional plastics made from petroleum and conceived to be resistant are persistent source of pollution in the environment that can take decades or even centuries to decompose. In addition, the small size fractions of plastic resulting from direct production or the fragmentation of larger plastics are found everywhere; from the deep ocean to the top of mountains.

When plastics reach the aquatic environment, a biofilm forms on its surface known as the “plastisphere”. This plastisphere is similar to aquatic biofilms growing on natural substrata, though some differences between the microbial colonization of natural and plastic supports may be found.

The quantification and identification of plastics pollution, as well as their impact on microbial communities, has been widely studied in the marine ecosystem. Regarding freshwater ecosystems (lentic and lotic), few and more recent research has been conducted on plastic pollution which and primarily focus on microplastics contamination. In comparison to the marine environment, there is a lack of knowledge regarding the quantification, identification and the impact of the presence of plastics on river microbial communities.

The first part of this thesis aimed to compare benthic microbial colonization between plastic substrata (a traditional petroleum-based plastic called 'non-biodegradable' and a bio-based plastic called 'biodegradable') and natural substrata (sediments, rocks, and leaves) in two river sites with a contrasting degree of macroplastic pollution.

We examined whether river microorganisms colonized natural substrata (leaves, sediments, and rocks) and plastic substrata in the same way and whether differences in colonization existed between the two plastic types. Accordingly, we measured microbial colonization on

different substrates using: (i) **functional** descriptors such as extracellular enzymatic activities: β -glucosidase (GLU), N-acetyl-glucosaminidase (NAG), and phosphatase (PHO), responsible for the acquisition of organic carbon, nitrogen, and phosphorus, respectively; (ii) **structural** descriptors such as bacterial, fungal, algal densities as well as the diversity of eukaryotic and prokaryotic communities. The sites studied along the Artière River were deliberately chosen and in each one we quantified the degree of macroplastics pollution. In particular, we selected an upstream site with weak human influence and without macroplastics and a downstream heavily impacted by human activity and significant macroplastic pollution.

Overall, microbial densities and extracellular enzymatic activities were higher on the natural substrates, namely sediments and leaves, likely due to greater availability of organic carbon and nutrients for microbial communities in these substrata. We observed differences in microbial colonization between the two plastics, but only at the downstream site, where the bacterial densities and enzymatic activities were higher on biodegradable plastic than on non-biodegradable plastic. A colonization pattern seems to emerge for plastics as we found that the colonization of biodegradable plastic resembled that of leaves and sediments, while the colonization of non-biodegradable plastic resembled that of rocks. Consequently, the presence of biodegradable macroplastics would increase heterotrophy to the river ecosystem more than the presence of non-biodegradable macroplastics.

The second part of my thesis aimed to assess the structural and functional impact of the same type of plastics used in the first study on natural benthic microbial communities (sediments and rocks) in a river microcosm experiment. The impact of plastics was evaluated using the same descriptors described in the previous study. We reproduced river microcosms under controlled laboratory conditions, in which we set up six experimental conditions, with or without plastics, with or without leaves, but each condition contained sediments and rocks. All the substrata used for this experiment were previously colonized at the downstream site of the Artière (the same one as in our first study) which is heavily polluted by macroplastics. Two research questions were addressed in this study: A) to assess the functional and structural impact of plastics, in the presence and absence of leaves, on natural communities of sediments and rocks, and B) to assess the functional and structural impact of plastics, in the presence and absence of leaves, at the ecosystem scale taking into account all the substrata present in the microcosms (upscaling).

This study revealed contrasting effects of plastics depending on the scale of the study (between substrata *versus* whole microcosm). At the substratum scale, the addition of non-biodegradable plastic increased GLU activity, as well as the enzymatic ratios of GLU:NAG and GLU:PHO, and reduced the alpha diversity of bacterial communities on rocks. The addition of biodegradable plastic reduced fungal density and alpha diversity of the bacterial community in the same biofilms on rocks. Thus, microbial communities on rocks proved to be sensitive to the presence of plastic, whereas sediments communities were not. Results at the microcosm scale showed that the presence of plastics, whether biodegradable or not, reduced the overall activity of N-acetyl-glucosaminidase and phosphatase enzymes, as well as the fungal and algal biomasses in the microcosms. And specifically, the presence of biodegradable plastic led to an overall decrease in β -glucosidase enzymatic activity in the microcosm. It is particularly interesting to note that regardless of the scale of the study (between substrata *versus* whole microcosm), the addition of leaf litter reversed the impact of plastics and restored a certain balance.

In conclusion, this second study highlights a more pronounced effect of plastics at the microcosm scale rather than at the substrate scale. The presence of plastics, instead of natural substrata, reduced global fungal and algal biomass in the microcosm and thus decreased enzymatic activities for the acquisition of organic nitrogen and phosphorus. This observation suggests that the effects of plastics needs to be assessed at larger scales of study, but further field validations needs to be conducted to confirm or reject our results at the microcosm scale.

In the context of aquatic microbial ecology and ecotoxicology, this thesis contributes to the understanding of plastic pollution's impact on freshwater ecosystems. While plastic pollution is widely recognized as a major environmental issue, this study stands out by examining microbial colonization of macroplastics in rivers, a relatively understudied ecosystem compared to marine environments. Our findings reveal that macroplastics are rapidly colonized by freshwater microbial communities, expanding our understanding of the 'plastisphere' beyond the marine context. This research highlights the importance of considering plastic pollution in freshwater ecosystems, as microbial biofilms formed on plastics could impact water quality, biodiversity, the food chain, and other ecological functions

provided by river ecosystems. This research highlights the impact of macroplastics on the structure and function of rock microbial communities, and calls for a more balanced research between the study of microplastics and plastics from other size fractions.

Keywords: macroplastic pollution; biosourced plastic; polyethylene; impact; microbial communities; river; microcosms, upscaling

Abréviations :

ABS Acrylonitrile butadiène styrène

ACC *American Chemistry Council*

ACE *Abundance-based Coverage Estimator*

ADEME Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie

ADN Acide Désoxyribonucléique

Anses Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

APME *Analysis of plastics production, demand and recovery in Europe*

ARN Acide Ribonucléique

ASTM *American Society for Testing and Materials*

ASV *Amplicon sequence variant*

ATP Adénosine Triphosphate

AWCD *Average Well Color Development*

B *Biodegradable*

BDBP *Biodegradable BioBased Plastic*

BPA Bisphénol A

C *Carbon*

CEDRE Cycle des Evaluations Disciplinaires Réalisées sur Echantillon

CLSM *Confocal Laser Scanning Microscopy*

CNRS Centre national de la recherche scientifique

COD Carbone Organique Dissous

CSO *Combined Sewer Overflow*

DDT *Dichlorodiphenyltrichloroethane*

DNA *Deoxyribonucleic Acid*

DOC *Dissolved Organic Carbon*

EDTA Éthylène-Diamine-Tétra-Acétique

EEAs *Extracellular Enzymatic Activities*

EN *European Norm*

EPS Extracellular Polymeric Substances

FTIR Fourier-Transform Infrared Spectroscopy

GLU β -glucosidase

HCH Hexachlorocyclohexane

HDPE High-Density Polyethylene - polyéthylène à haute densité

HPLC High-Performance Liquid Chromatography

ICI Imperial Chemical Industries

Ifremer Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer

INC Institut National de Chimie

INEE Institut Ecologie et Environnement

INP Institut National Polytechnique

INSIS Institut des Sciences de l'Ingénierie et des Systèmes

INSU Institut National des Sciences de l'Univers

ISO *International Organization for Standardization*

ITS *Internal Transcribed Spacer*

L *Leaves*

LC-MS *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*

LDPE *Low-Density Polyethylene* - polyéthylène à basse densité

LOMIC Laboratoire d'Océanographie Microbienne

MEB Microscopie électronique à balayage

MO Matière Organique

MOD Matière Organique Dissoute

MOP Matière Organique Particulaire

MOPF Matière Organique Particulaire Fine

MOPG Matière Organique Particulaire Grossière

MP Microplastique

Mt Millions de tonnes

MUF *Methylumbelliferyl*

N *Nitrogen*

NA *Non Applicable*

NAG *N-acetyl-glucosaminidase*

NB *Non-biodegradable*

NCBI *National Center for Biotechnology Information*

NMDS *Analysis of Non-Metric Multidimensional Scaling*

P *Phosphorus*

PA *Polyamide - Polyamide*

PAH *Polycyclic aromatic hydrocarbons*

PBAT *Polybutylene adipate terephthalate*

PBS *Poly(butylène succinate)*

PCB *Polychlorinated biphenyl*

PCR *Polymerase Chain Reaction*

PE *Polyethylene - Polyéthylène*

PEBD *Polyéthylène à basse densité*

PEF *Polyethylene 2,5-furandicarboxylate*

PEHD *Polyéthylène à haute densité*

PET *Polyethylene Terephthalate - Polyéthylène Téréphtalate*

PETE *Polyethylene Terephthalate - Polytéréphtalate d'éthylène*

PHA *Polyhydroxyalcanoate*

PHB *Polycarbonate d'acide polyhydroxybenzoïque*

PHO *Phosphatase*

PLA *Acide polylactique*

PNUE *Programme des Nations Unies pour l'Environnement*

PP *Polypropylene - Polypropylène*

PRF *Plastics Recycling Foundation*

PS *Polystyrene - Polystyrène*

PSI *Product Stewardship Institute*

PTT *Polytéréphtalate de triméthylène*

PUF *Polyurethane Foam* - mousse de polyuréthane

PVC *Polyvinyl Chloride* - Chlorure de polyvinyle

RCC *River Continuum Concept*

REP Responsabilité Elargie des Producteurs

ROS *Reactive Oxygen Species*

rpm *revolutions per minute*

SE *Standard Error*

SEM *Scanning Electron Microscopy*

SPI Society of the Plastics Industry

SRP Soluble Reactive Phosphorus

TC *Total Carbon*

TDC *Total Dissolved Carbon*

TDN *Total Dissolved Nitrogen*

TDP *Total Dissolved Phosphorus*

TEPCV Loi française relative à la Transition Energétique Pour la Croissance Verte

TN *Total nitrogen*

TOC *Total Organic Carbon*

TSG_ML *Technical Subgroup on Marine Litter*

UV Ultraviolet

WWTP *Wastewater Treatment Plant*

Index des Figures et Tableaux de l'analyse bibliographique

Index des Figures

Figure 1 : Carte de France des bassins hydrographiques par Grasshopper Geography.....	10
Figure 2 : Méthode de Strahler de désignation des ordres de cours d'eau.....	13
Figure 3 : Carte hydrographique du Puy-de-Dôme Région Auvergne-Rhône-Alpes, France..	15
Figure 4 : Cliché de microscopie électronique à fluorescence d'un biofilm environnemental.....	22
Figure 5 : Etapes de la formation d'un biofilm.	23
Figure 6 : Biodiversité d'un biofilm benthique dans les trois domaines de la vie.....	26
Figure 7 : Illustration des étapes historiques du développement, de la production et de l'utilisation des plastiques ainsi que des préoccupations associées et les mesures législatives..	38
Figure 8 : Schéma illustrant la production, l'utilisation et la destinée mondiale des résines polymères, des fibres synthétiques et des additifs de 1950 à 2015 en millions de tonnes.	39
Figure 9 : Les différentes classes de polymères plastiques allant de 1 à 7.....	41
Figure 10 : Capacités de production mondiale de bioplastiques.	44
Figure 11 : Capacités de production mondiale de bioplastiques 2027 en fonction des types de matériau.....	45
Figure 12 : Carte mondiale des émissions des déchets plastiques par les populations côtières.....	48
Figure 13 : Modèle conceptuel représentant le concept de « Cycle du plastique ».	50
Figure 14 : Diagramme conceptuel des flux de plastique à travers les compartiments des bassins hydrologiques.	51
Figure 15 : La communauté de la plastisphère.	67

Index des Tableaux

Tableau 1 : Quantification des plastiques dans les rivières..... 55

Tableau 2 : Etudes sur l'impact fonctionnel et/ou structurel du plastique en écosystème d'eau douce..... 74

Tableau 3 : Récapitulatif des études d'impact et de comparaison de descripteurs structuraux et fonctionnels sur des communautés microbiennes de la plastisphère et des communautés microbiennes sur substrats naturels en écosystèmes d'eau douce. 79

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE ET OBJECTIFS	1
ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE	7
I) ECOSYSTEME DE RIVIERE.....	8
I.1) Importance socio-économique et écologique.....	8
I.2) Importance dans les cycles biogéochimiques	16
I.2.1) Matière organique allochtone	16
I.2.2) Matière organique autochtone.....	17
II) BIOFILMS	20
II.1) Définition du biofilm	20
II.2) Biofilms microbiens en rivière.....	24
II.3) Biodiversité et structure des biofilms d’eau douce	24
II.4) Les biofilms : haut lieu des Activités Enzymatiques Extracellulaires (EEAs)	28
II.4.1) Rôles des EEAs pour les biofilms et dans leur gestion de la MOD (Matière Organique Dissoute) dans l’écosystème	28
II.5) Interactions microbiennes dans le biofilm.....	32
III) POLLUTION PLASTIQUE EN RIVIERE	36
III.1) L’ère du plastique.....	36
III.2) Pollution plastique dans les écosystèmes aquatiques	46
III.2.1) Sources	46
III.2.2) Persistance	48
III.2.3) Flux entre les écosystèmes	49
III.3) Pollution plastique en rivière	51
III.3.1) Quantitativement.....	51
III.3.2) Qualitativement	59
III.4) Les plastiques <i>Low-Density Polyethylene</i> (LDPE) et <i>Biodegradable BioBased-plastic</i> (BDBP) : production, utilisation et composition.....	60
III.5) Plastisphère.....	65
III.6) Impact structurel et fonctionnel de la pollution plastique sur les communautés microbiennes aquatiques.....	68
OBJECTIFS ET HYPOTHESES	88
<i>COLONIZATION - “COMPARISON OF MICROBIAL COLONIZATION BETWEEN NATURAL AND PLASTIC SUBSTRATA IN A POLLUTED WATERSHED”</i>	<i>91</i>
I) Abstract	96
II) Introduction.....	97

III) Materials and methods	100
III.1) Experimental design.....	100
III.2) Water physicochemical characteristics.....	102
III.3) Plastics pollution characterization	102
III.4) Microbial density.....	103
III.5) Microbial diversity.....	104
III.6) Extracellular Enzyme Activities.....	105
III.7) Data analyses.....	105
IV) Results.....	106
IV.1) Water physicochemical characteristics.....	106
IV.2) Characterization of plastics pollution	107
IV.3) Microbial densities.....	109
IV.4) Extracellular enzymatic activities.....	111
IV.5) Microbial diversity	113
IV.6) Relationships between structure and function in microbial communities.....	116
V) Discussion.....	118
VI) Acknowledgments.....	122
VII) Supplementary material and data	122
<i>IMPACT – “ASSESSING THE EFFECTS OF PLASTICS CONTAMINATION ON THE STRUCTURE AND FUNCTION OF STREAM MICROBIAL COMMUNITIES”</i>	<i>130</i>
I) Abstract.....	131
II) Introduction.....	132
III) Materials and methods	137
III.1) Experimental design.....	137
III.2) Water physical and chemical characteristics	139
III.3) Nutrient uptake	140
III.4) Extracellular Enzyme Activities measurements	140
III.5) Microbial density measurements.....	141
III.6) Microbial diversity.....	142
III.7) Data analyses.....	143
IV) Results.....	144
IV.1) Water physicochemical characteristics.....	144
IV.2) Extracellular Enzyme Activities for sediments and rocks.....	145
IV.3) Microbial biomass for sediment and rocks.....	150
IV.4) Upscaling enzyme activities and biomass in the microcosms	152
IV.5) Nutrient uptake at the channel level	156

IV.6) Microbial communities' diversity.....	157
V) Discussion.....	162
V.1) <i>Impact of plastics on sediment and rock biofilm structure and function</i>	162
V.2) <i>Impact of plastic on the microbial biomass and functions of the whole microcosm</i>	165
VI) Conclusion.....	167
VII) Supplementary data.....	169
DISCUSSION GENERALE	178
I) Contexte de la contamination plastique dans les cours d'eau anthropisées : l'exemple de la rivière Artière	179
II) Colonisation microbienne des macroplastiques en écosystème fluvial	182
III) Impact de l'ajout de plastique sur les communautés microbiennes des sédiments et des rochers	185
IV) Différence de colonisation et d'impact entre le plastique dit « non-biodégradable » et le plastique dit « biodégradable ».....	187
V) Impact à l'échelle d'un microcosme entier et quid de l'impact réel à l'échelle d'un écosystème	189
PERSPECTIVES et GESTION ET PREVENTION DE LA POLLUTION PLASTIQUE.....	192
I) PERSPECTIVES.....	193
I.1) En termes de réponse structurelle.....	193
I.2) En termes de réponse fonctionnelle	193
I.3) En termes d'échelle de temps et d'interaction avec les facteurs environnementaux	194
I.4) En termes d'échelle de taille des plastiques	194
I.5) Les feuilles	195
I.6) Impact différentiel entre sites.....	195
II) GESTION ET PREVENTION DE LA POLLUTION PLASTIQUE.....	198
COMMUNICATIONS ORALES, POSTERS, PUBLICATIONS ET FORMATIONS PRINCIPALES.....	204
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	207
ANNEXES.....	241
Résumé court	245
Short abstract	246

INTRODUCTION GENERALE ET OBJECTIFS

Les systèmes fluviaux, riches en vie et notamment en microorganismes, sont des écosystèmes dynamiques essentiels à de nombreux processus écologiques. Ils sont d'autant plus importants qu'ils occupent une vaste surface sur Terre, qui a d'ailleurs été estimée à $773\,000 \pm 79\,000$ kilomètres carrés correspondant à environ 0.58 ± 0.06 % de la surface terrestre non recouverte par les glaces, par Allen and Pavelsky (2018). Ces milieux aquatiques abritent une grande diversité de microorganismes, dont la plupart se trouvent sous forme de biofilms ; forme particulièrement dominante dans les cours d'eau d'ordre inférieure. Les biofilms d'eau douce sont des entités complexes qui se forment lorsque des microorganismes, tels que les bactéries, les champignons, les algues et les protistes, adhèrent à des surfaces solides de nature très diverse. Parmi les différents substrats benthiques colonisables par les biofilms, on retrouve notamment les substrats d'origine minérale tels que les sédiments et des rochers et les substrats d'origines végétales comme les feuilles, le bois ou les macrophytes. Ces structures en biofilm abritent une diversité biologique impressionnante, englobant différents règnes du vivant, et jouent un rôle essentiel dans les cours d'eau et les milieux aquatiques (Battin *et al.* 2016). Ces entités sont de véritables centres d'interactions microbiennes complexes. Ces interactions jouent un rôle crucial dans l'influence des processus biogéochimiques environnementaux, notamment avec la production primaire ou encore avec la décomposition de la matière organique. Ce dernier rôle est médié par les activités enzymatiques extracellulaires (Allison and Vitousek 2005; Penton and Newman 2008). Les biofilms, surtout dans leurs premiers stades de développement, constituent des foyers importants d'activité enzymatique microbienne extracellulaire, qui persiste au fil du temps et contribuent largement au métabolisme global de la communauté (Romaní *et al.* 2008) et par extension de l'écosystème fluvial (Battin *et al.* 2016).

Pour les microorganismes vivant dans les biofilms, la production d'enzymes extracellulaires vise à acquérir des éléments nutritifs essentiels tels que le carbone ou l'azote pour leur croissance et leur reproduction (Chróst 1991). Plus largement, les enzymes extracellulaires visent à acquérir les éléments nutritifs contenus dans le pool de matière organique dissoute et particulaire. Au-delà de répondre à leurs propres besoins nutritionnels et donc à l'utilisation des ressources, les microorganismes des biofilms produisent des enzymes extracellulaires participant au recyclage des éléments nutritifs. Ces enzymes sont capables de décomposer des composés organiques complexes en formes plus simples, facilitant le recyclage et l'utilisation des éléments nutritifs au sein de la communauté

microbienne des biofilms. Par exemple, certains microorganismes utilisent des enzymes telles que la β -glucosidase pour décomposer les chaînes de cellulose en monomères de glucose plus petits (Berlemont and Martiny 2013). L'enzyme N-acétyl-glucosaminidase est responsable de la décomposition des complexes de chitine en monomères essentiellement azoté mais aussi carboné (Gooday 1990), tandis que la phosphatase hydrolyse le phosphore inorganique présent dans la matière organique, décomposant les phospholipides et les esters phosphatés (Torriani 1960; Karl 2000). Ces enzymes sont produites par les microorganismes pour puiser dans les principaux réservoirs de carbone (C), d'azote (N) et de phosphore (P) présents dans les polymères organiques complexes issus de la matière organique allochtone, comme les feuilles ou le bois, et autochtone issue de la production primaire et secondaire.

Les cours d'eau ne sont pas à l'abri des pollutions anthropiques telles que l'eutrophisation, la présence de xénobiotiques (ex. pesticides, antibiotiques) ou encore la pollution plastique. Des travaux ont montré que ces pollutions anthropiques peuvent avoir un impact sur les activités enzymatiques microbiennes, et potentiellement sur les cycles biogéochimiques dans les cours d'eau (e.g. Artigas, et al. (2012), Rossi et al. (2019)). Néanmoins, des informations sur la vulnérabilité des communautés microbiennes aquatiques à la pollution plastique et spécifiquement sur leur rôle dans le processus hétérotrophe de décomposition de la matière organique manquent.

Depuis leur découverte et leur production de masse au cours de la première moitié du 20^e siècle, les polymères plastiques n'ont cessé de voir leur production mondiale augmenter (Thompson *et al.* 2009). Aujourd'hui, la pollution plastique est présente dans tous les compartiments environnementaux (eau, air et sol), mais les écosystèmes fluviaux, en tant que sites de préoccupation particulière, sont considérés comme des points chauds de la pollution plastique en raison de leur rôle à la fois de puits de cette pollution et de vecteurs, la transportant vers les océans (Windsor *et al.* 2019). Des corrélations solides ont été observées entre les quantités de plastique et la densité de population humaine, l'urbanisation et la gestion des déchets dans les bassins versants (Best 2019). Des polymères plastiques de différentes natures (polyéthylène, polystyrène, polypropylène, polyamide, entre autres) et de différentes tailles sont présents dans les rivières du monde entier (van Emmerik and Schwarz 2019). La diversité de taille, de forme et de nature chimique des plastiques qui se retrouvent

dans les rivières en fait une pollution particulièrement complexe en termes de caractérisation, de quantification et d'étude d'impact sur les organismes. La nature du plastique retrouvé dépend principalement des activités anthropiques dans le bassin versant, tandis que la taille dépend de la production de départ mais aussi de l'état de dégradation du polymère. Actuellement, la pollution par les microplastiques a été plus largement étudiée que la pollution par les macro- et mésoplastiques dans les milieux aquatiques (Blettler *et al.* 2018) ou même par rapport à la pollution aux nanoplastiques qui correspond à une recherche encore plus récente (Miao *et al.* 2019b; Du *et al.* 2022; Holzer *et al.* 2022).

Lorsque les plastiques atteignent les eaux des rivières, un biofilm commence à s'y développer. La plastisphère, c'est-à-dire la communauté microbienne colonisant les débris plastiques, a été bien décrite dans l'environnement marin (Zettler, Mincer and Amaral-Zettler 2013; Amaral-Zettler, Zettler and Mincer 2020). La plastisphère est caractérisée par un assemblage de communautés microbiennes composé de bactéries, de diatomées, cyanobactéries, de protozoaires et de champignons tout comme les substrats naturels (Amaral-Zettler, Zettler and Mincer 2020). La composition taxonomique microbiennes et les fonctions relatives au recyclage du carbone, de l'azote et du phosphore peuvent diverger pour certains taxons entre les substrats naturels et plastiques (Miao *et al.* 2019, 2020, 2022; Li *et al.* 2021; Chaudhary *et al.* 2022; Du *et al.* 2022).

Des études menées dans l'écosystème marin ont conclu que la composition de la communauté microbienne sur les plastiques est influencée à la fois par les caractéristiques environnementales, mais aussi par la nature du substrat, et qu'une petite proportion de taxons sont spécifiques aux polymères plastiques (Barros and Seena 2021; Bryant *et al.* 2016; Harrison *et al.* 2018; Ogonowski *et al.* 2018; Pinnell and Turner 2019; Zettler, Mincer, and Amaral-Zettler 2013). Les études menées dans les environnements marins indiquent que les débris plastiques peuvent affecter les processus comme le cycle de l'azote. Par exemple, Seeley *et al.* (2020) montrent que les sédiments amendés avec de la mousse de polyuréthane (PUF) et de l'acide polylactique (PLA) favorisent les processus de nitrification et de dénitrification et que les sédiments amendés avec du polychlorure de vinyle (PVC) inhibent ces deux processus associés au cycle de l'azote. Tu *et al.* (2021) ont observé que les biofilms marins abritent des bactéries dégradant les plastiques, ce qui modifie les groupes fonctionnels et l'hydrophobicité de surface, et améliore ainsi la colonisation et la biodégradation des microplastiques.

Cependant, bien moins de recherches ont été effectuées dans les écosystèmes fluviaux vis-à-vis de l'écosystème marin. Des études récentes indiquent que la colonisation microbienne des plastiques dans les rivières peut entraîner une colonisation accrue de biofilm ainsi qu'agir comme réservoirs et transporteurs de gènes de résistance aux antibiotiques (Liu *et al.* 2021; Martínez-Campos *et al.* 2023).

A notre connaissance, les changements fonctionnels et structuraux pendant la colonisation microbienne des plastiques dans les écosystèmes aquatiques d'eau douce ont relativement peu été examinés et, comme l'indiquent Amaral-Zettler, Zettler, and Mincer (2020), la diversité fonctionnelle et la capacité métabolique des microorganismes trouvés dans la plastisphère ne sont pas bien comprises. Dans les rivières et les ruisseaux, le biofilm benthique se développant sur des substrats minéraux (rochers, galets, sédiments) et organiques (tel que la litière de feuilles, le bois, les macrophytes) joue un rôle clé dans le fonctionnement global de l'écosystème (Battin *et al.* 2016). Par conséquent, nous pouvons nous interroger sur l'influence du substrat plastique sur le développement d'une communauté microbienne et si cela peut affecter la structure et le fonctionnement d'autres communautés microbiennes colonisant d'autres substrats benthiques présents naturellement dans l'écosystème fluvial. A terme, nous pouvons également nous interroger sur les impacts de la présence de plastiques à plus grande échelle sur le fonctionnement biogéochimique d'un cours d'eau entier.

La présence de déchets plastiques dans les écosystèmes fluviaux ainsi que la méconnaissance des relations et des impacts de cette pollution sur les communautés microbiennes d'eau douce ont motivé les deux grands objectifs de cette thèse.

Dans notre première étude, nous avons comparé la colonisation microbienne entre substrats plastiques et substrats naturels *in situ*, dans deux sites de rivière ayant des niveaux de pollution plastique différents. Nous avons évalué les différences de densité, de diversité, et d'activités microbiennes entre substrats et sites. L'objectif était de comprendre comment les biofilms se forment sur les plastiques, par rapport aux substrats naturels, en comparant deux types de plastiques. En tant que substrats naturels, nous avons utilisé du sédiment, des feuilles et des lames de verre dépolies de surface connu, servant de proxy de rochers. Nous avons choisi un plastique dit non biodégradable ; le LDPE (*Low Density Polyethylene* ou

Polyéthylène base densité) et un plastique dit biodégradable ; le BDBP (*Biodegradable BioBased-plastic* ou Bioplastique biodégradable). Ainsi, nous avons examiné les variations de colonisation entre le site amont (non contaminé aux macroplastiques) et le site aval (contaminé aux macroplastiques) du bassin versant, en considérant qu'une adaptation à la pollution plastique pourrait exister au sein des communautés microbiennes du site aval pollué.

Dans notre seconde étude, nous avons évalué l'impact de la présence des deux types de plastiques utilisés dans la première étude sur la structure et sur le fonctionnement des biofilms microbiens naturels se formant dans les sédiments et à la surface de lame de verre dépolies (proxy de rochers), et ceci en présence et en absence de feuilles, en microcosmes de rivière en laboratoire. L'ajout de litière de feuille aux microcosmes a permis de mimer la chute de feuilles se retrouvant dans les cours d'eau et nous a également permis de comparer si les potentiels effets des plastiques étaient similaires ou non en absence ou en présence de feuilles. Nous avons mesuré les changements dus à la présence de plastiques sur les densités, la diversité et l'activité microbiennes des communautés de sédiments et des rochers. À l'échelle du microcosme, l'ajout de plastiques en tant que substrat benthique, en remplacement des substrats naturels, a aussi été examiné.

ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

I) ECOSYSTEME DE RIVIERE

I.1) Importance socio-économique et écologique

Les cours d'eau ont une haute importance socio-économique et écologique en fournissant bon nombre de services écosystémiques. Ils sont la source d'un approvisionnement en eau potable pour de nombreuses régions du monde et garantissent une irrigation cruciale pour l'industrie qui utilise ces eaux douces pour le refroidissement et/ou pour le nettoyage de certains équipements industriels, pour certains processus de fabrication (notamment dans les industries chimiques et métallurgiques), mais aussi pour le transport de marchandises et la production d'énergie. Les cours d'eau sont également une source d'irrigation vitale pour l'agriculture qui utilise ces eaux douces pour l'arrosage des terres agricoles permettant la production de matières premières utilisées dans de nombreuses industries agroalimentaires. En effet, les terres avoisinant les rivières sont souvent très fertiles en raison des dépôts de sédiments riches en nutriments (tels que l'azote et le phosphore), en matières organiques, en minéraux (tels que le quartz, la silice, les argiles), et en élément trace (tels que le fer, le cuivre, le zinc, le chrome, le nickel) provenant de l'érosion des sols du bassin versant. C'est ainsi que les sédiments des cours d'eau jouent un rôle indispensable en fournissant des nutriments et éléments essentiels au développement de la faune, de la flore et du monde microbien constituant l'écosystème fluvial. L'irrigation à partir des rivières permet une agriculture prospère, favorisant la production de cultures et de l'élevage. Historiquement, les rivières ont été des voies de transport déterminantes pour les marchandises et les personnes (Lévêque 2006). De nombreuses villes et zones industrielles se sont développées le long des rivières en raison de la facilité d'accès au transport fluvial (Lévêque 2019). Les rivières peuvent aussi être utilisées pour la production d'énergie hydroélectrique grâce à des barrages qui permettent de capter l'énergie de l'eau en mouvement contribuant à la production d'électricité (Lévêque 2019). Les cours d'eau peuvent également être une aire de loisirs pour la pêche et les sports nautiques, mais aussi des lieux de vie populaires en plein air et de commerces de bouche avec l'installation des premières guinguettes sur les bords de Seine datant du XVIII^e siècle qui se sont répandues au cours du XIX^e siècle. Enfin, les écosystèmes de rivières fournissent des habitats pour de nombreuses espèces animales, végétales et microbiennes. En effet, les rivières abritent une grande

diversité d'espèces aquatiques, y compris des poissons, des invertébrés et des plantes aquatiques, mais aussi des êtres unicellulaires procaryote et eucaryote dont le nombre d'espèce foisonne et contribue ainsi à la biodiversité de l'écosystème. Les rivières jouent un rôle important dans la régulation du climat et contribuent à l'équilibre des écosystèmes (Lévêque 2019). Effectivement, elles ont un rôle important dans le maintien de l'équilibre climatique en stockant du carbone, en épurant l'air, en régulant les températures locales et en participant au cycle de l'eau.

Ces écosystèmes sont d'autant plus importants qu'ils occupent une très grande place au sein de la biosphère. En 2013, la surface totale des rivières avait été sous-évaluée (Downing *et al.* 2012; Raymond *et al.* 2013). En 2018, Allen and Pavelsky (2018) ont estimé les rivières et les ruisseaux à une surface terrestre totale d'environ 773 000 ± 79 000 kilomètres carrés correspondant à environ 0.58 ± 0.06 % de la surface terrestre non recouverte par les glaces. L'importance des eaux courantes continentales réside dans leur participation aux cycles biogéochimiques, comme celui du carbone, dû au métabolisme aquatique (Bastviken *et al.* 2011; Raymond *et al.* 2013; Hotchkiss *et al.* 2015; Butman *et al.* 2016). La [Figure 1](#) propose une superbe vue d'ensemble des cours d'eau de la France et illustre ainsi la prédominance des systèmes fluviaux à l'échelle d'un pays.

La santé des rivières et de leurs écosystèmes associés est cruciale pour maintenir ces services écosystémiques. La dégradation des cours d'eau peut entraîner la perte de biodiversité, la dégradation de la qualité de l'eau et des impacts négatifs sur les communautés dépendantes des services fournis par les rivières. La conservation et la gestion durable des bassins versants sont donc essentielles pour préserver ces services écosystémiques.

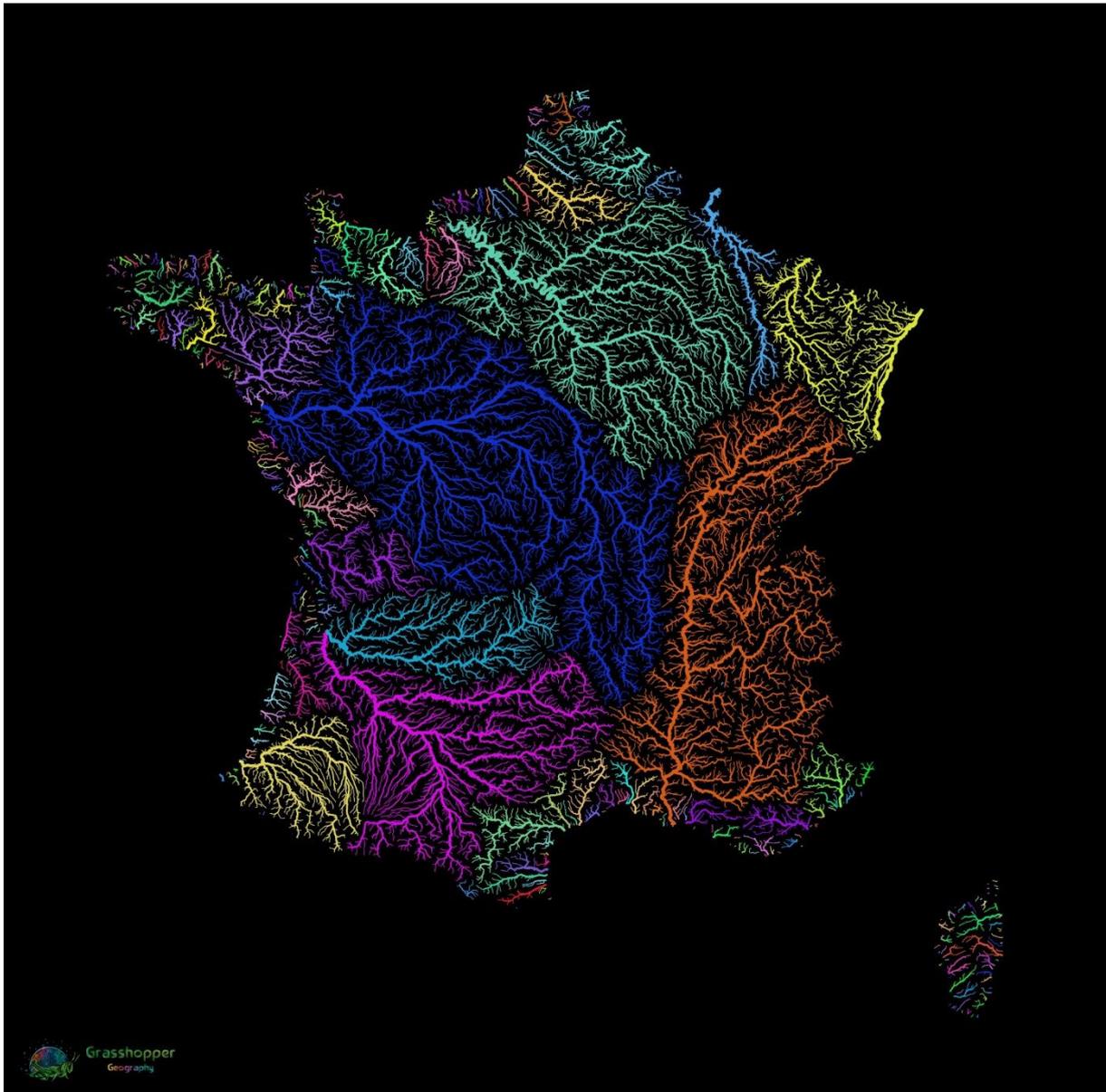


Figure 1 : Carte de France des bassins hydrographiques par Grasshopper Geography. Tous les flux d'eau permanents et temporaires sont cartographiés en détail. Les couleurs permettent de distinguer les différents bassins versants. (Crédit : Robert Szucs, source : www.grasshoppergeography.com)

Le concept de « Continuum fluvial » (« *River Continuum Concept : RCC* ») énoncé par Vannote *et al.* (1980) vise à caractériser un réseau fluvial régi par des facteurs abiotiques et biotiques s'influçant mutuellement et traduit un système fluvial soumis à un équilibre « dynamique ». Ce concept décrit que les flux d'eaux qui commencent en amont et se terminent en aval sont soumis à un gradient continu de paramètres physiques qui ont un impact direct sur les êtres vivants qui les habitent. En effet, les caractéristiques physiques du cours d'eau façonnent les caractéristiques structurelles et fonctionnelles des communautés biotiques de ce dernier présentant une hétérogénéité spatiale et temporelle. Les caractéristiques physiques qui ont une telle influence, peuvent être les courants avec un débit plus ou moins élevé avec des zones de turbulences qui ont un impact très localisé sur l'oxygénation de l'eau, créant par endroit des micro-environnements avec des ensembles d'espèces se développant en zone oxygénique, et inversement dans les zones moins tumultueuses souvent localisées dans de petit bassin de rétention (Lawrence *et al.* 2004; Atashgahi *et al.* 2015; Yoshimura, York and Biddle 2018). Ces différences de débit et donc d'oxygénation varient en fonction : i) des saisons, avec une alternance d'épisodes de crues et de sécheresses ; ii) de la morphologie du cours d'eau, avec la présence ou non de roches plus ou moins massives, de débris végétaux, de troncs d'arbres et autre végétation. Mais aussi avec le relief plus ou moins torturé du lit de la rivière ; iii) de la localisation au sein du cours d'eau, avec une oxygénation qui sera plus ou moins importante entre l'eau, la surface des sédiments et la zone hyporhéique ; et iv) la nature des substrats qui recouvrent le lit. Ces derniers sont souvent composés de rochers et de sédiments créant des niches pour les organismes qui s'y attachent, tels que les algues et bactéries benthiques et les invertébrés.

Les caractéristiques des rives et de la ripisylve de la rivière, telles que la végétation riveraine (riparienne), les zones humides adjacentes et les obstacles naturels, contribuent à la structure de l'habitat aquatique. La turbidité de l'eau, qui varie en fonction de la concentration de particules en suspension, affecte le passage de la lumière nécessaire à la photosynthèse des organismes photoautotrophes (Luo *et al.* 2020; Zhang *et al.* 2022c). La température de l'eau peut varier le long de la rivière et influe sur la distribution des espèces aquatiques et sur leurs taux métaboliques (Wang *et al.* 2023). L'ensemble de ces caractéristiques physiques spécifiques de la rivière interagit pour façonner les communautés biotiques qui y vivent, en

créant une mosaïque d'habitats et de conditions environnementales qui influencent la diversité et la distribution des espèces.

Le continuum fluvial forme un continuum spatial et temporel dynamique, régi par des flux de matière et d'énergie telle que la matière organique qui est elle-même soumise à des périodes de renouvellement, de transport, de stockage et d'utilisation par les organismes producteurs et consommateurs. Par exemple en amont, le cours d'eau est essentiellement amendé en matière organique allochtone ce qui favorise le métabolisme hétérotrophe, tandis qu'à l'aval, le lit du cours s'élargit permettant ainsi l'entrée de lumière ce qui favorise le métabolisme autotrophe. De plus, la conceptualisation du fonctionnement d'un cours d'eau, selon Vannote, souligne que les assemblages en espèces et les apports en matière organique le long du cours d'eau varient non seulement de l'amont vers l'aval, mais qu'ils varient également localement en fonction des sections de la rivière, et aussi ponctuellement en fonction des événements climatiques (ex. sécheresse, crues). De ce fait, il y introduit le concept d'invariance temporelle qui fait ainsi varier les successions d'organismes autotrophes et hétérotrophes dans le cours d'eau (Vannote *et al.* 1980). Les caractéristiques physico-chimiques et les structures des communautés biologiques varient entre le tronçon de tête de bassin et d'embouchure, ainsi qu'en fonction de la taille des cours d'eau et des événements climatiques saisonniers ou ponctuels. Ces éléments doivent être pris en compte pour étudier le fonctionnement des cours d'eau, car ils sont à la fois distincts et interconnectés.

Afin de mieux comprendre la variabilité des cours d'eau, il est essentiel d'explorer les concepts qui décrivent leurs caractéristiques physico-chimiques et biologiques en constante évolution. Cette variabilité intrinsèque des cours d'eau peut être observée à différents niveaux de hiérarchisation des affluents créant des habitats uniques. Ces niveaux de hiérarchisation sont exprimés par une classification couramment utilisée pour les cours d'eau et qui est faite sur la base d'une classification mathématique reposant sur le nombre de Strahler, qui a été appliquée pour la première fois en hydrologie par (Strahler 1952), puis par R. E. Horton (1955) et Strahler (1957). Cette classification repose sur la hiérarchisation des affluents en fonction de l'endroit où ils se ramifient les uns avec les autres. Les jonctions appelées nœuds, délimitent les cours d'eau de différents ordres. Les cours d'eau non ramifiés sont ceux du premier ordre, les cours d'eau qui sont formés à partir de deux cours d'eau de premier ordre

forment ceux du second ordre, et les cours d'eau qui sont formés à partir de deux cours d'eau du second ordre forment ceux du troisième ordre etc. (Strahler 1957), [Figure 2](#). Ce chiffre donné à chaque cours d'eau est appelé « l'ordre de Strahler ».

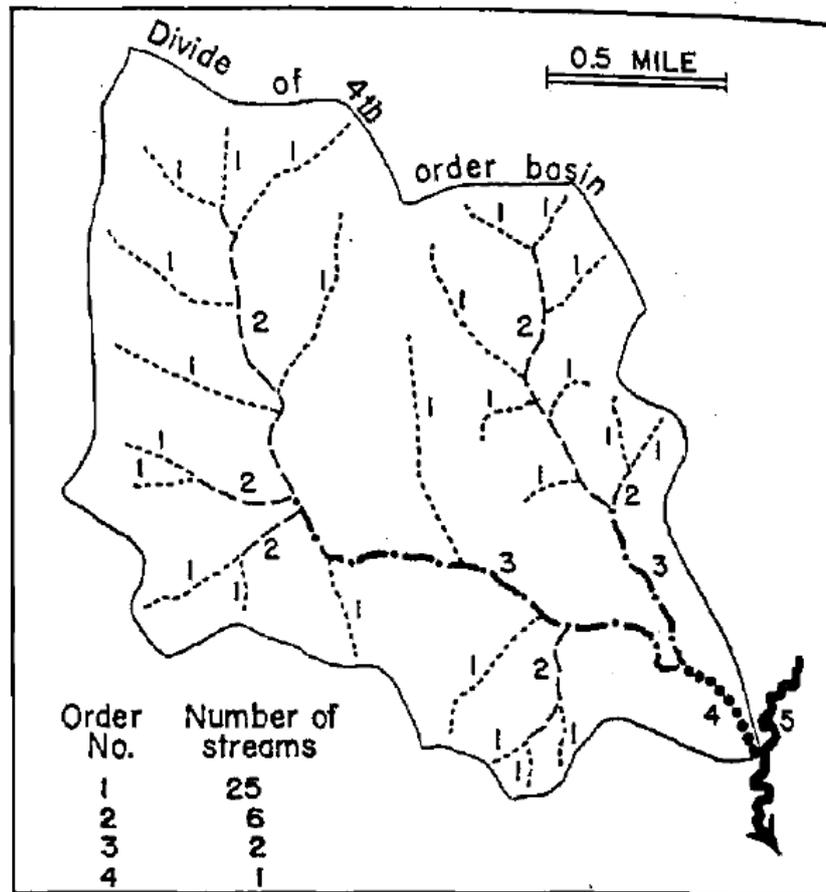


Figure 2 : Méthode de Strahler de désignation des ordres de cours d'eau. (Issue de Strahler (1957)).

Selon cette classification, les cours d'eau peuvent être regroupés en trois grandes catégories : les têtes de bassin (ordre de Strahler 1 à 3), les cours d'eau de taille moyenne (Strahler 4 à 6) et les grandes rivières (Strahler > 6) (Vannote *et al.* 1980). Cette classification découle de la topographie et de la géologie du bassin versant ainsi que de sa végétation et des mouvements des masses d'eau. Les variables physiques et chimiques au sein d'un cours d'eau, telles que la largeur, la profondeur, la vitesse, le débit, la température et le gain d'entropie,

varient de manière continue du segment amont au segment aval du cours d'eau. Et en fonction de ces caractéristiques, on trouvera des apports en lumière, oxygène et matière organique différent et cela aura une influence sur le type métabolique microbien dominant du cours d'eau.

Le concept de continuum fluvial peut être mis en lien avec l'ordre du cours d'eau de Strahler et à son application dans le microbiote de la rivière. En effet, le concept de continuum fluvial suggère que lorsque les rivières augmentent en taille (ordre), l'impact des apports de la zone riparienne diminue progressivement (Vannote *et al.* 1980). En d'autres termes, à mesure qu'une rivière s'élargit, elle devient moins dépendante des influences extérieures, car elle développe une plus grande diversité biologique à l'intérieur de la colonne d'eau. Initialement, à mesure que la complexité de l'ordre des ruisseaux augmente (c'est-à-dire que la rivière reçoit de plus en plus d'affluents et devient plus complexe), la diversité biologique augmente également (Vannote *et al.* 1980).

Le cours d'eau étudié durant mes travaux de thèse est la rivière Artière, affluent de la rivière Allier (sous-affluent de la Loire) s'écoulant dans le département du Puy-de-Dôme (région Auvergne-Rhône-Alpes) (Figure 3). L'Artière appartient à l'ordre 3 de Strahler et est donc considérée comme un cours d'eau de tête du bassin versant de la Loire.

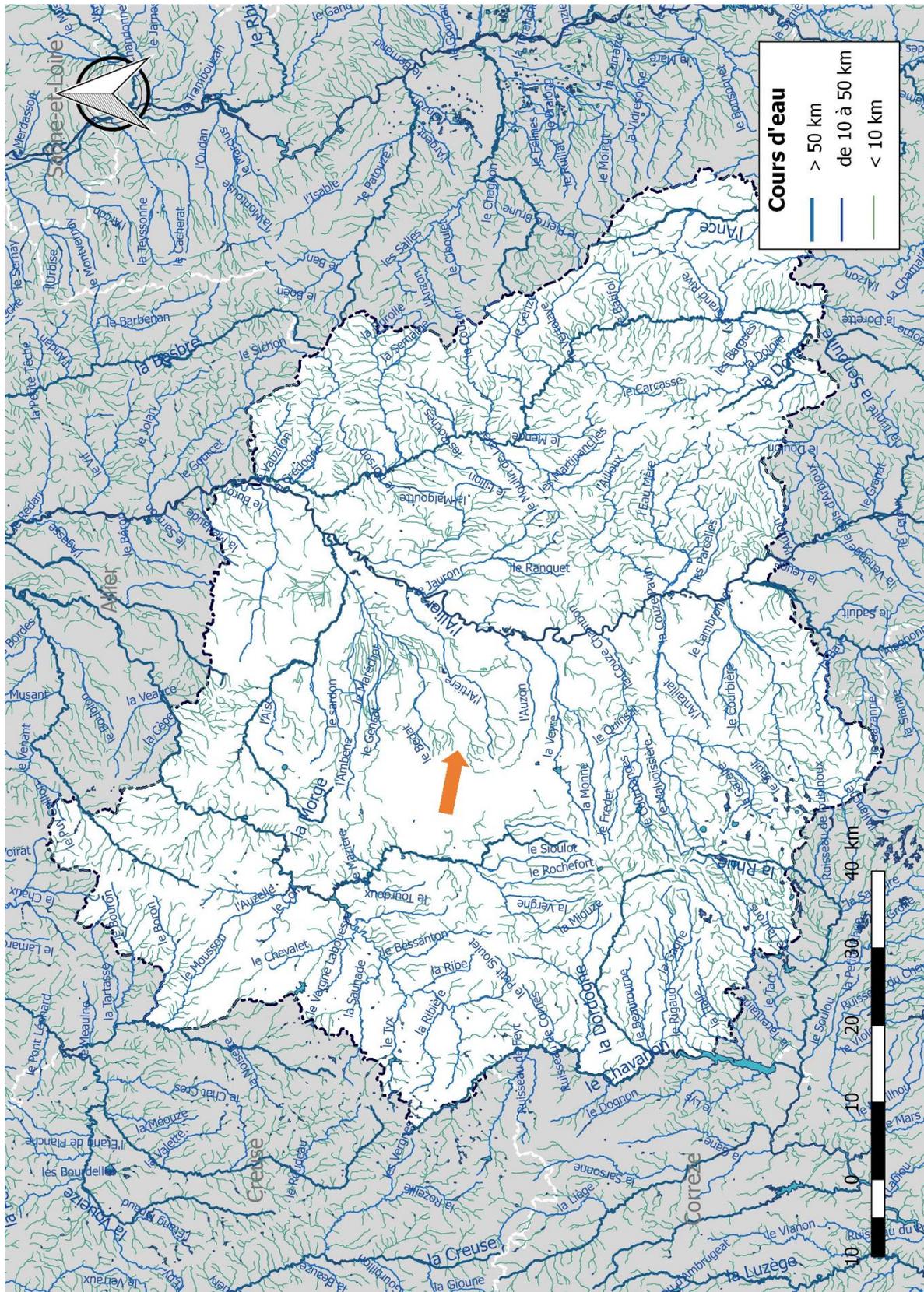


Figure 3 : Carte hydrographique du Puy-de-Dôme Région Auvergne-Rhône-Alpes, France. La flèche orange pointe la rivière Artière de troisième ordre affluent de l'Allier. Source : <https://gifex.com/fr/fichier/carte-hydrographique-du-puy-de-dome/> (Consulté en septembre 2023).

I.2) Importance dans les cycles biogéochimiques

Les rivières, ces voies d'eau qui serpentent à travers les paysages, possèdent un rôle dynamique bien au-delà de leur apparence tranquille. Au sein de ces cours d'eau, d'innombrables processus complexes interagissent pour maintenir l'équilibre des écosystèmes environnants et participent activement aux cycles biogéochimiques. La façon dont les rivières transportent, décomposent et redistribuent la matière organique joue un rôle essentiel dans la santé des environnements aquatiques et terrestres.

Les rivières reçoivent et drainent de la matière organique qui est généralement classée en fonction de sa taille : > 1 mm : MOPG (Matière Organique Particulaire Grossière) ; $\approx 0.45 \mu\text{m}$ - 1 mm : MOPF (Matière Organique Particulaire Fine) ; < 0.45 μm : MOD (Matière Organique Dissoute (Weigelhofer and Waringer 1994; Karlsson, Richardson and Kiffney 2005)). Une fois dans l'eau, la matière organique (MO) est soumise à des transformations comme sa décomposition et à des flux tels que l'import, le transport, l'export, la rétention. L'apport de la MO varie en fonction de l'ordre des cours d'eau comme décrit précédemment. On distingue deux types de MO ; l'allochtone et l'autochtone.

1.2.1) Matière organique allochtone

La MO allochtone fait référence à la matière organique d'origine extérieure à l'écosystème, qui est donc apportée depuis des sources externes. La matière organique particulaire peut provenir de sources végétales telles que les feuilles tombées des arbres et arbustes caduques, ou encore des aiguilles ou pomme de Pin provenant des arbres persistants environnants, les débris végétaux transportés par les rivières depuis les terres environnantes comme les parties florales, les bois et écorces, les fruits, et d'autres parties des végétaux susceptibles de tomber dans l'eau (Bray and Gorham 1964; Benfield 1997), ou d'autres matières organiques qui entrent dans l'écosystème à partir de régions extérieures comme par exemple des dépôts atmosphériques de MO transportés par le vent ou des apports anthropiques issues de l'agriculture. L'apport de matière organique allochtone peut jouer un rôle important dans les cycles biogéochimiques et dans le fonctionnement des écosystèmes en fournissant des sources de matière et d'énergie pour les organismes vivants et en

particulier dans les cours d'eau boisés. Pour les rivières situées en régions tempérées, l'apport en matière organique dépend des saisons, avec une plus forte activité de chute de feuilles en automne, représentant de 64 à 78 % des apports allochtones particuliers annuels (Conners and Naiman 1984), et lors de forts stress hydriques, par exemple en cas de sécheresse. Cet apport dépend également de la section de la rivière plus ou moins large et donc plus ou moins bordée de végétation riveraine. En effet, selon Conners et Naiman (1984), l'apport de litière par chute diminue de façon exponentielle avec l'augmentation de l'ordre de Strahler du cours d'eau. En revanche, l'apport latérale dépend de la structure des rives et des crues au printemps apportant un taux de matière organique plus important (Conners and Naiman 1984). L'apport de la matière organique des rivières en régions tempérées dépend aussi du taux d'urbanisation et des terres agricoles environnantes (Harding *et al.* 1998; Dalzell, Filley and Harbor 2005; Vaughn *et al.* 2021).

Néanmoins, le pool en matière organique principal dans les cours d'eau est composé de matière organique dissoute. Par exemple, il a été rapporté que la MOD de deux rivières canadiennes représentait 80 % de l'exportation de la matière organique et 15 % pour la MOPF (Karlsson, Richardson and Kiffney 2005). Les ruissellements de surface et souterrains de l'eau à travers le bassin versant entraînent avec eux des solutés qui proviennent des roches et des végétaux. En effet, la MOD provient notamment du sol riverain et son apport dépend de l'hydrologie du bassin versant (Fiebig, Lock and Neal 1990). La lixiviation des sols riverains apporte une partie non négligeable de la MOD dans les cours d'eau qui est ensuite minéralisée grâce à l'activité microbienne en CO₂ et en nutriments comme l'azote, le phosphore, le potassium (Drake *et al.* 2015). Les macroinvertébrés ont un rôle indirect dans cette production de MOD puisqu'ils transforment la MOPG en MOPF.

1.2.2) Matière organique autochtone

Le second type d'apport de MO est d'origine autochtone et désigne la matière organique qui est produite à l'intérieur de l'écosystème, résultant des processus biologiques et chimiques qui s'y déroulent. Cette matière organique est générée par les organismes vivants présents dans l'écosystème, tels que les plantes, les algues et les micro- et

macroorganismes, par le biais de processus de production primaire et secondaire. Dans les cours d'eau, la plupart de la matière organique autochtone provient des producteurs primaires capables de faire la photosynthèse.

Contrairement à la matière organique allochtone, la matière organique autochtone reste intrinsèquement liée aux interactions biologiques et aux cycles de vie propres à l'écosystème aquatique. Parmi les différentes fractions de MO, la quantité de MOD dans un cours d'eau dépend de son environnement direct et notamment de l'accès à la lumière. En effet, plus l'ordre de la rivière sera élevé plus l'ombrage sera faible et la fraction de MOD autochtone sera plus importante que la MOD allochtone (Brett *et al.* 2017). Cette MOD est ensuite intégrée dans le réseau trophique à commencer par son utilisation par les microorganismes hétérotrophes comme les bactéries où les champignons constituant les biofilms (Risse-Buhl *et al.* 2012).

Outre la lumière, d'autres facteurs environnementaux tels que les nutriments, la température et le régime hydrologique peuvent également influencer la production de MOD autochtone. Par exemple, une disponibilité accrue en nutriments, comme l'azote et le phosphore, peut stimuler la croissance des algues et la photosynthèse, augmentant ainsi la contribution de la MOD autochtone (Yang *et al.* 2008). De même, la température de l'eau joue un rôle majeur dans la régulation des taux de production primaire et de décomposition de la matière organique (Martínez *et al.* 2014), avec des températures plus élevées favorisant généralement des taux plus rapides de processus biologiques.

La composition relative de la matière organique dissoute dans les cours d'eau est donc le résultat d'interactions complexes entre la végétation riveraine, les conditions environnementales telles que la lumière, les nutriments et la température, ainsi que les cycles biogéochimiques locaux. Comprendre comment ces facteurs influencent la production de matière organique autochtone est essentiel pour évaluer l'état de santé des écosystèmes aquatiques et pour orienter les efforts de gestion visant à préserver la qualité de l'eau.

Les systèmes fluviaux continentaux constituent un réseau qui relie les écosystèmes entre eux et qui draine le paysage tel le xylème et le phloème d'un arbre conduisant l'eau, les

minéraux et nutriments essentiels à sa vie. En fin de compte, les rivières se révèlent être bien plus que des cours d'eau pittoresques. Leur rôle fondamental dans les cycles biogéochimiques transcende leurs eaux mouvantes pour influencer les écosystèmes adjacents et lointains. La dynamique complexe entre la matière organique et les processus qui la guident, des apports végétaux aux transformations microbiennes, façonne la vie le long des berges et au-delà. Le concept de ces voies d'eau comme les vaisseaux du paysage, transportant et distribuant les éléments vitaux, reflète la connexion profonde entre les cours d'eau et les écosystèmes terrestres, révélant ainsi leur rôle essentiel dans la préservation de l'équilibre biogéochimique de la biosphère.

II) BIOFILMS

Les deux grands modes de vies microbiens sont l'état libre c'est-à-dire non attaché aussi appelée « planctoniques » par opposition aux formes de vie en biofilm, attaché à une surface également appelé « sessile ».

II.1) Définition du biofilm

En 1683, Antoni van Leeuwenhoek a observé des « animalcules » attachés à des surfaces immergées dans l'eau. Bien qu'il n'ait pas lui-même utilisé le terme « biofilm », ses observations ont contribué à la compréhension des communautés microbiennes qui se forment et se développent à la surface de divers matériaux et substrats dans des environnements aqueux. De plus, ces premières découvertes ont contribué aux futures recherches sur les biofilms microbiens. Le concept de biofilm a été introduit pour la première fois par le microbiologiste J. William Costerton dans les années 1970.

Le concept de biofilm se réfère à une communauté de microorganismes qui est dans la plupart des cas, multi-espèces, et même plurispécifique, dans l'environnement comme l'illustre la [Figure 4](#). Cette communauté s'attache à une surface et forme une matrice extracellulaire protectrice. Cette matrice permet aux microorganismes de coopérer, de communiquer et de résister aux conditions environnementales défavorables (Costerton, Geesey and Cheng 1978; Costerton 1995). Les biofilms ont colonisé la plupart des environnements où ils constituent des communautés généralement plurimicrobiennes qui peuvent ainsi abriter des virus, des bactéries, des champignons, des algues, des protozoaires, voire des macro-invertébrés. La formation de la matrice du biofilm induit un environnement unique et hétérogène pour les microorganismes qui permet un mode de vie dynamique du biofilm (Costerton *et al.* 1987; Hall-Stoodley, Costerton and Stoodley 2004).

Les biofilms, et le mode de vie qui en résulte, se construisent selon des étapes précises et définies, produisant une communauté hétérogène dans l'espace et dans le temps. L'établissement d'un biofilm, suit quatre grandes étapes qui sont : 1. l'adhésion réversible à un support ; 2. La croissance avec la sécrétion des substances polymériques extracellulaires (*extracellular polymeric substances* ou EPS) pour l'attachement dit irréversible au support ; 3. la maturation avec la formation de microcolonies devenant un biofilm établi ; 4. la

dissémination (Figure 5). La matrice extracellulaire est formée d'EPS qui est constituée majoritairement de polysaccharides mais aussi de protéines, d'acides nucléiques, et de lipides (Flemming, Neu and Wozniak 2007; Kumari *et al.* 2018). Les EPS confèrent aux biofilms leur stabilité mécanique du fait de la contrainte exercée par l'environnement dans lequel les microorganismes évoluent, favorisant leur adhésion aux surfaces et créant un réseau de polymères cohésifs en trois dimensions (Wingender, Neu and Flemming 1999; Flemming and Wingender 2010). La matrice est produite par les organismes et englobe les cellules du biofilm, formant une structure tridimensionnelle qui permet l'adhérence et la cohésion.

Le mode de vie sous forme de biofilm est le plus répandu dans le monde microbien. Ce mode de vie attaché et regroupé confère de nombreux avantages comme une plus grande capacité à persister dans l'environnement ou à coloniser un nouveau milieu (environnement ou hôte). Le biofilm offre aussi la formation d'un réseau de communication par l'intermédiaire de différents signaux microbiens, le transfert horizontal de gènes avantageux du fait de la proximité, la protection contre certaines agressions extérieures comme par exemple à des substances chimiques ou à des antibiotiques (Karatan and Watnick 2009) mais aussi contre la dessiccation (Roberson and Firestone 1992; Potts 1994) et les rayonnements (de Carvalho 2017). Le biofilm est creusé de canaux hydriques qui assurent l'apport en oxygène et nutriments essentiels au développement microbiens (Donlan 2002). Leur hétérogénéité est également due à des gradients de lumière et d'oxygène qui favorisent l'apparition de micro-niches écologiques occupées par différents microorganismes en fonction de leur métabolisme.

Les biofilms microbiens peuvent se former sur une variété de supports et de surfaces dans divers environnements tels que les environnements aquatiques mais aussi sur les surfaces de dispositifs médicaux (Reid 1999; Vertes, Hitchins and Phillips 2012; Roberts 2013), les canalisations (Rozej *et al.* 2015) et d'autres surfaces exposées à l'eau ou à l'humidité comme par exemple les coques de bateau (Zardus *et al.* 2008).

Au sein de la matrice d'EPS, les microorganismes secrètent de grandes quantités d'enzymes extracellulaires dont beaucoup sont impliquées dans la dégradation des biopolymères. Ces enzymes constituent une sorte de système digestif externe qui décompose les biopolymères en produits de plus faible masse moléculaire, qui peuvent ensuite être absorbés et utilisés comme sources de matière et d'énergie par les microorganismes (Sabater *et al.* 2007; Flemming and Wingender 2010; Romaní *et al.* 2013).

Les microorganismes des biofilms produisent des enzymes exocellulaires (libres) et ectocellulaires (attachés aux cellules). La production d'enzymes extracellulaires par les champignons et les bactéries joue un rôle clé dans la décomposition de la matière organique dès les premiers stades de la formation du biofilm, avec des interactions complexes qui modulent ce processus (Romaní *et al.* 2006). Les champignons ont la capacité de décomposer des polymères végétaux complexes, tandis que les bactéries sont plus efficaces dans l'utilisation de substrats organiques simples tels que les sucres et les peptides, et lorsqu'ils se développent ensemble, les bactéries bénéficient de l'activité enzymatique des champignons, mais cela peut aussi entraîner un effet négatif sur la croissance des champignons (Romaní *et al.* 2006).

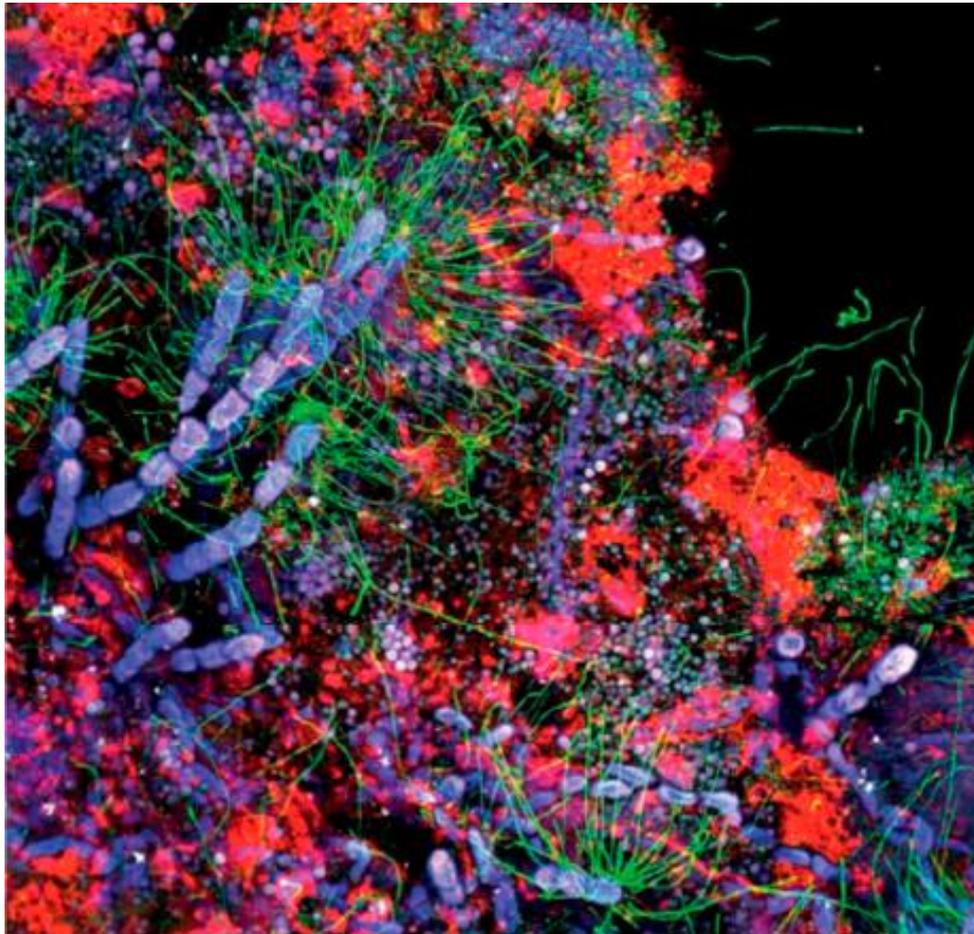


Figure 4 : Cliché de microscopie électronique à fluorescence d'un biofilm environnemental. En bleu : l'autofluorescence des algues (chlorophylle-*a*) ; en violet/blanc : l'autofluorescence des cyanobactéries. Marquage des différents éléments de la matrice : en vert : les acides nucléiques (SybrGreen) ; en rouge : les glycoconjugués type lectine. (Issue de (Flemming 2016)).

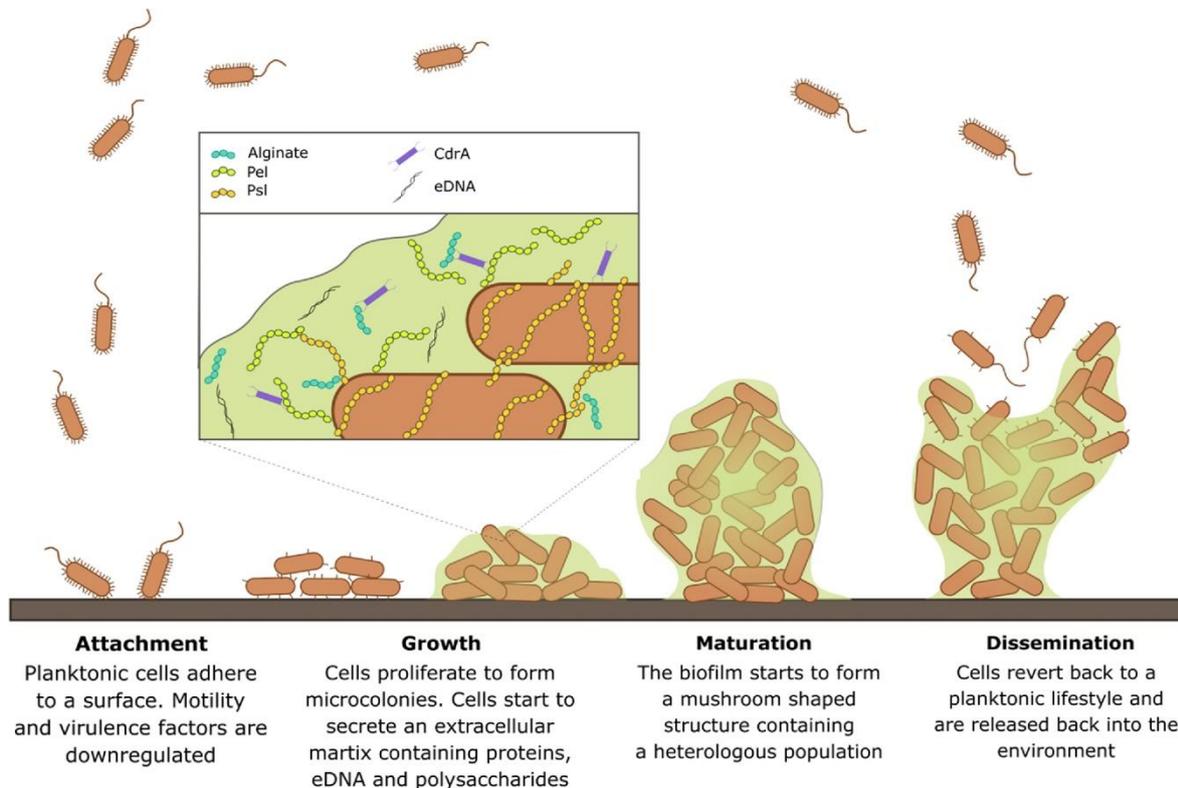


Figure 5 : Etapes de la formation d'un biofilm. La formation de biofilm commence lorsque des cellules planctoniques hautement mobiles adhèrent à une surface. Les cellules subissent des changements physiques qui impliquent la répression de l'appareil de mobilité et des facteurs de virulence tout en augmentant la production d'une matrice extracellulaire riche en exopolysaccharides. La communauté se développe pour former des structures denses en forme de champignon. En réponse à des conditions inductrices, les cellules redeviennent mobiles et se disséminent pour coloniser de nouvelles niches écologiques. (Issue de Maunders et Welch (2017)).

II.2) Biofilms microbiens en rivière

Les biofilms de rivière sont constitués de microorganismes tels que les bactéries, les algues, les champignons et les protozoaires, qui se développent à la surface des substrats immergés tels que les rochers, les sédiments, les plantes aquatiques, la litière de feuilles et le bois mort dans les cours d'eau. Cela dit, les bactéries et les champignons dominent la vie microbienne dans les cours d'eau variant selon les saisons et la localisation dans le bassin versant (Geesey *et al.* 1978; Lock *et al.* 1984).

La vaste surface de colonisation microbienne qu'offre le bassin versant (avec notamment les sédiments) et qui s'étend aux surfaces adjacentes constitue un ensemble bien illustré par le concept de peau microbienne « *microbial skin* » développé par Battin *et al.* en 2016. Cette peau microbienne correspond aux microorganismes colonisant la surface de l'ensemble du bassin versant, c'est-à-dire au niveau du cours d'eau mais aussi de la phyllosphère et du sol. La peau microbienne correspond donc à l'ensemble des biofilms colonisant le bassin versant. L'eau transporte des éléments organiques et inorganiques ainsi que des microorganismes depuis les terres environnantes vers ces biofilms. Par conséquent ce concept introduit également la nature dynamique des biofilms dans l'échange des nutriments et dans les interactions microbiennes. De ce fait, le concept souligne que les biofilms jouent un rôle crucial en absorbant, en amplifiant et en transformant les substances organiques, accumulant des éléments nutritifs précédemment dilués dans l'eau.

L'abondance des cellules microbiennes (pouvant aller jusqu'à 10^7 cellules par cm^2 de sédiment (Lock *et al.* 1984)), les interactions entre microorganismes des cours d'eau et les nutriments qui s'y écoulent et les fonctions des *consortia* microbiens font que cette peau microbienne a un rôle non négligeable dans la régulation des processus biogéochimiques dans l'écosystème dans lequel ils s'inscrivent (Battin *et al.* 2008; Beaulieu *et al.* 2011).

II.3) Biodiversité et structure des biofilms d'eau douce

Les biofilms d'eau douce constituent des écosystèmes microscopiques complexes et très riches en matière de diversité. Ils abritent tous les règnes du vivant avec des procaryotes unicellulaires (bactéries et archées); des eucaryotes unicellulaires (protistes avec les ciliés et les flagellés ainsi que des algues unicellulaires photosynthétiques); des champignons unicellulaires (levures) et des champignons pluricellulaires (champignons filamenteux); des

eucaryotes pluricellulaires de petits animaux (macroinvertébrés comme des insectes souvent à l'état d'*imago*, des escargots brouetteurs par exemple) (Amblard *et al.* 1998; Romaní *et al.* 2006, 2017; Das, Royer and Leff 2007; Dopheide *et al.* 2008; Harding *et al.* 2009; Sabater *et al.* 2016; Martinez, Nishihara and Haruta 2021; Holzer *et al.* 2022). Les biofilms des cours d'eau ont ainsi été qualifiés de « *jungle microbienne* » par Battin *et al.* (2016) tant ils sont diversifiés et couvrent d'ensemble de l'arbre de la vie avec les trois domaines microbiens : bactéries ; eucaryotes et archées (Figure 6).

La biodiversité et la structure des biofilms d'eau douce varient en fonction de nombreux facteurs environnementaux, tels que la température, la luminosité, le débit, les nutriments et la qualité de la matière organique disponible. Souvent, des effets interactifs et d'influence ont été observés entre la structure de la communauté microbienne du biofilm et le débit, la température de l'eau et la photopériode Sutton and Findlay (2003) mais aussi avec la concentration de carbone organique dissous Hullar, Kaplan, and Stahl (2006) et en fonction de la température liée aux variations saisonnières Crump *et al.* (2009), et en fonction des quantités de matière organique Freixa *et al.* (2016); Romaní *et al.* (2013); Wang *et al.* (2022).

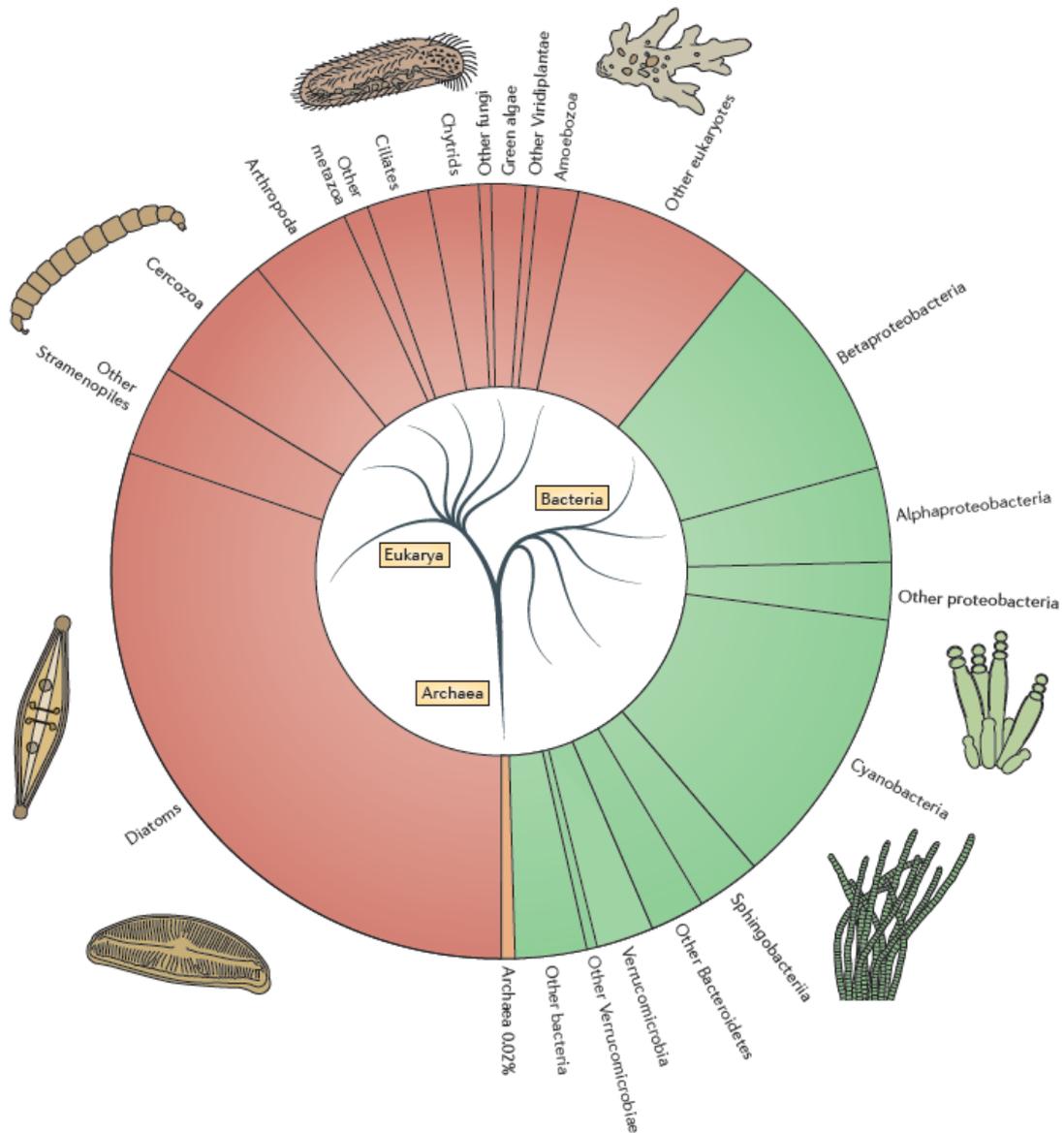


Figure 6 : Biodiversité d'un biofilm benthique dans les trois domaines de la vie. La biodiversité du biofilm benthique représente une « jungle » microbienne qui couvre les trois domaines de la vie : des larves d'insectes aux diatomées et à leurs champignons parasites, en passant par les ciliés et les flagellés brouteurs, en plus d'un ensemble diversifié de bactéries et, dans des niches spécialisées, de petites populations d'archées. (Issue de Battin et al. (2016)).

Les différents microenvironnements au sein du cours d'eau peuvent abriter des communautés de biofilms distinctes. Les parties exposées à la lumière sont favorables au développement des autotrophes et les zones plus profondes avec moins de lumière, comme les sédiments contenant des réserves de matière organique particulaire sont plutôt dominés par les hétérotrophes (Romaní *et al.* 1998). Les substrats organiques tels que les feuilles ou le bois sont favorables au développement des hétérotrophes tels que les bactéries et les champignons (Romaní *et al.* 2006; Joly, Mallet and Artigas 2019). Les bactéries et les champignons jouent un rôle fondamental dans la décomposition de la matière organique et le recyclage des éléments nutritifs (Lindeman 1942; Meyer 1994; Hall and Meyer 1998; Hieber and Gessner 2002; Tank *et al.* 2010). Les algues, quant à elles, effectuent la photosynthèse, produisant de l'oxygène et de la matière organique servant de nourriture à d'autres organismes. Les protozoaires et autres petits organismes peuvent se nourrir des bactéries et des algues, participant ainsi à la boucle microbienne (Arndt *et al.* 2003; Weitere *et al.* 2018; Holzer *et al.* 2022).

Dans les communautés microbiennes, il y a une forte relation entre la structure et les fonctions qu'elles remplissent au sein de l'écosystème (Cotner and Biddanda 2002; Horner-Devine *et al.* 2003; Smith 2007; Comte and Del Giorgio 2009; Gessner *et al.* 2010; Singer *et al.* 2010). L'idée fondamentale est que plus une communauté microbienne de biofilm est diversifiée, plus elle est capable d'exécuter une variété de fonctions écologiques. Une grande diversité microbienne au sein d'un biofilm se traduit généralement par une plus grande variété de fonctions que la communauté peut assurer. Chaque type de microorganisme apporte des compétences spécifiques, contribuant ainsi à une mosaïque de processus écologiques. Par exemple, certaines familles bactériennes telles que les *Flavobacteriaceae* et *Chitinophagaceae*, qui font partie du phylum *Bacteroidetes*, sont spécialisées dans le recyclage du carbone organique dissous (COD) allochtones (Wilhelm *et al.* 2015). Les *Bacteroidetes* sont impliquées dans la dégradation des particules en suspension, les algues sont associées à la photosynthèse, les champignons à la décomposition de la matière organique immergée et les protistes, y compris les flagellés, les ciliés et les amibes, ainsi que les virus, peuvent exercer un contrôle sur la croissance des biofilms et modifier leur diversité (Besemer 2015). Cette diversité fonctionnelle contribue à l'efficacité de la décomposition de la matière organique, à la transformation des éléments nutritifs, et à la régulation de la qualité de l'eau dans les

écosystèmes aquatiques. Toutefois, la relation entre diversité microbienne et fonctions n'est pas toujours linéaire. La notion de redondance fonctionnelle suggère que plusieurs espèces microbiennes peuvent remplir des rôles similaires au sein du biofilm, assurant ainsi une certaine stabilité des fonctions même en cas de perte de certaines espèces (Loreau 2004; Langenheder, Lindström and Tranvik 2006; Boucher and Debroas 2009; Comte and del Giorgio 2010; Dopheide *et al.* 2015). Ceci implique que même si une espèce microbienne disparaît ou diminue en abondance, d'autres peuvent compenser et maintenir la fonctionnalité du biofilm. Cette redondance fonctionnelle peut apporter une certaine résilience aux communautés de biofilm face aux perturbations environnementales.

II.4) Les biofilms : haut lieu des Activités Enzymatiques Extracellulaires (EEAs)

Les biofilms microbiens sont à la base du réseau trophique aquatique. Ils sont des sites d'importance dans la dégradation et minéralisation de la matière organique. Ces deux processus sont entre autres médiés par les microorganismes par le biais de la production d'enzymes extracellulaires pouvant transformer des composés organiques complexes en molécules plus simples et assimilables par la cellule tels que des sucres ou des acides aminés.

II.4.1) Rôles des EEAs pour les biofilms et dans leur gestion de la MOD (Matière Organique Dissoute) dans l'écosystème

De façon générale il existe sept classes d'enzymes : les oxydoréductases ; les transférases ; les hydrolases ; les lyases ; les isomérases ; les ligases et les translocases (McDonald *et al.* 2007; McDonald, Boyce and Tipton 2009). Dans le monde microbien, il existe une myriade d'enzymes qui appartiennent chacune aux classes précédemment citées en fonction de leur mode d'action. De la même façon, il existe différentes enzymes extracellulaires microbiennes qui sont classées en fonction du type de substrat qu'elles hydrolysent, de leur activité catalytique.

Dans le cycle du carbone, parmi les enzymes les plus importantes, on retrouve les glucosidases qui interviennent dans les étapes finales de catabolisme des molécules comme la cellulose, l'hémicellulose ou la lignine (Chamier 1985). Les glucosidases appartiennent à la classe des hydrolases. A cet égard, elles catalysent la rupture des liaisons chimiques β -1,4, par l'ajout d'une molécule d' H_2O (hydrolyse), des oligosaccharides de β -glucosides (issues de la primo-dégradation des molécules de cellulose en cellobiose) en monomères de glucose (Stott *et al.* 2010; Cañizares, Benitez and Ogunseitan 2011; Allison, Chacon and German 2014). Ainsi, par cette réaction enzymatique les glucosidases fournissent du glucose facilement assimilable pour les microorganismes hétérotrophes. Elles sont produites par des bactéries et des champignons.

Plusieurs enzymes microbiennes participent au recyclage de l'azote comme l'ammoniac oxydase, la nitrite oxydoréductase, la nitrate et la nitrite réductase et sont produites par des bactéries nitrifiantes, dénitrifiantes ou par des champignons. Certaines peptidases et uréases sont également spécifiquement impliquées dans l'acquisition d'azote à partir de la matière organique (Sinsabaugh, Carreiro and Alvarez 2002). Une des enzymes qui est très répandue dans le monde microbien est la N-acétyl-glucosaminidase, appartenant à la classe des hydrolases et qui réduit les polymères complexes de chitine en monomères plus simples (Cabib 1988; Gooday 1990). Cette enzyme cible la chitine – un polysaccharide naturel extrêmement abondant – composée de répétition de molécule de N-acétylglucosamine reliée par des liaison β -1,4 et composant les coquilles de crustacés, les parois cellulaires des champignons et les exosquelettes d'insectes (Kaur and Dhillon 2013). Plus précisément, une fois fixée à son substrat, elle clive les liaisons glycosidiques des unités de N-acétylglucosamine – reliant les unités de glucose et d'azote – par hydrolyse libérant des molécules plus petites qui sont des oligosaccharides nommés acide N-acétyl-glucosamine. Cette activité indique un besoin en azote par les microorganismes (Adrangi and Faramarzi 2013; Yang *et al.* 2014b; Vidhate, Bhide and Giri 2023), mais elle est également impliquée dans le recyclage du carbone. En effet, la N-acétyl-glucosaminidase peut aussi avoir pour substrat la cellulose et donc fournir du carbone et peut alors aussi être impliquée dans le cycle du carbone.

Plusieurs enzymes produites par des bactéries ou des champignons sont impliquées dans le cycle du phosphore. Selon le Comité de nomenclature de l'Union Internationale de

biochimie et de biologie moléculaire, les phosphatases peuvent être classées comme phosphomonoestérases, phosphodiesterases et les triphosphoestérases (Nannipieri *et al.* 2011). Les phosphatases, qu'elles soient alcalines ou acides, jouent un rôle clé dans la libération du phosphore organique sous forme de phosphate inorganique (orthophosphate) dans les écosystèmes (Sinsabaugh, Carreiro and Alvarez 2002). Elles catalysent l'hydrolyse des liaisons ester phosphate présentes dans les composés organophosphorés tels que les phosphomonoesters et les phosphodiesters (Sinsabaugh *et al.* 2008; Heuck, Weig and Spohn 2015; Hou *et al.* 2015). Ce processus libère du phosphore inorganique, rendant ainsi le phosphore organique disponible pour les microorganismes (Torriani 1960; Karl 2000; Sebastian and Ammerman 2009, 2011).

Les enzymes glucosidases, peptidases et phosphatases sont produites pour cibler les principaux réservoirs de carbone, azote et phosphore afin d'acquérir la matière et l'énergie pour la croissance microbienne (Chróst 1991; Chróst and Siuda 2002). Ces enzymes extracellulaires sont donc des éléments microbiens clés dans les cycles biogéochimiques tels que le cycle du carbone (Arnosti 2011), le cycle de l'azote et du phosphore (Leff *et al.* 2016). Dans les cours d'eau, les nutriments et la matière organique dissoute qui y circulent, l'abondance des microorganismes et les interactions entre eux jouent un rôle important dans la régulation des processus biogéochimiques dans l'écosystème et ce à grande échelle (Battin *et al.* 2008; Beaulieu *et al.* 2011).

Les enzymes microbiennes jouent un rôle déterminant dans le maintien d'un certain équilibre stœchiométrique des nutriments dans l'écosystème. De façon générale, l'efficacité stœchiométrique fait référence à la capacité d'un système biologique à utiliser efficacement les éléments chimiques en accord avec les proportions stœchiométriques nécessaires pour les processus biologiques. L'efficacité stœchiométrique peut être utilisée comme un indicateur reliant la demande en nutriments des microorganismes et la disponibilité de ces nutriments dans l'environnement (Sinsabaugh, Hill and Follstad Shah 2009). De plus, grâce à l'analyse de l'équilibre stœchiométrique de ces éléments il est possible d'apprécier le rapport entre la disponibilité des nutriments dans l'environnement et la demande des biofilms à un instant donné (Sinsabaugh, Hill and Follstad Shah 2009). A l'échelle d'un écosystème, les microorganismes tendent à maintenir des relations de stabilité et d'un certain équilibre entre

les différents ratios stœchiométriques des éléments essentiels (ex. carbone, azote et phosphore) pour assurer leur croissance et leur fonctionnement optimaux.

Après les premiers travaux de Sinsabaugh *et al.*, un lien a été fait entre la stœchiométrie des ressources en matière organique et la stœchiométrie éco-enzymatique des communautés microbiennes (c'est-à-dire les enzymes à l'extérieur de la cellule liées aux cycles biogéochimiques des écosystèmes) (Sinsabaugh *et al.* 2012). Cette approche permet d'apprécier les besoins nutritionnels des microorganismes, leur capacité à assimiler des nutriments dans un contexte nutritif propre à l'environnement et ainsi d'évaluer la manière dont les microorganismes réagissent vis-à-vis de leurs besoins nutritionnels lors de variations de la disponibilité en nutriments et leur influence sur la dynamique de l'écosystème (Sinsabaugh, Hill and Follstad Shah 2009; Sinsabaugh and Shah 2012). Il est à noter que l'efficacité stœchiométrique peut varier en fonction des conditions environnementales telles que la disponibilité des éléments, la température, les interactions entre les espèces et permet donc d'apprécier la dynamique microbienne dans la gestion des éléments nutritifs. Ceci en fait un bon indicateur pour apprécier l'impact potentiel d'une pollution survenue sur les cycles biogéochimiques.

De plus, les activités enzymatiques responsables de la libération de carbone, d'azote et de phosphore, de même que leurs ratios sont de bons indicateurs de l'état de « santé » des communautés microbiennes dans un écosystème soumis à une pollution, parce que ces activités éco-enzymatiques sont sensibles aux changements environnementaux comme les modifications physico-chimiques. Les activités éco-enzymatiques peuvent être utilisées pour évaluer les dynamiques d'utilisation du carbone, de l'azote et du phosphore dans différentes conditions (Fanin, Moorhead and Bertrand 2016) et même comme indicateur de perturbation environnementale telle que le traitement des sols ou l'apport d'engrais, d'azote ou de phosphore (Li *et al.* 2013; De Mastro *et al.* 2022; Zhang *et al.* 2022a; Haoyu *et al.* 2023). Cependant, il est important de garder à l'esprit que les activités enzymatiques extracellulaires microbiennes, ainsi que leurs ratios, doivent être interprétés avec prudence et en conjonction avec d'autres indicateurs biologiques et physico-chimiques environnementaux.

II.5) Interactions microbiennes dans le biofilm

Grâce à de nombreuses interactions microbiennes, se forme un équilibre notamment vis-à-vis du recyclage du carbone et des nutriments au sein du biofilm. Parmi ces interactions figurent celles entre les phototrophes et les hétérotrophes. Les premiers libèrent des composés organiques comme les glucides et acides aminés qui sont facilement assimilés par les hétérotrophes (Haack and McFeters 1982; Stock and Ward 1989; Ylla *et al.* 2009). Le recyclage du carbone dans les biofilms dépend des interactions influencées par les conditions environnementales telle que la disponibilité en lumière, qui affecte la croissance des organismes photosynthétiques et par conséquent, l'abondance des bactéries hétérotrophes (Battin, Kaplan, Newbold, Cheng, et al. 2003b; A. M. Romaní et al. 2004; Ylla et al. 2009). Le recyclage de la MOD récalcitrante comme par exemple la lignine des végétaux peut être favorisé par des interactions plus indirectes telles que « l'effet d'amorçage » ou le co-métabolisme. Cet effet englobe les composés organiques labiles sécrétés par les organismes phototrophes, lesquels pourraient apporter l'énergie requise aux organismes hétérotrophes pour synthétiser les enzymes extracellulaires nécessaires à la décomposition de la matière organique récalcitrante (Guenet *et al.* 2010). Ceci renforce la complémentarité entre autotrophes et hétérotrophes dans le recyclage de la MOD au sein du biofilm, ainsi qu'entre biofilms différents colonisant le benthos (par exemple entre périphyton et feuilles en décomposition, ou entre périphyton et sédiments).

D'autres exemples d'interactions microbiennes vis-à-vis du métabolisme existent comme la plasticité fonctionnelle qui décrit la capacité des microorganismes à ajuster leurs activités et leurs fonctions en réponse à des changements dans leur environnement. Autrement dit, les microorganismes peuvent adapter leurs réponses métaboliques et leurs fonctions selon des conditions environnementales variables (Allison and Martiny 2008; Malcolm *et al.* 2008; Malcolm, López-Gutiérrez and Koide 2009; Hawkes and Keitt 2015), par exemple suite à des variations de disponibilité en nutriments mais aussi à des variations de lumière, température ou pH, etc. La plasticité fonctionnelle est une caractéristique clé qui permet aux microorganismes de prospérer dans des environnements changeants et de contribuer aux processus biogéochimiques et écologiques. Cette adaptation fonctionnelle

peut-être couplée au concept de multifonctionnalité. La multifonctionnalité des microorganismes correspond à leur capacité à accomplir plusieurs fonctions biologiques par exemple, un même type de microorganisme peut être impliqué dans la décomposition de la MO, la fixation de l'azote, la production d'enzymes pour la digestion des nutriments etc.... Donc, si l'on prend en compte un ensemble d'espèces d'une communauté alors, la multifonctionnalité est en lien avec la diversité et correspond à la capacité qu'a chaque espèce à participer à une fonction qui entre dans un processus en particulier et donc à agir de concert pour remplir une fonction écosystémique donnée (Hector and Bagchi 2007; Peter *et al.* 2011; Miki, Yokokawa and Matsui 2014; Wilhelm *et al.* 2015). Au sein d'une communauté donnée la multifonctionnalité des microorganismes permet d'avoir une variété de fonctions.

Un autre concept rejoignant les interactions microbiennes dans les cycles des nutriments est la redondance fonctionnelle. Ce concept s'applique dans la situation où plusieurs espèces ou groupes d'espèces exécutent des fonctions similaires au sein d'un écosystème. Cela permet donc d'avoir dans une même communauté la répétition d'une même fonction présente au sein de plusieurs espèces différentes. En d'autres termes, différentes espèces microbiennes peuvent jouer des rôles fonctionnels similaires, accomplissant les mêmes tâches ou processus au sein de l'écosystème (Loreau 2004; Langenheder, Lindström and Tranvik 2006; Boucher and Debroas 2009; Comte and del Giorgio 2010; Dopheide *et al.* 2015). Ainsi si une espèce vient à disparaître, par exemple à cause d'un stress environnemental, alors, la fonction est sauvegardée dans la communauté. De plus, la disparition d'une ou plusieurs espèces dites redondantes n'affecte pas significativement l'écosystème car les autres espèces redondantes restantes assurent la fonction et compensent la perte (Naeem, Kawabata and Loreau 1998; Konopka 2009; Steudel *et al.* 2012). Cela démontre un point essentiel en écologie qui est que les communautés biotiques plus diversifiées sont fonctionnellement moins sensibles au stress environnemental. Cette redondance fonctionnelle peut être observée dans des environnements variés tels que les sols, les eaux douces et marines et elle peut jouer un rôle clé dans la stabilité et la résilience de l'écosystème. La redondance fonctionnelle est importante car elle peut fournir une certaine assurance en cas de perturbations ou de changements dans l'environnement. Si une espèce, ou un groupe d'espèces, est affecté par une perturbation, d'autres espèces ayant des fonctions similaires peuvent compenser et maintenir les processus écologiques essentiels.

Cela contribue à maintenir le fonctionnement global de l'écosystème malgré les variations et les stress environnementaux. Il est important de noter que la redondance fonctionnelle ne signifie pas nécessairement que toutes les espèces sont interchangeable. Chaque espèce peut avoir des caractéristiques uniques et jouer un rôle spécifique dans les interactions écologiques. Cependant, la redondance fonctionnelle souligne l'importance de la diversité des espèces dans un écosystème pour garantir la stabilité et le bon fonctionnement des processus écologiques.

Le lien existant entre diversité microbienne et multifonctionnalité métabolique ainsi que la redondance fonctionnelle indique que les biofilms microbiens sont efficaces dans la dégradation des composés de MOD récalcitrante leur donnant un avantage dans les écosystèmes aquatiques fluctuants dans lesquels ils évoluent.

La redondance fonctionnelle peut conduire aussi à des relations de compétition entre espèces au sein d'une communauté. Lorsque les biofilms sont composés de *clusters* clonaux, les cellules interagissent principalement avec des clones, favorisant la coopération. Cependant, lorsque différentes souches et espèces se mélangent dans l'espace, des comportements antagonistes sont souvent favorisés. Ces phénotypes sont régulés par des mécanismes sensoriels sophistiqués, tels que la détection de la compétition et la communication de *quorum* (Fontaine *et al.* 2007; Nadell *et al.* 2008). Les comportements sociaux entre microorganismes au sein des biofilms ont un impact sur la structure spatiale des communautés en modifiant localement la structure spatiale, les taux de croissance d'autres cellules et en changeant ainsi la composition locale du biofilm, *via* la sécrétion de composés de la matrice extracellulaire (Nadell and Bassler 2011; Nadell, Drescher and Foster 2016). Les interactions compétitives au sein des biofilms microbiens sont donc influencées par leur structure spatiale et sont régies par des mécanismes sensoriels et de communication complexes. Il s'agit le plus souvent de compétition d'ordre trophique, où les organismes rivalisent pour les ressources alimentaires disponibles, établissant ainsi des relations de compétition au sein des écosystèmes. Dans ce cas, la compétition fait référence à deux populations ou bien deux espèces qui se disputent une même ressource nutritive limitante. La croissance de la population dominante se fera au détriment de la croissance de la population moins efficace lors de l'acquisition de la ressource (James, Beaudette and Costerton 1995; Moons, Michiels and Aertsen 2009; Bergk Pinto *et al.* 2019). Au sein des

biofilms, les organismes s'organisent en *consortia* structurés, ancrés à la surface, générant ainsi une diversité de niches écologiques. Dans ces conditions, il est à noter que la biomasse et la structure de la population ne dépendent pas uniquement de la compétition pour la source principale de carbone (Christensen *et al.* 2002).

De telles interactions peuvent conduire à des altérations physiologiques dans les biofilms entraînant la sélection de certains microorganismes et affectant ainsi le rôle fonctionnel des communautés au sein de l'écosystème (Rendueles and Ghigo 2012). Les modèles métaboliques à l'échelle du génome révèlent que les communautés microbiennes deviennent plus riches en espèces et plus résistantes aux invasions à mesure qu'elles se développent (Wagner 2022). Cette résistance est liée à une productivité élevée de la communauté et à une compétition intense pour les ressources et les mécanismes de compétition prédominent sur les interactions facilitatrices, même si le partage métabolique entre espèces est courant (Wagner 2022). Alors, le processus de compétition pour les nutriments constitue une interaction nécessaire entre microorganismes et notamment dans la résistance aux invasions au sein des communautés microbiennes.

III) POLLUTION PLASTIQUE EN RIVIERE

III.1) L'ère du plastique

L'essor du plastique a été un phénomène majeur de l'histoire industrielle moderne. Le premier plastique synthétique commercialisé était la bakélite (formée de phénol et de formaldéhyde), développée par Leo Baekeland en 1907 (McGraw-Hill 2002). Ce matériau dur et résistant a ouvert la voie à d'autres plastiques synthétiques. La Seconde Guerre mondiale a accéléré la demande en plastique pour diverses applications militaires, telles que les avions, les véhicules et divers équipements. Cette période a vu l'émergence de plastiques tels que le nylon et le polyéthylène, bien que ce dernier ait été conçu pour la première fois en 1898 par Hans von Pechmann. Après la guerre, la demande en plastique a continué de croître rapidement, soutenue par le boom économique d'après-guerre et les avancées technologiques. La production a augmenté de manière exponentielle au fil des décennies, conduisant à une utilisation généralisée dans de nombreux secteurs. En effet, depuis la découverte des polymères plastiques au XIXe siècle, et surtout depuis la production de masse de plastique dans les années 1940 et 1950, la production et l'utilisation mondiales n'ont pas cessé au fil du temps jusqu'à atteindre les 300 millions de tonnes (Thompson *et al.* 2009), (Figure 7). Depuis les années 1950 et jusqu'en 2015 Geyer, Jambeck, and Law (2017), ont estimé la production mondiale de plastique à 6300 millions de tonnes, dont environ 79 % ont été accumulés dans les écosystèmes naturels, et depuis les années 1950 et jusqu'en 2017 cette production mondiale a été estimée à 8300 millions de tonnes (Figure 8). Cette augmentation n'a pas cessé d'augmenter malgré les législations mises en place. Par exemple, dans les années 2000, le Canada a mis en place l'interdiction du bisphénol A (BPA) (entrant dans la fabrication de certains plastiques rigides) dans les biberons, ou l'interdiction de sacs plastique dans certains commerces britanniques ou encore l'émergence de taxes sur le plastique par exemple (Thompson *et al.* 2009). Mais d'autres législations plus récentes, visant à réduire l'utilisation du plastique ont émergé et varient d'un pays à l'autre. En effet, de nombreux pays ont mis en place des interdictions, des restrictions, des taxes etc. Par exemple, l'Union européenne a adopté une directive interdisant les plastiques à usage unique, tels que les couverts en plastique, les assiettes, les pailles, les touillettes et les cotons-tiges en plastique à partir de juillet 2021 (Légifrance 2019). Le Royaume-Uni a mis en place une taxe sur les sacs

en plastique à usage unique, obligeant les détaillants à facturer un montant supplémentaire pour ces (Ambassade de France au Royaume-Uni 2022). Le Canada a mis en place un programme de « responsabilité élargie des producteurs » (le REP) pour les contenants de boissons en plastique, obligeant les producteurs à financer la collecte et le recyclage de ces contenants (Gouvernement du Canada 2023). Le Japon a fixé un objectif ambitieux de réduire de 25 % les déchets plastiques marins d'ici 2030, en mettant en œuvre diverses mesures de réduction et de recyclage (Ministère de l'économie des finances et de la souveraineté industrielle et Numérique 2022). La France a interdit l'utilisation de microplastiques dans les produits cosmétiques et de soins personnels (Legifrance.gouv 2020). L'accord de Bâle, ou la convention de Bâle sur le contrôle des mouvements transfrontières de déchets dangereux et de leur élimination, est un traité international conclu en 1989 (mais ayant connu plusieurs amendements au fil des ans) et sous les auspices du programme des Nations Unies pour l'environnement (PNUE). Bien que l'accord de Bâle ne se concentre pas exclusivement sur les plastiques, il couvre les déchets dangereux et peut inclure certains types de plastiques qui sont considérés comme dangereux en raison de leur composition ou de leur contamination. Certains types de plastiques peuvent contenir des substances toxiques ou dangereuses qui les rendent soumis à la réglementation de la convention. Cet accord impose des restrictions strictes sur l'importation, l'exportation et le transit des déchets concerné entre les pays signataires (Programme des Nations Unies pour l'environnement 1989). Plusieurs grandes entreprises de l'industrie de l'emballage, telles que Coca-Cola®, Nestlé® et PepsiCo®, ont pris des engagements en matière de durabilité, notamment en utilisant des plastiques recyclables et en s'engageant à réduire leur empreinte plastique.

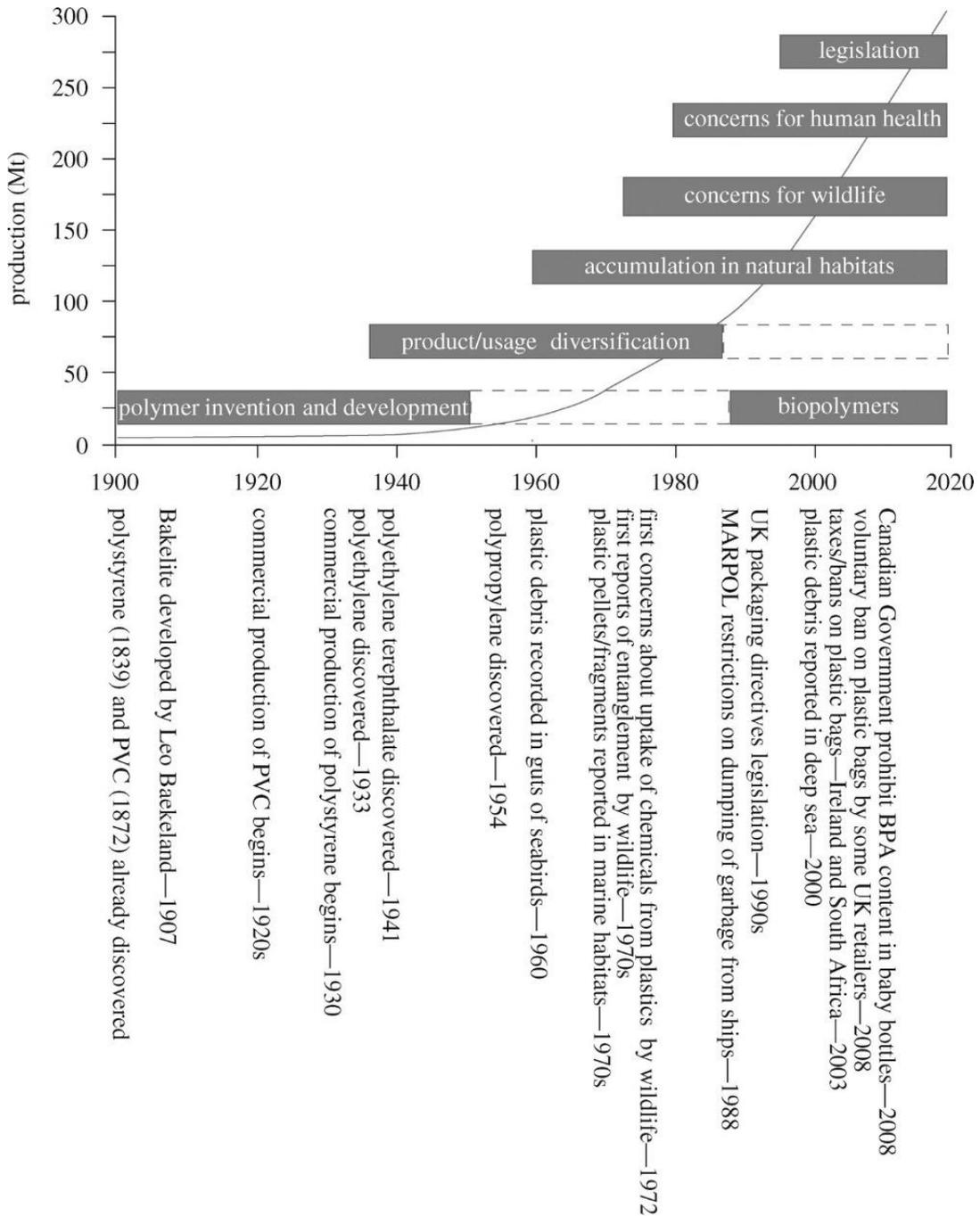


Figure 7 : Illustration des étapes historiques du développement, de la production et de l'utilisation des plastiques ainsi que des préoccupations associées et les mesures législatives. La ligne courbe continue indique la production de plastique en millions de tonnes (Mt). Reproduit avec permission de l'APME (2006). BPA, bisphénol A ; PVC, chlorure de polyvinyle. (Issue de Thompson et al. (2009)).

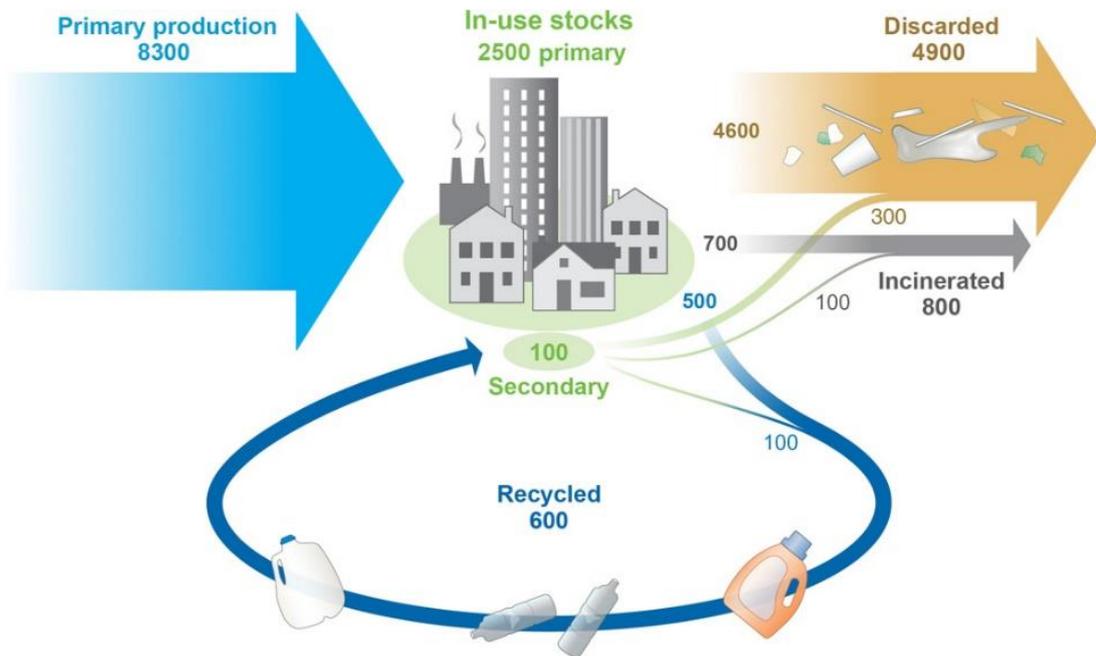


Figure 8 : Schéma illustrant la production, l'utilisation et la destinée mondiale des résines polymères, des fibres synthétiques et des additifs de 1950 à 2015 en millions de tonnes. (Issue de Geyer, Jambeck, and Law (2017)).

Il existe plusieurs types de plastiques, dont la nature diffère selon leurs propriétés chimiques et physiques. A partir des années 1980, plusieurs acteurs de l'industrie du plastique, de l'industrie chimique et autres organisations socio-économiques (dont la *Society of the Plastics Industry* (SPI) ; l'*American Chemistry Council* (ACC) et plus particulièrement la *Plastics Division of the American Chemistry Council* ; le *Product Stewardship Institute* (PSI) et la *Plastics Recycling Foundation* (PRF)) ont contribué à mettre en place une classification normalisée des plastiques connue sous forme de « code résine » numéroté de 1 à 7 (Figure 9). Cette classification est utilisée par les acteurs industriels et la société en générale pour identifier les différents types de plastiques dans le cadre du recyclage et de la gestion des déchets plastiques. Elle comporte :

- La classe 1 : polyéthylène téréphtalate (PET ou PETE), utilisé principalement pour les bouteilles d'eau, les récipients de boissons gazeuses et les emballages alimentaires.
- La classe 2 : polyéthylène haute densité (PEHD ou HDPE), très répandu et utilisé pour une variété d'applications, notamment les bouteilles de lait, les contenants de produits de nettoyage et certains types de sacs en plastique.
- La classe 3 : chlorure de polyvinyle (PVC ou V), le constituant des tuyaux, des revêtements de sol, des fenêtres en plastique, des jouets et utilisé pour diverses applications de construction.
- La classe 4 : polyéthylène basse densité (PEBD ou LDPE) : très répandu, il est principalement utilisé pour les sacs en plastique, les films d'emballage et les revêtements.
- La classe 5 : polypropylène (PP), utilisé pour une variété d'applications, y compris les contenants alimentaires, les bouchons et les pièces automobiles.
- La classe 6 : polystyrène (PS), entrant dans la composition de certains gobelets, d'emballages de fast-food, des boîtiers de CD/DVD et d'autres produits en plastique.
- La classe 7 nommée « other » pour « autres plastiques » : cette catégorie englobe des polymères plastiques spécifiques qui ne sont pas aussi courants ou standardisés que les six précédentes catégories. Elle regroupe divers autres plastiques comme :
 - L'acrylonitrile butadiène styrène (ABS), entrant dans la fabrication de pièces automobiles, de jouets, de boîtiers électroniques et d'autres produits.
 - L'acide polylactique (PLA), qui est un plastique dit biodégradable fabriqué à partir de matières premières renouvelables comme l'amidon de maïs. Le PLA est utilisé pour des applications telles que les emballages alimentaires biodégradables et les sacs.
 - Le polycarbonate d'acide polyhydroxybenzoïque (PHB), un plastique biodégradable utilisé dans des applications similaires au PLA. Le polycarbonate est également utilisé pour les bouteilles d'eau réutilisable et les verres de lunettes.

- Le nylon (polyamide), utilisé dans la fabrication de fibres textiles, de pièces mécaniques, de cordes et d'autres produits.
- Et d'autre plastiques spécifiques et mélangés.

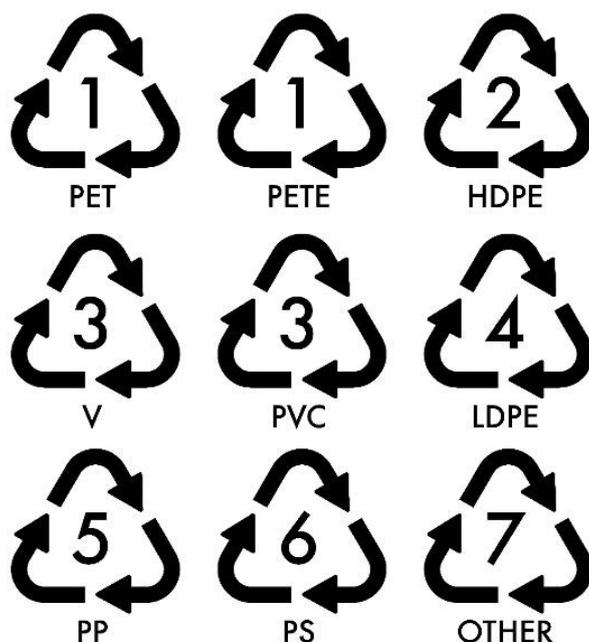


Figure 9 : Les différentes classes de polymères plastiques allant de 1 à 7. PET : Polyéthylène Téréphtalate ; PETE : Polytéréphtalate d'éthylène ; HDPE : polyéthylène à haute densité ; V ou PVC : Polychlorure de vinyle ; LDPE : polyéthylène à basse densité ; PP : Polypropylène ; PS : Polystyrène ; Other : autre. (Image libre de droit).

Il est nécessaire de bien définir les termes de plastique « biodégradable » et « biosourcé », souvent utilisés à mauvais escient ou confondus avec le terme « dégradable ». Un **bioplastique** est un terme générique utilisé pour décrire des polymères dérivés de matières premières renouvelables, appelés « **plastiques biosourcés** ». Plus précisément, les plastiques biosourcés sont des matériaux qui sont fabriqués à partir de sources carbonées renouvelables (carbone organique) pouvant être issues des végétaux, de champignons, d'animaux, du milieu marin ou forestier plutôt que du pétrole brut (Vert *et al.* 2012; ASTM D6400 2019). Les sources les plus courantes de matières premières pour les polymères

biosourcés incluent l'amidon de maïs, l'**amidon de pomme de terre**, la canne à sucre, la betterave sucrière, la cellulose, les microorganismes comme les bactéries et les levures, ainsi que d'autres biomasses végétales et animales (Iwata 2015; Khan *et al.* 2016; Mu *et al.* 2019; Sid *et al.* 2021). Un « **plastique biodégradable** » est un type spécifique de plastique qui peut se dégrader sous l'action des microorganismes (bactéries, champignons ou algues) en composés plus simples et en présence d'oxygène et de conditions environnementales appropriées, pour donner du CO₂, de l'eau et de la biomasse en produit final, selon la norme ASTM-D883 établie par l'« *American Society for Testing and Materials* » (ASTM D6400 2019) et la norme « ISO/TC 61/SC 5/WG 22 (ISO 472/DAM3) (ISO; Sawada 1998).

Il est important de noter que tous les bioplastiques ne sont pas biodégradables (même si certains le sont), et que tous les plastiques biodégradables ne sont pas nécessairement fabriqués à partir de sources renouvelables (Lambert and Wagner 2017). Les plastiques biodégradables sont décomposés par des microorganismes qui réduisent la taille des macromolécules constituant ces plastiques, mais il est essentiel de ne pas les confondre avec la « biodégradation ultime », qui implique la transformation complète des composés organiques en molécules simples oxydées ou réduites comme le dioxyde de carbone, le méthane, le nitrate, l'ammonium et l'eau (Lambert and Wagner 2017). En d'autres termes, l'utilisation du terme « plastique biodégradable » peut laisser penser à tort que le produit se décompose rapidement en composés que les microorganismes peuvent facilement convertir en matière minérale.

La biodégradabilité dépend de la structure chimique du polymère. De plus, il existe d'autres termes tels que « dégradable » et « compostable » qui sont parfois utilisés de manière interchangeable, mais qui ont des significations distinctes. Par exemple, un plastique dégradable peut se décomposer sous l'effet de certaines conditions physiques changeantes comme les UV ou l'action mécanique de l'eau, mais il ne subit pas nécessairement une dégradation biologique. Alors, les **bioplastiques** sont fabriqués à partir de sources renouvelables, tandis que les **plastiques biodégradables** ont la capacité de se dégrader sous l'action des microorganismes.

Le taux de biodégradabilité d'un polymère plastique par les microorganismes va dépendre des conditions dans lesquelles il se trouve. En effet, un matériau est dit

biodégradable à partir du moment où des conditions environnementales de température sont propices à cela, or, dans l'environnement, ces conditions ne sont pas nécessairement réunies pour permettre une biodégradation. Ce qui sous-entend une potentielle accumulation de ce type de plastique dans l'environnement.

Le taux de biodégradabilité dépend aussi de la composition du polymère, car même si ces matériaux sont élaborés à partir de matière carbonées utilisables par les microorganismes, ils sont également composés d'additifs visant à améliorer les caractéristiques physico-chimiques, la résistance à la traction, la morphologie et les propriétés thermiques des matériaux plastiques biodégradables (Oluwasina *et al.* 2021). Ces polymères sont souvent utilisés en packaging alimentaire notamment les plastiques conçus à base d'amidon. Parmi ces additifs, de nombreuses molécules sont utilisées comme des plastifiants pour obtenir de la souplesse, des encres et pigments pour la couleur, des stabilisants comme des agents antimicrobiens ou des antioxydants pour les rendre plus résistant ou des tensioactifs pour avoir des propriétés de surface désirées (Siracusa *et al.* 2008). La biodégradabilité dépendra donc aussi de la quantité et du type d'additifs ajoutés au polymère (Singh and Sharma 2008).

La production de plastiques biodégradables est en plein essor en raison d'un ensemble de facteurs écologiques, politiques et sociétaux qui convergent pour encourager son développement. Pour illustrer cette augmentation, les capacités mondiales de production de plastiques biosourcés et biodégradables étaient de 2,1 millions de tonnes en 2017 et de 2,4 millions de tonnes en 2022 (European Bioplastics 2017). Dorénavant, la production de bioplastique est estimée à 6,3 millions de tonnes en 2027, dont 3,55 % de plastique biodégradable et 2,73 % de plastique biosourcé et non-biodégradable (Nova-Institute and European Bioplastics 2021), (Figure 10).

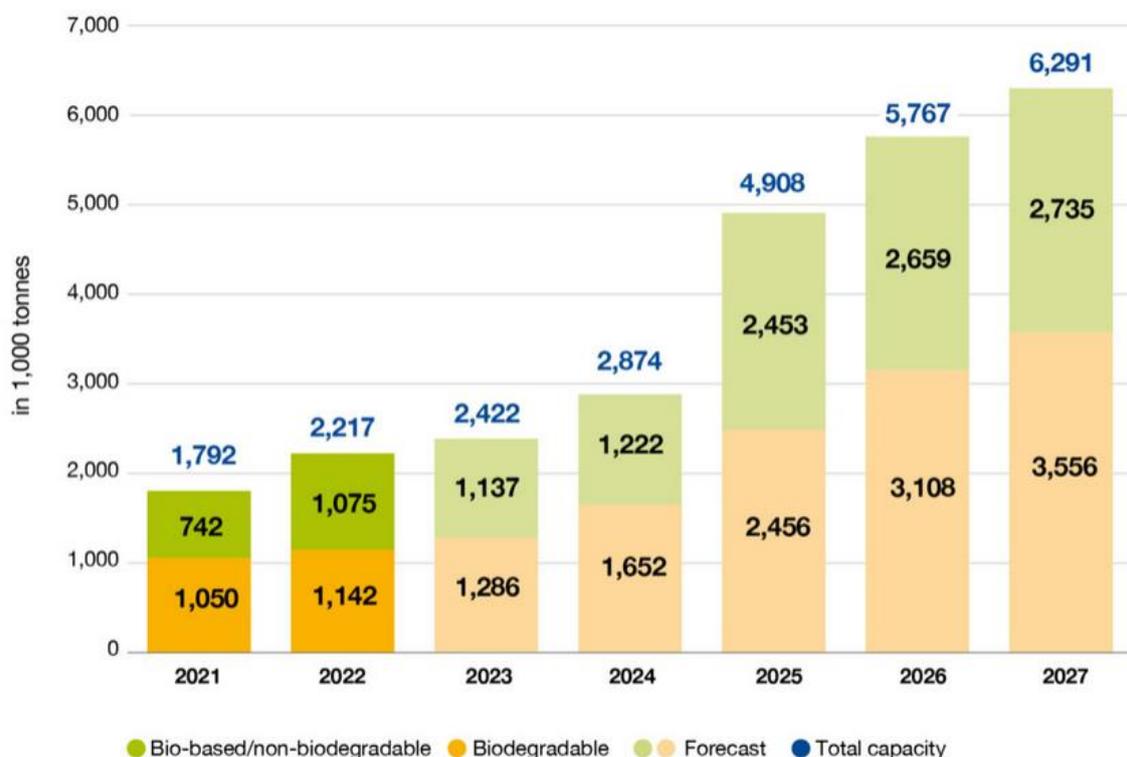


Figure 10 : Capacités de production mondiale de bioplastiques. (Issue de Nova-Institute and European Bioplastics 2021).

De façon plus précise, les pourcentages des différents types de polymère plastique des bioplastiques, dont la production estimée horizon 2027, sont représentés en [figure 11](#). Parmi les plastiques biosourcé et non-biodégradable on y trouve sept grandes catégories pour un pourcentage total estimé de 43,5 % des bioplastiques, tandis que six catégories représentent les plastiques biodégradables pour un pourcentage total estimé de 56,5 %.

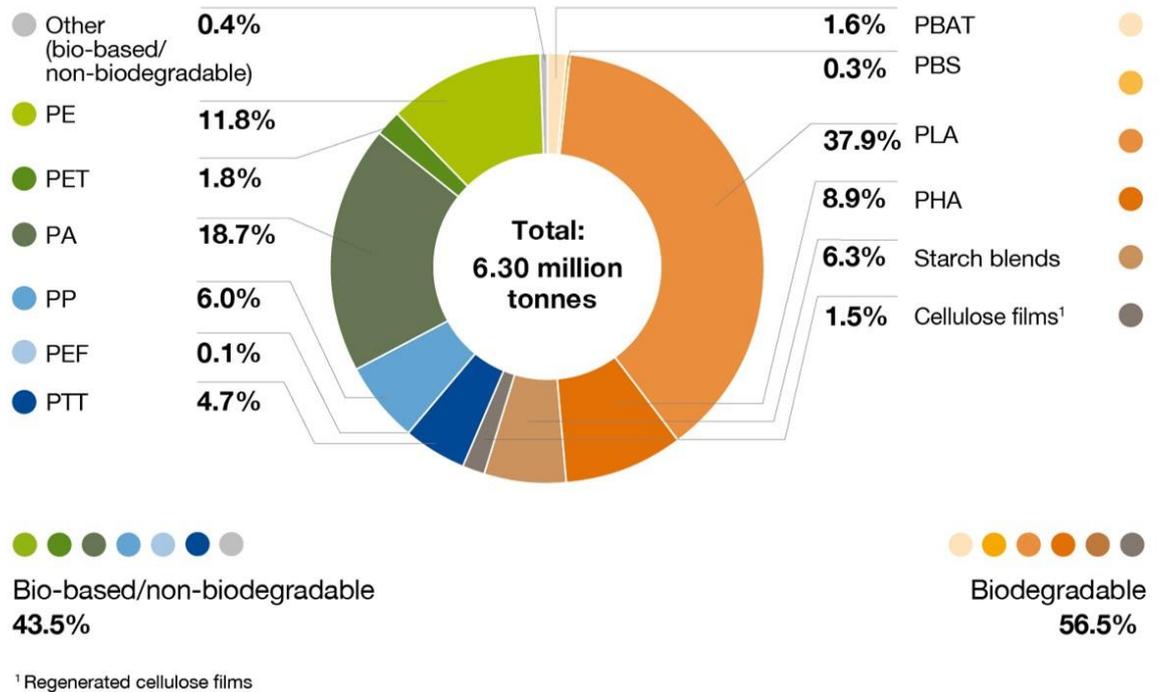


Figure 11 : Capacités de production mondiale de bioplastiques 2027 en fonction des types de matériau. (Issue de Nova-Institute and European Bioplastics 2021).

Parmi les raisons qui expliquent cette tendance, on trouve au premier plan des préoccupations environnementales qui sont croissantes concernant les impacts environnementaux des plastiques « traditionnels ». Les plastiques conventionnels dits « non biodégradables » c'est-à-dire dérivés du pétrole, mettent des centaines d'années à se décomposer dans l'environnement, ce qui entraîne une pollution des écosystèmes. Les plastiques biodégradables offrent une alternative qui est dite plus « respectueuse » de l'environnement, car ils se dégradent plus rapidement que leurs homologues dits « non biodégradables » et seraient donc moins susceptibles de causer des dommages à long terme. Pour répondre à ces enjeux écologiques, des réglementations gouvernementales ont émergé par la mise en place de réglementations visant à réduire l'utilisation des plastiques non biodégradables (comme l'interdiction ou la restriction de l'utilisation de plastiques à usage unique, de taxes sur les sacs en plastique et d'incitations à l'utilisation de plastiques biodégradables) (Thompson *et al.* 2009), (Figure 7). A titre d'exemple, l'une des mesures de la Loi française relative à la transition énergétique pour la croissance verte (TEPCV) votée

initialement en 2015, interdit l'utilisation des emballages plastiques non biodégradables et non compostables en compostage domestique pour l'envoi de la presse et de la publicité (Légifrance 2015).

La société entraîne aussi cette dynamique, car relayé par les médias, les consommateurs sont de plus en plus conscients de l'impact de leurs choix sur l'environnement. Ils sont alors de plus en plus enclins à soutenir les produits et les entreprises qui adoptent des pratiques dites « durables », y compris l'utilisation de plastiques biodégradables.

Avec cette prise de conscience et cette volonté politique d'encourager les innovations technologiques en recherche et développement, de nouveaux matériaux et de processus de fabrication ont permis de créer des plastiques biodégradables résistants et plus attrayants pour les industries ce qui en fait une opportunité commerciale poussant ces industries à la fabrication de ces matériaux en vue d'améliorer leur image de marque et de se conformer aux réglementations environnementales en vigueur.

III.2) Pollution plastique dans les écosystèmes aquatiques

III.2.1) Sources

Divers processus sont responsables de l'omniprésence de la pollution plastique dans les écosystèmes aquatiques. Une des principales sources anthropiques de pollution plastique dans les écosystèmes aquatiques provient des stations d'épuration. En effet, certains systèmes comme les débordements d'égout unitaire peuvent être une source importante de pollution (*Combined Sewer Overflow CSOs*) (Horton *et al.* 2017; United States Environmental Protection Agency 2017; Kawecki and Nowack 2019) ainsi comme les déversements d'eaux usées inefficacement traitées. Les débordements d'égouts dus aux eaux pluviales et les rejets agricoles environnants peuvent également expliquer pourquoi les rivières sont des sources de cette pollution plastique (Jambeck *et al.* 2015; Horton and Dixon 2017; Kawecki and Nowack 2019; Windsor *et al.* 2019). Les eaux usées domestiques recueillent une variété de types de plastique provenant de différents matériaux, comme par exemple les lingettes humides synthétiques, les microbilles (Duis and Coors 2016) entrant dans la composition de produits d'entretien et produits cosmétiques, les fibres polymères provenant du lavage des textiles synthétiques (Zitko and Hanlon 1991; Gregory 1996; Fendall and Sewell 2009; Napper and

Thompson 2016) ou les fibres textiles provenant du lavage de vêtements (Browne *et al.* 2011) qui sont autant de type de plastiques pouvant se retrouver dans l'environnement. Même si les stations d'épuration éliminent efficacement la grande majorité des macroplastiques et mésoplastiques des effluents bruts (Carr, Liu and Tesoro 2016), elles restent une source ponctuelle et un contributeur important de pollution notamment aux nanoplastiques et microplastiques dans les écosystèmes et notamment dans les eaux douces (da Costa *et al.* 2016; Murphy *et al.* 2016; Talvitie *et al.* 2017). En plus des sources de plastiques précédemment mentionnées, il convient de noter d'autres origines de la pollution plastique qui ont été identifiées dans la littérature. Une autre contribution provient directement de certaines industries qui utilisent des matières premières plastiques sous forme de granulés, de flocons ou de petites billes (Lechner *et al.* 2014; Sadri and Thompson 2014). De plus, des déchets mal gérés provenant d'activités telles que la pêche ou les loisirs en plein air peuvent également contribuer à la pollution plastique (Claessens *et al.* 2013; Desforges *et al.* 2014).

A l'échelle mondiale, la gestion des déchets plastiques varie considérablement d'un pays à l'autre, ce qui se reflète dans la répartition hétérogène des déchets plastiques (voir [Figure 12](#), issue de l'étude de Jambeck *et al.* (2015)). Cette figure présente une carte du monde qui estime la quantité de déchets plastiques générée par les populations côtières dans chaque pays. Les estimations sont basées sur les déchets plastiques produits par les habitants vivant à moins de 50 kilomètres des côtes. La Chine serait le pays avec les émissions de déchets plastiques vers l'océan les plus élevées du monde. Il est important de noter que cette approche se concentre sur les déchets plastiques générés par les populations côtières, car ces zones sont souvent les plus touchées par la pollution plastique due à leur proximité avec les sources potentielles de déchets. Cependant, cela ne signifie pas que les déchets plastiques à l'intérieur des terres sont négligés. La répartition des déchets plastiques peut en effet varier selon les régions, en fonction de divers facteurs tels que les habitudes de consommation, les infrastructures de gestion des déchets et les pratiques de collecte. Ainsi, cette carte offre une vue d'ensemble des déchets plastiques générés par les populations côtières dans le monde, tout en reconnaissant que la situation peut différer à l'intérieur des terres.

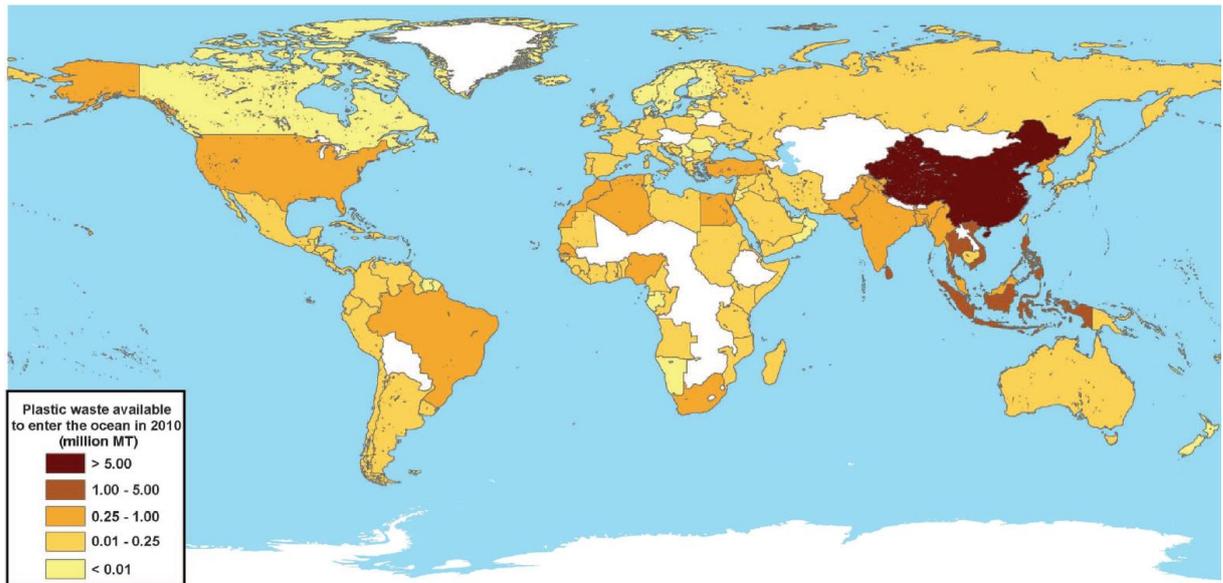


Figure 12 : Carte mondiale des émissions des déchets plastiques par les populations côtières. Chaque pays est ombré en fonction de la masse estimée de déchets plastiques mal gérés (en millions de tonnes (Mt)) générée en 2010 par les populations vivant dans un rayon de 50 km de la côte. 192 pays sont pris en compte. Les pays non inclus dans l'étude apparaissent en blanc. (Issue de Jambeck *et al.* (2015)).

III.2.2) *Persistence*

Les conditions environnementales ainsi que la nature chimique du polymère sont les principaux facteurs qui déterminent la biodégradabilité d'un plastique dans l'environnement. Les plastiques « traditionnels » sont des matériaux synthétiques qui sont conçus pour être durables et résistants à la décomposition, ce qui rend leur dégradation particulièrement lente. Cela signifie que les déchets plastiques peuvent rester dans l'environnement pendant des décennies voire des siècles (Zalasiewicz *et al.* 2016). De plus, les différentes fractions de taille de ces plastiques les rendent encore plus persistants dans l'environnement car les macroplastiques peuvent être dégradés en plus petits fragments appelés microplastiques ou nanoplastiques. Cette dégradation peut être d'origine abiotique et dépend notamment du pH, des variations thermiques, de l'exposition aux UV et des forces mécaniques et/ou d'origine biotique dépendant des enzymes microbiennes qui décomposent les polymères (Eubeler, Bernhard and Knepper 2010; Muthukumar and Veerappapillai 2015). L'accumulation des plastiques dans certains écosystèmes est également due à la rétention physique de particules de plus ou moins grande taille, engendrée par la fragmentation de gros débris en plus petits

(Browne *et al.* 2011; Lambert *et al.* 2013; Law and Thompson 2014; Eerkes-Medrano, Thompson and Aldridge 2015). Plus précisément, les débris plastiques sont retrouvés au niveau des rives des environnements côtiers avec une concentration plus élevée dans les zones densément peuplées (Browne, Galloway and Thompson 2010; Browne *et al.* 2011) ; mais aussi dans les environnements d'eau douce, des lacs et rivières (Eerkes-Medrano, Thompson and Aldridge 2015) où les fragments de plastiques sont retrouvés dans les eaux de surface, dans les sédiments et au niveau des berges (Moore, Lattin and Zellers 2011). L'accumulation des petits plastiques dans l'écosystème aquatique peut aussi être due à l'intégration dans la chaîne alimentaire, où ils peuvent y être bioaccumulés. Finalement, les nanoplastiques et les microplastiques sont particulièrement préoccupants car ils sont difficilement observables à l'œil nu et peuvent stagner dans des endroits inaccessibles ce qui les rend difficiles à drainer et à éliminer des cours d'eau.

III.2.3) Flux entre les écosystèmes

Les cours d'eau relient certains compartiments de la biosphère; ils sont des conduits reliant les systèmes terrestres, d'eau douce, et marins, offrant d'importantes voies de transport longue distance ainsi que des possibilités de stockage pour les plastiques dans certaines zones (Horton and Dixon 2017), comme par exemple les sédiments (Figure 13). La Figure 14 de Windsor *et al.* (2019) illustre les flux possibles de plastique entre les compartiments de la biosphère. La plupart des recherches sur la pollution plastique se sont concentrées sur les écosystèmes marins, mais ceux-ci ne sont que le point d'aboutissement d'une contamination provenant des environnements terrestres, et qui est véhiculée par les rivières (Windsor *et al.* 2019). Selon l'étude de Lebreton *et al.* (2017), il a été estimé qu'entre 1,15 et 2,41 millions de tonnes de déchets plastiques entrent annuellement dans les océans en provenance des rivières, considérant ainsi les cours d'eau comme la principale source d'apport de plastique dans les océans. Horton and Dixon (2017) ont souligné que les rivières sont des puits, mais aussi des voies de passage du plastique par différents mécanismes de transport tels que les effluents ou l'épandage des boues des stations d'épuration. Les rivières sont considérées comme des puits de plastique notamment en raison de leur accumulation au niveau des sédiments avec le plus souvent des tailles appartenant à la classe des

microplastiques (Castañeda *et al.* 2014; Wagner *et al.* 2014) mais aussi des méso- et macroplastiques retrouvés au niveau des berges et des cours d'eau (Hoellein *et al.* 2014; Bruge *et al.* 2018; Kiessling *et al.* 2019; Tramoy *et al.* 2019). Dans les bassins versants, les facteurs hydrométéorologiques tels que le vent, l'écoulement et le débit des rivières influencent la rétention, le transport et le dépôt des plastiques (Lechthaler *et al.* 2020; Haberstroh *et al.* 2021; Roebroek *et al.* 2021; van Emmerik *et al.* 2022). De plus, la remobilisation des plastiques retenus peut se produire lors d'événements hydrologiques extrêmes tels que les tempêtes et les inondations (van Emmerik *et al.* 2022).

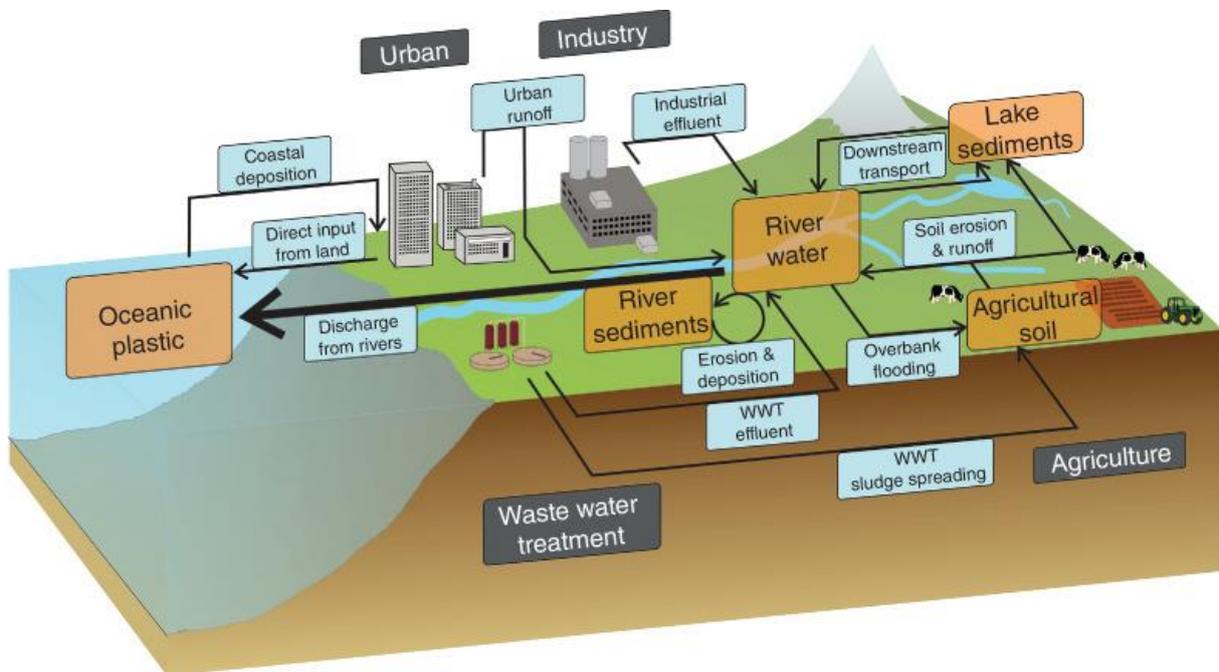


Figure 13 : Modèle conceptuel représentant le concept de « Cycle du plastique ». Les rectangles orange représentent les puits, les rectangles bleus représentent les mécanismes de transport et les flèches représentent les voies de transport du plastique. (Issue de Horton and Dixon (2017)). (Traitement des eaux usées, WWTP = *Wastewater Treatment Plant*).

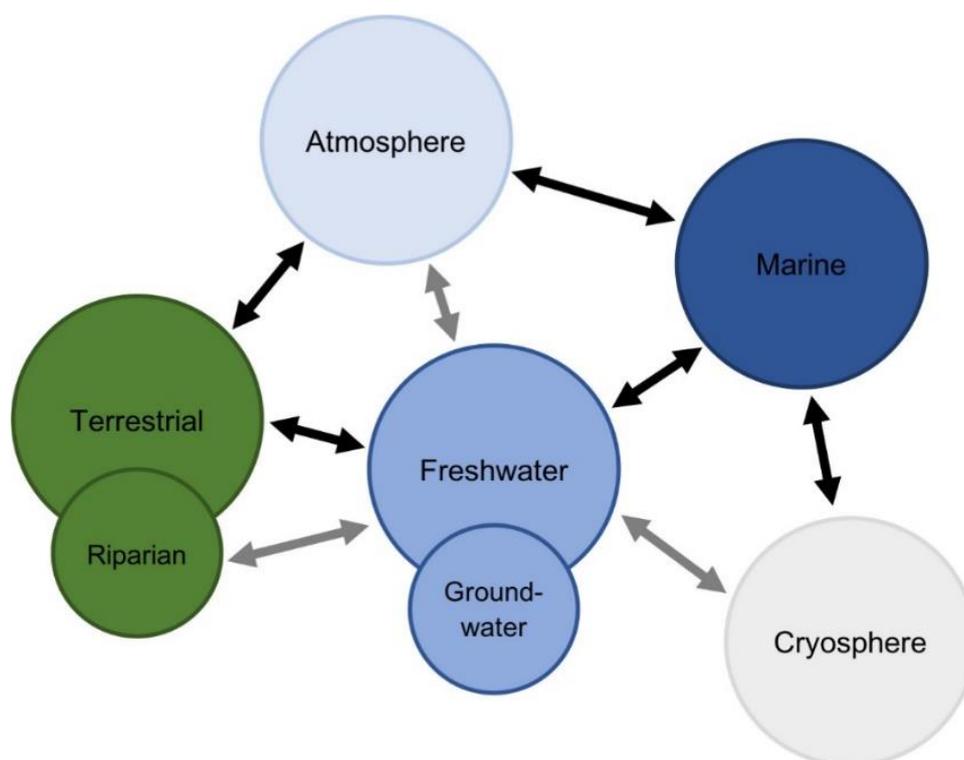


Figure 14 : Diagramme conceptuel des flux de plastique à travers les compartiments des bassins hydrologiques. Les voies spécifiques, indiquées par des flèches noires, sont discutées plus en détail dans le corps principal du texte de cette référence bibliographique. Les flèches grises représentent des flux théoriques qui doivent encore être étudiés en détail (voir le chapitre « Écosystèmes sous-représentés » de la source de cette figure). (Issue de Windsor *et al.* (2019)).

III.3) Pollution plastique en rivière

III.3.1) Quantitativement

La quantification précise des plastiques dans les cours d'eau est primordiale pour comprendre l'ampleur de la pollution plastique et élaborer des solutions efficaces. Les plastiques, sous forme de microplastiques et de macroplastiques, sont omniprésents dans les écosystèmes aquatiques, et pour les fractions de taille plus difficilement visibles à l'œil nu, c'est-à-dire les micro- et nanoplastiques, la quantification représente un défi unique en matière de mesure et d'analyse.

Tout d'abord, il y a de nombreuses études qui traitent de la quantification et/ou de la caractérisation des plastiques dans l'environnement (Browne, Galloway and Thompson 2010; Sadri and Thompson 2014; Gasperi *et al.* 2014; Hoellein *et al.* 2014; Lechner *et al.* 2014; Morritt *et al.* 2014; Guerranti *et al.* 2017; Bruge *et al.* 2018; van Emmerik *et al.* 2018; Lahens *et al.* 2018; Tramoy *et al.* 2019; van Calcar and van Emmerik 2019; van Emmerik and Schwarz 2019; Castro-Jiménez *et al.* 2019; Kiessling *et al.* 2019). Le [Tableau 1](#) des quantifications de plastiques donne un aperçu des quantités de plastique que l'on peut retrouver dans différents bassins versants autour du monde, mais aussi des méthodologies utilisées tant en matière de gamme de taille des plastiques étudiés, d'échelles spatiale et temporelle prises en compte et de méthodes de prélèvement, d'analyse et de quantification. Ces études présentent des différences au niveau de la taille de la zone de prélèvement, certaines se concentrent sur un tronçon de cours d'eau (Tramoy *et al.* 2019) d'autre étudient des sites précis du cours d'eau pouvant aller d'un site unique (Castro-Jiménez *et al.* 2019) plus ou moins long à plusieurs dizaines de sites dans une même étude (van Calcar and van Emmerik 2019). Il peut s'agir d'une quantification au niveau du lit de la rivière avec plusieurs zones bien définies comme dans l'étude de Hoellein *et al.* (2014) qui ont pris en compte à la fois les berges et les sédiments, tandis que d'autres études se concentrent sur une seule partie du lit comme les sédiments (Guerranti *et al.* 2017), ou bien sur les berges (Bruge *et al.* 2018), ou bien la colonne d'eau (Carson *et al.* 2013a; Gasperi *et al.* 2014) par exemple. D'autres études englobent plusieurs bassins versant couvrant la plupart des grands systèmes fluviaux d'Allemagne et quelques petits illustré par l'étude de Kiessling *et al.* (2019) dont la collecte de macroplastique à grande échelle a pu se faire grâce à la participation citoyenne. Donc on a une variété d'échelles et de compartiments étudiés à l'intérieur d'un écosystème, d'un bassin versant voire d'une région. On ajoute à cela une variété de tailles des plastiques étudiées, car en fonction de la question de recherche posée, certaines études vont quantifier les microplastiques tandis que d'autres quantifieront les mésoplastiques par exemple, ou plusieurs fractions de taille pourront être prise en compte comme dans l'étude de Tramoy *et al.* (2019) qui ont pris en considération les micro-, méso- et macroplastiques. De plus, les différentes études publiées dans la littérature n'ont pas forcément le même référentiel de gamme de taille de plastiques. Les techniques de collecte, d'échantillonnage peuvent aussi varier en fonction du site, du matériel à disposition, ou de la taille des déchets plastiques recherchés. Par exemple, des filets à maille plus ou moins grande peuvent être utilisés pour collecter les plastiques transportés dans l'eau (Morritt *et al.*

2014), l'élaboration d'un quadrillage d'une zone spécifique sur les berges (Tramoy *et al.* 2019), ou bien l'élaboration de transects peuvent être utilisés pour caractériser la contamination plastique d'un site. Ensuite, au laboratoire, les techniques de quantification aussi peuvent varier d'un protocole à l'autre, il peut s'agir d'une quantification en poids et/ou en nombre d'items de plastique par volume d'eau prélevé (Van Emmerik *et al.* 2019) ou par surface d'échantillonnage (Hoellein *et al.* 2014). Certains travaux offrent des analyses sur des échelles temporelles courtes (quelques minutes à quelques heures de prélèvement) (Tramoy *et al.* 2019) tandis que d'autres études ont un panel de prélèvements beaucoup plus long, avec une fréquence régulière sur plusieurs jours, parfois mêmes sur plusieurs années (Lechner *et al.* 2014; Bruge *et al.* 2018). Même si certaines études, notamment en milieu marin, tendent à homogénéiser ces protocoles, tous ces éléments rendent la comparaison entre publications difficiles parce que les protocoles de prélèvement, d'échantillonnage et d'analyse sont différents. Avec des protocoles similaires, les résultats seront tout de même influencés par des facteurs environnementaux et des conditions topographique et hydrodynamique différentes en fonction des sites d'étude et des périodes de prélèvement, comme précédemment évoqué dans le chapitre des flux de plastiques entre les écosystèmes.

Globalement, les études sur la contamination plastique des rivières ([Tableau 1](#)), utilisent des méthodologies variées pour mieux comprendre la répartition et l'ampleur de ce problème environnemental. Malgré cette diversité méthodologique, on constate que le compartiment le plus fréquemment étudié dans les rivières est la colonne d'eau, suivie des sédiments. Les méthodes de collecte les plus utilisées sont les filets et la collecte à la main. Cependant, il est important de noter que d'autres méthodes de prélèvement, telles que l'utilisation de barrages flottants, le comptage visuel, l'échantillonnage par chalut ont également été utilisées dans certaines études en fonction des objectifs de recherche spécifiques et des conditions sur le terrain. Donc, bien que la collecte à la main soit courante, d'autres méthodologies sont également employées en fonction des besoins de chaque étude. Il est important de noter que la méthodologie de prélèvement peut varier en fonction des objectifs spécifiques de chaque étude, de la disponibilité des ressources et du matériel, ainsi que des caractéristiques géographiques du site d'étude. Par conséquent, il n'y a pas de méthode unique qui soit couramment utilisée, mais plutôt une variété de méthodologies adaptées à différentes situations. Les niveaux de contamination plastique varient considérablement d'une étude à l'autre en raison de divers facteurs, notamment la

localisation géographique, la méthodologie de prélèvement, la taille ciblée des plastiques, et l'échelle temporelle de l'étude qui elle aussi varie beaucoup. Alors, les résultats varient de manière significative, allant de quelques milligrammes par mètre cube à plusieurs tonnes par an, en fonction de la méthode de mesure et de la taille du site de prélèvement. En outre, les niveaux de contamination plastique sont influencés par des facteurs tels que la densité de population et le degré d'urbanisation, la gestion des déchets plastiques, les régimes de précipitations, etc. Les plastiques de différentes tailles (micro-, méso-, macro-) sont souvent pris en compte dans les études, ce qui permet d'obtenir une image plus complète de la contamination plastique.

Tableau 1 : Quantification des plastiques dans les rivières. Dans les études présentées ici, les lieux de prélèvement du bassin versant, les échelles spatiales et temporelles de prélèvement, la taille des plastiques recherchés, la méthode de prélèvement ainsi que les quantités répertoriées sont présentées. A noter qu'en fonction des études, les termes micro-, méso- ou macroplastique ne correspondent pas tous au même référentiel de taille et sont précisés dans la colonne intitulée « Taille ciblée » lorsque les auteurs le spécifient.

Auteur et année	Pays d'étude	Lieux du bassin versant			Taille du site de prélèvement	Echelle de temps de prélèvement	Taille ciblée	Protocole de prélèvement	Résultats (unité)
		Eau	Sédiments	Berges					
(Morritt <i>et al.</i> 2014)	Royaume-Uni	X			7 sites de l'estuaire supérieur de la Tamise	3 mois (de septembre à décembre 2012)	Macroplastique	Filet de pêche	8490 items
(Lahens <i>et al.</i> 2018)	Vietnam	X			4 sites de prélèvement	5 prélèvements répartis sur 5 jours en Avril 2016	Micro et macroplastique	Filet et manuellement	0,96 à 19,91 g habitant ⁻¹ j ⁻¹ , soit 350 à 7270 g habitant ⁻¹ an ⁻¹
(Tramoy <i>et al.</i> 2019)	France			X	1 rive de 1km de long	Un prélèvement	Micro, Méso, Macroplastique (micro < 0,5 cm ; méso [0,5 ; 2,5] ; macro > 2,5 cm)	Collecte à la main dans des quadrillage en m ²	20259 items
(Hoellein <i>et al.</i> 2014)	USA		X	X	3 tronçons de 70 à 100 m de long espacés de 250 m	3 jours (Été 2011)	Méso, Macro méso et macro > 1cm	Non spécifié	0,02-0,04 items/m ² 35 à 50 g/m ¹

(Kiessling <i>et al.</i> 2019)	Allemagne			X	250 points d'échantillonnage répartis sur la plupart des grands systèmes fluviaux d'Allemagne plus quelques petits	6 mois (de Septembre à Novembre 2016 et de Mai à Juillet 2017)	Macroplastique	Collecte à la main dans des cercles établis sur les berges et ramassage des déchets	0,54 items/m ²
(Bruge <i>et al.</i> 2018)	France			X	8 sites d'échantillonnage	3 ans	> 0,5 cm	Collecte à la main sur les berges et dans la végétation riveraine	1-400 items/m ²
(Guerranti <i>et al.</i> 2017)	Italie		X		14 sites d'échantillonnage	1 an	Micro, Méso, Macroplastique	Prélèvement manuel à l'aide d'un seau de 2 L des sédiments	57-1069 items/kg
(Sadri and Thompson 2014)	Royaume-Uni	X			Remorquage du filet pendant 30 minutes (vitesse de 4 nœuds)	2 mois (Mai et Juillet 2012)	> 5 mm ; 3-5 mm ; 1-3 mm et < 1 mm	Filet Manta de 0,50 m sur 0,15 m (maille de 300 µm)	Totale de 204 débits dont 84% ont été confirmées comme étant du plastique.
(Castro-Jiménez <i>et al.</i> 2019)	France	X			1 site d'observation sur une largeur de 65 m du cours d'eau	1 an	Macro : [2,5 ; 50] cm	Observations visuelles mensuelles de l'eau courante depuis un pont au-dessus de l'eau	0,7 tonne /an ≈ 223 000 items au total

(Gasperi <i>et al.</i> 2014)	France	X			10 sites de prélèvement répartis en amont et en aval de la ville de Paris	6 ans (2008 à 2013)	> 5 mm	Echantillonnage des débris sur 10 barrages flottant	27 tonnes/an 2,3 g/habitant Parisien/an
(Carson <i>et al.</i> 2013a)	USA	X			2 barrages flottants chacun placé sur deux rivières	205 jours		Barrages flottants	73% de plastique sur 29,9 kg/205 jours
(van Emmerik <i>et al.</i> 2018)	Vietnam	X			12 points d'observation à partir d'un pont de 300 m de long	10 jours (Février et Mars 2018)	Macro (> 5 cm)	Comptage visuel et estimation du débit massique par échantillonnage avec un chalut statique sur un pont. Puis estimation des émissions de plastique par an.	7,5-13,7x10 ³ tonnes/an
(Van Emmerik <i>et al.</i> 2019)	Indonésie	X			5 sites d'observation sur des ponts	2 semaines	Macro (> 1 cm)	Comptage visuel et échantillonnage avec un chalut. Puis estimation des émissions de plastique par an.	2,1x10 ³ tonne/an

(Lechner <i>et al.</i> 2014)	Autriche	X			7 points d'échantillonnage	2 ans (2010 - 2012)	Méso (2-20 mm) et micro (<2 mm)	Echantillonnage par filets dérivants fixes	1533 tonnes/an
(van Calcar and van Emmerik 2019)	7 pays en Europe et Asie du Sud-Est	X			24 rivières dans 7 pays	1 an	Macro	Evaluation basée sur des observations par comptage visuel sur 24 sites	2,5x10 ² items/h ⁻¹ /mois en Europe et 7,1x10 ³ items/h ⁻¹ /mois en Asie du Sud-Est

III.3.2) Qualitativement

Dans l'ensemble, les études ont recensé une grande variété de types de polymères plastiques différents contaminant les écosystèmes aquatiques. Cependant, parmi ces études, un consensus semble se dégager quant au panel de polymères les plus fréquemment retrouvés ainsi que les plus abondants.

Les types de plastique les plus fréquemment trouvés dans les écosystèmes fluviaux sont le polyéthylène, le polystyrène, le polypropylène et le polyamide qui se déclinent dans des gammes de tailles de nanoplastiques ($< 0,1 \mu\text{m}$), de microplastiques ($0,1 \mu\text{m} - 5 \text{mm}$), de mésoplastiques ($5 \text{mm} - 5 \text{cm}$) et de macroplastiques ($> 5 \text{cm}$) (van Emmerik and Schwarz 2019). Ces plastiques ont été recensés dans de nombreux pays à travers le monde dont des pays d'Europe géographique comme la France, l'Angleterre, les Pays-Bas, la Roumanie, l'Autriche, la Suisse, des pays d'Asie comme la Malaisie, le Vietnam, la Corée du Sud mais aussi en Amérique du Nord (USA) et en Amérique latine comme par exemple le Chili (van Emmerik and Schwarz 2019). Une majorité de plastiques de types polyéthylène haute et basse densité, polypropylène, polystyrène, chlorure de polyvinyle, polyester, et polyamide ont été trouvés dans les rivières d'Argentine, d'Angleterre, d'Italie, de France, du Vietnam, d'Indonésie, de Thaïlande, de Malaisie et d'Allemagne (Browne, Galloway and Thompson 2010; Klein, Worch and Knepper 2015; Blettler *et al.* 2019; van Calcar and van Emmerik 2019). Ces plastiques sont largement utilisés dans les produits de consommation courants tels que les emballages, les bouteilles en plastique, les sacs en plastique, les récipients alimentaires, les ustensiles jetables, etc. C'est en raison de leur utilisation généralisée que ces types de plastiques ont tendance à se retrouver fréquemment dans l'environnement, y compris dans les cours d'eau et les bassins versants. Les plastiques les plus abondants et les plus fréquemment trouvés dans ces rivières sont les plastiques « traditionnels » ou non biodégradables, car la production mondiale de ce type de plastique a commencé dans les années 1950 et a augmenté au fil des ans, tandis que la production mondiale de plastiques biosourcés et biodégradables est beaucoup plus récente et, est aujourd'hui encore moins abondante comme expliqué précédemment. Il s'agit donc d'une production et d'une utilisation beaucoup plus récente des plastiques biodégradables, c'est pour cette raison que ces plastiques sont encore relativement peu présents dans les écosystèmes au regard des plastiques non biodégradables. Néanmoins, une tendance à l'augmentation de son accumulation dans les écosystèmes aquatiques est à

envisager compte tenu de l'accroissement mondial de leur production. De plus, leurs propriétés physiques dues à leur composition chimique hybride (mélange de polymère plastique classique et de matière biosourcée), qui leur confère une dégradabilité plus rapide dans l'environnement intégrant ces plastiques. Cependant, la production de plastiques biodégradables fabriqués à partir de matériaux biosourcés tend à augmenter, répondant à de nouvelles législations en lien avec les prises de conscience de l'augmentation de la pollution plastique afin de réduire l'impact environnemental des plastiques traditionnels. Par exemple, en France, la Loi de Transition Énergétique pour la Croissance Verte (TEPCV), adoptée en 2015, vise entre autres à promouvoir la production de sacs plastiques compostables avec un taux de matière biosourcée de plus en plus important. Afin de répondre à certains principes de l'économie circulaire (Keiser and Tortora 2022), les plastiques biodégradables sont conçus pour se décomposer plus rapidement dans l'environnement car ils peuvent être convertis en CO₂ par l'action microbienne, réduisant ainsi la masse de la pollution plastique dans l'environnement (Flury and Narayan 2021).

III.4) Les plastiques *Low-Density Polyethylene (LDPE)* et *Biodegradable BioBased-plastic (BDBP)* : production, utilisation et composition

Dans ce manuscrit, les plastiques sont catégorisés en deux grandes classes. Pour la première classe, il s'agit des plastiques que nous appellerons « non-biodégradables », composés par des polymères non-biodégradables à court terme, c'est-à-dire à une échelle de temps relativement courte. Cela ne signifie pas que ces plastiques ne sont pas biodégradables, mais cela permet de les opposer à la seconde classe de plastiques qui regroupe les plastiques dit « biodégradables » et qui sont biodégradables dans une échelle de temps beaucoup plus courte que ceux du premier groupe.

Au cours de cette thèse, nous avons choisi d'étudier la colonisation ainsi que l'impact structurel et fonctionnel sur les microorganismes de rivière de deux types de plastiques. Nous avons choisi le LDPE, en tant que plastique non-biodégradable et le plastique biodégradable à base d'amidon de pomme de terre (BDBP) en tant que plastique biodégradable. C'est

pourquoi les caractéristiques de ces deux polymères sont plus spécifiquement décrites dans ce paragraphe.

Le premier plastique (LDPE) « *Low-Density Polyethylene* » ou « Polyéthylène basse densité » est un polymère largement utilisé dans diverses applications en raison de ses propriétés intéressantes pour l'industrie (densité, résistance mécanique, étanchéité, propriétés thermiques et rhéologiques) (Demirors 2011). Son histoire remonte à la découverte des premières résines de polyéthylène dans les années 1930 par les chercheurs Reginald Gibson et Eric Fawcett de l'*Imperial Chemical Industries* (ICI) au Royaume-Uni. Cependant, ce n'est que dans les années 1950 que le LDPE a été développé et commercialisé par l'entreprise britannique ICI et la société américaine Phillips Petroleum (Fawcett and Gibson 1939; Sailors and P. 2006; Demirors 2011). Concernant sa composition chimique, le LDPE appartient à la famille des polyoléfines et est fabriqué à partir de monomères d'éthylène (Fawcett and Gibson 1939). Sa structure chimique est basée sur des chaînes linéaires de polymères composées de groupes $(CH_2-CH_2)_n$ répétés (Demirors 2011; Patel 2016). Cela confère au LDPE une structure peu dense avec des liaisons chimiques faibles entre les chaînes, lui donnant sa flexibilité et sa malléabilité (Sperling 2005). Concernant ses caractéristiques physiques, le LDPE est flexible mais aussi transparent ou semi-transparent, ce qui en fait un choix populaire pour les films plastiques et les sacs. Il a également une excellente résistance mécanique, une bonne isolation électrique et une faible perméabilité aux gaz, ce qui le rend adapté à diverses applications (Brydson 1999). Ses utilisations sont très courantes et variées, car il est utilisé dans une large gamme d'applications industrielles et commerciales. Il est couramment utilisé pour fabriquer des films plastiques fins, des sacs, des bouteilles, des jouets, des contenants alimentaires, des tuyaux souples, des revêtements de câbles, des récipients et des emballages. De par ses propriétés - essentiellement sa flexibilité, sa résistance et sa durabilité - il est très couramment utilisé pour les produits qui nécessitent des caractéristiques de protection et de conditionnement comme pour les emballages alimentaires.

Le polyéthylène basse densité est dit « non-biodégradable » en raison de son plus faible taux de biodégradabilité par rapport aux polymères dits biodégradables dans une échelle de temps plus courte, mais en réalité, il est possible qu'il soit dégradé par l'action de facteurs abiotiques tels que les irradiations UV, les variations de température par exemple, mais aussi par l'action de facteurs biotiques médiés par des microorganismes (Kumar Sen and

Raut 2015). En effet, cette biodégradation peut se faire par des enzymes microbiennes (Albertsson, Andersson and Karlsson 1987; Chiellini, Corti and Swift 2003). La biodégradation, par action enzymatique, du LDPE peut être faite par des bactéries (Nowak *et al.* 2011; Dey *et al.* 2020; Zadjelovic *et al.* 2022), des champignons (Nowak *et al.* 2011; Sowmya *et al.* 2014; Ameen *et al.* 2015; Gajendiran, Krishnamoorthy and Abraham 2016), ou des algues (Gowthami *et al.* 2023). Beaucoup de recherches se sont concentrées sur des souches uniques issues du milieu marin (Ameen *et al.* 2015; Nag *et al.* 2021; Zadjelovic *et al.* 2022; Gowthami *et al.* 2023), des sols provenant de décharge ou non, ou de boues de forage (Nowak *et al.* 2011; Gajendiran, Krishnamoorthy and Abraham 2016; Dey *et al.* 2020), ou encore de souches provenant du microbiote d'autres organismes comme le ver de cire (Yang *et al.* 2014a), et certaines études ont étudié cette biodégradation avec des *consortia* microbiens (Mumtaz, Khan and Hassan 2010; Skariyachan *et al.* 2018; Joshi *et al.* 2022).

Quant au second plastique que nous avons nommé BDBP « *Biodegradable BioBased Plastic* », il est fait à partir de 30 % de matière biosourcée ; l'amidon de pomme de terre selon la norme ISO 16620-2 : 2015, qui est couramment utilisé comme sac compostable (norme en vigueur en 2017, au moment de l'obtention des sacs en plastique utilisés pour notre expérimentation). Il est composé à 70 % de copolyester dont la composition exacte n'est pas spécifiée par le fabricant et à 30 % d'amidon de pomme de terre). De façon générale, les matériaux biodégradables sont des éléments pouvant subir un processus de décomposition sous l'action enzymatique de microorganismes et donner du CO₂, du méthane et de l'eau ainsi que des composés non organiques ou de la biomasse selon la norme D-5488-94 de l'*American Society for Testing and Materials* (ASTM). Les polymères plastiques biosourcés, également connus sous le nom de biopolymères, sont des matériaux plastiques fabriqués à partir de sources dites renouvelables d'origines biologiques, telles que les plantes, les microorganismes ou les déchets organiques. Contrairement aux polymères plastiques conventionnels dérivés du pétrole, les polymères biosourcés contribuent à réduire la dépendance aux ressources fossiles non renouvelables et à atténuer les impacts environnementaux associés aux plastiques. L'utilisation de matière biosourcée pour la fabrication de polymères plastiques s'inscrit dans le contexte d'une demande croissante de matériaux dits respectueux de l'environnement et de réduction de la dépendance aux ressources fossiles. La découverte et le développement de polymères à base d'amidon de

pomme de terre par exemple, sont liés aux recherches dans le domaine des matériaux biodégradables et durables (Plastics Europe 2023). A noter que dans les types de biopolymères, plusieurs classes sont décrites parmi lesquels on retrouve les polymères naturels, présents naturellement dans les plantes, tels que l'amidon ou la cellulose ; les polymères synthétiques biosourcés qui sont fabriqués à partir de monomères d'origine biologique comme l'acide lactique ou l'acide glycolique utilisés pour fabriquer des polymères comme le PLA (acide polylactique). On retrouve également les polymères dit biodégradables qui sont également biosourcés pouvant se dégrader dans la nature sans être nuisible pour l'environnement.

Les propriétés de l'amidon, telles que sa biodégradabilité et son abondance dans la nature, ont suscité un intérêt croissant pour son utilisation en tant que matière première pour la fabrication de plastique (Gonzalez-Gutierrez *et al.* 2010). L'amidon est un polysaccharide naturel, composé de chaînes de glucoses (Kumar and Singh 2008). La composition chimique de l'amidon de pomme de terre implique des chaînes linéaires d'amylose et des chaînes ramifiées de l'amylopectine. Les polymères plastiques fabriqués à partir d'amidon de pomme de terre sont souvent modifiés pour améliorer leurs propriétés mécaniques et thermiques, notamment en ajoutant d'autres additifs et agents de renforcement. Parmi les nombreux additifs qui peuvent être utilisés pour la fabrication de plastiques biodégradables à base d'amidon, on trouve les huiles essentielles (Vianna *et al.* 2021; Wang *et al.* 2021a) et autres extraits végétaux (Gao *et al.* 2020; Jha 2020; Menzel 2020) pour leurs propriétés antimicrobiennes. On y trouve également des composés chimiques comme : i) le nitrite de sodium pour améliorer les propriétés mécaniques, augmenter l'hydrophilie et réduire la croissance microbienne (Chatkitanan and Harnkarnsujarit 2020), ii) le sorbate de potassium pour améliorer les propriétés physiques, mécaniques et thermique du plastique, c'est-à-dire pour réduire l'adsorption de l'humidité et la perméabilité à l'oxygène ainsi qu'une meilleure résistance à la traction (Jha 2020), iii) des solvants tels que l'urée-chlorure de choline et le glycérol-chlorure de choline pour réduire la sensibilité à l'eau (Leroy *et al.* 2012). Parmi ces additifs il y a également des pigments qui ont des propriétés esthétiques, mais aussi antimicrobiennes et antioxydantes (Queiroz *et al.* 2017; Lozano-Navarro *et al.* 2018).

Les caractéristiques physiques des polymères à base d'amidon de pomme de terre varient en fonction des méthodes de fabrication et des traitements appliqués. Ces polymères peuvent présenter une certaine biodégradabilité en fonction de leur formulation et de leur

structure chimique, ce qui les rend attrayants pour les industries. Cependant, leurs propriétés mécaniques comme la résistance à la traction ou à l'eau par exemple, peuvent être moins efficaces par rapport à celles des plastiques traditionnels, ce qui limite encore leur utilisation dans certains domaines (Molavi *et al.* 2015). Ce sont d'ailleurs leurs propriétés physiques et chimiques qui détermineront leur biodégradabilité comme par exemple leur hydrophobicité/hydrophilie (Krasowska and Sigler 2014). Les utilisations de ces polymères sont variées et souvent similaires à celles des plastiques conventionnels. Ils sont couramment utilisés dans les emballages alimentaires, les films agricoles biodégradables (films de paillage par exemple), les sacs compostables et les produits jetables et également dans certaines applications dans les secteurs de la santé (Huang, Shetty and Wang 1990; Filiciotto and Rothenberg 2021).

Des études ont examiné la biodégradabilité de matériaux plastiques faits à base de matière renouvelable tel que l'amidon, ainsi que les propriétés mécaniques, thermiques et le potentiel en tant qu'alternatives aux plastiques conventionnels à base de pétrole. Les bioplastiques à base d'amidon de manioc se dégradent plus rapidement que ceux à base d'amidon de maïs, et l'ajout d'un ingrédient naturel extrait de la plante *Cola cordifolia* améliore la biodégradabilité des bioplastiques composites par rapport aux bioplastiques simples (Zoungranan *et al.* 2020). Les bioplastiques à base d'amidon de pomme de terre et d'igname (tubercule comestible) se sont avérés hautement biodégradables lors des tests de dégradation dans le sol avec des pourcentages de biodégradation dans un délai d'une semaine qui étaient de 43% pour le bioplastique à base de pomme de terre et de 26% pour celui à base d'igname (Aina *et al.* 2016).

De de façon générale, la biodégradabilité des plastiques biosourcés dépend de la nature de l'amidon utilisé. Les conclusions des études varient au cas par cas en fonction des types d'amidon utilisé et de la présence d'ingrédients naturels, mais dans l'ensemble, ces études suggèrent que les bioplastiques à base d'amidon ont un potentiel de biodégradabilité élevé, ce qui en fait des alternatives intéressantes aux plastiques conventionnels non biodégradables (Aina *et al.* 2016; Hasan *et al.* 2020; Zoungranan *et al.* 2020).

III.5) Plastisphère

Le concept de plastisphère a été décrit comme étant un assemblage de communautés microbiennes sur du plastique par Amaral-Zettler, Zettler, and Mincer (2020); Zettler, Mincer, and Amaral-Zettler (2013) montrant le potentiel des débris plastiques comme substrat pour la colonisation microbienne. La plastisphère est un terme qui fait référence à un ensemble constitué par la colonisation de microorganismes associés à des particules de plastique dans les systèmes aquatiques. En outre, la plastisphère s'étend sur plusieurs biomes sur Terre et peut être transportée sur de longues distances (Amaral-Zettler *et al.* 2015; Amaral-Zettler, Zettler and Mincer 2020). Dans la plastisphère, les microorganismes tels que les bactéries, les algues, les protozoaires et de petits animaux aquatiques s'attachent et colonisent la surface des plastiques (Figure 15). Ces microorganismes forment des biofilms, des agrégats de cellules et de matière organique, qui adhèrent aux plastiques. Cette colonisation peut être influencée par la composition chimique des plastiques, leur forme, leur taille et les facteurs environnementaux du milieu où ils se retrouvent.

La plastisphère est un concept relativement récent et en pleine exploration. Les interactions biologiques au sein de la plastisphère ont des implications pour la distribution des microorganismes dans les écosystèmes aquatiques, la chaîne alimentaire et l'écologie globale des écosystèmes aquatiques, mettant en évidence les effets potentiels des plastiques sur les écosystèmes marins et l'environnement en général, notamment en tant que substrat pour les microorganismes et vecteur longue distance de leur dispersion.

Ce concept a d'abord été développé pour l'environnement marin, mais certaines études ont plus récemment étendu le concept de plastisphère à l'eau douce, y compris les rivières. Il a été démontré l'existence d'une plastisphère d'eau douce sur des plastiques de plus ou moins grande taille, collectés ou exposés en rivière (Hoellein *et al.* 2014; McCormick *et al.* 2016; Harrison *et al.* 2018; Morohoshi *et al.* 2018; Oberbeckmann, Kreikemeyer and Labrenz 2018; Li *et al.* 2021; Liu *et al.* 2021; Wang *et al.* 2021b; Zhang *et al.* 2022b).

Les plastisphères d'eau marine et d'eau douce partagent des similitudes et présentent également des différences. Tout d'abord, elles présentent des similitudes dans leur colonisation rapide par les microorganismes (Harrison *et al.* 2014; Fish, Osborn and Boxall 2016; Laffet *et al.* 2023) et dans l'influence des propriétés de surface des polymères sur les

biofilms microbiens (Carson *et al.* 2013b; Oberbeckmann, Löder and Labrenz 2015). Cette plastisphère est retrouvée au niveau de la colonne d'eau mais également emprisonnée dans les sédiments marins et d'eau douce (Delacuvellerie *et al.* 2021; Li *et al.* 2021; Merbt *et al.* 2022; Miao *et al.* 2022). Ces communautés sont façonnées d'une part par les conditions environnementales de l'eau douce et marine et, d'autre part, par le type de plastique (PS et PE) (Oberbeckmann, Kreikemeyer and Labrenz 2018).

Les deux environnements partagent des similitudes en ce qui concerne la biodégradation des plastiques avec un accent mis sur la recherche en écosystème marin. Mais il réside au sein des deux types de plastisphère, marine et d'eau douce, certains microorganismes capables de dégrader certains polymères plastiques (Ameen *et al.* 2015; Delacuvellerie *et al.* 2022; Joshi *et al.* 2022; Zadjelovic *et al.* 2022; Ma *et al.* 2023; Zhang *et al.* 2023).

Cependant, les distinctions deviennent apparentes lorsqu'on examine l'origine de la pollution plastique, la recherche entreprise, et les impacts écologiques observés. En ce qui concerne la recherche, les plastisphères d'eau marine ont fait l'objet de nombreuses études, tandis que celles d'eau douce sont moins étudiées. En ce qui concerne les impacts écologiques, les plastisphères d'eau marine sont associées à un potentiel transport de pathogènes, de biotoxines ou de polluants (Harrison, Sapp and Osborn 2011; Zettler, Mincer and Amaral-Zettler 2013), ce qui soulève des préoccupations pour la santé animale et humaine.

Des lacunes de connaissances importantes subsistent, en particulier en ce qui concerne les biofilms plastiques dans les environnements peu étudiés. Les interactions avec les organismes supérieurs et les processus environnementaux peuvent varier en raison des caractéristiques propres à chaque environnement. Par conséquent, des recherches sont nécessaires pour comprendre les impacts sur la faune, les processus écologiques et la biodégradabilité des plastiques dans les deux types d'environnements.

Enfin, en ce qui concerne les méthodes analytiques et expérimentales, des avancées technologiques ont permis une meilleure compréhension des plastisphères, mais il existe encore des différences liées aux environnements spécifiques et aux types de microorganismes présents. Les avancées, telles que l'utilisation du *metabarcoding*, de la métatranscriptomique et des méthodes d'analyse de surface avancées, contribuent à une meilleure compréhension

des plastisphères dans les deux environnements. En somme, bien que des similitudes existent entre les plastisphères d'eau marine et d'eau douce, les conditions, les sources et les processus de transport varient, créant ainsi certaines différences.

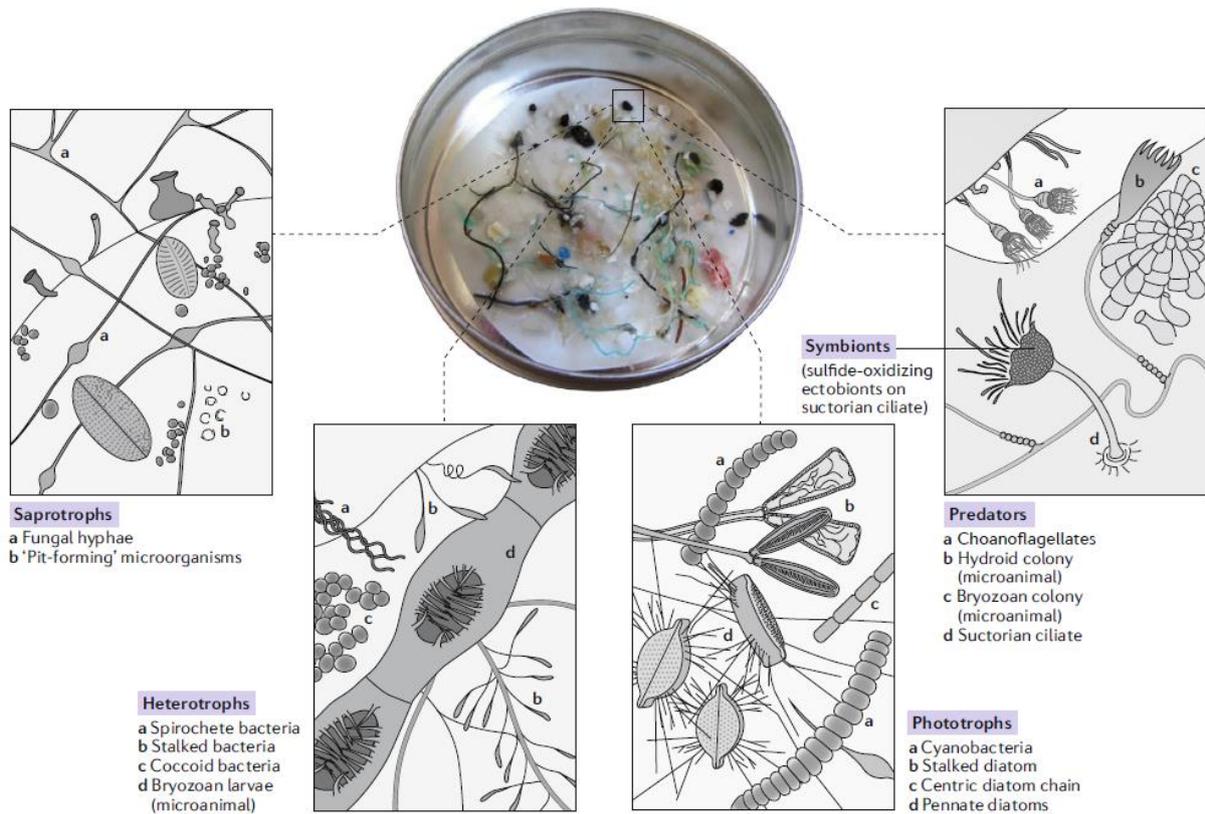


Figure 15 : La communauté de la plastisphère. Modèle conceptuel de la diversité de la communauté tridimensionnelle de la plastisphère, montrant un écosystème microbien composé de bactéries, de protistes et d'animaux dans les zones oligotrophes de l'océan ouvert. Les membres comprennent les producteurs primaires tels que les cyanobactéries et les diatomées, les ciliés prédateurs et les hydres, les herbivores incluant les ciliés et les bryozoaires, les relations symbiotiques et les hétérotrophes. (Issue de Amaral-Zettler, Zettler, and Mincer (2020)).

III.6) Impact structurel et fonctionnel de la pollution plastique sur les communautés microbiennes aquatiques

La pollution plastique est omniprésente à l'échelle mondiale. Cependant, contrairement au milieu marin, qui reste le compartiment le plus étudié en matière de quantification de la pollution plastique et d'évaluation de son impact (Harrison *et al.* 2018; Oberbeckmann, Kreikemeyer and Labrenz 2018; Jacquin *et al.* 2019; Leistenschneider *et al.* 2023), la compréhension de la répartition et des conséquences écologiques des plastiques dans d'autres écosystèmes reste limitée comme par exemple dans les eaux douces (Harrison *et al.* 2018; Amaral-Zettler, Zettler and Mincer 2020). Les connaissances relatives à l'ampleur et à la gravité des impacts de la pollution plastique à l'échelle des communautés microbiennes sont encore restreintes. La plupart des études sur les impacts structuraux et fonctionnels des plastiques dans les écosystèmes aquatiques se sont principalement concentrées sur le milieu marin. Cette orientation découle en grande partie de la constatation initiale d'une contamination substantielle des océans par les plastiques, marquée par la définition du « septième continent » ; une accumulation de débris plastiques transportés par les courants marins. Cette réalité a contribué à stimuler l'expansion des études sur les effets de la pollution plastique dans l'écosystème marin. Il a en effet été prouvé l'existence de différences structurelles (en termes de diversité et d'abondance d'espèces) entre les biofilms sur les plastiques et ceux sur les sédiments marins où l'eau environnante (Zettler, Mincer and Amaral-Zettler 2013; Ogonowski *et al.* 2018; Wright *et al.* 2020; Li *et al.* 2021). Cela suggère une sélection de la diversité des communautés microbiennes par le substrat. De plus, des différences au niveau fonctionnel ont été observées entre les plastiques et l'eau environnante où d'autres substrats concernant la présence et/ou de l'abondance de certains gènes impliqués dans des fonctions de recyclage des nutriments, comme par exemple le gène *nifH* impliqué dans la fixation de l'azote, significativement plus abondant chez les communautés bactériennes fixées au plastique que chez les bactéries planctoniques (Bryant *et al.* 2016). De même, des *pool* d'enzymes estérases, dépolymérase, adénylsulfate réductases (*aprBA*) et sulfites réductases (*dsrAB*) étaient plus abondants sur la plastisphère étudiée que dans des biofilms périphytiques (Pinnell and Turner 2019). Seeley *et al.* (2020) révèlent que l'amendement en chlorure de polyvinyle sur des biofilms sédimentaires a fait diminuer l'abondance relative de gènes impliqués dans la nitrification et dans la dénitrification tandis

qu'un amendement en polyuréthane et en acide polylactique a au contraire favorisé ces deux processus. Ces différences fonctionnelles entre la plastisphère et les microorganismes planctoniques ou d'autres substrats naturels, suggèrent donc des activités métaboliques distinctes en fonction des substrats (Zettler, Mincer and Amaral-Zettler 2013; Bryant *et al.* 2016; Pinnell and Turner 2019; Seeley *et al.* 2020).

Au regard des études qui portent sur le milieu marin, celles sur les écosystèmes d'eaux douces (lenticule et lotique) sont moins nombreuses. Néanmoins, les études réalisées jusqu'à présent dans les écosystèmes d'eau douce ont contribué à apporter quelques réponses à ces questionnements. Dans le [Tableau 2](#), des exemples d'études, relativement récentes, examinent les impacts structurels et fonctionnels de différents types et tailles de plastiques sur les biofilms microbiens d'eau douce. Du point de vue des impacts structurels, plusieurs études ont démontré des modifications significatives au sein des communautés microbiennes en présence de plastiques ([Tableau 2](#)). Ces altérations incluent des changements dans la composition taxonomique, l'abondance relative de certaines familles microbiennes et la diversité alpha (Li *et al.* 2020; Du *et al.* 2022; Merbt *et al.* 2022). De plus, des différences dans la structure et la composition des biofilms ont été observées entre les substrats plastiques et naturels. Les plastiques, notamment les microplastiques, favorisent un assemblage bactérien distinct, avec une richesse et une diversité inférieures par rapport aux substrats naturels (Miao *et al.* 2019c). Les plastiques semblent également induire des réponses spécifiques au niveau des biofilms microbiens naturels, avec une augmentation de la biomasse algale et de l'efficacité photosynthétique combinées à la présence d'un escargot brouetteur, suggérant une réponse structurelle positive au niveau des autotrophes colonisant les rochers (Holzer *et al.* 2022). A l'inverse, la présence de nanoplastiques a modifié la structure microbienne en diminuant la diversité des biofilms périphytiques naturels (Miao *et al.* 2019c). En ce qui concerne les impacts fonctionnels, la présence de nanoparticules de plastique à affecter de façon négative la capacité de dégradation de la litière de feuille par les communautés fongiques qui s'y étaient développées (Du *et al.* 2022). D'autres études ont révélé une gamme d'effets sur le métabolisme et les activités microbiennes ([Tableau 2](#)). Certaines fonctions métaboliques, telles que les cycles du carbone et de l'azote, ont montré des variations en présence de plastiques, avec des taux d'utilisation de certaines sources de carbone qui variaient (Miao *et al.* 2019b, 2019a, 2021, 2022; Li *et al.* 2021). En fin de compte, les plastiques

peuvent induire des altérations structurelles et / ou fonctionnelles substantielles au sein des communautés microbiennes naturelles des écosystèmes d'eau douce.

De plus, les plastiques ont été associés à une augmentation de l'activité antioxydante totale des biofilms, indiquant la génération d'un stress oxydant (Miao *et al.* 2019b). Les plastiques semblent également influencer la décomposition de la litière de feuilles, les activités des enzymes fongiques et la sporulation (Batista *et al.* 2022; Du *et al.* 2022). Cependant, ces impacts peuvent varier en fonction du type de plastique, de la concentration et de l'écosystème spécifiquement considéré.

En somme, ces différentes études ont mis en évidence des différences significatives au niveau des structures et des fonctions des communautés microbiennes d'eau douce entre les biofilms se développant sur les plastiques et les biofilms se développant sur des surfaces naturelles (par exemple les rochers, le bois), ou dans l'eau environnante, ou encore entre différents types de plastiques. Ces études prouvent que les plastiques peuvent modifier le métabolisme et certaines activités microbiennes. Cependant, il est important de noter que les effets peuvent varier en fonction de divers facteurs, notamment la nature chimique du plastique, sa taille ainsi que les caractéristiques propres à chaque écosystème. A noter que la plupart des études portent sur des fractions de taille de plastique qui vont du nanoplastique au microplastique (voire au mésoplastique), mais très rares sont les études portant sur les impacts des macroplastiques en eau douce (Miao *et al.* 2020; Batista *et al.* 2022).

Les plastiques en tant que support de colonisation peuvent influencer significativement la structure et la fonction des organismes qui s'y développent. Ces études suggèrent donc que ce type de pollution peut potentiellement perturber les fonctions écologiques des écosystèmes d'eau douce. A l'heure actuelle, la plupart des études qui traitent des impacts du plastique sur les communautés microbiennes font souvent le comparatif entre communautés formées sur du plastique et communautés formées sur des substrats naturels. Cependant, rares sont les études qui décrivent les effets de la présence de plastiques sur la structure et le fonctionnement des communautés microbiennes colonisant des substrats naturels tels que les sédiments, les rochers, ou la matière organique morte (ex. feuilles, bois) (Miao *et al.* 2019c; Du *et al.* 2022). Dans ces exemples d'études, on retrouve souvent l'application de traitement aux nano- ou microplastiques sur des biofilms naturels de rochers ou de sédiments (Holzer *et al.* 2022; Merbt *et al.* 2022) ou encore sur des biofilms de litière de feuilles (Batista *et al.* 2022; Du *et al.* 2022). En effet, les études ne varient pas

seulement en fonction de l'écosystème ou de la nature et de la taille des plastiques étudiés, mais aussi en fonction de comment est posée la question de départ ; du concept expérimental. Ainsi le [Tableau 3](#) a été réalisé avec les mêmes études d'impact des plastiques sur les communautés microbiennes d'eau douce, en précisant l'écosystèmes de départ, la taille et la nature des plastiques étudiés, si l'on se situe en microcosmes ou *in situ* entre autres, mais aussi les méthodes analytiques utilisées dans le but de souligner la variété de design expérimentale et des méthodes utilisées entre études. Parmi les 15 études recensées dans le [Tableau 3](#), sept d'entre elles ont étudié les biofilms des rochers, quatre d'entre elles les biofilms sédimentaires et deux ont étudiés les communautés de litière de feuilles ainsi que deux ont pris en compte les microorganismes de l'eau environnante. Et seulement une d'entre elles a étudié les communautés formées sur le bois et une autre a également ciblé les communautés du *seston*. Une majeure partie d'entre elles ont donc étudié les communautés des rochers (ou proxy de rochers). Neuf études ont été réalisées en microcosmes (d'eau stagnante ou bien d'eau circulante) et six études ont été réalisées *in situ* ([Tableau 3](#)). Enfin, les questions initialement posées dans ces études avaient toujours pour but de mesurer l'impact du plastique sur les communautés microbiennes mais la façon de les poser et donc le design expérimental qui en découlait, était de deux grands types : i) soit en comparant les biofilms naturels, ou les microorganismes de l'eau environnante aux biofilms formés à la surface des plastiques, ii) soit en appliquant un traitement composé de nano- ou de microplastiques à un biofilm formé à la surface d'un substrat naturel ([Tableau 3](#)).

En ce qui concerne les techniques recensées dans le [Tableau 3](#), les chercheurs utilisent un large éventail de méthodes analytiques pour évaluer les impacts structuraux et fonctionnels des plastiques sur les communautés microbiennes dans les écosystèmes aquatiques. Ces méthodes visent à comprendre la façon dont les plastiques affectent la composition taxonomique et les fonctions métaboliques des microorganismes. Parmi les méthodes analytiques structurelles les plus couramment utilisées dans ces études, les séquençages de l'ADNr 16S et 18S permettent respectivement d'identifier les communautés procaryotiques et eucaryotiques. Cette technique, utilisée dans plusieurs études, offre une vue approfondie de la diversité taxonomique des microorganismes. De plus, des analyses de biomasse, de concentration en chlorophylle-*a* ont été réalisées pour évaluer la composition et la biomasse des communautés microbiennes. Les méthodes de séquençage *Illumina* et l'analyse des indices de diversité, tels que Shannon et Simpson, ont été utilisés pour évaluer

la diversité alpha. L'utilisation de la microscopie électronique à balayage (SEM) a permis d'observer la structure morphologique des biofilms.

Concernant les méthodes analytiques fonctionnelles, les chercheurs ont exploré les impacts des plastiques sur les fonctions métaboliques des communautés microbiennes. Le rendement photosynthétique, la respiration, et l'efficacité de l'absorption des nutriments ont été mesurés pour évaluer les réponses fonctionnelles. Les activités enzymatiques extracellulaires ont été analysées pour évaluer le métabolisme des microorganismes et ont inclus des enzymes impliquées dans les cycles du carbone, de l'azote et du phosphore. Des approches *in silico* telles que PICRUST et FAPROTAX ont été utilisées pour prédire les fonctions microbiennes en se basant sur les données de séquençage. L'utilisation de puces à ADN GeoChip a également permis d'analyser le potentiel fonctionnel des communautés microbiennes impliquées dans les cycles biogéochimiques.

Parmi ces méthodes, le séquençage des ARNr 16S et 18S, l'analyse de la diversité alpha, et les mesures d'activité enzymatique extracellulaire semblent être les plus couramment utilisées dans les études sur les impacts des plastiques sur les communautés microbiennes. Ces méthodes offrent une compréhension à la fois structurale et fonctionnelle des réponses des communautés microbiennes aux plastiques.

Dans nos propres analyses, nous avons utilisé des méthodes analytiques structurelles telles que la mesure de la densité bactérienne, fongique et algale, ainsi que le séquençage *Illumina* pour évaluer la diversité procaryotique et eucaryotique. De plus, nous avons mesuré l'activité enzymatique extracellulaire en examinant la β -glucosidase, la N-acétyl-glucosaminidase et la phosphatase.

Comparativement aux méthodes couramment utilisées dans les études référencées dans le [Tableau 3](#), nos méthodes d'analyses structurelles se concentrent davantage sur la quantification de la biomasse et la diversité taxonomique, tandis que nos méthodes d'analyses fonctionnelles se concentrent sur les activités enzymatiques impliquées dans les cycles biogéochimiques du carbone, de l'azote et du phosphore rejoignant la littérature sur ce point. Cependant, parmi les études d'impact du plastique en eau douce les études ayant précédemment mesurés les mêmes activités enzymatiques extracellulaires que nous (β -glucosidase, N-acétyl-glucosaminidase et la phosphatase), sont au nombre de quatre (Miao *et al.* 2019b; Batista *et al.* 2022; Chaudhary *et al.* 2022; Du *et al.* 2022). Parmi celles-ci, les

auteurs ont étudié d'autres activités enzymatiques telles que la leucine-aminopeptidase, la glycine-aminopeptidase, la polyphénol oxydase, la peroxydase et la cellobiohydrolase (Miao *et al.* 2019b; Batista *et al.* 2022; Du *et al.* 2022).

Les méthodes que nous avons utilisées offrent une approche complémentaire à celles des autres études et relativement originales dans un contexte d'eau douce au regard du nombre d'études traitant de ces aspects d'impacts du plastique sur les communautés microbiennes naturelles. Nos mesures d'activités enzymatiques extracellulaires fournissent des informations sur le métabolisme des microorganismes en réponse aux plastiques. De façon globale, en comparaison avec les méthodes courantes, nos analyses se concentrent davantage sur les aspects fonctionnels des communautés microbiennes. Cette complémentarité peut contribuer à une compréhension plus approfondie des impacts des plastiques sur les écosystèmes d'eau douce. Et cette compréhension plus approfondie permettra une meilleure appréhension de l'influence et des conséquences environnementales de la pollution plastique sur la structure, la diversité et le fonctionnement des écosystèmes aquatiques anthropisés.

Tableau 2 : Etudes sur l'impact fonctionnel et/ou structurel du plastique en écosystème d'eau douce. Les cases grisées signifient que l'étude concernée n'a pas étudié de descripteurs structurel ou fonctionnel. Les études portant sur les macroplastiques sont spécifiées avec le mot macroplastique en gras.

Auteur et année	Fraction de taille des plastiques	Nature du plastique	Ecosystème	Impact structurel	Impact fonctionnel
(Holzer <i>et al.</i> 2022)	Nanoplastique	Polystyrène (dopé aux métaux)	Rivière	Effets des nanoplastiques seuls non significatifs mais l'exposition aux nanoplastiques combinée à une pression de broutage d'escargots a eu des effets sur la biomasse, la diversité et l'abondance taxonomique des biofilms. (L'augmentation de la biomasse algale et de l'efficacité photosynthétique après une exposition préalable aux nanoplastiques suggèrent une réponse fonctionnelle positive au niveau de la production d'algues et donc de la fonction photosynthétique du biofilm).	Pas d'effet significatif sur le rendement photosynthétique, la teneur en lipides ou les ratios en carbone, azote ou phosphore.
(Merbt <i>et al.</i> 2022)	Microplastique	Polyéthylène	Rivière	La composition et l'abondance relative des communautés procaryotiques et eucaryotiques du périphyton ont significativement changé. La diversité alpha a été affectée chez les eucaryotes, mais pas chez les procaryotes.	Le rendement photosynthétique, la respiration et l'efficacité de l'absorption des nutriments n'ont pas été modifiés.

(Du <i>et al.</i> 2022)	Nanoplastique	Polystyrène	Rivière	Diminution de l'abondance relative d' <i>Anguillospora</i> et de <i>Setophaeosphaeria</i> .	<p>Activités enzymatiques extracellulaires diminuées en présence de plastique (phosphatase ; β-glucosidase ; leucine-aminopeptidase ; peroxydase ; glycine-aminopeptidase).</p> <p>Augmentation de la biomasse fongique.</p> <p>Diminution significative de la décomposition de la litière de feuilles et des libérations de nutriments (carbone et azote).</p>
(Li <i>et al.</i> 2020)	Microplastique	Ensemble de la plastisphère aquatique des sites d'étude	Rivière	Indice Chao1 des communautés des sédiments diminué en présence de la plus forte concentration en plastique.	Les tests de prédiction de fonction ont suggéré que les microplastiques pourraient avoir des impacts différentiels sur diverses fonctions de la communauté microbienne.
(Li <i>et al.</i> 2021)	Microplastique	Ensemble de la plastisphère aquatique des sites d'étude	Rivière (et eau de mer)	Composition de la communauté microbienne de la plastisphère distincte de celle de l'eau environnante.	Différences de fonction entre la plastisphère et l'eau environnante (fonction de pathogénicité, de dégradation des composés, fonctions liées au cycle du carbone, de l'azote et du soufre).
(Chaudhary <i>et al.</i> 2022)	Mesoplastiques	Type de morphologie de plastique : dur, mou, mousse et film	Rivière urbaine	L'exposition aux plastiques a modifié la composition des communautés microbiennes avec une différence d'abondance relative de certains groupes bactériens, d'algues et de champignons, mais seulement dans les stades les plus avancés de l'expérience.	Le plastique a altéré le métabolisme du biofilm, avec des variations de photosynthèse, de respiration et de production nette d'énergie. Les taux d'activité des enzymes liés au recyclage du carbone, de l'azote et du phosphore n'ont pas changé en fonction du substrat mais en fonction de la date de prélèvement.

(Miao et al. 2019c)	Microplastique	Polyéthylène basse densité et polypropylène	Lac	<p>La diversité alpha (richesse, régularité et diversité) était plus faible dans les communautés associées aux microplastiques que dans celles des substrats naturels.</p> <p>Différence de structure et de composition de biofilm. Une structure communautaire et une composition de biofilm entre substrats naturels et plastiques.</p> <p>Des abondances plus élevées de <i>Pirellulaceae</i>, <i>Phycisphaerales</i>, <i>Cyclobacteriaceae</i> et <i>Roseococcus</i> sur les substrats plastiques par rapport aux substrats naturels.</p>	Prédiction de l'augmentation de certaines voies métaboliques (liées aux acides aminés aux cofacteurs et aux vitamines) dans les biofilms sur les substrats plastiques par rapport aux substrats naturels.
(Miao et al. 2019b)	Nanoplastique et microplastique	Polystyrène	Lac		<p>Une concentration élevée de plastiques a diminué les teneurs en chlorophylle-<i>a</i>, l'activité de la β-glucosidase et celle de la leucine-aminopeptidase (suggérant des effets sur le cycle du carbone et de l'azote des biofilms).</p> <p>Génération d'un stress oxydant par l'augmentation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) en présence de plastiques suivi d'une augmentation de l'activité antioxydante totale du biofilm.</p>
(Miao et al. 2019a)	Nanoplastique	Polystyrène	Lac	La diversité microbienne des biofilms périphtyque (indices de Shannon, Simpson) a été diminuée en présence de plastique.	En présence de plastique, les fonctions métaboliques du carbone total restaient constantes, mais certaines le taux d'utilisation de certaines sources de carbone variait.

(Miao <i>et al.</i> 2020)	Macroplastique	Chlorure de polyvinyle (PVC) et polyéthylène	Rivières et lacs	Les biofilms sur les plastiques avaient des biomasses plus élevées que celles des substrats naturels dans tous les écosystèmes.	Des activités métaboliques du cycle du carbone étaient différentes entre les biofilms des deux plastiques et les biofilms naturels périphytique.
(Miao <i>et al.</i> 2021)	Microplastique	Polychlorure de vinyle (PVC) et polyéthylène téréphtalate (PET)	Rivières et lacs	Des différences d'indices de diversité de Shannon et de Simpson entre les plastiques et entre le périphyton.	Il y avait une diversité fonctionnelle spécifique au substrat. Les biofilms formés sur les plastiques ont indiqué une variation des capacités d'utilisation du carbone dans trois écosystèmes d'eau douce. Les biofilms sur PET ont montré des taux de métabolisme du carbone inférieurs à ceux du périphyton et du PVC.
(Miao <i>et al.</i> 2022)	Nanoplastique	Polystyrène	Lac		Modification fonctionnelle due à l'exposition aux plastiques avec une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans le cycle du carbone total et de l'azote.
(Wang <i>et al.</i> 2021b)	Microplastique Mésoplastique	Micro : billes de polyéthylène Meso : feuilles de Polyéthylène et de Polypropylène	Rivière urbaine	La diversité alpha des communautés bactériennes était plus élevée sur les microplastiques de polyéthylène que sur les feuilles de polyéthylène et de polypropylène et aucune différence pour la composition taxonomique fongique n'a été détectée.	La prédiction des profils fonctionnels a montré que les voies du métabolisme de l'alanine, de l'aspartate, du glutamate et de la biotine étaient plus élevées au niveau des biofilms sur le microplastique de polyéthylène.

(Batista <i>et al.</i> 2022)	Microplastique Macroplastique	Micro : billes de polyéthylène Macro : sacs transparents et verts	Rivière	Diminution du nombre d'espèces fongiques avec l'augmentation de la concentration du plastique.	Les plastiques ont inhibé la décomposition des feuilles, les activités des enzymes fongiques et la sporulation.
(McCormick <i>et al.</i> 2016)	Microplastique	Ensemble de la plastisphère aquatique des sites d'étude	Rivières urbaines	<p>Les communautés bactériennes associées aux microplastiques diffèrent structurellement de celles des substrats naturels.</p> <p>Les communautés bactériennes sur les plastiques présentaient une richesse et une diversité inférieures par rapport aux substrats naturels, suggérant que les plastiques favorisent un assemblage bactérien distinct.</p> <p>Les microplastiques sont associés à une abondance élevée de séquences liées à certaines familles (Pseudomonadaceae ; Gammaproteobacteria), avec le genre <i>Pseudomonas</i> plus abondant sur les plastiques par rapport aux substrats organiques.</p>	

Tableau 3 : Récapitulatif des études d'impact et de comparaison de descripteurs structuraux et fonctionnels sur des communautés microbiennes de la plastisphère et des communautés microbiennes sur des substrats naturels en écosystèmes d'eau douce.

Légende des couleurs du Tableau 3 :



Etudes réalisées en microcosmes, soit en système d'eau circulante, soit en eau stagnante, soit en eau stagnante mais sous agitation



Collecte *in situ* et analyse en laboratoire



Application d'un traitement plastique (de différentes tailles et à différentes concentrations) sur un biofilm formé sur substrat naturel



Evaluation de l'impact de la présence de plastiques déjà existant sur site sur les biofilms naturels



Comparaison des biofilms formés à la surface de plastiques *versus* des biofilms formés à la surface de substrats naturels aux microorganismes de l'eau environnante



Comparaison des biofilms formés à la surface de différents types de plastiques



Type d'analyse non effectué

Auteur	Ecosystème de départ	Plastique (nature et taille)	Microcosme ou <i>in situ</i> ?	Question principale	Organisme modèle	Méthode analytique (structure)	Résultats principaux structure	Méthode analytique (Fonction)	Résultats principaux fonction
(Holzer <i>et al.</i> 2022)	Rivière	Nanoplastiques de polystyrène	Dans des pots d'eau douce reconstitué	Impact de l'exposition à différentes concentrations de nanoplastiques dopés aux métaux sur les biofilms périphtiques et sur un escargot boteur	Périphyton et un escargot aquatique	Biomasse mesurée en poids sec, teneur totale en lipide, azote et carbone du périphyton. Concentration en chlorophylle- <i>a</i> et Séquençage procaryote et eucaryote	Structure du biofilm insensible à l'exposition au nanoplastique seul mais sensible à la combinaison de pression de broutage et de l'exposition aux plastiques.	Rendement photosynthétique	Fonction du biofilm insensible à l'exposition au nanoplastique seul mais sensible à la combinaison de pression de broutage et de l'exposition aux plastiques.
(Merbt <i>et al.</i> 2022)	Rivière	Microplastiques de polyéthylène	Culture de périphyton à partir de lames dans le cours d'eau puis inoculation de microcosmes d'eau stagnante	Impact des microbilles de plastique de différentes tailles et différents degrés d'usure sur le développement de communautés naturelles de périphytons	Périphyton de rochers et de sédiments	Accumulation de biomasse (poids sec) Séquençage 16S et 18S Rhéologie du biofilm	Impact sur la composition et sur l'abondance relative eucaryote et procaryotes. Impact sur la diversité alpha chez les eucaryotes, mais pas chez les procaryotes.	Rendement photosynthétique Respiration <i>Uptake</i> d'azote	Les trois paramètres fonctionnels n'ont pas été affecté par les microplastiques.

(Du et al. 2022)	Rivière	Nanoplastiques de polystyrène	Microcosmes avec eau de rivière et disque de Peuplier dans des pots d'eau stagnante	Impact des effets des nanoparticules de polystyrène sur le processus de décomposition des litières de feuilles effectué par la communauté microbienne	Communautés fongiques de litière de feuilles de Peuplier	Biomasse fongique (concentration en ergostérol) Structure de la communauté fongique par séquençage <i>Illumina</i> de régions ITS	Augmentation ou diminution de la biomasse fongique en fonction de la concentration en plastique appliquée. Diminution de l'abondance relative d' <i>Anguillospora</i> et de <i>Setophaeosphaeria</i> .	Activité déshydrogénase (spectrophotométrie) Activités enzymatiques extracellulaires associées aux cycles du carbone, de l'azote et du phosphore (phosphatase acide ; β -glucosidase ; leucine-aminopeptidase ; glycine-aminopeptidase ; polyphénol oxydase ; peroxydase ; N-acétyl-glucosaminidase ; cellobiohydrolase)	Activités enzymatiques extracellulaires diminuées en présence de plastique (phosphatase ; β -glucosidase ; leucine-aminopeptidase ; peroxydase ; glycine-aminopeptidase). Augmentation de la biomasse fongique. Diminution de la décomposition de la litière de feuilles.
(Li et al. 2020)	Rivière	Microplastiques du site	<i>In situ</i> (prélèvement de sédiments)	Impact des microplastiques sur la communauté bactérienne des sédiments	Périphyton de sédiments	Indice de diversité alpha (Shannon, Simpson, Chao1, ACE : <i>Abundance-based Coverage Estimator</i>)	Différence d'indice de diversité alpha en fonction des concentrations de plastique appliquées. (Diminution des indices avec les plus fortes concentrations de plastique). Impact sur la structure et la composition des communautés microbiennes.	Outil <i>in silico</i> de prédiction des voies fonctionnelles et métaboliques (logiciel PICRUST) Bases de données COG et KEGG pour la prédiction des fonctions FAPROTAX pour la prédiction des cycles biochimiques	Les outils de prédiction de fonctions ont suggéré que les microplastiques pourraient avoir des impacts sur diverses fonctions de la communauté microbienne.

(Li <i>et al.</i> 2021)	Rivières et baies	Microplastiques du site	<i>In situ</i> (prélèvement des microplastiques et de l'eau environnante)	Différences de fonction et de structure entre les communautés se développant sur les plastiques et les communautés des eaux environnantes	Biofilm de la plastisphère du site <i>versus</i> microorganismes de l'eau environnante	Séquençage <i>Illumina</i> 16S et ITS	Recrutement de communautés microbiennes distinctes sur la plastisphère avec proportion notable d'espèces uniques par rapport à la communauté de l'eau environnante.	Outil de prédiction par annotation fonctionnelle des bactéries (logiciel FAPROTAX) et des champignons (FUNGuild)	Différences de fonctions microbiennes entre la plastisphère et l'eau environnante (fonctions de pathogénicité, de dégradation des composés, fonctions liées au cycle du carbone, de l'azote et du soufre). Et ces différences fonctionnelles étaient différentes dans les écosystèmes d'eau douce et d'eau de mer.
(Chaudhary <i>et al.</i> 2022)	Rivière	Mésoplastiques de polyéthylène basse densité et PVC	Substrats plastique et proxy de rochers mis à colonisé puis analyse directe après collecte <i>in situ</i>	Différence de fonction et de structure entre les communautés se développant sur les plastiques et les substrats naturels	Biofilm de la plastisphère <i>versus</i> biofilm de proxy de rochers	Biomasse du biofilm par coloration au cristal violet et spectrophotométrie Chlorophylle- <i>a</i> Séquençage <i>Illumina</i> 16S bactérien et archéen, ITS fongiques, ARNr 23S pour les algues eucaryotes et les cyanobactéries	La composition des communautés bactériennes, fongiques et algales avaient peu de différences significatives entre les substrats. Cependant, toutes les communautés microbiennes ont considérablement changé de composition au fil du temps.	Respiration Activité enzymatique extracellulaire impliquées dans les cycles du carbone, de l'azote et du phosphore (β -glucosidase, N-acétyl- β -D-glucosaminidase et phosphatase).	Respiration plus élevée et une productivité nette négative de l'écosystème sur les surfaces en mousse et en carreaux par rapport aux surfaces en plastique dur, souple et en film. La nature du substrat ne semble pas avoir eu d'effet sur les trois activités enzymatiques.

(Miao <i>et al.</i> 2019c)	Lac	Microplastiques polyéthylène basse densité	En petits aquariums	Différence de fonction et de structure entre les communautés se développant sur les plastiques et les substrats naturels de rochers et de bois	Biofilm de la plastisphère <i>versus</i> biofilm de proxy de rochers et de bois	Séquençage <i>Illumina</i> ARNr 16S et calcul des indices de diversité alpha (Shannon, Pielou) NMDS pour la bêta diversité	Les indices de diversité alpha étaient plus faibles dans les communautés associées aux microplastiques que dans celles des substrats naturels. Des abondances significativement plus élevées de <i>Pirellulaceae</i> , <i>Phycisphaerales</i> , <i>Cyclobacteriaceae</i> et <i>Roseococcus</i> ont été observées sur les substrats microplastiques par rapport aux substrats naturels.	Comparaison de taxonomie fonctionnelle grâce à la base de données KEGG, l'outil de caractérisation phylogénétique et fonctionnel Tax4Fun et la base de données SILVA.	La prédiction des profils fonctionnels a montré que les différences de voies métaboliques liées aux acides aminés, aux cofacteurs et aux vitamines étaient augmentées dans les biofilms sur les substrats microplastiques par rapport aux substrats naturels.
(Miao <i>et al.</i> 2019b)	Lac	Nano et microplastiques de polystyrène	En Erlenmeyer sous agitation	Impact fonctionnel des plastiques sur les biofilms de rochers	Biofilm périphytique de rochers			Concentration en chlorophylle- <i>a</i> et rendement photosynthétique Activités enzymatiques extracellulaires β -glucosidase, leucine aminopeptidase, et phosphatase alcaline Evaluation du stress oxydatif par mesure des ROS (d'espèces réactives de l'oxygène)	Ce sont les concentrations de billes de plastique les plus élevées qui ont eu un impact en diminuant la teneur en chlorophylle- <i>a</i> et les activités β -glucosidase et leucine aminopeptidase. Augmentation des ROS avec l'exposition aux nanoplastiques. Les auteurs soulignent également que les effets observés dépendaient fortement de la

									modification de surface des plastiques.
(Miao <i>et al.</i> 2019a)	Lac	Nano de polystyrène	En canal artificiel	Impact de l'exposition des nanoplastiques sur les biofilms de rochers	Biofilm périphytique de rochers	Calcul des indices de diversité de Shannon et Simpson (basé sur la fréquence d'utilisation des différents substrats carbonés pour estimer la diversité fonctionnelle des microorganismes) basé sur les microplaques BIOLOG ECO. Mesure de la croissance et du développement microbien par colorimétrie : AWCD (<i>Average Well Color Development</i>)	Indices de diversité réduit en présence de la plus forte des concentrations de nanoplastique	Mesure de la capacité d'utilisation du carbone (BIOLOG ECO Microplates)	Les fonctions métaboliques du carbone totale ont été inchangées, mais certaines sources de carbone spécifique, comme celle liée aux esters, ont été modifiées.
(Miao <i>et al.</i> 2020)	Rivières et lacs	Macroplastique de chlorure de polyvinyle (PVC) et polyéthylène	Sur substrats pavé et plastiques mis à colonisé <i>in situ</i> , collecte puis analyse en laboratoire	Différence de fonction et de structure entre les communautés se développant sur les macroplastiques et les substrats naturels de rochers	Biofilm sur plastique <i>versus</i> biofilm périphytique de rochers	Calcul des indices de Shannon et Simpson basé sur les plaques BIOLOG EcoPlate Mesure de la croissance et du développement microbien par colorimétrie : AWCD Biomasse du biofilm (poids sec)	Les biofilms sur les plastiques avaient des biomasses plus élevées que celles des substrats naturels dans tous les écosystèmes (lacs et rivières)	Mesure de la capacité d'utilisation du carbone (BIOLOG EcoPlate)	Les activités métaboliques liées au carbone étaient différentes entre les plastiques (PVC et PE) et les rochers dans les quatre écosystèmes. Les auteurs soulignent que les facteurs environnementaux avaient le plus fort impact sur les différences métaboliques observées par rapport aux types de substrats

						Morphologie du biofilm par SEM (Microscopie Electronique à Balayage)			
(Miao <i>et al.</i> 2021)	Rivières et lacs	Microplastique de polychlorure de vinyle et polyéthylène téréphtalate	Incubation des substrats lames de verre et plastiques <i>in situ</i> puis collecte et analyse en laboratoire	Différence de fonction et de structure entre les biofilms se développant sur les différents types de microplastiques et sur les lames de verre	Biofilm sur plastique <i>versus</i> biofilm périphytique de rochers	Biomasse des biofilms (poids sec) Mesure de la croissance et du développement microbien par colorimétrie : AWCD Mesure de l'indice de diversité de Shannon et de Simpson basé sur les microplaques BIOLOG ECO Imagerie par CLSM (<i>Confocal Laser Scanning Microscopy</i>)	En imagerie, les microstructures et la composition des biofilms étaient différentes sur les différents substrats. Les indices de diversité de Shannon et de Simpson pour une des rivières et pour un des lacs ont été classés comme suit : verre > PVC > PET	Mesure de la capacité d'utilisation du carbone avec des microplaques BIOLOG ECO	Les biofilms sur PET avaient des capacités et des taux de métabolisation du carbone inférieurs à ceux du verre et du PVC dans trois des quatre écosystèmes étudiés.
(Miao <i>et al.</i> 2022)	Lac	Nanoplastiques de polystyrène	Biofilm cultivé à partir de rochers benthiques	Impact fonctionnel des nanoplastiques en polystyrène sur les biofilms de rochers	Biofilm périphytique de rochers			Puce à ADN GeoChip 5.0 (utilisée pour l'étude de la diversité et des fonctions microbiennes environnementales) Ici utilisé pour analyser le potentiel fonctionnel impliqué dans les cycles du carbone, azote, phosphore et soufre des communautés microbiennes	L'exposition aux plastiques a augmenté l'expression des gènes liés aux cycles du carbone et de l'azote mais aussi l'augmentation de gènes impliqués dans le stockage du fer et dans le stress oxydatif

(Wang <i>et al.</i> 2021b)	Rivière	Microplastique bille de polyéthylène (MP). Mésoplastique de feuille de polyéthylène (PE) et polypropylène (PP)	En canal artificiel	Différence de fonction et de structure entre les biofilms se développant sur les différents types de plastiques	Biofilm formé sur les différent plastiques et comparés	Séquençage <i>Illumina</i> ARNr 16S pour les bactéries et ITS pour les champignons Calcul des indices de diversité de Shannon, Chao1 et Pielou NMDS, cladogramme et réseau de cooccurrence	La diversité alpha des communautés bactériennes était plus élevée sur les microplastiques de polyéthylène (MP) que sur les feuilles de polyéthylène (PE) et de polypropylène (PP). Pas de différence de diversité alpha et de composition taxonomique pour les communautés fongiques sur différents types de plastiques, mais avec une dominance des phyla Ascomycota, Basidiomycota, Blastocladiomycota et Mucoromycota	Inférence fonctionnelle <i>in silico</i> du métagénome bactérien a été fait avec les bases de données KEGG et SILVA et le programme Tax4Fun afin d'associer des voies métaboliques aux séquences obtenues	La prédiction fonctionnelle a révélé un enrichissement des voies métaboliques de l'alanine, de l'aspartate, du glutamate et de la biotine pour les biofilms formés sur les microbilles de polyéthylène
(Batista <i>et al.</i> 2022)	Rivière	Microbilles de polyéthylène et Macroplastique (sacs transparents et sacs verts) essentiellement composés de polyéthylène	En Erlenmeyer	Impact de différentes tailles de plastique sur la communauté de décomposeurs associée à la litière de feuille	Biofilm de la litière de feuille	Diversité fongique a été estimé par comptage des spores	Parmi les quatre traitements, certains d'entre eux ont inhibé la sporulation et des changements de composition de la communauté fongique ont également été observés	Mesure des activités enzymatiques extracellulaires β -glucosidase et phénol oxydase	Parmi les quatre traitements, certains d'entre eux ont inhibé la décomposition des feuilles, les activités enzymatiques fongiques. Seulement les traitements avec 0,5 g L ⁻¹ de microplastique et les macroplastiques en plastique vert, où la perte de masse foliaire et les activités des enzymes extracellulaires étaient au contraire stimulées.

(McCor mick <i>et al.</i> 2016)	Rivières	Microplastique du site	Collecte des particules flottantes dans l'eau puis analyse au laboratoire	Comparaison de l'assemblage bactérien entre les plastiques et la colonne d'eau et le <i>seston</i>	Biofilm de plastisphère <i>in situ versus</i> microorganismes de la colonne d'eau et du <i>seston</i>	Séquençage <i>Illumina</i> de l'ARNr 16S bactérien Calcul de l'indice de Shannon NMDS Analyse des abondances relative des <i>phyla</i>	Différence marquée des assemblages bactériens entre les microplastiques, le <i>seston</i> et la colonne d'eau Les microplastiques avaient une richesse et une diversité taxonomique inférieures à celles des autres substrats		
---------------------------------------	----------	---------------------------	--	---	--	--	---	--	--

OBJECTIFS ET HYPOTHESES

Le **premier grand objectif** de cette thèse vise à comparer la colonisation microbienne entre des substrats plastiques et des substrats naturels, dans deux sites d'une rivière – l'un exposé intensivement et régulièrement aux déchets plastiques et l'autre non – et sur une cinétique de temps de quatre semaines. L'objectif ici est donc de comparer des descripteurs de **structure** (densité bactérienne, fongique et algale ainsi que la diversité procaryote et eucaryote) mais aussi de **fonctionnement** (avec les activités enzymatiques extracellulaires β -glucosidase, N-acétyl-glucosaminidase et phosphatase) des communautés microbiennes qui se développent sur les différents substrats en milieu naturel. Cette comparaison a pour but de déterminer les spécificités des biofilms formés sur les plastiques. Nous attendons une biomasse microbienne, une diversité taxonomique et des activités plus élevées sur les substrats riches en carbone et en nutriments (tels que les feuilles et les sédiments) par rapport aux substrats artificiels (les plastiques) et aux substrats inorganiques (les rochers) où les ressources nutritives sont principalement disponibles dans la colonne d'eau contrairement aux feuilles et aux sédiments où les ressources nutritives sont soit intrinsèques au substrat (feuilles), soit emprisonnées dedans (les sédiments). Une deuxième question de recherche vise à comparer les effets spécifiques des plastiques biodégradables *versus* des plastiques non-biodégradables sur la colonisation microbienne. Nous anticipons une biomasse, une diversité et une activité microbienne plus élevées sur le plastique biodégradable en raison de la possibilité pour les microorganismes de métaboliser les composés biodégradables (l'amidon de pomme de terre) contenus dans ce plastique, favorisant ainsi leur abondance. Une troisième question de recherche vise à évaluer si la colonisation des différents substrats (naturels et plastiques) diffère entre les sites amont et aval d'un même bassin versant urbanisé. Nous supposons que le site aval accumule plus de nutriments dissous et de pollution plastique que le site amont, ce qui pourrait entraîner une colonisation plus importante de tous les substrats (naturels et plastiques) du site aval. Enfin, nous suggérons que les communautés microbiennes du site aval ont pu développer une adaptation à la pollution plastique, et auraient plus de facilité à coloniser les plastiques en comparaison aux communautés microbiennes de l'amont.

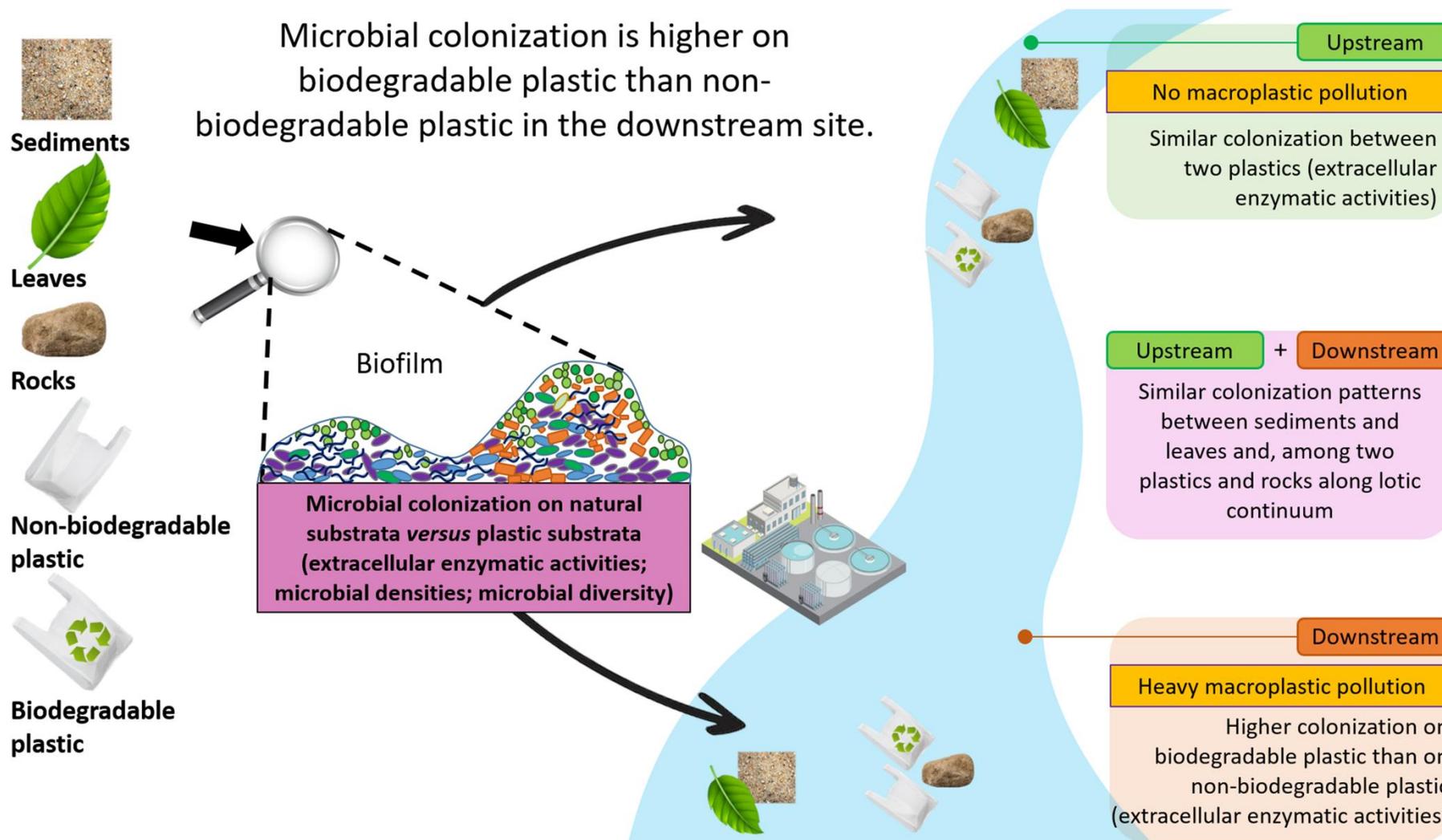
Le **second grand objectif** de cette thèse vise à évaluer l'impact de la pollution engendrée par deux types de plastiques (non-biodégradable et biodégradable) sur la structure, la diversité et le fonctionnement des communautés microbiennes naturelles des

biofilms présents dans les sédiments et sur les rochers, en absence ou en présence de feuilles pour simuler la végétation riveraine présente dans le site. L'évaluation de cet impact est réalisée dans des conditions contrôlées en microcosmes de laboratoire. Pour tester l'impact des plastiques, six conditions expérimentales ont été mise en place, elles comprenaient l'apport de substrats naturels (sédiments, rochers et feuilles) et de substrats plastiques (non-biodégradable et biodégradable) avec des surfaces maîtrisées. Nous avons évalué l'impact fonctionnel des plastiques sur les communautés microbiennes des sédiments et des rochers en comparant des activités enzymatiques extracellulaires impliquées dans les cycles biogéochimiques du carbone, de l'azote et du phosphore et de leurs ratios enzymatiques, ainsi que l'impact structurel en évaluant les densités microbiennes (bactéries, champignons et algues) et la diversité microbienne (alpha et bêta pour les bactéries et les champignons). Nous formulons l'hypothèse que les plastiques pourraient moduler la biomasse et la diversité des communautés microbiennes des rochers et des sédiments compte tenu de leur propre plastisphère ainsi que des substances chimiques relarguées par le plastique dans l'eau des microcosmes. De plus, nous supposons un impact sur les activités enzymatiques plus marqué en présence de plastique biodégradable, en raison de sa nature chimique (partiellement constituée d'amidon de pomme de terre), et qui pourrait fournir des polysaccharides aux communautés microbiennes des rochers et des sédiments. Enfin, l'ajout de feuilles devrait effacer l'impact des plastiques sur les activités enzymatiques compte tenu de la richesse des feuilles en tant que source de matière organique pour les communautés microbiennes. Une deuxième question de recherche est d'explorer l'impact des plastiques à une échelle plus globale, celle du microcosme. Pour cela, nous avons estimé des valeurs de biomasses et d'activités microbiennes de l'ensemble des substrats dans le microcosme à partir d'un calcul d'«*upscaling*» basé sur la contribution de chaque substrat en termes de surface du benthos. Compte tenu que les plastiques (surtout le non-biodégradable) ont des biofilms avec des activités enzymatiques et des densités microbiennes plus faibles que les substrats naturels (Laffet *et al.* 2023), nous suggérons que leur prise en compte dans le calcul d'«*upscaling*» diminuera les activités et biomasses globales au sein du microcosme. Un effet compensatoire à la présence des plastiques pourrait être l'ajout de feuilles ; ces dernières portant des communautés microbiennes riches en microorganismes et très actives en termes de décomposition de la matière organique.

***COLONIZATION - "COMPARISON OF MICROBIAL
COLONIZATION BETWEEN NATURAL AND PLASTIC
SUBSTRATA IN A POLLUTED WATERSHED"***

Laffet, Lucie ; Muriel Joly ; Louis Carles ; Florence Donnadieu-Bernard ; Anna M. Romani ; Joan Artigas. 2023. "Comparison of Microbial Colonization between Natural and Plastic Substrata in a Polluted Watershed." *FEMS Microbiology Ecology* 99(8): 1–14.

Graphical Abstract



Comparison of microbial colonization between natural and plastic substrata in a polluted watershed

Lucie Laffet¹, Muriel Joly², Louis Carles³, Florence Donnadiou-Bernard¹, Anna M. Romani⁴,
Joan Artigas¹

¹ Université Clermont Auvergne, CNRS, Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement (LMGE), F-63000 Clermont–Ferrand, France.

² Université Clermont Auvergne, CNRS, INP Clermont, Institut de Chimie de Clermont-Ferrand (ICCF), F-63000 Clermont–Ferrand, France.

³ INRAE, UR 1264 Mycology and Food Safety (MycSA), F-33882 Villenave d’Ornon, France.

⁴ GRECO, Institute of Aquatic Ecology, University of Girona, 17003, Girona, Spain.

Lucie Laffet: lucie.laffet3@gmail.com

Muriel Joly : muriel.joly@uca.fr

Louis Carles : louis.carles@inrae.fr

Florence Donnadiou : florence.donnadiou@uca.fr

Anna M. Romani : anna.romani@udg.edu

Joan Artigas : joan.artigas_alejo@uca.fr

Corresponding author:

Lucie Laffet

1 Impasse Amélie Murat

63178 Aubière (France)

Phone : +33 473 40 74 61

E-mail : lucie.laffet@uca.fr

1) Abstract

Plastic pollution represents a threat for biological communities and the ecological functions they provide in river ecosystems. In this study, we compared the microbial colonization of two plastics (biodegradable and non-biodegradable) and three natural substrata (leaves, sediment and rocks) in two study sites of an urbanized watershed differing in their plastic-contamination degree (upstream and downstream). The density and diversity of bacterial, fungal and algal communities, as well as the extracellular enzymatic activities β -glucosidase (GLU), N-acetyl-glucosaminidase (NAG) and phosphatase (PHO), were analyzed in each substrata and site over a four-week colonization experiment. Results showed higher microbial densities and enzymatic activities in leaves and sediment compared to plastics and rocks, probably due to the greater availability of organic carbon and nutrients in the former substrata. However, the microbial colonization of the two plastics was only different in the downstream site where bacterial density and enzymatic activities were higher in the biodegradable compared to the non-biodegradable plastic. Accordingly, the presence of biodegradable plastics would enhance the heterotrophic metabolism in plastic-polluted rivers.

Keywords: macroplastics, biodegradable plastic, polyethylene, enzymatic activities, microbial heterotrophs, river

II) Introduction

Since the discovery and mass production of plastic polymers in the first half of the 20th century, the plastic production in the world has never ceased to increase (Thompson *et al.* 2009). Between the 1950s and 2015, ca. 6300 million tons of plastic waste had been generated, about 9% was recycled, 12% incinerated and 79% accumulated in landfills or the natural environment (Geyer, Jambeck and Law 2017). Today plastic pollution is present in all the environmental compartments (water, air and soil), but river ecosystems are considered as sites of particular concern due to their role as sinks of plastic pollution as well as vectors of this pollution to the ocean (Windsor *et al.* 2019).

Strong correlations have been observed between plastic quantities and human population density, urbanization, and waste management in river basins (Best 2019). Plastic waste enters river systems through either natural transport processes (runoff or wind action) or through direct dumping. Plastics polymers of different nature (polyethylene, polystyrene, polypropylene, polyamide, among others) and sizes (nanoplastics (< 0.1 μm), microplastics (0.1 μm -5 mm), mesoplastics (5 mm – 5 cm), macroplastics (> 5 cm)) are present in rivers worldwide (van Emmerik and Schwarz 2019). The nature of the plastic found depends mainly on the anthropogenic activities in the watershed while the size depends mainly on the degradation state of the polymer. Currently, microplastics pollution has been a more widely studied topic compared with macro- and mesoplastics pollution in aquatic environments (Blettler *et al.* 2018). This bias can be partly explained by the fact that macroplastic debris are efficiently removed in waste water treatment plants after the initial sieving step, thus consistently reducing the amount of macroplastic mass of wastewaters (Rasmussen *et al.* 2021). However, the increased runoff during heavy storm events in the frame of global climate change can cause important macroplastic pollution in rivers. Macroplastics transits through wastewater outflows and combined sewage overflows which discharge untreated wastewater directly into the rivers (Horton and Dixon 2017). A study including different watersheds around the world showed a strong seasonality in the amount of macroplastic items in transport in flowing waters and also that the mean of macroplastic items per hour was higher in Southeast Asian (7.1×10^3 items h^{-1}) than in European (2.5×10^2 items h^{-1}) rivers (van Calcar and van Emmerik 2019).

The dominant type of plastic pollution in rivers is soft polyolefins (including polyethylene and polypropylene) with a mean of 47% and 37% from total plastic litter in rivers from Europe and Southeast Asia, respectively (van Calcar and van Emmerik 2019). A study of

macroplastics transport in the Seine river basin (NE of France) revealed that the percentage of soft polyolefin items was dominant (60-80%) in the mid and downstream sites, whereas polystyrene and soft polyolefin items were equally dominant in upstream sites (van Emmerik *et al.* 2019). To our knowledge, macroplastics contamination has not been characterized in small rivers and streams despite the strong interaction between the terrestrial and aquatic environments in these small watersheds. The extensive contamination of natural environments by plastics has prompted countries and states to address laws in banning plastic grocery bags (oil-based plastics) responsible for so-called “white pollution” around the world. Instead, the demand for the production of bio-based plastics, based on renewable resources and susceptible to microbial decomposition, is increasing progressively (Narancic *et al.* 2020). Different types of biodegradable plastics are commercially available, such as polyhydroxyalcanoates, polylactides, polycaprolactone, aliphatic polyesters, polysaccharides and copolymer or blend of these (Shah *et al.* 2008). The present experiment aims to compare the microbial colonization of a biodegradable bioplastic (potato-starch blend) and a non-biodegradable plastic (low-density polyethylene) in the river ecosystem.

Once macroplastics reach river waters, a biofilm starts to develop. Biofilms are defined as matrix-enclosed microbial populations adherent to each other and/or to surfaces and interfaces (Costerton 1995). The so-called plastisphere is the microbial community colonizing plastic debris and its ecology has been well described in the marine environment (Amaral-Zettler *et al.* 2020). The plastisphere, as common aquatic biofilms, is characterized by an assemblage of phototrophs (diatoms, cyanobacteria), heterotrophs (bacteria), saprotrophs (fungi) and predators (protozoa) communities. Until now, the major studies of macroplastic pollution and plastisphere development have been performed in marine ecosystems. Although specific factors may differ from both environments, plastisphere development is likely to be similar. Studies from marine ecosystems concluded that microbial community composition on plastics is both driven by environmental features and biofilm formation processes, and that a small proportion of taxa are polymer-specific (Harrison *et al.* 2018; Barros and Seena 2021). When comparing microbial colonization and degradation in non-biodegradable and biodegradable plastic polymers, it was observed that benthic microbes settled in higher densities on the biodegradable plastic (corn-starch blend) than on the non-biodegradable plastic (polyethylene) placed in temperate fine-grained organic-rich marine sediments from the Western Baltic Sea (Nauendorf *et al.* 2016). By also comparing non-biodegradable and biodegradable plastic microbial colonization but including the pelagic and benthic habitat at the

Mediterranean Sea, Eich *et al.* (2015) found that the habitat had a strong influence on diatom density and diversity whereas the type of polymer influenced temporarily diatom community succession during colonization. A laboratory experiment showed a higher bacterial colonization on biodegradable polymers (*i. e.* artificially aged polyethylene with a pro-oxidant additive) compared to the non-biodegradable one (*i. e.* polyethylene, Dussud *et al.* (2018)). It is important to remark that ageing of plastics, often simulated by the increased exposure of plastics to UV radiation in the laboratory, resulted in higher weight loss and hydrophilicity after being inoculated with microorganisms (Taghavi, Zhuang and Baroutian 2021). Although much less research has been performed in river ecosystems, recent investigations indicate that plastic microbial colonization may imply enhanced metal biofilm adsorption as well as acting as reservoirs and transport of antibiotic resistance genes (Liu *et al.* 2021; Martínez-Campos *et al.* 2023). The age and weathering of plastics, the successional stage of biofilms, and the local environmental conditions (*i. e.* salinity, light, pressure, current velocity, etc...) are the factors that most likely differ on biofilm formation and taxonomic composition on plastic between freshwater and marine habitats (Harrison *et al.* 2018).

However, to our knowledge, functional changes during the microbial colonization of plastics in aquatic ecosystems have been poorly examined and, as indicated by Amaral-Zettler, Zettler and Mincer (2020) functional diversity and metabolic capacity of microorganisms found in the plastisphere are not well understood (Amaral-Zettler, Zettler and Mincer 2020). In marine environments, recent research indicate that plastics debris may affect nitrogen cycling processes; the presence of microbeads of polyurethane foam and polylactic acid promoted nitrification and denitrification, while polyvinyl chloride inhibited these processes in marine sediments (Seeley *et al.* 2020). The nitrogen cycling processes in marine sediments can therefore be significantly affected by different microplastics, which may serve as organic carbon substrates for microbial communities. Tu *et al.* (2021) observed that marine biofilms harbor plastic degrading bacteria, leading to the changes of functional groups and surface hydrophobicity, and thereby enhancing the biodegradation of microplastics. In rivers and streams the benthic biofilm developing on inorganic and organic substrata play a key biogeochemical role for the whole ecosystem functioning (Battin *et al.* 2016). Thus it is expected that if input of plastic determines a distinct biofilm community developing on them, also showing distinct functions, this may affect river ecosystem functioning.

In the present study, we examine how different is the structural and functional diversity between biofilms growing on plastics (non-biodegradable and biodegradable) and natural substrata (leaves, sediment and rocks) and whether non-biodegradable plastics might host

communities more similar to natural substrata such as leaves. With this aim, two different study sites (upstream and downstream) of the same urbanized watershed were selected to run comparative colonization experiments of the plastics and natural substrata in contrasting environmental settings. We expected higher microbial biomass, diversity and activities on substrata rich in carbon and nutrients (*i. e.* leaves and sediments) than on artificial substrata (*i. e.* rocks and plastics) where resources are mainly available from the water column. When comparing the two plastics, we expected a higher microbial biomass, diversity and activity in the biodegradable plastic than in the non-biodegradable plastic because microorganisms could metabolize biodegradable molecules contained in the biodegradable plastic and increase their abundance. The colonization of substrata will probably be higher in the downstream site than in the upstream site, since downstream sections tend to accumulate more dissolved nutrients and plastic pollution than upstream sections. Finally, the adaptation of microbial communities to plastic pollution entering the stream and the greater resources availability in the downstream site could also favor the early degradation of the biodegradable plastic.

III) Materials and methods

III.1) Experimental design

This study compared the microbial colonisation in natural substrata *versus* plastic substrata in two sites of a French river with contrasting plastic pollution. Natural substrata included sediments, frosted glass slides (considered as rocky substrata surrogates, Artigas *et al.* (2012)) and leaves (*Alnus glutinosa*).

Plastic substrata included a slow-degradable polymer namely Low-Density Polyethylene (LDPE, non-biodegradable plastic), which is commonly used as plastic bag and packaging, and a fast-degradable polymer namely Starch-Based Biodegradable Plastic (BDBP, biodegradable plastic). The starch-based polymer is manufactured by the firm Végéos (Le Bignon, France) and composed of 30% of bio-sourced material (potato starch) according to the ISO 16620-2: 2015 and commonly used as compostable bag. 70% of the remaining composition of BDBP bags is copolyester whose exact composition is not specified by the manufacturer.

The microbial colonization study was performed at two sites of the Artière river (Auvergne Rhône-Alpes region, France): upstream (45°43'11.0"N 3°01'20.7"E) in Saint-Genès-Champanelle (low plastic contamination site) and downstream (45°47'44.7"N 3°10'26.8"E) in Aulnat (high plastic contamination site). The upstream site (25 m reach) is located within a forested area mainly composed by *Alnus glutinosa*, *Corylus avellana*, and *Fraxinus excelsior* tree species. The riverbed is 1.53 ± 0.20 m width and the streambed is composed by around 80 ± 5.77 % of rocks, 20 ± 5.77 % of sediments and 30 ± 17.32 % of mosses (measurements from three transects in the 25 m reach). The downstream site (25 m reach) is located downstream of the city of Clermont-Ferrand and is essentially surrounded by herbaceous plants such as nettles and the riverbank protected by riprap (Figure S1). The riverbed is 5.75 ± 0.25 m width and composed by around 26.66 ± 6.66 % of rocks and 73.33 ± 6.66 % of sediments and 70 ± 10 % of macrophytes (measurements from three transects in the 25 m reach). Note that the downstream site is located approximately 1.5 km after a waste water treatment plant (WWTP) collecting waters from the Clermont-Ferrand city and 19 other municipalites and a capacity of 425,000 equivalent habitants. The WWTP is equipped with a secondary treatment including two biological basins of 80000 m³ each with activated sludge. The WWTP effluent volume is ca. 2100 m³ / day which represents 2.76 % of the discharge of the Artière river.

The colonization experiment was performed in late autumn early winter (November-December 2017). Prior to the colonization, sediments were collected from the two study sites, sieved through 2 mm and autoclaved at 121 °C during 20 minutes. Autoclaved sediment was placed in perforated sterile conical tubes of 50 mL and buried ca. 3-4 cm depth in river sediment for colonization. Frosted glass slides (2.85 x 8.25 cm) were glued onto concrete slabs and placed in the riverbed for colonization. *Alnus glutinosa* leaves (5 leaves air-dried at room temperature), LDPE and BDBP (5 pieces of 4 x 7 cm each) were placed in nylon bags (15 x 20 cm, 1 cm mesh size, 1 type of substratum per bag) and attached to a metal rod immersed in the water column for colonization. Samplings were performed weekly for 4 weeks, and five replicates of each substratum were collected from each site and transported into an icebox to the laboratory. The sediment was sampled to 1-2 cm depth directly from the conical tubes using a stainless steel spatula. The frosted glass slides were scraped with a sterile scalpel and re-suspended in 7 mL of physiological Ringer solution (6.5 g L^{-1} NaCl, 0.12 g L^{-1} CaCl₂, 0.14 g L^{-1} KCl) while leaves, LDPE and BDBP were directly cut with a sterile scalpel and dispatched into the tubes corresponding to the different microbial analyses. Note that leaves were completely degraded in the downstream site at week 4. Initial measurements (at time 0) were performed on each substratum before placed in the stream (Table S3).

III.2) Water physicochemical characteristics

Physicochemical parameters were measured weekly at both sites. Water conductivity, temperature, pH and dissolved oxygen concentration were determined with portable probes (Orion 4-star, Thermo Fisher Scientific, and ProODO, YSI, respectively). Pre-filtered (0.45 μm pore size) water samples from each site and sampling time were collected in sterile tubes and preserved frozen ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) until analyses of total dissolved carbon (TC), total nitrogen (TN) and total organic carbon (TOC) concentration by using a Total Organic Carbon Analyzer (TOC-V_{CPH}, Shimadzu, Japan). Total phosphorus concentrations in water were measured according to Murphy and Riley (1962).

III.3) Plastics pollution characterization

Macroplastics ($> 5\text{ cm}$) and mesoplastics ($0.5\text{ cm} \leq 5\text{ cm}$) *sensu* Emmerik and Schwarz (2020) were sampled, characterized and quantified in the riverside and in the river channel from upstream and downstream sites of the Artière river. The sampling at the riverside was performed in a section of 100 m in length by 20 m in width. Three transects perpendicular to the river were established (0 m, 50 m and 100 m of the section) and each transect was divided in three zones: 1) the shoreline (half in the water and half inland), 2) the intermediate (10 m from the river) and 3) the distal (20 m from the river). The macroplastics and mesoplastics sampling were performed in 40 x 40 cm squares in each zone of the three transects.

Macroplastics and mesoplastics in each square were sampled manually using sterile forceps and placed in bags. Plastic transported by the water column was determined using a manta net (0.5 mm) placed in the middle of the riverbed during 30 minutes. The quantity of plastics transported by river water was corrected by the water flow. Macroplastics quantification and characterization was based on the PLASTICØPYR project protocol (<https://plastic0pyr.wordpress.com/actions>). Once in the laboratory, the macroplastics were identified using TSG_ML (Technical Subgroup on Marine Litter) General Name according to the Guidance on Monitoring for Marine Litter in European Seas (European Commission 2013), weighed and results were expressed as plastic litter abundance (items m^{-2}) or density (g m^{-2}) for each of the three zones analysed in the river bank. We focused on macroplastics contamination in order to compare with LDPE and BDBP colonization experiment.

III.4) Microbial density

Bacterial density was measured by flow cytometric counts on five replicates per site and sampling time. Fragments of 5 cm² for leaves, BDBP and LDPE or suspension equivalent to 2 cm² for sediments and 7 cm² for glass were mixed with sodium pyrophosphate (10 mM in Tris-EDTA buffer pH 8.0, Sigma-Aldrich®). Samples were gently agitated for 30 minutes, sonicated for 1 + 1 minute in a sonication bath (f: 50/60 Hz, Fisher Scientific FB15048, Germany) to detach cells from substrata. Then, samples were vortexed for 1 minute and centrifuged for 1 minute at 800 g. Finally, 500 µL of supernatant were fixed with formaldehyde (final concentration: 4 %). Bacterial suspensions were diluted 100-fold with Tris-EDTA buffer and stained with SYBR Green I (Molecular Probes) before counting cells with a BD FACS Calibur flow cytometer (15 mW at 488 nm, Becton Dickinson, USA). The results were expressed as cells per cm² for each substratum.

Fungal density was estimated by the number of 18S rRNA gene copies by quantitative PCR (qPCR) on three replicates per site and sampling time. Total DNA was extracted with the FastDNATM SPIN kit (MP BiomedicalsTM, Irvine, CA) and amplified using the FR1/FF390 primer set (5'-AICCATTCAATCGGTAIT-3' and 5'-CGATAACGAACGAGACCT-3', respectively) Prévost-Bouré *et al.* (2011) and the MESA green qPCR Master mix plus for SYBR® assay (Eurogentec). qPCR runs were performed with a BioRad CFX96TM Real-Time System (Bio-Rad laboratories, Inc., Hercules) as follow: a 5 min denaturation step at 95 °C, followed by 40 cycles consisting of denaturation (45 s at 95 °C), annealing (45 s at 48 °C), extension (70 s at 72 °C) and finally a specific denaturation curve from 70 °C to 95 °C. Standard curves were prepared by doing a ten-fold serial dilutions (from 10⁷ to 1 copies µL⁻¹) of linearized plasmid containing a 18S rRNA gene insert from fungi. Quantifications were performed as analytical triplicates. Results were expressed as the number of 18S rRNA gene copies per cm² of substratum.

Algal biomass was estimated through chlorophyll-*a* concentration determination on three replicates per site and sampling time, excepting leaves. The chlorophyll-*a* concentration was determined after lyophilisation and extraction in acetone 90 % in the dark at 4°C under inverse stirring agitation overnight. To improve chlorophyll-*a* extraction, the extracts were sonicated 4 minutes (Fisher Scientific FB15048, f: 50/60 Hz) and centrifuged 5 minutes at 10.000 g. The chlorophyll-*a* concentration was measured on supernatants by spectrophotometry (Thermo

Fisher scientific, Genesys 30, USA) according to the method of (Jeffrey and Humphrey 1975). Results were expressed as μg chlorophyll-*a* per cm^2 .

III.5) Microbial diversity

The diversity of prokaryotic and eukaryotic communities was analysed at week 3. We selected samples of week 3 given that stable and mature microbial community was expected at that time in agreement with other studies in the literature Montuelle *et al.* (2010) and in the same watershed (Joly, Mallet and Artigas 2019).

Aliquots from DNA extracted for fungal density measurements (three replicates per substrata, site and time) were used for microbial diversity analyses. The V4 region of 16S SSU rRNA gene (for prokaryotes) and V9 region of 18S SSU rRNA gene (for eukaryotes) were sequenced using the primer sets 515F/806R (5'-GTGYCAGCMGCCGCGGTAA/5'-GGACTACNVGGGTWTCTAAT, Caporaso *et al.* 2011) and Euk_1391f-7-for/EukBr-7-rev (5'-GTACACACCGCCCGTC/5'-TGATCCTTCTGCAGGTTACCTAC, Gilbert *et al.* 2014). Libraries were constructed with Fluidigm Access Array (Fluidigm, San Francisco, California, USA) and sequenced on a MiSeq flowcell (Illumina, 2×250 bp, 10 M–20 M paired reads) for 251 cycles from each end of the fragments using a MiSeq 500-cycle sequencing kit version 2. Fastq files were generated and demultiplexed with the bcl2fastq v2.20 Conversion Software (Illumina). Sequencing yielded a total of 2,963,827 reads (prokaryotes) and 903,893 reads (eukaryotes) which were further processed using the DADA2 pipeline (Callahan *et al.* 2016). After chloroplast and mitochondria sequences removal, rarefaction curves were performed and prokaryotes and eukaryotes data were resampled down to the lowest number of reads covering the maximal diversity (38000 and 11400 reads for prokaryotes and eukaryotes, respectively). Eukaryotic phyla, in downstream, the sediments and rocks substrata had only two replicates because the third replicates were removed during standardization because sediments and rocks had 234 sequences and 3399 sequences respectively. Taxonomic classification was carried out via a native implementation of the Ribosomal Database Project naive Bayesian classifier, and species-level assignment to 16 S and 18 S rRNA gene fragments by exact matching. The sequencing data have been deposited in NCBI's Sequence Read Archive with the following number PRJNA950420.

III.6) Extracellular Enzyme Activities

The activity of three extracellular hydrolytic enzymes β -D-glucosidase (GLU, EC 3.2.1.21), N-acetyl-glucosaminidase (NAG, EC 3.2.1.14), and phosphatase (PHO, EC 3.1.3.1-2) involved respectively in carbon, nitrogen and phosphorus acquisition were measured. Activities were analysed from five replicates per substratum, site and time. Samples (equivalents to 1 cm² of surface of each substrata) were placed in 800 μ L of Ringer solution (6.5 g L⁻¹ NaCl, 0.12 g L⁻¹ CaCl₂, 0.14 g L⁻¹ KCl) and activities were measured using fluorescent substrates analogues (4-Methylumbelliferyl- β -D-glucopyranoside, 4-Methylumbelliferyl-N-acetyl- β -D-glucosaminide and 4-Methylumbelliferyl-phosphate (Sigma-Aldrich)) at substrate-saturating concentration (0.3 mM) for 1 h at 20°C under agitation (100 rpm) in the dark according to (Romaní *et al.* 2004a). The enzymatic reaction was stopped by adding a glycine buffer solution (0.05 M, pH 10.4). The measure of Methylumbelliferyl (MUF) substrate production was determined fluorometrically using a spectrofluorimeter (Fluoroskan Ascent FL, ThermoFisher Scientific, USA) set up at a $\lambda_{\text{excitation}} = 355$ nm, $\lambda_{\text{emission}} = 460$ nm. MUF concentrations were determined from MUF-standard curve ranging 0 to 12.5 μ M and after correction by Ringer's media controls. Enzymatic activities results were expressed as nmol MUF h⁻¹ cm⁻².

III.7) Data analyses

Data from the three extracellular enzyme activities and the three microbial densities did not fit conditions for statistical parametric testing, therefore a non-parametric test equivalent to three-way ANOVA (Scheirer-Ray-Hare test, $P < 0.05$) was applied using R version 4.0.5 (R Core Team (2021)) and rcompanion package version 2.4.1 (Mangiafico 2016). The three factors tested were time, substrata and site, as well as their corresponding interactions. Pairwise comparisons among substrata and sampling times were tested using the Wilcoxon test, $P < 0.05$. Data from water physicochemical descriptors followed a normal distribution and therefore two-way ANOVA ($P < 0.05$) was tested. The factors time and site were tested for physicochemical data. Statistical analyses of the three extracellular enzyme activities and the three microbial densities were performed excluding the time 0 (before placed in the stream).

Sequencing results on prokaryotes and eukaryotes at the amplicon sequence variant (ASVs) level was analysed for alpha-diversity (Chao 1 and Shannon indices) and beta-diversity using non-metric multidimensional scaling (NMDS) analysis based on a Bray-Curtis

dissimilarity matrix using the package Phyloseq in R. A stress function (ranging from 0 to 1) was used to assess the goodness of fit between computed and original data. The relative abundances of phyla for prokaryotes and eukaryotes (*i.e.* mean abundance < 1 % across all samples) for the two sites and five substrata were analysed with the R package Phyloseq v1.42 according to McMurdie and Holmes (2013). Differences in microbial community composition between substrata and sites at week 3 were estimated through permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA) based on 9999 permutations to avoid potential autocorrelation among samples using PRIMER6 version 6.1.11. Differences in prokaryotes and eukaryotes phyla relative abundances between sites and among substrata were assessed through Scheirer-Ray-Hare test.

Relationships between structural (alpha diversity indices) and functional (extracellular enzymatic activities; GLU, NAG, PHO) descriptors of microbial communities colonizing the different substrata and sites were analysed through linear correlation analysis using the Pearson coefficient. The correlation analyses were performed for prokaryotes and eukaryotes, separately, and considering i) all the substrata and sites together and ii) separating substrata per study site.

IV) Results

IV.1) Water physicochemical characteristics

Water conductivity, temperature and concentrations of total dissolved carbon, dissolved organic carbon, and soluble reactive phosphorus were higher at the downstream site than in the upstream site, whereas dissolved oxygen was higher in the upstream site (Table 1). pH and concentrations of total dissolved nitrogen and total dissolved phosphorus were not statistically different between study sites, although average nutrient concentrations values were consistently higher downstream compared to upstream.

The factors time and site had an interactive effect on total dissolved carbon in water (Table S1). Indeed, stronger variations in total dissolved carbon concentrations were measured at the downstream site (ranging from 48.72 to 65.32 mg L⁻¹) than at the upstream site (ranging from 20.2 to 23.82 mg L⁻¹) during the length of the experiment.

Table 1: Water physicochemical parameters in the Artière's river, in upstream and downstream sections over the four study weeks (November and December 2020). Average values (N = 4, sampling weeks) \pm SE of pH, conductivity, temperature, concentrations of dissolved oxygen, Dissolved Organic Carbon (DOC), Total Dissolved Carbon (TDC), Total Dissolved Nitrogen (TDN), Soluble Reactive Phosphorus (SRP), Total Dissolved Phosphorus (TDP) are represented. Statistically significant differences between sites were marked by asterisks (*, $P < 0.05$).

	Upstream	Downstream
pH	7.40 \pm 0.17	7.17 \pm 0.01
Conductivity ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	222.88 \pm 4.00	723.80 \pm 64.16 *
Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	3.98 \pm 0.58	13.56 \pm 0.99 *
Dissolved oxygen (mg L^{-1})	11.54 \pm 0.26 *	7.78 \pm 0.46
DOC (mg L^{-1})	7.00 \pm 0.59	11.88 \pm 1.17 *
TDC (mg L^{-1})	22.83 \pm 1.08	59.09 \pm 3.74 *
TDN (mg L^{-1})	2.70 \pm 0.53	4.29 \pm 0.20
SRP (mg L^{-1})	0.103 \pm 0.06	0.138 \pm 0.07 *
TDP (mg L^{-1})	0.204 \pm 0.05	0.687 \pm 0.10

IV.2) Characterization of plastics pollution

Macroplastics debris were not found in the upstream section, neither transported by the water column nor in the riparian area. Accordingly, we consider that the upstream section was exempt from macroplastics pollution. In the downstream section, macroplastics debris were not found in the water column but they strongly accumulated in the riparian area (Table 2). The most polluted zone is the shoreline (at the riverside) comparing to the intermediate area (10 m from the riverside) and the distal area (20 m from the riverside). Gradually, the abundance and density of plastic contamination progressively decreased when moving away from the shoreline.

Plastic debris were identified and classified in Table 2. For some plastic fragments, we were not able to identify its origin and nature due to strong deterioration of materials (*i.e.* code G121 “Other plastic or polystyrene items not identifiable”). Five types of plastics were found in the shoreline, five types in the intermediate area and one type in the distal area (Table 2). There was presence of polypropylene (*i.e.* candies packaging found at the shoreline and intermediate areas), polyethylene (*i.e.* construction tape, found at the intermediate area), and low- and high-density polyethylene (*i.e.* bags and hunting cartridge shell found at the shoreline and intermediate areas). Note that the extremely heavy item (G120) found in the shoreline corresponded to the plastic protection of a bicycle lock safety. No plastic items of biodegradable nature (*i. e.* polyhydroxyalcanoates, polylactides, aliphatic polyesters ...) were found in the downstream section, including those tested in this experiment (potato-starch co-polymer).

Table 2: Quantification and identification of macroplastics at the downstream site based on three sampling zones: shoreline (at the riverside), intermediate (10 m from the riverside) and distal (20 m from the riverside). The abundance and weight of plastics are represented per unit of surface area. Values are means ($n = 3$) \pm SE. The classification of plastic debris according to the TSG_ML code European Commission (2013) is also provided. The percentages of plastic debris correspond to the total weight collected per sampling zones.

	Shoreline	Intermediate	Distal
Abundance (fragments/m ²)	29.2 \pm 2.1	18.8 \pm 15.7	2.1 \pm 2.1
Weight (g/m ²)	555 \pm 552	24.7 \pm 14.7	0.1 \pm 0.1
Plastic composition (% of weight)			
Bags (G2)	0.02	-	-
Crisps packets/sweets wrappers (G30)	0.40	1.72	-
Fertiliser/animal feed bags (G36)	0.07	-	-
Shotgun cartridges (G70)	-	31.20	-
Plastic construction waste (G85)	-	36.44	-
Other plastic/polystyrene items identifiable (G120)	99.13	-	-
Other plastic/polystyrene items not identifiable (G121)	0.38	19.62	100
Other rubber pieces (G131)	-	11.01	-

IV.3) Microbial densities

Bacterial density: bacteria increased significantly over time in the different substrata immersed in the two studied sites, with a strong increase during the first week of colonization followed by weaker variations until the end of experiment (Figure 1A, Table S2). An interactive effect between the factors substrata and site was observed (Figure 1A, Table S2). In the upstream site, bacterial densities were significantly higher in the sediment, followed by leaves, the two plastics (BDBP and LDPE), and finally rocks (Wilcoxon test, $P < 0.05$). Conversely, bacterial densities in the downstream site were significantly higher in leaves, followed by sediment and BDBP, and finally LDPE and rocks (Wilcoxon test, $P < 0.05$). No statistical differences were observed for bacterial accumulation between study sites (Table S2).

Fungal density: differences in density values were observed among sampling times ($P < 0.0005$, Table S2) especially for leaves and sediment compared to the other substrata (Figure 1B). An interactive effect was observed between the factors site and substrata ($P < 0.05$, Table S2). In the upstream site, fungal density was higher in leaves and sediment compared to BDBP and rocks while no fungi were detected in LDPE (Figure 1B). In the downstream site, the highest fungal density was measured in leaves, followed by sediment and LDPE, and finally rocks and BDBP. The factors substrata and site had each significant effects on fungal density values ($P < 0.0005$ and $P < 0.05$, respectively, Table S2). Overall, leaves and sediments were more colonized by fungi than plastics and rocks (except for a higher variation of the fungal density in week 4 downstream). And, fungal density was higher in the plastics colonized downstream than in those colonized upstream (Figure 1B, Table S2).

Algal biomass: the factors substrata and time had a significant effect on algal density ($P < 0.0005$ and $P < 0.05$, respectively). The algal accumulation was higher in sediments than in plastics or rocks from the two study sites. However, no interaction between factors substrata and site was observed (Table S2). The algal colonization was lower and slower comparing to that of bacteria and fungi in the substrata tested, with consistent increases after week 2 for sediments and after week 3 for rocks (Figure 1C). No differences in algal biomass were observed between BDBP, LDPE and rocks from the two studied sites (Figure 1C).

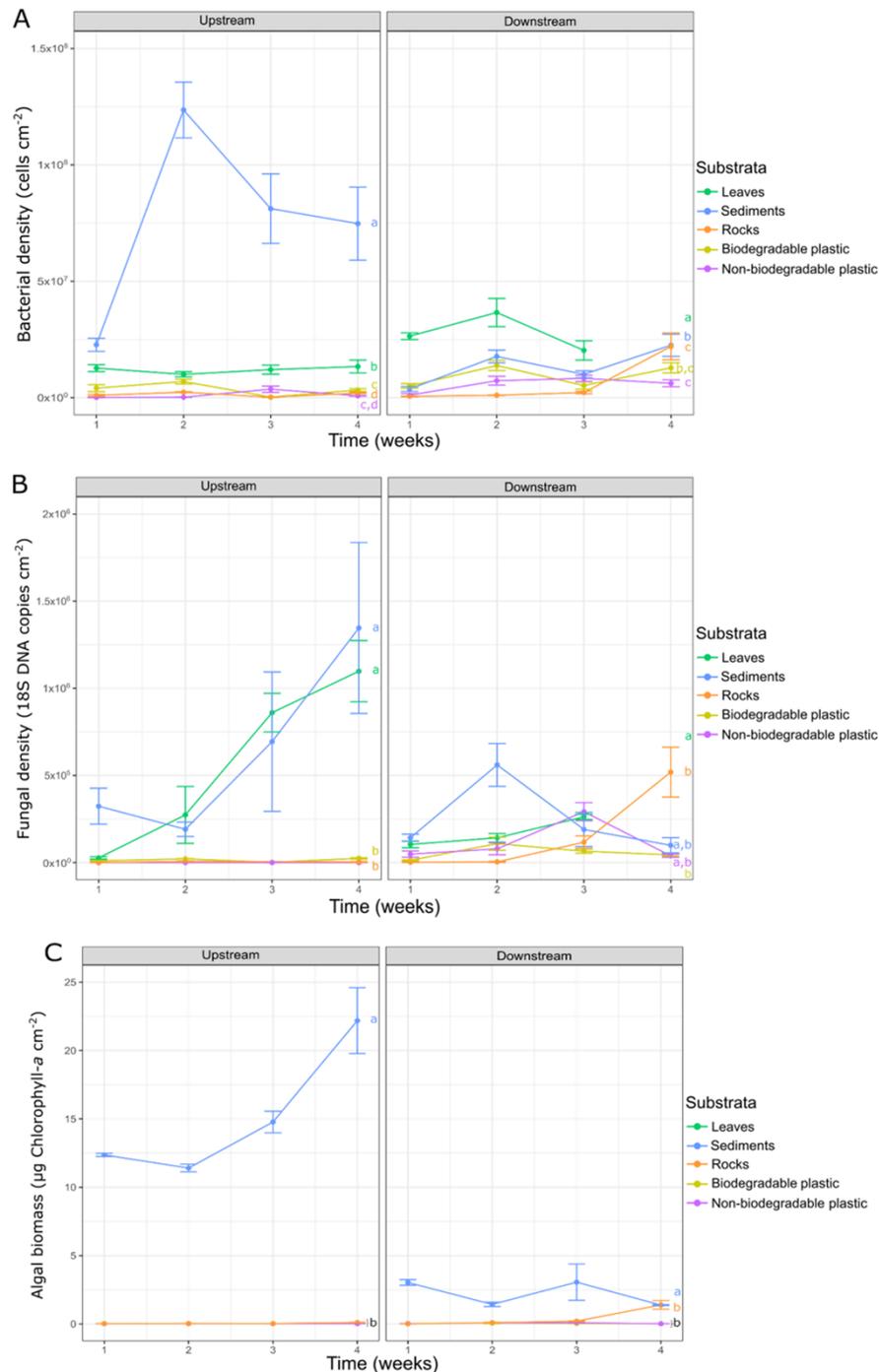


Figure 1: Bacterial density (A), fungal density (B), algal biomass (C) measured in the five substrata colonized in the upstream and downstream sites. Values are means ($n = 5$) \pm SE per substrata, site and sampling time. Statistical differences between substrata were represented by letters ($a > b > c$, Wilcoxon test, $P < 0.05$) and the test has been performed independently for each site.

IV.4) Extracellular enzymatic activities

GLU activity: the activity values increased progressively over the colonization time ($P < 0.05$, Table S2) with a more marked increase during weeks 1 and 2 (Figure 2A). Both the substrata and site factors had significant effects on GLU activity ($P < 0.0005$ for both factors, Table S2). The highest activity rates were measured in leaves, followed by sediments and finally plastics and rocks (Figure 2A). There was an interactive effect between the factor substrata and site ($P < 0.005$, Table S2), especially for plastics. The activity measured in the BDBP and sediments were similar and significantly higher comparing to that measured in LDPE and rocks from the downstream site. However, these differences were not observed in the upstream site where the activity rates in BDBP and LDPE were similar and even lower comparing to that measured in rocks (Figure 2A). When considering all substrata together, the GLU activity values were higher in the downstream site comparing to the upstream site.

NAG activity: The three tested factors had a significant effect on NAG activity values but no interactions were observed among factors (Table S2). The activity values increased later than those of GLU activity, between weeks 2 and 3, though this was rather variable depending on substrata and sites (Figure 2B). Activity values were higher in substrata from the downstream site than in those from the upstream site. Irrespectively of the study site, NAG activity in leaves and sediment was significantly higher comparing to that measured in plastics and rocks (Figure 2B). When comparing plastics, NAG activity in BDBP was significantly higher comparing to that measured in LDPE and rocks, and this was strongly evident in the downstream site (Figure 2B).

PHO activity: Although PHO activity values increase during the colonization study, the factor time was not statistically significant ($P = 0.238$, Table S2). However, effects were observed from the factors site and substrata ($P < 0.0005$ for both factors, Table S2). Overall, the phosphorus acquisition in the downstream site was higher than in the upstream site (Figure 2C). Moreover, PHO in leaves and sediments was higher than in plastics and rocks. PHO in plastics and sediments were relatively similar, despite an increasing trend of activity in BDBP comparing to LDPE and rocks during the early stages of colonization (weeks 1 to 2, Figure 2C).

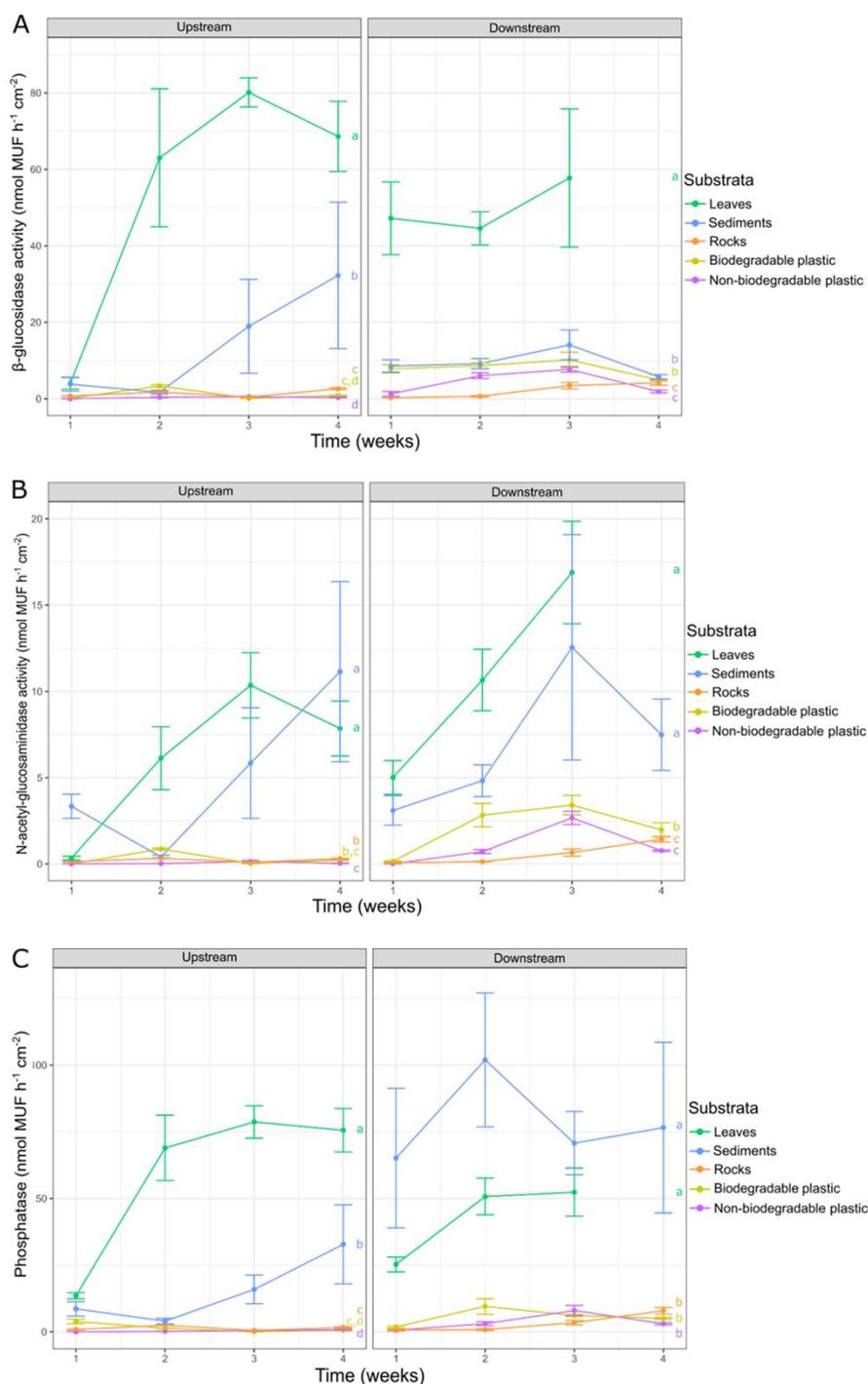


Figure 2: Extracellular enzymatic activities (GLU (A), NAG (B) and PHO (C)) measured in the five substrata placed in the upstream and downstream sites of the Artiere's river. Values are means ($n = 5$) \pm SE per substrata, site and sampling time. Statistical differences between substrata are represented by letters (Wilcoxon test, $a > b > c > d$, $P < 0.05$). The test has been performed independently for each site.

IV.5) Microbial diversity

The alpha-diversity of prokaryotic communities was influenced by the factor substrata ($P < 0.05$ for Chao1 and $P < 0.0005$ for Shannon) but not by the factor site (Table S2). In contrast, the beta-diversity of prokaryotic communities was much more different between sites (PERMANOVA, $P < 0.005$) than between substrata (Figure 3A). Differences between sites were explained by higher relative abundance of Firmicutes downstream and Verrucomicrobia upstream (Table S5, Figure 4). Both the structure and composition analyses of communities coincided in grouping separately sediments from rocks (PERMANOVA, $P < 0.05$) since the former had higher species richness and diversity than the latter. The structure and composition of prokaryotic communities in plastics and leaves was relatively similar when comparing substrata for each site separately (PERMANOVA, $P > 0.1$), although strong variance was observed between replicates of BDBP comparing to LDPE and rocks in the downstream site (Figure 3A). Differences among substrata are explained by a higher relative abundance of Firmicutes and Cyanobacteria in sediments and rocks, respectively, compared to leaves and plastics (Table S5, Figure 4).

In the case of eukaryotes, the structure of communities was not affected by the factor substrata but only by the factor site ($P < 0.05$ for the Shannon index, Table S2). Again, consistent differences were observed in the composition of eukaryotic communities between sites (PERMANOVA, $P < 0.005$) rather than between substrata (Figure 3B). Differences between sites were mostly explained by a higher relative abundance of Ascomycota, Euglenozoa and Chlorophyta upstream, while Ciliophora and Rotifera were more abundant downstream (Table S6, Figure 4). The diversity of eukaryotic communities was higher in the upstream site than in the downstream site excepting for leaves, (Table 3), and the composition of communities in sediments was significantly different from that observed in rocks (PERMANOVA, $P < 0.05$, Figure 3B). Leaves and plastics had similar eukaryotic community composition when comparing substrata for each site separately (PERMANOVA, $P > 0.1$), though again a higher variance between replicate samples was observed for BDBP comparing to LDPE and leaves in the downstream site (Figure 3B). Although differences in relative phylum abundance were observed between substrata (Table S6), these were highly variable between sites (Figure 4).

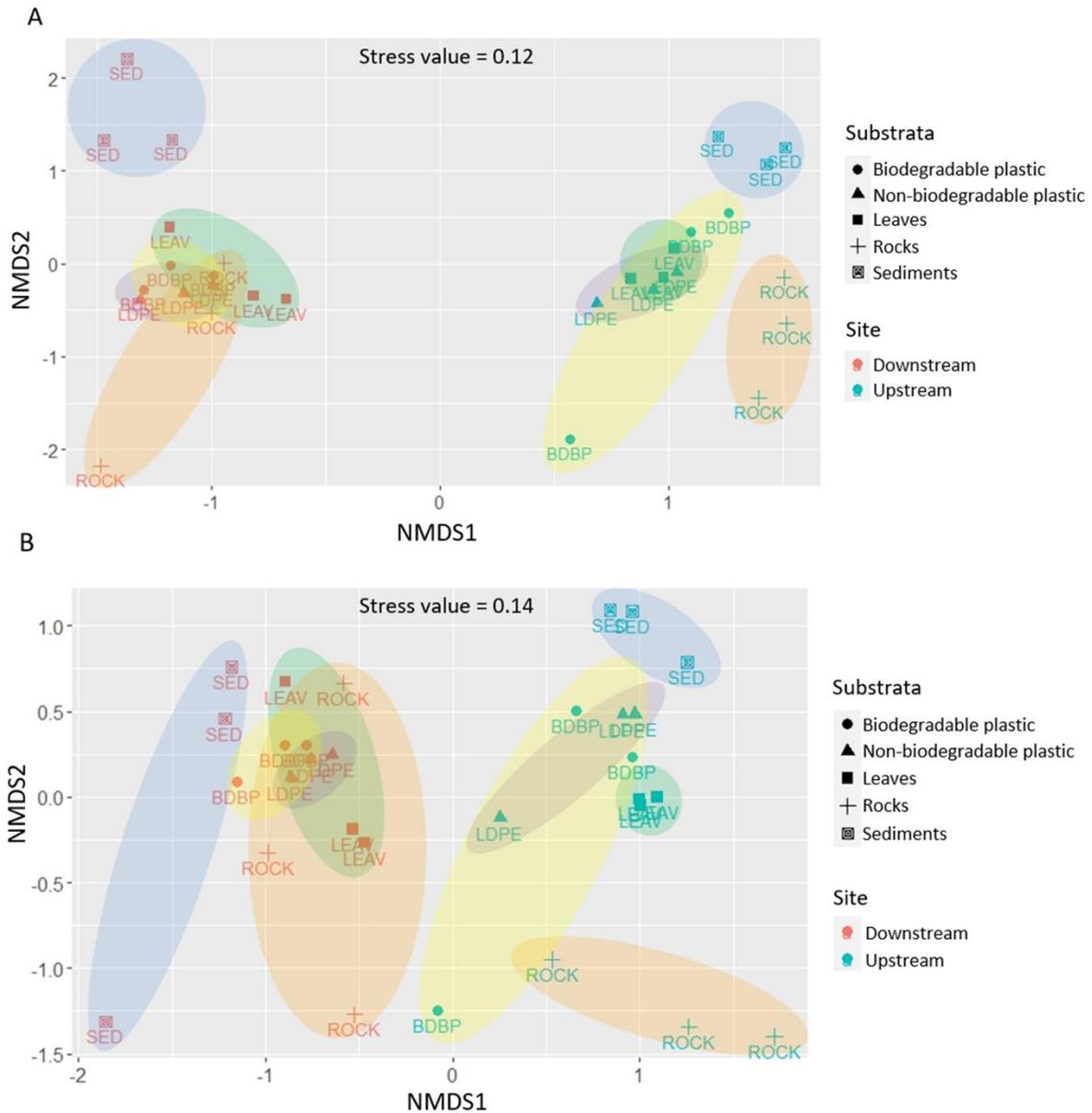


Figure 3. Non-metric multidimensional scaling (NMDS) analysis on prokaryotic (A) and eukaryotic (B) communities at week 3 of colonization of the five substrata placed in upstream and downstream sites of the Artière. Stress values were < 0.2 suggesting that the computation accurately represents the dissimilarity among samples. Ellipse zones are based on the confidence intervals for each substratum and site.

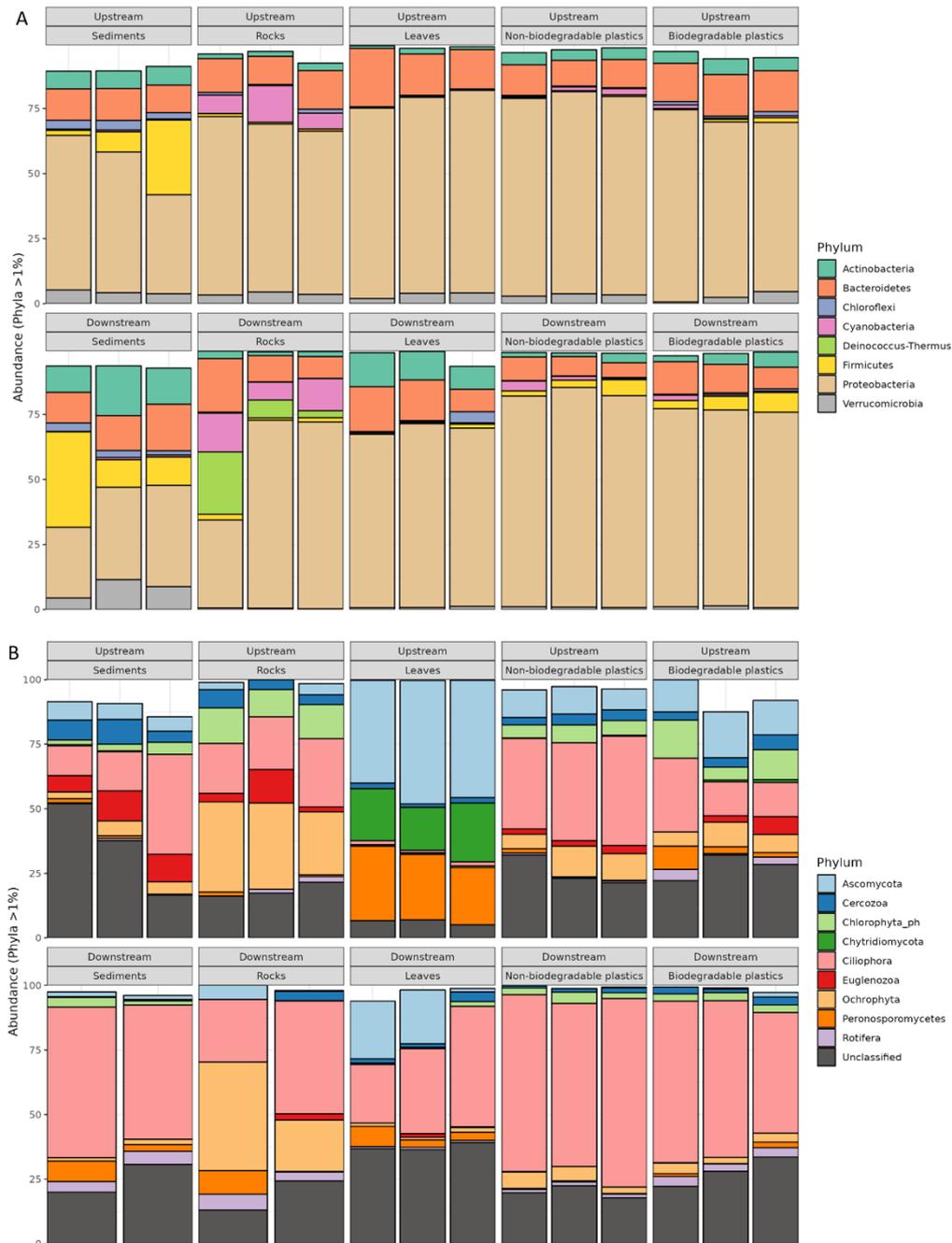


Figure 4: Relative abundance of microbial phyla contributing more than 1 % of total relative abundance of microbial communities at week 3 of the colonization experiment. Bar charts correspond to the percentage of prokaryotic phyla (A) and eukaryotic phyla (B) present in the different samples analysed.

Table 3: Richness (Chao 1) and diversity (Shannon) indices for prokaryotic and eukaryotic communities at week 3 of colonization of the five substrata in upstream and downstream sites of the Artière river. Values are means ($n = 3$) \pm SE per substrata and site. Differences among substrata within the same sites are represented by letters ($a > b > c$, $P < 0.05$, Tukey's test).

	Prokaryotes		Eukaryotes		
	Chao 1	Shannon	Chao 1	Shannon	
Up	leaves	877 \pm 94 (a)	4.38 \pm 0.23 (b,c)	113 \pm 3 (a,b)	2.31 \pm 0.04 (a)
	sediment	2106 \pm 484 (a)	6.67 \pm 0.30 (a)	364 \pm 83 (a)	4.75 \pm 0.37 (a)
	BDBP	1110 \pm 407 (a)	5.26 \pm 0.37 (b)	171 \pm 73 (a,b)	4.05 \pm 0.64 (a)
	LDPE	994 \pm 53 (a)	4.37 \pm 0.13 (b,c)	268 \pm 51 (a,b)	4.12 \pm 0.31 (a)
	rocks	785 \pm 136 (a)	4.08 \pm 0.28 (c)	63 \pm 16 (b)	3.30 \pm 0.09 (a)
Down	leaves	861 \pm 68 (a,b)	4.79 \pm 0.42 (a,b)	135 \pm 24 (a)	2.80 \pm 0.48 (a)
	sediment	1311 \pm 217 (a)	5.84 \pm 0.13 (a)	138 \pm 61 (a)	2.20 \pm 0.83 (a)
	BDBP	834 \pm 140 (a,b)	4.79 \pm 0.07 (a,b)	146 \pm 26 (a)	3.10 \pm 0.19 (a)
	LDPE	760 \pm 123 (a,b)	4.39 \pm 0.16 (b,c)	152 \pm 25 (a)	2.95 \pm 0.16 (a)
	rocks	479 \pm 164 (b)	3.72 \pm 0.12 (b,c)	106 \pm 54 (a)	2.87 \pm 0.82 (a)

IV.6) Relationships between structure and function in microbial communities

Linear correlations between alpha-diversity indices and extracellular enzymatic activities were mostly observed in prokaryotic communities rather than in eukaryotic communities (Table S4). A positive linear correlation was observed between the Shannon and Chao indexes of prokaryotic communities and NAG and PHO activities when considering all substrata and sites together. More precisely, the structure-function correlations were mostly explained by communities colonizing substrata downstream than by those colonizing upstream (Table S4). Strong positive correlations were observed in prokaryotic communities between i) the Shannon index and NAG and GLU activities and between ii) the Chao 1 index and GLU, NAG and PHO activities of substrata colonized in the downstream site (Table S4). According to correlation

plots (Figure 5), the lowest diversity and activity scores were measured in rocks, followed by plastics, and finally, leaves and sediments colonized in the downstream site. No correlations were observed between diversity indices and enzyme activities in prokaryotic communities from the upstream site.

In eukaryotic communities, we only observed a negative correlation between the Shannon index and PHO activity when considering all the substrata and sites together (Table S4). No structure-activity correlations were observed for eukaryotic communities when analyzing study sites separately.

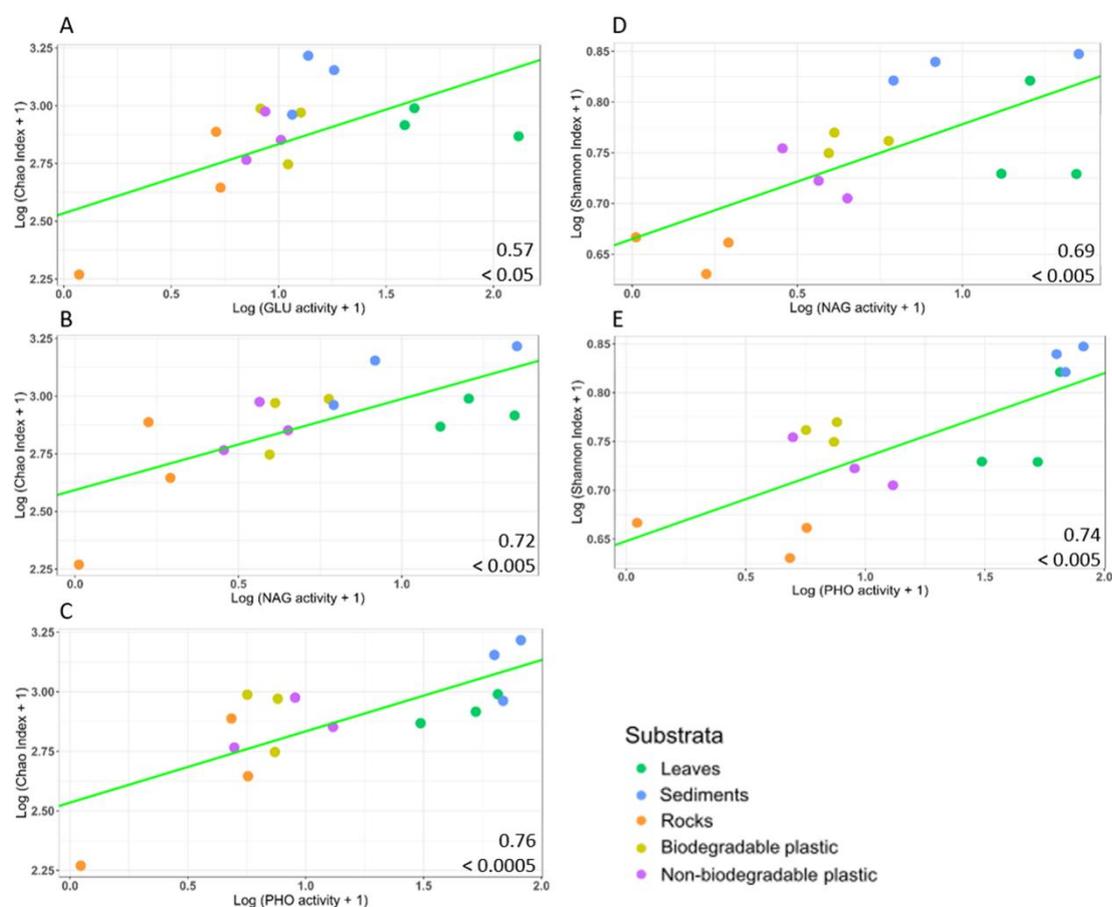


Figure 5. Log relationships between the Chao 1 index of prokaryotic communities and GLU (A), NAG (B) and PHO (C) activities measured at the downstream site as well as between the Shannon index of prokaryotic communities and NAG (D) and PHO (E) activities measured at the downstream site. In each plot we provided the Pearson correlation coefficient and the corresponding *P*-value. The different substrata are represented by different colours.

V) Discussion

The objective of this study was to examine the ability of microbial communities to colonise different benthic substrata (including plastics) in two river sites with different level of plastic contamination. In the Artière river (Centre France), no plastics were found in the upstream site while strong plastic contamination was detected in the riverbed of the downstream site. According to the distribution and characteristics of the macroplastics debris found in the downstream site, we suspect their origin from combined sewage overflows release during heavy storm episodes (Horton and Dixon 2017; Kawecki and Nowack 2019). Indeed, the downstream site was located 1.7 km downstream from a WWTP (425000 equivalent habitants) collecting waters from the Clermont-Ferrand city. The nature of macroplastic debris found in the downstream section (polystyrene, polypropylene and low- and high-density polyethylene) were quite similar compared to those found in other aquatic systems (Klein, Worch and Knepper 2015; Blettler *et al.* 2019; Kawecki and Nowack 2019). Biodegradable plastic (BDBP) debris were not found in the Artière, and this was probably explained by their lower and more recent industrial production compared to other non-biodegradable plastics (such as polyethylene, polystyrene and/or polypropylene (European Bioplastics 2017)), as well as by their expected lower lifetime in the environment (compostable material, (Song *et al.* 2009)). According to studies quantifying plastic litter pollution in rivers (*i. e.* 0.5-1.2 items m⁻², Kiessling *et al.* (2019); 5 items m⁻², Blettler *et al.* (2019); 0.6-113 g m⁻², Liro, Mikuś and Wyzga (2022)), the downstream site of the Artière was more contaminated by macroplastics (ranging 2 to 29 items m⁻² and 0.1-555 g m⁻²) than other rivers worldwide. However, this result must be taken with caution since protocols used to quantify and identify plastic pollution in rivers are not yet well standardized (*e. g.* Hartmann *et al.* 2019).

The four-week colonization experiment in the Artière river permitted to obtain mature microbial communities in the five substrata analysed, including leaves, sediment, rocks, BDBP and LDPE. The amount of bacteria and algae accumulated in sediments, rocks and leaves in our experiment were in the same range than those measured in other studies in temperate stream ecosystems (Sabater and Romaní 1996; Romaní *et al.* 2004a; Artigas *et al.* 2009). Plastics in our experiment reached bacterial densities per surface area (cm²) similar to those measured on polypropylene sheets after four months of experiment in a pre-alpine lake (Hempel, Grossart and Gross 2009). After four weeks of colonization, enzymatic activities (*i. e.* GLU and PHO) measured in sediments and rocks from our experiment were in the same range than those measured in other French rivers (Montuelle *et al.* 2010) but consistently lower comparing to

those measured in Mediterranean streams (three to seven times lower comparing to Romaní *et al.* (2004). Such differences between experiments are expected given that enzymatic activity measurements in microbial communities strongly depend on the specific organic matter and nutrient context of each environment (Arnosti 2003). Joly, Mallet and Artigas (2019) measured GLU, NAG and PHO activities and bacterial densities in natural (alder leaves) and standardized organic substrata (wood and cotton strips) colonized for eight weeks in the upstream site of the Artière river (same study site of the present study). This experiment showed that three- to four-week colonization was sufficient to reach a mature microbial community on natural and artificial organic substrata.

The microbial colonization of the two plastic polymers (in terms of microbial densities and enzymatic activities) was closer to that observed on rocks than on sediments and leaves in the two river sites. These differences can be explained by the nature of the substratum where the microbial community develops. For instance, leaves are organic substrata that can provide microbial heterotrophs (such as fungi and bacteria) with carbon and nutrients (Tank and Dodds 2003), whereas sediments are depositional habitats where strong accumulation of organic matter occurs (Romaní *et al.* 2004a). When carbon and/or nutrient availability in leaves and sediment is insufficient, microorganisms can also obtain nutrients from the water column (Mulholland *et al.* 1984). Conversely, the functioning of microbial communities on rocks and plastics rely mostly on nutrients from the water column and/or from the internal recycling of nutrients within the microbial community (*e. g.* Francoeur and Wetzel 2003) since the substrata cannot provide nutrients or does so at very low rates. The above explanation based on nutrient-resources acquisition was not valid for differences observed in microbial communities' composition (beta-diversity) among substrata. After three weeks of colonization, the composition of prokaryotes and eukaryotes communities in plastics (including BDBP and LDPE) was closer to that observed in leaves than on rocks and sediments in the two studied sites. Indeed, higher relative abundance of Firmicutes and Cyanobacteria were observed in sediments and rocks, respectively, compared to leaves and plastics. Another possible explanation for these results may be the different exposure of leaves and plastics to current velocity compared to sediments and rocks. The low weight and strong flexibility of leaves and plastics substrata were probably selecting microbial species more adapted to turbulent flow, whereas rocks and sediments probably selected for microbial species more adapted to intermediate to laminar flow-types (Besemer *et al.* 2007). This is, however, a hypothesis that remains to be tested.

Interestingly, we observed higher GLU and NAG activities and bacterial densities per unit of substratum surface area, in BDBP than in LDPE substrata. More precisely, the activities and bacterial accumulation in BDBP were similar to those measured in sediments, while those measured in LDPE were similar to that measured in rocks. These differences in microbial colonization can be explained by the different nature of plastics. Miao *et al.* (2021) observed variation on carbon utilization capacities between freshwater biofilms on PET and those growing on PVC and glass tiles, indicating the presence of substrate-specific functional diversity. Nauendorf *et al.* (2016) measured five times higher aerobic and eight times higher anaerobic bacterial density in biodegradable plastic bags (> 50% biodegradable polyester and >20% corn starch) than in polyethylene plastic bags incubated in marine sediments. The BDBP substratum used in our study was composed of 30% potato starch and 70% biodegradable copolyester, though the supplier does not specify the exact nature of the copolymer (Végéos, France), whereas the LDPE is composed of 100% polyethylene. Up to date, there is no clear or very few evidence of real biodegradation of polyethylene (Ghatge *et al.* 2020), whereas the accessible labile carbon contained in BDBP could explain the stronger GLU and NAG activity measured in this substratum. The higher GLU (hydrolyze 1,4 linked β -D-glucose residues from cellobiose) and NAG (hydrolyze 1,4 linked N-acetyl- β -D-glucosaminide residues in chitooligosaccharides) activities measured in BDBP cannot be related to the use of starch since the cleavage of this polysaccharide is mediated by the action of α -glucosidases among other enzymes (hydrolyze 1,4 linked α -D-glucose residues from maltose (German, Chacon and Allison 2011)). Therefore, the higher rates of GLU and NAG activities could explain the enhanced breakdown of the unknown copolymer used in the BDBP polymer manufacturing.

It is important to highlight that differences between microbial colonization of BDBP and LDPE were only observed in the downstream site of the Artière river. The downstream site had higher water temperature, nutrient concentrations and plastic pollution than the upstream site, certainly due to the natural as well as anthropogenic patterns along upstream-downstream gradients found in urbanized watersheds (Vannote *et al.* 1980; Marti *et al.* 2004). The specific environmental template from the downstream site could explain the strong structure-function relationships observed in prokaryotic communities colonizing the different substrata. Such a difference can result from niche adaptation of prokaryotic communities to colonize in different manner non-biodegradable and biodegradable plastics in a favorable environmental context for microbial development. The more diverse is the prokaryotic community the higher are the

enzymatic activity rates permitting to decompose organic matter polymers which agrees with biodiversity-function observations made in the literature (*e. g.* Cardinale *et al.* 2006). In microbial communities, decomposers preferentially decompose labile polymers (*i. e.* cellulose and hemicellulose) when present at any concentration rather than recalcitrant polymers (*i. e.* lignin, chitin), as long as they are within a favorable environment (Ekschmitt *et al.* 2005). However, the decomposition of more recalcitrant polymers can be operated in the presence of labile polymers as the resultant of co-metabolic processes occurring in microbial decomposer communities (Arnosti 2003). The microbial co-metabolism is defined by the transformation of a non-growth substrate in the presence of a substrate necessary for growth (Dalton and Stirling 1982). According to this concept, the higher decomposition activities in BDBP downstream can result from recalcitrant compounds degradation (*i. e.* starch) favored by the high dissolved organic carbon concentrations supplied by the WWTP effluent (boosting GLU activity). Further studies specifically investigating enzyme activities involved in starch decomposition (*i. e.* α -glucosidases, α - β -amylases) should be conducted on the biodegradable plastic between study sites.

From an ecosystem point of view, upstream plastics are colonized in a similar way than rocks while downstream they are colonized in a similar way than sediment providing higher enzyme degradation capabilities to the river ecosystem and higher heterotrophy. A pattern seems to distinguish the microbial colonization of biodegradable plastic (BDBP), that tends to resemble sediments and leaves, from the microbial colonization of non-biodegradable plastic (LDPE) that tends to resemble rocks. Accordingly, the presence of biodegradable macroplastics would increase heterotrophy to the river ecosystem more than the presence of non-biodegradable macroplastics. However, the size of these effects at the ecosystem level would depend on the respective availability of the distinct surface substrata in the streambed (*i.e.* natural: rocks, sediment, leaves; and plastics: biodegradable, non-biodegradable). It is important to remark that this conclusion applies to the specific environmental and microbiological characteristics of the Artière's river and may not reproduce in other rivers with different degree of plastic pollution, water physicochemical characteristics, and microbial biodiversity.

VI) Acknowledgments

This study was funded by the program Ecosphère Continentale et Cotière (EC2CO) in the frame of the project DeCoDry. We thank Florent Rossi for his participation in the field samplings.

VII) Supplementary material and data



Figure S1: Artière's river sites in November. A) Overall view of the upstream site. B) Canopy cover at the upstream site. C) Plastic pollution spot observed at the downstream site. D) Overall view of the downstream site.

Table S1: *P*-values results from the comparisons of physicochemical measurements between two sites and over four weeks. Two-way ANOVA ($P < 0.05$). In the "factor" column, it is indicated in italics whether the data are similar or whether they are higher or lower between the two sites.

Factors	Site	Time	Site x Time
pH (<i>Down</i> \approx <i>Up</i>)	0.658	0.467	0.736
Conductivity (<i>Down</i> > <i>Up</i>)	< 0.005	0.415	0.406
Temperature (<i>Down</i> > <i>Up</i>)	< 0.005	0.207	0.201
Dissolved oxygen (<i>Up</i> > <i>Down</i>)	< 0.005	0.178	0.221
DOC (<i>Down</i> > <i>Up</i>)	< 0.05	0.854	0.183
TDC (<i>Down</i> > <i>Up</i>)	< 0.0005	< 0.0005	< 0.005
TDN (<i>Down</i> \approx <i>Up</i>)	0.107	0.416	0.554
SRP (<i>Down</i> > <i>Up</i>)	< 0.05	0.753	0.337
TDP (<i>Down</i> \approx <i>Up</i>)	0.810	0.520	0.810

Table S2: The upper table show the *P*-value results of Scheirer-Ray-Hare test on the effect of factors time, substrata and site, as well as their interactions, on microbial densities and extracellular enzymatic activities (EEAs) of microbial communities colonizing the five substrata in the two sites over four weeks. NA (Non-Applicable) corresponds to factors not calculable for the integrated enzyme activity per bacterial cell throughout the study. The lower table show the results of two-way ANOVA test on the effect of factors substrata and site on alpha-diversity indices for prokaryotic and eukaryotic communities on the five substrata in the two sites at week 3 of the experiment. Statistically significant *P*-values < 0.05 are marked in bold.

Descriptors Factors	Microbial densities			EEAs / cm ² of biofilm			EEAs / bacterial cell		
	Bacteria	Fungi	Algae	GLU	NAG	PHO	GLU	NAG	PHO
Time	< 0.0005	< 0.0005	< 0.05	< 0.05	< 0.0005	0.238	NA	NA	NA
Substrate	< 0.0005	< 0.0005	< 0.0005	< 0.0005	< 0.0005	< 0.0005	< 0.0005	< 0.0005	< 0.0005
Site	0.165	< 0.05	0.587	< 0.0005	< 0.0005	< 0.0005	< 0.05	< 0.05	< 0.0005
Substrate x Site	< 0.05	< 0.05	0.347	< 0.005	0.183	0.081	< 0.0005	< 0.005	< 0.0005
Substrate x Time	0.263	0.613	0.148	0.573	0.354	0.867	NA	NA	NA
Site x Time	0.692	0.533	0.761	0.061	0.490	0.345	NA	NA	NA

Descriptors Factors	Prokaryote / Eukaryote diversity			
	Prokaryote Chao1	Prokaryote Shannon	Eukaryote Chao1	Eukaryote Shannon
Substrate	< 0.05	< 0.0005	0.060	0.246
Site	0.069	0.124	0.298	< 0.05
Substrate x Site	0.830	0.147	0.154	0.075

Table S3: Bacterial density, fungal density, algal biomass and GLU, NAG and PHO activities measured at Time 0 (before placed in the stream) in the five substrata.

Descriptors	Substrata	Means \pm SE
Bacterial density (cells cm ⁻²)	BDBP	0 \pm 0
	Leaves	400878 \pm 90370
	LDPE	0 \pm 0
	Sediments	117170 \pm 18546
	Rocks	0 \pm 0
Fungal density (18S DNA copies cm ⁻²)	BDBP	0 \pm 0
	Leaves	8071 \pm 4187
	LDPE	0 \pm 0
	Sediments	0 \pm 0
	Rocks	0 \pm 0
Algal biomass (μ g chlorophyll- <i>a</i> cm ⁻²)	BDBP	0.010 \pm 0.002
	LDPE	0.022 \pm 0.009
	Sediments	8.768 \pm 0.256
	Rocks	0 \pm 0
GLU activity (nmol MUF h ⁻¹ cm ⁻²)	BDBP	0.005 \pm 0.001
	Leaves	14.47 \pm 4.7
	LDPE	0.001 \pm 0.0005
	Sediments	0.209 \pm 0.009
	Rocks	0 \pm 0
NAG (nmol MUF h ⁻¹ cm ⁻²)	BDBP	0.007 \pm 0.001
	Leaves	2.45 \pm 0.36
	LDPE	0.009 \pm 0.004
	Sediments	0.387 \pm 0.032
	Rocks	0 \pm 0
PHO (nmol MUF h ⁻¹ cm ⁻²)	BDBP	0 \pm 0
	Leaves	3.590 \pm 0.464
	LDPE	0 \pm 0
	Sediments	0 \pm 0
	Rocks	0 \pm 0

Table S4. Pearson correlation coefficients between structural (Shannon and Chao 1 indexes) and functional (GLU, NAG and PHO activities) descriptors of microbial communities colonizing the different substrata and sites. Analyses were performed, separately, for prokaryotes and eukaryotes and considering both the two study sites together (n = 30) and/or separated (n = 15). The Pearson correlation scores as well as the *P*-values are represented. *P*-values are shown in parentheses and the significant results are shown in bold.

Shannon index				
	Eukaryote		Prokaryote	
GLU	Upstream and downstream		Upstream and downstream	
	-0.280 (0.134)		0.219 (0.231)	
	Upstream	Downstream	Upstream	Downstream
	-0.369 (0.176)	0.009 (0.973)	0.205 (0.462)	0.445 (0.097)
NAG	Upstream and downstream		Upstream and downstream	
	-0.243 (0.195)		0.406 (< 0.05)	
	Upstream	Downstream	Upstream	Downstream
	-0.239 (0.389)	0.001 (0.997)	0.343 (0.209)	0.694 (< 0.005)
PHO	Upstream and downstream		Upstream and downstream	
	-0.379 (< 0.05)		0.353 (≤ 0.05)	
	Upstream	Downstream	Upstream	Downstream
	-0.383 (0.158)	-0.206 (0.459)	0.223 (0.424)	0.741 (< 0.005)

Chao 1 index				
GLU	Upstream and downstream		Upstream and downstream	
	0.206 (0.272)		0.257 (0.170)	
	Upstream	Downstream	Upstream	Downstream
	0.230 (0.408)	0.307 (0.264)	0.266 (0.337)	0.570 (< 0.05)
NAG	Upstream and downstream		Upstream and downstream	
	0.231 (0.218)		0.368 (< 0.05)	
	Upstream	Downstream	Upstream	Downstream
	0.305 (0.268)	0.285 (0.302)	0.378 (0.163)	0.715 (< 0.005)
PHO	Upstream and downstream		Upstream and downstream	
	0.130 (0.491)		0.329 (0.074)	
	Upstream	Downstream	Upstream	Downstream
	0.223 (0.423)	0.115 (0.682)	0.265 (0.338)	0.761 (< 0.0005)

Table S5: *P*-value results of Scheirer-Ray-Hare test on the effect of factor site, substrata for relative abundances of each prokaryotic phylum. Significant *P*-values < 0.05 are marked in bold.

Factors Descriptors	Site	Substrata	Site x Substrata
Proteobacteria	0.917	< 0.0005	0.485
Bacteroidetes	0.152	< 0.05	0.376
Deinococcus-Thermus	0.878	0.127	0.105
Actinobacteria	0.329	< 0.05	< 0.05
Firmicutes	< 0.005	< 0.005	0.774
Verrucomicrobia	< 0.05	< 0.05	0.267
Cyanobacteria	0.418	< 0.0005	0.995
Chloroflexi	0.467	< 0.005	0.182

Table S6: *P*-value results of Scheirer-Ray-Hare test on the effect of factor site, substrata for relative abundances of relative abundances of each eukaryotic phylum. Significant *P*-values < 0.05 are marked in bold.

Factors Descriptors	Site	Substrata	Site x Substrata
Ciliophora	< 0.0005	0.082	0.895
Ascomycota	< 0.005	< 0.05	0.396
Chytridiomycota	< 0.005	< 0.05	0.761
Peronosporomycetes	0.790	< 0.05	0.367
Chlorophyta_ph	< 0.05	< 0.05	0.187
Ochrophyta	0.305	< 0.0005	0.739
Cercozoa	< 0.005	0.796	0.111
Euglenozoa	< 0.005	0.617	0.559
Rotifera	< 0.005	0.063	0.647
Unclassified	0.258	0.386	< 0.05

***IMPACT – “ASSESSING THE EFFECTS OF PLASTICS
CONTAMINATION ON THE STRUCTURE AND FUNCTION
OF STREAM MICROBIAL COMMUNITIES”***

Laffet, Lucie, Anna M. Romani, and Joan Artigas. (*in prep.*) “Assessing the Effects of Plastics Contamination on the Structure and Function of Stream Microbial Communities.”

Assessing the effects of plastics contamination on the structure and function of stream microbial communities

Lucie Laffet¹, Anna M. Romani², Joan Artigas¹

¹ Université Clermont Auvergne, CNRS UMR 6023, Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement, Aubière, 63178, France

² University of Girona, Institute of Aquatic Ecology, Girona 17003, Spain

I) Abstract

Plastics (non-biodegradable and biodegradable; each covering 60 % of the benthic surface area), on the functioning and biomass of natural benthic microbial communities (sediments, rocks and leaves) in stream microcosms. We measured microbial extracellular enzyme activities (β -D-glucosidase: GLU; N-acetyl-glucosaminidase: NAG; phosphatase: PHO), estimated the biomasses of bacteria, fungi and algae as well as their diversity in each substratum to determine the impact of plastics addition to: i) the surrounding natural substrata (substratum scale study) and ii) the overall benthos (microcosm scale study).

The results at the substratum scale showed that the addition of non-biodegradable plastic increased GLU activity, Log(GLU):Log(NAG) and Log(GLU):Log(PHO) enzyme activity ratios and decreased the alpha-diversity of the bacterial community in rocks, while the addition of biodegradable plastic reduced fungal density and alpha-diversity also in rock microbial communities. No effect of plastics addition was observed in microbial descriptors measured in sediment communities. At the microcosm scale, the presence of biodegradable plastic decreased the global GLU in the benthos whereas the presence of the two plastics decreased global NAG and PHO activities and fungal and algal biomass in the benthos. Surprisingly, the effects of plastics were overridden by the addition of leaves at both the substrata and microcosm scales of study.

This study highlights the contrasting effect of plastics depending the scale of the study (substratum *versus* microcosm) since most of the effects were detected when analysing the

effects of plastic addition at the microcosm scale. When replacing 60 % of natural substrata benthic surface (sediments or rocks) by plastics, a decrease in dissolved organic carbon, nitrogen and phosphorus acquisition activities was observed probably explained by the lower fungal and algal biomass colonisation in plastics compared to natural substrata. Indeed, the upscaling of plastic effects from the substrata scale to the microcosm scale (*i. e.* multiplying by the benthic surface area occupied by the different substrata) enabled us to get closer to the response of aquatic microbial communities in plastic-contaminated ecosystems.

Keyword: plastic pollution; microbial communities; extracellular enzyme activities; stream microcosms; upscaling

II) Introduction

Rivers and streams are of the utmost socio-ecological relevance because they represent an important resource for drinking water, serve as waterways for goods and people transport, provide habitats for aquatic organisms, and contribute to biogeochemical processes (Raymond *et al.* 2013; Butman *et al.* 2016). Moreover, these aquatic ecosystems are important in terms of surface area occupied in the continents. Allen and Pavelsky (2018), estimated the total land area of rivers and streams to be $773\,000 \pm 79\,000$ square kilometers.

River ecosystems provide multiple habitats for life, especially for microorganisms. These aquatic ecosystems contain a great richness of microorganisms, most of which live attached to supports (*i.e.* rocks, cobbles, sediment, leaves) forming biofilms. In biofilms, microorganisms may establish complex microbial interactions that can influence major ecosystem functions such as the organic matter decomposition (Battin *et al.* 2016). The dissolved organic matter is decomposed thanks to the activity of extracellular enzymes secreted by microorganisms. Indeed, biofilms are powerhouses of extracellular enzyme activity especially in young biofilms and are maintained thereafter (Romaní *et al.* 2008).

The production of extracellular enzymes allows bacteria and fungi to acquire essential carbon and nutrient resources for their growth and reproduction (Artigas *et al.* 2009). Beyond acquiring nutrients for their own growth, biofilm microorganisms produce extracellular enzymes that contribute to nutrient cycling and resource utilization in the aquatic ecosystem.

More specifically, extracellular enzymes can break down complex organic compounds into simpler forms that can be directly absorbed by the microbial cells. For example, some microorganisms can break down cellobiose from cellulose chains with the β -glucosidase enzyme (Berlemont and Martiny 2013) to obtain glucose. The N-acetyl-glucosaminidase enzyme is used to break the complexes of the chitin to N-acetylglucosamine monomer (Gooday 1990; Kaur and Dhillon 2013). The phosphatase enzyme is used to hydrolyze the inorganic phosphorus from phospholipids and phosphate esters present in the organic matter (Karl 2000; M. Sebastian and Ammerman 2011; Sebastian and Ammerman 2009; Torriani 1960). These three enzymes are produced to target the principal reservoirs of C, N and P nutrient from complex organic matter polymers and acquire energy and resources for microbial growth (Chróst and Siuda 2002).

Plastic pollution is present in all ecosystems including freshwater ecosystems, in particular rivers. Rivers are referred to as hotspots of plastic pollution (Jambeck *et al.* 2015; Horton and Dixon 2017; Windsor *et al.* 2019) since they are considered to be both sources and sinks of plastic pollution, but also transport pathways between the terrestrial and the marine ecosystems. Rivers are conduits connecting terrestrial, freshwater, transitional and marine systems, providing an important long-range transport pathway as well as storage opportunities for the plastics (Horton and Dixon 2017). Lebreton *et al.* (2017) estimated that between 1.15 and 2.41 million tons of plastic waste entering the ocean comes from rivers. A study on macroplastic pollution in 24 rivers in seven countries around the world concluded that plastic pollution was lower in European (average 2.5×10^2 items $\text{h}^{-1} \text{month}^{-1}$) than in Asian rivers (7.1×10^3 items $\text{h}^{-1} \text{month}^{-1}$) (van Calcar and van Emmerik 2019). A study in the estuary of a Vietnamese river running through a megalopolis revealed that among the natural river debris, plastics represented an average of 26% of the total weight of the debris (Lahens *et al.* 2018). Within plastic debris, 37% were represented by bags, 9-22% by polystyrene food packaging, and the rest was largely represented by bottles (Lahens *et al.* 2018). In an English estuary, the majority of plastic debris collected consisted of microplastics, accounting for 65% of the total debris, while macroplastics constituted a smaller proportion. Most of the macroplastics found were plastics of low density while microplastic debris were of higher density (Browne, Galloway and Thompson 2010). Among the macroplastics collected, Browne, Galloway, and Thompson (2010) categorized them in 32% polyethylene, 28% polypropylene, and 23% polystyrene. A citizen science study collected a total of 5955 items, of which 30.5% corresponded to plastics, in the riversides over 250 sampling sites along several large and small rivers between Autumn 2016 and Spring 2017 in Germany (Kiessling *et al.* 2019). More

specifically, Vriend *et al.* (2020) measured a total of 508 items being collected in the shoreline of the Rhine river (Germany) with an average transport of 5.8 kg of plastic per day and 10-75 macroplastic items per hour transported by a Rhine tributary. Lechner *et al.* (2014) observed that 86% of debris collected in the Austrian Danube over two years, from 2010 to 2012 corresponded to plastics (*i. e.* 316.8 ± 4664.6 items per 1000 m³).

The most abundant and frequent plastics found in rivers are "non-biodegradable" plastics, because global production of this type of plastic started decades ago (in the 1950s) and has increased over the years to reach about 8300 million tons worldwide in 2017 (Geyer, Jambeck and Law 2017). In 2019, the global plastic production reached 368 million metric tons (PMERG 2019). The types of plastics most commonly found in river ecosystems, including nanoplastics (<0.1 µm), microplastics (0.1 µm - 5 mm), mesoplastics (5 mm - 5 cm), and macroplastics (>5 cm) (van Emmerik and Schwarz 2019), comprise high and low-density polyethylene, polystyrene, polypropylene, polyamide, polyvinyl chloride, and polyester (Browne, Galloway and Thompson 2010; Klein, Worch and Knepper 2015; Blettler *et al.* 2019; van Calcar and van Emmerik 2019). In contrast to the non-biodegradable plastics, the global production of bio-based and biodegradable plastics was 2 million tons in 2017 and 2.4 million tons in 2022 (European Bioplastics 2017) and is estimated to be 7.6 million tons in 2026 (European Bioplastics and Nova-Institute 2021). Indeed, the production of biodegradable plastics made from biosourced materials tends to increase with the aim to reduce the environmental impact of traditional plastics. Given that biodegradable plastics are in expansion and are not yet produced in the same quantities as non-biodegradable plastic, they are less accumulated in the environment. Moreover, the biodegradable plastics decompose faster in the environment than non-biodegradable plastics. In order to meet certain principles of circular economy (Keiser and Tortora 2022), biodegradable plastics are designed to decompose fast in the environment because they can be converted into CO₂ by the microbial action, thereby reducing the accumulation of plastic pollution in the environment (Flury and Narayan 2021).

Once in the aquatic environment, plastics are colonized by microbial biofilms. The concept of a plastisphere has been developed as an assembly of microbial communities, similar to biofilms, developing on plastic (Zettler, Mincer and Amaral-Zettler 2013; Amaral-Zettler, Zettler and Mincer 2020) showing the potential of plastic debris as a substratum for microbial colonization. This concept was first developed for the marine environment but some studies have more recently extended the plastisphere concept to freshwaters, including rivers. Most studies around the plastisphere, including marine and freshwater environments, have focused on the colonization of plastics of small size such as microplastics (Andrady 2011; Cole *et al.*

2011; Harrison, Sapp and Osborn 2011; McCormick *et al.* 2016; Miao *et al.* 2019c; Li *et al.* 2021; Merbt *et al.* 2022) and less on macroplastics. In addition, a recent study has demonstrated that the microbial colonization of plastics (low-density polyethylene and starch-based biodegradable plastic) was similar to that of rocks and different compared to that of leaves and sediments in a French river (Laffet *et al.* 2023). Moreover, a higher bacterial density and enzyme activity was measured on the biodegradable plastic than on the non-biodegradable (Laffet *et al.* 2023).

The microbiota formed on the plastic may be different from that of the surrounding water (Li *et al.* 2021). For instance, the biomass and alpha diversity of river and lake microbial communities differ between rocky biofilms and biofilms formed on macro- or microplastic of Polyvinyl Chloride (PVC), Polyethylene (PE) and Polyethylene Terephthalate (PET) (Miao *et al.* 2020, 2021). It has also been reported that eukaryotic alpha diversity and its relative abundance in river biofilms were affected by exposure to polystyrene micro- and nano-beads (Holzer *et al.* 2022; Merbt *et al.* 2022). Plastics can select the colonization of certain microorganisms due to the chemical additives incorporated during their manufacture or other chemical molecules transported by the water and adsorbed onto their surface (Hahladakis *et al.* 2018). From a functional point of view, few studies have investigated the functional diversity and metabolic capacity of the plastisphere. One of the first studies show higher metabolic activity in terms of oxygen production, respiration, nitrogen fixation and the production of enzymes involved in the use of phosphonates in marine plastics compared to the surrounding water (Bryant *et al.* 2016). More recently, (Li *et al.* 2021) showed differences in carbon, nitrogen, sulphur cycling and pathogenicity functions between the plastisphere and microbial communities in the surrounding water, and those differences were more marked in freshwaters than in marine waters and so found that these functional differences were not always the same between environments. This underlines that plastics have environment-specific functional impacts.

Macroplastics can behave in the same manner than leaves that fall into the river. While leaves are rich in carbon and serve as a preferred substrate for fungi and bacteria (Romaní *et al.* 2006; Rossi, Artigas and Mallet 2017; Rossi *et al.* 2019), little is known about macroplastics role and how do they interact with microbial communities in leaves, sediments and/or rocks. Consequently, the aims of this study were to assess the impact of plastic pollution on natural biofilm communities on rocks and sediments, and determine whether this impact is modulated by the presence of leaves. We tested the impact of low-density polyethylene (LDPE), a so-called "non-biodegradable" plastic that is frequently used in the manufacture of plastic bags,

and Biodegradable Biobased Plastic (BDBP) a so called “biodegradable” plastic based on potato starch and copolymers, which is much less studied because it is less common in the environment, but its production is increasing every year. We evaluate the impact of these two plastics under controlled conditions in laboratory microcosms. Specifically, the channels surface was filled with 50% sediment + 50% rocks (Condition 1), further covered with non-biodegradable plastic (60% surface, Condition 2) or with biodegradable plastic (60% surface, Condition 3). The same conditions were supplemented with leaves of *Alnus glutinosa* thus generating conditions 4, 5 and 6. Using these conditions, we assessed the impact of plastics on the functions (β -D-glucosidase (GLU), N-acetyl-glucosaminidase (NAG), Phosphatase (PHO) enzyme activities), and on the structure with density (bacteria, fungi and algae) and diversity (prokaryotes and eukaryotes) of microbial communities in rocks and sediment, in the presence and in the absence of leaves. Afterwards, we upscaled the density and activity of microbial communities in the different substrata up to the microcosm scale to determine whether the presence of plastics increased/decreased the overall biomass and activity of microorganisms in the whole microcosm benthos.

Our first hypothesis is that the addition of biodegradable plastic could indirectly stimulate the enzymatic activity and biomass accumulation in sediments and rocks. Thus, the release of long-chain starch molecules from biodegradable plastic into the water column could serve as organic carbon source for rock and sediment microbial communities and change the diversity of these communities. We expect that the microbial community developed at the plastics may influence the community at the rocks and sediment. This influence would be due to a difference in microbial community composition between natural substrata and plastic substrata as previously reported by (McCormick *et al.* 2016; Miao *et al.* 2019c, 2021). Our second hypothesis is that the addition of both types of plastics in the microcosm surface would decrease the microbial biomass and activity in the whole microcosm. This hypothesis is based on the upscaling method applied to this study in which replacing natural colonization substrata (sediments and rocks) by synthetic surfaces (plastics) in the microcosm will result in less efficient microbial colonization on plastic substrata compared to natural substrata, as demonstrated in our previous research (Laffet *et al.* 2023). Finally, we expect that the addition of leaves could compensate for plastic effects on sediment and rock communities and increase global microbial biomass and activity in the whole microcosm. Leaves could mitigate the effect of plastic by providing a surface

easily colonized by microorganisms, in particular bacteria and fungi, and an important source of organic matter (Romani *et al.* 2006).

III) Materials and methods

III.1) Experimental design

Eighteen microcosms corresponding to 6 experimental conditions in triplicate were set up in a laboratory room (Figure S1). The room was controlled at a constant temperature (20°C) and light regime. Automatic timers were placed above the microcosms to reproduce the day/night cycle of the period in which the experiment was run (end-autumn 2021); simulating sunrise at 8:30 AM and sunset at 5:30 PM. Each microcosm consisted of an artificial channel of 691 mm long and 105 mm wide in surface and a water depth of 30 mm. Each microcosm was connected to 15 L aquaria with an aquarium pump allowing a continuous recirculation of water flow. The water used to fill the microcosms was composed of 50 % Artière river water (taken from the same site of substrata colonization) and 50 % tap water filtered through a BRITA® P1000 cartridge (retains chlorine and particles > 0.5 µm). During the acclimation period (10 days which allowed the microorganisms to adapt to laboratory conditions including a temperature change of 20°C compared to the lower outside temperature at this time of year), as well as the period of the experiment, the water was replaced twice per week in order to renew the organic matter, nutrients and oxygen in the whole microcosm. Pendant la période l'acclimatation (d'environ 10 jours qui a permis aux microorganismes de s'adapter aux conditions de laboratoire avec notamment un changement de température de 20°C par rapport à la température extérieur plus basse à cette période de l'année), ainsi que la période de l'expérience.

The substrata (sediments, rocks, non-biodegradable plastic, biodegradable plastic and *Alnus glutinosa* leaves) used to fill the microcosms were colonized in the Artière river located in the Auvergne Rhône-Alpes region in France in Aulnat (45°47'44.7"N 3°10'26.8"E) for three weeks. The day when the substrata were deployed for colonization, the Artière river water was characterized by a pH of 7.17 ± 0.01 , conductivity of $723.80 \pm 64.16 \mu\text{S cm}^{-1}$, temperature of $13.6 \pm 0.9 \text{ }^\circ\text{C}$, $7.78 \pm 0.46 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$, $11.88 \pm 1.17 \text{ mg dissolved organic carbon L}^{-1}$, and 4.29

± 0.2 mg dissolved nitrogen L⁻¹. In the riverbed, the relative percentage of covering of sediments and rocks were approximately 58 ± 1.67 % and 42 ± 1.67 % respectively. This site was chosen for substrata colonization because it was heavily polluted by macroplastics due to its geographical situation; located around 700 meters downstream from a wastewater treatment plant.

The colonized substrata were transported to the laboratory in ice boxes and used to fill the bottom surface of the microcosms. In the laboratory, the substrata were immediately installed into the channel area corresponding to the exclusion zone of turbulence caused by the water inflow (upstream of channel) and the water stagnation caused by the water outflow (downstream of channel) (Figure S2). The percentage of surface areas represents the area occupied by the substrate in the surface area of the channel. Specifically, the bottom surface of the microcosm was filled with 50% sediment + 50% rocks (Condition 1, Control, C treatment), and further covered with non-biodegradable plastic (60% surface, Condition 2, NB treatment) or with biodegradable plastic (60% surface, Condition 3, B treatment) (Figure S1). The same conditions were supplemented with leaves of *Alnus glutinosa* thus generating conditions 4, 5 and 6 (C+L, NB+L, B+L treatments).

The plastic substrata were chosen according to their differences in biodegradability: there was LDPE (Low Density Polyethylene) of chemical composition (C₂H₄)_n strongly represented in the plastic industry and frequently found as a plastic pollutant in ecosystems, and BDBP (Biodegradable Biobased Plastic) manufactured with 30% potato starch in application of the French law of energy transition and according to the standard ISO 16620-2: 2015 and which is commonly used as a compostable bag. The remaining 70% of the biodegradable plastic was composed of unknown copolymers and copolyester. Time sequence: (a) We had put to colonized the substrata in the Artière river for three weeks (time to obtain mature biofilms) during the period of November – December. The sediments were those of the river, the proxy of rocks corresponded to 220 frosted glass slides measuring 8.3 x 2.8 cm glued to concrete slabs and placed in the river water. The dried % *Alnus glutinosa* leaves were rehydrated and placed in 17 large mesh nylon bags of 1 cm² (5 leaves per bag). The LDPE plastic was collected from eppendorf bags and the BDBP plastic was collected from a supermarket shopping bag. The nylon bags and both types of plastic (large strips of approximately 30 cm x 20 cm) were attached

to metal stakes so that they could be immersed in the river bed at the site. The sampling was done in early December and was done in such a way as not to damage the biofilm on the surface of the different substrata, which were transported to the laboratory in ice boxes. (b) We placed the different substrata in the microcosms and we allowed the microbial biofilms to acclimatize for 10 days to laboratory conditions, with the water that we provided to them and the temperature which was 20 °C in the laboratory compared to laboratory temperatures variants and lower outside, at this time of year (November - December). (c) We then took samples of the different substrates for analysis.

Samples of the different substrata (sediments, rocks, leaves, LDPE and BDBP) were collected from each microcosm for the measurement of extracellular enzymatic activities, and microbial biomass and diversity. The leaves were sampled using a punch tool to obtain discs of 1 cm in diameter (disc surface: 0.7854 cm²) and plastic substrata were sampled by cutting directly pieces of 1 cm² with a sterile scalpel. The sediments were cored with an uncapped syringe (syringe surface: 1.13 cm², and 0.5 cm deep. And finally, the biofilms on the glass slides (proxy of the rock substrata) were scraped with sterile scalpels (glass slide surface: 23.24 cm²). Samples for analysis of enzyme activities were preserved in Ringer's solution, samples used to determine fungal and algal biomass, or microbial diversity were immediately frozen (-20 °C), and samples used to determine bacterial density were fixed with 37 % formaldehyde (2% final concentration). Extracellular enzyme activities were analyzed immediately after substrata collection.

III.2) Water physical and chemical characteristics

Water samples were taken from each microcosm at the start of the manipulation (after 10 days of acclimation). pH was measured with SevenCompact pH meter 220 (Mettler Toledo, Switzerland). Temperature, conductivity and dissolved oxygen concentration was measured with the ProODO YSI probe (USA). Water samples taken for nutrient concentration analyses were pre-filtered by 0.45 µm pore size. The dissolved organic carbon (DOC), the total dissolved carbon (TDC), and the total dissolved nitrogen (TDN) concentrations were measured using the Total Organic Carbon analyzer (TOC-V_{CPH}, Shimadzu, Japan). The phosphate concentrations

were measured photometrically using the Phosphate assay kit Supelco[®] Sigma-Aldrich. Physical and chemical measurements were performed in each microcosm and mean \pm standard error calculations were performed per experimental condition.

III.3) Nutrient uptake

Carbon, nitrogen and phosphorus uptake capacity was measured after spiking a nutrient-enriched solution to each microcosm as described in Proia, Romaní, and Sabater (2017) and monitoring the decay concentration through time for 10 minutes. Uptake measurements were performed after the sampling of the different substrata to avoid any interference on the enzyme activity measurements. 71.23% of the rocks, 3.44% of the leaves, and 5.25% of the plastics, equivalent to the total surface area of the canal, were previously sampled for enzymatic activity, biomass, and diversity analyses. The basal carbon, nitrogen and phosphorus concentrations in water from the microcosms were previously determined in triplicate. The nutrient-enriched solution spiked multiplied by four times the basal nutrient concentrations measured (Proia, Romaní and Sabater 2017). One single nutrient solution, containing carbon, nitrogen and phosphorus, was prepared using glucose, NaNO₃ and KH₂PO₄.

The experiment started with the spiking of a 40 ml nutrient-enriched solution at the top of the channel (before the substrata). After that, a total of 30 water samples were taken at the bottom of channel (after the substrata) every 15 seconds for 5 minutes and then every 30 seconds for 5 minutes (Álvarez *et al.* 2010). Water samples were filtered by 0.2 μ m and stored at -20 °C until analysis. Glucose concentration was measured with the Glucose Assay Kit MAK263 (Sigma-Aldrich), phosphate concentration was measured using the Phosphate Assay Kit Supelco[®] (Sigma-Aldrich), and nitrate concentration measured using nitrate kit Spectroquant[®] (Sigma-Aldrich). Results were expressed as ng of carbon, nitrogen, phosphorus uptake per second and square centimeter of substrata surface in the microcosm.

III.4) Extracellular Enzyme Activities measurements

In order to assess the acquisition capacity of carbon, nitrogen and phosphorus by the biofilm, three extracellular enzyme activities were measured on each substratum (sediments, rocks, leaves and the two plastics). These activities were β -D-glucosidase

(EC 3.2.1.21) (GLU), N-acetyl-glucosaminidase (EC 3.2.1.14) (NAG) and phosphatase (EC 3.1.3.1-2) (PHO), involved in carbon, nitrogen and phosphorus acquisition, respectively. Each substrata sample was placed in an Eppendorf filled with 800 μL Ringer solution (6.5 g L^{-1} NaCl, 0.12 g L^{-1} CaCl_2 , 0.14 g L^{-1} KCl) and supplemented with 80 μL of enzyme substrate 4-Methylumbelliferyl- β -D-glucopyranoside (GLU), 4-Methylumbelliferyl-N-acetyl- β -D-glucosaminide (NAG) and 4-Methylumbelliferyl-phosphate (PHO) (Sigma-Aldrich) at substrate saturation concentrations (0.3 mM) as reported by (Sabater and Romani 1996; Romani *et al.* 2006; Artigas *et al.* 2012a; Joly, Mallet and Artigas 2019).

Samples were incubated under gently continuous agitation (100 rpm) in the dark for 1 h at 20 °C. After incubation, the enzymatic reaction was stopped by adding glycine buffer solution (0.05 M, pH 10.4 composed of 6.428 g L^{-1} NaOH and 14.742 g L^{-1} Glycine). Enzyme activities were determined by fluorescence measurements based on MUF-substrates transformation using a spectrofluorimeter (Fluoroskan Ascent FL, ThermoFisher Scientific, USA), $\lambda_{\text{excitation}} = 355 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emission}} = 460 \text{ nm}$. Fluorescence measurements were made in duplicate per sample and an average value was reported to calculate activity. Results were expressed as nmol MUF per cm^2 per h^{-1} .

III.5) Microbial density measurements

Similar to extracellular enzyme activities measurements, microbial densities were measured on all substratum and in triplicate per experimental condition.

Bacterial densities were determined by flow cytometry counts (Borrel *et al.* 2012). The samples were sonicated at power 35, 37 Hz for 90 seconds + 1 minute rest + 90 seconds in a sonication bath (Elma, Germany) to detach the microbial cells from the substrata. The bacterial suspension was then centrifuged (1 minute at 800g) to collect detached bacteria from the supernatant. All supernatants were supplemented with TE + sodium pyrophosphate buffer (Tris-EDTA buffer pH 7.2, Tris 10 mM, EDTA 1 mM, sodium pyrophosphate 10 Mm) in order to favor cells disaggregation prior to cytometry analyses. Samples were stained with 2.5 μL of SYBR Green I (100X), a molecular probe binding to nucleic acids, for 15 minutes in the dark. Cells were counted with the BD FACS Calibur flow cytometer (15 mW at 488 nm, Becton Dickinson, USA). The results were expressed as number of cells per cm^2 of substrata for each condition.

Fungal densities were estimated by the quantification of the number of 18S rRNA gene copies in each substratum and condition through quantitative PCR (qPCR) analysis. DNA from each sample was extracted with the FastDNATM SPIN for Soil kit following the manufacturers instructions (MP BiomedicalTM, Irvine, CA). qPCR was performed using primer sets FR1 and FF390 (5'-AICCATTCAATCGGTAIT-3' and 5'-CGATAACGAACGAGACCT-3', respectively) targeting a small subunit (SSU) 18S rRNA gene near the ITS1 region as described by (Prévost-Bouré *et al.* 2011). Reactions were performed in 12.5 µL final volume with 6.25 µL of Master Mix (SYBR® assay (Eurogenetec)), 0.5 µL of each primer (at 10 pmol/µL), 5.88 µL of BSA (50 mg/mL) and 2.5 µL of extracted DNA samples. The qPCR runs were performed with the BioRad CFX96TM Real-Time System (Bio-Rad laboratories, Inc., Hercules). The machine was set up to cycle as follows: five minutes of denaturation at 95°C, followed by 40 cycles of 45 seconds of denaturation at 95°C, 45 seconds of annealing and 70 seconds of extension at 72°C. The final phase of the qPCR was completed with a melting curve from 70°C to 95°C. Results were expressed as 18S DNA copies per cm² per substratum.

Algal biomass was estimated by measuring chlorophyll-*a* concentration on the different substratum and condition, excepting leaves. To extract chlorophyll-*a*, samples were thawed and then centrifuged at 4700 rpm at 6 °C for 5 minutes to remove debris. The supernatant was discarded and 4 ml of 90 % acetone were added to the pellet. The whole was vortexed for 5 seconds and incubated overnight at 4°C at 100 rpm. To improve the complete chlorophyll-*a* extraction, the samples were sonicated at 37 kHz for 4 minutes in an ultrasonic bath (Fisher Scientific FB15048, f: 50/60 Hz). After sonication, the samples were filtered 0.45 µm and optical densities measured spectrophotometrically (Thermo Fisher Scientific, Genesys 30, USA) at $\lambda = 750, 665$ and 430 nm (Jeffrey and Humphrey 1975). The chlorophyll-*a* concentration was expressed as µg of chlorophyll-*a* per cm².

III.6) Microbial diversity

The DNA was extracted from each substrata using the FastDNATM SPIN for Soil kit following the manufacturer's instructions (MP BiomedicalTM, Irvine, CA). After that, the DNA concentration was determined using the Thermo Scientific NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, U.S.A) and the quality of DNA verified after migration on a 1% agarose gel. The prokaryotic

(bacteria) and eukaryotic (fungi) diversity of biofilms from each substratum and condition was analyzed by Illumina MiSeq 2 x 250 base pair sequencing. The sequencing was performed by the Keck center for comparative and functional genomics at the University of Illinois (U.S.A). The primers used for the sequencing of prokaryotes corresponded to the V4 region (revised by the earth microbiome *consortium*) and were the 515F: 5'-GTGYCAGCMGCCGCGGTAA-3' and 806R: 5'-GGACTACNVGGGTWTCTAAT-3' (Caporaso *et al.* 2011). The primers used for fungi sequencing corresponded to the ITS3-4 region and were the ITS3F: 5'-GCATCGATGAAGAACGCAGC-3' and ITS4R: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' (Op De Beeck *et al.* 2014). The sequencing analysis generated a total of 2,572,175 reads (bacteria) and 881,327 reads (fungi) that were processed with the DADA2 pipeline (Callahan *et al.* 2016). After normalization, we processed our data with 17,168 reads for bacteria and 3,478 reads for fungi. The raw sequences data have been deposited in NCBI under the BioProject accession number PRJNA1020795.

III.7) Data analyses

We calculated extracellular enzyme activities (GLU, NAG and PHO) and biomass (bacteria, fungi and algae) per cm² of each substratum (substratum scale study) as well as per cm² of the whole microcosm (microcosm scale study). Calculations at the microcosm scale were made by multiplying enzyme activities or microbial biomass per cm² of substratum by their corresponding surface area occupied in the microcosm. The corrected activities and biomasses of the different substrata were added and divided by the surface of the microcosm i.e. the colonizable surface microcosm area, 456.75 cm² (excluding the surface overlapped between substrata).

The effects of adding the specific plastic, and/or leaves and their interaction were analyzed on water physico-chemistry, nutrient uptake, enzyme activities, and microbial biomass variables through a two-way ANOVA ($P < 0.05$). When a significant interaction was detected, plastic effect was analyzed separately for the conditions with leaves and without leaves (two separated one-way ANOVAs ($P < 0.05$)). When the plastic effect was significant, a pairwise comparison test (Tukey post-hoc, $P < 0.05$) was applied to see differences between the control and non-biodegradable plastic or biodegradable plastic conditions. For the enzyme activities and

microbial biomass measured in leaves and plastics specific one-way ANOVA ($P < 0.05$) analyses were performed to test the plastic effect on leaves and to test the leaves effect on plastic. Before carrying out the statistical analysis, we checked the normality of the data (Shapiro-Wilk test) and their homoscedasticity (Bartlett test).

Amplicon sequence variants (ASVs) obtained for bacteria and fungi were used to calculate Chao1 and Shannon diversity indexes (alpha-diversity), whereas the same ASVs were used to compare microbial community composition using non-metric multidimensional scaling (NMDS) analysis based on a Bray Curtis distance matrix. Moreover, the relative abundance of bacterial and fungal phyla for five substrata and for each condition were analysed with the R package Phyloseq v1.42 according to McMurdie and Holmes (2013). The differences of Chao1 and Shannon indexes for each substratum separately and among conditions were tested by an on-way ANOVA. The effect of plastic, leaves and their interaction on alpha-diversity indexes and relative abundances were analysed through two-way ANOVA and the effects on community composition were analysed using PERMANOVA analysis (9999 permutations). The RStudio (R Core Team (2021) version 4.0.5) was used to run DADA2 processing on ASVs, NMDS, alpha-diversity indexes calculations and ANOVA and PERMANOVA analyses.

IV) Results

IV.1) Water physicochemical characteristics

The water physicochemical conditions were similar among microcosms (Table 1); while few parameters were affected by the treatments (Table 2.A). Specifically, an impact of presence of plastic was detected on pH, DOC, and TDC (Table 2.A). An impact of leaves was detected on pH, with a slightly more alkaline pH in the presence of leaves compared to without leaves; the pH was slightly higher in the presence of plastics compared to controls, while DOC and TDC were slightly lower in the presence of plastic compared to controls (Tables 1 and 2). Finally, there was a slightly lower temperature in the presence of leaves (Tables 1 and 2).

Table 1: Water physicochemical parameters in the microcosms. Average values (N = 3) ± SE of pH, conductivity, temperature, concentration of dissolved oxygen, Dissolved Organic Carbon (DOC), Total Inorganic Carbon (TIC), Total Dissolved Carbon (TDC), Total Dissolved Nitrogen (TDN) and phosphate (P-PO₄³⁻) are represented.

Conditions	C	NB	B	C+L	NB+L	B+L
Physicochemical parameters						
pH	7.18 ± 0.18	7.41 ± 0.21	7.72 ± 0.09	7.66 ± 0.08	7.91 ± 0.08	7.95 ± 0.07
Conductivity (µS cm⁻¹)	625 ± 6.2	625 ± 6.2	630.3 ± 3	639 ± 10.6	639 ± 7.8	625.5 ± 6.3
Temperature (°C)	19.4 ± 0.07	19.4 ± 0	19.6 ± 0.1	19.2 ± 0.1	19.2 ± 0.03	18.9 ± 0.03
Dissolved oxygen (mg L⁻¹)	7.54 ± 0.3	7.59 ± 0.2	7.49 ± 0.3	6.98 ± 0.5	7.44 ± 0.4	7.32 ± 0.2
DOC (mg L⁻¹)	12 ± 0.3	11.11 ± 0.3	11.5 ± 0.7	11.95 ± 0.4	11.35 ± 0.1	10.26 ± 0.4
TIC (mg L⁻¹)	38.52 ± 0.3	38.1 ± 0.2	38.46 ± 0.2	38.8 ± 0.2	38.7 ± 0.3	38 ± 0.1
TDC (mg L⁻¹)	50.52 ± 0.5	49.21 ± 0.5	49.96 ± 0.9	50.75 ± 0.7	50.01 ± 0.4	48.29 ± 0.4
TDN (mg L⁻¹)	0.63 ± 0.02	0.58 ± 0.03	0.74 ± 0.08	0.77 ± 0.1	0.61 ± 0.03	0.79 ± 0.1
P-PO₄³⁻ (mg L⁻¹)	0.12 ± 0.06	0.10 ± 0.04	0.09 ± 0.03	0.06 ± 0.03	0.06 ± 0.01	0.10 ± 0.03

IV.2) Extracellular Enzyme Activities for sediments and rocks

The three enzyme activities (GLU, NAG, PHO) measured on the sediments and rocks substrata were neither affected by the presence of plastics nor by the presence of leaves (Figure 1, Table 2.A). However, a weak significant interaction between plastic x leaves ($P = 0.052$) on the GLU activity of rocks was observed (Table 2.A). When analyzed separately with and without leaves, a significantly higher GLU on rocks in the presence of non-biodegradable plastic than in the presence of biodegradable plastic and control was observed only when leaves were absent (Table 2.B, Figure 1B). Effect of non-biodegradable plastic was observed when leaves were absent but not when leaves were present (Figure 1B).

The interaction effect of plastic x leaves was also observed for the Log(GLU):Log(NAG) and Log(GLU):Log(PHO) ratios calculated on the rocks substratum (Figure S3, Table 2.A). As similarly observed for GLU, the two enzyme ratios were higher on rocks in the presence of non-biodegradable plastic than in presence of biodegradable plastic or control only when leaves were absent (Table 2.B, Figure S3.B.D). In addition, the Log(GLU):Log(NAG) and Log(GLU):Log(PHO) ratios on the rocks were > 1 (1.28) and similar to 1 (1.05) in average, respectively for the condition in presence of non-biodegradable plastic. Again, this effect of non-biodegradable plastic on enzyme ratios was not observed in the presence of leaves or in the

sediments (Figure S3). Extracellular enzymes and enzyme ratios in the sediments were not affected by plastic and/or leaves addition (Table 2.A, Figure 1, Figure S3).

When considering the enzyme activities measured for all substrata (including leaves and plastics), the three enzyme activities were higher in sediments, followed by leaves and rocks, while activities measured in the two plastics were lower compared to those measured in natural substrata (Figure 1, Figure S4). The three enzyme activities measured in leaves were not affected by the presence of plastics (Table S1, Figure S4.D.E.F and S4.G.H.I).

GLU activity values measured in the non-biodegradable plastic tended to be lower compared to those measured in the biodegradable plastic, but no statistical differences were observed (P -value = 0.151, Figure S4). The NAG and PHO activities were significantly lower in non-biodegradable plastic than in the biodegradable plastic (P -value < 0.05 for both), (Figure S4).

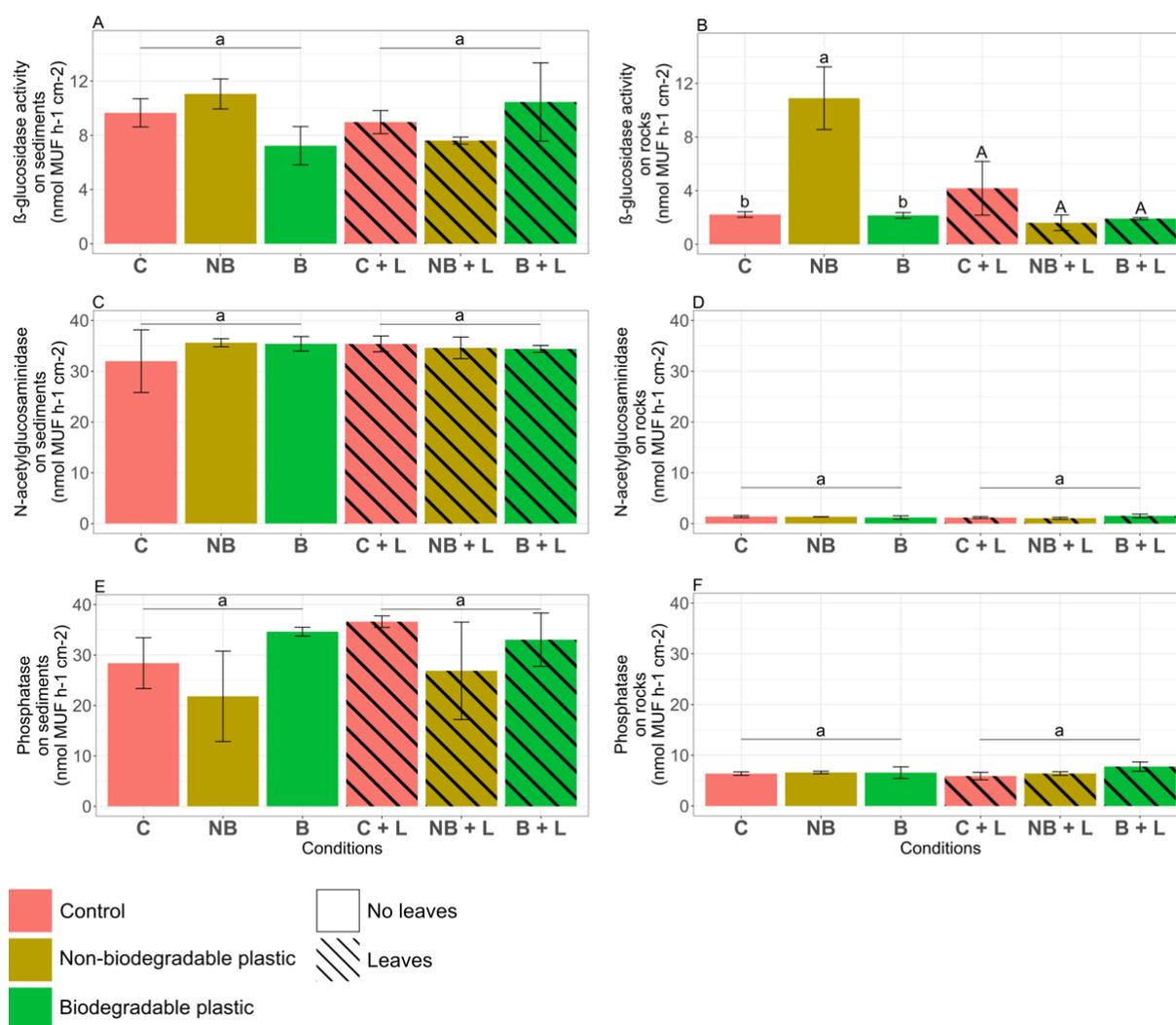


Figure 1: Extracellular enzymatic activities on biofilms of sediments and of rocks. β -D-glucosidase (A, B); N-acetyl-glucosaminidase (C, D) and phosphatase (E, F). Sediments (A, C, E) and rocks (B, D, F). Values are means ($n = 6$) \pm SE per conditions. Two-way Anova test factors plastic, leaves and plastic \times leaves. The effect of leaves is represented by horizontal bars surmounted by letters indicating the difference between the groups leaves and non-leaves. In the case of plastic \times leaves interaction effect is detected, a one-way Anova testing the effect of factor plastic followed by a Tukey test is performed for the groups leaves and non-leaves separately. Lowercase letters indicate differences between the three conditions within the no-leaf group ($a > b$). Capital letters indicate differences between the three conditions within the leaf group ($A > B$).

Table 2.A: Two-way ANOVA test on the effect of factors plastic, leaves and interaction plastic x leaves on physicochemical parameters (conductivity, temperature, concentration of dissolved oxygen, Dissolved Organic Carbon (DOC), Total Inorganic Carbon (TIC), Total Dissolved Carbon (TDC), Total Dissolved Nitrogen (TDN) and phosphate (P-PO₄³⁻)), extracellular enzymatic activities and enzyme ratios and microbial densities both at the substrata and at the microcosm scales. Significant *P*-value (< 0.05) are marked in bold, those with *P*-value < 0.1 are highlighted in italics.

Descriptor	Substrata or water	Factor Plastic (Two-way Anova)	Factor Leaves (Two-way Anova)	Plastic x Leaves (Two-way Anova)
pH	water	< 0.05	< 0.005	0.614
Conductivity	water	0.096	0.703	0.538
Temperature	water	0.920	< 0.05	<i>0.073</i>
Dissolved oxygen	water	0.465	0.276	0.468
DOC	water	< 0.05	0.332	0.556
TIC	water	0.122	0.521	0.613
TDC	water	< 0.05	0.668	0.538
TDN	water	0.780	0.281	0.507
P-PO ₄ ³⁻	water	0.779	0.335	0.415
Substrata scale				
GLU	Sediments	0.876	0.827	0.827
	Rocks	0.914	0.099	<i>0.052</i>
NAG	Sediments	0.711	0.959	0.423
	Rocks	0.972	0.779	0.629
PHO	Sediments	0.632	0.354	0.480
	Rocks	0.278	0.771	0.437
GLU:NAG	Sediments	0.484	0.724	0.513
	Rocks	0.785	0.130	< 0.05
GLU:PHO	Sediments	0.610	0.606	0.771
	Rocks	0.884	0.078	< 0.05
NAG:PHO	Sediments	0.345	0.682	0.998
	Rocks	0.341	0.490	0.974
Bacteria	Sediments	0.596	0.603	0.515
	Rocks	0.220	< 0.0005	0.865
Fungi	Sediments	0.735	0.353	0.555
	Rocks	< 0.0005	< 0.0005	< 0.0005
Algae	Sediments	0.833	0.280	< 0.05
	Rocks	0.137	< 0.05	0.393
Microcosms scale - Upscaling				
GLU	All substrate averaged by the open area occupied in the channel and add	0.527	0.535	0.320
NAG		< 0.05	0.161	≤ 0.05
PHO		< 0.05	0.805	0.308
GLU:NAG		0.969	0.062	0.688
GLU:PHO		0.603	0.749	0.682
NAG:PHO		0.676	0.750	0.644
Bacteria		0.729	< 0.005	0.380
Fungi		< 0.005	0.832	< 0.05
Algae		< 0.0005	< 0.0005	0.235

Table 2.B: One-way ANOVA test on the effect of plastic on the experimental conditions with leaves and without leaves separately. This test was only performed in descriptors having shown a significant two-way ANOVA interaction (Table 2.A) between plastic and leaves. Significant *P*-values (< 0.05) are marked in bold.

Descriptor / Substrata / Without or with leaves	Factor plastic (One-way Anova)	Tukey post-hoc
Substrata scale		
GLU Rocks without leaves	< 0.05	C-B : 0.999 NB-B : < 0.05 NB-C : < 0.05
GLU Rocks with leaves	0.062	C-B : 0.126 NB-B : 0.955 NB-C : 0.075
GLU:NAG Rocks without leaves	< 0.05	C-B : 0.844 NB-B : < 0.05 NB-C : < 0.05
GLU:NAG Rocks with leaves	0.286	C-B : 0.325 NB-B : 0.994 NB-C : 0.366
GLU:PHO Rocks without leaves	< 0.05	C-B : 0.995 NB-B : < 0.05 NB-C : < 0.05
GLU:PHO Rocks with leaves	0.139	C-B : 0.233 NB-B : 0.933 NB-C : 0.149
Fungi Rocks without leaves	< 0.005	C-B : < 0.005 NB-B : < 0.005 NB-C : 0.921
Fungi Rocks with leaves	0.503	C-B : 0.674 NB-B : 0.494 NB-C : 0.943
Algae Sediment without leaves	0.116	C-B : 0.100 NB-B : 0.481 NB-C : 0.452
Algae Sediment with leaves	0.203	C-B : 0.205 NB-B : 0.909 NB-C : 0.342
Microcosms scale - Upscaling		
NAG Microcosms without leaves	< 0.0005	C-B : < 0.0005 NB-B : 0.776 NB-C : < 0.0005
NAG Microcosms with leaves	0.275	C-B : < 0.0005 NB-B : 0.776 NB-C : < 0.0005
Fungi Microcosms without leaves	< 0.005	C-B : < 0.005 NB-B : 0.804 NB-C : < 0.005
Fungi Microcosms with leaves	0.462	C-B : 0.982 NB-B : 0.576 NB-C : 0.480

IV.3) Microbial biomass for sediment and rocks

No plastic effect was detected for the bacterial and algae densities measured on the sediments and rocks (Table 2.A). However, an interaction plastic x leaves effect was observed for the algal biomass in sediments (Table 2.A) despite of the low chlorophyll-*a* values were measured in this substratum. Specifically, a higher algal biomass was measured in sediments when plastics were added in the absence of leaves, while a higher algal biomass was measured in sediments from control without plastics in the presence of leaves (Figure 2.E).

Effects of factors plastic and leaves, as well as a plastic x leaves interaction effect were detected (Table 2.A) for the fungal biomass on the rocks. We observed a strong and significant reduction of fungal biomass in rocks when the biodegradable plastic was present and leaves were absent (Tukey test $P < 0.05$, Figure 2.D). These differences between conditions were not observed when leaves were present (Figure 2.D). One-way Anova indicates an effect of the plastic factor in the absence of leaves but not in the presence of leaves (Table 2.B, Figure 2D).

Overall, the biomass of bacteria, fungi and algae was reduced in rocky biofilms incubated with leaves compared to those incubated without leaves, and this was irrespective of the presence of plastics (Figure 2, Table 2.A). Conversely, the presence of leaves was not modifying the biomass of the three microbial groups on the sediments (Figure 2).

When considering the microbial biomass in all substrata (including leaves and plastics), the biomass of bacteria was higher in sediments than in rocks (Figure 2.A.B), whereas algal biomass was higher in rocks compared to sediments (Figure 2.E.F). The fungal density was higher in rocks than in sediments, but only for the control condition and in the presence of non-biodegradable plastic, while for the conditions in the presence of leaves the fungal density was higher in sediments than in rocks (Figure 2.C.D).

Statistically, the three microbial biomasses measured on leaves were not affected by the presence of plastic, and three microbial biomasses measured on plastics were no affected by the presence of leaves (Table S1). The fungal biomass was higher in the biodegradable than in the non-biodegradable plastic while bacterial density was higher in the non-biodegradable plastic than biodegradable plastic (Figure S5). Finally, algal biomass values were similar between plastics (Figure S5).

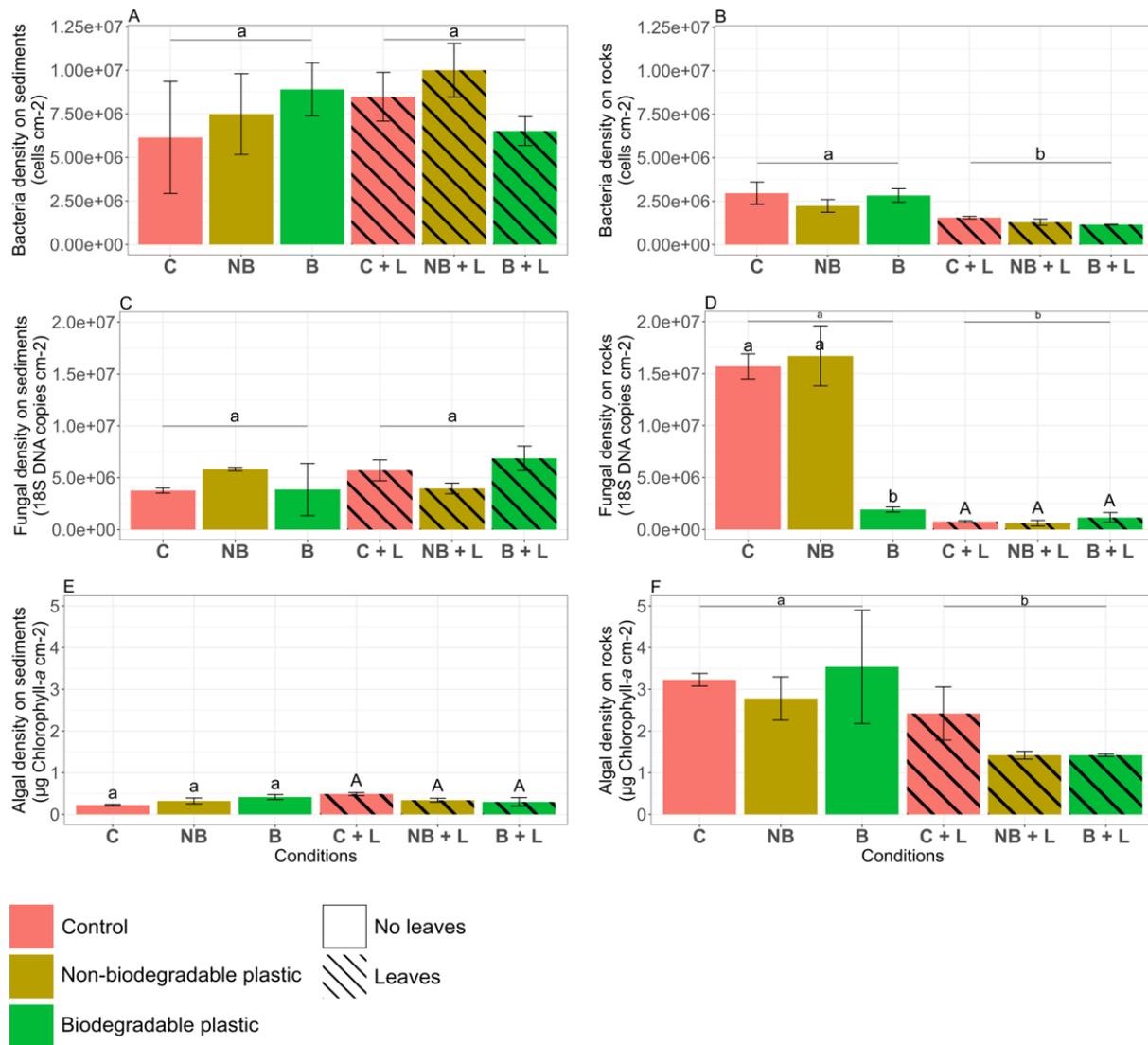


Figure 2: Microbial accumulation on sediments and on rocks for each condition. Bacterial density on sediments (A), on rocks (B). Fungal density on sediments (C), on rocks (D). Algal biomass on sediments (E), on rocks (F). Values are means ($n = 3$) \pm SE per conditions. Two-way Anova test factors plastic, leaves and plastic \times leaves. The effect of leaves is represented by horizontal bars surmounted by letters indicating the difference between the groups leaves and non-leaves. In the case of plastic \times leaves interaction effect is detected, a one-way Anova testing the effect of factor plastic followed by a Tukey test is performed for the groups leaves and non-leaves separately. Lowercase letters indicate differences between the three conditions within the no-leaf group ($a > b$). Capital letters indicate differences between the three conditions within the leaf group ($A > B$).

IV.4) Upscaling enzyme activities and biomass in the microcosms

N-acetyl-glucosaminidase and phosphatase activities measured at microcosm scale were significantly reduced in the presence of plastics, but this was not the case for β -D-glucosidase activity (Figure 3, Table 2.A). More specifically, global N-acetyl-glucosaminidase in the microcosm was 2.16 and 2.09 times lower in presence of non-biodegradable and biodegradable plastic respectively than in control (Figure 3). NAG activity reduction by the presence of plastics was statistically significant when both leaves were absent and present (Table 2.B, Figure 3).

In the case of global phosphatase activity, plastics also reduced phosphatase activity compared to the control. In presence of non-biodegradable and biodegradable plastic, the phosphatase activity was respectively 2.15 and 1.95 times lower than control. Despite no plastic effect on global β -D-glucosidase activity was observed, activity values were 2.92 times lower in presence of biodegradable plastic than in the control condition without plastic (Figure 3). Overall, the lower enzymatic activity values measured in microcosms with plastics were explained by the lower contribution of plastics in terms of enzymatic activity compared to natural substrata (i. e. sediment, rocks or leaves).

Finally, no effects of plastic of leaves or interaction plastic x leaves were detected on Log(GLU):Log(NAG), Log(GLU):Log(PHO) and Log(NAG):Log(PHO) enzyme ratios (Table 2.A, Figure S6).

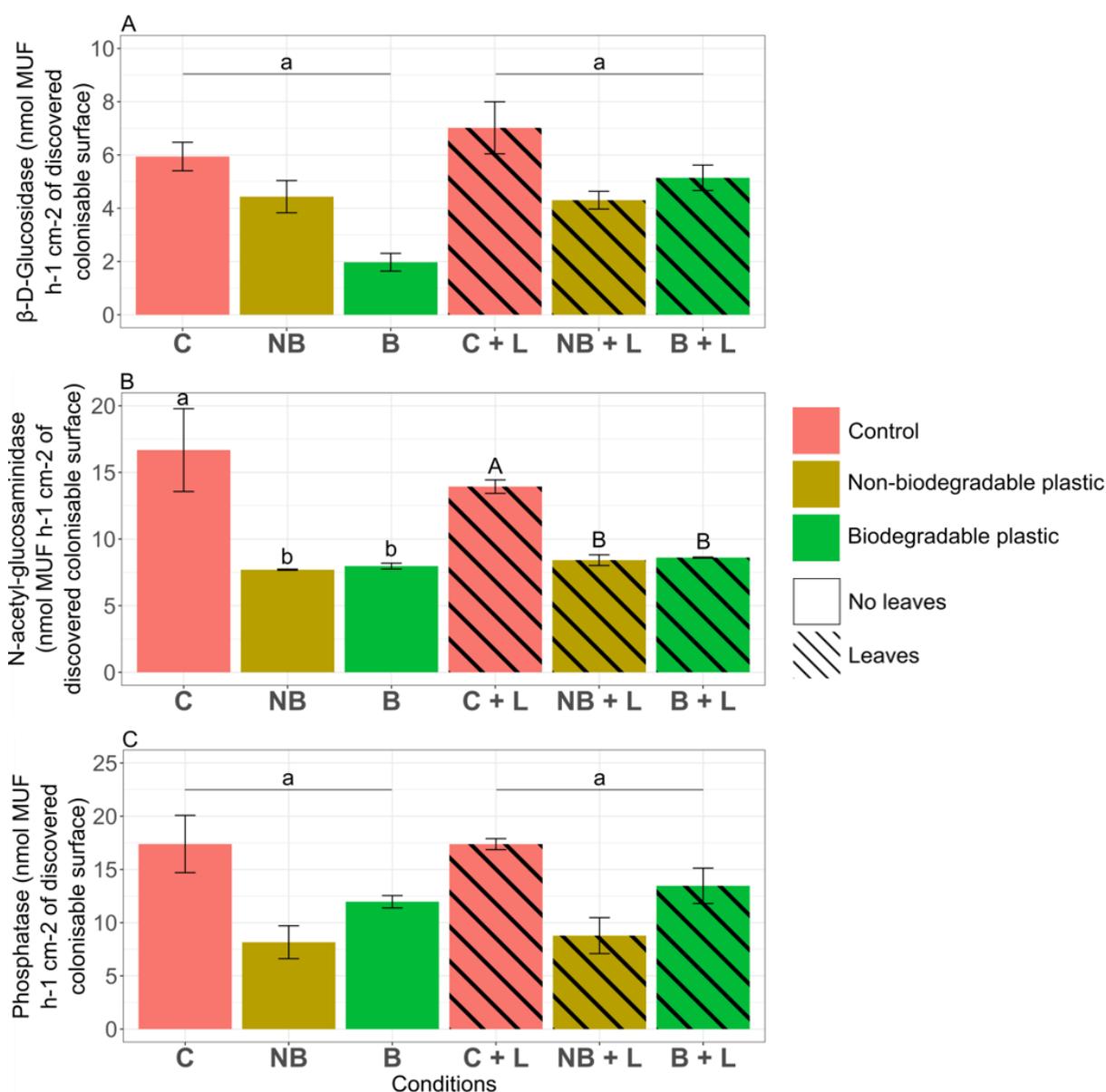


Figure 3: Extracellular enzymatic activities at the microcosm scale. β -D-glucosidase activity (A); N-acetylglucosaminidase activity (B); phosphatase activity (C). Values are means ($n = 3$) \pm SE per conditions; because $n = 3$ channels per condition. Two-way Anova test factors plastic, leaves and plastic \times leaves. The effect of leaves is represented by horizontal bars surmounted by letters indicating the difference between the groups leaves and non-leaves. In the case of plastic \times leaves interaction effect is detected, a one-way Anova testing the effect of factor plastic followed by a Tukey test is performed for the groups leaves and non-leaves separately. Lowercase letters indicate differences between the three conditions within the no-leaf group ($a > b$). Capital letters indicate differences between the three conditions within the leaf group ($A > B$).

Similar to enzyme activities, the global biomass of fungi and algae in the microcosm were reduced in the presence of non-biodegradable and biodegradable plastics compared to the control without plastics (Figure 4, Tables 3). More specifically, the global fungal density was 1.98 and 2.24 times lower in presence of non-biodegradable and biodegradable plastic, respectively, compared to the control condition (Figure 4.B). An interaction plastic x leaves effect (Table 2.A) revealed that fungal biomass reduction due to plastics was consistent in the absence of leaves, though this effect was weaker in the presence of leaves (Table 2.B, Figure 4.B).

The global algal biomass in the microcosm in the presence of non-biodegradable and biodegradable plastics was respectively 2.63 and 1.90 times lower than in the control (Figure 4.C). Again, the contribution of plastics to the global microbial biomass in the microcosm is lower compared to that of natural substrata.

Surprisingly, the global bacterial density in the microcosm was not reduced due to the presence of plastics (Figure 4, Table 2.A). Also, the presence of leaves in the microcosm increased significantly the global biomass of bacteria and reduced significantly that of algae in the microcosms (Figure 4.A.C, Table 2.A). The average of bacterial density of three conditions in presence of leaves was 4.99 times higher than the average of three conditions without leaves (Figure 4.A). While the average of algae biomass of three conditions without leaves was 1.57 times lower than the average of three conditions without leaves (Figure 4.C).

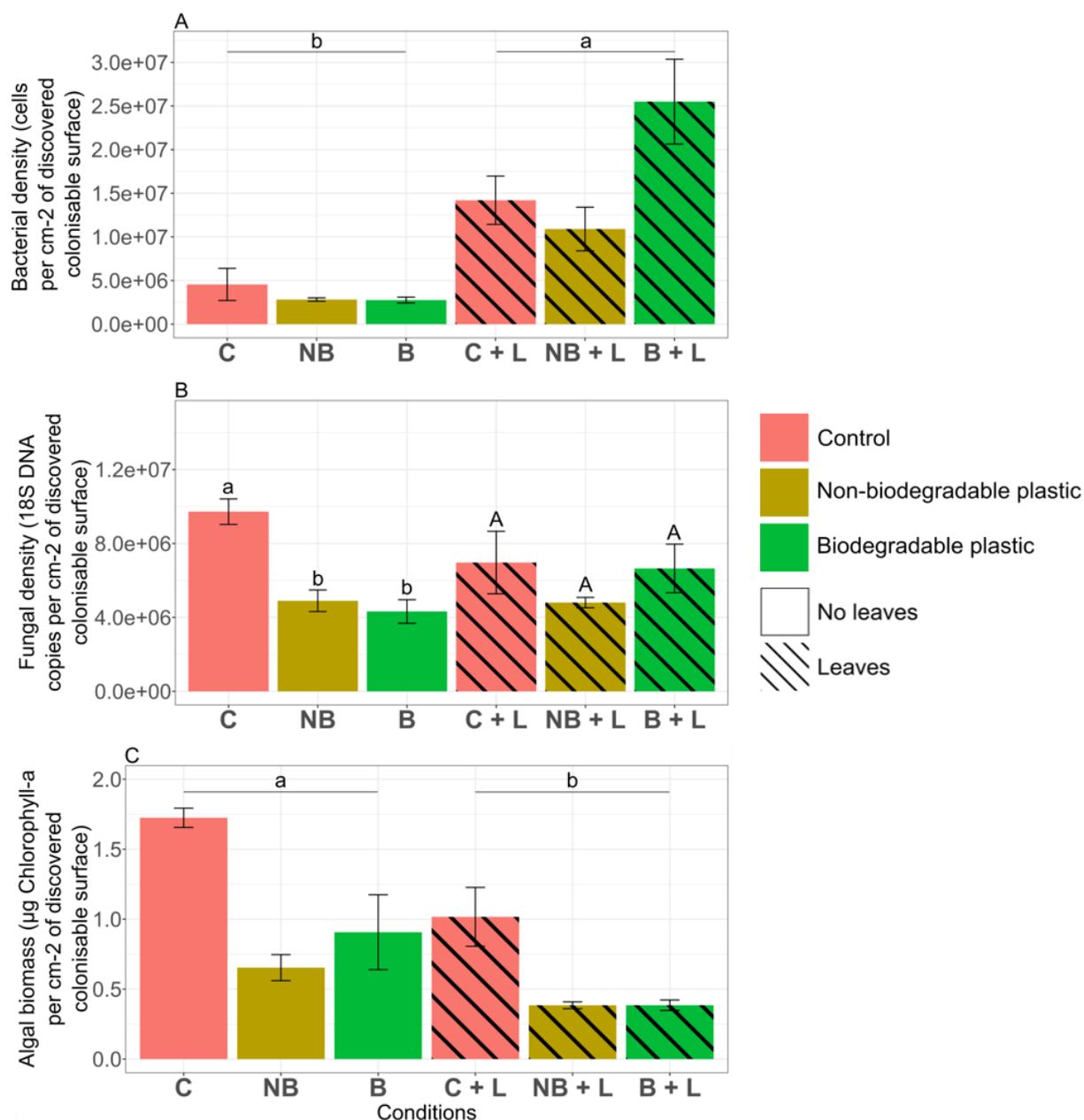


Figure 4: Microbial densities at the microcosm scale. Bacterial density (A); Algal density (B); Algal biomass (C) Values are means ($n = 3$) \pm SE per conditions. Two-way ANOVA test factors plastic, leaves and plastic x leaves. The effect of leaves is represented by horizontal bars surmounted by letters indicating the difference between the groups leaves and non-leaves. In the case of plastic x leaves interaction effect is detected, a one-way ANOVA testing the effect of factor plastic followed by a Tukey test is performed for the groups leaves and non-leaves separately. Lowercase letters indicate differences between the three conditions within the no-leaf group ($a > b$). Capital letters indicate differences between the three conditions within the leaf group ($A > B$).

IV.5) Nutrient uptake at the channel level

Overall, the uptake of glucose (carbon) in microcosms was more important compared to that of nitrogen or phosphorus, and this was independent of the experimental condition tested (Figure 5). No effects of plastics and/or leaves and interaction plastic x leaves were observed for the uptake of glucose, nitrogen and phosphorus in the microcosms (Table S2).

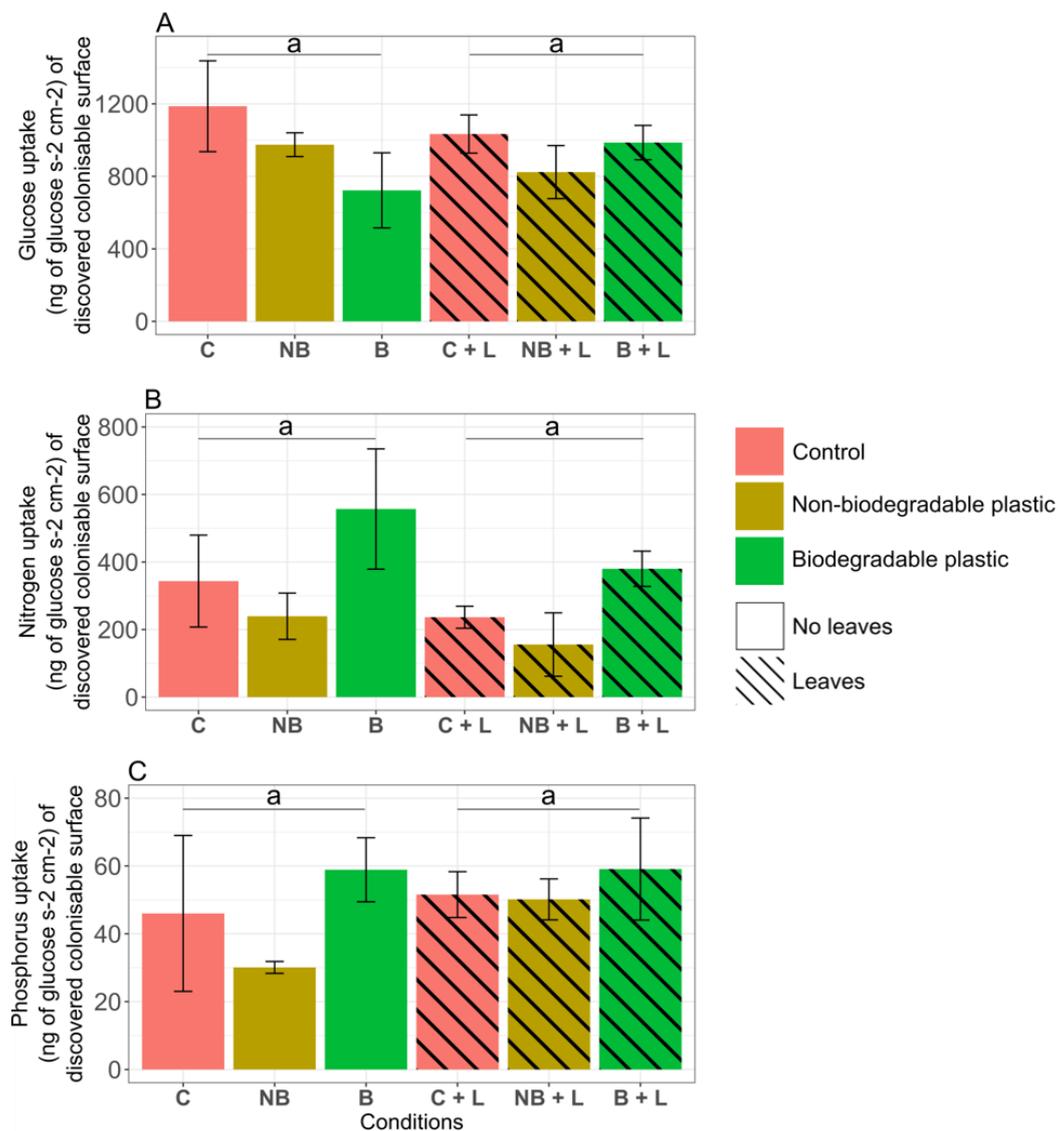


Figure 5: Nutrient uptake for each condition. Glucose concentration (A); nitrogen concentration (B); phosphorus concentration (C). Values are means ($n = 3$) \pm SE per conditions. Statistical differences between conditions are represented by letters (Tukey test, $a > b, P > 0.05$).

IV.6) Microbial communities' diversity

In sediment, the alpha-diversity indexes (Chao1 and Shannon) of fungal and bacterial communities were not influenced by the presence of plastics or leaves (Table 4). However, for bacterial communities on the rocks, the presence of leaves decreased significantly Chao1 and Shannon indexes (Table 3, Table 4). In addition, a plastic x leaves interaction effect was detected for the Shannon index on **bacterial** communities from the **rocks** (Table 4). When both plastics and leaves were present, the reduction in bacterial diversity in rocks was less evident than when only plastics were added (Table 3, Figure S7).

Table 3: Chao1 and Shannon indexes for each substrata of each condition and for bacterial and fungal communities. Values are means by substrata (n=3 values) \pm Standard Error.

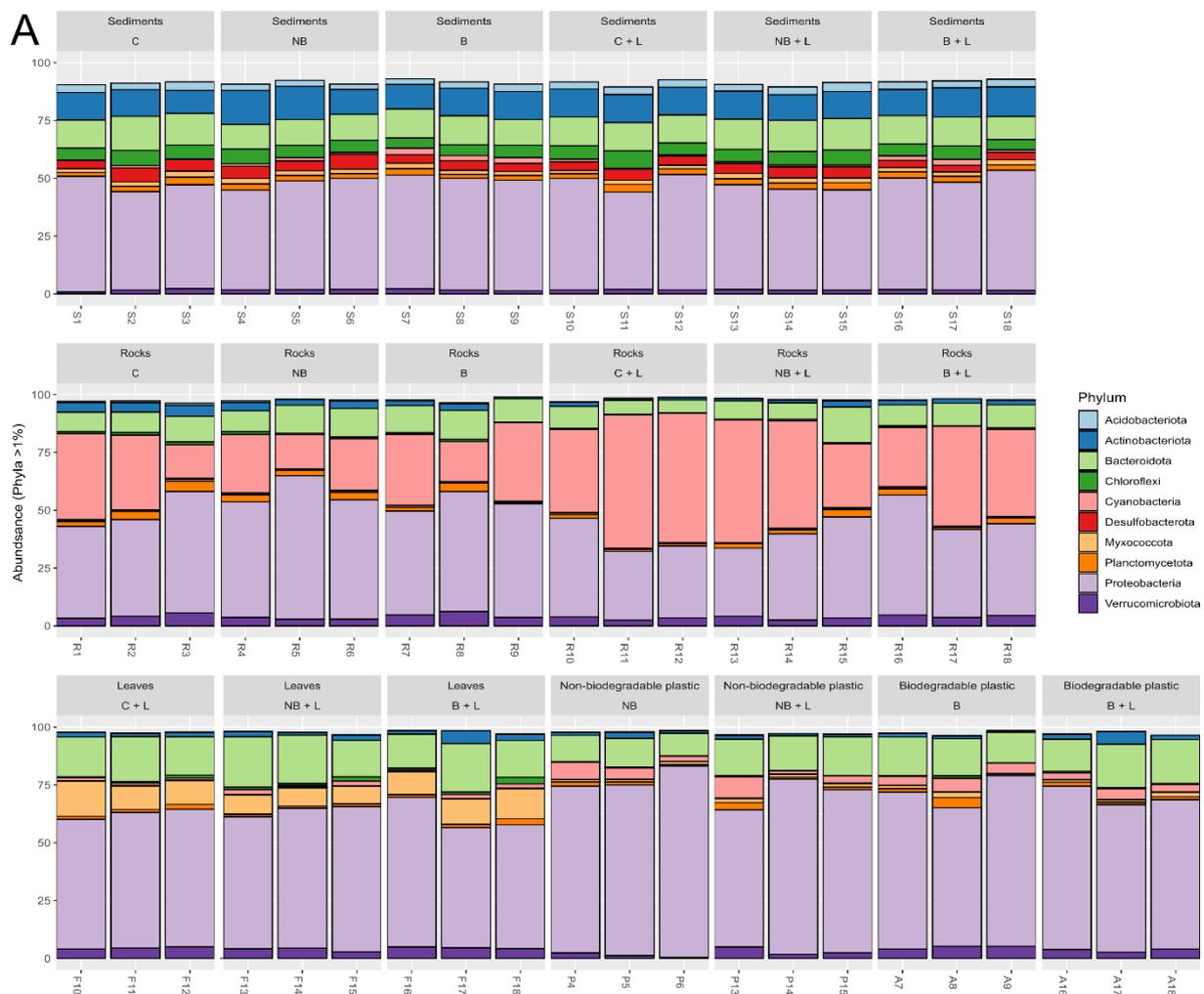
Substrata	Condition	Chao1	Shannon
BACTERIA			
Sediments	C	1139 \pm 171	6.04 \pm 0.17
Sediments	NB	1247 \pm 26	6.14 \pm 0.06
Sediments	B	1244 \pm 68	6.08 \pm 0.03
Sediments	C + L	1259 \pm 75	6.16 \pm 0.07
Sediments	NB + L	1139 \pm 22	6.05 \pm 0.03
Sediments	B + L	1350 \pm 2	6.19 \pm 0.05
Rocks	C	792 \pm 128	5.27 \pm 0.09
Rocks	NB	634 \pm 195	4.89 \pm 0.16
Rocks	B	438 \pm 43	4.7 \pm 0.23
Rocks	C + L	389 \pm 61	4.26 \pm 0.28
Rocks	NB + L	384 \pm 12	4.55 \pm 0.15
Rocks	B + L	460 \pm 40	4.57 \pm 0.12
Leaves	C + L	512 \pm 122	5.08 \pm 0.04
Leaves	NB + L	484 \pm 17	5.21 \pm 0.03
Leaves	B + L	405 \pm 7	4.9 \pm 0.11
Non-biodegradable plastic	NB	343 \pm 8	4.3 \pm 0.08
Non-biodegradable plastic	NB + L	391 \pm 109	4.66 \pm 0.30
Biodegradable plastic	B	330 \pm 50	4.36 \pm 0.43
Biodegradable plastic	B + L	412 \pm 44	4.48 \pm 0.30
FUNGI			
Sediments	C	36 \pm 8	3.1 \pm 0.21
Sediments	NB	50 \pm 12	2.78 \pm 0.1
Sediments	B	61 \pm 12	2.61 \pm 0.46
Sediments	C + L	38 \pm 9	3 \pm 0.34
Sediments	NB + L	35 \pm 1	3.04 \pm 0.15
Sediments	B + L	56 \pm 6	3.02 \pm 0.22
Rocks	C	120 \pm 12	3.62 \pm 0.15
Rocks	NB	120 \pm 13	3.55 \pm 0.23
Rocks	B	108 \pm 8	3.74 \pm 0.12
Rocks	C + L	106 \pm 10	3.65 \pm 0.13
Rocks	NB + L	98 \pm 5	3.93 \pm 0.02
Rocks	B + L	112 \pm 8	3.83 \pm 0.12

Leaves	C + L	59 ± 12	2.86 ± 0.14
Leaves	NB + L	62 ± 7	2.71 ± 0.07
Leaves	B + L	67 ± 7	3.05 ± 0.1
Non-biodegradable plastic	NB	81 ± 12	3.63 ± 0.18
Non-biodegradable plastic	NB + L	75 ± 13	3.31 ± 0.24
Biodegradable plastic	B	101 ± 6	3.75 ± 0.06
Biodegradable plastic	B + L	91 ± 6	3.04 ± 0.2

Table 4: *P*-values of two-way Anova for the sediments and rocks substrata testing the effect of the factor plastic, the factor leaves and interaction plastic x leaves. And *P*-values of one-way Anova for the leaves substrata testing the effect of the factor plastic. (*P*-values < 0.05 are marked in bold).

Descriptor	Substrata	Factor Plastic (two-way Anova)	Factor Leaves (two-way Anova)	Plastic x Leaves interaction (two-way Anova)	Factor plastic (one-way Anova)
BACTERIA					
Chao1	Sediments	0.550	0.583	0.430	
Shannon	Sediments	0.812	0.501	0.474	
Chao1	Rocks	0.228	< 0.05	0.125	
Shannon	Rocks	0.559	< 0.005	< 0.05	
Chao1	Leaves				0.448
Shannon	Leaves				0.868
FUNGI					
Chao1	Sediments	0.124	0.481	0.493	
Shannon	Sediments	0.467	0.357	0.381	
Chao1	Rocks	0.681	0.211	0.797	
Shannon	Rocks	0.317	0.177	0.406	
Chao1	Leaves				0.636
Shannon	Leaves				0.899

The composition of bacterial and fungal ASVs differed significantly between sediments and the rest of substrata and this was independent of the presence/absence of plastics and/or leaves (Figure 6, Figure 7). Despite the statistically significant differences observed in bacterial and fungal community composition (beta-diversity) in rocks and sediments due to the presence of plastics (PERMANOVA, Table S5), those differences were not visible when comparing relative abundances of bacterial and fungal phyla (Figure 6) or through the NMDS analysis (Figure 7). However, the presence of leaves had an effect on the diversity of bacterial and fungal communities on the rocks (Figure 7, Table S5). The presence of leaves decreased the relative abundance of Proteobacteria on rocks compared the condition without leaves (Table S4, Figure 6).



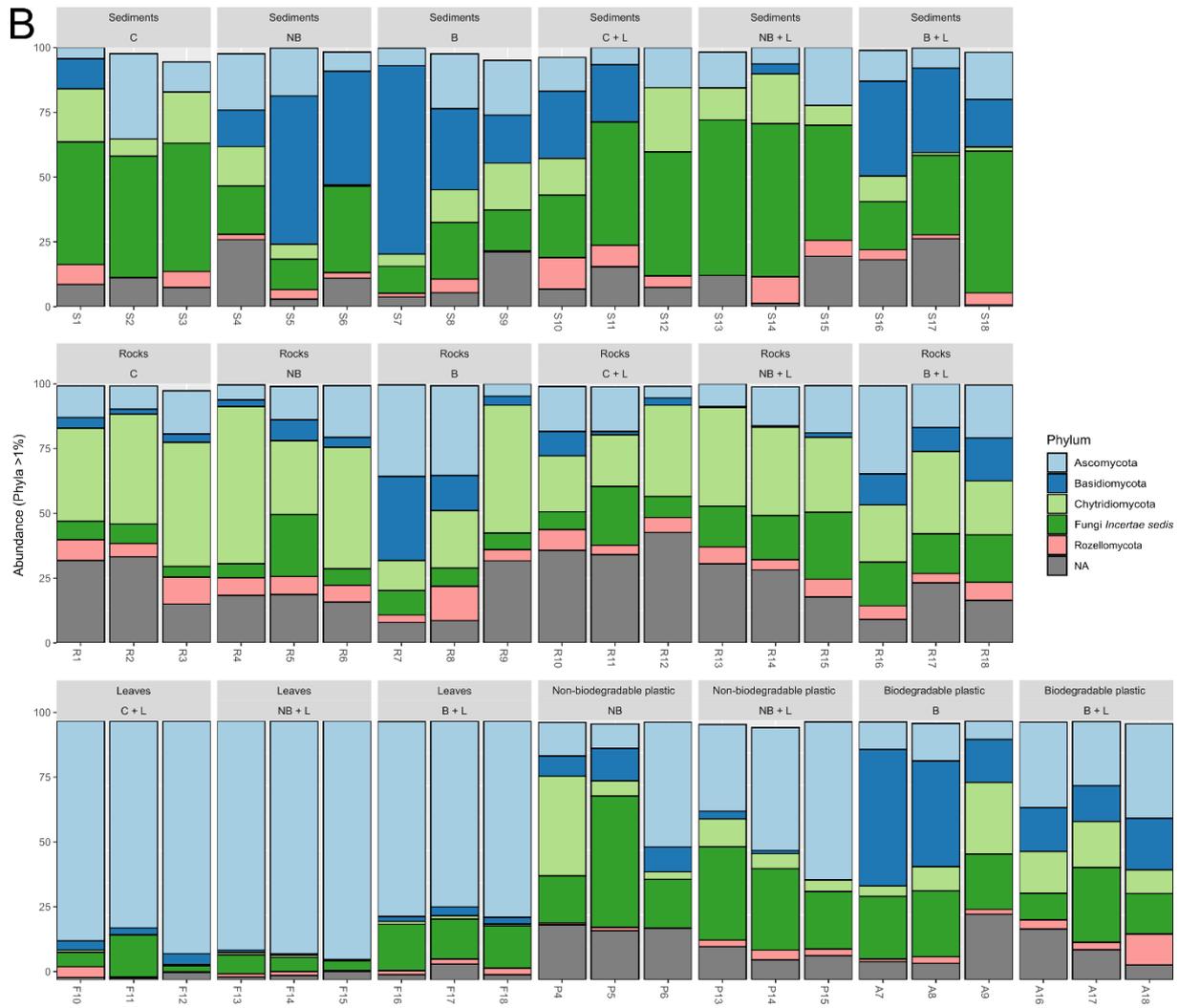


Figure 6: Relative abundance of microbial phyla contributing more than 1 % of total communities. Bar chart correspond to the percentage of (A) bacterial and (B) fungal taxonomic composition of phyla for each sample. For Fungi: “*Fungi Incertae sedis*”: “fungi of uncertain classification” It signifies that the classification of these fungi is uncertain, unknown, or still under investigation.

We further explored the effect of leaves and plastics on each of the detected bacterial phyla in rocks. The analysis revealed that the presence of leaves had an effect on 5 out of the 10 detected phyla. The plastic factor did not alter the phyla composition (Figure 6) despite a significant p -value for Bacteroidota (Table S4). An interactive plastic x leaves effect was observed for Desulfobacterota, Chloroflexi, Actinobacteriota, and Acidobacteriota (Table S4). Regarding the fungal phyla in rocks, only an effect of leaves was detected for the *Fungi Incertae Sedis*

(Table S4). No effect of plastic was observed on relative abundances of fungal phyla on rocks or sediments (Table S4).

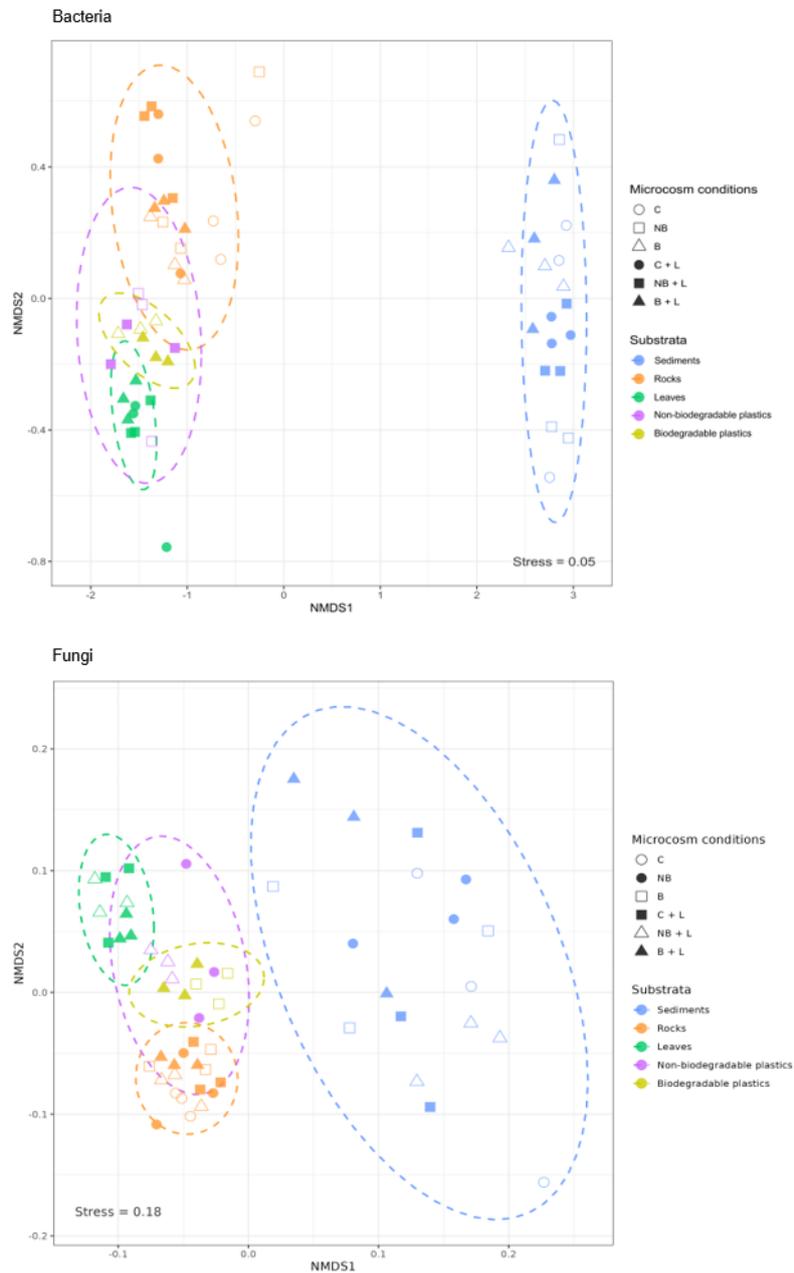


Figure 7: Non-metric multidimensional scaling (NMDS) analysis based on a Bray Curtis distance matrix. Upper: on bacteria and lower: on fungi communities on five substrata and on six conditions. Stress values were < 0.2 suggesting that the computation accurately represents the dissimilarity among samples. Ellipse zones are based on the confidence intervals for each substratum and site.

V) Discussion

V.1) Impact of plastics on sediment and rock biofilm structure and function

The structure and function of microbial communities on the rocks were impacted by the presence of plastics. The rock communities had higher β -D-glucosidase activity in presence of non-biodegradable plastic compared to the control or compared to the condition with biodegradable plastic, but this was not occurring when leaves were added. Similarly, in the presence of non-biodegradable plastic, the Log(GLU):Log(NAG) and Log(GLU):Log(PHO) ratios increased compared to the other conditions reaching values well above 1 suggesting a higher need for carbon than for nitrogen or phosphorus in rock microbial communities in the presence of non-biodegradable plastic (Sinsabaugh *et al.* 2012; Sinsabaugh, Hill, and Follstad Shah 2009). Also, without leaves the fungal density in rocks was highest than when leaves were present, and this was reduced with the presence of the biodegradable plastic. In contrast to responses observed on the rocks, the presence of plastics did not modify neither the structure nor the function of microbial communities in sediments.

Microbial communities on the rocks are therefore more sensitive to the presence of plastics than those on the sediments. We propose several hypotheses that could explain these differences. The first hypothesis is that microbial communities formed on the surface of rocks would be more dependent on the nutrient and dissolved organic matter in the flowing water compared to those on the sediments where communities have a greater stock of organic matter and nutrients available in the substratum itself (Leichtfried 1991; Weigelhofer and Waringer 1994; Fischer, Wanner and Pusch 2002; Stelzer, Heffernan and Likens 2003). This difference can make rock communities more sensitive to toxic molecules eventually released by the plastic. Plastics as a polyvinyl chloride (PVC), polypropylene (PP), Polystyrene (PS), high-density polyethylene (HDPE), low-density polyethylene (LDPE), polyethylene terephthalate (PET), are not only composed of hydrocarbon chain polymers, they are also polymerised using solvents and other chemical additives to confer their properties of strength, flexibility and colour (Lithner, Larsson and Dave 2011). In the aquatic environment, the chemical additives that constitute plastics can be released into the water column, as shown by (Kedzierski *et al.* 2018), and some have been described as toxic for marine copepod *Nitocra spinipes* (Bejgarn *et al.* 2015), for the bacteria *Vibrio fischeri* (Degli-Innocenti *et al.* 2001), or for the planktonic

crustacean *Daphnia magna* (Lithner *et al.* 2009). Moreover, certain environmental pollutants can also be adsorbed to the surface of plastics and then be desorbed into the water column by leaching or desorption due to their physical properties (Oehlmann *et al.* 2009; Teuten *et al.* 2009). For instance, plastics can adsorb heavy metals such as Cr, Co, Ni, Cu, Zn, Cd and Pb (Holmes, Turner and Thompson 2012) with relatively rapid adsorption kinetics (< 100 h) in polyethylene granules as shown by (Ashton, Holmes and Turner 2010). It has been shown that certain metals, such as CuO, are highly cytotoxic against several bacteria (Shim *et al.* 2015), or Cu covering polyester (Rtimi *et al.* 2016), which has antimicrobial properties. Plastics can also adsorb organic pollutants such as polychlorinated biphenyls (PCBs), DDT, HCHs, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) (Santana-Viera *et al.* 2021) or pesticides (Teuten *et al.* 2009; Wang *et al.* 2020; Li *et al.* 2021) or pharmaceutical products (Elizalde-Velázquez *et al.* 2020; Banaee *et al.* 2023) as well as personal care products (Wu *et al.* 2016). Considering that plastics used in our experiment were colonized in a metal- and pesticide-contaminated site (Artière river downstream site, see Rossi *et al.* 2019), both desorbed additives and/or contaminants from plastics could have been affecting the structure and function of microbial communities in the rocks.

It is important to remark that rocky biofilms, at least a mature community, tends to have a thicker EPS matrix that can prevent from contaminations transported by the flowing water (Romani and Sabater 2001). According to this, maybe the differential effect of plastics between rocks and sediments is more related to the developing community on the plastics. The microbial communities on plastics were characterized by lower enzymatic activities (GLU, NAG, PHO) compared to those measured on natural substrata. We observed higher enzymatic activities on the biodegradable plastic compared to non-biodegradable plastic, and a higher fungal density, indicating a greater presence of heterotrophic microorganisms on the biodegradable plastic. These findings could help explain the lower fungal density on rocks in the presence of biodegradable plastic.

The structure and metabolism of microbial communities on non-biodegradable plastic could have been influencing the metabolism of rock biofilms suggesting a potential interaction for the dissolved organic matter use (Kemp and Boynton 1981; Findlay *et al.* 2002; Ponomarova and Patil 2015). The limited availability of resources, such as carbon and nutrients, can lead to competitive interactions between communities, and can influence the metabolic strategy of competing communities (Tilman 1982). A decrease of DOC and TDC measured when adding plastics could be due to the microbial carbon uptake from rocks and plastic biofilms, increasing

competition. Moreover, the significant decrease of TDC and increase of pH could indicate higher photosynthetic activity when adding plastics. In this way, the aggrieved community can modify its metabolic strategy to use another source of carbon, as shown by (Wagner 2022). The functional changes in rocks communities in the presence of plastics may also be due to the competition between the plastic and rocks communities. Plastic microbial community could have reduced the availability of dissolved carbon in water, for the rocks microorganisms, and by competition effect would result in higher glucosidase activity from rocks communities to acquire carbon.

Interestingly, the effect on non-biodegradable plastic on β -D-glucosidase activity on rocks was not observed when leaves were added in the microcosm. These results indicate that the addition of leaves restores the balance of microbial descriptors, even in the presence of non-biodegradable plastic. The addition of leaves represents a significant addition of organic matter to the environment, and is a preferred substrate for fungal and bacterial growth (Romaní *et al.* 2006; Rossi, Artigas and Mallet 2017). In fact, fungal colonization of the leaves enables lignin, cellulose and hemicellulose polymers to be broken down into smaller carbon dimers and monomers that can be more easily used by other microbial communities (Romaní *et al.* 2006). The release of these carbon compounds into the water could then limit the competition effect between the rocks and plastic communities, which would re-establish a balance and reduce the production of β -D-glucosidase on the rock microbial communities. Additionally, the alpha diversity of bacterial communities on rocks was impacted by the interaction between plastic and leaves. We observed an increase in the Shannon diversity index in the presence of both plastics compared to the control when leaves were present. Conversely, a decrease in diversity was observed in the presence of both plastics compared to the control when leaves were absent. The competition process between rock and plastic communities could thus have an impact on both functions and community structure, which are closely interrelated.

When comparing microbial accumulations between the two plastics, bacterial density was higher on the non-biodegradable plastic, whereas fungal density was higher on the biodegradable plastic. The presence of biodegradable plastic has led to a decrease in the fungal density on the rocks, which can be explained by a preference of fungi to colonize biodegradable plastic probably due to its rich organic composition, primarily starch, in contrast to rocks, which are inorganic substrata. This colonization preference is illustrated by the fact that we measured a fungal density twice as high on the biodegradable plastics compared to that measured on the

rocks in the presence of this biodegradable plastic. This preference could be explained by the better accessibility of the organic matter in the starch of biodegradable plastic, which can be degraded by fungi (Roldán-Carrillo *et al.* 2003; Neveen and Salama 2011; Urbanek *et al.* 2017; Bezirhan Arikan and Bilgen 2019; Sankhla, Sharma and Tak 2020). Furthermore, this effect is not observed in the presence of non-biodegradable plastic. This can be explained by the chemical nature of non-biodegradable plastic, composed of ethylene polymers that are less accessible to microorganisms and therefore less attractive than biodegradable plastic, which fungi would prefer to colonize within a short timeframe of 10 days in our experiment.

The simultaneous presence of both plastic and leaves substrata would provide a diverse colonization surface, potentially leading to greater microbial diversity in the environment. Indeed, plastics can harbor specific taxa to the plastisphere compared to their environment with a different diversity contribution among substrata, plastics *versus* natural ones, from the same environment (Zettler, Mincer and Amaral-Zettler 2013; Bryant *et al.* 2016; Li *et al.* 2020; Wang *et al.* 2021b; Merbt *et al.* 2022), suggesting that the introduction of plastic substrata can alter diversity and, consequently, the structure of communities within an ecosystem. Consequently, the rocks could become colonized by a greater diversity of microorganisms due to the introduction of different substrata into the ecosystem. In the absence of leaves, there would be a lower species diversity in the microcosm that could contribute to lower the bacterial diversity on the rocks.

Further analysis would require an assessment of the impact of the presence of plastics and leaves on deeper taxonomic ranks such as class, order or even family if the sequencing technique allows such a fine depth.

V.2) Impact of plastic on the microbial biomass and functions of the whole microcosm

The presence of plastics (especially the non-biodegradable) reduced global NAG and PHO activities, as well as the global fungal and algal biomass, in the microcosm. At the microcosm scale, plastic substrata offer a colonization surface poor in fungi and algae compared to natural substrata and this can contribute to lower fungal and algal biomass at the microcosm scale. Indeed, we measured a lower fungal and algal biomass in plastics compared to leaves, sediments or rocks except for fungal density on biodegradable plastic, which is similar to that measured

on sediment. This result coincides with observations made by (Laffet *et al.* 2023) where both the non-biodegradable and biodegradable plastics provide a less favorable surface for microbial colonization than natural substrata (leaves and sediment). The lower microbial density at the microcosm level can also explain the reduced NAG and PHO activities at the microcosm scale, since microbial enzymatic activity is often correlated to the biomass accumulation in microbial communities (Abdullah and Taj-Aldeen 1989; Arnosti 2003; Artigas *et al.* 2009; Vidhate, Bhide and Giri 2023). In addition, the NAG and PHO activities measured on both types of plastics were similar to those measured on rocks but significantly lower than those in the sediments, which may explain the decrease in NAG and PHO at the microcosm scale.

Surprisingly, the presence of plastics did not modify neither bacterial density nor GLU activity at the microcosm scale and bacterial densities on both plastics was lower than on natural substrata. Bacterial colonization on natural substrata would have compensated for the overall GLU activity at the microcosm scale. The presence of leaves in the microcosm increased significantly the global biomass of bacteria and reduced significantly that of algae in the microcosms. This can be explained by the fact that leaves are a suitable organic substrate for bacterial colonization (Sampaio, Cortes and Leão 2001; Romaní *et al.* 2006; Mora-Gómez *et al.* 2016).

The absorption capacities for glucose, nitrogen, and phosphorus by the communities were not affected by the presence of plastic. Nevertheless, it should be noted that our experiment was of short duration, and with a longer time frame, effects might have been observable. To avoid impacting the analyses of enzymatic activities, microbial biomass, and diversity due to nutrient spikes during the uptake experiment, we conducted substrate sampling prior to the uptake process. This involved removing a few cm² of substratum surface, including biofilms, for these analyses. This procedure may have affected the overall adsorption capacity of the biofilms in the microcosm.

We chose to consider only exposed surfaces in our study due to potential differences in environmental conditions, such as oxygenation, light availability, and nutrient availability, between microorganisms located below plastic substrata and those exposed to the water column. Our upscaling method aims to provide a global estimate of microbial activities and densities in our experimental systems. However, by our approach, the calculation of enzyme activities and biomass at the microcosm scale may be underestimated since did not include the potential active microorganisms in sediments and rocks covered by plastics. By not accounting for the effects of plastics and leaves on the microbial communities located below overlapping

substrata, we may underestimate the overall impact of these materials at the canal scale. While the upscaling calculation may enhance the representativeness of our data, there are inherent limitations in using microcosms compared to natural ecosystems. Therefore, our results should be interpreted as general trends specific to our experimental design, rather than an exact replication of natural behavior. Hence, although our upscaling is a valid method for addressing surface differences among substrata in our river microcosms, it is crucial to keep in mind the inherent limitations of microcosms and exercise caution when interpreting the results, considering them as general indications rather than an exact replica of the ecosystem.

VI) Conclusion

Rocky microbial communities were more sensitive to the presence of macroplastic pollution than microbial communities in sediments or leaves. After only 10 days of experiment, a significant functional effect of plastic microbial communities was detected in rock microbial communities, related to the use and acquisition of organic carbon. A competitive effect may occur between the microbial communities on rocks and plastics, which could have also led to a reduction in diversity on the rocks. We note that this impact varies according to the type of plastic, but also according to the scale, as the effects of the presence of plastic were different when comparing effect between substrata (rocks, sediment) or effects at the microcosm scale. We also observed that the addition of leaves often restored the microbial functioning at both the substrata and microcosm levels. This highlights the importance of having developed riparian vegetation along rivers because this vegetation provides a source of allochthonous organic matter and microhabitats conducive to the development of fungal and bacterial communities.

It is important to note that these conclusions apply to microbial communities and water specific from our sampling site, and results may therefore vary from one river to another according to differences in degrees of plastic pollution, nutrients and microbiological composition.

Despite the variations in the impact of plastic between types of plastic, between scales and most certainly between ecosystems, it is necessary to continue assessing this impact at different levels of biological integration and different rivers in order to assess the impact of macroplastic pollution on aquatic microbial biodiversity and biogeochemical cycles.

Acknowledgments

We thank Damien Courtine for his participation to the treatment of metabarcoding data.

VII) Supplementary data

Table S1: *P*-value results for analyses extracellular enzyme activities and microbial densities and biomass by cm² for leaves, non-biodegradable and biodegradable plastics. (One-way Anova test *P*-value < 0.05).

Descriptors	Substrata	<i>P</i> -value (one-way Anova) Plastic effect	<i>P</i> -value (one-way Anova) Leaves effect
Extracellular enzymatic activities			
GLU	Leaves	0.738	
NAG		0.606	
PHO		0.912	
GLU	Non-biodegradable plastic		0.308
NAG			0.505
PHO			0.165
GLU	Biodegradable plastic		0.668
NAG			0.356
PHO			0.737
Microbial densities and biomass			
Bacteria	Leaves	0.470	
Fungi		0.439	
Bacteria	Non-biodegradable plastic		0.315
Fungi			0.637
Algae			0.380
Bacteria	Biodegradable plastic		0.118
Fungi			0.760
Algae			0.524

Table S2: *P*-value results for analyses of carbon, nitrogen and phosphorus uptake of the water channel. Two-way Anova test on the effect of factors plastic, leaves and interaction plastic x leaves for each uptake nutrient.

Descriptor	Factor Plastic (Two-way Anova)	Factor Leaves (Two-way Anova)	Plastic x Leaves (Two-way Anova)
Glc UpTake	0.110	0.916	0.456
N UpTake	0.692	0.241	0.914
P UpTake	0.946	0.426	0.840

Table S3: *P*-values of one-way Anova for the sediments, rocks, leaves and both plastics substrata testing the differences of chao1 and Shannon indexes among conditions (*P*-values < 0.05 are marked in bold).

Descriptors	Substrata	One-way Anova
BACTERIA		
Chao1	Sediments	0.483
Chao1	Rocks	0.084
Chao1	Leaves	0.574
Chao1	Non-biodegradable plastic	0.680
Chao1	Biodegradable plastic	0.288
Shannon	Sediments	0.756
Shannon	Rocks	< 0.05
Shannon	Leaves	0.064
Shannon	Non-biodegradable plastic	0.321
Shannon	Biodegradable plastic	0.820
FUNGI		
Chao1	Sediments	0.254
Chao1	Rocks	0.254
Chao1	Leaves	0.833
Chao1	Non-biodegradable plastic	0.776
Chao1	Biodegradable plastic	0.335
Shannon	Sediments	0.815
Shannon	Rocks	0.815
Shannon	Leaves	0.188
Shannon	Non-biodegradable plastic	0.349
Shannon	Biodegradable plastic	0.071

Table S4: *P*-values of two-way Anova of relative abundance. Testing impact of plastic; impact of leaves and interaction plastic x leaves for each phylum detected on the bacterial rocks communities and on the fungal rocks communities. (*P*-values < 0.05 are marked in bold).

Phylum	Factor plastic	Factor leaves	Plastic x Leaves
BACTERIA on rocks			
Desulfobacterota	0.596	0.086	< 0.05
Cyanobacteria	0.165	< 0.005	0.503
Chloroflexi	0.572	< 0.005	< 0.05
Actinobacteriota	0.09	< 0.0005	< 0.0005
Planctomycetota	0.895	0.067	0.082
Proteobacteria	0.085	< 0.005	0.832
Bacteroidota	< 0.05	0.113	0.695
Verrucomicrobiota	0.876	0.329	0.380
Acidobacteriota	0.067	< 0.0005	< 0.005
Myxococcota	0.403	0.375	0.744
FUNGI on rocks			
Fungi <i>Incertae sedis</i>	0.147	< 0.05	0.728
Basidiomycota	0.250	0.585	0.522
Ascomycota	0.245	0.977	0.968
Rozellomycota	0.626	0.238	0.783
Chytridiomycota	0.886	0.102	0.471

Table S5: *P*-value results for PERMANOVA analysis based on the Bray Curtis dissimilarity distance matrix. Permutation: 9999. Beta-diversity of bacteria and beta-diversity of fungi for sediments, rocks and leaves substrata. Significant *P*-value (< 0.05) are marked in bold.

Descriptor	Substrata	Factor Plastic	Factor Leaves	Plastic x Leaves interaction
Beta-diversity of bacteria	Sediments	0.136	0.311	0.480
	Rocks	< 0.05	< 0.005	0.330
	Leaves	0.181	/	/
Beta-diversity of fungi	Sediments	< 0.05	0.356	< 0.05
	Rocks	< 0.05	< 0.05	0.231
	Leaves	0.614	/	/

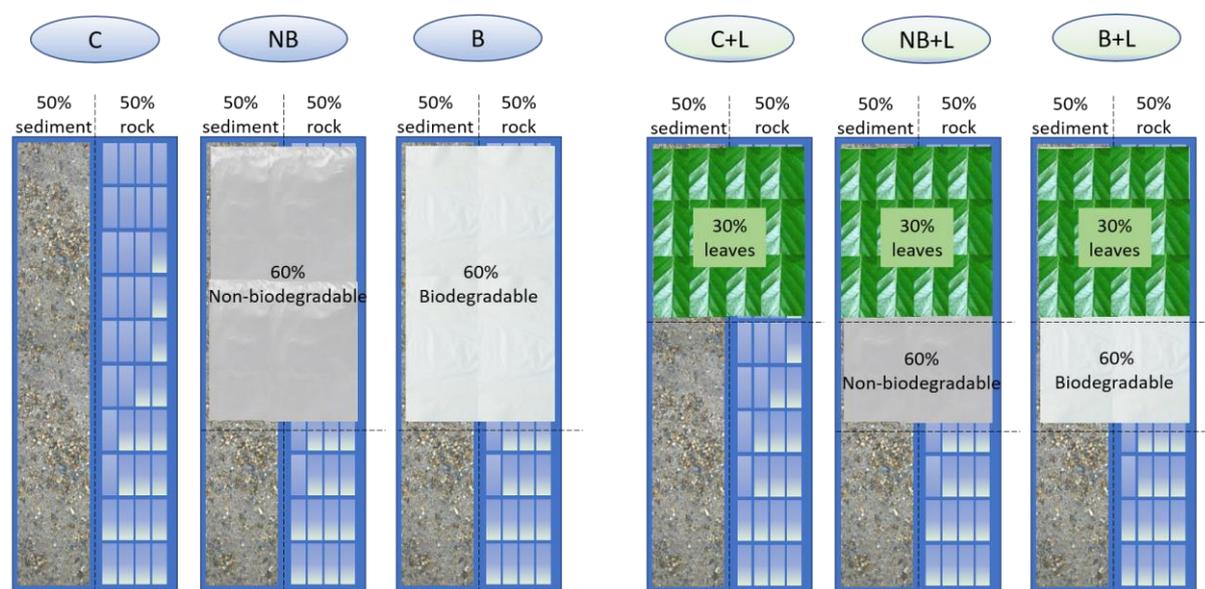


Figure S1: Diagram of six artificial channel microcosm conditions in top view. Each of the six conditions was covered with 50% sediment surface and 50% frosted glass slides (rocky substrata surrogates) surface. Condition "C" contains only these two substrata. Condition "NB" contains 50% sediment + 50% rocks + 60% non-biodegradable plastic (LDPE) covering. Condition "B" contains 50% sediment + 50% rocks + 60% biodegradable plastic (BDBP) covering. Conditions "C+L", "NB+L" and "B+L" are constructed in the same manner as the first three conditions, with the addition of 30% *Alnus glutinosa* leaves covering. In this diagram, the upstream-downstream flow is from top to bottom. Each condition was realized in triplicate, giving a total of 18 channels.

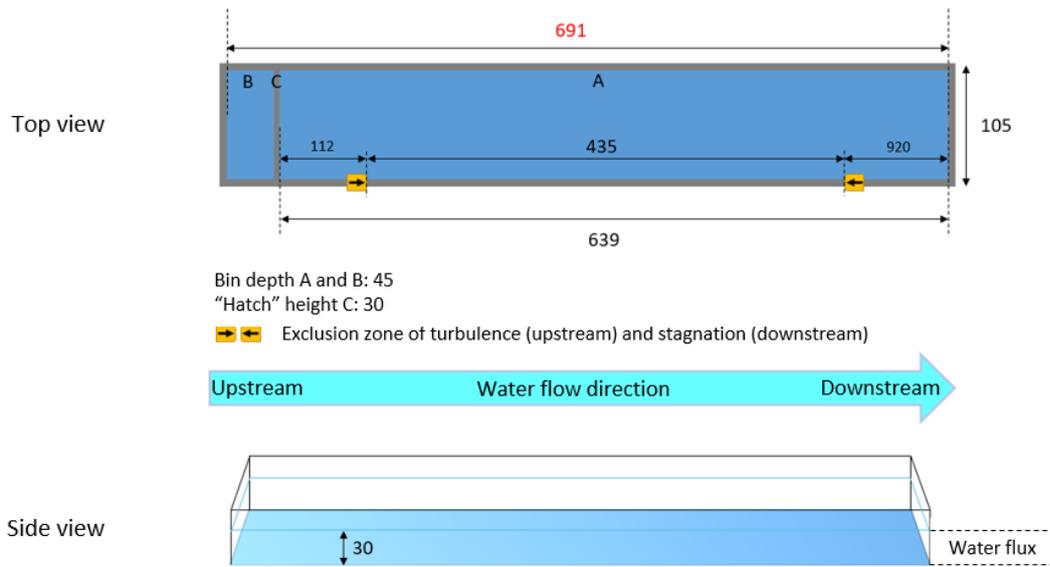


Figure S2: Diagram of an artificial channel with a top view and a side view. This diagram illustrates exclusion zones due to turbulence (upstream) and stagnation (downstream). The substrata have been placed within the area enclosed by the black and yellow arrows. All dimensions are provided in millimeters.

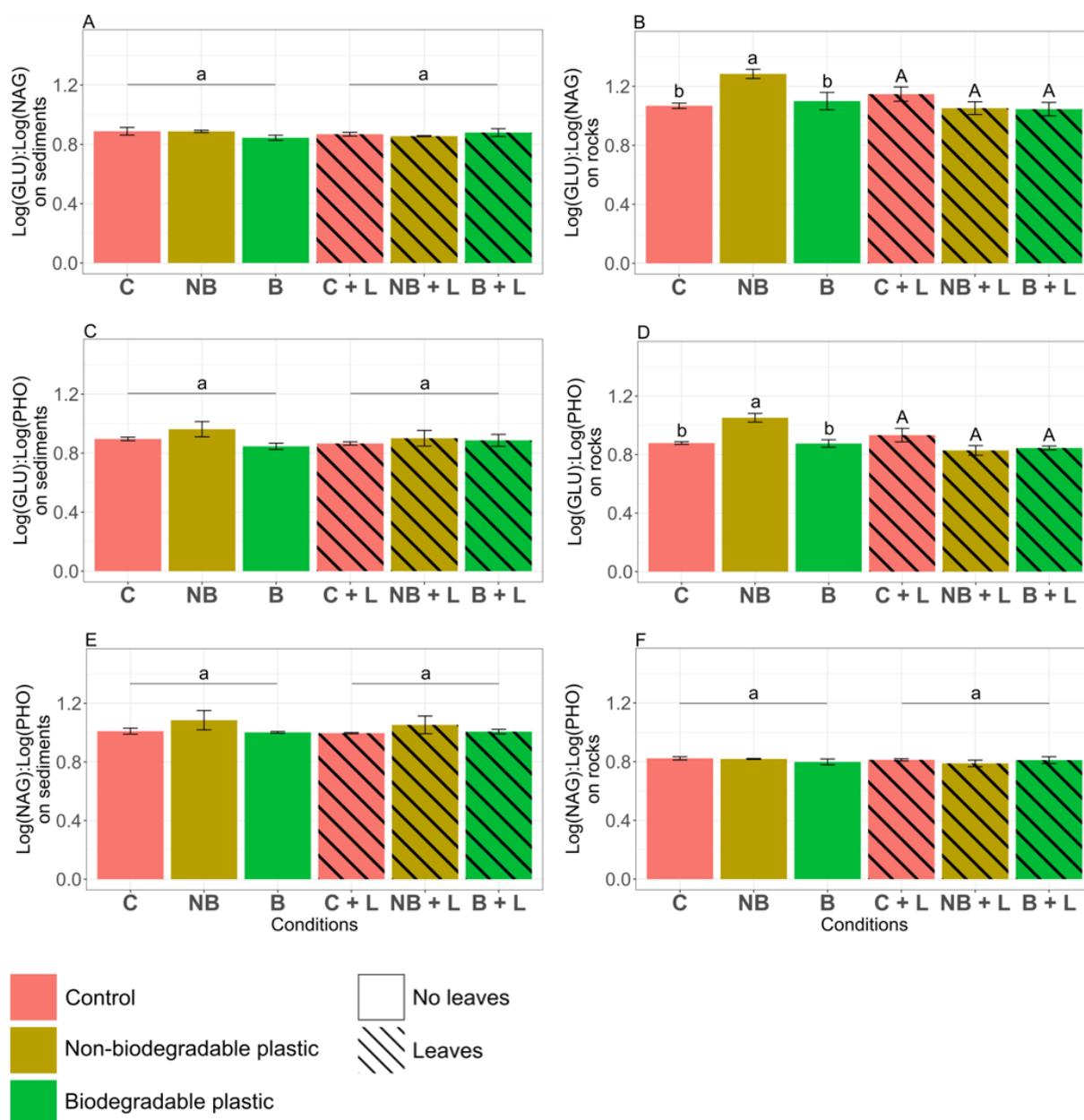


Figure S3: Log ratio of extracellular enzyme activities on biofilms of sediments and of rocks. Log(GLU):Log(NAG) (A, B); Log(GLU):Log(PHO) (C, D) and Log(NAG):Log(PHO) (E, F). Values are means ($n = 3$) \pm SE per conditions. Two-way Anova test factors plastic, leaves and plastic \times leaves. The effect of leaves is represented by horizontal bars surmounted by letters indicating the difference between the groups leaves and non-leaves. In the case of plastic \times leaves interaction effect is detected, a one-way Anova testing the effect of factor plastic followed by a Tukey test is performed for the groups leaves and non-leaves separately. Lowercase letters indicate differences between the three conditions within the no-leaf group ($a > b$). Capital letters indicate differences between the three conditions within the leaf group ($A > B$).

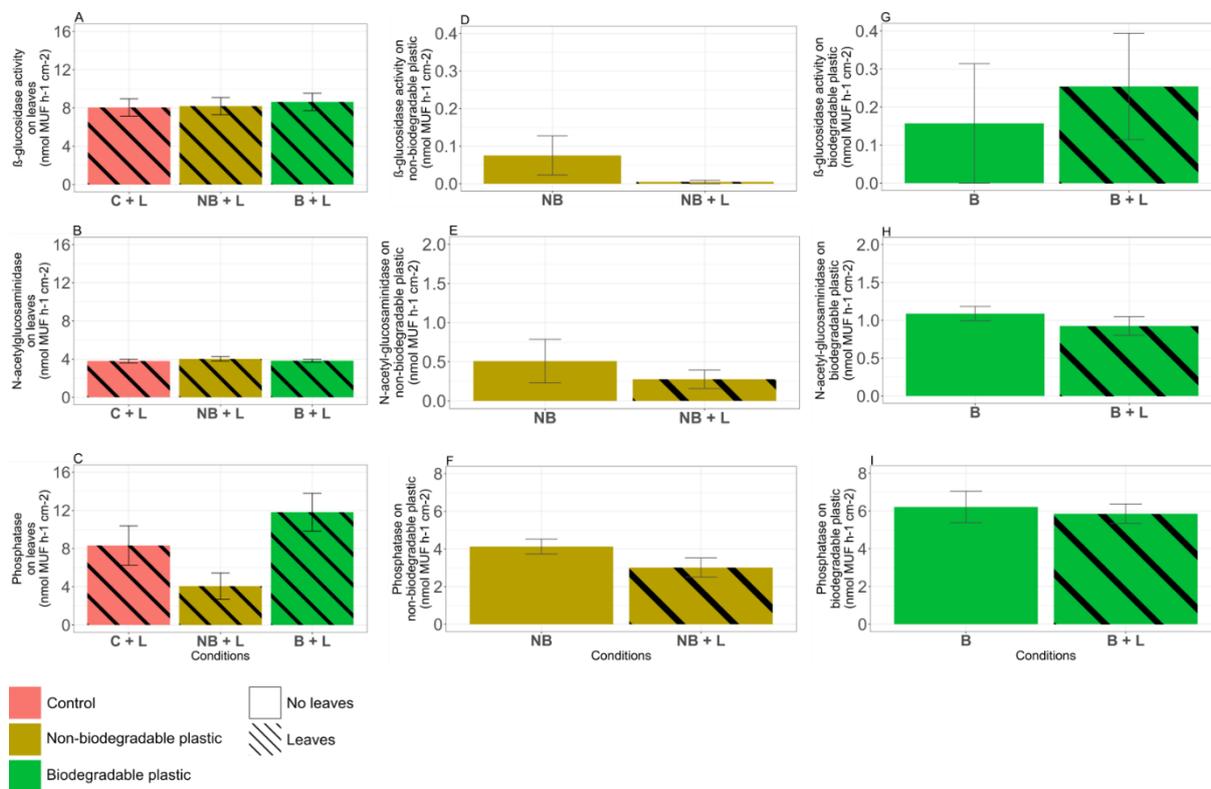


Figure S4: Extracellular enzyme activities on leaves and both plastics. β -D-glucosidase (A, D, G); N-acetylglucosaminidase (B, E, H) and phosphatase (C, F, I). Leaves (A, B, C); non-biodegradable plastic (D, E, F); biodegradable plastic (G, H, I). Values are means ($n = 6$) \pm SE per conditions. The effect of plastic was tested on leaves and the effect of leaves was tested on plastics by one-way ANOVA ($P < 0.05$).

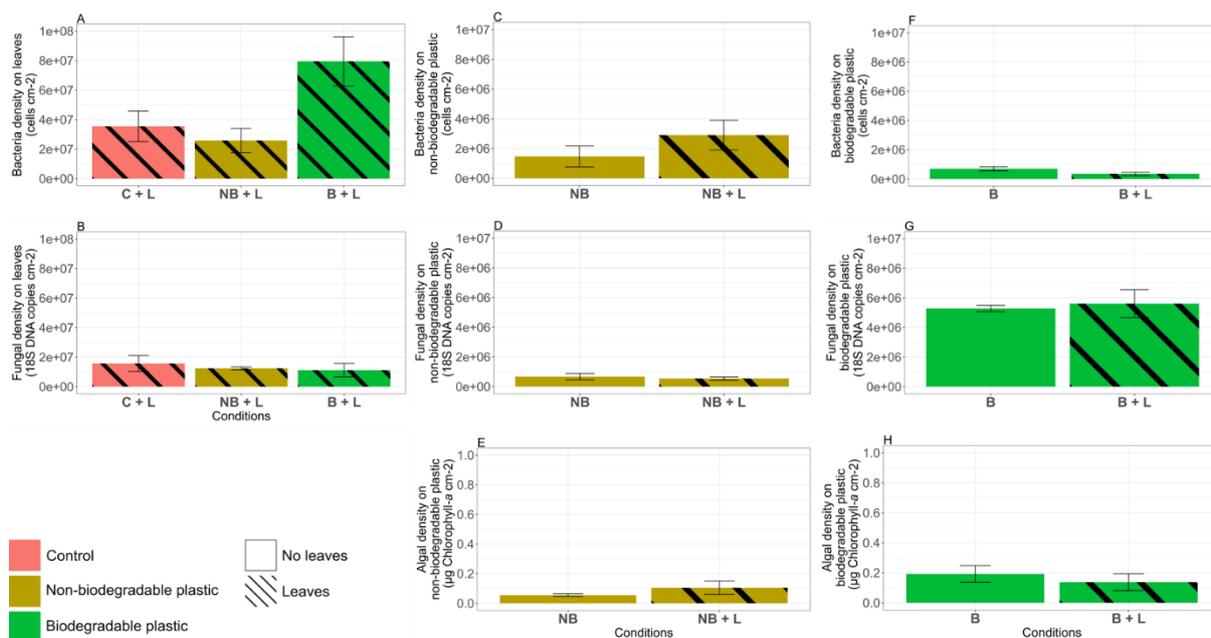


Figure S5: Microbial densities on leaves and both plastics. Bacteria (A, C, F); fungi (B, D, G) and algae (E, H). Leaves (A, B); non-biodegradable plastic (C, D, E); biodegradable plastic (F, G, H). Values are means ($n = 6$) \pm SE per conditions.

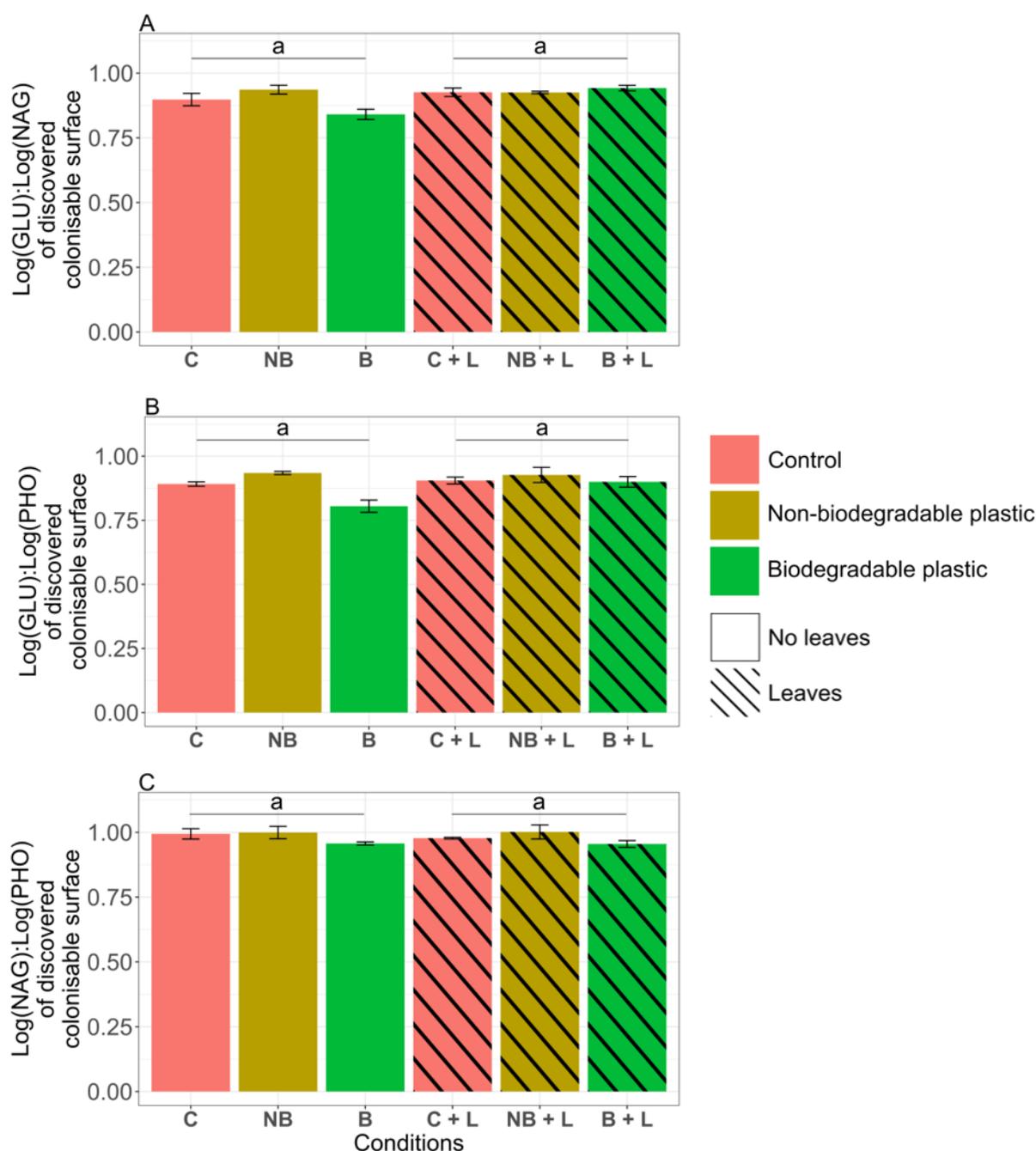


Figure S6: Cumulative extracellular enzymatic activities Log ratios of biofilm on each substratum by channel for each microcosms conditions. Log(GLU):Log(NAG) (A); Log(GLU):Log(PHO) (B); Log(NAG):Log(PHO) (C). Values are means ($n = 3$) \pm SE per conditions; because $n = 3$ channels per condition. Two-way Anova test factors plastic, leaves and plastic x leaves. The effect of leaves is represented by horizontal bars surmounted by letters indicating the difference between the groups leaves and non-leaves. In the case of plastic x leaves interaction effect is detected, a one-way Anova testing the effect of factor plastic followed by a Tukey test is performed for the groups leaves and non-leaves separately. Lowercase letters indicate differences between the three conditions within the no-leaf group ($a > b$). Capital letters indicate differences between the three conditions within the leaf group ($A > B$).

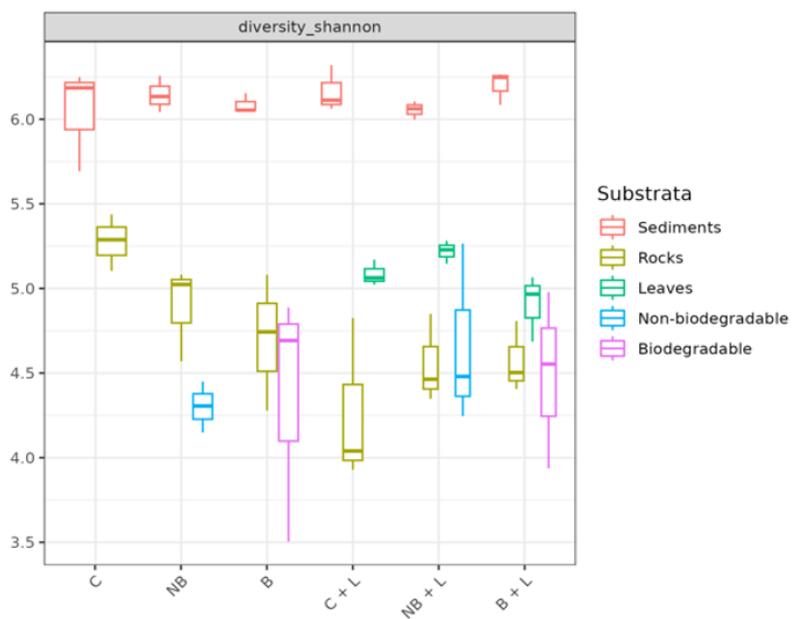


Figure S7: Shannon indexes of bacterial communities for each substratum and each condition.

DISCUSSION GENERALE

l) Contexte de la contamination plastique dans les cours d'eau anthropisés : l'exemple de la rivière Artière

La rivière Artière située dans le centre de la France offre un contexte intéressant pour étudier l'impact de la contamination plastique sur les cours d'eau anthropisés car l'utilisation des sols est très diversifiée le long de son parcours ; avec des zones boisées et de prairies en amont, des zones fortement urbanisées dans la section intermédiaire et des zones agricoles en aval (Rossi *et al.* 2019). Dans notre étude, nous avons observé des niveaux significativement différents de contamination plastique entre le site en amont, où aucun macroplastique n'a été détecté, et le site en aval, fortement contaminé. La forte contamination plastique observée sur le site aval est probablement due aux débordements des égouts unitaires pendant les épisodes de fortes tempêtes ou d'orages, mettant en évidence les défis de la gestion des déchets plastiques en milieu urbain. Les débris de macroplastiques trouvés dans le site en aval étaient principalement du polystyrène, du polypropylène et du polyéthylène, des matériaux communs dans d'autres systèmes aquatiques (Browne, Galloway and Thompson 2010; Klein, Worch and Knepper 2015; Blettler *et al.* 2019; van Calcar and van Emmerik 2019; van Emmerik and Schwarz 2019). La forte contamination plastique dans le site en aval était particulièrement préoccupante, avec des niveaux dépassant souvent ceux observés dans d'autres rivières à travers le monde ; par exemple de 0,5 à 1,2 éléments m^{-2} (Kiessling *et al.* 2019), 5 éléments m^{-2} (Blettler *et al.* 2019), ou encore 0,6 à 113 $g m^{-2}$ (Liro, Mikuś and Wyzga 2022) contre un totale de 2 à 29 éléments m^{-2} ou 0,1 à 555 $g m^{-2}$ trouvé à l'aval de notre site d'étude. Cependant, il est important de noter que les protocoles de quantification de la pollution plastique dans les rivières ne sont pas encore standardisés, ce qui soulève des défis pour la comparaison des résultats entre différentes études. En effet, en fonction des études les protocoles varieront en fonction du lieu de prélèvement du bassin versant : l'eau (Gasperi *et al.* 2014; Morrith *et al.* 2014; Sadri and Thompson 2014; Lahens *et al.* 2018), les sédiments (Hoellein *et al.* 2014; Guerranti *et al.* 2017), les berges (Hoellein *et al.* 2014; Bruge *et al.* 2018; Kiessling *et al.* 2019; Tramoy *et al.* 2019), plus ou moins éloignés du lit de la rivière. Les protocoles varieront aussi en fonction de l'extension de la zone échantillonnée pouvant aller d'un site unique de prélèvement (Castro-Jiménez *et al.* 2019; Tramoy *et al.* 2019) à plus de deux voir même plusieurs dizaines (Bruge *et al.* 2018; van Calcar and van Emmerik 2019). Les protocoles varient également en fonction de l'échelle de temps de prélèvement allant d'un prélèvement unique

(Tramoy *et al.* 2019) à une cinétique de temps (Carson *et al.* 2013a; Lechner *et al.* 2014; Lahens *et al.* 2018; van Emmerik *et al.* 2018). Cela varie aussi en fonction de la taille de plastique recherché comme le microplastique et / ou le mésoplastique et / ou le macroplastique (Lechner *et al.* 2014; Tramoy *et al.* 2019). Les quantifications varient aussi en fonction de la manière de prélever les plastiques pouvant se faire grâce à des filets de pêche (Morritt *et al.* 2014), par filet manta (Sadri and Thompson 2014), ou manuellement avec quadrillage de zones bien précis sur le terrain (Kiessling *et al.* 2019; Tramoy *et al.* 2019; Laffet *et al.* 2023). De plus, les échantillons une fois rapportés au laboratoire, ne seront pas nécessairement analysés de la même manière ; c'est-à-dire que les fragments de plastiques peuvent être quantifiés en poids ou bien en nombres d'éléments. Plus précisément, les unités peuvent être des grammes ou des kilogrammes de plastiques ou un comptage de nombre de fragment par unité de temps ou par habitant ou par surface ou par volume d'eau (Tableau 1). Une harmonisation des protocoles d'échantillonnage serait idéale. Cependant, la mise en évidence de la pollution plastique, ses caractérisations et ses quantifications permettent une certaine comparaison et une appréciation des différents niveaux de contamination entre des sites divers.

Dans la littérature actuelle, il est notable que la majorité des études se concentrent davantage sur les microplastiques que sur les macroplastiques en ce qui concerne la pollution plastique dans les écosystèmes aquatiques. Cette prédominance de la recherche sur les microplastiques peut être attribuée à plusieurs facteurs. Tout d'abord, les microplastiques, en raison de leur petite taille, sont plus difficiles à éliminer des environnements aquatiques et peuvent être ingérés par une plus grande variété d'organismes (Cole *et al.* 2013; Holzer *et al.* 2022), ce qui suscite des préoccupations sur les impacts potentiels sur la chaîne alimentaire et la santé des écosystèmes et sur la santé humaine. En outre, on suppose que les microplastiques sont souvent plus abondants dans les environnements aquatiques de par leur petite taille que les macroplastiques, ce qui en fait un sujet de préoccupation majeure. Cela peut être également dû à l'émergence de la conscience « environnementale » durant les années 1960 – 1970 où il y a eu une prise de conscience croissante de la pollution plastique dans les océans qui a conduit à des efforts pour quantifier la présence de macroplastiques, tels que les sacs en plastique, les bouteilles et les filets de pêche, sur les plages et dans les océans. À ce stade – même s'il n'y avait pas autant d'études que maintenant à ce sujet – la

recherche portait principalement sur les macroplastiques, car ils étaient visibles à l'œil nu et plus faciles à quantifier. Dans les années 2000, on a assisté à une évolution vers la détection des microplastiques au cours de laquelle la recherche a commencé à se concentrer sur les microplastiques en raison de leur petite taille et de leur potentiel impact et persistance sur les écosystèmes marins (Andrady 2011). Par la suite, il y a eu un certain intérêt pour la recherche concernant les nanoplastiques qui a émergé courant années 2010, mais c'est depuis le milieu des années 2010 que cette recherche a pris plus d'ampleur avec la question des sources et du devenir de ces nanoplastiques (da Costa *et al.* 2016). Cette recherche a entraîné un questionnement encore plus récent sur les impacts de cette fraction de taille de plastique sur la vie microbienne aquatique notamment (Miao *et al.* 2019a, 2019b, 2022; Du *et al.* 2022; Holzer *et al.* 2022). En parallèle de cette prise de conscience, on a vu l'émergence de méthodes spécifiques pour la collecte, l'isolation et la quantification des plastiques de petites tailles, notamment l'utilisation de filets à maille fine, de filtrations et de techniques de laboratoire sophistiquées comme la microscopie électronique à balayage (MEB) et la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR), pour caractériser et détecter les différents types de plastiques dans l'eau, les sédiments marins et d'autres milieux aquatiques (Mumtaz, Khan and Hassan 2010; Dey *et al.* 2020; Cappello *et al.* 2021; Rasmussen *et al.* 2021). Ajoutons à cela l'apparition de normes qui ont contribué à la quantification de ce type de plastique notamment, la norme EN 14046 promulguant l'évaluation de la disponibilité en eau et la gestion de l'eau dans un contexte de durabilité environnementale et la norme ISO 22628, qui traite des méthodes d'analyse des microplastiques dans l'eau. Ces normes visent à fournir des directives générales pour la recherche sur les plastiques dans le milieu aquatique, mais même avec ces normes, la recherche sur les plastiques reste un domaine en évolution, et les chercheurs ont adapté les méthodes en fonction des caractéristiques uniques de leur étude, avec les questionnements et les techniques à disposition. Par conséquent, bien que des normes existent, il peut toujours y avoir une certaine variabilité dans la manière dont les chercheurs quantifient les plastiques dans différents contextes. Cela montre l'importance de la flexibilité et de l'adaptabilité dans la recherche sur les plastiques, tout en reconnaissant les efforts visant à établir des protocoles standardisés. Même si des normes existent, elles n'impliquent pas nécessairement une standardisation stricte, laissant place à des adaptations en fonction des besoins spécifiques de chaque étude.

La recherche sur la quantification, la caractérisation et sur les impacts environnementaux des microplastiques est pertinente, toutefois, il est important de reconnaître que les macroplastiques peuvent avoir également un impact significatif sur la diversité et fonctions des communautés microbiennes aquatiques d'eau douce lenticue (Miao *et al.* 2020; Batista *et al.* 2022).

Les débris de macroplastiques trouvés dans le site en aval de l'Artière étaient exclusivement de nature non-biodégradable (ex. polystyrène, polypropylène et polyéthylène); aucun fragment de macroplastique biodégradable (ex. plastiques biosourcés) a été retrouvé. Ceci reflète la prédominance des plastiques traditionnels à base de pétrole dans l'environnement, d'une part parce qu'historiquement, ils ont été les premiers à être conçus et massivement utilisés (Fawcett and Gibson 1939; Brydson 1999; Sailors and P. 2006; Demirors 2011) – contrairement aux plastiques biosourcés dont l'utilisation est beaucoup plus récente (Gonzalez-Gutierrez *et al.* 2010) – et d'autre part, parce que les plastiques biosourcés sont moins durable dans l'environnement car il sont davantage soumis à la biodégradation et à la dégradation abiotique (Aina *et al.* 2016; Hasan *et al.* 2020; Zoungranan *et al.* 2020). Cet aspect qualitatif illustre l'omniprésence des plastiques traditionnels et persistants dans nos écosystèmes mais ne signifie pas une totale absence de la catégorie des plastiques biosourcés dans l'environnement. La présence historique de ce type de plastique dans l'environnement à cause de leur utilisation intensive et de leur gestion insuffisante au cours de ces dernières décennies doit alerter quant à la gestion future des plastiques biosourcés car bien qu'une partie de la composition de ces matériaux soit biodégradable, une part de la composition reste des polymères plastiques dont la durabilité dans l'écosystème et dont l'impact sur la vie interroge.

II) Colonisation microbienne des macroplastiques en écosystème fluvial

Au regard des nombreuses études qui portent sur les impacts des plastiques en écosystème marin (e.g. Harrison *et al.* 2018; Jacquin *et al.* 2019; Leistenschneider *et al.* 2023; Oberbeckmann, Kreikemeyer, and Labrenz 2018), un nombre beaucoup moins important d'études traitent de la colonisation et de l'impact du plastique en écosystème d'eau douce (Harrison *et al.* 2018; Amaral-Zettler, Zettler and Mincer 2020). C'est dans ce contexte que s'inscrit l'objectif principal de ce travail, qui était notamment d'explorer comment les

communautés microbiennes colonisent différents substrats benthiques, y compris les plastiques, dans ces deux sites fluviaux présentant des niveaux de contamination plastique contrastés. Au cours de notre expérience de colonisation de quatre semaines, nous avons pu observer la formation de biofilms matures sur l'ensemble des substrats étudiés, notamment les feuilles, les sédiments, les rochers, le plastique biodégradable (BDBP) et le plastique non-biodégradable (LDPE). Il est important de noter que les densités bactériennes et les activités enzymatiques mesurées dans les sédiments, les rochers et les feuilles étaient comparables à celles relevées dans d'autres études en écosystèmes fluviaux tempérés (Sabater and Romani 1996; Romani *et al.* 2004a; Artigas *et al.* 2009). Cela suggère que les microorganismes ont réussi à coloniser avec succès ces différents substrats, indépendamment de leur nature.

L'une des découvertes les plus intéressantes de notre étude est que la colonisation microbienne des plastiques, qu'ils soient biodégradables ou non, présentait des caractéristiques fonctionnelles plus similaires à la colonisation des rochers qu'à celle des feuilles ou des sédiments (Laffet *et al.* 2023). Cette observation souligne l'influence prépondérante du substrat sur la composition et la fonction des communautés microbiennes comme l'on également suggéré Miao *et al.* (2019a). Ces auteurs ont observé des différences de colonisation microbienne entre les substrats plastiques polyéthylène, polypropylène et des substrats naturels des pavés (proxy des rochers) et du bois. Nos résultats rejoignent ceux rapportés par Chaudhary *et al.* (2022) qui retrouvent une certaine similarité de valeurs d'activité enzymatique extracellulaire entre la plastisphère et les biofilms des rochers. En effet, les biofilms formés sur les plastiques et les rochers pourraient avoir un fonctionnement similaire, car plus dépendants des apports nutritifs via la colonne d'eau, en comparaison aux biofilms des sédiments et des feuilles beaucoup plus riches en matière organique.

Concernant la diversité microbienne, la composition des communautés de procaryotes et d'eucaryotes dans les deux types de plastiques était plus proche de celle observée dans les feuilles que sur les rochers et les sédiments quel que soit le site étudié. Néanmoins, on peut se poser la question de l'évolution des similarités et des différences de composition des communautés entre les substrats. Selon Chaudhary *et al.* (2022), la composition des communautés bactériennes, fongiques et algales ont peu de différences significatives entre les substrats plastiques (tels que le polyéthylène basse densité et le PVC) et les rochers

naturels, mais au cours du temps, les communautés ont considérablement changé de composition.

Il est particulièrement intéressant de noter que du point de vue de la structure des communautés microbiennes, les plastiques et les feuilles présentent une similarité marquée dans notre étude. Cependant, malgré la similarité structurelle (diversité) de ces communautés, nous observons des différences notables dans leur fonctionnement. En particulier, les activités enzymatiques extracellulaires varient considérablement entre les plastiques et les feuilles et celles des plastiques ressemblent davantage à celle des rochers. Cette divergence fonctionnelle suggère que la diversité microbienne, bien que similaire du point de vue de la structure, peut être fonctionnellement différente en fonction des substrats. Les microorganismes présents sur les plastiques et les feuilles peuvent avoir des rôles et des fonctions spécifiques qui se traduisent par des activités enzymatiques distinctes. En d'autres termes, pour des communautés à la structure similaire, les microorganismes n'expriment pas de la même manière les fonctions, en fonction du substrat sur lequel ils se situent suggérant un lien direct avec l'environnement proche du biofilm. Ces observations mettent en évidence l'importance des liens complexes entre la diversité microbienne et les fonctions au sein des communautés microbiennes. Comprendre ces liens diversité-fonctions est essentiel pour éclairer les mécanismes sous-jacents à la réponse des communautés microbiennes aux changements environnementaux tels que la pollution plastique.

Nos résultats, confirment la rapidité et la facilité de formation des biofilms sur les substrats synthétiques tels que le LDPE et le BDBP en environnement d'eau douce, tout comme mesuré par Chaudhary *et al.* (2022) sur les mesoplastiques ou par Miao *et al.* (2020) sur des macroplastiques également en système lentique et lotique. Nos résultats suggèrent donc que les plastiques tels que le LDPE et le BDBP doivent être considérés comme des substrats propices au développement de biofilms et pourrait avoir des répercussions significatives sur l'écosystème local. Les biofilms formés sur les plastiques peuvent potentiellement influencer la qualité de l'eau, la biodiversité locale, la chaîne alimentaire et les fonctions de l'écosystème.

III) Impact de l'ajout de plastique sur les communautés microbiennes des sédiments et des rochers

De façon générale, nos travaux soulignent l'impact de la présence de plastique au niveau structurel et fonctionnel sur des communautés des rochers (périphytiques) voisines, tandis qu'aucun impact des plastiques n'a été observé sur les sédiments.

La présence simultanée des plastiques et des feuilles a eu pour effet d'augmenter l'indice de diversité de Shannon des communautés bactériennes sur les rochers. De plus, nous avons mesuré une abondance relative plus élevée de Bacteroidota sur les rochers en présence plutôt qu'en l'absence de plastique. Cela indiquerait un léger impact de la présence de plastique sur les communautés des rochers. Ainsi, la présence de plastique apporterait peut-être une diversité différente car pourrait introduire ou du moins augmenter certain phylum dans l'écosystème. Selon Miao *et al.* (2019a), des abondances significativement plus élevées de *Pirellulaceae*, *Phycisphaerales*, *Cyclobacteriaceae* et *Roseococcus* ont été observées sur les substrats plastiques par rapport aux substrats naturels. Néanmoins, l'étude a également révélé que la diversité alpha (richesse et équitabilité) était plus faible dans les communautés associées aux microplastiques que dans celles des substrats naturels (Miao *et al.* 2019a). Nous avons constaté une légère diminution de l'indice de diversité alpha de Shannon pour les bactéries des rochers diminué en présence des deux types de plastiques (sans les feuilles). Alors, est-ce que la présence de plastiques supplanterait une certaine diversité microbienne dans le milieu ? Cette hypothèse est à modérer dans la mesure où, pour ce qui est des champignons, nous n'avons pas observé de différence claire de diversité alpha sur les rochers ou dans les sédiments en présence des deux types de plastiques. Dans l'étude de Miao *et al.* (2019a), les auteurs suggèrent une sélection des espèces microbiennes due au type de substrat. Au vu de nos résultats, nous les rejoignons sur ce point, cependant nous nuancions cette conclusion concernant la structure des communautés, car cela diffère en fonction du type de substrat naturel que l'on compare. En effet, nous avons trouvé que la composition eucaryote et procaryote était plus proche de celle observée dans les feuilles par rapport aux rochers dans notre étude « **COLONIZATION** ». Et dans notre étude « **IMPACT** », nous n'avons pas trouvé de différence de structure de communauté en termes de diversité bêta entre les deux types de plastiques, les feuilles et les rochers tandis qu'elles différaient de celle des sédiments (Figure 7, Article 2).

Notre étude a aussi montré l'impact indirect de l'augmentation de l'activité β -glucosidase (décomposition de polysaccharides) des communautés des rochers en présence de plastique non-biodégradable, tandis qu'aucun impact a été observé en présence du plastique biodégradable ni sur les sédiments. Une étude récente montre que l'application de nano-billes de polystyrène aurait inhibé l'activité β -glucosidase des biofilms de rochers d'eau douce (Miao, Hou, *et al.* 2019b). Une deuxième étude montre la diminution des activités enzymatiques β -glucosidase, glycine-aminopeptidase et phénol oxydase, des communautés microbiennes associées à la litière de feuille en rivière suite à l'application des nanoplastiques de polystyrène (Du *et al.* 2022). Cette sensibilité plus importante des communautés du périphyton aux plastiques pourrait être due aux différences en termes de disponibilité des nutriments et de la matière organique entre substrats benthiques. Les rochers, ayant une plus faible disponibilité en nutriments et en matière organique que les sédiments ou les feuilles, pourraient être plus sensibles aux perturbations causées par le plastique. Cet impact clair peut aussi être dû à la libération de substances nocives en provenance du plastique qui seraient potentiellement libérées dans l'eau (Hahladakis *et al.* 2018), ce qui aurait pu impacter négativement les communautés microbiennes des rochers. Ou bien dû à un processus de compétition pour les nutriments entre communauté des plastiques et communauté des rochers. Quoi qu'il en soit, les études actuelles traitent beaucoup de la colonisation des microorganismes et de leur structure propre à la plastisphère (Wang *et al.* 2021b), ou bien comparent la plastisphère à l'eau environnante (McCormick *et al.* 2016; Li *et al.* 2021) ou aux substrats naturels tels que les rochers, les sédiments, les feuilles ou le bois (Miao *et al.* 2019c, 2020, 2021; Chaudhary *et al.* 2022) plutôt qu'analyser l'impact de la plastisphère sur les communautés microbiennes des substrats naturels. Cependant, ce type d'étude existe, mais les auteurs soumettent des fragments de plastique de petites tailles (nano et microplastiques) directement sur des biofilms pour en mesurer l'impact (Miao *et al.* 2019a; Du *et al.* 2022; Holzer *et al.* 2022; Merbt *et al.* 2022) et ne mesure pas l'impact de la présence de macroplastiques sur lesquels se forment les biofilms. Nos travaux apportent un regard original sur l'impact de la pollution plastique sur l'écologie microbienne des cours d'eau.

Quel que soit l'impact observé (fonctionnel ou structurel) des plastiques sur les communautés des rochers, les effets observés ont été atténués en présence de feuilles.

L'ajout de la litière de feuilles d'Aulne a restauré un certain équilibre entre les différentes conditions avec ou sans plastiques. Cet effet des feuilles mérite d'être souligné, car cela indique que les feuilles peuvent avoir un impact significatif sur la dynamique des communautés microbiennes en présence de plastiques dans les écosystèmes fluviaux. Cette observation suggère que les feuilles peuvent agir comme un facteur atténuant, potentiellement en modifiant la disponibilité des nutriments, en fournissant des substrats alternatifs pour la colonisation microbienne, ou en influençant d'autres paramètres environnementaux susceptibles d'influencer la diversité et les fonctions du périphyton.

Nos résultats mettent en lumière l'impact des plastiques sur les communautés microbiennes naturelles des écosystèmes fluviaux et s'inscrivent dans un contexte scientifique plus vaste d'écologie microbienne aquatique. Nos résultats soulignent les implications écologiques sur la colonisation microbienne des plastiques, notamment en ce qui concerne le réseau trophique aquatique. Les plastiques peuvent être ingérés par des organismes aquatiques, entraînant ainsi une potentialité de bioaccumulation des plastiques à travers les niveaux trophiques (Holzer *et al.* 2022). Ceci soulève des questions sur la santé des écosystèmes et *in fine* sur la sécurité alimentaire. Dans l'ensemble, notre recherche contribue à éclairer les effets de la pollution plastique sur l'écologie des communautés microbiennes des rivières, mais elle devrait s'inscrire sur une approche intégrée (effets sur l'ensemble du réseau trophique) pour relever les défis posés par cette forme de pollution omniprésente dans les écosystèmes aquatiques.

IV) Différence de colonisation et d'impact entre le plastique dit « non-biodégradable » et le plastique dit « biodégradable »

A ma connaissance, très peu d'études ont comparé la colonisation microbienne entre plastiques « non-biodégradable » et plastiques « biodégradable » en eaux douces, c'est pour cette raison que les exemples cités dans ce paragraphe concernent essentiellement le milieu marin. Dans l'étude de Nauendorf *et al.* (2016), en moyenne, les sacs en plastique biodégradable étaient cinq fois plus colonisés par des microbes aérobies et huit fois plus par des microbes anaérobies que les sacs en polyéthylène. Ces résultats corroborent un aspect important de notre étude qui traite de la différence de colonisation entre le BDBP et le LDPE.

En effet, nous avons observé des activités enzymatiques et des densités bactériennes plus élevées dans le BDBP par rapport au LDPE dans le site aval de l'Artière (Laffet *et al.* 2023). Ces différences peuvent s'expliquer, en partie, par la composition chimique différente entre ces deux plastiques. Le BDBP contenait en partie de l'amidon, tandis que le LDPE était composé de polyéthylène. Cette différence a conduit à des taux d'activités enzymatiques et densités bactériennes supérieurs dans le BDBP, suggérant une dégradation accrue de l'amidon et peut-être du copolymère utilisé dans la fabrication du BDBP et dont la composition exacte n'est pas indiquée par le fabricant. D'autres explications de cette différence de colonisation soulevées par Nauendorf *et al.* (2016), impliquent la rugosité des matériaux qui serait plus importante sur les sacs biodégradables et qui fournirait davantage de sites d'adhérence pour les microorganismes, favorisant ainsi la colonisation par rapport aux sacs non-biodégradables qui seraient plus lisses dans cette étude. Ils ont également avancé l'argument des propriétés hydrophiles des sacs biodégradables qui peuvent rendre la surface plus favorable à la colonisation, car elles favorisent l'adhérence des nutriments nécessaires à la croissance microbienne (Nauendorf *et al.* 2016).

Les différences de colonisation microbienne entre plastique « biodégradable » et « non-biodégradable » ne sont pas toujours observées. En effet, la formation de biofilms sur des plastiques « compostables » et « non compostables » ont montré des différences en fonction de leur position (dans les sédiments ou dans la colonne d'eau) et non pas en fonction de leur nature chimique (Delacuvellerie *et al.* 2021), bien que cette étude traitât plus d'un aspect de comparaison de décomposition que de colonisation entre les différents types de plastiques. Dans notre étude, les différences de colonisation entre le BDBP et le LDPE ont été observées seulement sur le site en aval de la rivière Artière (Laffet *et al.* 2023) caractérisé par une température de l'eau plus élevée, des concentrations en nutriments accrues et une pollution plastique plus importante que sur le site en amont. Ces différences soulignent l'interaction complexe entre la contamination plastique, les caractéristiques environnementales et les communautés microbiennes. Il est possible que les communautés microbiennes du site aval de l'Artière soient adaptées à la présence de plastiques, aient une disponibilité en nutriments et des températures favorables, influençant ainsi la colonisation des plastiques de manière distincte. D'où la nécessité de pouvoir corrélérer les paramètres physico-chimiques aux paramètres biologiques de colonisation des biofilms microbiens. De même, Oberbeckmann *et al.* (2014) ont observé des variations de la colonisation microbienne

des plastiques en milieux marin en fonction des saisons et de la localisation géographique. D'autre part, Miao *et al.* (2020) soulignent que malgré des différences d'activité métabolique liée à l'utilisation du carbone mesurées entre les substrats plastiques et les rochers dans quatre écosystèmes d'eau douce, ce sont les facteurs environnementaux qui avaient le plus fort impact sur les différences métaboliques observées par rapport aux types de substrats.

Nos observations mettent en relief la complexité des interactions entre les microorganismes et les différents types de plastiques et donc, l'importance de prendre en compte des facteurs tels que i) la composition chimique, la rugosité de surface et les propriétés hydrophiles des plastiques, ii) les caractéristiques physico-chimiques des écosystèmes aquatiques étudiés, et iii) les possibles adaptations des communautés microbiennes à la contamination par les plastiques. L'ensemble de ces facteurs permettront d'améliorer la compréhension de la colonisation microbienne des plastiques.

V) Impact à l'échelle d'un microcosme entier et quid de l'impact réel à l'échelle d'un écosystème

A notre connaissance, aucune étude n'a traité à la fois l'impact de la présence de plastique sur les communautés naturelles des rochers et des sédiments et à la fois l'estimation de l'impact à l'échelle de l'ensemble de substrats benthiques présents dans le lit de la rivière (échelle microcosme). L'objectif de ce changement d'échelle était justement d'aider à l'évaluation de l'impact des plastiques sur l'écosystème de rivière et son fonctionnement microbien. Pour prendre en compte l'ensemble des substrats dans les microcosmes de rivière, nous avons pris nos mesures de descripteurs (activités enzymatiques, densités microbiennes) que nous avons pondérés par la surface du substrat réellement occupée dans le canal (par multiplication de la mesure initiale en cm^2 par la surface du substrat occupée dans le canal), que nous avons ensuite additionné et divisé par la surface découverte (pour éviter de prendre en compte les surface de substrat se superposant). Les principaux résultats montrent que la présence de plastiques, en particulier de plastique non biodégradable au sein du benthos du microcosme, a eu pour effet une réduction des activités microbiennes N-acétyl-glucosaminidase et phosphatase et la biomasse d'algues et de champignons. Ce résultat pourrait s'expliquer par la faible colonisation microbienne en champignons et algues sur les

plastiques en comparaison aux sédiments ou feuilles. Néanmoins, la présence de plastiques n'a pas affecté la densité bactérienne ni l'activité β -D-glucosidase à l'échelle du microcosme suggérant que la présence de plastiques aurait tendance à favoriser les communautés bactériennes au détriment des communautés fongiques ou algales. Plus globalement, les capacités d'absorption du glucose et des nutriments (azote et phosphore) au niveau des microcosmes sont restées inchangées en présence de plastiques par rapport aux conditions sans plastiques. Ces résultats montrent que malgré l'influence des plastiques sur l'accumulation de biomasses microbiennes dans le microcosme, leur capacité pour retenir/utiliser des nutriments n'est pas altéré.

Le calcul d'*upscaling* (échelle du microcosme) tend à améliorer la représentativité de nos données vis-à-vis d'un écosystème réel. Cependant, en termes de représentativité, l'utilisation de microcosmes présente des limites inhérentes par rapport aux écosystèmes naturels. Il y aura toujours des spécifications et des différences, alors il faut que les conclusions tirées à partir des microcosmes soient interprétées comme des tendances générales propre au design expérimental plutôt que comme des répliques exactes du comportement naturel. Nous avons fait le choix de prendre en compte les effets des plastiques et des feuilles sur les communautés des surfaces découvertes et non celles des surfaces de substrats superposées. En faisant cela, on surestime les impacts des plastiques à l'échelle du microcosme car les l'activités et les biomasses des sédiments et des rochers couverts par les plastiques ne sont pas considérés dans nos calculs.

De plus, concernant notre design expérimental, nous avons choisi des surfaces de couverture fixes de 60 % plastique et de 30 % feuille. Ces surfaces ont été choisies en accord avec les estimations de (Joly *et al.* 2019) qui ont suggéré un impact significatif sur les activités de recyclage du phosphore et de l'azote à partir d'une couverture de plastique supérieure à 60 % sur le benthos de rivière. Une couverture de 60 % de plastique peut sembler peu réaliste, or dans certaines rivières – bien que la quantification se fasse par nombre d'éléments ou par poids – sont très élevés notamment dans les rivières d'Asie qui se trouvent être parmi les plus pollués au monde en matière de plastique (Blettler *et al.* 2018).

En résumé, l'*upscaling* que nous avons réalisé est une méthode valable pour tenir compte des différences de surface entre les substrats dans nos microcosmes de rivière.

Cependant, il est essentiel de garder à l'esprit les limites inhérentes aux microcosmes et de faire preuve de prudence lors de l'interprétation des résultats, en les considérant comme des indications générales plutôt que comme une réplique exacte de l'écosystème.

**PERSPECTIVES et GESTION ET PREVENTION DE LA
POLLUTION PLASTIQUE**

I) PERSPECTIVES

I.1) En termes de réponse structurelle

Afin de compléter l'examen de comparaison de colonisation, il serait intéressant d'examiner la diversité microbienne à un niveau plus fin, par exemple au rang de l'espèce, associée aux plastiques biodégradables (BDBP) et aux plastiques non biodégradables (LDPE) en milieu naturel, c'est-à-dire *in situ*. Est-ce qu'il y aurait des différences de composition d'espèces microbiennes entre les plastiques et les substrats naturels, puis entre les deux types de plastiques ? Ces analyses de diversité pourraient donner des éléments de réponse supplémentaires sur l'influence de la nature du substrat sur la colonisation microbienne et *in fine* relier ces éléments de structure et de fonctions.

I.2) En termes de réponse fonctionnelle

L'exploration approfondie de la façon dont les microorganismes s'adaptent aux plastiques en termes de physiologie et de métabolisme passerait par une analyse de leurs métabolismes. Cela permettrait de répondre à des questions telles que ; comment les microorganismes peuvent-ils modifier leur métabolisme pour dégrader les composants plastiques, comme les polymères complexes, les additifs chimiques ou les résidus d'amidon ? L'adaptation des microorganismes à ces substrats artificiels peut offrir des informations sur leur potentiel de biodégradation des plastiques. Il serait donc intéressant d'aborder les implications de la colonisation microbienne sur la durabilité et donc sur la dégradation des plastiques dans l'environnement fluvial, notamment sur les plastiques biosourcés. Est-ce que la présence de microorganismes favorise ou entrave la dégradation de ces plastiques ? Aborder non seulement les processus biotiques mais aussi abiotiques comme la fragmentation, l'hydrolyse ou l'oxydation des plastiques permettrait de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents de la dégradation plastique dans les environnements fluviaux.

1.3) En termes d'échelle de temps et d'interaction avec les facteurs environnementaux

Notre étude a duré au total quatre semaines, mais il pourrait être intéressant d'explorer comment une durée plus importante de colonisation des plastiques affecte la structure et la fonction des communautés microbiennes. Les observations à long terme, nécessaires pour suivre la décomposition des plastiques difficilement dégradables, pourraient révéler des dynamiques subtiles et des changements significatifs dans la diversité en fonctionnement microbiens qui pourrait fournir des pistes sur le processus de dégradation des plastiques à long terme dans les écosystèmes fluviaux.

Il serait pertinent d'aborder les interactions complexes entre la colonisation des plastiques et d'autres facteurs environnementaux (tels que la température, exposition aux UV, la disponibilité en nutriments) sur les réponses des microorganismes. Y aurait-il des interactions synergiques / antagonistes entre ces facteurs ? Ces interactions pourraient influencer la colonisation microbienne des plastiques comme souligné par Miao *et al.* (2020, 2021).

Il y a des lacunes dans la recherche actuelle, notamment en ce qui concerne l'impact à long terme des plastiques sur les écosystèmes fluviaux et les synergies potentielles avec d'autres stress environnementaux tels que la pollution chimique ou le changement climatique. Par conséquent, il est impératif de continuer à explorer ces interactions complexes et à mener des études dans une échelle de temps plus grande, pour mieux comprendre les conséquences à long terme de la pollution plastique dans un contexte physico-chimique environnemental variable.

1.4) En termes d'échelle de taille des plastiques

Si l'étude sur les microplastiques domine actuellement la recherche, il est essentiel de continuer à étudier et à surveiller attentivement les macroplastiques pour comprendre pleinement l'ampleur de leur impact sur l'environnement aquatique, et ce, quelle que soit leur taille. Dans une même étude, il serait intéressant de mesurer différents descripteurs structuraux et fonctionnels sur des tailles différentes de plastique de même nature chimique afin de vérifier si les mesures de descripteurs sont similaires ou différentes entre les fractions de taille de plastique. Il faudrait choisir des fractions de tailles de plastiques encore peu étudié

de nature chimique courante dans l'environnement, par exemple des fragments de mésoplastiques (compris entre 5 mm et 5 cm) et macroplastiques (supérieur à 5 cm) de polyéthylène. Ces fragments pourraient être mis à coloniser par les microorganismes de rivière pour ensuite être analysé en laboratoire. Ces mesures comprendraient des descripteurs de structure, comme l'analyse par *metabarcoding* (16S et 18S) afin de comparer entre fractions de taille de plastique, les différents rangs taxonomiques comme les phyla ou de descendre plus profondément en analysant les classes, les ordres ou les familles par exemple en fonction de la qualité des séquences. Les densités microbiennes bactériennes, fongiques ou algales pourraient également à nouveau être mesurées. Pour les descripteurs fonctionnels, un panel d'activités enzymatiques permettant l'acquisition de carbone, azote et phosphores pourraient être mesurées. Ou bien la capacité des biofilms à utiliser différentes sources de carbone grâce aux microplaque BIOLOG ECO Microplates par exemple.

1.5) Les feuilles

L'atténuation des impacts des plastiques par l'ajout de la litière de feuilles soulève l'idée que des solutions de restauration ou de gestion des écosystèmes fluviaux peuvent potentiellement inclure des interventions visant à maintenir ou à augmenter la présence de feuilles, ce qui peut contribuer à atténuer les effets néfastes de la pollution plastique. Il est donc essentiel de continuer à explorer ces interactions complexes pour élaborer des stratégies de conservation et de gestion plus efficaces dans les environnements fluviaux touchés par la pollution plastique. Ceci pourrait passer par l'élaboration de nouvelles études de l'impact du plastique via l'étude de descripteurs fonctionnels et structuraux microbiens puis l'interaction de l'ajout de litière de feuilles, d'une part en microcosmes ou en mésosome, puis de passer en environnement *in situ* afin de constater si les résultats sont similaires.

1.6) Impact différentiel entre sites

Nos résultats différents en fonction du site d'étude mettent en évidence la nécessité de mener des études approfondies dans divers contextes environnementaux pour évaluer pleinement l'impact des plastiques, qu'ils soient biodégradables ou non, sur les écosystèmes fluviaux. Ces résultats appellent alors à des études dans d'autres contextes pour mieux

comprendre cette problématique environnementale complexe. A ce sujet, pendant ma thèse, nous avons conceptualisé et réalisé une troisième étude permettant de progresser dans la compréhension des effets de la pollution aux macroplastiques, nous avons effectué une troisième grande manip intitulée « **CATCHMENT** » qui comprenait ce même genre d'analyse, mais à une échelle bien plus conséquente. Cette manip prenait en compte trois bassins versants, avec au total neuf sites dont trois sites par bassin versant : un en amont, un intermédiaire et un en aval. Cela permettait d'avoir un gradient de pollution plastiques, et de comparer les données entre trois sites à l'intérieur d'une même rivière, mais aussi les données entre rivières. Cette étude est en cours et permettra de répondre à différentes grandes questions : va t'on obtenir des patterns différents ou similaires ? Est-ce que sur certains sites, nous aurons un pattern similaire à celui obtenu en microcosmes ? Auquel cas il pourra se poser la question d'un impact à plus grande échelle.

A ce genre d'étude à plus grande échelle, s'ajoute un niveau de complexité qui prend en compte les facteurs physicochimiques variables d'un site à l'autre ainsi que l'impact que ces derniers ont sur les communautés microbiennes. En revanche, établir un modèle prédictif sur la base de l'acquisition de suffisamment de données avec les mêmes descripteurs les mêmes protocoles d'analyses et de quantification des plastiques sur site. Faire une étude à large échelle pour avoir une vue d'ensemble à l'échelle d'un écosystème. Une fois suffisamment de données acquises dans des bassins versant différents si un pattern, un modèle semble se dégager faisant route à un consensus, alors envisager la modélisation d'un outil prédictif. Cette modélisation prendrait en compte les données précédemment acquises, les temporalités, les données physicochimiques, la surface des rivières et les quantifications de la pollution plastiques avec une harmonisation des protocoles.

Petit à petit, ces questions peuvent également nous amener à nous interroger sur la qualité de l'eau et plus particulièrement sur l'influence de la dégradation des plastiques et du relargage de certaines substances additives qui les composent sur la qualité de l'eau sur les organismes qui y vivent. En premier lieu, il serait intéressant d'obtenir des additifs connus et commercialisés, que l'on pourrait soumettre à des microcosmes de rivières, et cela, à des concentrations différentes. Il serait ensuite intéressant d'explorer la qualité de l'eau en termes

de paramètres physicochimiques, mais aussi de paramètres biologiques structuraux et fonctionnels sur les biofilms des différents substrats, et cela, sur une cinétique de temps.

II) GESTION ET PREVENTION DE LA POLLUTION PLASTIQUE

Ces travaux ont porté sur des aspects d'écologie microbienne et d'écotoxicologie, ce qui amène, inéluctablement à des thématiques de gestion de la pollution plastique. C'est pourquoi j'aimerais terminer ce manuscrit par un aspect gestion des déchets dans les écosystèmes fluviaux.

Pour une meilleure gestion des plastiques dans les écosystèmes fluviaux, il est nécessaire de mettre en place une approche globale et multidimensionnelle qui aborde à la fois la prévention, la sensibilisation, l'éducation, la réduction et la gestion des déchets plastiques.

Les stratégies en matière de gestion des déchets plastiques sont nombreuses et très variées à commencer par une continuité dans les investissements dans la recherche et dans l'innovation. En effet, l'innovation technologique peut contribuer à améliorer la surveillance, la gestion des plastiques ainsi que de développer des méthodes de détection, de quantification des plastiques dans les rivières. Mais poursuivre les recherches dans les interactions entre les écosystèmes et cette pollution est également crucial pour saisir plus justement les impacts à plus grande échelle.

D'autres points clé qui peuvent contribuer à une meilleure gestion des plastiques dans les écosystèmes fluviaux concernent la sensibilisation du public, des communautés locales, des industries et les décideurs politiques aux impacts environnementaux des plastiques dans les rivières est essentiel. L'éducation peut contribuer à une meilleure compréhension des problèmes liés aux plastiques et à un changement de comportement. Par exemple, mettre en place des interventions obligatoires annuelles dans les écoles et lycées en vue de sensibiliser les plus jeunes générations à cette pollution pourrait contribuer à l'émergence précoce de consciences de ce problème. Il existe des actions comme par exemple l'action de science participative « Plastique à la Loupe » (PAL) lancée par la Fondation Tara Océan en 2019 qui vise à sensibiliser les collégiens et lycéens à la pollution plastique en les invitant à enquêter sur les plages et les berges de la France métropolitaine ou d'outremer. Cette action est en partenariat avec le ministère de l'éducation nationale, l'ADEME, le CEDRE et le laboratoire d'Océanographie Microbienne (LOMIC-CNRS), cette initiative encourage les jeunes élèves à collecter des données sur les macrodéchets et les microplastiques, contribuant ainsi à la

recherche scientifique et à la prise de décision politique. Concrètement, la fondation Tara Océan indique que les résultats obtenus à partir des données de l'année scolaire 2021-2022, provenant de l'étude de 142 sites sur les berges et 96 sur le littoral en France, révèlent des informations sur la quantité médiane de macrodéchets collectés est notable, avec 328 macrodéchets/100m sur le littoral et 210 macrodéchets/100m sur les berges. Ils ont également révélé des quantités de méso et microplastiques 2 à 6 fois plus importants que les fractions de tailles plus grosses. Ces microplastiques sont principalement composés de polyéthylène (PET), de polystyrène (PS) ou de polypropylène (PP), des plastiques souvent utilisés pour les emballages et les plastiques à usage unique. Ces résultats soulèvent des questions sur nos pratiques quotidiennes en tant que consommateurs. Ces travaux participatifs des élèves, menés en collaboration avec des scientifiques, contribuent à la création d'une banque de données sur la quantité, l'origine et la composition des macrodéchets et des microplastiques sur les plages et les berges françaises. Ces données contribuent également à une base de données européenne initiée lors de la mission Tara Microplastiques 2019 de la Fondation Tara Océan. Ces informations participent à une estimation plus précise des quantités de plastiques atteignant la mer, et ainsi, cela permet d'appréhender davantage d'information sur leur forme et leur origine (Fondation Tara Océan, 2023). Comme l'explique la fondation Tara Océan, sur le plan éducatif, Plastique à la Loupe s'inscrit dans la formation scientifique et dans l'éducation au développement durable. Les objectifs incluent l'encouragement de l'observation et de la réflexion, l'engagement citoyen, la sensibilisation aux enjeux de la pollution plastique, l'introduction à la pratique scientifique, le développement de l'esprit critique et la compréhension du rôle de la science dans la prise de décision politique (Fondation Tara Océan, 2023).

Il est essentiel de réduire la production de plastiques à usage unique et promouvoir des alternatives durables est une stratégie fondamentale. Cela peut inclure des réglementations supplémentaires visant à limiter la production et l'utilisation de plastiques non essentiels, ainsi que des incitations à l'adoption de produits réutilisables.

Il existe une loi française relative à la transition énergétique pour la croissance verte (TEPCV) initialement votée en 2015, cette loi interdit l'utilisation des sacs plastiques non-

biodégradables à usage unique et promeut le développement et l'utilisation de plastiques biosourcés et biodégradables par exemple (Légifrance 2015). A l'échelle nationale, pour compléter les mesures déjà prévues dans la loi, il serait intéressant de continuer à promouvoir le développement d'emballages écoconçues tout en menant en parallèle une recherche approfondie sur les impacts environnementaux et notamment sur les microorganismes que ces nouveaux emballages ont tant en matière de structure et de fonction que de dégradation. A l'échelle mondiale, la coopération entre pays de l'Union Européenne et d'autres pays tels que les Etats-Unis, la Chine par exemple pour une organisation internationale pour harmoniser les réglementations sur les plastiques et encourager la recherche et le partage pourrait contribuer à une évolution significative de la réduction de ces déchets.

La mise en place de systèmes efficaces de collecte, de tri et de recyclage des plastiques est essentielle pour empêcher leur entrée dans les rivières. Le renforcement et la pratique plus fréquente des programmes de collecte des déchets, y compris les campagnes de nettoyage des berges, peuvent contribuer à réduire la quantité de plastiques qui atteignent les cours d'eau. Cela peut aussi consister en un investissement plus conséquent dans des technologies de collecte avancées tels que des systèmes de collecte automatisée des déchets flottants, des drones de surveillance des cours d'eau pour détecter les déchets. Encourager la promotion de la collecte participative par les citoyens.

L'aspect « sentinelle » est également très important ; c'est-à-dire continuer à surveiller les niveaux de pollution plastique dans les rivières et à mener des recherches sur les impacts des plastiques sur les écosystèmes fluviaux est essentiel pour prendre des décisions éclairées en matière de gestion. Des partenariats et des efforts coordonnés sont nécessaires pour résoudre ce problème complexe. Par exemple, favoriser la collaboration entre le secteur public et le secteur privé pour améliorer l'efficacité des systèmes de collecte, de tri et de recyclage, en partageant les meilleures pratiques et en investissant dans des infrastructures de pointe.

En termes de collaboration, il existe notamment des groupements de Recherche comme par exemple le « GRD Polymères & Océans », qui réunit 240 chercheurs répartis en 56 équipes. Il implique cinq instituts du CNRS, à savoir l'INP, l'INC, l'INEE, l'INSU, et l'INSIS, ainsi que deux partenaires, l'Ifremer et l'Anses. Ce groupement a pour objectif de rassembler des

scientifiques travaillant sur le devenir des plastiques en milieu aquatique, et favorise de nouvelles recherches interdisciplinaires. Ce groupement rassemble des disciplines complémentaires telles que la chimie, la physique, la biologie, l'écologie, l'écotoxicologie, l'océanographie, l'économie et la sociologie. L'objectif est de soutenir le développement d'approches multi-échelles et transdisciplinaires pour mieux comprendre l'impact des plastiques dans les environnements aquatiques (GDR Polymères & Océans, 2023). Concrètement, le GDR Polymères & Océans organise des journées de rencontre au cours desquelles la communauté scientifique partage les derniers résultats et discute des perspectives et des solutions à mettre en œuvre en ce qui concerne le devenir et les impacts des polymères en milieux aquatique, aérien mais aussi continentaux.

Des entités comme l'Anses (Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail) – organisme français indépendant – travaille à garantir la sécurité sanitaire des aliments, de l'environnement et d'évaluer les risques liés aux produits chimiques, aux biotechnologies et aux technologies émergentes. La pollution plastique est devenue une préoccupation majeure en raison de ses impacts sur les écosystèmes terrestres et aquatiques. Les plastiques peuvent se décomposer en microplastiques, de petites particules qui peuvent contaminer l'eau, les sols, et même être ingérées par les organismes vivants. En ce sens, l'Anses s'intéresse également à la question de la pollution environnementale aux plastiques et a été amené à évaluer les risques sanitaires associés à la présence de microplastiques dans l'environnement, en examinant notamment les conséquences possibles sur la chaîne alimentaire, la qualité de l'eau, et la santé humaine. L'agence peut ainsi contribuer à la recherche scientifique, à la collecte de données et à l'évaluation des risques afin d'informer les autorités publiques sur les mesures à prendre pour réduire la pollution plastique et atténuer ses impacts sur la santé et l'environnement.

Les évaluations de l'Anses sur la pollution environnementale aux plastiques reposent sur une variété de sources, notamment des données scientifiques, des études issues de programmes de recherche, des données provenant de programmes de surveillance environnementale qui mesurent la présence de plastiques dans l'eau, les sols, et d'autres environnements, des enquêtes sur le terrain, des travaux publiés, des collaborations avec d'autres organismes nationaux et internationaux, et des expertises internes. Des études de recherche dédiées à l'impact des microplastiques sur la santé humaine et animale pourraient également être prises

en compte. Les expertises internes de l'agence dans des domaines tels que la toxicologie et l'écotoxicologie seraient également mobilisées pour évaluer les risques associés. L'objectif est de s'appuyer sur une base de connaissances solide et diversifiée pour formuler des recommandations et des avis pertinents concernant les risques associés à la pollution plastique.

Par exemple, en octobre 2022, l'Anses a publié un rapport qui aborde les risques de dispersion des microplastiques dans l'environnement issue du compostage des plastiques biosourcés, des plastiques dit « biodégradables » et « compostables », dans le but d'apporter des connaissances sur les impacts environnementaux de ces types de plastique (Anses, 2022). Ce rapport a été généré grâce à un comité d'expert spécialisé qui se sont basé sur une analyse bibliographique, sur une analyse comparative de Normes, et de réglementations européennes. Ce rapport apporte des conclusions sur la composition chimique des matières plastiques biosourcées et dite biodégradables, mais aussi sur le manque d'information de la composition exacte de ces matériaux en raison du secret industriel, et donc sur le manque de connaissances de certaines substances pouvant se retrouver dans le compost. Le rapport souligne la complexité et le grand nombre des normes de biodégradabilité des plastiques, créant confusion et difficultés d'application. Il met aussi en évidence des incertitudes sur la fraction résiduelle des matériaux et leur impact environnemental. La génération potentielle de microplastiques par les matériaux biodégradables est aussi soulignée, accompagnée d'une évaluation insuffisante de leur impact global. Les normes actuelles ne couvrent pas les particules de plastique de petite taille, mettant en évidence une lacune dans l'évaluation des risques environnementaux (Anses, 2022). Ce rapport appelle à une approche plus globale pour évaluer l'impact des plastiques biosourcés et biodégradables. Grâce à ce travail, les experts formulent également des recommandations à destination des industriels et des pouvoirs publics (Anses, 2022).

Il semble également très important de mettre encore plus l'accent sur l'économie circulaire en encourageant l'adoption de pratiques économiques et circulaires dans la conception, la production et l'utilisation afin de réduire leur impact environnemental. Cela inclut la réutilisation, le recyclage et la réduction des déchets. Comme le prône la fondation Ellen MacArthur, l'économie circulaire considère toutes les phases du cycle de vie d'un produit, avant et après son utilisation par le client. Cette approche, cruciale pour lutter contre

la pollution plastique, offre des bénéfices économiques, sociaux et climatiques significatifs. D'ici à 2040, elle pourrait réduire de 80 % le volume annuel de plastiques dans les océans, diminuer de 25 % les émissions de gaz à effet de serre, engendrer des économies de 200 milliards d'USD par an et créer 700 000 emplois (Ellen MacArthur Foundation, 2023). Pour instaurer une économie circulaire du plastique, il faut éliminer les articles plastiques problématiques, innover pour rendre les plastiques réutilisables, recyclables ou compostables, et favoriser la circulation des produits plastiques pour les maintenir dans l'économie et hors de l'environnement.

Etant donné que ces travaux de thèse contribuent à mettre en lumière l'impact de la colonisation microbienne des plastiques, il est important de sensibiliser aux conséquences microbiennes de la pollution plastique dans les écosystèmes fluviaux. Cela peut aider à promouvoir une meilleure compréhension de ces interactions.

Quel que soit le point d'amélioration de la chaîne de la pollution plastique, que ce soit au niveau de sa conception, de son utilisation ou de son recyclage, la mise en place de législations ou d'autres moyens d'action peut contribuer à diminuer cette pollution. Néanmoins, il faut garder à l'esprit que la pollution plastique, déjà existante est persistante dans l'environnement et a bel est bien un impact qu'il est nécessaire de comprendre de façon plus complète afin d'avoir des arguments et des leviers supplémentaires en faveur de l'amélioration des actions qui se font en amont dans la chaîne de production par les industriels et d'utilisation par les consommateurs.

**COMMUNICATIONS ORALES, POSTERS, PUBLICATIONS
ET FORMATIONS PRINCIPALES**

Communications

- Présentation et participation à une débat **grand public** lors de la **Clermont innovation week** – sur la thématique « *One Health* » en 2022 - Impacts de la pollution plastique sur les communautés microbiennes de rivière
- Présentation orale lors des **Journées des Doctorants** du LMGE : 2021 - « *Fate and effects of plastic pollution on stream microbial communities* »
- Présentation orale lors des **Journées des Doctorants** du LMGE : 2023 - « *Assessing the effects of plastics contamination on the structure and functions of stream microbial communities* »
- Présentation orale lors du **séminaire EcoEvo – INRAE 2023** – « *Assessing the effects of plastics contamination on the structure and functions of stream microbial communities* »

Posters

- Flash présentation suivit de la présentation du poster à **EcotoxicoMic Young Researcher 2021** – « *Comparison of microbial colonization between natural and plastic substrata in a contaminated watershed* »
- Flash presentation suivit de la présentation du poster lors des **Journées de l'Ecole Doctorale 2022** - « *Comparison of microbial colonization between natural and plastic substrata in a contaminated watershed* »
- Flash présentation suivit de la présentation du poster lors de la **journée de l'INEE** (Institut Ecologie et Environnement) – CNRS sur l'eau - « *Comparison of microbial colonization between natural and plastic substrata in a contaminated watershed* »
- Poster en congres internationale de la **SFE²-GfÖ-EEF 2022** sur le theme « *Ecology and Evolution: New perspectives and societal challenges* » - « *Assessing the effects of plastics contamination on the structure and functions of stream microbial communities* »

Publications scientifiques

- Article publié:
Laffet, Lucie *et al.* 2023. "Comparison of Microbial Colonization between Natural and Plastic Substrata in a Polluted Watershed." *FEMS Microbiology Ecology* 99(8): 1–14.
- Article en préparation:
Laffet, Lucie, Anna M. Romaní, and Joan Artigas. (*in prep.*) "Assessing the Effects of Plastics Contamination on the Structure and Function of Stream Microbial Communities."

Principales formations

- Co-encadrement d'un stagiaire de Master 1 en 2021
- Organisation des Journées des Doctorants 2022
- Formation Langage R, R.Studio – Bioscience & Co 2021
- Formation MetaBioDiv « Exploration de la Diversité Taxonomique des Ecosystèmes par *Metabarcoding* » CNRS-INSU 2022

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdullah SK, Taj-Aldeen S j. Extracellular enzymatic activity of aquatic and aero-aquatic conidial fungi. *Hydrobiologia* 1989;**174**:217–23.
- Adrangi S, Faramarzi MA. From bacteria to human: A journey into the world of chitinases. *Biotechnol Adv* 2013;**31**:1786–95.
- Aina N, Mohd S, Yahya N *et al.* Synthesis and Characterization of Biodegradable Starch-based Bioplastics. 2016;**846**:673–8.
- Albertsson AC, Andersson SO, Karlsson S. The mechanism of biodegradation of polyethylene. *Polym Degrad Stab* 1987;**18**:73–87.
- Allen GH, Pavelsky TM. Global extent of rivers and streams. *Sci Rep* 2018;**361**:1–7.
- Allison SD, Chacon SS, German DP. Substrate concentration constraints on microbial decomposition. *Soil Biol Biochem* 2014;**79**:43–9.
- Allison SD, Martiny JBH. Resistance, resilience, and redundancy in microbial communities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;**105**:11512–9.
- Allison SD, Vitousek PM. Responses of extracellular enzymes to simple and complex nutrient inputs. *Soil Biol Biochem* 2005;**37**:937–44.
- Allison SD, Weintraub MN, Gartner TB *et al.* Evolutionary-Economic Principles as Regulators of Soil Enzyme Production and Ecosystem Function. In: Shukla G, Varma A (eds.). *Soil Enzymology*. Springer. 2011, 229–43.
- Álvarez M, Proia L, Ruggiero A *et al.* A comparison between pulse and constant rate additions as methods for the estimation of nutrient uptake efficiency in-streams. *J Hydrol* 2010;**388**:273–9.
- Amaral-Zettler LA, Zettler ER, Mincer TJ. Ecology of the plastisphere. *Nat Rev Microbiol* 2020;**18**:139–51.
- Amaral-Zettler LA, Zettler ER, Slikas B *et al.* The biogeography of the Plastisphere: Implications for policy. *Front Ecol Environ* 2015;**13**:541–6.
- Ambassade de France au Royaume-Uni. The Resources and Waste Strategy. *Ambassad Fr au Royaume-Uni Serv économique régional Londres* 2022.
- Amblard C, Boisson JC, Bourdier G *et al.* Microbial ecology in aquatic systems : a review from viruses to protozoa. In: Université du Québec - INRS-Eau T et E (INRS-E (ed.)).

- Journal of Water Science*. Canada, 1998, 145–62.
- Ameen F, Moslem M, Hadi S *et al.* Biodegradation of low density polyethylene (LDPE) by mangrove fungi from the red sea coast. *Prog Rubber, Plast Recycl Technol* 2015;**31**:125–44.
- Andrady AL. Microplastics in the marine environment. *Mar Pollut Bull* 2011;**62**:1596–605.
- Anses - Avis de l'Anses Rapport d'expertise collective Octobre 2022 - Usage de matières plastiques biosourcées, biodégradable et compostables -
<https://www.anses.fr/fr/system/files/CONSO2021SA0202Ra.pdf>
- Arndt H, Schmidt-Denter K, Auer B *et al.* Protozoans and Biofilms. *Foss Recent Biofilms* 2003:161–79.
- Arnosti C. Microbial Extracellular Enzymes and their Role in Dissolved Organic Matter Cycling. *Aquatic Ecosystems*. 2003, 315–42.
- Arnosti C. Microbial extracellular enzymes and the marine carbon cycle. *Ann Rev Mar Sci* 2011;**3**:401–25.
- Artigas J, Fund K, Kirchen S *et al.* Patterns of biofilm formation in two streams from different bioclimatic regions: Analysis of microbial community structure and metabolism. *Hydrobiologia* 2012a;**695**:83–96.
- Artigas J, Majerholc J, Foulquier A *et al.* Effects of the fungicide tebuconazole on microbial capacities for litter breakdown in streams. *Aquat Toxicol* 2012b;**122–123**:197–205.
- Artigas J, Romaní AM, Gaudes A *et al.* Organic matter availability structures microbial biomass and activity in a Mediterranean stream. *Freshw Biol* 2009;**54**:2025–36.
- Ashton K, Holmes L, Turner A. Association of metals with plastic production pellets in the marine environment. *Mar Pollut Bull* 2010;**60**:2050–5.
- ASTM D6400. *ASTM D6400 - Standard Specification for Labeling of Plastics Designed to Be Aerobically Composted in Municipal or Industrial Facilities.*, 2019.
- Atashgahi S, Aydin R, Dimitrov MR *et al.* Impact of a wastewater treatment plant on microbial community composition and function in a hyporheic zone of a eutrophic river. *Sci Rep* 2015;**5**:1–13.
- Banaee M, Faraji J, Amini M *et al.* Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) physiological

- response to microplastics and enrofloxacin: Novel pathways to investigate microplastic synergistic effects on pharmaceuticals. *Aquat Toxicol* 2023;**261**:106627.
- Barros J, Seena S. Plasticsphere in freshwaters: An emerging concern. *Environ Pollut* 2021;**290**:118123.
- Bastviken D, Tranvik LJ, Downing J *et al.* Freshwater Methane Emissions Offset the Continental Carbon Sink. *Science (80-)* 2011;**331**:50.
- Batista D, Pradhan A, Pascoal C *et al.* Evidence of micro and macroplastic toxicity along a stream detrital food-chain. *J Hazard Mater* 2022;**436**:1–9.
- Battin TJ, Besemer K, Bengtsson MM *et al.* The ecology and biogeochemistry of stream biofilms. *Nat Rev Microbiol* 2016;**14**:251–63.
- Battin TJ, Kaplan LA, Findlay S *et al.* Biophysical controls on organic carbon fluxes in fluvial networks. *Nat Geosci* 2008;**2**:95–100.
- Battin TJ, Kaplan LA, Newbold JD *et al.* Effects of current velocity on the nascent architecture of stream microbial biofilms. *Appl Environ Microbiol* 2003;**69**:5443–52.
- Beaulieu JJ, Tank JL, Hamilton SK *et al.* Nitrous oxide emission from denitrification in stream and river networks. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;**108**:214–9.
- Op De Beeck M, Lievens B, Busschaert P *et al.* Comparison and validation of some ITS primer pairs useful for fungal metabarcoding studies. *PLoS One* 2014;**9**, DOI: 10.1371/journal.pone.0097629.
- Bejgarn S, MacLeod M, Bogdal C *et al.* Toxicity of leachate from weathering plastics: An exploratory screening study with *Nitocra spinipes*. *Chemosphere* 2015;**132**:114–9.
- Benfield EF. Comparison of litterfall input to streams. *J North Am Benthol Soc* 1997;**16**:104–8.
- Bergk Pinto B, Maccario L, Dommergue A *et al.* Do Organic Substrates Drive Microbial Community Interactions in Arctic Snow? *Front Microbiol* 2019;**10**:1–13.
- Berlemont R, Martiny AC. Phylogenetic distribution of potential cellulases in bacteria. *Appl Environ Microbiol* 2013;**79**:1545–54.
- Besemer K. Biodiversity, community structure and function of biofilms in stream ecosystems. *Res Microbiol* 2015;**166**:774–81.

- Besemer K, Singer G, Limberger R *et al.* Biophysical controls on community succession in stream biofilms. *Appl Environ Microbiol* 2007;**73**:4966–74.
- Best J. Anthropogenic stresses on the world's big rivers. *Nat Geosci* 2019;**12**:7–21.
- Bezirhan Arikan E, Bilgen HD. Investigation of Fungal Biodegradation of Starch Based Bioplastic Spoon Wastes. *Mühendislik Bilim ve Tasarım Derg* 2019;**7**:294–300.
- Blettler MCM, Abrial E, Khan FR *et al.* Freshwater plastic pollution: Recognizing research biases and identifying knowledge gaps. *Water Res* 2018;**143**:416–24.
- Blettler MCM, Garello N, Ginon L *et al.* Massive plastic pollution in a mega-river of a developing country: Sediment deposition and ingestion by fish (*Prochilodus lineatus*). *Environ Pollut* 2019;**255**:113348.
- Borrel G, Colombet J, Robin A *et al.* Unexpected and novel putative viruses in the sediments of a deep-dark permanently anoxic freshwater habitat. *ISME J* 2012;**6**:2119–27.
- Boucher D, Debroas D. Impact of environmental factors on couplings between bacterial community composition and ectoenzymatic activities in a lacustrine ecosystem. *FEMS Microbiol Ecol* 2009;**70**:66–78.
- Bray JR, Gorham E. Litter Production in Forests of the World†. *Adv Ecol Res* 1964;**2**:101–57.
- Brett MT, Bunn SE, Chandra S *et al.* How important are terrestrial organic carbon inputs for secondary production in freshwater ecosystems? *Freshw Biol* 2017;**62**:833–53.
- Browne MA, Crump P, Niven SJ *et al.* Accumulation of microplastic on shorelines worldwide: Sources and sinks. *Environ Sci Technol* 2011;**45**:9175–9.
- Browne MA, Galloway TS, Thompson RC. Spatial patterns of plastic debris along estuarine shorelines. *Environ Sci Technol* 2010;**44**:3404–9.
- Bruge A, Barreau C, Carlot J *et al.* Monitoring litter inputs from the Adour river (southwest France) to the marine environment. *J Mar Sci Eng* 2018;**6**, DOI: 10.3390/jmse6010024.
- Bryant JA, Clemente TM, Viviani DA *et al.* Diversity and Activity of Communities Inhabiting Plastic Debris in the North Pacific Gyre. *mSystems* 2016;**1**:1–19.
- Brydson JA. *Plastics Materials*. Eighth Edi. Elsevier (ed.), 1999.
- Butman D, Stackpoole S, Stets E *et al.* Aquatic carbon cycling in the conterminous United

- States and implications for terrestrial carbon accounting. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016;**113**:58–63.
- Cabib E. Assay for chitinase using tritiated chitin. *Methods Enzymol* 1988;**161**:424–6.
- van Calcar CJ, van Emmerik THM. Abundance of plastic debris across European and Asian rivers. *Environ Res Lett* 2019;**14**:124051.
- Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ *et al.* DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods* 2016;**13**:581–3.
- Cañizares R, Benitez E, Ogunseitán OA. Molecular analyses of β -glucosidase diversity and function in soil. *Eur J Soil Biol* 2011;**47**:1–8.
- Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA *et al.* Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;**108**:4516–22.
- Cappello S, Caruso G, Bergami E *et al.* New insights into the structure and function of the prokaryotic communities colonizing plastic debris collected in King George Island (Antarctica): Preliminary observations from two plastic fragments. *J Hazard Mater* 2021;**414**, DOI: 10.1016/j.jhazmat.2021.125586.
- Cardinale BJ, Srivastava DS, Duffy JE *et al.* Effects of biodiversity on the functioning of trophic groups and ecosystems. *Nature* 2006;**443**:989–92.
- Carr SA, Liu J, Tesoro AG. Transport and fate of microplastic particles in wastewater treatment plants. *Water Res* 2016;**91**:174–82.
- Carson HS, Lamson MR, Nakashima D *et al.* Tracking the sources and sinks of local marine debris in Hawai'i. *Mar Environ Res* 2013a;**84**:76–83.
- Carson HS, Nerheim MS, Carroll KA *et al.* The plastic-associated microorganisms of the North Pacific Gyre. *Mar Pollut Bull* 2013b;**75**:126–32.
- de Carvalho CCCR. Biofilms: Microbial strategies for surviving UV exposure. *Adv Exp Med Biol* 2017;**996**:233–9.
- Castañeda RA, Avlijas S, Anouk Simard M *et al.* Microplastic pollution in St. Lawrence river sediments. *Can J Fish Aquat Sci* 2014;**71**:1767–71.
- Castro-Jiménez J, González-Fernández D, Fornier M *et al.* Macro-litter in surface waters from the Rhone River: Plastic pollution and loading to the NW Mediterranean Sea. *Mar Pollut*

- Bull* 2019;**146**:60–6.
- Chamier A. Cell-wall-degrading enzymes of aquatic hyphomycetes: a review. *Bot J Linn Soc* 1985;**91**:67–81.
- Chatkitanan T, Harnkarnsujarit N. Development of nitrite compounded starch-based films to improve color and quality of vacuum-packaged pork. *Food Packag Shelf Life* 2020;**25**:100521.
- Chaudhary A, Dunn ST, Kelly J *et al.* Plastic microbiome development in a freshwater ecosystem. *Sci Total Environ* 2022;**848**:157697.
- Chiellini E, Corti A, Swift G. Biodegradation of thermally-oxidized, fragmented low-density polyethylenes. *Polym Degrad Stab* 2003;**81**:341–51.
- Christensen BB, Haagensen JAJ, Heydorn A *et al.* Metabolic commensalism and competition in a two-species microbial consortium. *Appl Environ Microbiol* 2002;**68**:2495–502.
- Chróst RJ. Environmental Control of the Synthesis and Activity of Aquatic Microbial Ectoenzymes. 1991:29–59.
- Chróst RJ, Siuda W. Enzyme in the environment. In: Burns, R.C. and Dick, R.P. E (ed.). *Microbial Enzymes in the Environment Activity, Ecology, and Applications*. Marcel Dek. USA, 2002, 35–72.
- Claessens M, Van Cauwenberghe L, Vandegheuchte MB *et al.* New techniques for the detection of microplastics in sediments and field collected organisms. *Mar Pollut Bull* 2013;**70**:227–33.
- Cole M, Lindeque P, Fileman E *et al.* Microplastic ingestion by zooplankton. *Environ Sci Technol* 2013;**47**:6646–55.
- Cole M, Lindeque P, Halsband C *et al.* Microplastics as contaminants in the marine environment: A review. *Mar Pollut Bull* 2011;**62**:2588–97.
- Comte J, del Giorgio PA. Linking the patterns of change in composition and function in bacterioplankton successions along environmental gradients. *Ecol Ecol Soc Am* 2010;**91**:1466–76.
- Comte J, Del Giorgio PA. Links between resources, C metabolism and the major components of bacterioplankton community structure across a range of freshwater ecosystems.

- Environ Microbiol* 2009;**11**:1704–16.
- Connors ME, Naiman RJ. Particulate allochthonous inputs: relationships with stream size in an undisturbed watershed. *Can J Fish Aquat Sci* 1984;**41**:1473–84.
- da Costa JP, Santos PSM, Duarte AC *et al.* (Nano)plastics in the environment - Sources, fates and effects. *Sci Total Environ* 2016;**566–567**:15–26.
- Costerton JW. Overview of microbial biofilms. *J Ind Microbiol* 1995;**15**:137–40.
- Costerton JW, Chen K., Geesey GG *et al.* Bacterial Biofilms in Nature and Disease. *Ann Rev Microbiol* 1987;**41**:435–64.
- Costerton JW, Geesey GG, Cheng KJ. How bacteria stick. *Sci Am* 1978;**238**:86–95.
- Cotner JB, Biddanda BA. Small players, large role: Microbial influence on biogeochemical processes in pelagic aquatic ecosystems. *Ecosystems* 2002;**5**:105–21.
- Crump BC, Peterson BJ, Raymond PA *et al.* Circumpolar synchrony in big river bacterioplankton. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;**106**:21208–12.
- Dalton H, Stirling DI. Co-metabolism. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1982;**297**:481–96.
- Dalzell BJ, Filley TR, Harbor JM. Flood pulse influences on terrestrial organic matter export from an agricultural watershed. *J Geophys Res Biogeosciences* 2005;**110**:1–14.
- Das M, Royer T V., Leff LG. Diversity of fungi, bacteria, and actinomycetes on leaves decomposing in a stream. *Appl Environ Microbiol* 2007;**73**:756–67.
- Degli-Innocenti F, Bellia G, Tosin M *et al.* Detection of toxicity released by biodegradable plastics after composting in activated vermiculite. *Polym Degrad Stab* 2001;**73**:101–6.
- Delacuvellerie A, Ballerini T, Frère L *et al.* From rivers to marine environments: A constantly evolving microbial community within the plastisphere. *Mar Pollut Bull* 2022;**179**, DOI: 10.1016/j.marpolbul.2022.113660.
- Delacuvellerie A, Benali S, Cyriaque V *et al.* Microbial biofilm composition and polymer degradation of compostable and non-compostable plastics immersed in the marine environment. *J Hazard Mater* 2021;**419**:1–11.
- Demirors M. The history of polyethylene. In: Strom ET, Rasmussen SC (eds.). *100+ Years of Plastics*. Vol 1080. Washington, DC, 2011, 115–45.

- Desforges JPW, Galbraith M, Dangerfield N *et al.* Widespread distribution of microplastics in subsurface seawater in the NE Pacific Ocean. *Mar Pollut Bull* 2014;**79**:94–9.
- Dey AS, Bose H, Mohapatra B *et al.* Biodegradation of Unpretreated Low-Density Polyethylene (LDPE) by *Stenotrophomonas* sp. and *Achromobacter* sp., Isolated From Waste Dumpsite and Drilling Fluid. *Front Microbiol* 2020;**11**:1–15.
- Donlan RM. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerg Infect Dis* 2002;**8**:881–90.
- Dopheide A, Lear G, He Z *et al.* Functional gene composition, diversity and redundancy in microbial stream biofilm communities. *PLoS One* 2015;**10**:1–21.
- Dopheide A, Lear G, Stott R *et al.* Molecular characterization of ciliate diversity in stream biofilms. *Appl Environ Microbiol* 2008;**74**:1740–7.
- Downing JA, Cole JJ, Duarte CM *et al.* Global abundance and size distribution of streams and rivers. *Inl Waters* 2012;**2**:229–36.
- Drake TW, Wickland KP, Spencer RGM *et al.* Ancient low-molecular-weight organic acids in permafrost fuel rapid carbon dioxide production upon thaw. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015;**112**:13946–51.
- Du J, Qv W, Niu Y *et al.* Nanoplastic pollution inhibits stream leaf decomposition through modulating microbial metabolic activity and fungal community structure. *J Hazard Mater* 2022;**424**:127392.
- Duis K, Coors A. Microplastics in the aquatic and terrestrial environment: sources (with a specific focus on personal care products), fate and effects. *Environ Sci Eur* 2016;**28**:1–25.
- Dussud C, Hudec C, George M *et al.* Colonization of non-biodegradable and biodegradable plastics by marine microorganisms. *Front Microbiol* 2018;**9**:1–13.
- Eerkes-Medrano D, Thompson RC, Aldridge DC. Microplastics in freshwater systems: A review of the emerging threats, identification of knowledge gaps and prioritisation of research needs. *Water Res* 2015;**75**:63–82.
- Eich A, Mildenerberger T, Laforsch C *et al.* Biofilm and diatom succession on polyethylene (PE) and biodegradable plastic bags in two marine habitats: Early signs of degradation in the pelagic and benthic zone? *PLoS One* 2015;**10**:1–16.

- Ekschmitt K, Liu M, Vetter S *et al.* Strategies used by soil biota to overcome soil organic matter stability - Why is dead organic matter left over in the soil? *Geoderma* 2005;**128**:167–76.
- Elizalde-Velázquez A, Subbiah S, Anderson TA *et al.* Sorption of three common nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) to microplastics. *Sci Total Environ* 2020;**715**:136974.
- van Emmerik T, Kieu-Le TC, Loozen M *et al.* A methodology to characterize riverine macroplastic emission into the ocean. *Front Mar Sci* 2018;**5**:1–11.
- Van Emmerik T, Loozen M, Van Oeveren K *et al.* Riverine plastic emission from Jakarta into the ocean. *Environ Res Lett* 2019;**14**, DOI: 10.1088/1748-9326/ab30e8.
- van Emmerik T, Mellink Y, Hauk R *et al.* Rivers as Plastic Reservoirs. *Front Water* 2022;**3**:1–8.
- van Emmerik T, Schwarz A. Plastic debris in rivers. *Wiley Interdiscip Rev Water* 2019;**7**:1–24.
- van Emmerik T, Tramoy R, van Calcar C *et al.* Seine Plastic Debris Transport Tenfolded During Increased River Discharge. *Front Mar Sci* 2019;**6**, DOI: 10.3389/fmars.2019.00642.
- Ellen MacArthur Foundation. It's time for a circular economy. <https://www.ellenmacarthurfoundation.org/>. 2023.
- Eubeler JP, Bernhard M, Knepper TP. Environmental biodegradation of synthetic polymers II. Biodegradation of different polymer groups. *Trends Anal Chem* 2010;**29**:84–100.
- European Bioplastics. *Report - Bioplastic Market Data 2017 - Global Production Capacities of Bioplastics 2017 - 2022.*, 2017.
- European Bioplastics, Nova-Institute. *Bioplastics Market Development Update 2020.*, 2021.
- European Commission. *MSDF Guidance on Monitoring Marine Litter in European Seas.*, 2013.
- Fanin N, Moorhead D, Bertrand I. Eco-enzymatic stoichiometry and enzymatic vectors reveal differential C, N, P dynamics in decaying litter along a land-use gradient. *Biogeochemistry* 2016;**129**:21–36.

- Fawcett EW, Gibson RO. *Polymerisation of Olefins.*, 1939.
- Fendall LS, Sewell MA. Contributing to marine pollution by washing your face: Microplastics in facial cleansers. *Mar Pollut Bull* 2009;**58**:1225–8.
- Fiebig DM, Lock MA, Neal C. Soil water in the riparian zone as a source of carbon for a headwater stream. *J Hydrol* 1990;**116**:217–37.
- Filiciotto L, Rothenberg G. Biodegradable Plastics: Standards, Policies, and Impacts. *ChemSusChem* 2021;**14**:56–72.
- Findlay S, Tanks J, Dye S *et al.* A Cross-System Comparison of Bacterial and Fungal Biomass in Detritus Pools of Headwater Streams. *Microb Ecol* 2002;**43**:55–66.
- Fischer H, Wanner SC, Pusch M. Bacterial abundance and production in river sediments as related to the biochemical composition of particulate organic matter (POM). *Biogeochemistry* 2002;**61**:37–55.
- Fish KE, Osborn AM, Boxall J. Characterising and understanding the impact of microbial biofilms and the extracellular polymeric substance (EPS) matrix in drinking water distribution systems. *Environ Sci Water Res Technol* 2016;**2**:614–30.
- Flemming HC. Eps—then and now. *Microorganisms* 2016;**4**:1–18.
- Flemming HC, Neu TR, Wozniak DJ. The EPS matrix: The “House of Biofilm Cells.” *J Bacteriol* 2007;**189**:7945–7.
- Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* 2010;**8**:623–33.
- Flury M, Narayan R. Biodegradable plastic as an integral part of the solution to plastic waste pollution of the environment. *Curr Opin Green Sustain Chem* 2021;**30**:100490.
- Fondation Tara Océan. Étudier le plastique à la loupe : le défi des collégiens et lycéens. 2023. <https://fondationtaraoccean.org/actualite-education/plastique-a-la-loupe-science-participative-bilan-2022/>
- Fontaine L, Boutry C, Guédon E *et al.* Quorum-sensing regulation of the production of B1p bacteriocins in *Streptococcus thermophilus*. *J Bacteriol* 2007;**189**:7195–205.
- Francoeur SN, Wetzel RG. Regulation of periphytic leucine-aminopeptidase activity. *Aquat Microb Ecol* 2003;**31**:249–58.

- Freixa A, Ejarque E, Crognale S *et al.* Sediment microbial communities rely on different dissolved organic matter sources along a Mediterranean river continuum. *Limnol Oceanogr* 2016;**61**:1389–405.
- Gajendiran A, Krishnamoorthy S, Abraham J. Microbial degradation of low-density polyethylene (LDPE) by *Aspergillus clavatus* strain JASK1 isolated from landfill soil. *Biotech* 2016;**6**:1–6.
- Gao W, Wu W, Liu P *et al.* Preparation and evaluation of hydrophobic biodegradable films made from corn/octenylsuccinated starch incorporated with different concentrations of soybean oil. *Int J Biol Macromol* 2020;**142**:376–83.
- Gasperi J, Dris R, Bonin T *et al.* Assessment of floating plastic debris in surface water along the Seine River. *Environ Pollut* 2014;**195**:163–6.
- GDR Polymères & Océans. 2023. <https://www.gdr-po.cnrs.fr/index.html>
- Geesey GG, Mutch R, Costerton JW *et al.* Sessile bacteria: An important component of the microbial population in small mountain streams. *Limnol Oceanogr* 1978;**23**:1214–23.
- German DP, Chacon SS, Allison SD. Substrate concentration and enzyme allocation can affect rates of microbial decomposition. *Ecology* 2011;**92**:1471–80.
- Gessner MO, Swan CM, Dang CK *et al.* Diversity meets decomposition. *Trends Ecol Evol* 2010;**25**:372–80.
- Geyer R, Jambeck JR, Law KL. Production, use, and fate of all plastics ever made. *Sci Adv* 2017;**3**:25–9.
- Ghatge S, Yang Y, Ahn JH *et al.* Biodegradation of polyethylene: a brief review. *Appl Biol Chem* 2020;**63**:1–14.
- Gonzalez-Gutierrez J, Partal P, Garcia-Morales M *et al.* Development of highly-transparent protein/starch-based bioplastics. *Bioresour Technol* 2010;**101**:2007–13.
- Gooday GW. The Ecology of Chitin Degradation. In: Springer, Boston M (ed.). *Advances in Microbial Ecology Volume 11*. Marshall, USA, 1990, 387–430.
- Gouvernement du Canada. Contenu recyclé et règles d'étiquetage des produits en plastique. 2023.
- Gowthami A, Syed Marjuk M, Raju P *et al.* Biodegradation efficacy of selected marine

- microalgae against Low-Density Polyethylene (LDPE): An environment friendly green approach. *Mar Pollut Bull* 2023;**190**:1–10.
- Gregory MR. Plastic scrubbers' in hand cleansers: A further (and minor) source for marine pollution identified. *Mar Pollut Bull* 1996;**32**:867–71.
- Guenet B, Danger M, Abbadie L *et al.* Priming effect: bridging the gap between terrestrial and aquatic ecology. *Ecology* 2010;**91**:2850–2861.
- Guerranti C, Cannas S, Scopetani C *et al.* Plastic litter in aquatic environments of Maremma Regional Park (Tyrrhenian Sea, Italy): Contribution by the Ombrone river and levels in marine sediments. *Mar Pollut Bull* 2017;**117**:366–70.
- Haack TK, McFeters GA. Nutritional relationships among microorganisms in an epilithic biofilm community. *Microb Ecol* 1982;**8**:115–26.
- Haberstroh CJ, Arias ME, Yin Z *et al.* Effects of Urban Hydrology on Plastic Transport in a Subtropical River. *ACS ES T Water* 2021;**1**:1714–27.
- Hahladakis JN, Velis CA, Weber R *et al.* An overview of chemical additives present in plastics: Migration, release, fate and environmental impact during their use, disposal and recycling. *J Hazard Mater* 2018;**344**:179–99.
- Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* 2004;**2**:95–108.
- Hall RO, Meyer JL. The Trophic Significance of Bacteria in a Detritus-Based Stream Food Web. *Ecology* 1998;**79**:1995.
- Haoyu C, Bo Y, Tao Z *et al.* Rural mixed pond water irrigation affected microbial community and eco-enzymatic stoichiometry of soil profiles. *Appl Soil Ecol* 2023;**188**:104863.
- Harding JS, Benfield EF, Bolstad P V. *et al.* Stream biodiversity: The ghost of land use past. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;**95**:14843–7.
- Harding MW, Marques LLR, Howard RJ *et al.* Can filamentous fungi form biofilms? *Trends Microbiol* 2009;**17**:475–80.
- Harrison JP, Hoellein TJ, Sapp M *et al.* Microplastic-Associated Biofilms: A Comparison of Freshwater and Marine Environments. *Freshw Microplastics* 2018;**58**:181–201.
- Harrison JP, Sapp M, Osborn MA. Interactions between micro-organisms and metronidazole.

- Mar Technol Soc J* 2011;**45**:12–20.
- Harrison JP, Schratzberger M, Sapp M *et al.* Plastics on the Sargasso sea surface. *BMC Microbiol* 2014;**232**:3–15.
- Hartmann NB, Hüffer T, Thompson RC *et al.* Are We Speaking the Same Language? Recommendations for a Definition and Categorization Framework for Plastic Debris. *Environ Sci Technol* 2019;**53**:1039–47.
- Hasan M, Gopakumar DA, Olaiya NG *et al.* Evaluation of the thermomechanical properties and biodegradation of brown rice starch-based chitosan biodegradable composite films. *Int J Biol Macromol* 2020;**156**:896–905.
- Hawkes C V., Keitt TH. Resilience vs. historical contingency in microbial responses to environmental change. *Ecol Lett* 2015;**18**:612–25.
- Hector A, Bagchi R. Biodiversity and ecosystem multifunctionality. *Nature* 2007;**448**:188–90.
- Hempel M, Grossart HP, Gross EM. Community composition of bacterial biofilms on two submerged macrophytes and an artificial substrate in a pre-alpine Lake. *Aquat Microb Ecol* 2009;**58**:79–94.
- Heuck C, Weig A, Spohn M. Soil microbial biomass C: N: P stoichiometry and microbial use of organic phosphorus. *Soil Biol Biochem* 2015;**85**:119–29.
- Hieber M, Gessner MO. Contribution of Stream Detritivores, Fungi, and Bacteria to Leaf Breakdown Based on Biomass Estimates. *Ecology* 2002;**83**:1026.
- Hoellein T, Rojas M, Pink A *et al.* Anthropogenic litter in urban freshwater ecosystems: Distribution and microbial interactions. *PLoS One* 2014;**9**:1–13.
- Holmes LA, Turner A, Thompson RC. Adsorption of trace metals to plastic resin pellets in the marine environment. *Environ Pollut* 2012;**160**:42–8.
- Holzer M, Mitrano DM, Carles L *et al.* Important ecological processes are affected by the accumulation and trophic transfer of nanoplastics in a freshwater periphyton-grazer food chain. *Environ Sci Nano* 2022;**9**:2990–3003.
- Horner-Devine MC, Leibold MA, Smith VH *et al.* Bacterial diversity patterns along a gradient of primary productivity. *Ecol Lett* 2003;**6**:613–22.

- Horton AA, Dixon SJ. Microplastics: An introduction to environmental transport processes. *WIREs Water* 2017;**5**:1–10.
- Horton AA, Svendsen C, Williams RJ *et al.* Large microplastic particles in sediments of tributaries of the River Thames, UK – Abundance, sources and methods for effective quantification. *Mar Pollut Bull* 2017;**114**:218–26.
- Horton RE. Erosional development of streams and their drainage basins, hydrophysical approach to quantitative morphology. *Nihon Ringakkai Shi/Journal Japanese For Soc* 1955;**37**:555–8.
- Hotchkiss ER, Hall RO, Sponseller RA *et al.* Sources of and processes controlling CO₂ emissions change with the size of streams and rivers. *Nat Geosci* 2015;**8**:696–9.
- Hou E, Chen C, Wen D *et al.* Phosphatase activity in relation to key litter and soil properties in mature subtropical forests in China. *Sci Total Environ* 2015;**515–516**:83–91.
- Huang J -C, Shetty AS, Wang M -S. Biodegradable plastics: A review. *Adv Polym Technol* 1990;**10**:23–30.
- Hullar MAJ, Kaplan LA, Stahl DA. Recurring seasonal dynamics of microbial communities in stream habitats. *Appl Environ Microbiol* 2006;**72**:713–22.
- ISO. Normes ISO.
- Iwata T. Biodegradable and bio-based polymers: Future prospects of eco-friendly plastics. *Angew Chemie - Int Ed* 2015;**54**:3210–5.
- Jacquin J, Cheng J, Odobel C *et al.* Microbial ecotoxicology of marine plastic debris: A review on colonization and biodegradation by the “plastisphere.” *Front Microbiol* 2019;**10**:1–16.
- Jambeck JR, Geyer R, Wilcox C *et al.* Plastic waste inputs from land into the ocean. *Science (80-)* 2015;**347**:768–71.
- James GA, Beaudette L, Costerton JW. Interspecies bacterial interactions in biofilms. *J Ind Microbiol* 1995;**15**:257–62.
- Jeffrey SW, Humphrey GF. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochem und Physiol der Pflanz* 1975;**167**:191–4.

- Jha P. Effect of plasticizer and antimicrobial agents on functional properties of bionanocomposite films based on corn starch-chitosan for food packaging applications. *Int J Biol Macromol* 2020;**160**:571–82.
- Joly M, Carles L, Rossi F *et al.* 11th Symposium for European Freshwater Sciences. *Macroplastics in Rivers: Threat or Opportunity for Aquatic Microbes?*. Zagreb, 2019, 1–503.
- Joly M, Mallet C, Artigas J. Assessing extracellular enzymatic activities of biofilms on natural and standardized organic substrata immersed in a stream. *Aquat Microb Ecol* 2019;**83**:161–6.
- Joshi G, Goswami P, Verma P *et al.* Unraveling the plastic degradation potentials of the plastisphere-associated marine bacterial consortium as a key player for the low-density polyethylene degradation. *J Hazard Mater* 2022;**425**:128005.
- Karatan E, Watnick P. Signals, Regulatory Networks, and Materials That Build and Break Bacterial Biofilms. *Microbiol Mol Biol Rev* 2009;**73**:310–47.
- Karl DM. Phosphorus, the staff of life. *Nature* 2000;**406**:31–3.
- Karlsson OM, Richardson JS, Kiffney PM. Modelling organic matter dynamics in headwater streams of south-western British Columbia, Canada. *Ecol Modell* 2005;**183**:463–76.
- Kaur S, Dhillon GS. Recent trends in biological extraction of chitin from marine shell wastes: A review. *Crit Rev Biotechnol* 2013;**35**:44–61.
- Kawecki D, Nowack B. Polymer-Specific Modeling of the Environmental Emissions of Seven Commodity Plastics As Macro- and Microplastics. *Environ Sci Technol* 2019;**53**:9664–76.
- Kedzierski M, D’Almeida M, Magueresse A *et al.* Threat of plastic ageing in marine environment. Adsorption/desorption of micropollutants. *Mar Pollut Bull* 2018;**127**:684–94.
- Keiser S, Tortora PG. Ellen MacArthur Foundation. *Fairchild Books Dict Fashion* 2022, DOI: 10.5040/9781501365287.925.
- Kemp WM, Boynton WR. External and internal factors regulating metabolic rates of an estuarine benthic community. *Oecologia* 1981;**51**:19–27.

- Khan B, Bilal Khan Niazi M, Samin G *et al.* Thermoplastic Starch: A Possible Biodegradable Food Packaging Material—A Review. *J Food Process Eng* 2016;**40**:1–17.
- Kiessling T, Knickmeier K, Kruse K *et al.* Plastic pirates sample litter at rivers in Germany – Riverside litter source and litter sources estimated by schoolchildren. *Environ Pollut* 2019;**245**:545–57.
- Klein S, Worch E, Knepper TP. Occurrence and Spatial Distribution of Microplastics in River Shore Sediments of the Rhine-Main Area in Germany. *Environ Sci Technol* 2015;**49**:6070–6.
- Konopka A. What is microbial community ecology? *ISME J* 2009;**3**:1223–30.
- Krasowska A, Sigler K. How microorganisms use hydrophobicity and what does this mean for human needs? *Front Cell Infect Microbiol* 2014;**4**:1–7.
- Kumar AP, Singh RP. Biocomposites of cellulose reinforced starch: Improvement of properties by photo-induced crosslinking. *Bioresour Technol* 2008;**99**:8803–9.
- Kumar Sen S, Raut S. Microbial degradation of low density polyethylene (LDPE): A review. *J Environ Chem Eng* 2015;**3**:462–73.
- Kumari A, Mankotia S, Chaubey B *et al.* Role of biofilm morphology, matrix content and surface hydrophobicity in the biofilm-forming capacity of various *Candida* species. *J Med Microbiol* 2018;**67**:889–92.
- Laffet L, Joly M, Carles L *et al.* Comparison of microbial colonization between natural and plastic substrata in a polluted watershed. *FEMS Microbiol Ecol* 2023;**99**:1–14.
- Lahens L, Strady E, Kieu-Le TC *et al.* Macroplastic and microplastic contamination assessment of a tropical river (Saigon River, Vietnam) transversed by a developing megacity. *Environ Pollut* 2018;**236**:661–71.
- Lambert S, Sinclair CJ, Bradley EL *et al.* Effects of environmental conditions on latex degradation in aquatic systems. *Sci Total Environ* 2013;**447**:225–34.
- Lambert S, Wagner M. Environmental performance of bio-based and biodegradable plastics: The road ahead. *Chem Soc Rev* 2017;**46**:6855–71.
- Langenheder S, Lindström ES, Tranvik LJ. Structure and function of bacterial communities emerging from different sources under identical conditions. *Appl Environ Microbiol*

- 2006;**72**:212–20.
- Law KL, Thompson RC. Microplastics in the seas. *Science* (80-) 2014;**345**:144–5.
- Lawrence JR, Chenier MR, Roy R *et al.* Microscale and molecular assessment of impacts of nickel, nutrients, and oxygen level on structure and function of river biofilm communities. *Appl Environ Microbiol* 2004;**70**:4326–39.
- Lebreton LCM, Van Der Zwet J, Damsteeg JW *et al.* River plastic emissions to the world's oceans. *Nat Commun* 2017;**8**:1–10.
- Lechner A, Keckeis H, Lumesberger-loisl F *et al.* The Danube so colourful : A potpourri of plastic litter outnumbered fish larvae in Europe's second largest river. *Environ Pollut* 2014;**188**:177–81.
- Lechthaler S, Waldschläger K, Stauch G *et al.* The way of macroplastic through the environment. *Environ - MDPI* 2020;**7**:1–30.
- Leff L, Van Gray JB, Marti E *et al.* Aquatic Biofilms: Ecology, Water Quality and Wastewater Treatment. In: Romaní AM, Helena G, Balaguer DM (eds.). *Aquatic Biofilms: Ecology, Water Quality and Wastewater Treatment*. Caister Ac. Caister Academic Press (January 1, 2016), 2016, 89–108.
- Légifrance. LOI n° 2015-992 du 17 août 2015 relative à la transition énergétique pour la croissance verte. 2015.
- Légifrance. Directive (UE) 2019/904 du Parlement européen. 2019.
- Legifrance.gouv. LOI n° 2020-105 du 10 février 2020 relative à la lutte contre le gaspillage et à l'économie circulaire. 2020.
- Leichtfried M. POM in bed sediments of a gravel stream (Ritrodat-Lunz study area, Austria). *SIL Proceedings, 1922-2010* 1991;**24**:1921–5.
- Leistenschneider D, Wolinski A, Cheng J *et al.* A critical review on the evaluation of toxicity and ecological risk assessment of plastics in the marine environment. *Sci Total Environ* 2023;**896**:1–15.
- Leroy E, Decaen P, Jacquet P *et al.* Deep eutectic solvents as functional additives for starch based plastics Eric. *Green Chem* 2012;**14**:3063–6.
- Lévêque C. *Nos Rivières Sont-Elles Devenues Des Poubelles?* Le Pommier. Le Pommier

- (ed.). Paris, 2006.
- Lévêque C. *La Mémoire Des Fleuves et Des Rivières*. 968th–01 ed. Ulmer (ed.). Paris: Ulmer, 2019.
- Li C, Gan Y, Dong J *et al*. Impact of microplastics on microbial community in sediments of the Huangjinxia Reservoir—water source of a water diversion project in western China. *Chemosphere* 2020;**253**:126740.
- Li C, Wang L, Ji S *et al*. The ecology of the plastisphere: Microbial composition, function, assembly, and network in the freshwater and seawater ecosystems. *Water Res* 2021;**202**:117428.
- Li X, Wang H, Gan SH *et al*. Eco-Stoichiometric Alterations in Paddy Soil Ecosystem Driven by Phosphorus Application. *PLoS One* 2013;**8**:1–9.
- Lindeman RL. The Trophic-Dynamic Aspect of Ecology. *Ecol Soc Am* 1942;**23**:399–417.
- Liro M, Mikuš P, Wyzga B. First insight into the macroplastic storage in a mountain river: The role of in-river vegetation cover, wood jams and channel morphology. *Sci Total Environ* 2022;**838**:0–11.
- Lithner D, Damberg J, Dave G *et al*. Leachates from plastic consumer products - Screening for toxicity with *Daphnia magna*. *Chemosphere* 2009;**74**:1195–200.
- Lithner D, Larsson A, Dave G. Environmental and health hazard ranking and assessment of plastic polymers based on chemical composition. *Sci Total Environ* 2011;**409**:3309–24.
- Liu Z, Adyel TM, Miao L *et al*. Biofilm influenced metal accumulation onto plastic debris in different freshwaters. *Environ Pollut* 2021;**285**, DOI: 10.1016/j.envpol.2021.117646.
- Lock MA, Wallace RR, Costerton JW *et al*. River Epilithon: Toward a Structural-Functional Model. *Oikos* 1984;**42**:10.
- Loreau M. Does functional redundancy exist? *Oikos Adv Ecol* 2004;**104**:606–11.
- Lozano-Navarro JI, Díaz-Zavala NP, Velasco-Santos C *et al*. Chitosan-Starch Films with Natural Extracts: Physical, Chemical, Morphological and Thermal Properties. *MDPI* 2018;**11**:1–20.
- Luo X, Xiang X, Yang Y *et al*. Seasonal effects of river flow on microbial community coalescence and diversity in a riverine network. *FEMS Microbiol Ecol* 2020;**96**:1–13.

- Ma Y, Wu S, Xu Y *et al.* Degradation characteristics of polyethylene film by microorganisms from lake sediments. *Environ Pollut* 2023;**333**:122115.
- Malcolm GM, López-gutiérrez JC, Koide RT *et al.* Acclimation to temperature and temperature sensitivity of metabolism by ectomycorrhizal fungi. *Glob Chang Biol* 2008;**14**:1169–80.
- Malcolm GM, López-Gutiérrez JC, Koide RT. Little evidence for respiratory acclimation by microbial communities to short-term shifts in temperature in red pine (*Pinus resinosa*) litter. *Glob Chang Biol* 2009;**15**:2485–92.
- Mangiafico SS. *Summary and Analysis of Extension.*, 2016.
- Marti E, Aumatell J, Godé L *et al.* Nutrient Retention Efficiency in Streams Receiving Inputs from Wastewater Treatment Plants. *J Environ Qual* 2004;**33**:285–93.
- Martínez-Campos S, González-Pleiter M, Rico A *et al.* Time-course biofilm formation and presence of antibiotic resistance genes on everyday plastic items deployed in river waters. *J Hazard Mater* 2023;**443**:130271.
- Martínez A, Larrañaga A, Pérez J *et al.* Temperature affects leaf litter decomposition in low-order forest streams: Field and microcosm approaches. *FEMS Microbiol Ecol* 2014;**87**:257–67.
- Martinez JN, Nishihara A, Haruta S. Metagenome-Assembled Genome Sequences Recovered from Epilithic River Biofilm in the Tama River, Japan. *Microbiol Resour Announc* 2021;**10**:1–2.
- De Mastro F, Brunetti G, Traversa A *et al.* Fertilization promotes microbial growth and minimum tillage increases nutrient-acquiring enzyme activities in a semiarid agroecosystem. *Appl Soil Ecol* 2022;**177**:104529.
- Maunder E, Welch M. Matrix exopolysaccharides; the sticky side of biofilm formation. *FEMS Microbiol Lett* 2017;**364**:1–10.
- McCormick AR, Hoellein TJ, London MG *et al.* Microplastic in surface waters of urban rivers: Concentration, sources, and associated bacterial assemblages. *Ecosphere* 2016;**7**, DOI: 10.1002/ecs2.1556.
- McDonald AG, Boyce S, Moss GP *et al.* ExplorEnz: A MySQL database of the IUBMB

- enzyme nomenclature. *BMC Biochem* 2007;**8**:1–7.
- McDonald AG, Boyce S, Tipton KF. ExplorEnz: The primary source of the IUBMB enzyme list. *Nucleic Acids Res* 2009;**37**:593–7.
- McGraw-Hill. *Handbook of Plastics, Elastomers, and Composites*. Fourth Edi. Harper CA (ed.). ew York Chicago San Francisco Lisbon London Madrid Mexico City Milan Montreal New Delhi San Juan Seoul Singapore Sydney Toronto, 2002.
- McMurdie PJ, Holmes S. Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS One* 2013;**8**, DOI: 10.1371/journal.pone.0061217.
- Menzel C. Improvement of starch films for food packaging through a three-principle approach: Antioxidants, cross-linking and reinforcement. *Carbohydr Polym* 2020;**250**:116828.
- Merbt SN, Kroll A, Tamminen M *et al*. Influence of Microplastics on Microbial Structure, Function, and Mechanical Properties of Stream Periphyton. *Front Environ Sci* 2022;**10**:1–17.
- Meyer JL. The microbial loop in flowing waters. *Microb Ecol* 1994;**28**:195–9.
- Miao L, Guo S, Liu Z *et al*. Effects of nanoplastics on freshwater biofilm microbial metabolic functions as determined by BIOLOG ECO microplates. *Int J Environ Res Public Health* 2019a;**16**:8–10.
- Miao L, Guo S, Wu J *et al*. Polystyrene nanoplastics change the functional traits of biofilm communities in freshwater environment revealed by GeoChip 5.0. *J Hazard Mater* 2022;**423**:127117.
- Miao L, Hou J, You G *et al*. Acute effects of nanoplastics and microplastics on periphytic biofilms depending on particle size, concentration and surface modification. *Environ Pollut* 2019b;**255**:113300.
- Miao L, Wang C, Adyel TM *et al*. Microbial carbon metabolic functions of biofilms on plastic debris influenced by the substrate types and environmental factors. *Environ Int* 2020;**143**, DOI: 10.1016/j.envint.2020.106007.
- Miao L, Wang P, Hou J *et al*. Distinct community structure and microbial functions of

- biofilms colonizing microplastics. *Sci Total Environ* 2019c;**650**:2395–402.
- Miao L, Yu Y, Adyel TM *et al.* Distinct microbial metabolic activities of biofilms colonizing microplastics in three freshwater ecosystems. *J Hazard Mater* 2021;**403**:123577.
- Miki T, Yokokawa T, Matsui K. Biodiversity and multifunctionality in a microbial community: A novel theoretical approach to quantify functional redundancy. *Proc R Soc B Biol Sci* 2014;**281**, DOI: <https://doi.org/10.1098/rspb.2013.2498>.
- Ministère de l'économie des finances et de la souveraineté industrielle et Numérique. Accélération de l'économie circulaire au Japon. 2022.
- Molavi H, Behfar S, Shariati MA *et al.* A review on biodegradable starch based film. *J Microbiol Biotechnol Food Sci* 2015;**4**:456–61.
- Montuelle B, Dorigo U, Bérard A *et al.* The periphyton as a multimetric bioindicator for assessing the impact of land use on rivers: An overview of the Ardières-Morcille experimental watershed (France). *Hydrobiologia* 2010;**657**:123–41.
- Moons P, Michiels CW, Aertsen A. Bacterial interactions in biofilms. *Crit Rev Microbiol* 2009;**35**:157–68.
- Moore CJ, Lattin GL, Zellers AF. Quantity and type of plastic debris flowing from two urban rivers to coastal waters and beaches of Southern California. *Rev Gestão Costeira Integr* 2011;**11**:65–73.
- Mooshammer M, Wanek W, Zechmeister-Boltenstern S *et al.* Stoichiometric imbalances between terrestrial decomposer communities and their resources: Mechanisms and implications of microbial adaptations to their resources. *Front Microbiol* 2014;**5**:1–10.
- Mora-Gómez J, Elozegi A, Duarte S *et al.* Differences in the sensitivity of fungi and bacteria to season and invertebrates affect leaf litter decomposition in a Mediterranean stream. *FEMS Microbiol Ecol* 2016;**92**:1–13.
- Morohoshi T, Oi T, Aiso H *et al.* Biofilm formation and degradation of commercially available biodegradable plastic films by bacterial consortiums in freshwater environments. *Microbes Environ* 2018;**33**:332–5.
- Morrith D, Stefanoudis P V., Pearce D *et al.* Plastic in the Thames: A river runs through it. *Mar Pollut Bull* 2014;**78**:196–200.

- Mu R, Hong X, Ni Y *et al.* Recent trends and applications of cellulose nanocrystals in food industry. *Trends Food Sci Technol* 2019;**93**:136–44.
- Mulholland PJ, Elwood JW, Newbold JD *et al.* Phosphorus uptake by decomposing leaf detritus: Effect of microbial biomass and activity. *SIL Proceedings, 1922-2010* 1984;**22**:1899–905.
- Mumtaz T, Khan MR, Hassan MA. Study of environmental biodegradation of LDPE films in soil using optical and scanning electron microscopy. *Micron* 2010;**41**:430–8.
- Murphy F, Ewins C, Carbonnier F *et al.* Wastewater Treatment Works (WwTW) as a Source of Microplastics in the Aquatic Environment. *Environ Sci Technol* 2016;**50**:5800–8.
- Murphy J, Riley JP. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal Chim Acta* 1962;**27**:31–6.
- Muthukumar A, Veerappapillai S. Biodegradation of Plastics-A Brief Review. *Int J Pharm Sci Rev Res* 2015;**31**:204–9.
- Nadell CD, Bassler BL. A fitness trade-off between local competition and dispersal in *Vibrio cholerae* biofilms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;**108**:14181–5.
- Nadell CD, Drescher K, Foster KR. Spatial structure, cooperation and competition in biofilms. *Nat Rev Microbiol* 2016;**14**:589–600.
- Nadell CD, Xavier JB, Levin SA *et al.* The evolution of quorum sensing in bacterial biofilms. *PLoS Biol* 2008;**6**:0171–9.
- Naeem S, Kawabata Z, Loreau M. Transcending boundaries in biodiversity research. *Trends Ecol Evol* 1998;**13**:134–5.
- Nag M, Lahiri D, Dutta B *et al.* Biodegradation of used polyethylene bags by a new marine strain of *Alcaligenes faecalis* LNDR-1. *Environ Sci Pollut Res* 2021;**28**:41365–79.
- Nannipieri P, Giagnoni L, Landi L *et al.* Role of Phosphatase Enzymes in Soil. In: Bünemann E, Oberson A, Frossard E (eds.). *Phosphorus in Action. Soil Biology*. Springer Berlin Heidelberg, 2011, 215–243.
- Napper IE, Thompson RC. Release of synthetic microplastic plastic fibres from domestic washing machines: Effects of fabric type and washing conditions. *Mar Pollut Bull* 2016;**112**:39–45.

- Narancic T, Cerrone F, Beagan N *et al.* Recent advances in bioplastics: Application and biodegradation. *Polymers (Basel)* 2020;**12**:1–38.
- Nauendorf A, Krause S, Bigalke NK *et al.* Microbial colonization and degradation of polyethylene and biodegradable plastic bags in temperate fine-grained organic-rich marine sediments. *Mar Pollut Bull* 2016;**103**:168–78.
- Neveen SG, Salama AO. Enhancement of fungal degradation of starch based plastic polymer by laser-induced plasma. *African J Microbiol Res* 2011;**5**:3273–81.
- Nova-Institute, European Bioplastics. European Bioplastics et Nova-Institute bioplastic estimation. 2021.
- Nowak B, Pajak J, Drozd-Bratkowicz M *et al.* Microorganisms participating in the biodegradation of modified polyethylene films in different soils under laboratory conditions. *Int Biodeterior Biodegrad* 2011;**65**:757–67.
- Oberbeckmann S, Kreikemeyer B, Labrenz M. Environmental factors support the formation of specific bacterial assemblages on microplastics. *Front Microbiol* 2018;**8**:1–12.
- Oberbeckmann S, Löder MGJ, Labrenz M. Marine microplastic-associated biofilms - A review. *Environ Chem* 2015;**12**:551–62.
- Oberbeckmann S, Loeder MGJ, Gerdt G *et al.* Spatial and seasonal variation in diversity and structure of microbial biofilms on marine plastics in Northern European waters. *FEMS Microbiol Ecol* 2014;**90**:478–92.
- Oehlmann J, Schulte-Oehlmann U, Kloas W *et al.* A critical analysis of the biological impacts of plasticizers on wildlife. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 2009;**364**:2047–62.
- Ogonowski M, Motiei A, Ininbergs K *et al.* Evidence for selective bacterial community structuring on microplastics. *Environ Microbiol* 2018;**20**:2796–808.
- Oluwasina OO, Akinyele BP, Olusegun SJ *et al.* Evaluation of the effects of additives on the properties of starch-based bioplastic film. *SN Appl Sci* 2021;**3**:1–12.
- Patel RM. Polyethylene. In: Wagner JR (ed.). *Multilayer Flexible Packaging (Second Edition)*. William Andrew, 2016, 17–34.
- Penton CR, Newman S. Enzyme-Based Resource Allocated Decomposition and Landscape Heterogeneity in the Florida Everglades. *J Environ Qual* 2008;**37**:972–6.

- Peter H, Ylla I, Gudasz C *et al.* Multifunctionality and Diversity in Bacterial Biofilms Hannes. *PLoS One* 2011;**6**:1–8.
- Pinnell LJ, Turner JW. Shotgun metagenomics reveals the benthic microbial community response to plastic and bioplastic in a coastal marine environment. *Front Microbiol* 2019;**10**:1–13.
- Plastics Europe. Plastics Europe Enabling a sustainable future. 2023.
- PMERG. Plastic Europe. *Dati di Mercat del Sett della Plast Eur* 2019:zu finden unter www.plasticseurope.de/informations.
- Ponomarova O, Patil KR. Metabolic interactions in microbial communities: Untangling the Gordian knot. *Curr Opin Microbiol* 2015;**27**:37–44.
- Potts M. Desiccation tolerance of prokaryotes. *Microbiol Rev* 1994;**58**:755–805.
- Prévost-Bouré N, Christen R, Dequiedt S *et al.* Validation and application of a PCR primer set to quantify fungal communities in the soil environment by real-time quantitative PCR. *PLoS One* 2011;**6**:e24166.
- Programme des Nations Unies pour l'environnement. *Convention de Bâle*. Basel, 1989.
- Proia L, Romaní A, Sabater S. Biofilm phosphorus uptake capacity as a tool for the assessment of pollutant effects in river ecosystems. *Ecotoxicology* 2017;**26**:271–82.
- Queiroz R, Machado S, Maria T *et al.* Industrial Crops & Products Active biodegradable cassava starch films incorporated lycopene nanocapsules. *Ind Crop Prod* 2017;**109**:818–27.
- Rasmussen LA, Iordachescu L, Tumlin S *et al.* A complete mass balance for plastics in a wastewater treatment plant - Macroplastics contributes more than microplastics. *Water Res* 2021;**201**:117307.
- Raymond PA, Hartmann J, Lauerwald R *et al.* Global carbon dioxide emissions from inland waters. *Nature* 2013;**503**:355–9.
- Reid G. Biofilms in infectious disease and on medical devices. *Int J Antimicrob Agents* 1999;**11**:223–6.
- Rendueles O, Ghigo JM. Multi-species biofilms: How to avoid unfriendly neighbors. *FEMS Microbiol Rev* 2012;**36**:972–89.

- Risse-Buhl U, Trefzger N, Seifert AG *et al.* Tracking the autochthonous carbon transfer in stream biofilm food webs. *FEMS Microbiol Ecol* 2012;**79**:118–31.
- Roberson EB, Firestone MK. Relationship between desiccation and exopolysaccharide production in a soil *Pseudomonas* sp. *Appl Environ Microbiol* 1992;**58**:1284–91.
- Roberts CG. The role of biofilms in reprocessing medical devices. *Am J Infect Control* 2013;**41**:S77–80.
- Roebroek CTJ, Hut R, Vriend P *et al.* Disentangling Variability in Riverbank Macrolitter Observations. *Environ Sci Technol* 2021;**55**:4932–42.
- Roldán-Carrillo T, Rodríguez-Vázquez R, Díaz-Cervantes D *et al.* Starch-based plastic polymer degradation by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* grown on sugarcane bagasse pith: Enzyme production. *Bioresour Technol* 2003;**86**:1–5.
- Romaní AM, Amalfitano S, Artigas J *et al.* Microbial biofilm structure and organic matter use in mediterranean streams. *Hydrobiologia* 2013;**719**:43–58.
- Romaní AM, Butturini A, Sabater F *et al.* Heterotrophic metabolism in a forest stream sediment: Surface versus subsurface zones. *Aquat Microb Ecol* 1998;**16**:143–51.
- Romaní AM, Chauvet E, Febria C *et al.* The Biota of Intermittent Rivers and Ephemeral Streams: Prokaryotes, Fungi, and Protozoans. In: Thibault D, Núria B, Andrew B (eds.). *Intermittent Rivers and Ephemeral Streams: Ecology and Management*. Elsevier. Elsevier Inc., 2017, 161–88.
- Romaní AM, Fischer H, Mille-Lindblom C *et al.* Interactions of bacteria and fungi on decomposing litter: Differential extracellular enzyme activities. *Ecology* 2006;**87**:2559–69.
- Romaní AM, Fund K, Artigas J *et al.* Relevance of polymeric matrix enzymes during biofilm formation. *Microb Ecol* 2008;**56**:427–36.
- Romaní AM, Giorgi A, Acuña V *et al.* The influence of substratum type and nutrient supply on biofilm organic matter utilization in streams. *Limnol Oceanogr* 2004a;**49**:1713–21.
- Romaní AM, Guasch H, Muñoz I *et al.* Biofilm structure and function and possible implications for riverine DOC dynamics. *Microb Ecol* 2004b;**47**:316–28.
- Romani AM, Sabater S. Structure and Activity of Rock and Sand Biofilms in a Mediterranean

- Stream. *Ecology* 2001;**82**:3232–45.
- Rossi F, Artigas J, Mallet C. Structural and functional responses of leaf-associated fungal communities to chemical pollution in streams. *Freshw Biol* 2017;**62**:1207–19.
- Rossi F, Mallet C, Portelli C *et al.* Stimulation or inhibition: Leaf microbial decomposition in streams subjected to complex chemical contamination. *Sci Total Environ* 2019;**648**:1371–83.
- Rożej A, Cydzik-Kwiatkowska A, Kowalska B *et al.* Structure and microbial diversity of biofilms on different pipe materials of a model drinking water distribution systems. *World J Microbiol Biotechnol* 2015;**31**:37–47.
- Rtimi S, Pulgarin C, Bensimon M *et al.* New evidence for Cu-decorated binary-oxides mediating bacterial inactivation/mineralization in aerobic media. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 2016;**144**:222–8.
- Sabater S, Guasch H, Ricart M *et al.* Monitoring the effect of chemicals on biological communities. the biofilm as an interface. *Anal Bioanal Chem* 2007;**387**:1425–34.
- Sabater S, Romaní AM. Metabolic changes associated with biofilm formation in an undisturbed Mediterranean stream. *Hydrobiologia* 1996;**335**:107–13.
- Sabater S, Timoner X, Borrego C *et al.* Stream biofilm responses to flow intermittency: From cells to ecosystems. *Front Environ Sci* 2016;**4**:1–10.
- Sadri SS, Thompson RC. On the quantity and composition of floating plastic debris entering and leaving the Tamar Estuary, Southwest England. *Mar Pollut Bull* 2014;**81**:55–60.
- Sailors HR, P. HJ. History of Polyolefins. *J Macromol Sci Part A - Chem* 2006;**12**:1377–402.
- Sampaio A, Cortes R, Leão C. Invertebrate and microbial colonisation in native and exotic leaf litter species in a mountain stream. *Int Rev Hydrobiol* 2001;**86**:527–40.
- Sankhla IS, Sharma G, Tak A. *Fungal Degradation of Bioplastics: An Overview*. Elsevier B.V., 2020.
- Santana-Viera S, Montesdeoca-Esponda S, Guedes-Alonso R *et al.* Organic pollutants adsorbed on microplastics: Analytical methodologies and occurrence in oceans. *Trends Environ Anal Chem* 2021;**29**:e00114.
- Sawada H. ISO standard activities in standardization of biodegradability of plastics -

- Development of test methods and definitions. *Polym Degrad Stab* 1998;**59**:365–70.
- Sebastian M, Ammerman JW. The alkaline phosphatase PhoX is more widely distributed in marine bacteria than the classical PhoA. *ISME J* 2009;**3**:563–72.
- Sebastian M, Ammerman JW. Role of the phosphatase PhoX in the phosphorus metabolism of the marine bacterium *Ruegeria pomeroyi* DSS-3. *Environ Microbiol Rep* 2011;**3**:535–42.
- Seeley ME, Song B, Passie R *et al.* Microplastics affect sedimentary microbial communities and nitrogen cycling. *Nat Commun* 2020;**11**:1–10.
- Shah AA, Hasan F, Hameed A *et al.* Biological degradation of plastics: A comprehensive review. *Biotechnol Adv* 2008;**26**:246–65.
- Shim GI, Kim SH, Eom HW *et al.* Concentration- and roughness-dependent antibacterial and antifungal activities of CuO thin films and their Cu ion cytotoxicity and elution behavior. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2015;**42**:735–44.
- Sid S, Mor RS, Kishore A *et al.* Bio-sourced polymers as alternatives to conventional food packaging materials: A review. *Trends Food Sci Technol* 2021;**115**:87–104.
- Singer G, Besemer K, Schmitt-Kopplin P *et al.* Physical heterogeneity increases biofilm resource use and its molecular diversity in stream mesocosms. *PLoS One* 2010;**5**, DOI: 10.1371/journal.pone.0009988.
- Singh B, Sharma N. Mechanistic implications of plastic degradation. *Polym Degrad Stab* 2008;**93**:561–84.
- Sinsabaugh RL, Carreiro MM, Alvarez S. Enzyme and microbial dynamic during litter decomposition. In: Burns R, Dick RP (eds.). *Enzymes in the Environment*. Marcel Dek. USA, 2002, 249–66.
- Sinsabaugh RL, Follstad Shah JJ, Hill BH *et al.* Ecoenzymatic stoichiometry of stream sediments with comparison to terrestrial soils. *Biogeochemistry* 2012;**111**:455–67.
- Sinsabaugh RL, Hill BH, Follstad Shah JJ. Ecoenzymatic stoichiometry of microbial organic nutrient acquisition in soil and sediment. *Nature* 2009;**462**:795–8.
- Sinsabaugh RL, Lauber CL, Weintraub MN *et al.* Stoichiometry of soil enzyme activity at global scale. *Ecol Lett* 2008;**11**:1252–64.

- Sinsabaugh RL, Shah JJF. Ecoenzymatic stoichiometry and ecological theory. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 2012;**43**:313–43.
- Siracusa V, Rocculi P, Romani S *et al.* Biodegradable polymers for food packaging: a review. *Trends Food Sci Technol* 2008;**19**:634–43.
- Skariyachan S, Patil AA, Shankar A *et al.* Enhanced polymer degradation of polyethylene and polypropylene by novel thermophilic consortia of *Brevibacillus* sps. and *Aneurinibacillus* sp. screened from waste management landfills and sewage treatment plants. *Polym Degrad Stab* 2018;**149**:52–68.
- Smith VH. Microbial diversity-productivity relationships in aquatic ecosystems. *FEMS Microbiol Ecol* 2007;**62**:181–6.
- Song JH, Murphy RJ, Narayan R *et al.* Biodegradable and compostable alternatives to conventional plastics. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 2009;**364**:2127–39.
- Sowmya H V., Ramalingappa, Krishnappa M *et al.* Degradation of polyethylene by *Trichoderma harzianum*—SEM, FTIR, and NMR analyses. *Environ Monit Assess* 2014;**186**:6577–86.
- Sperling LH. *Introduction to Physical Polymer Science*. Fourth Edi., 2005.
- Stelzer RS, Heffernan J, Likens GE. The influence of dissolved nutrients and particulate organic matter quality on microbial respiration and biomass in a forest stream. *Freshw Biol* 2003;**48**:1925–37.
- Studel B, Hector A, Friedl T *et al.* Biodiversity effects on ecosystem functioning change along environmental stress gradients. *Ecol Lett* 2012;**15**:1397–405.
- Stock M, Ward AK. Establishment of a Bedrock Epilithic Community in a Small Stream: Microbial (Algal and Bacterial) Metabolism and Physical Structure. *Can J Fish Aquat Sci* 1989;**46**:1874–83.
- Stott DE, Andrews SS, Liebig MA *et al.* Evaluation of β -Glucosidase Activity as a Soil Quality Indicator for the Soil Management Assessment Framework. *Soil Sci Soc Am J* 2010;**74**:107–19.
- Strahler A. Hypsometric (area-altitude) analysis of erosional topography. *Geol Soc Am Bull* 1952;**63**:1117–42.

- Strahler A. Quantitative Analysis of Watershed Geomorphology. *Trans Am Geophys Union* 1957;**38**:913–20.
- Sutton SD, Findlay RH. Sedimentary microbial community dynamics in a regulated stream: East Fork of the Little Miami River, Ohio. *Environ Microbiol* 2003;**5**:256–66.
- Taghavi N, Zhuang WQ, Baroutian S. Enhanced biodegradation of non-biodegradable plastics by UV radiation: Part 1. *J Environ Chem Eng* 2021;**9**:106464.
- Talvitie J, Mikola A, Koistinen A *et al.* Solutions to microplastic pollution – Removal of microplastics from wastewater effluent with advanced wastewater treatment technologies. *Water Res* 2017;**123**:401–7.
- Tank JL, Dodds WK. Nutrient limitation of epilithic and epixylic biofilms in 10 North American streams. 2003:1031–49.
- Tank JL, Rosi-Marshall EJ, Griffiths NA *et al.* A review of allochthonous organic matter dynamics and metabolism in streams. *J North Am Benthol Soc* 2010;**29**:118–46.
- Teuten EL, Saquing JM, Knappe DRU *et al.* Transport and release of chemicals from plastics to the environment and to wildlife. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 2009;**364**:2027–45.
- Thompson RC, Swan SH, Moore CJ *et al.* Our plastic age. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 2009;**364**:1973–6.
- Tilman D. *Resource Competition and Community Structure*. Princeton. Robert B, Brown EB (eds.). U.S.A, 1982.
- Torriani A. Influence of inorganic phosphate in the formation of phosphatases by *Escherichia coli*. *BBA - Biochim Biophys Acta* 1960;**38**:460–9.
- Tramoy R, Colasse L, Gasperi J *et al.* Plastic debris dataset on the Seine river banks: Plastic pellets, unidentified plastic fragments and plastic sticks are the Top 3 items in a historical accumulation of plastics. *Data Br* 2019;**23**:103697.
- Tu C, Liu Y, Li L *et al.* Structural and Functional Characteristics of Microplastic Associated Biofilms in Response to Temporal Dynamics and Polymer Types. *Bull Environ Contam Toxicol* 2021;**107**:633–9.
- United States Environmental Protection Agency. What are Combined Sewer Overflows (CSOs)? *United States Environ Prot Agency* 2017:1.

- Urbanek AK, Rymowicz W, Strzelecki MC *et al.* Isolation and characterization of Arctic microorganisms decomposing bioplastics. *AMB Express* 2017;**7**, DOI: 10.1186/s13568-017-0448-4.
- Vannote RL, Minshall GW, Cummins KW *et al.* The river continuum concept. *Can J Fish Aquat Sci* 1980;**37**:130–7.
- Vaughn DR, Kellerman AM, Wickland KP *et al.* Anthropogenic landcover impacts fluvial dissolved organic matter composition in the Upper Mississippi River Basin. *Biogeochemistry* 2021;**164**:117–41.
- Vert M, Doi Y, Hellwich K-H *et al.* Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012). *Trends Biomater Artif Organs* 2012;**84**:377–410.
- Vertes A, Hitchins V, Phillips KS. Analytical challenges of microbial biofilms on medical devices. *Anal Chem* 2012;**84**:3858–66.
- Vianna TC, Marinho CO, Marangoni Júnior L *et al.* Essential oils as additives in active starch-based food packaging films: A review. *Int J Biol Macromol* 2021;**182**:1803–19.
- Vidhate RP, Bhide AJ, Giri AP. Functional characterization of N-acetyl glucosaminidase from *Myrothecium verrucaria* for bio-control of plant pathogenic fungi and bio-production of N-acetyl glucosamine. *Process Biochem* 2023;**129**:102–12.
- Vriend P, Calcar C Van, Kooi M *et al.* Rapid Assessment of Floating Macroplastic Transport in the Rhine. 2020;**7**:1–8.
- Wagner A. Competition for nutrients increases invasion resistance during assembly of microbial communities. *Mol Ecol* 2022;**31**:4188–203.
- Wagner M, Scherer C, Alvarez-Muñoz D *et al.* Microplastics in freshwater ecosystems: what we know and what we need to know. *Microplastics Freshw Ecosyst what we know what we need to know* 2014;**26**:1–9.
- Wang B, Sui J, Yu B *et al.* Physicochemical properties and antibacterial activity of corn starch-based films incorporated with *Zanthoxylum bungeanum* essential oil. *Carbohydr Polym* 2021a;**254**:117314.
- Wang H, Liu X, Wang Y *et al.* Spatial and temporal dynamics of microbial community composition and factors influencing the surface water and sediments of urban rivers. *J*

- Environ Sci (China)* 2023;**124**:187–97.
- Wang L, Tong J, Li Y *et al.* Bacterial and fungal assemblages and functions associated with biofilms differ between diverse types of plastic debris in a freshwater system. *Environ Res* 2021b;**196**, DOI: 10.1016/j.envres.2020.110371.
- Wang L, Wang Y, Li Y *et al.* Benthic Biofilm Bacterial Communities and Their Linkage with Water-Soluble Organic Matter in Effluent Receivers. *Int J Environ Res Public Health* 2022;**19**, DOI: 10.3390/ijerph19041994.
- Wang T, Yu C, Chu Q *et al.* Adsorption behavior and mechanism of five pesticides on microplastics from agricultural polyethylene films. *Chemosphere* 2020;**244**:125491.
- Weigelhofer G, Waringer JA. Allochthonous Input of Coarse Particulate Organic Matter (CPOM) in a First to Fourth Order Austrian Forest Stream. *Int Rev der gesamten Hydrobiol und Hydrogr* 1994;**79**:461–71.
- Weitere M, Erken M, Majdi N *et al.* The food web perspective on aquatic biofilms. *Ecol Monogr* 2018;**88**:543–59.
- Wilhelm L, Besemer K, Fragner L *et al.* Altitudinal patterns of diversity and functional traits of metabolically active microorganisms in stream biofilms. *ISME J* 2015;**9**:2454–64.
- Windsor FM, Durance I, Horton AA *et al.* A catchment-scale perspective of plastic pollution. *Glob Chang Biol* 2019;**25**:1207–21.
- Wingender J, Neu TR, Flemming HC. *Microbial Extracellular Polymeric Substances. Characterization, Structure and Function*. Springer. Flemming HC (ed.), 1999.
- Wright RJ, Erni-Cassola G, Zadjelovic V *et al.* Marine Plastic Debris: A New Surface for Microbial Colonization. *Environ Sci Technol* 2020;**54**:11657–72.
- Wu C, Zhang K, Huang X *et al.* Sorption of pharmaceuticals and personal care products to polyethylene debris. *Environ Sci Pollut Res* 2016;**23**:8819–26.
- Yang J, Yang Y, Wu WM *et al.* Evidence of polyethylene biodegradation by bacterial strains from the guts of plastic-eating waxworms. *Environ Sci Technol* 2014a;**48**:13776–84.
- Yang S, Song S, Yan Q *et al.* Biochemical Characterization of the First Fungal Glycoside. *Agric food Chem* 2014b;**62**:5181–90.
- Yang XE, Wu X, Hao HL *et al.* Mechanisms and assessment of water eutrophication. *J*

- Zhejiang Univ Sci B* 2008;**9**:197–209.
- Ylla I, Borrego C, Román AM *et al.* Availability of glucose and light modulates the structure and function of a microbial biofilm. *FEMS Microbiol Ecol* 2009;**69**:27–42.
- Yoshimura KM, York J, Biddle JF. Impacts of salinity and oxygen on particle-associated microbial communities in the Broadkill River, Lewes DE. *Front Mar Sci* 2018;**5**:1–11.
- Zadjelovic V, Erni-Cassola G, Obrador-Viel T *et al.* A mechanistic understanding of polyethylene biodegradation by the marine bacterium *Alcanivorax*. *J Hazard Mater* 2022;**436**:129278.
- Zalasiewicz J, Waters CN, Ivar do Sul JA *et al.* The geological cycle of plastics and their use as a stratigraphic indicator of the Anthropocene. *Anthropocene* 2016;**13**:4–17.
- Zardus JD, Nedved BT, Huang Y *et al.* Microbial biofilms facilitate adhesion in biofouling invertebrates. *Biol Bull* 2008;**214**:91–8.
- Zettler ER, Mincer TJ, Amaral-Zettler LA. Life in the “plastisphere”: Microbial communities on plastic marine debris. *Environ Sci Technol* 2013;**47**:7137–46.
- Zhang C, Mu Y, Li T *et al.* Assembly strategies for polyethylene-degrading microbial consortia based on the combination of omics tools and the “Plastisphere.” *Front Microbiol* 2023;**14**:1–20.
- Zhang J, Ai Z, Liu H *et al.* Short-term N addition in a *Pinus tabulaeformis* plantation: Microbial community composition and interactions show different linkages with ecological stoichiometry. *Appl Soil Ecol* 2022a;**174**, DOI: 10.1016/j.apsoil.2022.104422.
- Zhang W, Jiang C, Chen L *et al.* Spatial turnover of core and occasional bacterial taxa in the plastisphere from a plateau river, China. *Sci Total Environ* 2022b;**838**:156179.
- Zhang W, Zhou P, Pan S *et al.* The role of microbial communities on primary producers in aquatic ecosystems: Implications in turbidity stress resistance. *Environ Res* 2022c;**215**:1–9.
- Zitko V, Hanlon M. Another source of pollution by plastics: Skin cleaners with plastic scrubbers. *Mar Pollut Bull* 1991;**22**:41–2.
- Zounggran Y, Lynda E, Dobi-brice KK *et al.* Journal of Environmental Chemical Engineering Influence of natural factors on the biodegradation of simple and composite

bioplastics based on cassava starch and corn starch. *J Environ Chem Eng* 2020;**8**:104396.

ANNEXES

Photos des microcosmes de rivières







Résumé court

La pollution plastique, résultant de la production massive et de l'utilisation de plastiques depuis le 20^e siècle, est omniprésente dans la biosphère. Les plastiques, conçus pour leur durabilité, perdurent des décennies, voire des siècles, et se fragmentent en microplastiques, répandus partout, des fonds marins aux montagnes. Dans le milieu aquatique, les plastiques favorisent la formation de communautés microbiennes, appelées "plastisphère", similaires aux biofilms aquatiques naturels. Les écosystèmes marins ont été largement étudiés pour quantifier la présence de plastiques, en particulier de microplastiques, et leur impact sur les communautés microbiennes. Cependant, les écosystèmes d'eau douce ont été moins explorés que les écosystèmes marins, tant sur la présence de plastiques que sur l'impact de ces derniers sur les communautés microbiennes naturelles du benthos de la rivière. De plus, la fraction de taille la plus étudiée correspond aux microplastiques par rapport aux macroplastiques.

La première partie de cette thèse a comparé la colonisation microbienne entre deux types de plastiques (non biodégradable et biodégradable) et des substrats naturels (sédiments, rochers et feuilles) sur deux sites de rivières, avec des niveaux de pollution plastique distincts. Cette comparaison a été faite avec l'analyse des descripteurs structuraux et fonctionnels des communautés microbiennes. De façon globale, les densités microbiennes et les activités de décomposition du carbone, azote et phosphore organique étaient plus élevées au niveau des substrats naturels (sédiments, rochers et feuilles) qu'au niveau des substrats plastiques. Ceci peut être dû à une plus grande disponibilité en carbone organique et en nutriments dans les substrats naturels. Les microorganismes de rivière ont montré des différences de colonisation, avec une densité bactérienne et des activités enzymatiques plus élevées sur le plastique biodégradable dans le site en aval. En conséquence, la présence de macroplastiques biodégradables augmenterait davantage l'hétérotrophie de l'écosystème fluvial que la présence de macroplastiques non biodégradables.

La deuxième partie a évalué l'impact structurel et fonctionnel des deux types de plastiques sur les communautés microbiennes des sédiments et rochers en microcosmes de rivière. Les résultats ont montré des effets contrastés en fonction de l'échelle d'étude. Au niveau du substrat, l'ajout de plastique non biodégradable a augmenté l'activité enzymatique β -glucosidase et l'ajout de plastique biodégradable a réduit la densité fongique sur les communautés microbiennes des rochers. Cependant, à l'échelle du microcosme, la présence des deux plastiques a réduit les activités N-acetylglucosaminidase et phosphatase ainsi que les biomasses fongiques et algales présents dans l'ensemble du microcosme. Tant à l'échelle du substrat qu'à l'échelle du microcosme, l'ajout de litières de feuilles tend à réduire l'impact des plastiques sur les communautés microbiennes naturelles.

L'impact des plastiques sur les communautés microbiennes benthiques dépend de divers facteurs, notamment le type de plastique, les conditions physico-chimiques de la rivière, la présence de substrats organiques (ex. feuilles) et de l'échelle de l'étude. Cette recherche met en évidence l'impact des macroplastiques sur la structure et la fonction des communautés microbiennes des rochers et appelle à un équilibre dans la recherche sur la pollution plastique, au-delà des microplastiques.

Mot clefs : pollution macroplastique ; plastique biosourcé ; polyéthylène ; impact ; communautés microbiennes ; rivière ; microcosmes ; *upscaling*

Short abstract

Plastic pollution, resulting from massive production and use of plastic polymers since the 20th century, is now ubiquitous in the biosphere. Plastics durability makes them able to persist for decades to centuries, fragmenting into microplastics, that can accumulate everywhere from the deep ocean to the top of the mountains. In aquatic environments, plastics promote the formation of microbial communities similar to natural aquatic biofilms known as the 'plastisphere'. While the presence and impact of plastics on microbial communities has been extensively characterized for the marine ecosystems, freshwater ecosystems have been less explored. Furthermore, most of the studies focus on the effect of the microplastics size fraction rather than on macroplastics.

The first part of this thesis compared the microbial colonization between two plastic types (non-biodegradable and biodegradable) and natural substrata (sediments, rocks, and leaves) in two sites of the same watershed with contrasting plastic-pollution levels. This comparison included an analysis of the structural and functional descriptors of microbial communities during substrata colonization. Overall, microbial densities and enzymatic activities involved in organic carbon, nitrogen, and phosphorous decomposition were higher on natural substrata (sediments, rocks, and leaves) than on plastics substrata. This could be due to the greater availability of organic carbon and nutrients in natural substrata. River microorganisms exhibited colonization differences between plastic types at the downstream site, with higher bacterial density and enzymatic activities values measured on the biodegradable compared to the non-biodegradable plastic. Consequently, the presence of biodegradable macroplastics would increase heterotrophy to the river ecosystem more than the presence of non-biodegradable macroplastics.

The second part assessed the structural and functional impact of the same plastic types on sediment and rock microbial communities in a river microcosm experiment. Main findings revealed contrasting plastic effects depending on the approach used. At the substratum scale, the addition of non-biodegradable plastic increased β -glucosidase activity and the addition of biodegradable plastic reduced the fungal density in microbial communities from rocks. However, at the microcosm scale, the presence of both plastics reduced N-acetyl-glucosaminidase and phosphatase activities, as well as fungal and algal biomasses in the entire microcosm. At both substratum and microcosm scales, the addition of leaf litter tended to mitigate the plastic impact on microbial communities, especially those from rocks.

The impact of plastics on benthic microbial communities depends on several factors, including the plastic type, water physicochemical characteristics, the presence of organic substrata (e.g. leaves), and the scale of the study. This research highlights the impact of macroplastics on the structure and function of rock microbial communities, and calls for a more balanced research between the study of microplastics and plastics form other size fractions.

Keywords: macroplastic pollution; biosourced plastic; polyethylene; impact; microbial communities; river; microcosms; upscaling