THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National Polytechnique de Toulouse (Toulouse INP)

Discipline ou spécialité :

Ecologie Fonctionnelle

Présentée et soutenue par :

M. PAUL BRAYLE

le jeudi 14 décembre 2023

Titre :

Ecotoxicité de nanoparticules de graphène fonctionnalisées sur des biofilms d'eau douce.

Ecole doctorale :

Sciences de l'Univers de l'Environnement et de l'Espace (SDU2E)

Unité de recherche :

Laboratoire Ecologie Fonctionnelle et Environnement (LEFE)

Directeur(s) de Thèse :

M. ERIC PINELLI

MME MAIALEN BARRET

Rapporteurs :

MME CATHERINE SANTAELLA, CEA CADARACHE

M. PATRICE GONZALEZ, UNIVERSITE BORDEAUX 1

Membre(s) du jury :

M. EMMANUEL FLAHAUT, UNIVERSITE TOULOUSE 3, Président

M. BENOIT SCHOEFS, UNIVERSITE DU MANS, Invité(e)

M. ERIC PINELLI, TOULOUSE INP, Membre

MME LISE BARTHELMEBS, UNIVERSITE DE PERPIGNAN, Membre

MME MAIALEN BARRET, TOULOUSE INP, Membre

REMERCIEMENTS

Je souhaiterais en premier lieu remercier mes deux directeurs de thèse, Maialen et Eric. Merci pour votre encadrement sans faille, vos conseils, votre soutien et pour tout ce que vous m'avez appris et apporté. C'est grâce à vous que ces travaux se sont déroulés dans les meilleures des conditions. Votre disponibilité et votre écoute m'ont été d'une grande aide tout au long de ma thèse. Votre accompagnement scientifique et surtout humain a été exceptionnel, mais surtout essentiel. Je ne serai jamais assez reconnaissant d'avoir fait mes premiers pas dans la recherche avec vous. Vous êtes des êtres humains exceptionnels, merci du fond du cœur.

Je remercie tous les membres de mon jury de thèse d'avoir accepté de prendre le temps d'évaluer mon travail. Merci Patrice Gonzalez, Catherine Santaella, Lise Barthelmebs, Emmanuel Flahaut et Benoît Schoefs. Un remerciement supplémentaire pour Emmanuel qui a pu me fournir toutes les nanoparticules nécessaires à ces travaux, pour leurs caractérisations, ton expertise en physique-chimie mais aussi pour ton accompagnement au divers meeting du Graphene Flagship à travers l'Europe. J'aimerais aussi ajouter un remerciement supplémentaire à Benoît pour ton accueil au Mans, la possibilité d'effectuer des expériences complémentaires avec toi mais aussi pour ton expertise dans le domaine des microalgues.

J'aimerais remercier les financeurs de cette thèse : le ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche et le projet Européen du Graphene Flagship qui m'a aussi permis de voyager à travers l'Europe et de rencontrer de nouveaux chercheurs et de découvrir leurs travaux.

Un grand merci à toute l'équipe ECI du laboratoire. A ceux qui ont partagé mon bureau pendant ces trois années, Mathieu, Antoine et Sara. Merci pour votre bonne humeur constante, nos discussions et pour l'ambiance chaleureuse qui a toujours régné dans ce bureau, vous avez rendu ces trois années très agréables. Mention spéciale à Mathieu qui a le même calendrier que moi, avec qui on se comprend, se soutient et se supporte tous les jours. Tu as été un super compagnon de route. Merci Florence, depuis mon entrée dans le laboratoire en stage de master 1, tu as toujours eu le mot juste, tu as été remplie de gentillesse et de bienveillance. J'aimerais aussi remercier Lauris, qui est là depuis le début aussi, qui m'a formé et transmis son savoir, aussi avec beaucoup de bienveillance. Un grand merci à Jérôme, pour tes conseils, tes idées et aussi ta formidable polyvalence. Merci à tous les stagiaires du laboratoire qui ont animé la vie au laboratoire durant leurs passages. Particulièrement à Clara, qui a travaillé avec moi et qui a fourni un travail de qualité qui m'a été très utile pour ces travaux de thèse. Je vous remercie tous, et tous les autres membres de l'équipe, pour les discussions dans les

couloirs, les conseils, les rires, les pauses clopes (beaucoup trop de pauses clopes) et la bonne ambiance quotidienne, essentielle à la réussite de ces travaux.

J'aimerais remercier ma famille qui me soutient depuis le début, de près ou de loin. Même si je ne suis pas le plus présent et le plus expressif sur mon travail, je sais que je peux toujours compter sur vous. Merci de m'avoir encouragé, rassuré dans mes choix et de m'avoir permis d'en arriver là. Un grand merci à tout mon entourage, mes proches et mes amis qui m'ont soutenu, supporté, changé les idées mais aussi réconforté quand j'en avais besoin. Pas besoin de vous citer, vous vous reconnaitrez. Merci à tous.

J'aimerais aussi dédier un remerciement, un peu plus particulier, à la musique, ma passion, qui m'accompagne absolument tous les jours. Merci à tous les musiciens que j'ai croisé durant ces trois années mais aussi à mon label pour toutes ces belles opportunités. Tout ceci m'a apporté un épanouissement personnel en dehors du travail qui a été essentiel à mon bon fonctionnement et donc à la réussite de ces travaux de thèse.

Merci à tous.

TABLE DES MATIERES

Apparaissent ***en gras et en italique*** les titres correspondants aux parties d'articles.

LISTE DES ABREVIATIONS 8

INTRODUCTION GENERALE 9

CHAPITRE 1 : Contexte bibliographique 12

1. Les nanoparticules de graphène 13

1.1. Les nanoparticules : histoire et définition 13

1.2. Les nanoparticules de carbone : précisions sur le graphène et ses dérivés 14

1.3. Propriétés et applications du graphène et ses dérivés 17

1.4. Le graphène dans l'environnement 18

1.4.1. Sources et rejets des GBMs dans l'environnement 18

1.4.2. Devenir des GBMs dans l'environnement aquatique 19

2. Modèles biologiques d'étude 21

2.1. Les biofilms de rivières 21

2.1.1. Présentation des biofilms de rivière 21

2.1.2. Intérêt écotoxicologique des biofilms de rivière 23

2.2. La diatomée *Nitzschia palea* 23

2.2.1. Les microalgues : généralités 23

2.2.2. Les diatomées : biologie et cycle de vie 24

2.2.3. Rôle écologique des diatomées 27

2.2.4. Intérêt écotoxicologique des diatomées 27

2.2.5. Modèle d'étude : *Nitzschia palea* 28

3. Effets du graphène et ses dérivés sur les communautés microbiennes 29

3.1. ***Introduction*** 32

3.2. ***Studies addressing interactions between GBMs and microbial communities*** 34

3.2.1. ***Environmental compartments studied and experimental models*** 35

3.2.2. ***Graphene based materials used, concentrations and exposure time*** 40

3.2.3. ***Study goals: from ecotoxicology to process engineering*** 41

3.3. ***Effect of GBMs on the microbial community structure*** 42

3.3.1. ***Effect on growth, viability and biomass*** 42

3.3.2. ***Effect on the alpha diversity*** 43

3.3.3. ***Effect on the beta diversity*** 44

3.4. ***Microbial activities affected by GBMs and related taxa affected*** 45
3.4.1. ***Nitrogen cycle*** 45
3.4.2. ***Carbon cycle*** 47
3.4.3. ***Microbiota and host interactions*** 50
3.4.4. ***Antibiotics resistance*** 51
3.5. ***Effect of microbial communities on graphene-based materials*** 52
3.5.1. ***Degradation, reduction and oxidation of GBMs by microbial communities*** 52
3.5.2. ***Bioaccumulation and fate of GBMs after interactions with microbial communities*** 53
3.6. ***Conclusion and perspectives*** 53
Conflict of interest 55
Acknowledgments 56
4. Effets connus du graphène et ses dérivés sur les microalgues 57

CHAPITRE 2 : Matériels et méthodes 62
1. Nanoparticules de graphène et caractéristiques 63
1.1. Caractéristiques des nanoparticules de graphène utilisées 63
1.2. Choix des concentrations d'exposition 65
2. Culture et méthodes d'expositions 65
2.1. Provenance du matériel biologique et pré culture 66
2.1.1. Diatomée *Nitzschia palea* 66
2.1.2. Algue verte Raphidocelis subcapitata 66
2.1.3. Consortium bactérien 67
2.2. Méthodes d'exposition aux GBMs 67
2.2.1. Exposition de *Nitzschia palea* en plaques 67
2.2.2. Variations de l'exposition de *Nitzschia palea* 68
2.2.3. Exposition du biofilm mixte diatomées/consortium bactérien 69
3. La cytométrie en flux 70
3.1. Dénombrement cellulaire 70
3.2. Marqueurs fluorescents et paramètres physiologiques 73
3.3. Interférence des GBMs avec la cytométrie en flux 75

CHAPITRE 3 : Effets de nanoparticules de graphène fonctionnalisées sur un biofilm de rivière mixte (diatomées/bactéries) 80
1. ***Introduction*** 84
2. ***Material and methods*** 86

2.1. ***Graphene-based nanomaterials*** ... 86
2.2. ***Complex biofilm model and exposure procedure*** ... 86
2.3. ***Flow cytometry analysis*** ... 87
2.3.1. ***Microorganisms counts and growth rate calculation*** ... 87
2.3.2. ***Diatom physiological parameters*** ... 88
2.4. ***Analysis of community level physiological profiles (CLPP)*** ... 88
2.5. ***Analysis of bacterial community structure: DNA extraction, PCR, sequencing and data processing*** ... 89
2.6. ***Statistical analysis*** ... 90
2.7. ***Data deposition*** ... 90
3. ***Results*** ... 90
3.2. ***Effects on microorganism growth rates*** ... 90
3.3. ***Effects on N. palea physiology*** ... 91
3.4. ***Effects of GBMs exposure on community level physiological profiles*** ... 93
3.5. ***Effects on bacterial community structure*** ... 93
4. ***Discussion*** ... 96
4.2. ***Consequences of the GBMs exposure on the algal compartment*** ... 97
4.3. ***Consequences of the GBMs exposure on the bacterial compartment*** ... 98
4.4. ***Consequences of the diatom-bacteria interactions on the response to GBMs exposure*** 100
5. ***Conclusion*** ... 101
Acknowledgment ... 102
Supplementary data ... 102

CHAPITRE 4 : Effets de nanoparticules de graphène fonctionnalisées sur la diatomée *Nitzschia palea* ... 107
1. ***Introduction*** ... 111
2. ***Materials and methods*** ... 112
2.1. ***Preculture of the diatom Nitzschia palea*** ... 112
2.2. ***Graphene based materials*** ... 112
2.3. ***GBM-medium interaction*** ... 113
2.4. ***Effect of GO and rGO on diatom division rate, lipid and chlorophyll content*** ... 113
2.5. ***Shading effect of GO*** ... 114
2.6. ***Photosynthesis efficiency*** ... 114
2.7. ***77k fluorescence spectroscopy*** ... 114
2.8. ***Sedimentation and "sticking" of GO*** ... 115
2.9. ***Scanning electron microscope (SEM)*** ... 115

2.10. ***RAMAN analysis of GO*** 115
3. ***Results and discussion*** 116
3.1. ***Graphene based nanomaterials characteristics*** 116
3.2. ***Increased division rate of Nitzschia palea by GO*** 117
3.3. ***Chlorophyll content increase and minor shading effect upon GO exposure*** 118
3.4. ***Unchanged photosynthesis efficiency*** 120
3.5. ***Sedimentation, "sticking" of GO and interactions with Nitzschia palea*** 122
3.6. ***Effect of GO on the bioavailability of nutrients*** 125
3.7. ***GO modification after diatom exposure*** 125
3.8. ***Possible enhancement of the heterotrophy of Nitzschia palea*** 127
3.9. ***Neutral lipid content*** 127
4. ***Conclusion and perspectives*** 128
Conflict of interest 129
Acknowledgments 129
Supplementary data 130
5. Expérimentations supplémentaires 132
5.1. Validation de l'augmentation du taux de croissance de *Nitzschia palea* 132
5.2. Propriétés optiques du GO 133
5.2.1. Absorption lumineuse du GO 133
5.2.2. Spectre de transmission du GO 134
5.2.3. Influence des propriétés optiques du GO sur *Nitzschia palea* 134
6. Comparaison avec une algue pélagique 135
6.1. Mise au point expérimentale et matériel et méthode 135
6.1.1. Mise au point expérimental selon la norme OCDE 201 135
6.1.2. Exposition de l'algue au GO et rGO 136
6.2. Résultats 137
6.3. Discussion et conclusion 139

CHAPITRE 5 : Discussion et conclusion 142
1. Influence de la vie benthique sur la réponse à l'exposition à du graphène fonctionnalisé 143
2. Le GO et son influence sur l'hétérotrophie de la diatomée *Nitzschia palea* 145
3. Influence du taux d'oxydation du graphène 147
4. Influence de la complexité environnementale sur la réponse des biofilms à l'exposition à du graphène fonctionnalisé 148
5. Répercussions écosystémiques des impacts de graphènes fonctionnalisés sur les biofilms d'eau douce 149

BIBLIOGRAPHIE 153
LISTE DES FIGURES 187
LISTE DES TABLEAUX 191
ANNEXES 192
LISTES DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS 194

LISTE DES ABREVIATIONS

AFNOR : Association Française de NORmalisation

AWCD : développement colorimétrique moyen des puits, de l'anglais « Average Well Colour Development »

BET : Brunauer, Emmett and Teller

CIRIMAT : Centre Interuniversitaire de Recherche et d'Ingénierie des MATériaux

CNT : Nanotube de Carbone, de l'anglais « Carbon NanoTube »

DAG : Diacylglycerol

DIET : Direct Inter-species Electron Transfert

DO : Densité Optique

EPS : Substances Polymériques Extracellulaires, de l'anglais « ExoPolymeric Substances »

FLG : graphène à peu de couches, de l'anglais « Few Layers Graphene »

FSC : Forward Scatter

GBM : Matériau à Base de Graphène, de l'anglais « Graphene-Based Material »

GO : Graphène Oxydé

HRTEM : Microscopie Electronique à Transmission de Haute Résolution

IBD : Indice Biologique Diatomées

IS : force ionique, de l'anglais « Ionic Strength »

LEFE : Laboratoire d'Ecologie Fonctionnelle et Environnement

MEB : Microscopie Electronique à Balayage

MO : Matière Organique

NAR : NitrAte Réductase

NIR : NitrIte Réductase

NOR : Oxyde Nitrique Réductase

NOS : Oxyde Nitrique Synthase

OTU : Unité Taxonomique Opérationnelle

PAM : Modulation d'Amplidtude d'Impulsion, de l'anglais « Pulse-Amplitude Modulated »

PEC : Concentration Environnementale Prédite, de l'anglais « Predicted Environmental Concentration »

rGO : Graphène Oxydé réduit

ROS : Espèces Réactives de l'Oxygène, de l'anglais « Reactive Oxygen Species »

SSC : Side Scatter

TAG : Triacylglycerol

TEM : Microscopie Electronique à Transmission

INTRODUCTION GENERALE

Les progrès réalisés dans les différents domaines industriels n'ont pas toujours été accompagnés de la prise en compte des risques pour la santé humaine et pour l'environnement associés à l'usage de certaines technologies ou produits chimiques. Prenons l'exemple du plastique, qui à l'époque était considéré comme l'invention du siècle qui changerait le quotidien de la population (Thompson et al., 2009). Le plastique a tenu ses promesses, mais c'est seulement près d'un demi-siècle plus tard que les problèmes liés à sa dissémination dans l'environnement sont apparus (Cole et al., 2011; Persson et al., 2022). Le graphène est une nanoparticule de carbone découverte en 2004 et ses caractéristiques physico-chimiques font de lui un des matériaux les plus prometteurs dans le domaine des nanotechnologies ces dernières années, suscitant l'intérêt des scientifiques et industriels. Afin de ne pas reproduire le même schéma qu'avec le plastique, le projet européen Graphene Flagship a vu le jour en 2013 (https://graphene-flagship.eu/). Il regroupe plus de 170 partenaires à travers 22 pays d'Europe et a pour but de superviser des travaux gravitants autour du graphène, de sa production à son optimisation et utilisation, mais aussi ses potentiels effets toxicologiques pour l'Homme, son devenir dans l'environnement et ses effets écotoxicologiques sur les organismes vivant dans les milieux naturels. C'est dans le cadre de ce dernier objectif que s'inscrivent ces travaux de thèse.

L'écotoxicologie est une science multidisciplinaire visant à étudier l'effet et le devenir des polluants dans les écosystèmes. Parmi ces disciplines, l'écologie et la biologie des organismes sont indispensables pour comprendre les réponses induites par les polluants à plusieurs niveaux d'organisation biologiques, de la cellule à l'écosystème, en incluant les organismes et les communautés. Les approches physico-chimiques nécessaires à cette discipline permettent de caractériser les polluants, et de comprendre leur devenir et leur comportement dans l'environnement. C'est sur ces approches transversales que mon laboratoire d'accueil : le Laboratoire d'Ecologie Fonctionnelle et Environnement (LEFE, UMR 5245), plus précisément l'équipe d'Ecotoxicologie Intégrative (ECI), et le laboratoire du Centre Inter-universitaire de Recherche et d'Ingénierie des MATériaux (CIRIMAT, UMR 5085) collaborent depuis 2005 dans le but de mener des études sur le devenir et l'effet de nanoparticules de graphène. Le LEFE apporte ses connaissances et son expertise en évaluation écotoxicologique des nanomatériaux sur les écosystèmes aquatiques, tandis que le CIRIMAT produit, fournit et caractérise ces nanoparticules tout en y apportant son expertise physico-chimique.

Dans le cadre du projet Graphene Flagship, la collaboration LEFE-CIRIMAT s'est principalement focalisée sur l'effet de différentes nanoparticules de carbone, notamment le graphène et ses dérivés, sur les organismes microscopiques et unicellulaires des rivières comme les bactéries et les microalgues.

L'ensemble de ces organismes vivant dans un même lieu est plus communément appelé une communauté microbienne. Ces communautés, souvent retrouvées sous forme de biofilms, ont une place importante et jouent des rôles clefs dans les écosystèmes aquatiques. Leur perturbation peut entraîner des conséquences plus globales à l'échelle des écosystèmes. Ce sont les raisons pour lesquelles l'étude d'effets écotoxicologiques de nouveaux matériaux tels que le graphène et ses dérivés sur les communautés microbiennes est essentielle.

Dans ce contexte, les premiers objectifs de cette thèse ont porté sur :

- Evaluer les effets de nanoparticules de graphène sur une communauté microbienne mixte, composée d'un compartiment bactérien et d'un compartiment de diatomées, plus précisément de l'espèce modèle *Nitzschia palea*
- Déterminer l'influence du degré d'oxydation de ces nanoparticules, en utilisant deux nanoparticules avec des degrés d'oxydation différents : le graphène oxydé (GO) et le graphène oxydé réduit (rGO)

Les résultats étonnants obtenus au cours des différentes expérimentations pour répondre à ces deux premiers objectifs nous ont amenés à nous focaliser sur la diatomée *Nitzschia palea* avec les objectifs suivants :

- Evaluer les effets du GO et du rGO sur la diatomée *Nitzschia palea* seule et déterminer les différents mécanismes et interactions en jeu
- Déterminer l'influence du mode de vie benthique dans la réponse de la diatomée en la comparant à une microalgue pélagique : *Raphidocelis subcapitata*

Afin de répondre à ces différentes problématiques, le manuscrit s'articulera autour des chapitres suivants :

- Le premier chapitre est une étude bibliographique qui vise à décrire les nanoparticules de carbone et plus précisément le graphène et ses dérivés, de leurs méthodes de productions et leurs applications, à leur devenir dans l'environnement aquatique. Les deux principaux modèles biologiques, les biofilms mixtes de rivière et les biofilms de microalgues en culture pure, plus précisément les diatomées, y sont aussi présentés. Ce chapitre se clôture par une revue bibliographique sur les effets des matériaux à base de graphène sur les communautés microbiennes (Braylé et al., 2022) ainsi que sur les microalgues.
- Le second chapitre présente les différents matériels et méthodes utilisés de façon récurrente tout au long de la thèse, comme les nanoparticules utilisées et leur caractéristiques, les méthodes de culture employées et les différentes stratégies d'exposition. Une partie de ce

chapitre est notamment focalisée sur la cytométrie en flux et de la validation de son utilisation en présence des nanoparticules de graphène.

- Le troisième chapitre présente sous la forme d'article les résultats de l'étude des effets du GO et du rGO sur un biofilm composé de bactéries et diatomées (Evariste et al., 2021). Les différents résultats comportent des analyses physiologiques des deux compartiments mais aussi une analyse de changement de diversité et de structure de la communauté suite à une exposition aux différentes nanoparticules.
- Le quatrième chapitre se focalise sur les effets du GO et du rGO sur la diatomée *Nitzschia palea*, de sa réponse physiologique et des interactions qui ont lieu entre les nanoparticules et la diatomée. Une première partie des résultats est présentée sous forme d'article, puis sont présentées des expérimentations supplémentaires qui ont été menées, et finalement une dernière partie se focalise sur la différence de réponse avec la microalgue pélagique *Raphidocelis subcapitata*.

Le manuscrit se terminera par un chapitre final de discussion et conclusion générale visant à reprendre les travaux de cette thèse tout en y identifiant les limites, leurs implications écologiques et environnementales et d'en faire naître des perspectives.

Chapitre 1
Contexte bibliographique

1. Les nanoparticules de graphène

1.1. Les nanoparticules : histoire et définition

Bien que le concept moderne de « nanoparticules » n'ait été développé qu'au cours des dernières décennies, son histoire remonte à des milliers d'années. Déjà en Antiquité, l'utilisation de nanoparticules se faisait à travers l'utilisation de métaux ou minéraux finement broyés pour créer des pigments et des colorants. Il y a 4500 ans, les habitants d'Egypte ancienne utilisaient des nanoparticules de $CaCuSi_4O_{10}$ (forme de verre) et de SiO_2 (quartz) pour colorer la céramique en bleu, ce qui a donné lieu à la fameuse couleur « bleu égyptien ». Au cours des siècles, l'utilisation et la manufacture de nanoparticules n'a cessé d'être retracée et retrouvée dans des pièces d'art en verre (les Coupes de Lycurgus, 4ème siècle), dans les vitraux d'églises médiévales ou encore dans la céramique émaillée du 9ème siècle, utilisant des nanoparticules de Cu et d'Ag, donnant des propriétés optiques particulières à ces objets (Jeevanandam et al., 2018). Ce n'est qu'au début de 20ème siècle que le concept de taille des particules fait son apparition. Richard Adolf Zsigmondy sera le premier à développer une méthode de mesure des particules colloïdales, précurseurs des nanoparticules, en 1908 (Zsigmondy 1908). Depuis, les techniques de productions et de caractérisations des nanoparticules n'ont cessé de s'améliorer afin de mieux les étudier et comprendre leurs propriétés. Richard Feynman sera le premier physicien à proposer de produire des composés à l'échelle nanométrique dans les années 1950. Cela a donné lieu aux nanotechnologies, un domaine suscitant un intérêt croissant pour l'utilisation des nanoparticules dans divers domaines (Roco et al., 2011).

Au départ, le terme « nano » (du grec *nanos* : nain) fait référence à l'unité métrique du nanomètre (10^{-9} mètre) (figure 1). A l'heure actuelle, la définition des termes nanoparticules et nanomatériaux est encore très discutée et il existe dans la littérature plusieurs définitions différentes (Boholm and Arvidsson, 2016) qui varient en fonction du secteur d'activité dans lequel ils sont employés. Selon la Commission Européenne, les nanomatériaux sont définis par la norme ISO TS 80004-1 comme « des particules dont la répartition numérique par taille, présente au moins 50% de particules avec une ou plusieurs dimensions externes se situant entre 1 nm et 100 nm » (INRS, 2018). On classe donc les nanoparticules au sein des nanomatériaux. Aujourd'hui, la définition la plus courante d'une nanoparticule, est une particule dont au moins une dimension est comprise entre 1 et 100 nm (Gaffet, 2011). Au cours de ces travaux de thèse, c'est à cette définition que nous nous réfèrerons quand le terme « nanoparticule » sera employé.

Bien que les nanoparticules soient souvent attribuées à une origine anthropique, « nano » ne signifie pas toujours « artificiel ». Les nanoparticules peuvent avoir une origine naturelle. Elles peuvent

être générées par la combustion incomplète de combustibles carbonés, lors de feux ou d'éruptions volcaniques (Theng and Yuan, 2008), ou suite à l'érosion des roches (Luther and Rickard, 2005). Des exemples bien connus sont les phyllosilicates (chlorite, talc, argile…), les oxydes métalliques, les substances humiques, ou encore l'allophane et l'imogolite que l'on retrouve dans les sols volcaniques (Bakshi et al., 2015). On différencie alors les nanoparticules manufacturées et les nanoparticules naturelles. Au cours de ces travaux de thèse, les nanoparticules utilisées ont été d'origine anthropique et donc de type manufacturé.

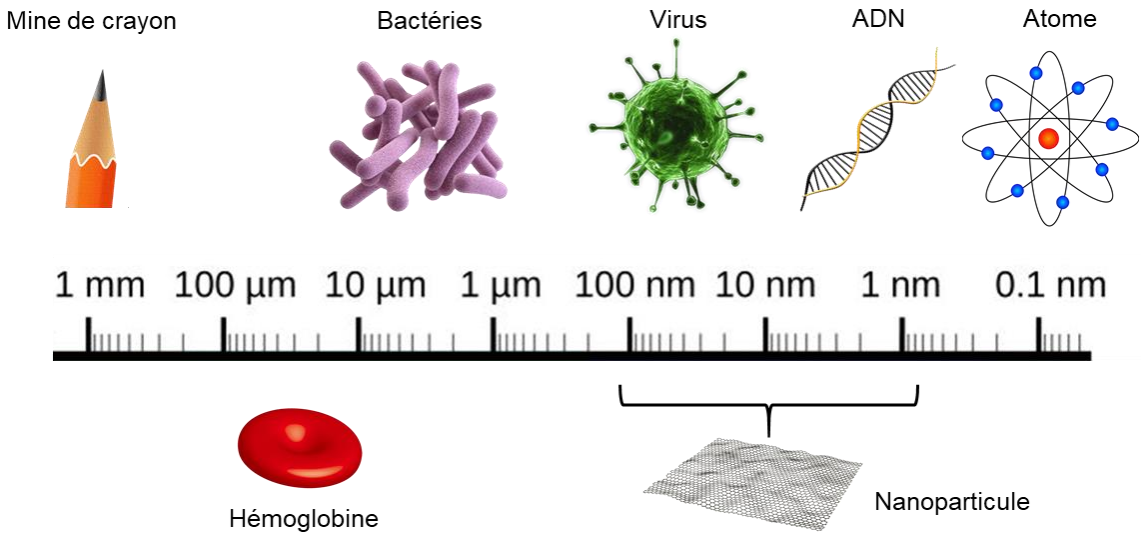

Figure 1: Représentation schématique d'une échelle de taille du dixième de nanomètre (angström) au millimètre accompagnée d'éléments de tailles correspondantes.

1.2. Les nanoparticules de carbone : précisions sur le graphène et ses dérivés

Au sein des nanoparticules, se trouve les nanoparticules de carbone. Parmi tous les atomes, seul le carbone possède la capacité de former des liaisons covalentes donnant lieu à de longues structures en chaîne. A l'état fondamental, cet atome est tétravalent avec une configuration de type $1s^2\,2s^2\,2p^2$: 4 électrons non appariés sont disponibles pour créer des liaisons d'hybridations. Il existe trois formes hybridées du carbone : sp^1, sp^2 et sp^3. Sa versatilité lui permet de s'agencer de plusieurs façons différentes en fonction des conditions de température mais aussi de pression, ce qui aboutit à l'existence d'une multitude d'allotropes du carbone, le graphite (sp^2) et le diamant (sp^3) étant les plus connus (figure 2) (Falcao and Wudl, 2007).

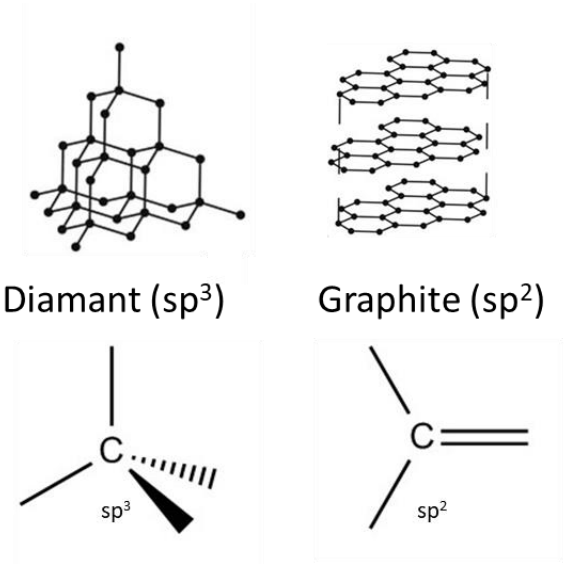

Figure 2: Représentation schématique de deux allotropes du carbone, le diamant et le graphite, et de leur forme hybridée respectives sp^3 et sp^2.

L'histoire du graphène (matériau schématisé en figure 3a) est très récente et débute au cours des années 2000 à Manchester. En 2004, Novoselov et ses coéquipiers exfolient pour la première fois des mono couches de graphène 2D à partir de graphite (couches successives de plans d'atomes de carbone sp^2 en réseau hexagonal). La méthode repose sur une exfoliation mécanique à l'aide d'un ruban adhésif qui leur a valu le prix Nobel de physique en 2010 (Novoselov et al., 2004). La découverte du graphène a débouché sur des recherches intensives afin de le caractériser, le produire mais aussi sur ses potentielles applications. Effectivement ce matériau possède une excellente conductivité électrique et thermique, une flexibilité importante tout en présentant une forte résistance mécanique. Ce matériau possède aussi une propriété de transparence optique (Geim, 2009). Depuis la découverte du graphène, produit par exfoliation, les méthodes ont grandement évolué et permettent d'en produire en plus grandes quantités. Les méthodes les plus courantes sont les suivantes :

- La croissance chimique en phase gazeuse ou solide : cette méthode repose sur la l'organisation et la liaison d'atomes de carbone en graphène sur un support en utilisant des gaz à base de carbone en tant que précurseur tel que le méthane (Li et al., 2009). Des essais de croissance chimique en phase solide ont aussi vu le jour (Sun et al., 2010).
- La réduction d'oxyde de graphène (GO) : les oxydes de graphène sont généralement obtenus par une première oxydation du graphite, la méthode la plus répandue restant encore la méthode d'Hummers (Hummers and Offeman, 1958), suivie d'une exfoliation chimique ou physique (Parvez et al., 2015). La réduction peut ensuite être effectuée afin d'obtenir du graphène oxydé réduit (rGO) (Pei and Cheng, 2012).

- L'exfoliation liquide : l'exfoliation de graphène du graphite peut s'effectuer dans des milieux liquides en appliquant des ultrasons, en effectuant une exfoliation liquide-ionique ou encore l'utilisation de divers surfactants (Xu et al., 2018).
- Dépliement de nanotube de carbone (CNT): il est possible d'obtenir des feuillets, ou rubans, de graphène en ouvrant des CNT par des voies chimiques en utilisant des acides forts (ex : $KMnO_4$-H_2SO_4) dans des conditions thermodynamiques précises (Baraton et al., 2011).

La découverte du graphène et de ses propriétés physico-chimiques exceptionnelles a poussé la communauté scientifique à produire et développer tous types de nanomatériaux à base de graphène (GBMs) afin d'exploiter une ou certaines caractéristiques pour des applications diverses et variées qui seront décrits dans la prochaine partie (Huang et al., 2011). Les principaux GBMs que l'on retrouve aujourd'hui sont les suivants :

- Les feuillets de graphène (figure 3a) : c'est la forme la plus simple du graphène, des feuillets composés d'un seul plan de carbone atomique (Geim, 2009)

- Le graphène oxydé (GO) (figure 3d) : ce sont des feuillets de graphène auxquels sont greffées des groupements d'oxygène fonctionnalisés (notamment des groupes hydroxyle, carboxyle et époxyde). La présence de ces groupements rend le GO hydrophile contrairement au graphène. L'ajout de groupements oxygène fonctionnalisés résulte aussi dans l'apparition de domaines aliphatiques non présents dans le graphène, ce qui augmente les interactions potentielles à la surface du matériel (Yu et al., 2020). Le GO peut être réduit en rGO, ce qui confère des propriétés physico-chimiques proches de celles des feuilles de graphène. La réduction du GO augmente aussi ses défauts tel que des « trous » au sein du feuillet. On le nomme le graphène oxydé réduit (figure 3e).

- Le FLG (de l'anglais « few layer graphene » (FLG)) (figure 3b) : le FLG est généralement considéré comme un sous-produit de l'exfoliation du graphite. Ce matériel est composé de 2 à 9 monos feuillets, il est généralement de plus grande dimension que le GO.

- Les composites à base de graphène : ce sont des matériaux dans lesquels le graphène est incorporé dans une matrice de type polymère, céramique en encore métallique. Ces composites visent souvent à améliorer les propriétés de base du graphène, décrites dans la prochiane section (Potts et al., 2011).

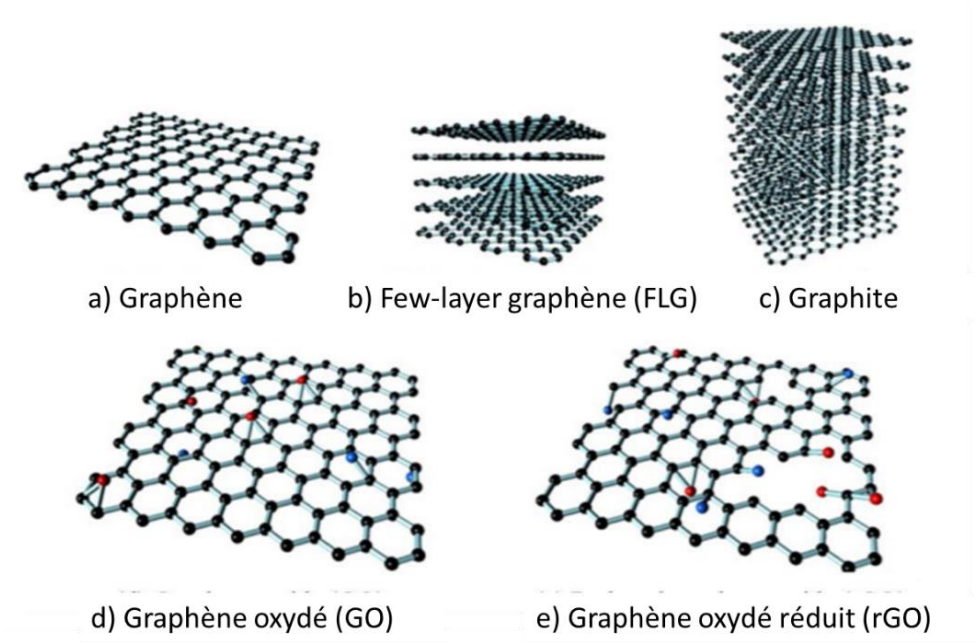

Figure 3: Représentation schématique des différents nanoparticules à base de graphène d'après (Kiew et al., 2016)

1.3. Propriétés et applications du graphène et ses dérivés

La propriété la plus explorée du graphène est sa conductivité électrique. Il a été mis en évidence que toutes les particules chargées (électrons et positrons) présents sur les atomes de carbone du graphène avaient une masse quasi-nulle, permettant à ces particules de se déplacer d'une extrême facilité le long des liaisons (Novoselov et al., 2004). Ce transport d'électrons est à l'origine de l'effet de Hall quantique, qui s'avère traduire une très bonne conductivité électrique (Zhang et al., 2005). Cette propriété électrique du graphène peut varier en fonction des propriétés physiques du graphène telles que des ondulations de sa surface ou encore sa topologie (Castro Neto et al., 2009) mais aussi en fonction des conditions de température et de pression. Ces propriétés électroniques, couplées à sa structure, sont aussi à la base des propriétés optiques du graphène : une forte transparence dans le spectre du visible, influencée par son nombre de couches (Kumar et al., 2013), avec une couche absorbant seulement 2,3% du spectre visible (Nair et al., 2008). De plus, le graphène possède une très bonne conductivité thermique, plus élevée que les nanotubes de carbone et aussi proche du diamant, plus grand conducteur thermique connu (Balandin et al., 2008). C'est la structure idéale du graphène et des liaisons covalentes entre les atomes qui permettent un déplacement de la chaleur rapide et efficace sous la forme de vagues de phonons (Li et al., 2017). La résistance mécanique (Papageorgiou et al., 2017), tout en gardant une certaine flexibilité (Lee et al., 2008), est aussi une des nombreuses propriétés exceptionnelles du graphène.

La découverte plutôt récente du graphène, de ses dérivés et de leurs propriétés fait qu'il n'est encore qu'au début de ses potentielles utilisations malgré des recherches en constante augmentation.

Ses applications ne cessent de prendre de l'ampleur et son marché était estimé atteindre 2,1 milliards de dollars US en 2025 (Reiss et al., 2019). Les propriétés électriques des GBMs leur permettent d'être appliqués à l'électronique et la photonique (Avouris and Dimitrakopoulos, 2012). Grâce à leurs propriétés mécaniques et optiques couplées, les GBMs sont utilisés pour la création de conducteurs ou semi-conducteurs et électrodes flexibles et transparentes (Eda et al., 2008; Kim et al., 2009). Les propriétés catalytiques des GBMs font d'eux des très bon capteurs électrochimiques (Yola, 2019). On les retrouve aussi utilisés pour la conversion et le stockage d'énergie (Olabi et al., 2021) comme dans les panneaux photovoltaïques (Liang et al., 2009). Ses propriétés d'adsorption sont aussi utilisées dans le traitement de pollutions, notamment d'éléments traces métalliques, de polluants organiques comme les pesticides, de polluants inorganiques (Shen et al., 2015) ou encore des résidus de produits pharmaceutiques (Sophia et al., 2016). On peut aussi retrouver les GBMs en médecine régénérative, pour la conception de dispositifs biomédicaux (Kumar and Chatterjee, 2016) ou bien pour l'administration de médicaments (Pan et al., 2012).

1.4. Le graphène dans l'environnement

1.4.1. Sources et rejets des GBMs dans l'environnement

L'augmentation de la production et de l'utilisation des GBMs va inévitablement aboutir à leur rejet dans l'environnement. Les nanoparticules de carbone, dont le graphène et ses dérivés, peuvent être libérées dans l'environnement à chaque stade de leur cycle de vie, c'est-à-dire pendant leur production, leur transformation (manufacture, fonctionnalisation, intégration à des produits etc…), leur utilisation mais aussi leur élimination et recyclage (Gottschalk et al., 2013). Les sources de pollution les plus importantes dans les eaux restent les usines de fabrication des nanoparticules dont l'épuration des eaux usées n'est pas optimale, et qui déversent ces eaux usées dans l'environnement (Brar et al., 2010). La dispersion dans l'air du graphène est peu probable du fait de sa taille et de sa forte aggregation à l'état sec, mais il est possible de le retrouver dans l'air associé à des poussières (Arvidsson et al., 2013). Les rejets peuvent se faire de façon ponctuelle sous forme de « spill » (déversements) de petite ou grande quantité dû à un déversement accidentel, ou encore de façon continue. A l'heure actuelle, malgré la possibilité de détecter les GBMs à l'aide de méthodes telles que la microscopie, la spectroscopie RAMAN ou encore le marquage au C^{13} et C^{14}, les concentrations environnementales des GBMs ne sont pas connues, dû à un manque de méthode analytique précise et fiable (Goodwin et al., 2018). Cependant, il est proposé par De Marchi et ses coéquipiers de comparer les concentrations environnementales prédites (PEC) des GBMs à celles des nanotubes de carbone du fait de leurs propriétés physico-chimiques proches (De Marchi et al., 2018). Les PECs moyennes des CNTs ont été estimées par modélisation probabiliste et sont les suivantes : 0,17 ng/L

dans les eaux de surface, 3,6 ng/L dans les eaux usées, 0,12 mg/kg dans les boues d'épurations et 0,02 ng/m^3 dans l'air. Pour les compartiments environnementaux susceptibles d'accumuler les GBMs tels que les sols et les sédiments, 5,1 ng/kg et 0,79 µg/kg respectivement, sont prévues d'être accumulés chaque année (Sun et al., 2014).

1.4.2. Devenir des GBMs dans l'environnement aquatique

Les systèmes aquatiques peuvent être pollués par des rejets directs dans les eaux, mais aussi indirectement en agissant comme un réceptacle final des polluants présents dans les autres compartiments environnementaux. En effet, par l'action de plusieurs processus biogéochimiques, les polluants, tel que les GBMs, présents dans l'air finissent par se déposer au sol ou dans les eaux suite à des précipitations ou dépôts atmosphériques. Les polluants dans les sols sont à leur tour lessivés vers les eaux de surface, ou encore s'infiltrent pour rejoindre les eaux souterraines (Gottschalk et al., 2013). L'étude du comportement et du devenir des GBMs dans les systèmes aquatiques est essentiel pour comprendre et interpréter les mécanismes de toxicité envers les organismes aquatiques. Dans l'eau, le devenir des GBMs est fonction de leurs propriétés physico-chimiques. Dans un premier temps, les GBMs ont la capacité d'adsorber des éléments de différentes façons : liaison π (ex. adsorption de cations et anions, composés aromatiques (Apul et al., 2013), ADN, protéines (Liu, 2012)…), interactions hydrophobes (ex. adsorption de produits chimiques organiques (Pan and Xing, 2008)), interactions électrostatiques (force de Coulomb) (ex. adsorption de cations organiques et inorganiques (Sharma and Das, 2013)), liaisons hydrogène (ex. adsorption de composés organiques (Zhang et al., 2013) tel que les substances humiques (Yang et al., 2013)) et interactions acide-base de Lewis. Par exemple, la présence de groupes oxygénés sur le GO limite ses interactions hydrophobes contrairement au rGO, FLG et graphène, tandis que sa charge négative plus importante aboutit à des attractions électrostatiques. La capacité d'adsorption est aussi dépendante de la surface spécifique. Les deux côtés d'une mono couche de graphène peuvent adsorber des éléments, tandis que les interstices entre les multiples feuillets de FLG ne peuvent adsorber. Cette surface spécifique, mais aussi le devenir des GBMs dans l'environnement, sont dépendants de l'agglomération ou la dispersion des GBMs dans le milieu aquatique. Ces phénomènes, présentés en figure 4, sont fortement influencés par la présence ou non de groupements hydroxyl et carboxyl contenant des atomes d'oxygène à la surface des matériaux. Les forces électrostatiques de répulsion sont les principales explications de la non agglomération du GO (Cote et al., 2010) en milieu aqueux mais aussi son potentiel zeta souvent inferieur à -40mV, lui conférant une bonne stabilité dans l'eau (Si and Samulski, 2008; Yoon et al., 2013), indépendamment du pH des eaux naturelles (Chowdhury et al., 2013; Lanphere et al., 2013). Les groupes fonctionnalisés à la surface du GO entrainent la formation d'une couche appelée « couche double électrique » une fois en solution aqueuse. La présence d'électrolyte capable de compresser

cette couche (NaCl, KCl, $CaCl_2$ etc.) et donc à déterminer la charge de surface du GO, peuvent résulter en une hétéro-agrégation des matériaux (Hong et al., 2012). Le GO peut aussi s'agglomérer dans l'eau en présence de particules comme l'argile ou le kaolin (Yang et al., 2013). Contrairement au GO, le graphène, le rGO et le FLG sont moins stables dans l'eau dû à leur hydrophobicité. Ils sont donc plus facilement emmenés à s'agréger et sédimenter. Cependant la présence de surfactants (Guardia et al., 2011; Liang et al., 2013) ou de macromolécules organiques peuvent être à l'origine de la dispersion de ces matériaux à faible stabilité dans l'eau par des forces majoritairement de Wan-der-Walls. Ces différents éléments peuvent aussi améliorer la stabilité du GO (Chowdhury et al., 2013). Ces propriétés d'adsorption des GBMs s'appliquent aussi évidemment à d'autres polluants plus répandus tels que les éléments traces métalliques (Perreault et al., 2015) et les pesticides (H. Wang et al., 2021). Ces interactions pourraient élever la toxicité des différents polluants en ayant une action synergique. L'agglomération des GBMs induit souvent la formation d'agglomérats qui sédimentent vers les fonds où les organismes benthiques tel que les biofilms seront principalement exposés.

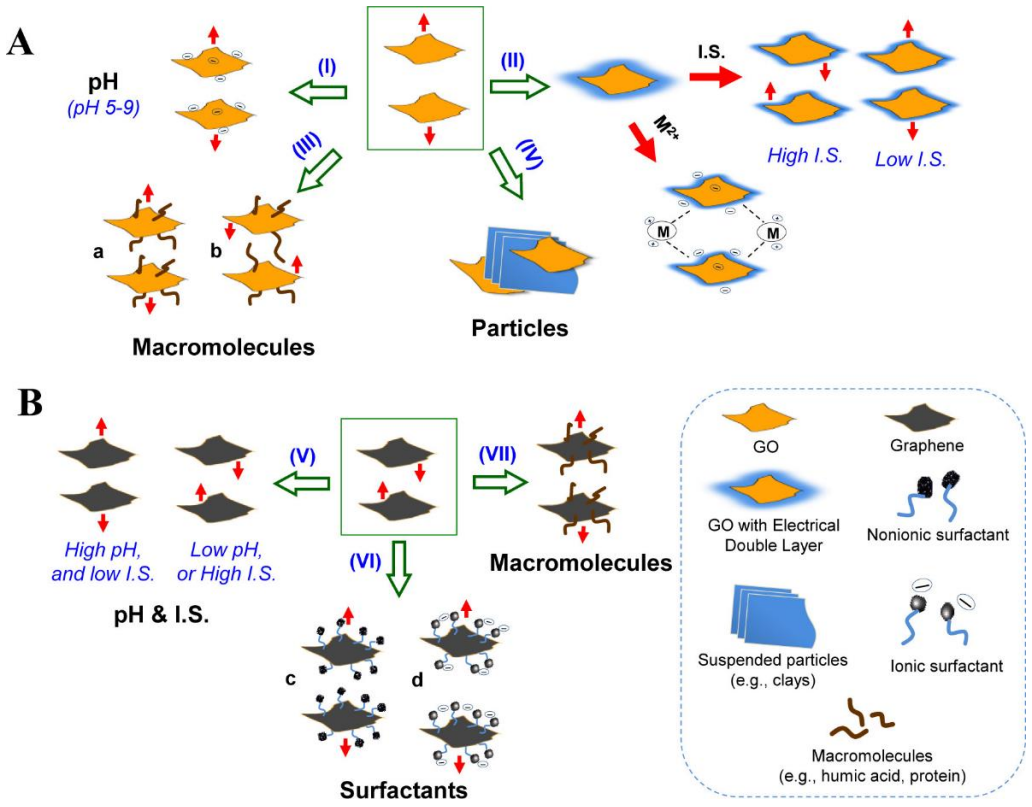

Figure 4: Comportement des GBMs oxydés (GO) (A) et réduits (rGO) (B) dans l'environnement aquatique d'après (Zhao et al., 2014). Pour le GO, la suspension peut être stable sur toute la gamme de pH retrouvée dans les milieux aquatiques (pH 5-9) (I). La compression de la couche électrique (représentée par les fonctions du GO) par des électrolytes, capables de déterminer la charge de surface, est responsable de l'homo-agrégation irréversible du GO aux fortes forces ioniques (I.S., en anglais « ionic strength ») ; de plus, l'agrégation des feuillets se produirait en présence de cations divalents ou polyvalents qui viendraient se complexer aux groupes fonctionnels du GO (II). Des macromolécules et des particules colloïdales (des argiles par exemple) peuvent aussi influencer la stabilité de la suspension de GO (III et IV). Pour le rGO, les feuillets pourraient seulement être dispersés à pH élevé en présence de faibles forces ioniques (V). Des surfactants (ioniques et non-ioniques) et des macromolécules pourraient cependant disperser le rGO via différents mécanismes (VI et VII).

Dans l'environnement aquatique, les GBMs sont aussi soumis à plusieurs facteurs environnementaux capables de les dégrader. La photolyse induite par la lumière visible et le spectre UV est un des mécanismes affectant le plus les GBMs dans l'environnement aquatique. L'irradiation de la lumière naturelle, dite solaire, aboutit le plus souvent à des défauts et la réduction des GBMs (Adeleye et al., 2019; Zhao and Jafvert, 2015) et la création de nouveaux produits tel que de l'O_2, de l'H_2 ou encore des espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Zhao et al., 2021). La présence de composés inorganiques peuvent aussi réduire le GO en rGO, notamment les composé soufrés (Chen et al., 2010) tout comme celle de composés organiques tels que des polyphénols (Wang et al., 2011) ou encore la vitamine C (Fernández-Merino et al., 2010). Finalement les GBMs peuvent subir une biotransformation par des organismes aquatiques, principalement des microorganismes, via l'action d'enzymes comme les peroxydases. La biotransformation par les communautés microbiennes sera décrite ultérieurement dans une revue consacrée aux interactions entre les GBMs et les communautés microbiennes (chapitre 1, partie 3) (Braylé et al., 2022).

Dû à leur comportement dans les milieux aquatiques, les organismes benthiques seront emmenés à être ciblé par les GBMs. Dans cette prochaine partie seront décrits les différents modèles d'études choisis pour évaluer la toxicité des GBMs sur les biofilms d'eaux douces.

2. Modèles biologiques d'étude

2.1. Les biofilms de rivières

2.1.1. Présentation des biofilms de rivière

Les biofilms de rivière sont des communautés caractérisées par une grande diversité, contenant des bactéries, des cyanobactéries, des algues telles que les diatomées, des protozoaires et des champignons interagissant au sein d'une même matrice adhérant à une surface (Lawrence and Neu, 2003) (figure 5A). La composition de ce biofilm, notamment les proportions algues/bactéries, est fortement impactée par les saisons (Chénier et al., 2003), les conditions environnementales (Gao et al., 2005; Lyautey et al., 2005) et varie au cours des différentes phases de développement du biofilm : l'adhésion, la croissance en surface, la maturation et finalement la dispersion (Manz et al., 1999). Certains biofilms peuvent être composés jusqu'à plus de 30 % d'organismes phototrophes, on le nomme alors périphytons (Azim et al., 2005).

La matrice structurant ces communautés est plus communément décrite sous le nom d'EPS (substances polymériques extracellulaires) (figure 5B). Ces substances représentent jusqu'à 90% de la masse sèche des biofilms (Pyl'nik et al., 2007). Les EPS sont principalement composés de protéines, lipides et polysaccharides (Flemming and Wingender, 2010). Il a été démontré que l'on pouvait aussi

y retrouver de l'ADN libre (Flemming et al., 2007). La composition et le ratio entre les composants des EPS sont bien évidemment différents en fonction de la composition cellulaire et des espèces présentes dans le biofilm, mais aussi en fonction du stade de développement de celui-ci (Barranguet et al., 2005; Romaní et al., 2008). Le biofilm est considéré comme la forme de vie la plus aboutie sur Terre, et cela lui est attribué grâce aux multiples fonctions endossées par les EPS (Evans, 2003). Une des premières fonctions est purement mécanique : la stabilité et l'ancrage sur leur substrat d'accroche permettant de résister aux différents courants et agitations des cours d'eau. Ceci est notamment possible grâce à certains polysaccharides et protéines formant des fibres amyloïdes (Randrianjatovo-Gbalou et al., 2017). Les EPS ont aussi un rôle dans la résistance au stress hydrique à travers la rétention d'eau, composante majeure des biofilms, et confère aux organismes de la communauté une protection aux variations des niveaux d'eau et aux périodes de sécheresse (Flemming and Wingender, 2010). La matrice d'EPS joue aussi un rôle de barrière pour les organismes face aux polluants aquatiques tels que les antibiotiques (Davies, 2003) et les nanoparticules (Quigg et al., 2013). Elle représente aussi une source considérable de carbone qui peut être utilisée par les organismes hétérotrophes et mixotrophes en période de stress nutritif. Ces premières fonctions sont des atouts majeurs pour la résistance aux fluctuations environnementales.

La matrice du biofilm est aussi un lieu d'interactions entre les organismes de la communauté. Ces interactions peuvent être antagonistes, comme la production de toxines par une espèce pour favoriser son développement et obtenir un avantage compétitif, mais aussi coopératif comme la dégradation des molécules complexes qu'une espèce seule ne pourrait dégrader (Moons et al., 2009). La signalisation cellulaire utilisée pour croître et adhérer (Davies et al., 1998) ou encore l'échange de matériel génétique sont d'autres exemples d'interactions positives au sein du biofilm (Cvitkovitch, 2004).

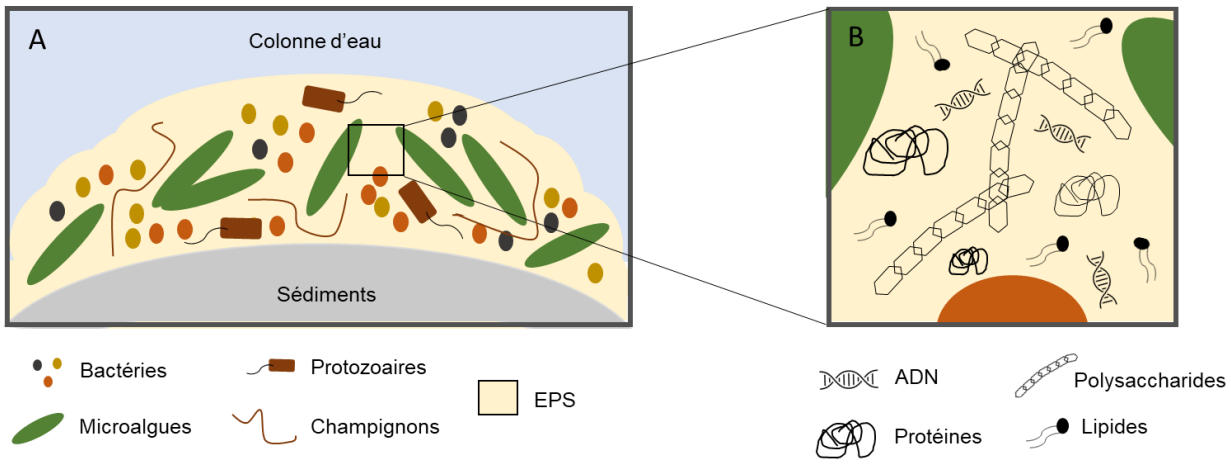

Figure 5: Représentation schématique d'un biofilm de rivière. A) Composition cellulaire du biofilm. B) Composition de la matrice d'EPS. La taille des différents éléments n'est pas représentative de la réalité.

2.1.2. Intérêt écotoxicologique des biofilms de rivière

Les biofilms endossent plusieurs rôles écologiques essentiels aux écosystèmes. Il est essentiel d'étudier l'impact des polluants sur les biofilms, notamment dans le cas des GBMs qui visent particulièrement ces organismes benthiques dû à leur comportement d'agrégation et de sédimentation dans les systèmes aquatiques. A travers de nombreuses activités biochimiques des différents organismes, ils participent notamment aux cycles du carbone et de l'azote (Battin et al., 2016). Les organismes phototrophes sont eux responsables de la production primaire des écosystèmes aquatiques. Les perturbations anthropiques tels que les GBMs peuvent perturber ces fonctions et avoir un impact sur ces différents cycles. Les biofilms ont aussi un rôle dans la stabilisation des sédiments (Evans, 2003) et constituent une barrière d'échange entre les sédiments et la colonne d'eau (Pyl'nik et al., 2007). Les biofilms participent aussi activement à l'épuration de la colonne d'eau en adsorbant les polluants (principe de biosorption) (Wenten et al., 2020) tel que les nanoparticules (Miao et al., 2009), et dans certain cas en les éliminant (principe de bioremédiation) (Singh et al., 2006). Ces principes sont depuis longtemps utilisés dans le traitement des eaux usées (Capdeville and Rols, 1992). Dans le cas où les polluants ne sont pas éliminés mais seulement stockés par le biofilm, ce phénomène peut avoir un impact sur les maillons trophiques supérieurs : le rôle de producteur primaire des phototrophes font d'eux la première source de carbone et de nutriments des organismes supérieurs, notamment les brouteurs benthiques (Jenkins et al., 2001). Cette consommation peut entrainer une bioaccumulation au sein des organismes mais aussi une bioamplification de polluants tout le long de la chaîne trophique, impactant alors les organismes supérieurs. Ce phénomène a déjà été observé avec des nanoparticules de graphène (Dong et al., 2018). Du fait de leur importance dans les cycles biogéochimiques, de leur position clef dans les écosystèmes aquatiques et leur capacité à accumuler des polluants, il est essentiel d'étudier l'impact de ceux-ci, notamment des GBMs, sur les biofilms de rivière.

2.2. La diatomée *Nitzschia palea*

2.2.1. Les microalgues : généralités

Au sein des communautés microbiennes et des biofilms, on retrouve les microalgues. Également appelées algues unicellulaires, ce sont des organismes photosynthétiques microscopiques composés d'une seule cellule. Elles sont adaptées à une grande variété de conditions de vie et sont présentes dans tous types de niches écologiques, mais principalement dans les environnements aquatiques tels que les eaux douces, salées et saumâtres. Certaines espèces peuvent aussi se retrouver dans des milieux terrestres humides et certaines même dans l'environnement aérien (Sialve and Steyer, 2013). Parmi les microalgues aquatiques, on retrouve plus de 47 000 espèces appartenant au règne des eucaryotes mais aussi des procaryotes (Sharma and Rai, 2011). Leur plus grand rôle

écologique est la production d'oxygène à partir du dioxyde de carbone et d'énergie lumineuse (Falkowski and Raven, 2007). En étant des producteurs primaires essentiels aux systèmes aquatiques, elles représentent aussi une source de nourriture fondamentale pour les niveaux trophiques supérieurs et participent activement à l'équilibre des nutriments.

2.2.2. Les diatomées : biologie et cycle de vie

Parmi les microalgues, on retrouve les diatomées, des algues brunes eucaryotes aussi appelées Bacillariophycées dont la taille varie entre 5 et 500 µm. Ce sont des espèces phototrophes à la lumière et hétérotrophes à l'obscurité. Elles se distinguent par l'élaboration d'une paroi en silice appelée frustule. Ce frustule est divisé en deux thèques : l'hypothèque, la plus petite des deux valves, vient s'emboîter dans l'épithèque, la plus grande. Chaque thèque est divisée en deux parties : la valve et le cingulum. L'hypovalve et l'hypocingulum forme l'hypothèque, l'épivalve et l'épicingulum forment l'épithèque. Le cingulum entoure la périphérie de toute la cellule et permet de solidariser les deux thèques entre elles (Round et al., 1990). C'est ce même frustule qui, en fonction de sa forme et de son ornementation (épines, excroissances, pores, sillons...), permet de diviser les Bacillariophycées en trois classes (figure 6):

- Les Coscinodiscophycées (figure 6a), diatomées centriques avec un frustule à la symétrie radiale
- Les Bacillariophycées (figure 6b), diatomées pennées possédant un frustule à la symétrie bilatérale avec la présence d'un raphé (zone médiane absente d'ornements)
- Les Fragilariophacées (figure 6c), diatomées pennées sans raphé

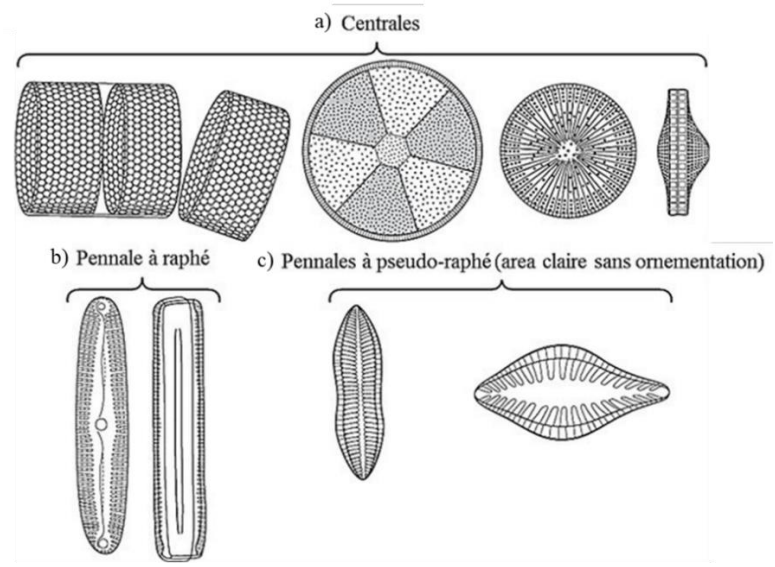

Figure 6: Représentation schématique des différentes classes de diatomées en fonction de leur frustule d'après Mathieu et al. 2011. a) Les Coscinodiscophycées aux frustules centriques. b) Les Bacillariophycée aux frustules pennés avec raphé. c) Les Fragilariophacées aux frustules pennés sans raphé.

Le frustule contient tous les organites propres aux organismes eucaryotes photosynthétiques unicellulaires : un noyau localisé au centre et relié à un réticulum endoplasmique, un appareil de Golgi, des gouttelettes lipidiques renfermées dans des vacuoles où s'agencent des lipides de façon transitoire ou permanente, et des chloroplastes aux tailles et formes différentes en fonction de la classe. Chez les diatomées pennées, à la forme allongée, on retrouve deux grands chloroplastes situés aux extrémités de la cellule le long de la membrane (figure 7). Chez les diatomées centriques, à la forme circulaire, les chloroplastes sont plus petits, en plus grande quantité et distribués dans le cytoplasme. Ces chloroplastes comportent une variété de pigments chlorophylliens : chlorophylle a et c (jamais b), diatoxanthine, diandinoxanthine et fucoxanthine, ces trois derniers appartenant à la famille des xanthophylles, et finalement des caroténoïdes tel que les β-caroténoïdes (Kuczynska et al., 2015).

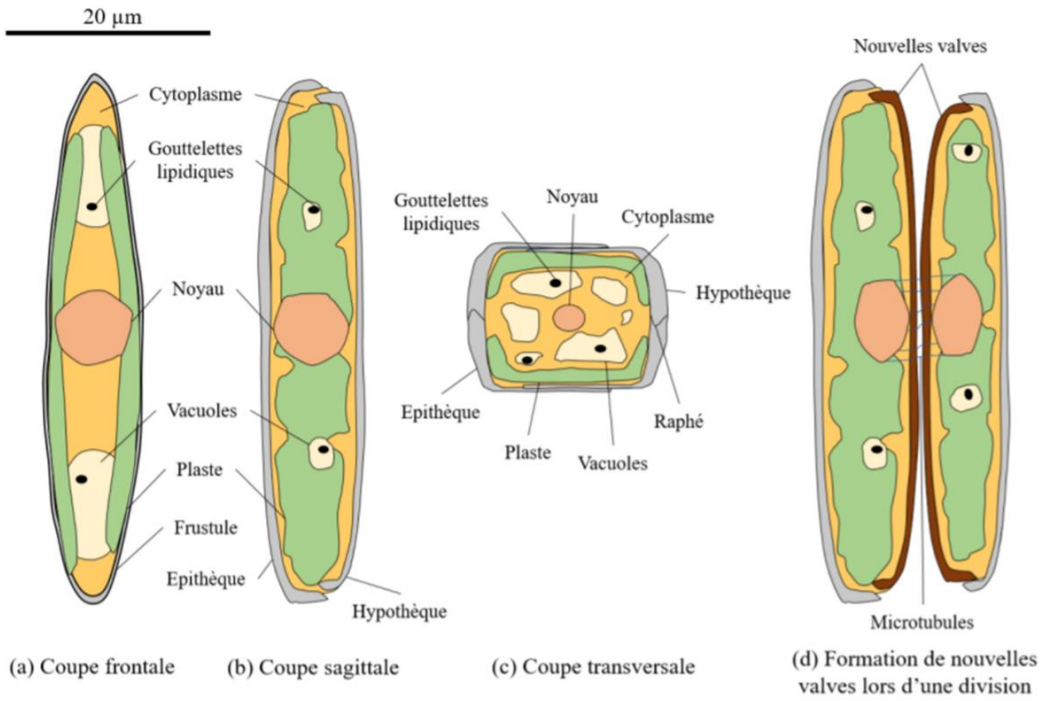

Figure 7: Structure et composition cellulaire d'une diatomée pennée d'après Garacci, 2018, en coupe frontale, (b) en coupe sagittale, (c) en coupe transversale et en (d), la mise en évidence de la diminution du frustule lors de la division cellulaire.

La reproduction des diatomées se fait en deux phases (figure 8). La première phase correspond à de simples divisions cellulaires, où chaque thèque forme son hypothèque. L'ancienne hypothèque et épithèque deviennent toutes deux une hypothèque, et leur épithèque correspondante est formée grâce à l'import de silicium venant du milieu. Lors des divisions cellulaires successives, la taille des diatomées diminue jusqu'à atteindre une taille critique correspondant à environ moins de 30% de sa taille initiale. Arrivée à ce stade, la deuxième phase de reproduction est amorcée par auxosporulation. Ce mode de reproduction sexuée peut aussi avoir lieu dans des cas de pénurie en silicium et permet de générer des cellules de taille équivalente ou plus grande que la taille initiale. Une fois une méiose

enclenchée dans la cellule mère et produisant quatre noyaux haploïdes, où seulement deux fonctionnent comme des gamètes, cette auxosporulation ne se déroule pas de la même façon entre les diatomées pennées (Bacillariophycées et Fragilariophacées) et les diatomées centriques (Coscinodiscophycées) :

- Diatomées centriques oogames : un gamète mâle et un gamète femelle sont produits et sont oogames. Les gamètes mâles possèdent un flagelle leur permettant de pénétrer dans la cellule mère voisine afin de féconder le gamète femelle lui non mobile. Cette fécondation aboutit à la formation d'un auxospore (Chepurnov et al., 2006).
- Diatomée pennées cystogames : avant la méiose, la production d'un mucilage à lieu afin de garder les deux cellules mères proches. Trois des quatre gamètes produits lors de la méiose dégénèrent et laissent place à un gamète immobile identique dit cystogame dans chaque cellule mère. La fécondation des deux gamètes peut se faire de façon différente telle qu'avec la création d'un canal de copulation (Mann et al., 2003).

Une fois l'auxospore produit, celui-ci produit un mucilage épais et sa taille augmente jusqu'à produire un frustule. Une fois arrivée à maturité, la diatomée diploïde peut de nouveau enclencher la division cellulaire.

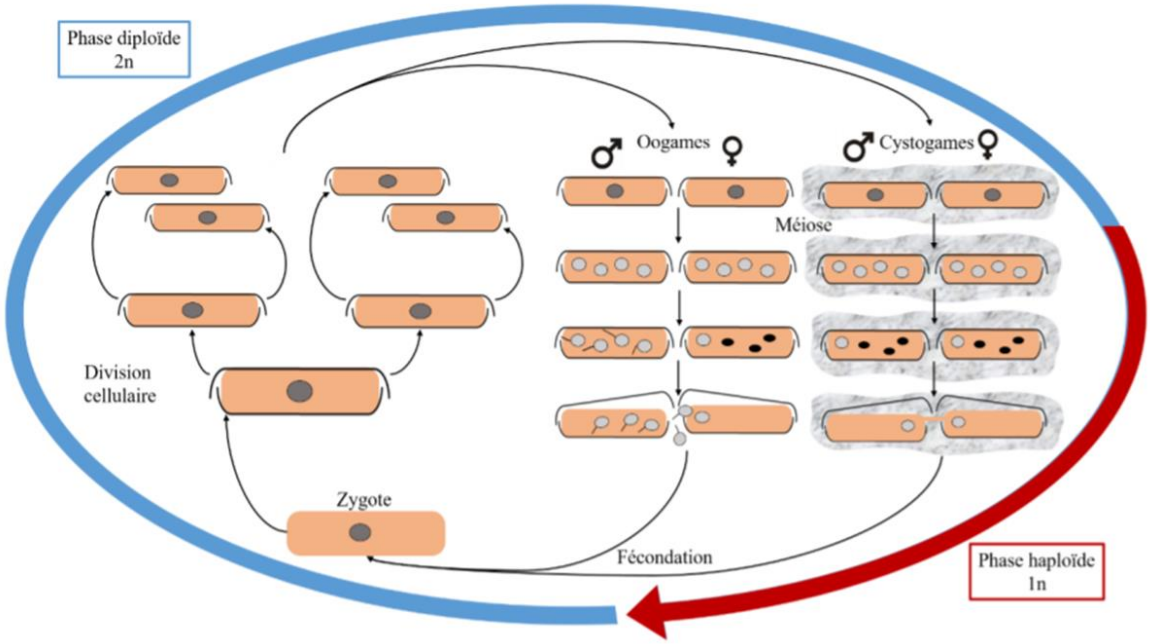

Figure 8: Cycle de vie des diatomées d'après (Garacci, 2018). La phase diploïde étant dominante ce cycle de vie est décrit comme diplophasique monogénétique. Les divisions cellulaires successives entraînent la diminution de la taille du frustule, déclenchement de la reproduction sexuée (auxosporulation). Ce mode de reproduction sexuée diffère entre les diatomées centriques (oogames) et pennées (cystogames).

La lumière est un paramètre essentiel pour le développement des diatomées. De ce fait, en milieu marin, les diatomées sont généralement retrouvées sous forme planctonique à la surface de l'eau, mais peuvent se retrouver agglomérées sous forme de biofilm sur des objets flottants (Armbrust, 2009), tandis que les diatomées d'eaux de surface sont généralement benthiques, associées dans un biofilm et liées par des EPS. N'étant pas acclimatées aux forts ensoleillements, les diatomées d'eaux douces et leurs biofilms colonisent les cours d'eau essentiellement au printemps et à l'automne (Werner, 1977). D'autres paramètres environnementaux tels que le pH, la salinité, la teneur en oxygène et la température sont déterminants pour leur répartition géographique. Les diatomées ont tout de même développé une grande variété d'adaptations climatiques et ont pu coloniser différents milieux, parfois extrêmes, et sont considérées comme ubiquistes dans l'environnement (Bussard, 2015).

2.2.3. Rôle écologique des diatomées

A l'émergence des diatomées, celles-ci étaient responsables, accompagnées d'autres groupes d'organismes eucaryotes photosynthétiques, de l'augmentation des taux d'oxygène dans l'atmosphère et du déclin du CO_2 (Katz et al., 2005). Cette capacité à transformer le CO_2 en O_2, mais aussi le carbone inorganique en carbone organique à travers la photosynthèse, font d'elles des producteurs primaires. Elles sont aujourd'hui responsables d'environ un quart de la production primaire du globe, ce qui représente plus que les forêts primaires tropicales (Scala and Bowler, 2001). Les diatomées ont donc un rôle évident et majeur dans le cycle du carbone. En étant responsables de la production de carbone organique à partir de carbone inorganique, elles représentent la base des chaines trophiques aquatiques, étant une source de carbone et nutriments essentielle aux maillons trophiques supérieurs. Les diatomées ont aussi un rôle dans le cycle de l'azote. Elles ont la capacité d'effectuer le cycle de l'urée, ce qui leur confère aussi la capacité d'utiliser des composés organiques azotés comme source d'énergie (Allen et al., 2011). Finalement, les diatomées sont aussi un des seuls êtres vivants à participer au cycle du silicium à travers la bio minéralisation de la silice en synthétisant leur frustule (Yool and Tyrrell, 2003). En participant à plusieurs cycles géochimiques et en occupant une place importante dans les écosystèmes aquatiques, les diatomées sont des organismes clefs de ces systèmes. La perturbation des diatomées par le biais de polluants tels que les nanoparticules pourrait avoir un impact sur l'ensemble des espèces aquatiques mais aussi plus globalement sur les écosystèmes.

2.2.4. Intérêt écotoxicologique des diatomées

L'adaptation et l'évolution complexe des diatomées a abouti à tout un panel d'espèces capables de proliférer dans des milieux pollués. La présence de certains polluants affecte donc les

espèces présentes dans les milieux aquatiques. Les changements de composition et la présence des diatomées influencées par les perturbations anthropiques ont été observées il y a déjà plus d'un demi-siècle (Butcher, 1947), identifiant ainsi les diatomées en tant qu'espèces bioindicatrices et modèle écotoxicologique reconnu (Araújo et al., 2010). Par la suite, de nombreuses métriques telles que les indices de diversité ou l'abondance relative de taxons liés à certaines pollutions, ont été utilisées pour donner des indications sur les statuts des écosystèmes aquatiques et de leur possible contamination (Caesemaeker, 2005). En 1998, un article est publié par des « diatomistes » voulant harmoniser les méthodes d'échantillonnage et de biosurveillance des diatomées dans les rivières d'Europe (Kelly et al., 1998). En France, l'indice utilisé est l'IBD (indice biologique diatomées) (Prygiel et al., 1996) normalisé par l'AFNOR en 2000 et révisé en 2016. L'Europe a plus récemment standardisé les méthodes de prélèvement, d'identification des diatomées et d'interprétation de ces résultats (Norme Eurpéenne 14407, 2014). En plus d'être des organismes polluo-sensibles et bioindicateurs, leur facilité d'échantillonnage, la facilité à les cultiver et la rapidité de leur temps de génération font d'eux des modèles d'étude de laboratoire très avantageux. Ainsi, l'effet de polluants sur les diatomées peut être évalué au travers des modifications de la forme de vie, des anomalies du noyau, des altérations de l'appareil photosynthétique, la mobilité, les réserves lipidiques ou encore les déformations des frustules (Debenest et al., 2009; Pandey et al., 2017).

2.2.5. Modèle d'étude : *Nitzschia palea*

L'espèce *Nitzschia palea* (figure 9) est découverte en 1844 par F. T. Kützig et portait initialement le nom de *Synedra palea*. C'est en 1853 qu'elle obtient son nom actuel, décrite par les travaux de W. Smith (Smith and West, 1853). La diatomée *Nitzschia palea* est une diatomée pennée appartenant à la classe des Bacillariophycées et mesurant entre 12 et 42 µm de long et 3 à 4 µm de large. Son frustule est un raphé, linéaire, ornementé de valves lancéolées, verticalement strié (environ 36 à 38 stries pour 10 µm) et aux bouts arrondis (Kociolek, 2011). Elle est largement répandue dans les eaux douces du monde entier, autant dans les milieux lotiques que lentiques et possède une forme de vie benthique (Bagmet et al., 2020). Le genre *Nitzschia* était déjà reconnu pour sa tolérance aux eaux polluées, mais la capacité à coloniser des milieux pollués est encore plus marquée chez l'espèce *Nitzschia palea* , par exemple dans des milieux affectés par des effluents organiques et inorganiques (Ahirwar et al., 2020), des pollutions métalliques ou encore des pesticides (Pandey et al., 2017). De plus, elle est une des rares espèces de diatomée à pouvoir développer son propre biofilm à travers la production d'EPS en condition axénique en laboratoire, c'est à dire en culture pure. Sa grande répartition géographique, sa résistance aux différentes pollutions et sa facilité à être cultivée et étudiée en laboratoire font d'elle une excellente espèce bioindicatrice en écotoxicologie.

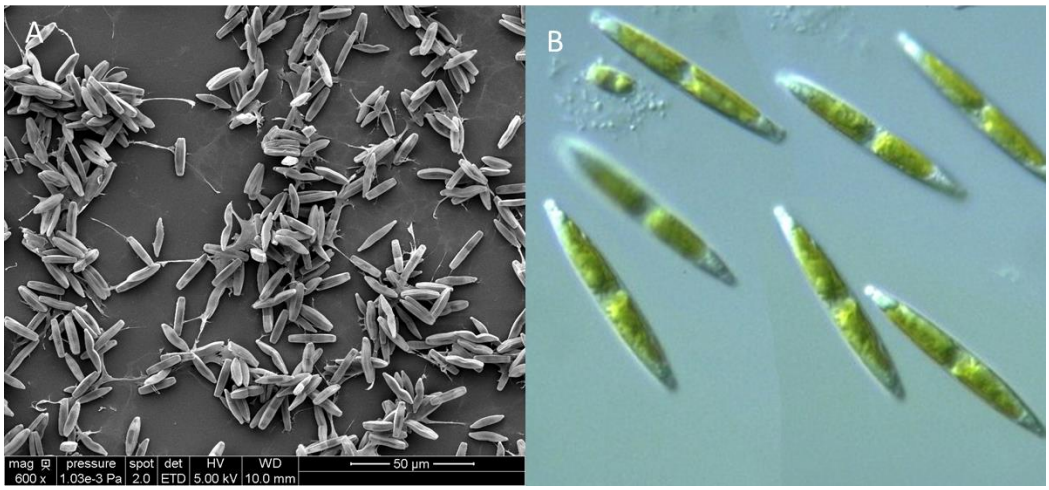

Figure 9: Images de la diatomée Nitzschia palea (A) au MEB mettant en évidence un biofilm de Nitzschia palea (obtenu au Centre de Microscopie Electronique Appliquée à la Biologie) et (B) au microscope optique: http://protist.i.hosei.ac.jp/

3. Effets du graphène et ses dérivés sur les communautés microbiennes : revue bibliographique

Afin de synthétiser les travaux de recherche récemment fournis par la communauté scientifique sur les effets des GBMs sur les communautés microbiennes, une revue a été rédigée. Elle regroupe des études écotoxicologiques mais aussi des études expérimentales émanant du champ disciplinaire des bioprocédés. Les expérimentations en bioprocédés, malgré des concentrations en GBMs, en nutriments et des conditions opératoires (pH, température, agitation, potentiel d'oxydo-réduction) parfois éloignées des conditions rencontrées dans l'environnement, ont été aussi retenues car elles ont la particularité de d'orienter le fonctionnement de communautés microbiennes et d'intensifier certains processus microbiens grâce aux systèmes contrôlés que sont les procédés. Ces études sont donc complémentaires avec les études écotoxicologiques, dans lesquelles le forçage fonctionnel est moindre. Le travail bibliographique décrivant les effets connus des nanoparticules de graphène sur les communautés microbiennes a fait l'objet d'une revue publiée dans le journal « Environmental Science : Nano » en 2022 (Braylé et al., 2022).

Résumé :

Les effets du graphène sur les biofilms sont de plus en plus étudiés et le nombre de publications sur le sujet ne cesse de croître. La littérature regroupe des articles portant sur les effets de plusieurs types de nanoparticules de graphène tel que le GO, le rGO, le FLG, des composites ou encore des co-contaminations avec des pollutions métalliques telles que le cuivre.

Ces études ont été menées sur plusieurs types de communautés microbiennes que l'on peut regrouper dans deux grandes catégories : les communautés du milieu naturel (eau de surface, sol, sédiments, marécage ou encore microbiote de différents organismes) et les communautés utilisées en biotechnologie (boues d'épuration, bioréacteurs). Les résultats montrent des effets des GBMs sur la croissance et la biomasse des communautés, généralement négatifs, mais avec bien souvent une résilience de ces communautés dans le temps. Les espèces sensibles laissent la place à des espèces plus résistantes, créant une communauté plus adaptée mais avec des fonctions biologiques différentes. En effet, les GBMs influencent les fonctions biologiques des communautés liées au cycle de l'azote (nitrification, dénitrification, anammox) et du carbone (méthanogenèse, dégradation de la matière organique ou encore production d'EPS). Aucune tendance ne se dessine cependant en termes d'effets : on peut observer des augmentations de rendement autant que des diminutions de performance des procédés microbiens. Chaque effet semble être dépendant de la composition de départ des communautés mais aussi des méthodes expérimentales d'exposition et des types de nanomatériaux étudiés. On relève aussi une certaine capacité des GBMs soulignée par plusieurs auteurs, à augmenter le transfert d'électrons inter-espèces dont certains processus sont dépendants tel que la méthanogenèse. La fonction du transfert d'ADN semble aussi être impactée : en effet les GBMs interagissent fortement avec l'ADN présent dans le milieu, diminuant l'efficacité de transfert d'éléments génétiques entre espèces.

Inversement, les effets des communautés microbiennes sur les GBMs sont aussi présentés. Dans l'ensemble des articles documentant cette question, on relève la capacité des communautés à réduire les graphènes oxydés en des matériaux moins oxydés, qui semblent être moins toxiques pour les espèces microbiennes. Cette capacité semble provenir de l'action d'enzymes de type peroxydase. La capacité de certaines espèces à biodégrader le graphène est aussi présentée.

La revue souligne également le manque de réalisme environnemental des études mais aussi la difficulté de les comparer entre elles. Les études sont très souvent portées sur des communautés essentiellement composées de bactéries et très peu sur les microalgues telles que les diatomées ou encore les champignons, qui sont pourtant des microorganismes omniprésents dans les communautés microbiennes. De plus, les doses testées sont bien souvent beaucoup plus élevées que les concentrations prédites dans l'environnement et les protocoles expérimentaux varient beaucoup entre les études, les rendant souvent incomparables. Il semble nécessaire que la communauté scientifique s'accorde sur les études d'impacts des GBMs sur les communautés microbiennes.

Graphene-based nanomaterials and microbial communities: a review of their interactions, from ecotoxicology to bioprocess engineering perspectives

Paul Braylé, Eric Pinelli, Laury Gauthier, Florence Mouchet, Maialen Barret

Laboratoire d'écologie fonctionnelle et environnement, Université de Toulouse, CNRS, Toulouse INP, Université Toulouse 3 – Paul Sabatier (UPS), Toulouse, France

Abstract

Graphene-based materials (GBMs) are gaining more and more attention from the scientific community due to their unique properties. One of the major concerns is to deliver the safest material possible on the market. To address this challenge, assessing the GBM ecotoxicity is required. Microbial communities are present in every environmental compartment, are at the basis of every trophic chain and endorse many essential roles in the environment and in engineered systems such as element cycling. Studies conducted on GBMs impact mainly focused on the effect of GBMs towards mono species cultures of bacteria and algae, which are not environmentally relevant. This review examines recent advances about GBMs effects on complex microbial communities, bringing together ecotoxicology and bioprocess engineering researches, two major and complementary fields in environmental sciences. This review reveals the potential of GBMs to disrupt the growth of the communities but also their structure and diversity in a broad spectrum of environmental conditions. Multiple studies reported the disruption of carbon and nitrogen cycling throughout the perturbation of related species. Electron transfer, on which relies many bioprocesses, was also found to be enhanced. The fate of antibiotic resistance genes was also influenced. Moreover, communities seemed to exhibit a form of resilience through composition modifications and also by reducing the oxidation state of the GBMs. Nevertheless, GBMs are pointed out as disruptors of the structure and activity of microbial communities, which could lead to larger environmental consequences as these communities are at the basis of every ecosystem's health.

Keywords: 2D nanoparticle, diversity, element cycling, ecosystem function, environmental toxicity

3.1. Introduction

Graphene, a two dimensional crystalline and allotropic form of carbon, was exfoliated from graphite for the first time by Novoselov and his co-workers in 2004 (Novoselov et al., 2004). A variety of graphene-based materials (GBMs) have then been elaborated, such as graphene oxide (GO) and reduced graphene oxide (rGO), that can be classified according to their carbon/oxygen ratio, their number of graphene layers and their average width (Wick et al., 2014). GBMs have attracted the attention of the scientific community thanks to their unique properties. Their rigidity, elasticity, electrical and thermal conduction have made them very coveted materials in many sectors such as electronics and photonics (Avouris and Dimitrakopoulos, 2012), energy production (Liang et al., 2009), drug delivery in nanomedicine (Pan et al., 2012) and in waste treatment through the absorption of pollutants such as pharmaceutical drugs in waste waters (Sophia et al., 2016).

The unique properties of GBMs have led to an increase of their production over the last years and their market is predicted to reach more than 200 million USD in 2022 (Lin et al., 2019). This increase will inevitably result in the release of GBMs in the environment including in the aquatic ecosystems. To date, the environmental concentrations of GBMs have not been measured due to the lack of operational analytic methods (Goodwin et al., 2018). According to De Marchi et al., the predicted environmental concentrations (PECs) would be similar to that of the carbon nanotubes (CNTs) since GBMs and CNTs share similar physical and chemical properties (De Marchi et al., 2018). The PECs of CNTs were estimated, using probabilistic modelling and means, to be 0.17 ng/L in surface waters, 3.6 ng/L in wastewater, 0.12 mg/kg in sewage sludge and 0.02 ng/m^3 in the air. For environmental compartments which can retain GBMs such as soils and sediments, 5.1 ng/kg and 0.79 µg/kg are predicted to be accumulated each year, respectively (Sun et al., 2014).

Microbial communities can be found in all environments and ecosystems. These highly diverse communities play a crucial role in the regulation of the biogeochemical cycles (Falkowski et al., 2008). They represent a source of carbon and nutrient for higher trophic levels, drive the formation and decomposition of organic matter (Condron et al., 2010), are responsible for the stabilisation of sediments in the aquatic ecosystems (Evans, 2003), endorse key activities in soil formation and promote plant growth (Koshila Ravi et al., 2019). Disturbance of these communities could lead to large-scale environmental and ecological consequences. Effects of GBMs on microbes have been mainly investigated on mono species models of bacteria such as *Staphylococcus epidermis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis* (Akhavan and Ghaderi, 2010a; Kang et al., 2009; Liu et al., 2011; Mejías Carpio et al., 2012; Perreault et al., 2015) and eukaryotic micro algae such as *Scenedesmus obliquus* and *Nitzschia palea* (Du et al., 2016; Garacci et al., 2017). Results showed that

GBMs had an antimicrobial activity due to oxidative stress. GBMs interact with the membranes and oxidate lipids, proteins and nucleic acids causing the disruption of biochemical reactions and leading to the production of different reactive oxygen species (ROS) (Liu et al., 2011). Another mechanism suggested by Mejías Carpio et al. (Mejías Carpio et al., 2012) was the capacity of GBMs to disable bacteria to interact with their extracellular medium, preventing them from accessing to nutrients and therefore decreasing metabolic activities. However, some studies contested the antimicrobial activity of GBMs and evidenced beneficial effects of GO on the growth rates of microorganisms such as *Escherichia coli* (Ruiz et al., 2011). Some raised the hypothesis that Gram negative bacteria were more resistant thanks to their thicker layer of peptidoglycan (Akhavan and Ghaderi, 2010a), but others showed similar response between Gram negative and positive species (Kang et al., 2009). This led to the understanding that the effects of GBMs were species dependent but also material dependent. Indeed, behaviour of GBMs in the environment differs as a function of the properties of these materials, and is also influenced by environmental factors such as pH and ion concentrations (Zhao et al., 2014). In studies conducted on bacteria, authors pointed out that the response of bacteria to GBMs exposure led to a feedback on GBMs themselves, through a modification of the biochemical properties of GBMs, concentration and fate. It was also revealed that certain bacterial and fungal species were able to biodegrade and reduce GBMs (Chen et al., 2017; Liu et al., 2015).

Although knowledge was recently acquired on bacteria or microalgae and GBMs, microbial species never appear as a monoculture in the environment but are part of a microbial community. Microbial assemblies embedded in a self-produced matrix of extracellular polymeric substances result, for example in surface-attached biofilms, in a much more successful form of life (Flemming and Wingender, 2010). This form of life appears to offer many functions such as mechanic stability, adherence, water retention, the capacity to retain sources of energy, exchange of genetic information and a protection to environmental fluctuations and contaminations (Flemming et al., 2007). The community also allows interactions and metabolic cooperation between a wide range of species (Pamp et al., 2009). With all these functions and the fact that these communities have the capacity to adapt to a wide range of environmental conditions, the microbial community assembly can however be modulated by intrinsic and extrinsic drivers such as chemicals, metals and antibiotics (Callieri et al., 2019). The potential harmful and beneficial effects on human and vertebrate gut microbiota by engineered nanomaterials such as GBMs were already put forward and was reviewed by Zhang et al. in 2020 (Zhang et al., 2020) and more recently by Xie et al. (Xie et al., 2022) and Utembe et al. (Utembe et al., 2022) in 2022. In this review, to add to the current understanding of the interactions between microbes and GBMs and contribute to a One Health approach, we focused on a broad range of systems that represent the diversity of microbial communities in environmental sciences.

Literature about the impact of GBMs on microbial environmental communities is limited. The topic has nonetheless emerged and the typology of recent studies will be described in the first section of this review. The second point is focused on the effects of GBMs on the structure of the different communities studied. The third point is focused on the effects of GBMs on the different activities of microbial communities and the different species, gene and enzymatic activities related: carbon and nitrogen cycling, host interactions and antibiotic resistance. Finally, the fourth point of this review will address interactions in the opposite direction, i.e. the effects of microbial communities on the fate of GBMs and the potential influence on their bioaccumulation.

3.2. Studies addressing interactions between GBMs and microbial communities

The following terms "ALL=(graphene) AND (ALL=(microbial communit*) OR ALL=(bacterial communit*) OR ALL=(prokaryotic communit*) OR ALL=(microbiome) OR ALL=(microbiota))" were chosen in order to cover the literature of this topic in Google Scholar and Web of Science™. The tool Web of Science™ displayed 328 publications for these keywords since 2013 (16/05/2022). The number of publications per year can be found in figure 10 and reveals the emergence of this topic. Among these 328 publications, literature was refined in order to keep publications dealing with microbial communities in environmental sciences, i.e. environmental compartments as well as bioprocesses. Publications working on mono species, human microbiota and which did not have environmental or bioprocess toxicity purposes were not kept to avoid overlapping with previous reviews. For instance, articles dealing with mice microbiota were discarded since they fit in human health framework.

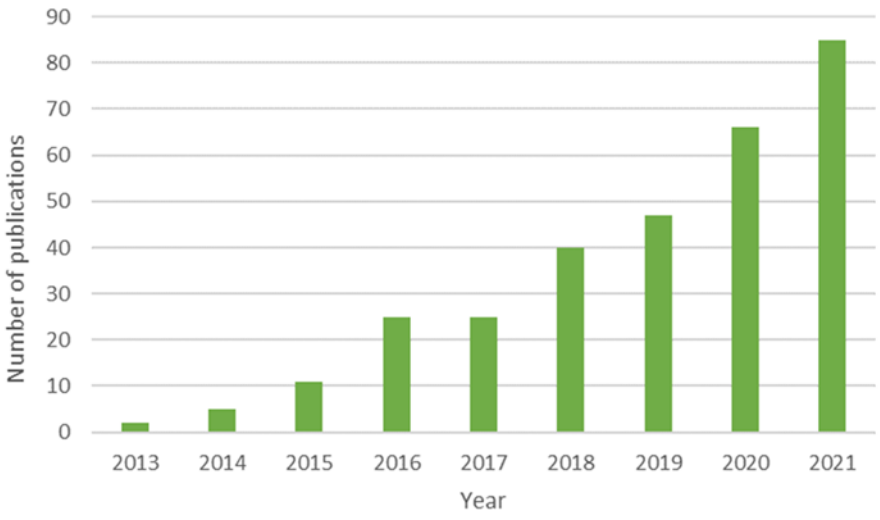

Figure 10: Number of publications per year since 2013 for the terms ALL=(graphene) AND (ALL=(microbial communit) OR ALL=(bacterial communit*) OR ALL=(prokaryotic communit*) OR ALL=(microbiome) OR ALL=(microbiota)) indexed in Web of Science™*

3.2.1. Environmental compartments studied and experimental models

The literature documenting the interactions between GBMs and microbial communities (table 1) is restricted to laboratory experiments in which environmental compartments or bioprocesses are mimicked in controlled conditions. The absence of publications derived from real systems (*in natura* or in full-scale bioreactors) is probably related to the absence of reliable methodology for GBMs quantification. The majority of the studies (47 %) were conducted with microbial communities in bioprocesses (figure 11). Among studies focused on bioprocesses, activated sludge sampled from wastewater treatment plants was usually used as starting material, either as inoculum in aerobic batch reactors (Ahmed and Rodrigues, 2013; Alam et al., 2022; Lian et al., 2020; Nguyen and Rodrigues, 2018; Sha et al., 2020) or as feeding in anaerobic batch reactors (Dong et al., 2019; Li et al., 2021; P. Wang et al., 2021). The interaction between GBMs and microbial communities in anaerobic digestors was also investigated in reactors fed with swine manure (J. Zhang et al., 2017; Zhang et al., 2019), cattle manure (Muratçobanoğlu et al., 2021) or synthetic wastewater (Bueno-López et al., 2020; Tian et al., 2017). Communities in aerobic granular sludges (Guo et al., 2018; Kedves et al., 2020, 2021; Tian et al., 2021) (strong compact structures embedding microbial cells) were also exposed to GBMs. In addition to the aforementioned bioprocesses that are designed to remove organic matter (and recover energy through methane production in the case of anaerobic digestion), anammox reactors carrying out anaerobic ammonium oxidation were also investigated (Elreedy et al., 2021; Li et al., 2019; Tomaszewski et al., 2019; D. Wang et al., 2013). Among environmental compartments, soil was highly studied and represented 27% of the studies. The different types of soils studied were the following : paddy (Ren et al., 2015), urban (Chung et al., 2015; Kim et al., 2018), agriculture (Du et al., 2015, 2020; Forstner et al., 2019a, 2019b; Ge et al., 2018; Wu et al., 2021), forest (J. Song et al., 2018), mountain (Xiong et al., 2018) and grassland (Ge et al., 2016) soils. The aquatic environment was also studied using communities from surface waters such as rivers (Ko et al., 2019; Zou et al., 2016), lake (Ko et al., 2019), estuary (Yu et al., 2017) and aquarium (Evariste et al., 2020, 2021) but also sediment communities (Li et al., 2020; Liao et al., 2021). Those communities were exposed to GBMs in microcosm experiments of variable size, complexity and realism. Although most studies relied on small-scale (≤ 1L) batch incubations, Evariste et al. (Evariste et al., 2020) used a more complex experimental setup combining a water and a sediment compartment as well as a reconstituted trophic chain. Such an experimental model integrates the interactions between pelagic and benthic microbial communities together and other aquatic organisms (decomposers, primary and secondary consumers). Reconstituted wetlands were also studied twice by the same authors in 2022 (C. Yan et al., 2022b, 2022a). Less represented compartments in the literature were gut microbiota, here from

zebrafish (Jia et al., 2019; Lu et al., 2017; Zheng et al., 2019). The low representation of gut microbiota is in line with recent reviews highlighting that gut microbiota are understudied in spite of their key role in host and ecosystem response (Duperron et al., 2020; Evariste et al., 2019a).

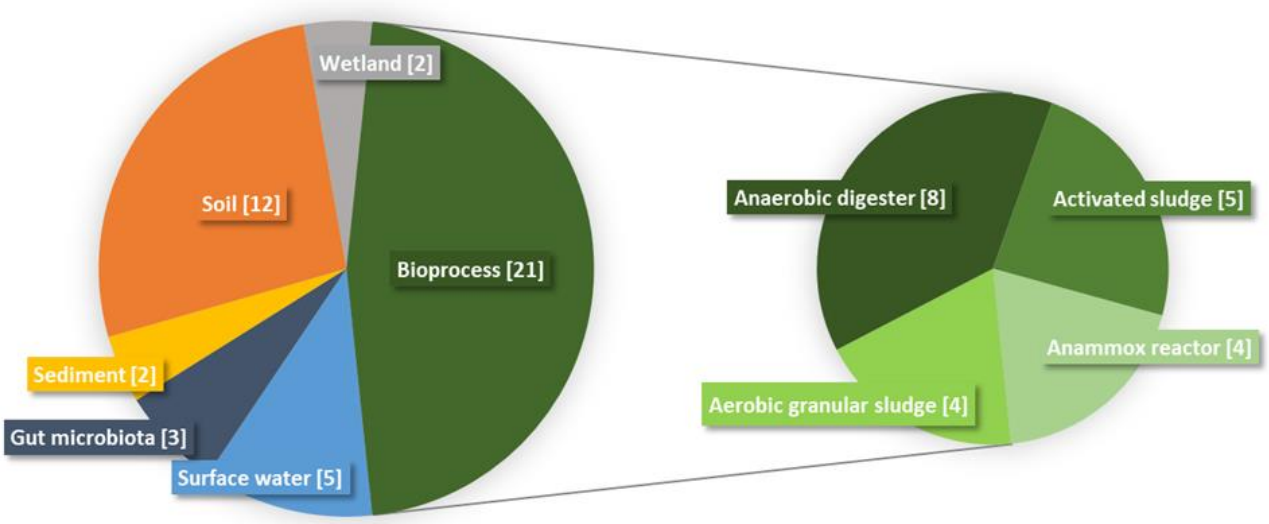

Figure 11: Distribution of studies documenting the interactions between GBMs and microbial communities as a function of the experimental model studied. For the bioprocess category, subcategories were distinguished and represented in the right panel. The number of articles contributing to each category or subcategory is indicated in brackets.

Tableau 1: Summary of results obtained across the literature. α stands for the alpha diversity and β for the beta diversity. Four types of effects were reported regarding growth, diversity and activity: ↗ stands for an increase compared to control, ↘ for an inhibition compared to control. E stands for effect, NE for no effect. The "–" symbol means that this effect was not investigated during the study. EPS: exopolymeric substances. COD: carbon oxygen demand. OM: organic matter

Experimental conditions					Observed effects				
Study	**Type of community**	**Type of GBMs**	**Concentrations**	**Exposure time**	**Growth**	**Diversity**	**Activity**	**ARGs**	**Impact on graphene**
(Ahmed and Rodrigues, 2013a)	Activated sludge	GO	10 - 20 - 50 - 100 - 200 - 300 mg/L	5 h	↘	-	Nitrification: ↘ BOD_5: ↘	-	-
(Lian et al., 2020)	Activated sludge	GO - Graphene	5 - 100 mg/L	45 - 60 d	↘	α: transitory ↘	Nitrification: ↘	-	Reduction
(Sha et al., 2020)	Activated sludge	GO	5 – 25 mg/L	11 d	-	α: ↗ / β: E	Nitrification: ↗	-	-
(Nguyen and Rodrigues, 2018)	Activated sludge	GO - Graphene	1 – 5 mg/L	10 d	-	β: E	COD removal: ↘ Nitrification: ↘	-	-
(Alam et al., 2022)	Activated sludge	rGO – rGO-nZVI	10 mg/L	115 d	↗	β: E	Nitrification: ↗	-	-
(Dong et al., 2019)	Anaerobic digester	GO	21.6 – 43.2 g/L	55 d	-	-	Methanogenesis: ↘	-	-
(Li et al., 2021)	Anaerobic digester	Graphene	5 – 10 – 15 g/L g/L	8 – 80 d	↗	α: ↗/ β: E	Methanogenesis: ↗ COD removal: ↗	-	-
(P. Wang et al., 2021)	Anaerobic digester	GO - Graphene	3 mg/L	13 – 18 d	-	α: transitory ↘ β: E	Methanogenesis: ↗	↘	-
(Tian et al., 2017)	Anaerobic digester	Graphene	30 - 120 mg/L	15 – 55 d	-	-	Methanogenesis: E EPS: ↗	-	-
(J. Zhang et al., 2017)	Anaerobic digester	GO	5 - 50 - 100 - 500 mg/L	0 - 5 - 13 - 22 d	-	-	Methanogenesis: ↘	↘	-
(Zhang et al., 2019)	Anaerobic digester	GO with Cu	100 - 800 mg/L	5 - 15 - 30 - 50 d	-	-	-	↘	-
(Muratçobanoğlu et al., 2021)	Anaerobic digester	rGO	10 – 20 – 30 mg/L	4 5d	-	α: ↗/ β: E	Methanogenesis: ↗		-
(Bueno-López et al., 2020)	Anaerobic digester	GO - rGO	10 - 50 - 300 mg/L	5 - 13 - 22 d	-	-	Methanogenesis: ↘	-	Reduction

(Kedves et al., 2020a)	Aerobic granular sludge	GO	15 - 25 - 35 - 55 - 75 - 95 mg/L	7 d	↘	β: E	Nitrification: ↘ COD removal: ↘ EPS: E	-	-
(Kedves et al., 2021)	Aerobic granular sludge	GO	15 – 35 – 55 – 75 – 95 – 115 mg/L (increase of dose every 8d)	112 d	-	-	Nitrification: ↘ COD removal: ↘ EPS: ↗	-	-
(Tian et al., 2021)	Aerobic granular sludge	GO	50 – 100 – 150 – 200 mg/L	5 – 30 d	-	β: E	Nitrification: E EPS: E	-	-
(Guo et al., 2018a)	Aerobic granular sludge	GO	60 mg/L	235 min	-	β: E	Denitrification: NE EPS: ↗	-	-
(Li et al., 2019)	Anammox reactor	GO	1 - 10 mg/L	61 d	-	-	Anammox: ↘	-	-
(D. Wang et al., 2013)	Anammox reactor	GO	0.05 - 0.1 - 0.15 g/L	0 - 7 - 14 - 21 - 28 - 35 - 42 h	-	-	Anammox: ↗ EPS: ↗	-	-
(Elreedy et al., 2021)	Anammox reactor	Graphene	10 – 25 – 50 – 100 mg/L	48 h	-	β: E	Anammox: ↗ EPS: E	-	-
(Tomaszewski et al., 2019a)	Anammox reactor	rGO	15mg/L	316 d	↗	β: NE	Anammox: ↗	-	Degradation - oxidation
(Chung et al., 2015a)	Soil	GO	0.1 - 0.5 - 1 mg/g	7 - 13 - 21 - 31 - 45 - 59 d	↘	-	OM degradation: ↗	-	-
(Du et al., 2015a)	Soil	GO	5 g/kg	90 d	-	α: ↗ / β: E	-	-	Reduction
(Du et al., 2020)	Soil	GO - rGO	50 mg/kg	90 d	-	α: ↘ / β: E	-	-	-
(Ren et al., 2015)	Soil	Graphene	10 - 100 - 1000 mg/kg	4 - 21 - 60 d	↗	β: E	-	-	-
(Ge et al., 2016)	Soil	Graphene	1000 mg/kg	1 y	↘	-	-	-	-
(J. Song et al., 2018)	Soil	Graphene	10 - 100 - 1000 mg/kg	7 - 15 - 30 - 60 - 90 d	↗	α: transitory ↘ / β: E	-	-	-
(Xiong et al., 2018a)	Soil	GO with Cd	1 - 2 g/kg	3 - 7 - 15 - 30 - 60 d	-	α: ↘	-	-	-

(Forstner et al., 2019c)	Soil	GO - rGO - aGO	1ng - 1µg - 1mg/kg	7 - 14 - 30 d	-	α: NE / β: E	-	-	-
(Forstner et al., 2019a)	Soil	GO	1ng - 1µg - 1mg/kg	7 - 14 - 30 d	-	α: NE / β: E	-	-	-
(Kim et al., 2018)	Soil	GO - Ag-GO	100 - 500 - 1000 mg/kg	7 - 14 - 21 d	NE	α: NE / β: E	C cycling: ↘ Nitrification: ↘		-
(Wu et al., 2021)	Soil	Graphene	300 mg/kg	30 – 360 d	-	α: ↗ / β: E	-	-	-
(Ge et al., 2018)	Soil	Graphene	0 – 0.1 – 100 – 1000 mg/kg	20 – 39 d	-	β: E	-	-	-
(Li et al., 2020)	Sediment	GO - rGO	0.1g/20mL	1 - 2 - 3 - 5 - 7 d	-	α: ↘ / β: E	Denitrification: ↗	-	-
(Liao et al., 2021)	Sediment	GO	5 – 7.5 – 10 – 25 – 50 mg/L	18 h	-	-	Denitrification: E EPS: ↗	-	-
(Zou et al., 2016)	Surface water	GO	0.01 - 0.1 - 1 mg/L	10 d	-	-	-	↘	-
(Yu et al., 2017)	Surface water	GO	50 - 100 - 150 - 200 - 250 - 300 mg/L	15 min	-	-	-	↘	-
(Ko et al., 2019)	Surface water	GO – Ag-GO	10 - 50 - 100 mg/L	1 - 24 - 48 h	-	-	Nitrification: ↘	-	-
(Evariste et al., 2020a)	Surface water	GO - rGO	0.5 - 1 mg/L	48 - 144 h	-	β: E	-	-	-
(Evariste et al., 2021)	Surface water	GO - rGO	0.1 - 1 - 10 mg/L	48 - 144 h	↘	α: ↗ / β: E	-	-	-
(C. Yan et al., 2022b)	Constructed wetland	GO	0.5 – 5 mg/L	30 – 60 – 90 – 120 d	-	β: E	Nitrification: ↘ Denitrification: ↘	-	-
(C. Yan et al., 2022a)	Constructed wetland	GO	0.5 – 5 mg/L	30 - 60 - 90 -120 d	transitory ↘	α: ↘ then ↗ / β: E	OM removal: NE	-	-
(Jia et al., 2019)	Zebrafish microbiota	GO	0.05 - 0.5 - 5 - 50 mg/L	25 d	-	α: E / β: E	-	-	-
(Zheng et al., 2019)	Zebrafish microbiota	Graphene – GO - rGO	1µg/day	14 d	-	α: NE / β: E	-	-	-
(Lu et al., 2017)	Zebrafish microbiota	FLG	0.25 mg/L (approx. 48mg/kg dry mass)	48 h	-	α: NE / β: E	-	-	-

3.2.2. Graphene based materials used, concentrations and exposure time

Graphene oxide was the most represented material (32 studies) compared to graphene (12 studies), rGO (10 studies) and few layers graphene (FLG) (1 study; figure 12). This imbalance can be related to the higher toxicity of GO reported for mono species models of bacteria (Liu et al., 2011). Effects of graphene composite materials were also investigated in 4 studies, such as Ag-GO and rGO-nZVI (nano zerovalent iron). Co-contamination was just tested twice, bringing together GO and Cu in an anaerobic digester fed with swine manure (Zhang et al., 2019) and another study exposing Cd contaminated soils to GO (Xiong et al., 2018).

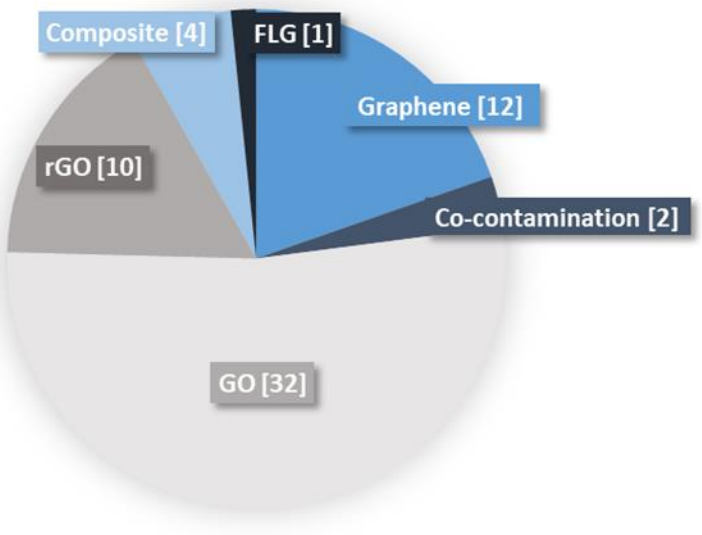

Figure 12: Types of GBMs and number of times they occurred in the literature. The number of articles contributing to each category is indicated in brackets.

The concentrations tested (table 1, figure 13) in the same compartments are heterogenous, especially in soils: the lowest concentration tested, 10^{-9} mg/kg, is 13 orders of magnitude lower than the highest concentration tested, 5 g/kg. Generally, the concentrations tested were higher than predictable concentrations mentioned previously in the introduction. In some cases, the concentrations tested in soil or surface water exceeded PECs by eight orders of magnitude (Ko et al., 2019; Xiong et al., 2018). This can be explained by the fact that some studies aim to reproduce a spill in the environment, representing a "hotspot", while PECs refer to a diffuse concentration in the environment. It is noteworthy that in some extreme cases in the field of bioprocess engineering, GBMs were not seen as contaminants but as a lever to improve process efficiency and were added at very high concentrations. For example, graphene was added up to 15 g/L to increase phenol removal during anaerobic digestion (Li et al., 2021).

The times of exposure were also highly heterogenous (table 1, figure 13). Times of exposure in soils were higher, starting at 3 days (Xiong et al., 2018) and going up to one year of exposure (Ge et al.,

2016). These longer time of exposures in soils are related with their characteristics to retain GBMs in the environment. In bioprocesses, exposure times were generally around a few hours, but some studies went up to 60 days of exposure, depending on the retention time in real processes (hours to few days for activated sludges when anaerobic digesters have higher retention time from 15 to 60 days). In aquatic environments such as surface waters and sediments, exposure was relatively short, never exceeding 10 days. These heterogenous times of exposure are important because, combined with appropriate concentrations, they represent different types of pollutions in the environment.

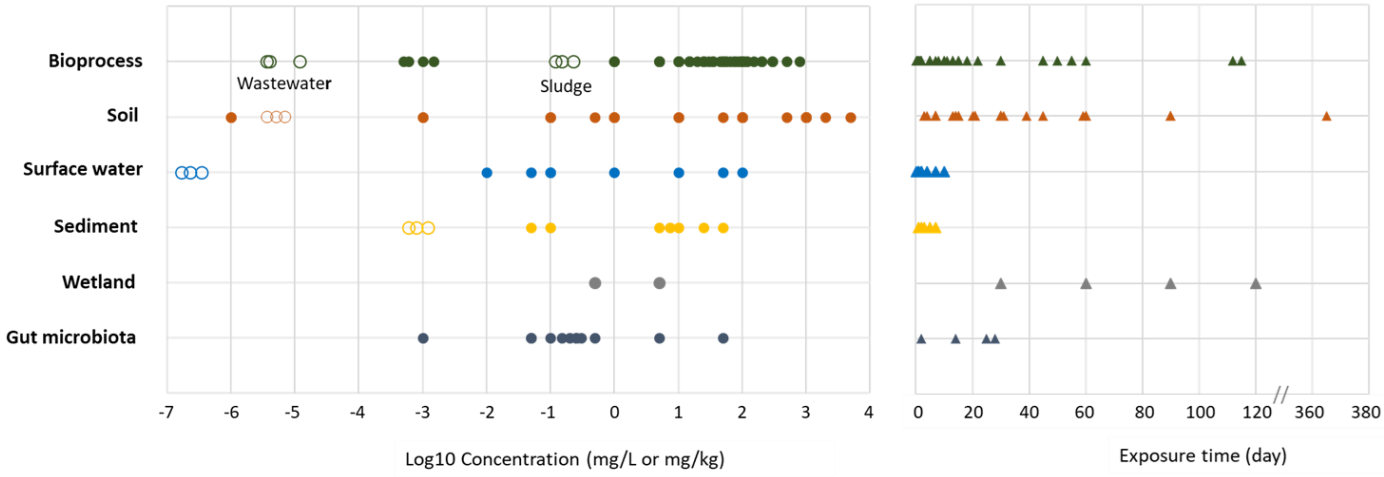

Figure 13: GBMs concentrations (left panel) and time of exposure (right panel) used in the studies. Full circles represent the concentrations experimentally tested in studies while empty circles represent CNTs PECs (GBMs PECs are still unknown but can be comparable to CNT PECs due to their similar properties (9)). PECs are only available for sediment, surface water, bioprocess and soil. Two series of PECs are represented in bioprocess, the lowest represents PECs in wastewaters effluent and the highest represents PECs in wastewater sludges. The three concentrations of PECs given by types of environmental compartments are the first, second and third quartile of the prediction model (10). For sediment and soils, concentrations of PECs represent a yearly accumulation in mg/kg/year.

3.2.3. Study goals: from ecotoxicology to process engineering

The recent results included in this review span both ecotoxicological studies in environmental compartments and studies on the effects on microbial communities in engineered systems such as nitrification, denitrification, anaerobic ammonium oxidation (anammox) and anaerobic digestion reactors. In both types of studies, microbial communities were exposed to GBMs in experimental setups that mimic actual systems, by using microcosms for natural environment such as surface waters (Evariste et al., 2020; Zou et al., 2016), or using laboratory scale reactors to mimic full scale reactors: sequential batch reactors (Lian et al., 2020), anaerobic digestors (Bueno-López et al., 2020; Dong et al., 2019; Tian et al., 2017; J. Zhang et al., 2017; Zhang et al., 2019) and anammox up flow column reactor (D. Wang et al., 2013). The specificity of the studies focused on engineered systems is that they systematically targeted the functions intensified in such reactors by measuring bioprocess efficiency together with, generally, documenting the related functional guilds of microbes. On the contrary,

studies carried out in microcosms mimicking environmental compartments do not necessarily investigate the effects of GBMs on functional counterparts to bioprocess efficiency, which are the activities contributing to natural biogeochemical cycles. The lack of functional data in such studies is probably due to the coexistence of multiple interacting activities in the natural environment, whereas bioprocesses are highly constrained to intensify one activity. Therefore, even if ecotoxicology and bioprocess engineering refer to distinct scientific communities, combining both perspectives in this review was found to be relevant since bioprocesses can be seen as a tool to a better understanding of the relationships between GBMs and the structure and function of microbial communities.

3.3. Effect of GBMs on the microbial community structure

3.3.1. Effect on growth, viability and biomass

One of the main endpoints studied on microbial communities is the growth rate. It can be expressed as the evolution of the number of cells, the biomass or even the quantity of DNA. GBMs tend to affect negatively the growth of microbial communities. For instance, in activated sludges, it was shown that GO had an impact on the growth as soon as five hours of exposure at 50 mg/L, and decreased viability at 100, 200 and 300 mg/L (Ahmed and Rodrigues, 2013). The quantity of DNA in aerobic granules was also found to be decreased after 7 days of exposure to 35 and 95 mg/L of GO (Kedves et al., 2020). The decrease of cell viability of communities exposed to 100 mg/L in a sequential batch reactor during 45 and 60 days demonstrated an acute toxicity of long term exposure to high concentrations of GO (Lian et al., 2020). Decrease of biomass (determined by DNA quantity) was also reported on soil microbial communities exposed for a year to graphene at 1 g/kg (Ge et al., 2016). A decrease of microbial biomass was additionally reported in soil communities after 7 days of exposure to GO at 0,5 and 1 g/kg, but was interestingly followed by a recovery after 13 to 59 days (Chung et al., 2015). In a biofilm composed of diatoms and bacteria, the bacterial growth rate was found to be highly diminished compared to the control (up to 75%) by the presence of 1 and 10 mg/L of GO after 48 and 144h of exposure, whereas rGO impacted only slightly the growth rate at 10 mg/L (Evariste et al., 2021). This study highlighted different effects of different GBMs on the same community. Like reported on monocultures of bacteria (Akhavan and Ghaderi, 2010a), the overall oxidative stress was enhanced in microbial communities exposed to GBMs (Ahmed and Rodrigues, 2013; Ko et al., 2019; Li et al., 2019) which could explain the observed negative effects on the growth rates in these different studies.

Although negative effects were generally measured, it is noteworthy that positive effects were also reported with GBMs. An increase of biomass in soil was observed after 4 days of exposure to 10 and 100 mg/kg of graphene (Ren et al., 2015). These results were supported in soil by Song et al. in 2018 (J. Song et al., 2018) who observed, after a slight decrease at day 7, an increase of biomass after

exposure to 10 and 100 mg/kg of graphene for the following days and until the end of exposure, day 90. On the other hand, in the same study, 1000mg/kg of graphene affected negatively the biomass after 60 days of exposure. A beneficial effect of GO at 10 mg/L on the growth rates of diatoms was measured in a diatom-bacteria biofilm (Evariste et al., 2021). In this same study, bacteria growth rate was decreased, showing contrasted effects of GO on different organisms in one same community. Taken as a whole, these results suggest an adaptivity or even a growth stimulation of some microorganisms at lower doses of graphene. Higher concentrations and longer exposures seem to generate a negative effect on the biomass. This form of adaptivity, and sometimes resilience, can be related with the expression of genes that are markers of the global health of cells. Mobility, wall and envelope biogenesis, repair, recombination and replication genes were investigated and were found to increase after an exposure to 1 and 10 mg/L of GO during 61 days (Li et al., 2019). In the same study, the lactate dehydrogenase (LDH) activity, an indicator of stress and cell death when it increases, was found to decrease through time. At higher concentrations such as 1 and 2 g/kg of GO, the LDH activity was significantly promoted during the first 15 days of exposure but returned to normal between 30 and 60 days of exposure (Xiong et al., 2018). It was also notified in constructed wetlands that exposition to GO led to the production of antioxidative enzymes such as superoxide reductase in order to counter oxidative damage from GO (C. Yan et al., 2022a). Taken as a whole, these results support the idea of resilience, or even positive effects, that can be observed on growth.

3.3.2. Effect on the alpha diversity

The alpha diversity of microbial communities represents the richness and/or evenness of taxa within a community, commonly quantified through diversity indexes such as Chao1, Shannon and Simpson indexes (Hill et al., 2003). Alpha diversity indexes are commonly derived from metabarcoding datasets, i.e. high-throughput sequencing of 16S rRNA gene amplicons. The modification of the alpha diversity in communities exposed to GBMs did not show a common pattern. The absence of detectable effect on the alpha diversity was reported in shorter-term studies conducted with soils (below 30 days) (Forstner et al., 2019a, 2019b; Kim et al., 2018) and Zebrafish microbiota (below 14 days) (Lu et al., 2017; Zheng et al., 2019). Increase of the alpha diversity, especially the Shannon index, was rare but occurred in anaerobic digesters exposed to 10, 20 and 30 mg/L of rGO (Muratçobanoğlu et al., 2021) and 5, 10 and 15 g/L of GO (Li et al., 2021), in activated sludge exposed to 25 mg/L of GO (Sha et al., 2020) and soils exposed to 5 g/kg of GO for 90 days (Du et al., 2015) and to 300 mg/kg of graphene for 360 days (Wu et al., 2021). Nevertheless, a decrease of the alpha diversity was observed in many studies. Interestingly, a co-contamination of Cd and 1 and 2 g/kg of GO only altered the alpha diversity (Shannon index) of soil after 60 days of exposure (Xiong et al., 2018). This late effect on the Shannon index was also reported on communities in sequential batch reactors after 45 days of exposure to 100

mg/L of GO, but with recovery after 60 days (Lian et al., 2020). Meanwhile, a decrease of several indexes (Richness, Evenness, Shannon and Chao1) was also measured during a short exposure of 7 days to GO and rGO in sediments (Li et al., 2020). Exposure to rGO 50 mg/kg for 90 days also decreased ACE (estimation of the number of species using sample coverage), Chao1 and Shannon indexes in a soil community, while GO at the same concentration had no effect on the alpha diversity (Du et al., 2020). Transitional effects were also observed in soils: in 2018, Song et al. (J. Song et al., 2018) reported a decrease compared to control of the alpha diversity after an exposure of 7-15 days to 10 and 100 mg/kg of graphene, but an increase after a longer exposure. The recovery and increase were not observed for the highest concentration of 1000 mg/L, displaying a form of resilience of the communities to lower concentrations of GBMs. After 18 days, a recovery of the alpha diversity (Chao, Shannon, Simpson and ACE) was also observed in anaerobic digesters exposed to 3 mg/L of graphene and GO (P. Wang et al., 2021). These results are consistent with observed effects on growth and biomass showing a transitory effect and the adaptivity of microorganisms exposed to lower concentrations. Different effects were also reported in the same study between the gut microbiota of female and male zebrafishes (Jia et al., 2019). Alpha diversity of microbiota exposed to 5mg/L of GO was increased in the female and decreased in male. Microbiota composition was not the same between male and female individuals, showing a difference of response to GO as a function of the composition of the community.

3.3.3. Effect on the beta diversity

The beta diversity represents the dissimilarity between communities' structure as usually determined by metabarcoding. When it was investigated and analysed between control communities and exposed communities, differences were always evidenced, but the temporal patterns of dissimilarity were not congruent. For instance, in soil communities exposed to graphene, a dose dependent effect was observed in the 7 first days with 10, 100 and 1000 mg/kg, and a recovery was pointed out at day 21 and 60 (Ren et al., 2015). This recovery was not observed in other soil experiments with the same concentrations (J. Song et al., 2018). Instead, communities exposed to the highest dose of graphene (100 et 1000 mg/kg) differed more from the control in the later stages. Soil (Du et al., 2020; Forstner et al., 2019a, 2019b; Ge et al., 2018; Kim et al., 2018; Wu et al., 2021) and sediment (Li et al., 2020) communities exposed to GO, rGO and/or graphene showed similar results, demonstrating time, concentration and pollutant dependant shifts of microbial communities. In a complex biofilm composed of diatoms and bacteria, 10 mg/L of GO caused shifts in the structure of the communities exposed, whereas rGO did not impact the beta diversity (Evariste et al., 2021). Finally, in a complex aquatic system containing several trophic levels with a microbial community at its basis, changes in the benthic and planktonic communities exposed to 0.05 and 0.1 mg/L of GO and rGO were

revealed (Evariste et al., 2020). This shows the capacity of GBMs to drive community structures by decreasing non-tolerant species, benefitting to more tolerant species. These changes in microbial communities can also have an impact on the interaction network of these communities, for example increasing negative interactions such as competition. The degradation of these interactions, highlighted by Lian et al. (Lian et al., 2020), can lead to disruptions of important functions of the communities, such as element cycling, and generate broader consequences for the entire ecosystem.

Although beta diversity is generally affected by GBMs, it is difficult to point out specific taxa which are particularly affected or tolerant in the presence of GBMs while all communities studied originated from highly diverse systems and experiments were conducted in highly diverse environmental conditions. Nevertheless, a common pattern was the identification of changes in taxa with recognized roles in major biochemical cycles such as nitrogen and carbon cycles.

3.4. Microbial activities affected by GBMs and related taxa affected

3.4.1. Nitrogen cycle

Microbial communities regulate nitrogen cycling through multiple processes such as nitrification (oxidation of ammonia into nitrite and nitrate), denitrification (series of reductions leading to the transformation of nitrate into elemental nitrogen) and anammox reactions (nitrate and ammonia simultaneously converted into nitrogen and water).

- Nitrification

The nitrification process was found to be inhibited by GO at 50 to 300 mg/L in activated sludge after 5h of exposure (Ahmed and Rodrigues, 2013). This was also observed with a longer time of exposure to GO (48h) in river and lake communities during fall, while surprisingly in the same study, no effect was observed during summer, underlining the difference of effect of GO influenced by the different environmental factors (Ko et al., 2019), and so different communities. Inhibition of NH_4^+ removal by the presence of 115 mg/L of GO was also underlined in aerobic granular sludge (Kedves et al., 2021) and by 3.64 and 5.26 g/L of GO in sequential batch reactors (Nguyen and Rodrigues, 2018). Transient effects on the nitrification process were highlighted in aerobic granular sludge exposed to 150 and 200 mg/L of GO: after 5 days, the nitrification rate was increased, in parallel with a higher abundances of the *Nitrospirae* family and the *Nitrosomonas* genus, while after 30 days it was decreased (Tian et al., 2021). In other aerobic granules, the removal of NH_4^+ was found to be decreased after 7 days of exposure to 55 mg/L and up to 95 mg/L (decrease of 88.7%) (Kedves et al., 2020). Inhibition of nitrification was confirmed on communities exposed to 100 mg/L of GO and graphene in sequential batch reactor for 45 days, but after 60 days of exposure, the nitrification rate was recovered

with GO (Lian et al., 2020). This recovery can be associated with changes and adaption of communities, promoting species responsible of the nitrification process. In soil communities, the nitrification rate was found to be decreased by 1 mg/kg of Ag-GO after 21 days of exposure (Kim et al., 2018). The decrease of nitrification was explained by the decrease of the urease enzyme activity observed (Xiong et al., 2018) in soil communities exposed to GO where a recovery of activity was observed after 30 days of exposure. This decrease can also be associated to the diminished relative abundance of *Nitrospirae*, which has a role in nitrification, and the *Rhodospirillales* order (N_2 fixation). The relative abundance of *Nitrospirae* was also found to be diminished in soils exposed to graphene along with *Planctomyces*, capable of ammoniac oxidation (Ren et al., 2015). Although GBMs seem to usually impair nitrification, the ammonia removal by nitrification was found to be increased in activated sludge exposed to 5 and 25 mg/L of GO (Sha et al., 2020). It was also observed in wastewaters exposed to 10 mg/L of rGO (Alam et al., 2022) explained by an increase of the *amoA* gene copies and an increase of the relative abundance of *Nitrospirae*.

- Anammox process

Upon exposure to GO at 1 and 10 mg/L, the anammox rate exhibited a dose dependent short term decrease, but recovered after 15 days (Li et al., 2019). The recovery could be associated to a higher relative abundance of anammox bacteria such as the *Anammoxglobus* specie. On the contrary, in a community fed with NH_4^+ and NO_2^- in batch, the anammox process was increased by 0.05; 0.1 and 0.15 g/L of GO after 42h of exposure (D. Wang et al., 2013). Increases of the anammox rate was also observed in a community exposed to 15 mg/L of rGO for 316 days (Tomaszewski et al., 2019) and in a reactor exposed to 25, 50, 100 and 150 mg/L of graphene (Elreedy et al., 2021) where higher relative abundances of anammox bacteria species were observed: *Candidatus Brocadia* and *Candidatus Jettenia.* Anammox relies on electron transfer and interestingly, it has been put forward the capacity of *Candidatus Brocadia* to use GO as an electron acceptor in the case of anaerobic oxidation of ammonium (Shaw et al., 2020). This potential increase of electron transfer by GBMs could be an explanation to the increase of the anammox process.

- Denitrification

The denitrification process was also studied in soil communities exposed to GO and rGO. From day 1 to day 7, the nitrogen, particularly nitrate, removal efficiency was increased. These results were correlated with the increase of the relative abundance of *Sulfuricella* and *Rhodobacter*, both genera capable of denitrification. This was also correlated with the increase of the activity of different denitrification enzymes : nitrate reductase (NAR), nitrite reductase (NIR), nitric oxide synthase (NOS) and nitric oxide reductase (NOR) (Li et al., 2020). NAR and NIR activity was also enhanced in a sediment

community exposed to 7.5 and 10 mg/L of GO for 18h (Liao et al., 2021). As denitrification relies on extracellular electron transfer (Hao et al., 2022), this increase of denitrification is explained by the increase of the electron transport system thanks to GO. If those results show increases in denitrification and related taxa, it is noteworthy that taxa capable of converting nitrate in nitrite were found less abundant in soils exposed to pristine-GO (Du et al., 2015), but unfortunately denitrification rates were note monitored. Other results showed that genera capable of removing nitrate such as *Paracoccus* and *Klebsiella* could be tolerant to GO in aerobic granules (Kedves et al., 2020) and others, such as *Zoogloea*, intolerant to GO in sequential batch reactors (Nguyen and Rodrigues, 2018). Functional groups, predicted with FAPROTAX database, involved in nitrate reduction were found less abundant in the presence of 0.1 and 100 mg/kg of graphene (Ge et al., 2018).

3.4.2. Carbon cycle

- Methanogenesis

One of the major roles of microbial communities in the carbon cycling is methane (CH_4) formation through methanogenesis. On one hand, CH_4 has a strong radiative effect and is thus related to climate change (Myhre et al., 2014). Methanogenesis in the environment has therefore been extensively studied to better constrain CH_4 emissions to the atmosphere. On the other hand, CH_4 being an energy source, methanogenesis is also a crucial microbial process because it can be domesticated and intensified to produce energy in bioprocess engineering. The interactions between GBMs and methanogenesis have been mainly studied in the bioprocess engineering perspective. The effect of GO and rGO was investigated on the three different pathways of methanogenesis in batches (Bueno-López et al., 2020): acetoclastic, methylotrophic and hydrogenotrophic. After 144h of exposure, GO had beneficial impact on the acetoclastic and methylotrophic pathways at 10 and 50 mg/L, while 300 mg/L impacted negatively acetoclastic and hydrogenotrophic ones. With rGO, methylotrophic methanogenesis was increased at all concentrations, acetoclastic at 50 and 300 mg/L and hydrogenotrophic at 500 mg/L. This underlined the difference of effect between two GBMs and their concentrations in a same system. With longer times of exposure and in the presence of graphene, the acetoclastic methanogenesis was found to increase after 15 days of exposure at 30 and 120 mg/L, but was decreased with 120 mg/L after 55 days (Tian et al., 2017). Surprisingly, the acetate kinase activity was decreased: the authors suggested that this loss of activity was compensated by the increase of the coenzyme F420. In the same study, relative abundances of genera implicated in methanogenesis were found to be affected: *Methanosarcina* (decrease) and *Methanobacterium* (increase), but also lactate producers such as *Olsenalla* (increase) and *Lactococcus* (decrease). Methane production was also enhanced in anaerobic digesters exposed to 3 mg/L of graphene and GO after 13 and 18 days (P. Wang

et al., 2021) and to 10 mg/L of GO after 8 days (Li et al., 2021). 10, 20 and 30 mg/L of rGO for 45 days also increased methane production in an anaerobic digester and was related with the increase of the relative abundance of the *Methanoculleus* genus, capable of hydrogenotrophic methanogenesis (Muratçobanoğlu et al., 2021). The increase of methanogenic activity was not found in all studies. GO at 2.16 and 43.2 mg/L was found to decrease the total methane production, affecting the methylotrophic pathway. It was highlighted that GO had a high affinity with the organic substrates, leading to a decrease of their bioavailability (Dong et al., 2019). GO at 5, 50, 100 and 500 mg/L decreased the total methane production from swine manure. In the same experiment, the key gene *mcrA* was quantified and interestingly found to be increased and the abundance of the genera *Methanobrevibacter* and *Methanosphaera* were found to be decreased. The authors suggested that the membrane wrapping, oxidative stress and cell death due to GO addition caused the methanogenesis inhibition (J. Zhang et al., 2017). There seem to be no general trend in the effects of GBMs on methanogenesis. Possible increases or decreases seem to be related to the different degree of resistance to GBMs of taxas capable of this bioprocess. An explanation of the increase could be the enhancement of electron transfer by the materials. Interestingly, Igarashi et al. (Igarashi et al., 2020) exposed a co-culture of *Geobacter* (electron producer) and *Methanoasarcina* (electron consumer) to GO. They underlined the fact that in the absence of GO, methane production did not occur, while in the presence of GO, acetate was produced from ethanol and then consumed to produce methane. This suggests the capacity of GO to promote the "direct interspecies electron transfer" by playing the hypothetic role of electron carrier. However, it has not been proven that this electron transfer between species with possible enhancement of methanogenesis occurs in more complex communities.

- Degradation of organic matter

Evariste et al. (Evariste et al., 2021) measured potential activities related to organic matter degradation in aquatic microbial community exposed to 0.1, 1 and 10 mg/L of rGO and GO. The authors revealed an increase of the specific activity of the communities exposed to 10 mg/L of GO for 48 hours. This increase was not noticeable after 144h of exposure. In the same study, the genus *Silanimonas* (degradation of benzene) was found to be tolerant to GO along with the genus *Acidovorax* (degradation of organic matter and aromatic compounds). *Acidovorax* genus was also identified as tolerant in aerobic granules exposed to GO (Kedves et al., 2020). The presence of 10 to 300 mg/L of GO in activated sludge decreased of over 50% of the BOD_5, revealing a high loss of organic compound removal (Ahmed and Rodrigues, 2013). In the same way, in aerobic granular sludges, after 7 days of exposure to GO ranging from 35 to 95 mg/L, the COD (Chemical Oxygen Demand) removal was highly decreased in a dose dependent manner (up to 73.7% decrease) (Kedves et al., 2020). A decrease of the COD removal was also found in aerobic granular sludge exposed to 115 mg/L of GO (Kedves et al.,

2021) and in sequential batch reactors exposed to 3,64 and 5.26 g/L of GO for 8 days (Nguyen and Rodrigues, 2018). On the contrary the COD removal increased in the presence of 10 mg/L of GO in anaerobic digesters (Li et al., 2021). Functional groups involved in cellulolysis, as predicted with FAPROTAX database, were found more abundant in the presence of 0.1 and 100 mg/kg of graphene (Ge et al., 2018). Chung et al. (Chung et al., 2015) exposed soil communities to 0.1, 0.5 and 1 mg/g of GO and investigated enzyme activities related to organic matter degradation. Xylosidase and β-1,4-N-acetylglucosamidase activities decreased in the first 21 days and then a recovery and even an increase of activity was reported after 45 days of exposure. In another soil community, Ag-GO at 1mg/kg significantly impacted the activity of cellobiohydrolase, β-glucosidase and xylosidase (Kim et al., 2018). At the level of gene expression, it was shown that genes encoding for transport, metabolism of carbohydrates and amino acids and signal transduction mechanisms were impacted by acute and chronic exposure of GO (Li et al., 2019).

Other studies during which activities related to the carbon cycle were not directly investigated also found changes in taxa with carbon-related activities. The relative abundance of genera involved in the biodegradation of organic pollutants were found to be enhanced by the presence of graphene in soil communities: *Bacillus*, *Arthrobacter* and *Geobacter* (Ren et al., 2015). *Sphingomonas* relative abundance, also capable of organic pollutant biodegradation, was found to increase in other soil communities co-exposed to GO and Cu along with *Actinobacteria*, involved in decomposition of organic matter such as chitin and cellulose (Xiong et al., 2018). *Actinobacteria* was also found to be more abundant in soils exposed to graphene for 30 days (Wu et al., 2021). In sequential batch reactors exposed to graphene and GO, an increase of the relative abundance of *Saccharibacteria*, capable of metabolizing organic macromolecules, was observed compared to control (Lian et al., 2020). In an anaerobic system, changes in the relative abundances of genera with a role in the carbon cycle such as *Alkaliflexus* (utilisation of carbohydrates), *Syntrophomanas* (degradation of butyrate) or *Lactobacillus* (fermentation) were observed (Li et al., 2021). In an anaerobic digestor exposed to rGO, the relative abundance of *Defluvitoga*, capable of converting complex carbohydrates in acetate, ethanol, H_2 and CO_2, was found to be increased (Muratçobanoğlu et al., 2021). Soil communities during two studies, were exposed to graphite, rGO and/or GO (Forstner et al., 2019) with no focus on the carbon or nitrogen cycle. Nevertheless, the results also highlighted modifications of relative abundances of genera with roles in the carbon cycle such as *Acidobacterium* (use of glucose and lactose) and *Chlorobiales* (use of CO_2) and the specie *Clonostachys candelabrum* (fermentation). In soils, changes in the relative abundances of functional groups predicted using FAPROTAX database (REFFF) after exposition to 50 mg/kg of GO and rGO were observed. These functional groups were related to organic matter degradation (chemoheterotrophy and fermentation). There is no shared

trend in these overall results, but changes in the taxa composition of microbial communities and in their activities show the potential of GBMs to modulate the degradation of organic matter.

- Exopolymeric substance production

Microbial communities have also a role in the carbon cycle through the production of EPS in biofilms. Few studies were focused on EPS production but all congruently demonstrated an increase of production. GO at 0.05 and 0.1 g/L induced an increase of total EPS, but no increase was revealed at 0.15 g/L after 42h of exposure in an anammox reactor (D. Wang et al., 2013). In a sediment community exposed to GO, the total EPS content was also increased after 18h of exposition (Liao et al., 2021). In an anaerobic digester fed with wastewater and exposed to graphene for 55 days, the total EPS production also increased at 30 and 120 mg/L (Tian et al., 2017). The relative content of carbohydrates increased while the relative protein content decreased. The EPS content also increased in aerobic granular sludge exposed to 60 mg_{GO}/L (Guo et al., 2018). In other aerobic granules exposed for 7 days, the production of EPS was found to be increased at the lowest concentration tested (15, 25 and 35 mg_{GO}/L) while higher concentrations (55, 75 and 95 mg/L) decreased the production of EPS (Kedves et al., 2020). In the same study, the content of the EPS was also changed. The protein content was increased at the lowest concentrations and decreased at the highest while the carbohydrates content was decreased at each concentration. The protein content of EPS was also increased in an annamox reactor exposed to 10 mg/L of graphene (Elreedy et al., 2021) and in aerobic granular sludge exposed to 35 and 50 mg/L (Kedves et al., 2021). On the contrary, it was observed in aerobic granular sludge, after an increase of the protein content at day 5, a decrease of the protein content and total EPS production after 30 days of exposure to 150 and 200 mg/L of GO (Tian et al., 2021). This showed the capacity of graphene-based materials to modify not only the quantity but also the quality of EPS.

3.4.3. Microbiota and host interactions

Gut microbiota endorse vital roles in health and metabolism of their hosts (Tremaroli and Bäckhed, 2012). In the past two decades, tremendous advances were made in understanding the influence of microbiota in human health, mostly using mouse and rat as experimental models (Fan and Pedersen, 2021). In line with these advances, the interactions between nanoparticles, human gut microbiota models and human health have been explored and have been reviewed extensively (Utembe et al., 2022; Xie et al., 2022; Zhang et al., 2020). However, in environmental sciences and more specifically in ecotoxicology, gut microbiota is just emerging (Duperron et al., 2020; Evariste et al., 2019). Therefore, literature remains scarce and almost inexistent about GBMs ecotoxicity towards gut microbiota of hosts that are representative of aquatic or terrestrial ecosystems, except for three studies conducted on zebrafishes. Studies that focused on gut microbiota of zebrafishes revealed

decreases in *Fusobacteria* and *Bacteroidetes* phyla which have a major role in the production of vitamins and the degradation of complex molecules (Gibiino et al., 2018). The same study also revealed an increase in the Proteobacteria phylum, which was in this case associated with dysbiosis and toxin liberation (Shin et al., 2015) and which was correlated with weight gain of zebrafishes exposed to GO (Jia et al., 2019). The relative abundance of *Proteobacteria* was also decreased in zebrafish microbiota exposed to FLG (Lu et al., 2017). Inflammatory responses caused by GBMs were also reported in zebrafishes and was associated with dysbiosis: the increase of *Fusobacteria*, *Cetobacterium* and *Lactobacillus* and the decrease of *Firmicutes* and *Pseudomonas* (Zheng et al., 2019). GBMs have the potential to modulate gut microbiota and thus be a threat for hosts of these unbalanced communities. Nevertheless, the use of one only host model is questionable. More research is needed to better constrain the effects of GBMs on gut microbiota of environmental hosts that would better represent the biodiversity in terrestrial and aquatic ecosystems.

3.4.4. Antibiotics resistance

The effect of GBMs, especially GO, was also tested on antibiotic resistance and revealed a decrease of abundance and dissemination of antibiotic resistance genes (ARGs) in communities. In a freshwater microcosm exposed to 0.01, 0.1 and 1 mg/L, the abundance of *intI*, *sul1* and *sul2* genes were found to decrease after 4 days of exposure up to the end of experiment: 10 days. The authors explained that this decrease was due to the formation of DNA-GO complexes as revealed by Gold View 1, a nucleic acid marker. This complex disabled the access to DNA and thus its horizontal transfer (Zou et al., 2016). The dynamics of four antibiotic resistance genes (*tetA*, *sul2*, *ermB* and *ampC*) were also studied on an estuary community cultivated in a Luria-Bertani broth medium. The decrease of gene abundances was effective at the lowest concentration tested, 50 µg/L, and in a dose dependent manner up to the highest concentration tested, 300 µg/L (Yu et al., 2017). This confirms previous results and extends their relevance at lower concentrations. In an anaerobic digestor fed with swine manure containing 50, 100 and 500 mg/L of GO, total abundance of ARGs decreased compared to that in control. It is noteworthy that a majority of ARGs decreased (*ermB*, *tetM*, *tetG*, *sul1* and bla_{TEM}). This decrease could be related to the changes in the microbial community, showing a decrease of potential host populations (J. Zhang et al., 2017). During another experiment with anaerobic digestion of swine manure containing 100 and 800 mg/L of GO, similar results were obtained as the overall abundance of ARGs was lower than in control conditions, and the same was observed for mobile genetic elements (Zhang et al., 2019). This generally observed decrease could be explained by the formation of DNA-GO complexes as revealed by Gold View 1, a nucleic acid marker (Zou et al., 2016), and disabling the horizontal gene transfer (HGT) of this complexed DNA. The partial disabling of HGT within microbial communities was supported by a study on tetracycline resistance in a coculture of a donor strain (*E.*

coli HB101 with a RP4 plasmid) and a recipient strain (*E. coli* NK5449). It was reported that the survival rate of bacteria exposed to tetracycline diminished in the presence of 10, 80 and 100 mg/L of GO, explained by a decrease of gene copies (*tetA* and *aphA*) (Guo and Zhang, 2017). A higher removal of antibiotic resistance genes such as *blaOXA-1*, *ermB*, *ermF*, *tetQ* and *tetX* was also reported after 18 days in an anaerobic digestor exposed to 3mg/L of GO (P. Wang et al., 2021). These decreases of antibiotic resistance genes abundances in presence of GO can be explained by the capacity of GO to damage DNA structure, cleavage and also intercalate into plasmidic DNA and form GO-DNA complexes which inhibits horizontal transfer (Xu et al., 2019). On the contrary, conjugative transfer of *tetA* and *aphA*, that does not involve free DNA in the medium, was found to be increased in a community exposed to 0.1, 1, 10, 50 and 100 mg/L of GO (Guo and Zhang, 2017).

3.5. Effect of microbial communities on graphene-based materials

3.5.1. Degradation, reduction and oxidation of GBMs by microbial communities

The capacity of microbial communities to reduce the size and the oxidation state of GBMs was reported in several recent studies (Table 1). After exposing soil communities to GO, Du et al. (Du et al., 2015) showed different changes in the GO properties. Scanning electron microscopy images showed rougher texture and transmission electron microscopy images revealed a lower transparency due to aggregation of minerals such as N, Mg, Al, Si, K, Ca and Fe, leading to thicker nanomaterials. Investigations also showed a decrease in C-O (from 29% to 18%) and C=O (from 26% to 8%) functional groups. This reduction was also notified in anaerobic digestors (Bueno-López et al., 2020) and sequential batch reactors (Lian et al., 2020). This reduction can be explained by GO acting as an acceptor of electron during reduction process such as respiration (Jiao et al., 2011) and glycolysis (Akhavan and Ghaderi, 2010a). The capacity of GO to be reduced while enhancing direct interspecies electron transfer during anaerobic processes was also reported. This phenomenon lead to the formation of conductive complexes composed of GO and species (Igarashi et al., 2020). These two processes have only been investigated in monospecific or coculture tests, but similar processes can be expected in complex communities where the reduction of GBMs was reported. At the opposite of reducing, the capacity to oxidize FLG into a GO-like material was also reported in axenic monocultures of wood degrading and saprotrophic fungi (Candotto Carniel et al., 2021).

The capacity of naphthalene degrading bacteria to degrade graphite, GO and rGO was previously reviewed (Liu et al., 2015) and was also observed in anammox reactors, where the oxidation of rGO was also evidenced (Tomaszewski et al., 2019). The degradation of graphene by different microbial peroxidase enzymes was also highlighted: lignin peroxidase produced by white rot fungus (Lalwani et al., 2014) but also horseradish peroxidase and myeloperoxidase (Chen et al., 2017).

Furthermore, in the presence of graphene, the relative abundance of bacterial strains capable of the biodegradation of complex carbon pollutants were found to be enhanced (Evariste et al., 2021; Lian et al., 2020; Ren et al., 2015; Xiong et al., 2018), suggesting that this capacity of biodegradation could also be effective on GBMs. To our knowledge, this oxidative activity has not been demonstrated in complex communities.

3.5.2. Bioaccumulation and fate of GBMs after interactions with microbial communities

The fate of GBMs in the environment is driven by their physical and chemical properties. The changes in the GBMs oxidation state reviewed in paragraph 4.1 by microbial communities will therefore modulate their fate and bioavailability. Furthermore, microbial communities were found to accumulate different GBMs such as GO in wastewater sludge (Ahmed and Rodrigues, 2013), but also FLG in diatom biofilms (Garacci et al., 2017). This phenomenon could lead to a higher bioavailability of GBMs for higher trophic level, for example biofilm-feeding grazers. The trophic transfer of graphene was highlighted in simplified aquatic food chains, in particular between *E.coli* bacteria and *T. thermophila* protozoa (Dong et al., 2018). Once GBMs are up taken by higher trophic species such as zebrafish, they were found to accumulate in the gut and induce dysbiosis (Jia et al., 2019; Lu et al., 2017; Zheng et al., 2019). The accumulation of GBMs in microbial assemblies could represent a threat to trophic chains and therefore to the stability of ecosystems. Literature about bioaccumulation of GBMs is still poorly represented and needs to be explored further.

3.6. Conclusion and perspectives

GBMs are well known to impact monocultures of microbial organisms. Studies now try to focus on microbial communities from different compartments of the environment, but also in engineered systems, in order to assess broader environmental impacts. This review gathers recent knowledge and understandings of interactions between microbial communities and GBMs and highlights the diversity of mechanisms behind these interactions. Results mainly exhibit negative impacts of GBM on the growth, generally due to oxidative stress, but some studies did underline forms of resilience after exposure to low concentrations and even some beneficial effects. Microbial communities endorse many roles throughout different activities that were found to be influenced by the presence of GBMs. Indeed, activities related to biochemical cycles, such as carbon and nitrogen cycles, were affected in different manners. Bioprocess yields were increased or decreased, but no shared patterns could be observed. It seems that the effect comes from the disruption of the community structure leading to the promotion or decrease of species related to particular activities, subsequently influencing the gene and enzyme activity and the overall bioprocess. Even if the carbon (methanogenesis, EPS production and composition and carbon uptake) and nitrogen (nitrification, denitrification and anammox) cycles

have been put forward in recent literature, there is no reason why other cycles such as the phosphorus one would not be affected. Literature remains scarce but impacts of GBMs on phosphorus removal (Kedves et al., 2020) and related enzymes (Chung et al., 2015) were reported. If the increase of species with roles in these different bioprocesses is an explanation of the increases of the different yields, the potential electron transfer by GBMs could also be one. Bioprocesses such as methanogenesis, denitrification or anammox rely on electron transfer and graphene nanomaterials seem to increase the direct interspecies electron transfer. Effects of GBMs on antibiotic resistance was also highlighted, generally decreasing horizontal gene transfer and related gene copies number due to the interaction of GBMs with genetic material and potentially mitigating their transfer and causing damage and cleavage. The structure and oxidation state of GBMs was also impacted by the interaction with microbial communities: reduction, oxidation and potential biodegradation of the materials by specific bacteria. The potential retention of GBMs by communities is also a none negligible mediator of the environmental fate of GBMs and increases their potential bioaccumulation across higher trophic chains.

Some results show similar trends but some are contradictory. Apart from the difference of concentrations tested, the heterogeneity of results probably originates from the fact that all studies started their experiments with different community compositions from different environmental compartments, but also exposed those communities in different conditions. Environmental factors have been shown to mediate the fate and toxicity of GBMs in the environment (Zhao et al., 2014), which could also contribute to the difference of results. Moreover, it is obvious that the variability of the results can be influenced by the variety of the characteristics of the GBM itself. The multiple processes for synthesis, oxidation and reduction of these nanomaterials are likely to lead to large variations in the composition, the structure or the level of surface functionalization of these 2D materials, introducing an even higher level of variability after exposure in a biological matrix. This great variability of materials contributes to make the comparison between various studies particularly difficult or even uncertain.

Various results were put forward in the literature but gaps to fill are still remaining. First of all, research efforts have been mainly focused on bioprocesses and soil communities while the water environment is slightly understudied although this compartment is a major receptacle of GBMs such as GO, due to their high oxidation state and thus great stability in water (He et al., 2017; Lanphere et al., 2014). Microbial communities are not only composed by bacteria. Studies mainly focused on the bacterial and archaeal compartment, while fungi or even eukaryotic microalgae such as diatoms were poorly studied. Besides, there is a lack of realism of the environmental conditions. Only one study relied on complex experimental conditions with reconstituted trophic chains (Evariste et al., 2020).

When it comes to the types of GBMs tested, GO was mainly studied which creates a gap of knowledge about the effects of rGO or graphene. Moreover, GBMs have the characteristic to interact and adsorb different pollutants such as heavy metals (Chan et al., 2008). Only few studies are oriented towards co-contamination, whereas this case is the most representative of the environmental conditions nowadays. The concentrations tested during studies were in ranges exceeding predicted values. Even if the actual concentrations of GBMs in the natural environment cannot be measured, probabilistic models of CNTs concentrations in different environmental compartments were elaborated but substantially higher concentrations of nanomaterials were generally tested. The discrepancy between environmental concentrations of nanomaterials and concentrations used in studies was already put forward, underlining a lack of environmental relevance (Holden et al., 2014). There is a real need to develop an operational analytical method in order to assess environmental concentrations and obtain realistic results. The need of coordination between studies in nanomaterials analysis, fate, transport modelling and hazard assessment was already discussed by Holden et al. (Holden et al., 2016) along with the importance of the environmental relevance. Even if the literature on GBMs exhibits different types of exposure such as chronic and acute, very few have taken these points into account and therefore share few similarities in order for them to be comparable and environmentally relevant.

Nevertheless, GBMs were pointed out as disruptors of microbial communities, in terms of both composition and functions (indirectly and directly). As a matter of fact, all lowest concentrations tested in every compartment induced effects on the composition or activity of the microbial communities exposed. Recent studies have shown that plant and human pathogens abundance could be mediated by GBMs (Forstner et al., 2019) which could lead to ecological disruptions and increases in plant and human diseases. Gut microbiota can also be disrupted by GBMs and lead to dysbiosis in hosts, leading to a broader environmental problem by causing diseases to species bearing unstable microbiota. In a world where the global health depends on the health of all three components (humans, environment and animals), known under the concept of “One Health” (Destoumieux-Garzón et al., 2018), and where microbial communities play a crucial role within each of the three components (van Bruggen et al., 2019), the possible disturbance of these communities could lead to broad consequences.

Conflict of interest

All authors have declared that this review was carried out without any commercial and financial relationships that could be interpreted as a potential conflict of interest.

Acknowledgments

Authors would like to thank the European Union's Horizon 2020 research and innovation program under grant agreement n°881603 and the French Ministry of Higher Education and Research for the PhD grant n°2020-11.

L'étude bibliographique met en avant certains manques, notamment la quasi-absence d'études d'effets des GBMs sur les communautés microbiennes où des organismes phototrophes sont associés à ces communautés. Cependant, dans les écosystèmes aquatiques, les biofilms reposent notamment sur l'activité photosynthétique de ce compartiment. La partie suivante vise donc à dresser un portrait des effets écotoxiques connus sur les micro-organismes photosynthétiques.

4. Effets connus du graphène et ses dérivés sur les microalgues

La littérature étudiant les effets des GBMs sur toutes sortes de microalgues est encore très limitée contrairement aux études sur les bactéries. Cependant, les microalgues jouent un rôle essentiel dans les écosystèmes en produisant de l'oxygène mais aussi en transformant le carbone inorganique en carbone organique, faisant des microalgues la base des chaînes trophiques (cf. chapitre 1 – 2.2.). Les études portant sur les effets des GBMs sur les microalgues sont répertoriées dans le tableau 2. Les 9 publications constituant ce corpus d'études représentent 16 combinaisons de modèles biologiques et de GBMs auxquels ils ont été exposés. Une première description de ce corpus d'études porte sur les différents types de GBMs testés. Le GO est dominant dans les tests (12/16) tandis que le FLG (2/16) et le rGO (2/16) ne représentent que très peu d'études. Ceci peut s'expliquer par l'utilisation plus importante du GO en termes d'applications industrielles, mais aussi par sa toxicité plus importante que les autres GBMs déjà connue sur les bactéries. Aucun composite et aucune co-contamination n'ont à ce jour été l'objet d'études sur les microalgues alors que l'on peut imaginer que ces formes d'expositions soient plus réalistes sur le plan environnemental. Le choix des modèles d'études est quant à lui variable, même si les algues vertes dominent (11/16) tandis que seulement deux études se focalisent sur des diatomées (*Nitzschia palea* et *Cycoltella sp.*). *Nitzschia palea* est la seule diatomée cultivée en condition benthique. Les concentrations utilisées au cours des études varient de 0,01 à 300 mg/L. Même si certaines concentrations semblent inenvisageables dans l'environnement (cf. chapitre 1 – 1.4.), ce large panel de concentrations permet d'obtenir des informations sur la réponse des microalgues à plusieurs types d'expositions.

Toutes les études menées s'accordent sur l'effet négatif des GBMs sur la croissance des micro algues (Du et al., 2016; Garacci et al., 2017; Hazeem et al., 2017; Hu et al., 2015; Malina et al., 2019; Nogueira et al., 2015; Z. Yan et al., 2022; Yin et al., 2020; Zhao et al., 2017). Seule une étude démontre l'effet bénéfique du GO sur l'algue *Picochlorum sp.* à 0,05 mg/L, avant d'observer des effets d'inhibition avec des doses plus élevées (1 à 5 mg/L). Le GO semble être le plus toxique des GBMs testés avec les EC_{50} les plus faibles, à savoir 37,3 mg/L pour *Chlorella pyrenoidosa* (Zhao et al., 2017) et 49,3 mg/L pour *Microcystis aeruginosa* (Z. Yan et al., 2022), tandis que l'EC_{50} du rGO varie de 34 mg/L pour *C.*

pyrenoidosa (Zhao et al., 2017) à 150 mg/L pour *Scenedesmus obliquus* (Du et al., 2016), et que la valeur de 62,2 mg/L a été répertoriée pour *C. pyrenoidosa* (Zhao et al., 2017).

Plusieurs mécanismes sont mis en avant par les auteurs. Le premier et plus courant est l'induction de stress oxydatif souvent lié à une production de ROS et une altérations de la membrane cellulaire des algues (Du et al., 2016; Hu et al., 2015; Nogueira et al., 2015; Z. Yan et al., 2022; Yin et al., 2020; Zhao et al., 2017). L'altération de la membrane peut avoir lieu de façon mécanique, où les GBMs agissent comme un rasoir, induisant des coupures ou perforations des membranes (Du et al., 2016; Garacci et al., 2017; Malina et al., 2019; Z. Yan et al., 2022). Cette activité « coupante » serait plus importante pour les GBMs moins oxydés, portant moins de groupement oxygènés à leur surface et des bords plus coupants (Malina et al., 2019). Un second mécanisme de toxicité des GBM reporté est celui d'effet d'ombrage, signifiant que les GBM diminuent l'accès à la lumière des microalgues, induisant une baisse de l'activité photosynthétique et des taux de pigments chlorophylliens (Du et al., 2016; Garacci et al., 2017; Hazeem et al., 2017; Malina et al., 2019; Nogueira et al., 2015; Z. Yan et al., 2022; Zhao et al., 2017). Zhao et ses collaborateurs mettent en évidence la différence d'effet d'ombrage entre différents matériaux aux degrés d'oxydations différents (degré d'oxydation du GO > rGO > graphène à multiple couches) : seul le GO induit cet effet. Ils expliquent que les matériaux les plus oxydés sont plus stables et dispersés dans la colonne d'eau, tandis que les matériaux moins oxydés ont plus tendances à s'agglomérer et interagir directement avec les algues (Zhao et al., 2017). Un dernier mécanisme induisant un effet négatif sur les microalgues, moins souvent mis en avant, est l'absorption de nutriments par les GBMs, agissant sur leur disponibilité pour les microalgues. Cela a été reporté pour les macro nutriments suivants : N, P, Mg et Ca (Zhao et al., 2017), ce qui serait selon les auteurs responsable de 53% de la toxicité totale du GO sur *Chlorella pyrenoidosa*. Ces mêmes éléments ont été absorbés par le GO dans deux autres études (Malina et al., 2019), accompagnés du Mn et du K (Z. Yan et al., 2022). Parmi les réponses observées des algues, la surproduction d'EPS a aussi été reportée (Malina et al., 2019), induisant un collage des GBMs et aboutissant à un rattrapage de la croissance dans certains cas (Garacci et al., 2017). D'autres mécanismes de réponse moins documentés et détaillés sont aussi évoqués tel que l'augmentation de la migration de *Chlamydomonas reihardtii* pour éviter l'effet d'ombrage (Yin et al., 2020) ou encore l'absorption de GO par le biais de lysosomes chez *Chlorella vulgaris* (Hu et al., 2015).

Dans l'ensemble, il a été démontré que les GBMs ont des effets négatifs sur les microalgues, avec des variations d'effets en fonction des taux d'oxydation de ces matériaux. Il semblerait aussi que les effets soient modulés en fonction de l'espèce exposée. Il est difficile de réellement comparer les études entre elles du fait qu'elles ne se basent pas sur les mêmes matériaux et méthodes d'exposition. Cependant, une étude s'est focalisée sur les différences d'effets du GO entre des algues vertes, des

cyanobactéries et des diatomées (Yin et al., 2020), et révèle des effets négatifs plus ou moins importants non entre les catégories d'algues mais entre les différentes espèces : une algue verte étant la plus résistante (*S. obliquus*), mais aussi une algue verte étant la plus impactée négativement (*C. reinhardtii*). Le manque de données dans la littérature ne permet pas de dresser un portrait d'espèces résistantes ou non, et encore moins d'identifier les facteurs qui pourraient les rendre plus ou moins résistantes. De plus, il y a un manque crucial d'information sur les diatomées et les microalgues aux formes de vie benthiques, alors même que la capacité des microalgues benthiques à produire des EPS a été identifié comme déterminante pour le comportement des GBM et donc leurs effets.

Tableau 2: Résumé des études évaluant la toxicité de GBMs sur les algues et organismes phototrophes unicellulaires. EC_{50}: concentration induisant 50% des effets observés.

Auteurs	Espèce	Catégorie	Exposition	GBM	Concentrations	Effets
(Du et al., 2016)	*Scenedesmus obliquus*	Algue verte	Pélagique	rGO	10 - 300 mg/L	Cytotoxique EC_{50} : 150 mg/L Baisse des taux de chlorophylle Dommages mécaniques Stress oxydatif
(Garacci et al., 2017)	*Nitzschia palea*	Diatomée	Benthique	FLG	0,1 - 50 mg/L	Inhibition de croissance à 50 mg/L Effet d'ombrage à 50 mg/L Collage des GBMs par les EPS Dommages mécaniques
(Nogueira et al., 2015)	*Raphidocelis subcapitata*	Algue verte	Pélagique	GO	10 - 100 mg/L	Inhibition de croissance Stress oxydatif Effet d'ombrage
(Zhao et al., 2017)	*Chlorella pyrenoidosa*	Algue verte	Pélagique	GO	50 g/L	EC_{50} : 37,3 mg/L Effet d'ombrage Stress oxydatif et dommages à la membrane externe Epuisement des nutriments
				rGO		EC_{50} : 34 mg/L Stress oxydatif et dommages à la membrane externe
				multi-layer graphene (MG)		EC_{50} : 62,2 mg/L Stress oxydatif et dommages à la membrane externe
(Yin et al., 2020)	*Chlorella vulgaris*	Algue verte	Pélagique	GO	1 – 10 mg/L	Inhibition de croissance Stress oxydatif Changements physiologiques
	Scenedesmus obliquus	Algue verte	Pélagique			
	Chlamydomonas reinhardtii	Algue verte	Pélagique			
	Microcystis aeruginosa	Cyanobactérie	Pélagique			
	Cyclotella sp.	Diatomée	Pélagique			
(Malina et al., 2019)	*Raphidocelis subcapitata*	Algue verte	Pélagique	GO	0,39 – 200 mg/L	Inhibition de croissance Effet d'ombrage Dommages mécaniques Production d'EPS Epuisement des nutriments
	Synechococcus elongatus	Cyanobactérie	Pélagique			
(Z. Yan et al., 2022)	*Microcystis aeruginosa*	Cyanobactérie	Pélagique	GO	0,1 – 50 mg/L	Inhibition croissance EC_{50} : 49,32 mg/L Stress oxydatif Baisse chlorophylle a Dommages mécaniques Epuisement des nutriments
(Hazeem et al., 2017)	*Picochlorum sp.*	Algue verte	Pélagique	GO	0,5 – 5 mg/L	0,5 mg/L : amélioration de la croissance et augmentation pigments chlorophylliens 1 à 5 mg/L : Inhibition croissance et baisse des pigments chlorophylliens
(Hu et al., 2015)	*Chlorella vulgaris*	Algue verte	Pélagique	GO	0,01 - 10	Inhibition de croissance Stress oxydatif Absorption par lysosome

La littérature met en évidence la capacité des GBMs à perturber les communautés microbiennes dans leur structure et leur fonctionnement dans un large panel de systèmes. Cependant, le manque de données sur les communautés benthiques d'eaux douces et les biofilms en général est notable, et d'autant plus sur les biofilms mixtes composées d'organismes hétérotrophes et phototrophes. Les prochains chapitres visent donc à combler ce manque. En premier lieu, les méthodologies adaptées à l'étude de l'effet des GBMs sur les biofilms mixtes nécessitent d'être déployées.

Chapitre 2
Matériels et méthodes

Afin de répondre aux différentes problématiques de cette thèse, plusieurs expérimentations ont été mises en place. Dans ce chapitre, seront détaillées les techniques qui ont été utilisées de manière récurrente au cours de la thèse et celles qui nécessitent une explication plus détaillée que les matériels et méthodes décrits dans les articles correspondants. Une mise au point sur les analyses en cytométrie en flux est aussi présentée dans ce chapitre. Les protocoles d'expériences ponctuelles seront détaillés dans le matériel et méthode de chaque chapitre correspondant.

1. Nanoparticules de graphène et caractéristiques

1.1. Caractéristiques des nanoparticules de graphène utilisées

Au cours de ces travaux de thèse, deux nanoparticules de graphène ont été utilisées : le graphène oxydé et le graphène oxydé réduit. Le GO provient du « Antolin Group » et a été préparé par exfoliation de nanofibres de carbone « Grupo Antolin Carbon Nanofiber » (Grupo Antolin, Burgos, Espagne) suivie d'une oxydation suivant la méthode d'Hummers (Hummers and Offeman, 1958). Le rGO a lui été obtenu à partir de ce même GO, par une réduction thermale à 200°C sous atmosphère d'hydrogène avec un flux de 5L/h. Ces étapes aboutissent à la production d'un matériel partiellement réduit. Cette réduction a été effectuée par les collaborateurs du Centre Inter-universitaire de Recherche et d'Ingénierie des Matériaux (CIRIMAT, CNRS UMR 5085) à Toulouse, tout comme la caractérisation physico-chimique des GO et rGO.

Tableau 1: Caractéristiques du GO et rGO utilisés. at% : % atomique ; HRTEM : microscopie électronique à transmission de haute résolution ; TEM : microscopie électronique à transmission ; BET : Brunauer, Emmett and Teller

	GO	**rGO**
Carbon content (at%)	68.62 %	83.01 %
Oxygen content (at%)	30.37 %	16.81 %
Csp^2 graphene (at%)	35.5 %	64.5 %
C-OH / C-O-C (at%)	24.7 %	7.8 %
C=O (at%)	2.5 %	5.8 %
O=C-O (at%)	5.3 %	1.3 %
Sat. (at%)	1.4 %	4.5 %
Number of layers (HRTEM)	1 – 5	1 – 5
Lateral size (TEM)	0.2 – 8 µm	0.2 – 8 µm
Surface area (BET)	152 m^2/g	155.7 m^2/g
I_D/I_G (RAMAN)	1,09 ± 0.06	1,26 ± 0.03

Comme indiqué dans le tableau 1, la réduction du GO en rGO a induit une perte d'environ 50% du contenu en groupements oxygénés, avec en particulier une perte importante des fonctions C-OH, C-O-C et O=C-O. Cette perte importante en fonctions oxygénées est un facteur important à prendre en compte et a une influence non négligeable sur le comportement du rGO en milieu aqueux tel que décrit dans le chapitre précédent (cf chapitre 1 – 1.4.) . Cependant, la réduction du GO n'a eu aucune influence sur la taille, le nombre de couches et la surface spécifique. La dernière caractéristique du GO et du rGO présentée dans le tableau 1 est le ratio des bandes D et G du spectre RAMAN. La bande G représente la configuration planaire sp^2 des liaisons entre atomes de carbone, tandis que la bande D représente les défaut et désordres dans le graphène (Thermo Fisher Scientific, 2019), principalement des défauts de bordure dus à la perte de liaison entre atomes de carbone (Bhatt et al., 2022). Généralement, le ratio des intensités de ces deux bandes : I_D/I_G est calculé. Dans notre cas, une augmentation de ce rapport est notable suite à la réduction du GO. Une augmentation de ce rapport est souvent liée à une augmentation de défauts, mais peut aussi être lié à la perte du contenu en fonctions oxygénés (Balaji Mohan et al., 2016; Minitha and Rajendrakumar, 2013; Wróblewska et al., 2017). L'augmentation de ces défauts peut avoir une influence importante sur les caractéristiques physico-chimiques, notamment sur la conductance du matériel. Finalement, l'observation faite au microscope électronique à balayage présenté en figure 1 permet de visualiser ces feuillets de GO et rGO, mais ne permet en aucun cas des les différencier.

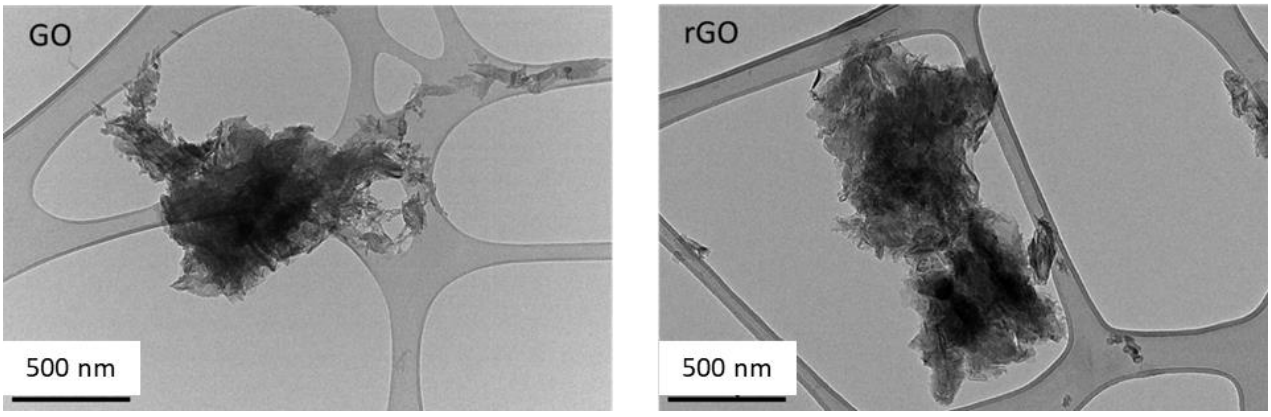

Figure 1: Images du GO et rGO utilisés obtenues au MEB (microscopie électronique à balayage).

Les différentes caractéristiques obtenues pour ces deux matériaux sont similaires, en termes d'ordre de grandeur, aux matériaux utilisés dans la littérature. Cependant il faut rester prudent quant à l'utilisation des GO et rGO utilisés dans d'autres études quant à leurs degrés d'oxydation. Par exemple le GO et rGO utilisés dans une étude évaluant leur toxicité sur plusieurs microalgues (Zhao et al., 2017). Le rGO utilisé contient 30,1 % d'oxygène, la même quantité que dans le GO utilisé dans les

expérimentations de ce manuscrit, et leur GO contient 55,2 % d'oxygène, soit presque deux fois plus que le GO utilisé dans ces travaux (30,37 %). Ceci met en évidence l'importance de la caractérisation des matériaux dans les études.

1.2. Choix des concentrations d'exposition

Au cours de tests écotoxicologiques, il est pertinent d'utiliser des concentrations similaires à celles potentiellement présentes dans l'environnement. Comme rapporté précédemment au cours du chapitre 1, les concentrations théoriques attendues dans les eaux de surfaces sont de 0,17 ng/L avec un niveau d'accumulation dans les sédiments de et 0,79 µg/kg/an. De plus, il est aussi intéressant d'utiliser des concentrations proches des études déjà réalisées afin de pouvoir comparer les résultats obtenus. Les concentrations utilisées varient de 0,01 à des 100^{aines} de mg/L, ce qui est bien au-delà des concentrations théoriques prédites. Il faut aussi prendre en compte que la plupart des effets reportés des GBMs ne sont observables généralement qu'au-dessus de 1 mg/L. En prenant en compte tous ces paramètres, les concentrations de 0,1 – 1 et 10 mg/L ont été choisies pour ces travaux de thèse. Bien que la plus petite concentration soit loin des concentrations prédites, elle peut tout de même se rapprocher d'un scénario de déversement accidentel, ou d'une remise en suspension et dispersion de sédiments ayant accumulés durant plusieurs années ces nanoparticules. Ce genre d'évènement peut survenir lors de fortes crues printanières. Les concentrations 1 et 10 mg/L ont aussi été choisies dans le but de rendre les effets des GBMs plus facilement observables, mais aussi de rendre nos résultats comparables à ceux de la littérature. Des concentrations plus élevées n'ont pas été utilisées car les analyses de croissance des différents organismes ont été analysés en La cytométrie en flux (chapitre 2 – 3.), technique largement utilisée au cours de ces travaux et présentée plus tard au cours de ce chapitre, et il a été mis en évidence l'impossibilité d'analyser correctement des échantillons comportant des concentrations au-delà de 10 mg/L de graphène. De plus, des concentrations plus élevées n'auraient aucune pertinence environnementale.

2. Culture et méthodes d'expositions

Afin d'assurer la stérilité des cultures au cours de chacune des expériences, toutes les manipulations de culture de diatomées, d'algues vertes et du consortium bactérien ont été effectuées sous hotte à flux laminaire.

2.1. Provenance du matériel biologique et pré culture

2.1.1. Diatomée *Nitzschia palea*

La diatomée *Nitzschia palea* utilisée durant la thèse est la souche axénique CPCC 60 provenant du centre de culture physiologique canadien de l'Université de Waterloo. Elles ont été ensemencées dans des flasques stériles Falcon 35501 dans du milieu CHU modifié, intitulé « SPE » (composition en annexe 1), comportant tous les macro et microéléments nutritifs nécessaires au bon fonctionnement et à la croissance des diatomées. Les flasques ont été placées dans un phytotron thermorégulé à 20 ± 2°C sous une lumière LED délivrant 50 µmol/m^{-2}.s^{-1} de photons avec un cycle jour/nuit de 14/10h. Afin de mimer un écoulement d'eau semblable à une rivière et afin de favoriser la croissance en biofilm des diatomées au fond des flasques, les cultures ont été placées en agitation douce et permanente à 40 rpm. Pour maximiser la surface de croissance du biofilm, il est préconisé d'utiliser ces flasques couchées. Cependant, l'agitation provoquait une imbibition par le milieu de culture des bouchons des flasques pouvant à terme entrainer des contaminations. Pour éviter cela, les flasques ont été utilisées debout comme sur l'image ci-contre (figure 2). Afin d'éviter l'épuisement du milieu, celui-ci était renouvelé tous les 3 jours. Lorsque le fond des flasques était entièrement colonisé et que le biofilm représentait une biomasse suffisante (au bout d'environ 2 semaines), les flasques ont alors été grattées à l'aide d'un grattoir spécifique, les cellules resuspendues dans du milieu SPE et utilisées pour ensemencer plusieurs autres flasques. La culture et le repiquage consécutif d'une même population de diatomées aboutit à la réduction de taille des cellules et le vieillissement de la culture. Afin d'éviter cela, les flasques n'ont été repiquées que 3 fois de façon consécutive.

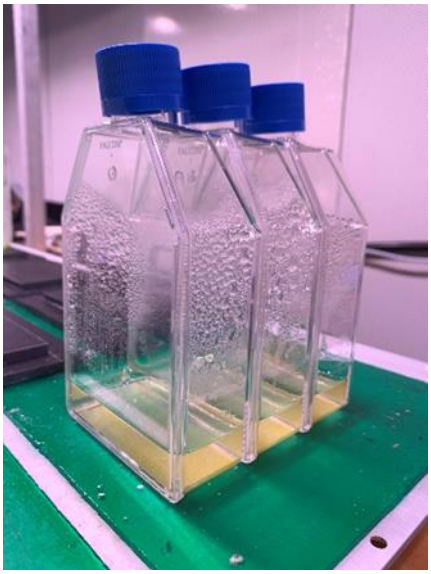

Figure 2: Image de flasques Falcon placées au phytotron et contenant chacune un biofilm de Nitzschia palea

La condition d'axénie de la culture est essentielle. Afin de s'assurer de l'absence de contamination, les cultures ont été régulièrement analysées en cytométrie en flux pour rechercher la présence de bactéries (voir partie sur La cytométrie en flux).

2.1.2. Algue verte Raphidocelis subcapitata

L'algue verte *Raphidocelis subcapitata* a également été utilisée au cours d'une expérience afin de comparer sa réponse avec celle de *Nitzschia palea*. Elle provient aussi du centre de culture physiologique canadien de l'Université de Waterloo. La souche a été ensemencée dans 100 mL dans

des Erlenmeyers en verre de 250 mL préalablement stérilisés. Le milieu de culture utilisé est une eau Volvic commerciale enrichie en éléments essentiels à la croissance d'algues vertes (annexe 2). Les flasques ont été placées dans le même phytotron que les diatomées, avec le même éclairage et cycle jour/nuit. De plus, les algues ont été placées sous agitation à 100 rpm pour éviter leur sédimentation et favoriser leur croissance dans la colonne d'eau. Au bout d'environ dix jours, sans changement de milieux, la culture était soit utilisée pour des expériences, soit repiquée en transférant 2 mL de cette culture dans 100 mL de milieu frais.

2.1.3. Consortium bactérien

Le consortium bactérien provient de filtres du Musée-aquarium de Nancy et a été conservé dans 50% de glycérol conservé à -80°C. Du fait de la très forte concentration du consortium, la pré culture de celui-ci n'a pas été nécessaire. Avant son utilisation pour les expériences, le glycérol a été éliminé par centrifugation, et le consortium a été inoculé dans 100 mL de milieu SPE 24h avant son utilisation pour assurer sa revivification.

2.2. Méthodes d'exposition aux GBMs

2.2.1. Exposition de *Nitzschia palea* en plaques

La grande majorité des expositions de la diatomée *Nitzschia palea*, dont les résultats se trouvent dans le chapitre 4, ont été réalisées dans des plaques de culture cellulaire stériles 6 puits de 9,6 cm^2. Pour chaque puits, 250 000 cellules de diatomées sont inoculées (environ 26 000 cellules/cm^2) 48h avant l'exposition dans 2mL de milieu SPE. Cette inoculation avant exposition permet une bonne sédimentation et installation du biofilm au fond des puits. Pour chaque expérimentation, 3 répliquats par condition sont inoculés. Il est nécessaire de prévoir 3 puits par condition et par jour de prélèvement. En effet, chaque prélèvement est destructif car il est nécessaire de gratter les cellules adhérentes pour les re suspendre. Les temps de prélèvements ont été les suivants : 0h, 24h, 48h, 96h et 144h. Par exemple, une exposition avec 3 concentrations de GO et 3 concentrations de rGO avec les différents points de prélèvement indiqués précédemment nécessite la préparation de 87 puits. Le jour de l'exposition, les solutions mères de GBMs fournies par le CIRIMAT sont agitées et soniquées dans un bain à ultrasons durant 10 minutes avant d'être diluées dans du milieu SPE. Ces solutions « filles » sont à nouveau soniquées pendant 1 minute avant d'être introduites dans les puits. Chaque puits est ensuite ajusté à un volume final de 3 mL avec du milieu SPE. Au cours de l'exposition, les plaques de cultures sont toutes placées dans les mêmes conditions de culture décrites précédemment. Afin de dénombrer et analyser les cellules dans les différents puits, pour chaque point de prélèvement, les cellules adhérentes sont grattées et resuspendues dans le milieu, puis reprises dans 200 µL et déposées

dans des plaques 96 puits pour l'analyse en La cytométrie en flux. Le déroulement de ces expositions et des prélèvements est représenté en figure 3.

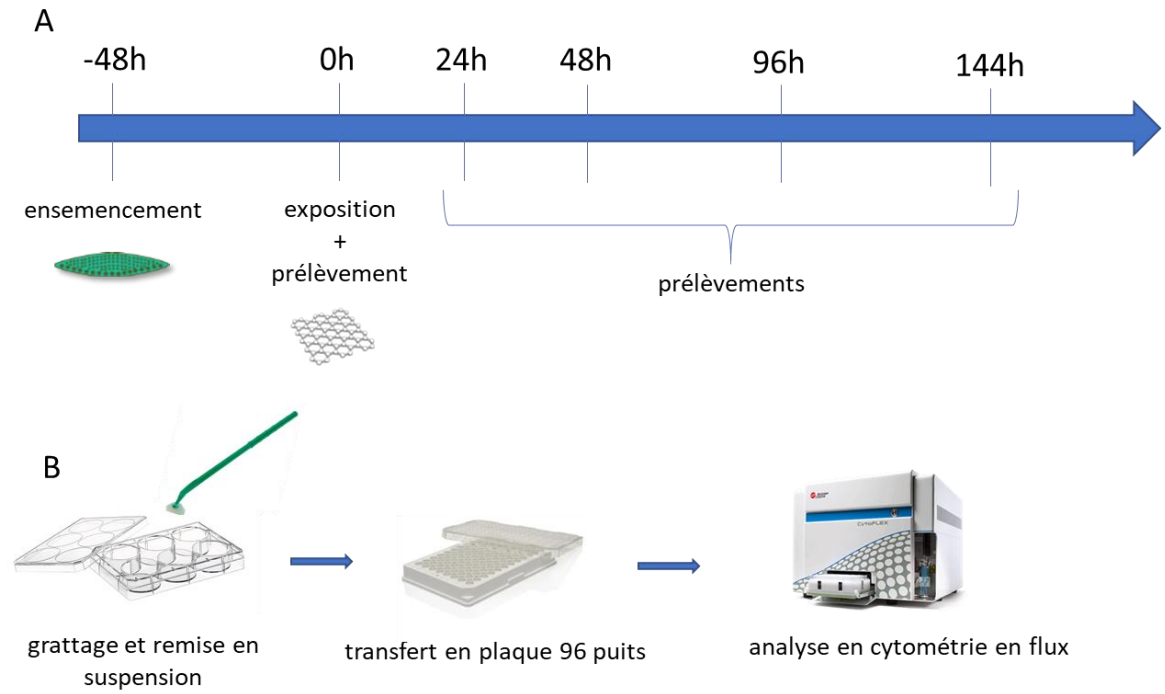

Figure 3: Déroulé expérimental d'une exposition de Nitzschia palea en plaques 6 puits. A) Chronologie de l'ensemencement, expositions et des prélèvements. B) Procédés de prélèvement : les biofilms sont grattés à l'aide d'un râteau et remis en suspension dans le milieu, 200µL de cette suspension par puits est transféré dans des plaques 96 puits pour analyse en cytométrie en flux

2.2.2. Variations de l'exposition de *Nitzschia palea*

Au cours de la thèse, afin de répondre à plusieurs questionnements scientifiques, l'exposition de la diatomée *Nitzschia palea* a légèrement été modifiée en fonction des questions traitées. Ces adaptations sont présentées dans le tableau 2 ci-dessous.

Tableau 2 : Adaptations du protocole d'exposition de Nitzschia palea en fonction du questionnement scientifique

Analyse complémentaire	Questionnement scientifique	Adaptations	Chapitre
Ombrage	Déterminer la part d'ombrage induite par les nanoparticules	Deux plaques 6 puits sont superposées. Celle du bas contient le biofilm de diatomée, celle du haut contient le GO dans un volume de 3 mL. Les deux plaques sont placées dans une boite noire laissant la lumière uniquement traverser par le haut de la plaque supérieure	4

		(Garacci et al., 2017; Verneuil et al., 2015b).	
Hétérotrophie	Déterminer si l'activité hétérotrophique de *Nitzschia palea* est influencée par la présence de GO	Pré-culture en conditions de référence puis exposition à l'obscurité à partir du t0 et prélèvements à différents temps.	4
Imagerie MEB	Obtenir des images du biofilm de diatomée	Introduction de deux lames circulaires (diamètre 14 mm) en verre au fond des puits	4
Analyse RAMAN	Caractériser le GO après une exposition avec *Nitzschia palea*	Exposition dans 50 mL en flasques Falcon 35501 de 100mL couchées. Respect du ratio surface/nbre de cellule. Après 144 h d'exposition, les flasques sont vidées, 10 mL de milieu frais est rajouté et le biofilm gratté et repris dans ces 10 mL avant de préparer les échantillons	4

2.2.3. Exposition du biofilm mixte diatomées/consortium bactérien

L'exposition du biofilm mixte a été menée en flasques Falcon 33501 et son déroulement est représenté en figure 4. L'introduction de la diatomée et des bactéries s'est faite de la façon suivante : la diatomée *Nitzschia palea* a été introduite à la concentration de 5 x 10^4 cellules par mL dans 50 mL de milieu SPE, 48h avant l'exposition. Après 24h de croissance des diatomées (24h avant exposition), la concentration avait atteint 9 x 10^4 cellules par mL. Les flasques ont été alors ensemencées avec le consortium bactérien à la concentration de 3 x 10^4 cellules par mL, entrainant un ratio de 3 cellules de diatomée pour une bactérie. Après 24h, soit au t0 de l'exposition aux nanoparticules, les flasques ont ensuite été contaminées avec différentes concentrations de GO et rGO dans 50mL de SPE pour atteindre des concentrations finales de 0,1 mg/L, 1 mg/L et 10 mg/L et 50mL de milieu SPE non contaminé pour les flasques contrôles, pour un volume final de 100 mL par flasque. Les expositions ont été réalisées en phytotron dans les mêmes conditions que décrites précédemment (cf. chapitre 2 - 2.1.1.). Le biofilm a été échantillonné après 48h et 144h d'exposition. A ces temps, les cellules ont été grattées et re-suspendues dans du milieu SPE. Les premiers 50 mL ont été utilisés pour l'analyse en cytométrie de flux afin de quantifier le nombre de cellules et analyser les profils physiologiques. Les

50 mL restants ont été filtrés à 0,45 µm afin de récolter toute la communauté microbienne. Les filtres ont été conservés dans des tubes stériles à -80°C pour déterminer la composition de la communauté par métabarcoding (cf chapitre 3 – 2.5.).

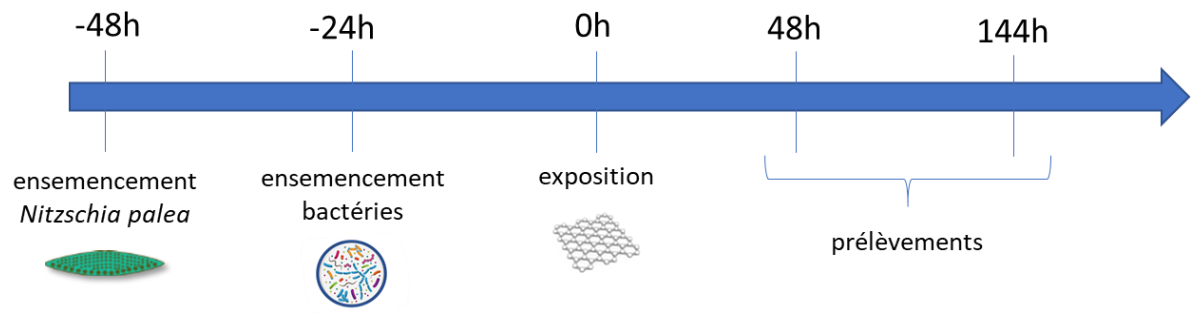

Figure 4 : Déroulement de l'exposition du biofilm dans les flasques Falcon 33501

3. La cytométrie en flux

3.1. Dénombrement cellulaire

La cytométrie en flux permet d'effectuer des analyses multiparamétriques quantitatives et qualitatives à haut débit des cellules. Cette technique a été utilisée tout au long de la thèse afin de dénombrer des cellules et déterminer des paramètres physiologiques. Chaque analyse a pu être effectuée à partir de suspensions de 200 µL disposées dans des plaques 96 puits. Le cytomètre utilisé est un CytoFLEX© V0-B3-R2 (Beckman Coulter) accompagné du logiciel CYTExpert. Le cytomètre est équipé de deux laser d'excitation à 488 et 638 nm et de détecteurs qui permettent de lire les signaux suivants en sortie (figure 5) :

- Le FSC (forward scatter) ou diffraction petit angle : faisceau lumineux qui traverse chaque événement (c'est-à-dire chaque particule) et qui renseigne la taille des évènements.
- Le SSC (side scatter) ou diffraction grand angle : faisceau lumineux qui est dévié par les évènements, et qui donne des informations sur la complexité ou granularité des évènements (plus l'élément est complexe, c'est-à-dire non-sphérique, plus le faisceau est dévié).
- L'intensité de fluorescence naturelle ou de fluorochromes : le signal diffracté peut être par la suite filtré pour récolter des informations sur l'intensité d'émission d'une longueur d'onde précise. Le cytomètre est équipé d'un ensemble de filtres interchangeables. Ceux utilisés dans nos études correspondent aux longueurs d'onde de 525 ± 40 nm (nommé « FITC ») et 660 ± 10 nm (nommé « APC ») mais aussi un à 610 ± 10 nm (nommé « IP »), un canal à 690 ± 50 nm (nommé « PC5.5 »).

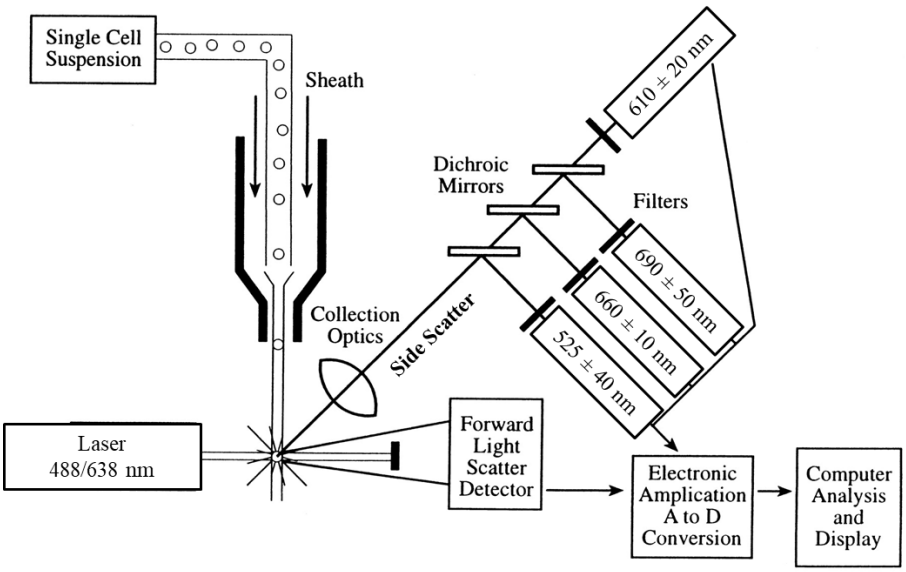

Figure 5: Représentation schématique de la cytométrie en flux adapté de (Gupta et al., 2016). La suspension cellulaire s'écoule dans un entonnoir permettant une analyse individuelle des cellules. Le laser à 488 ou 638 nm traverse chacune des cellules. Le SSC, qui peut être filtré à différentes longueurs d'onde, et le FSC sont ensuite analysés.

Il a été possible de travailler sur deux types cellulaires bien distincts : les bactéries et les micro algues. Ces deux types cellulaires se différencient principalement d'un point de vue analytique par leur taille et leur complexité. Afin de les observer, des paramètres propres à la machine sont à régler en fonction du type de cellules à observer (tableau 3).

Tableau 3: Paramètres constructeurs de la cytométrie en flux en fonction du type cellulaire à analyser. Mis à part la vitesse de lecture, ces paramètres n'ont pas d'unité de mesure.

	Paramétrage (bactéries)	**Paramétrage (microalgues)**
Canal FSC	165	10
Canal SSC	400	10
Canal FITC	240	1
Canal IP	350	300
Canal PC5.5	415	415
Canal APC	680	680
Vitesse de lecture	10 µL/min	60 µL/min

La vitesse de lecture des échantillons doit également être réglée. Pour des concentrations cellulaires très élevées, le taux de « abort » (% de cellules non lues par le cytomètre) peut rapidement augmenter. Afin de minimiser ce taux, il faut réduire la vitesse de flux, et dans des cas de très fortes concentrations (souvent avec les bactéries), de diluer ses échantillons au préalable. Pour la lecture de

bactéries et de microalgues, les vitesses sélectionnées pour une lecture optimale sont les suivantes : 10 µL/min et 60 µL/min respectivement.

L'analyse en cytométrie en flux nécessite que chaque cellule soit analysée seule. Cependant il se peut que deux ou plusieurs cellules soient lues en même temps, formant alors un doublet de lecture. Un doublet de lecture donnerait un évènement 2 fois plus grand qu'une cellule seule. Afin de les éviter dans notre analyse, il est important de les éliminer en déterminant une population qui suit une proportionnalité entre le hauteur et l'aire du pic du canal du FSC, et de travailler par la suite sur cette population (figure 6A).

Il est possible d'affiner à nouveau l'analyse en optimisant la sélection d'une population d'intérêt. En affichant un nuage de points représentant des données collectées dans le canal FSC contre le SSC, on peut sélectionner une population de taille et de complexité homogène (figure 6B). Cette analyse se doit de rester constante au cours des analyses pour minimiser un biais entre les différentes analyses.

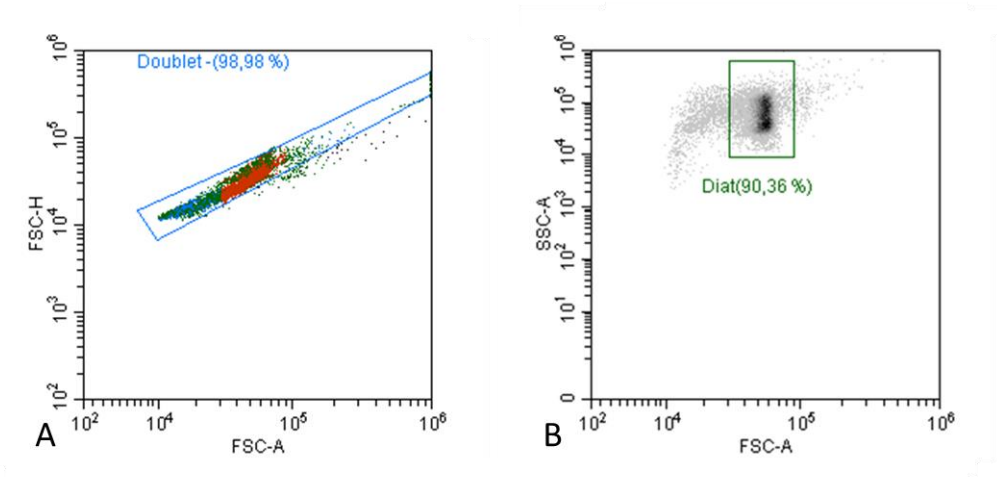

Figure 6: Discrimination des doublets de lecture (A) et sélection d'une population homogène (B) en cytométrie en flux. Le rectangle bleu représente la ligne de proportionnalité entre le FSC-H et le FSC-A et comprend 98,98% de tous les évènements analysés. Parmi tous ces éléments, on sélectionne une population de taille et complexité homogène (carré vert), qui dans ce cas représente 90,36% des 98,98% évènements

Le dénombrement des diatomées par cette technique nécessite par la suite de s'appuyer sur la fluorescence naturelle de la chlorophylle (détaillée au paragraphe 3.2) et ne nécessite aucun marquage à l'aide de fluorochrome des cellules. L'analyse et le dénombrement des bactéries est plus complexe et nécessite une étape supplémentaire. En effet, dans une suspension cellulaire, beaucoup d'éléments possèdent une taille et complexité similaire à des bactéries (exemple : des débris cellulaires). Afin de dissocier les bactéries des autres éléments, il est nécessaire d'utiliser un marqueur fluorescent nommé SYTO™ 9. Son utilisation est décrite dans la section suivante.

3.2. Marqueurs fluorescents et paramètres physiologiques

- Marquage des bactéries

Afin de dissocier les bactéries de débris présents dans la suspension cellulaire, il est possible d'utiliser le marqueur SYTO™ 9. Ce fluorochrome possède une grande affinité avec l'ADN de tout type de cellules. Avant analyse, les cellules sont incubées 15 min avec 5 µM de SYTO™ 9 (Vanhauteghem et al., 2019). Son excitation optimale est à 483 nm et son pic d'émission de fluorescence est à 503 nm, ce qui le rend observable avec un filtre à 525 ± 40 nm (FITC). L'analyse se fait de la façon suivante : il est nécessaire de déterminer un seuil de fluorescence naturelle sur une population non marquée et par la suite, tous les évènements d'une population marquée dépassant ce seuil de fluorescence sont considérés comme des bactéries (figure 7).

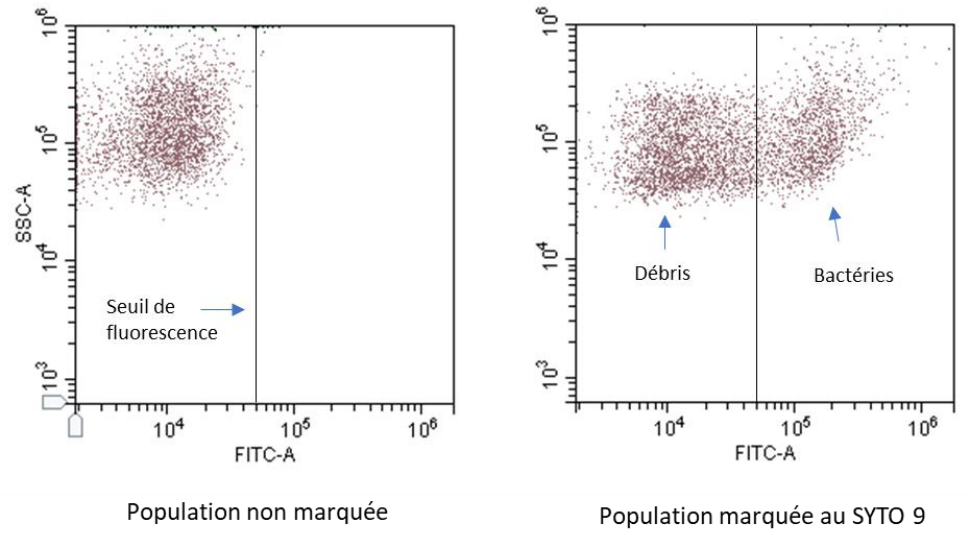

Figure 7: Différenciation des bactéries des débris et éléments à l'aide du marqueur SYTO9. Dans le panel de gauche, on pose un seuil de fluorescence à 525 nm (filtre FITC) sur une population non marquée. Dans le panel de droite, on comptabilise les évènements dépassant le seuil de fluorescence comme des bactéries.

La cytométrie en flux permet aussi d'obtenir des informations sur les paramètres physiologiques des microalgues :

- Taux de chlorophylle

La chlorophylle est une molécule naturellement fluorescente qui peut être détectée au cytomètre. Le laser d'excitation du cytomètre à 488 nm permet d'être relativement proche de la longueur d'onde optimale d'excitation de la chlorophylle (430 nm), et le filtre à 660 nm (APC) permet une lecture relativement proche du spectre optimal d'émission de fluorescence des pigments chlorophylliens (figure 8).

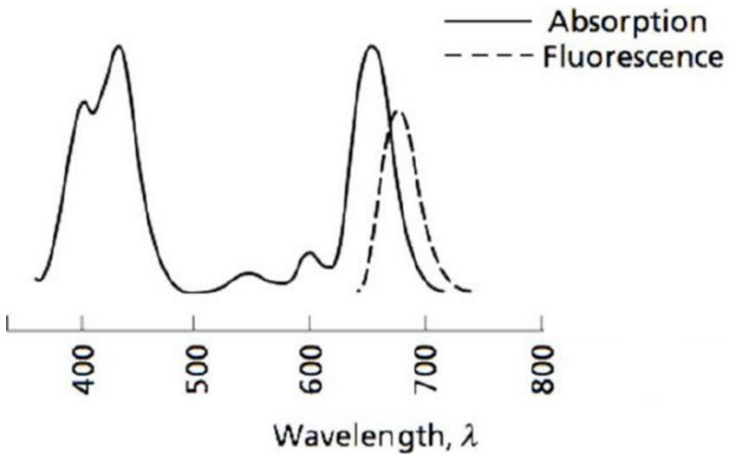

Figure 8: Spectre d'absorbance et de fluorescence de la chlorophylle d'après (Fernandez-Jaramillo et al., 2012).

- Perméabilité membranaire

La perméabilité membranaire peut être déterminée en utilisant le marqueur SYTOX® Green, qui est un marqueur d'acides nucléiques. Les cellules vivantes y sont imperméables, tandis que les cellules ayant une membrane détériorée vont laisser diffuser le marqueur vers le milieu intracellulaire qui devient fluorescent après liaison aux acides nucléiques. Il est utilisé à 0,5 µM avec un temps d'incubation de 15 min (Armbrecht et al., 2014), généralement pour un comptage au microscope, mais cette utilisation est aussi adaptée à l'analyse en cytométrie en flux. Sa longueur d'onde optimale d'excitation est 504 nm, mais il peut aussi être excité à 488 nm, et sa fluorescence émise optimale est de 523 nm (Site officiel Thermo Fisher) (figure 9). La fluorescence réémise peut donc être lue à travers le filtre à 525 nm. En plaçant un seuil de fluorescence sur une population non marquée, il est possible de déterminer par la suite dans une population marquée le nombre de cellules sénescentes : celles qui dépassent le seuil de fluorescence naturelle à 525 nm (FITC) (figure 10).

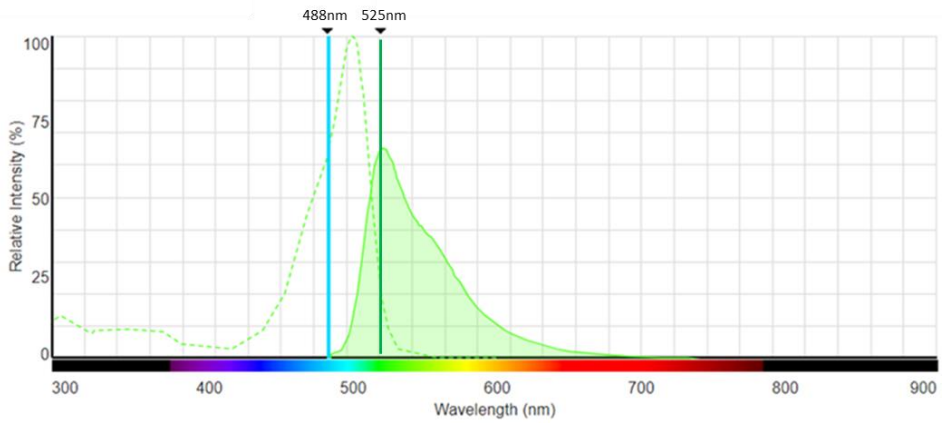

Figure 9 : Spectre d'absorption (pointillés) et fluorescence (plein) du marqueur SYTOX Green d'après https://www.thermofisher.com/. Le laser utilisé à 488 nm représenté en bleu permet une excitation optimale et le filtre à 525 nm représenté en vert permet une lecture optimale.

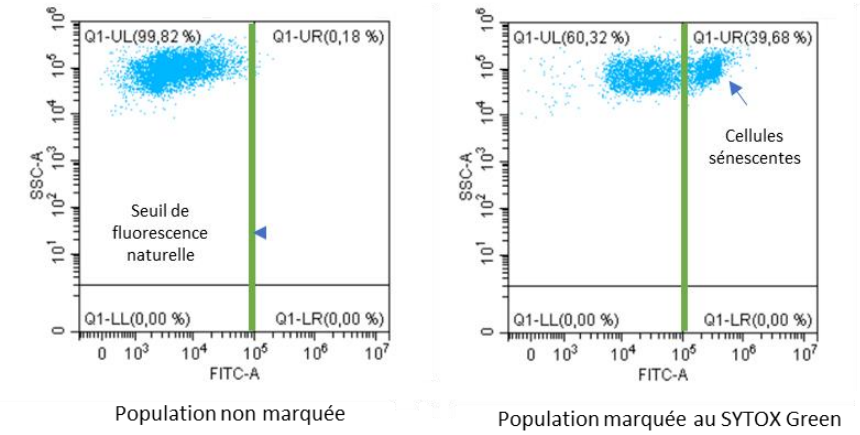

Figure 10: Différentiation de cellules vivantes et sénescentes à l'aide du marqueur SYTOX Green. Dans le panel de gauche, on pose un seuil de fluorescence sur une population non marquée. Dans le panel de gauche où est représenté une population marquée, les cellules dépassant le seuil de fluorescence sont considérées comme sénescentes.

- Taux de lipides neutres

Les taux de lipides neutres relatifs peuvent être déterminés à l'aide du marqueur Bodipy™ 493/503. Le bore-dipyrométhene est un marqueur non sensible à la polarité et marque les lipides neutres. Il est caractérisé par une longueur d'onde d'excitation optimale de 493 nm et une émission maximale à 503 nm (Site Officiel Thermo Fisher), ce qui le rend aussi observable à 525 nm (filtre FITC). Le marquage des cellules se fait à une concentration finale de 1 µg/mL pendant une minute d'incubation (Lynch et al., 2015). Il est possible par la suite de comparer le taux de lipides neutres relatif en comparant l'intensité de fluorescence moyenne à 525 nm entre deux populations marquées.

3.3. Interférence des GBMs avec la cytométrie en flux

Les GBMs sont des éléments pouvant s'agglomérer dans une solution aqueuse, mais aussi avec les cellules. Ces agglomérats pourraient avoir des conséquences sur l'analyse d'échantillons en cytométrie de flux, en étant comptabilisé comme une cellule ou encore en obstruant la fluorescence de celle-ci. Dans cette partie, les possibles interférences des GBMs en cytométrie en flux seront mis en évidence et une gamme de concentration de GBMs garantissant l'absence d'interférences sera déterminée.

Protocole expérimental :

Plusieurs échantillons, à partir d'une même culture cellulaire de *Nitzschia palea*, ont été préparés (figure 11). Les diatomées seules (10^6/3mL), du GO seul à deux différentes concentration (10 et 50 mg/L), deux mélanges de diatomées (10^6/3mL) et GO, l'un à 10 et l'autre à 50 mg/L, et finalement un échantillon de résidus cellulaire obtenus par sonication d'une culture cellulaire (10^6/3mL) pendant 30 min, et deux autres échantillons de ces résidus cellulaires avec 10 ou 50 mg/L de GO. Chacun de ces échantillons a été analysé par la suite en cytométrie en flux avec le laser d'excitation à 488nm.

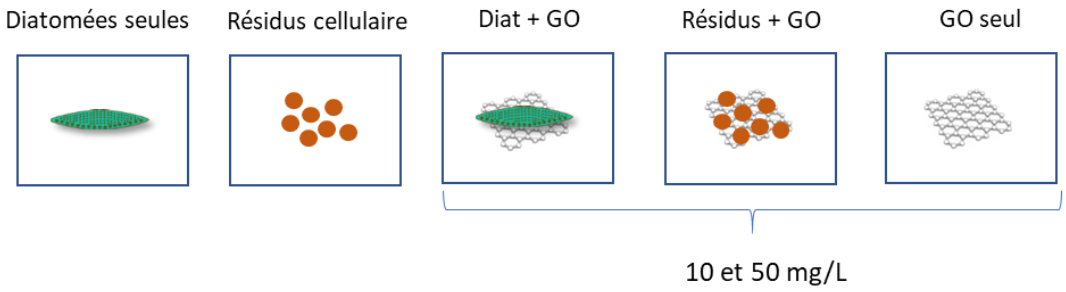

Figure 11: Représentation schématique des 8 différents échantillons analysés en cytométrie en flux afin de comparer leur analyse seule et puis couplé à deux concentrations de GO (10 et 50 mg/L).

Résultats et discussion :

Dans un premier temps, il est présenté en figure 12 une analyse très simple FSC/SSC (complexité/taille) de chacun des échantillons sans combinaison. Il est tout d'abord observable qu'une population de diatomées seule est relativement homogène, mais possède tout de même une trainée d'évènements avec une complexité et taille plus petite et plus grande (figure 12A). L'analyse des résidus cellulaires a permis de confirmer que la trainée d'évènement plus petits correspondait en majeure partie à des résidus cellulaires (figure 12B). C'est pour cela que l'analyse normale de diatomée ne se focalise pas uniquement sur ces paramètres, mais aussi sur le paramètre de fluorescence de la chlorophylle, qui sera présenté juste après. Etonnamment, le GO à 10 (figure 12C) et 50 mg/L (non montré) peut être observé dans la même fenêtre que les diatomées, avec une taille et complexité similaires. Cela peut paraître étonnant sachant qu'une diatomée mesure 10 µm et ces feuillets de graphène ne mesurent pas plus de 8 nm. Cependant, pendant l'analyse, les diatomées s'alignent souvent en longueur dans le flux et le laser traverse la diatomée en largeur, qui est d'environ 3-4 µm. Ce qui est observé serait donc des agrégats de GO qui atteignent une taille similaire à celle de la diatomée.

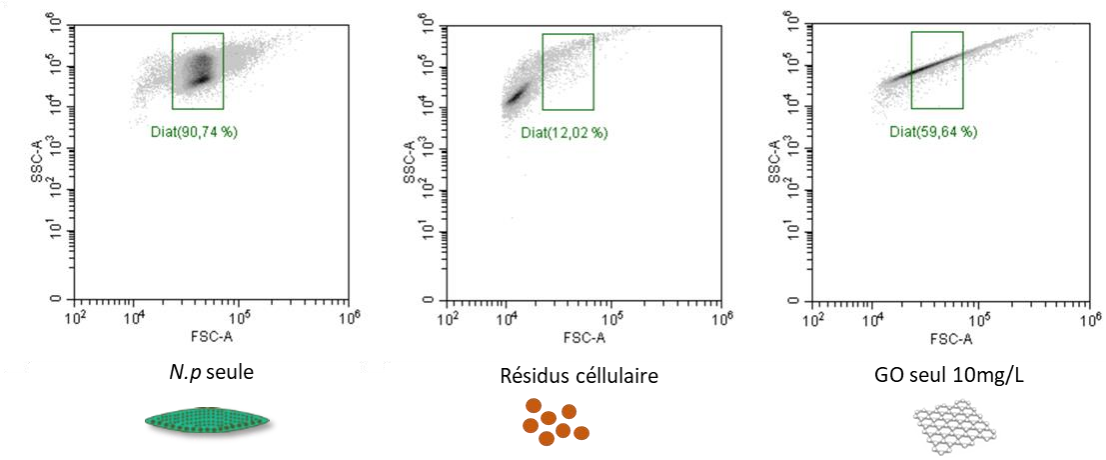

Figure 12: Analyse SSC/FSC (complexité/taille) de Nitzschia palea (A), de résidus cellulaires (B) de Nitzschia palea et du GO à 10 mg/L (C). Le carré vert correspond à la population homogène de base de diatomée.

En tenant compte des analyses du SSC et FSC, le GO apparaît dans la même fenêtre que les diatomées. Effectivement, comme on peut l'apercevoir dans la figure 13, l'ajout de GO à 50 mg/L influe sur la qualité de la population analysée, mais il réduit aussi drastiquement, presque de moitié, le nombre de diatomées comptabilisées dans la fenêtre déterminée au préalable (tableau 4). Avec 10 mg/L, le dénombrement n'est pas influencé : le ratio de « diatomées » parmi tous les évènements enregistrés par le cytomètre baisse très légèrement mais n'est pas significativement différent (ANOVA p-value > 0,05).

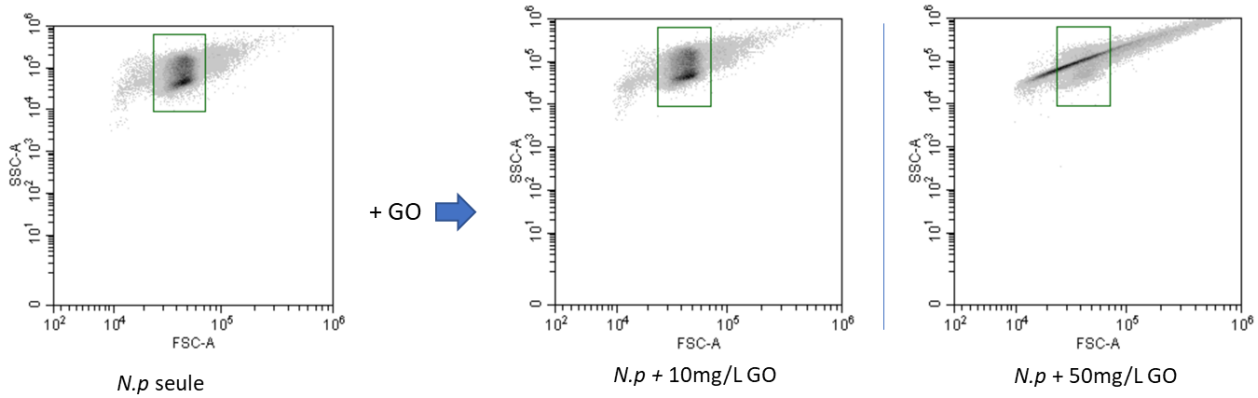

Figure 13: Analyse FSC/SSC (complexité/taille) de Nitzschia palea seule (gauche) puis en présence de 10mg/L de GO (milieu) et de 50 mg/L de GO (droite). Le carré vert correspond à la population homogène de base de diatomées

*Tableau 4 : Nombre d'évènements compris dans l'analyse de base de diatomée (carré vert de la figure 13) parmi tous les évènements analysés en cytométrie en flux. *correspond à une différence significative (ANOVA p-value < 0,05).*

	Tous les évènements	**Evènements « diatomées »**	**% (diat/tous)**
Diatomées seules	42312 ± 4421	37316 ± 3692	88,3 ± 1,1
Diatomées + 10 mg/L GO	38811 ± 3310	32858 ± 2550	84,77 ± 1,3
Diatomées + 50 mg/L GO	43783 ± 1579	23505 ± 1800 *	53,5 ± 3,9 *

Dans un second temps, une analyse adaptée aux diatomées a été effectuée pour les différencier du GO. En effet, les diatomées fluorescent naturellement grâce à diverses macromolécules telles que les chlorophylles. Le filtre à 610 nm (APC) est donc utilisé pour analyser ces données. Dans un premier temps, le taux de fluorescence de tous les échantillons « seuls » est présenté dans la figure 14A. Comme attendu, l'intensité de fluorescence des diatomées est bien plus importante que

celle du GO et des résidus cellulaires, ce qui permettrait à premier abord de séparer les cellules de *Nitzschia palea* avec le GO et les résidus.

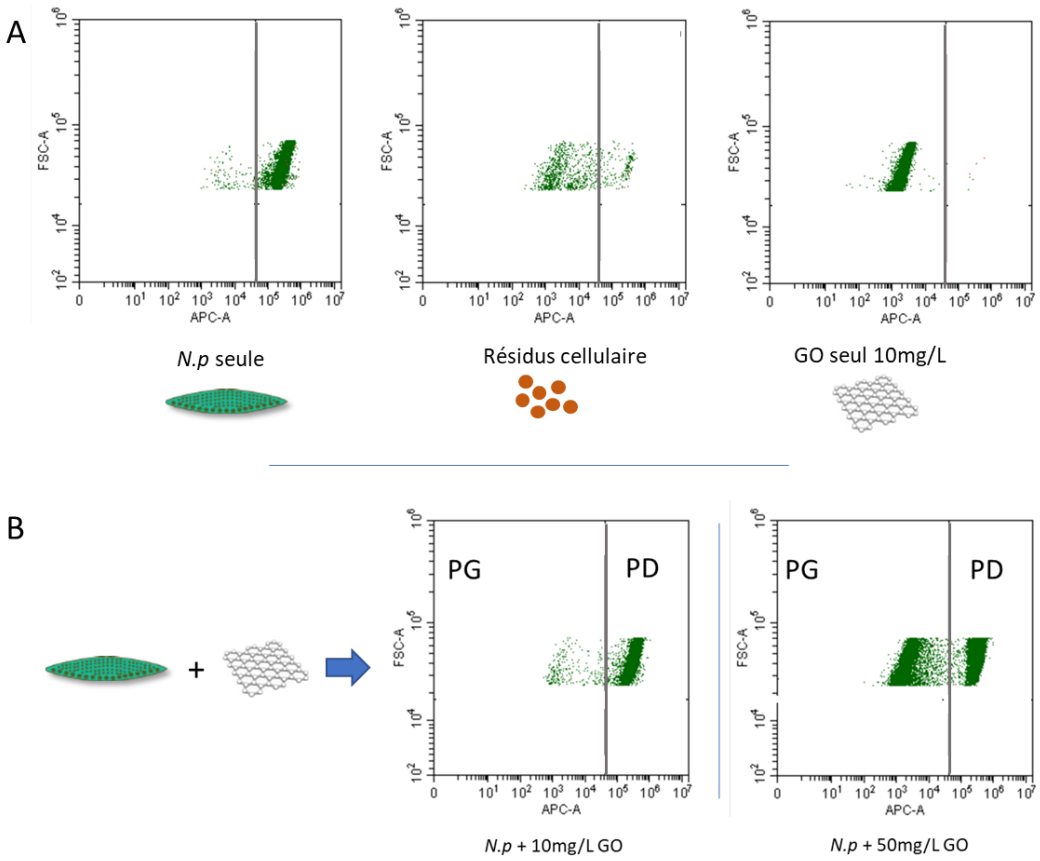

Figure 14 : Analyse en cyrtométrie en flux en fonction de la fluorescence à 610nm (filtre APC). A) Fluorescence naturelle de Nitzschia palea seule, des résidus cellulaires et du GO à 10 mg/L. Cette première analyse permet de poser un seuil de florescence naturelle (trait noir) et de séparer en deux panel (PG : panel gauche ; PD : panel droit) la diatomée des autres éléments. B) Fluorescence naturelle après l'ajout de 10 et 50mg/L de GO à Nitzschia palea

Cette première analyse des échantillons seuls permet de poser un seuil de fluorescence permettant de retirer 83,3% des évènements liés aux résidus et 99% de ceux liés au GO. Ce seuil définit le panneau de gauche (PG), qui contient le GO et la majorité des résidus quand les échantillons sont seuls, et le panneau de droite (PD) qui contient les diatomées. En ajoutant le GO aux diatomées, à hauteur de 10 mg/L, l'analyse n'est pas obstruée par la présence de GO et le dénombrement de diatomées est le même que sans le GO (ANOVA p-value > 0,05). Cependant, avec 50 mg/L, la quantité d'évènements dans le panneau de gauche est grandement augmentée et les évènements de droite grandement diminués (ANOVA p-value < 0,05) (figure 14B, tableau 5). Il y a donc une baisse d'intensité de la fluorescence des diatomées, appelée « quenching », induite par la présence de 50 mg/L de GO. Ce phénomène proviendrait du GO qui pourrait englober les cellules de *Nitzschia palea* et faire barrière à la fluorescence émise par les cellules. Le cytomètre ne perçoit donc plus la même intensité de

fluorescence pour les diatomées à 610 nm et il devient impossible de dissocier les cellules du GO dans ce panel de gauche.

*Tableau 5 : Nombre d'évènement compris dans le panel de gauche (normalement comptabilisé résidus et GO) et le panel de droite (normalement comptabilisé Nitzschia palea) scindé par le seuil de fluorescence à 610 nm dans la figure 14. *correspond à une différence significative (ANOVA p-value < 0,05).*

	Evènements PG (%)	**Evènements PD (%)**
Diatomées seules	970,3 ± 79,4 (2,3 ± 0,5)	41341,7 ± 4393 (97,7 ± 0,5)
Diatomées + GO 10mg/L	1173 ± 48 (3,1 ± 0,6)	37638 ± 3328,7 (96,9 ± 0,6)
Diatomées + GO 50mg/L	21963 ± 857,2 (50,1 ± 0,5) *	21819 ± 737,1 (49,9 ± 0,5) *

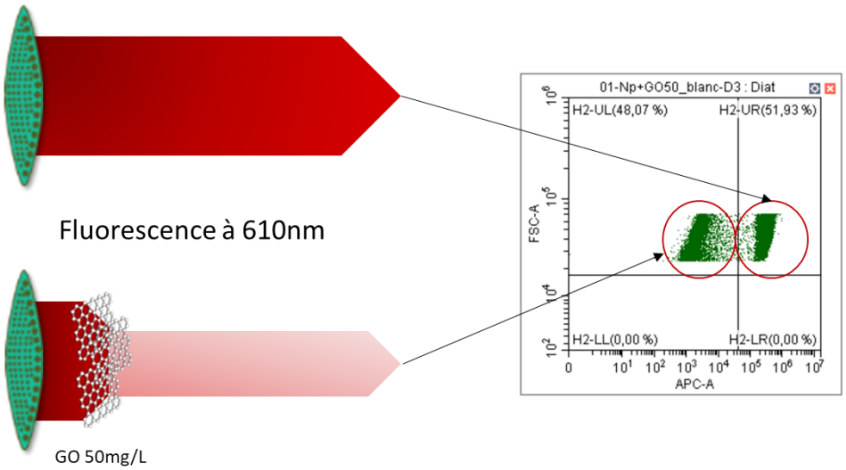

Figure 15: Phénomène de « quenching » de la fluorescence de Nitzschia palea à 610nm (filtre APC) induit par 50 mg/L de GO et de son analyse en cytométrie en flux

Conclusion :

Une analyse normale en cytométrie en flux de diatomées se fait toujours en utilisant le paramètre de fluorescence de la chlorophylle en plus des paramètres FSC et SSC afin de les dissocier de résidus et débris. A travers les différents résultats présentés, il a été démontré qu'il était aussi possible de dissocier les GBMs de *Nitzschia palea* en utilisant cette différenciation de fluorescence. Ceci vient renforcer l'importance d'utiliser ce paramètre dans l'analyse des diatomées, mais aussi des microalgues plus généralement lorsque l'on utilise la cytométrie en flux. Cependant, cette différenciation avec les nanoparticules est satisfaisante jusqu'à 10 mg/L. En effet à plus fortes concentrations de l'ordre de 50 mg/L de GO, il ne devient plus possible de dénombrer correctement des cellules en cytométrie en flux dû à un « quenching » de la fluorescence (figure 15) qui peut être dû à une agglomération des nanoparticules à ces très fortes concentration. Ainsi, les concentrations utilisées pour les tests écotoxicologiques et justifiées en partie 1.2. garantissent l'absence d'interférences liées aux GBMs lors des analyses en cytométrie.

Chapitre 3

Effets de nanoparticules de graphène fonctionnalisées sur un biofilm de rivière mixte (diatomées/bactéries)

Malgré le manque de données des effets des GBMs sur les communautés microbiennes, il a été montré dans le chapitre précédent que le sujet était en plein essor ces dernières années. Cependant, les communautés microbiennes aquatiques, et surtout les biofilms, sont peu représentées dans la littérature. De plus, les études se sont principalement focalisées sur le compartiment bactérien et son activité, tandis que les organismes phototrophes ont souvent été mis de côté. Afin d'essayer de combler ce vide, ce premier chapitre vise à étudier les effets de deux GBMs, le GO et le rGO, sur un biofilm mixte composé à la fois d'un compartiment bactérien, et d'un compartiment algal avec la présence de la diatomée *Nitzschia palea*. Ce mélange d'organismes hétérotrophes et phototrophes, bien que simplifié par rapport à la réalité d'un biofilm de rivière présente l'avantage d'être plus complexe qu'une culture d'une seule espèce microbienne, et permet d'appréhender les effets des GBMs non seulement sur chaque compartiment mais aussi les possibles interactions entre ces deux compartiments.

Ce chapitre portant sur les effets du GO et du rGO sur un biofilm mixte comportant à la fois la diatomée *Nitzschia palea* et un consortium bactérien a fait l'objet d'un article scientifique publié en 2021 dans le journal « Frontiers in Microbiology » (Evariste et al., 2021) dont un résumé est présenté ci-dessous :

Résumé :

Pour déterminer l'effet de nanoparticules de graphène sur un biofilm de rivière, un consortium bactérien associé à la diatomée *Nitzschia palea* a été exposé pendant 144h à 0 – 0,1 – 1 et 10 mg/L de GO et rGO. Au bout de 48 et 144h, plusieurs paramètres ont été mesurés. L'utilisation de la cytométrie en flux nous a permis de déterminer le taux de croissance de la diatomée, mais aussi d'évaluer des fluctuations dans ses paramètres physiologiques tels que le taux de chlorophylle, le taux de lipides, ainsi que la viabilité cellulaire et le stress oxydatif. Le compartiment bactérien a aussi été analysé en cytométrie en flux afin de déterminer son taux de croissance. De plus, l'utilisation de plaques de culture Biolog ont permis de déterminer les possibles changements d'activités liés au cycle du carbone du compartiment bactérien. Finalement, une analyse métagénomique, plus communément appelée métabarcoding, en séquençant l'amplicon 16S des cellules a été menée afin de déterminer des changements dans la composition et la structure de la communauté.

Les résultats démontrent dans un premier temps l'effet négatif important du GO dès 1 mg/L sur le compartiment bactérien, s'accordant sur la littérature. Les activités liées au cycle du carbone et à l'hétérotrophie ont aussi été augmentées les premières 48h, revenant à la normale après 144h d'exposition. Cependant, et de façon très intéressante, l'ajout de GO et rGO a stimulé la croissance de la diatomée tout en augmentant ses taux de chlorophylle et de lipides au cours des 144h. Ces résultats

vont à l'encontre de la littérature montrant très souvent des effets négatifs des GBMs sur les algues unicellulaires et les diatomées.

L'analyse métabarcoding du consortium bactérien à mis en avant la capacité du GO, et non du rGO, à dévier la trajectoire naturelle de la communauté. En effet le GO, et de façon plus importante à 10 mg/L, induit des effets sur la diversité alpha (au sein d'un échantillon), mais aussi la diversité beta (entre les échantillons). Cela a permis de mettre en avant des espèces résistantes au GO telle que des bactéries appartenant aux genres *Acidovorax* et *Silanimonas.* Ces deux genres ont été précédemment mis en avant pour leur résistance à des GBMs. Cette capacité est attribuée à leur résistance au stress oxydatif, le principal effet antimicrobien des GBMs, mais aussi à leur capacité à dégrader des composés carbonés complexes qui pourrait s'appliquer au GO et rGO.

Les résultats démontrant une augmentation de la croissance de la diatomée *Nitzschia palea* par le GBMs vont dans le sens contraire de la littérature montrant l'effet négatif des GBMs sur les micro algues. Cependant les études menées étaient sur des espèces seules. Il semblerait que dans cette étude, la diatomée bénéficie en partie de la présence du consortium bactérien. La littérature démontre la capacité des nanomatériaux à base de graphène à augmenter la production d'EPS par les diatomées, ce qui pourrait être une source de carbone non négligeable pour les bactéries. En effet, dans notre étude, l'augmentation des capacités hétérotophiques des bactéries a été mise en avant, et pourrait être expliquée par une surproduction d'EPS des diatomées. L'augmentation de ces activités par le consortium bactérien pourrait déboucher sur la production de nutriments ou autres molécules bénéfiques à *Nitzschia palea*.

Il a donc été démontré au cours de cette étude que les GBMs, et plus particulièrement le GO, avaient la capacité de modifier la diversité d'une communauté bactérienne. Il est proposé que les interactions au sein du biofilm entre les organismes phototrophes et hétérotrophes peuvent aussi être influencées par les GBMs. Ces changements dans la composition et la physiologie des espèces du biofilm peuvent avoir un effet sur les différentes fonctions biologiques et le rôle de ce biofilm vis-à-vis des différents cycles des éléments, mais aussi sur les réseaux trophiques supérieurs se nourrissant sur celui-ci.

Graphene-based nanomaterials modulate internal biofilm interactions and microbial diversity

Lauris Evariste[1], Paul Braylé[1], Florence Mouchet[1], Jérôme Silvestre[1], Laury Gauthier[1], Emmanuel Flahaut[2], Eric Pinelli[1], Maialen Barret[1]

[1]Laboratoire d'écologie fonctionnelle et environnement, Université de Toulouse, CNRS, INPT, UPS, Toulouse, France

[2]CIRIMAT, Université de Toulouse, CNRS, INPT, UPS, UMR CNRS-UPS-INP N°5085, Université Toulouse 3 Paul Sabatier, Bât. CIRIMAT, 118 route de Narbonne, 31062 Toulouse cedex 9, France

Abstract

Graphene-based nanomaterials (GBMs) such as graphene oxide (GO) and reduced graphene oxide (rGO) possess unique properties triggering high expectations for the development of new technological applications and are forecasted to be produced at industrial-scale. This raises the question of potential adverse outcomes on living organisms and especially toward microorganisms constituting the basis of the trophic chain in ecosystems. However, investigations on GBMs toxicity were performed on various microorganisms using single species that are helpful to determine toxicity mechanisms but fail to predict the consequences of the observed effects at a larger organization scale. Thus, this study focuses on the ecotoxicological assessment of GO and rGO towards a biofilm composed of the diatom *Nitzschia palea* associated to a bacterial consortium. After 48 and 144 hours of exposure to these GBMs at 0, 0.1, 1 and10 $mg.L^{-1}$, their effects on the diatom physiology, on the structure and the metabolism of bacterial communities were measured through the use of flow cytometry, 16S amplicon sequencing and Biolog ecoplates, respectively. The exposure to both of these GBMs stimulated the diatom growth. Besides, GO exerted strong bacterial growth inhibition as from 1 $mg.L^{-1}$, influenced the taxonomic composition of diatom-associated bacterial consortium, and increased transiently the bacterial activity related to carbon cycling, with weak toxicity towards the diatom. On the contrary, rGO was shown to exert a weaker toxicity toward the bacterial consortium whereas it influenced more strongly the diatom physiology. When compared to the results from the literature using single species tests, our study suggests that diatoms benefited from diatom-bacteria interactions and that the biofilm was able to maintain or recover its carbon-related metabolic activities when exposed to GBMs.

Keywords: microbial ecotoxicology, graphene, freshwater, biofilm, diatom, metabarcoding

1. Introduction

Two-dimensional nanomaterials derived from graphene possess unique properties such as high surface area, electrical and thermal conductivity, mechanical strength and optical transmittance that are currently being explored for the development of new applications in multiple area including composite improvement, energy storage, electronics, medicine or water purification (Dasari Shareena et al., 2018; Mohan et al., 2018; Nag et al., 2018; Perreault et al., 2015). Among these graphene-based materials (GBMs), graphene oxide (GO) and reduced graphene oxide (rGO) appear as very attractive due to their ease of synthesis, their high stability after dispersion in various solvents and the possibility for surface functionalization (Smith et al., 2019). rGO, which carries a lower amount of oxygen-containing functions compared to GO (Lavin-Lopez et al., 2017), constitutes a good compromise between GO and graphene, especially for electrical conductivity properties, leading to its use for the development of electrochemical sensors (Rowley-Neale et al., 2018; Tarcan et al., 2020). As the production of high quality graphene suffers from high energy consumption and cost, GO and rGO constitute major products in the graphene market (Lin et al., 2019). For these reasons, these GBMs are forecasted to be mass-produced and are thus likely to be released in the environment during their whole life cycle, from the production to the recycling (Mottier et al., 2017). However, the monitoring of environmental pollutions by GBMs is not possible yet due to technical limitations for their detection at current low concentrations in complex matrices (Goodwin et al., 2018). Nevertheless, despite the lack of modelling data about their expected environmental concentrations, it is estimated that with increasing needs, GBMs could reach concentrations between 1 and 1000 µg/L in aqueous environment (X. Zhang et al., 2017), with an accumulation trend in sediment (Avant et al., 2019; Sun et al., 2016). This requires to carefully evaluate the potential impact of these materials on environmental health, in order to contribute to the development of this nanotechnology in a safety and sustainable way (Fadeel et al., 2018).

Previous studies investigated the toxicity of GBMs towards various aquatic organisms including vertebrates (Clemente et al., 2019; Evariste et al., 2019b; Paital et al., 2019) or invertebrates (Castro et al., 2018; Lv et al., 2018) while the most abundant literature concerns the effects on bacteria and microalgae (Han et al., 2019; Kumar et al., 2019; Saxena et al., 2020; Tashan et al., 2019). Studying the effects of GBMs on these microorganisms is essential since they play crucial roles in aquatic ecosystems. Indeed, microalgae ensure primary production through photosynthesis while bacterial heterotrophic activities contribute to organic matter and nutrient cycling (Paerl and Pinckney, 1996; Scala and Bowler, 2001). Moreover, these microorganisms are at the basis of the trophic chain in the environment and act as a resource supplier for many primary consumers. Thus, impairment of these

communities by GBMs exposure could indirectly affect organisms from higher trophic levels (Evariste et al., 2020). The vast majority of the studies available on bacteria and algae were performed on isolated single strains (e.g. *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Chlorella sp.)* and highlighted antibacterial activities, and algal growth inhibitory effects of GBMs that were both associated to oxidative stress and membrane injuries (Ji et al., 2016; Ouyang et al., 2015; Zhao et al., 2017). Although these effects are well documented in free-living cells, data concerning GBMs toxicity toward microorganisms living in complex biofilms remain scarce and inconsistent despite the fact that environmental biofilms are recognized to bind and accumulate nanoparticles (Ikuma et al., 2015). Biofilm lifestyle confers ecological advantages over free-living cells as it includes social cooperation as well as enhanced resource capture and resistance to antimicrobials for the organisms embedded in a matrix of extracellular polymeric substances (EPS) (Flemming et al., 2016).

The main literature available focus on the effects of metallic nanoparticles towards biofilms while studies focusing on carbon-based nanomaterials remains scarce (González et al., 2015; Hou et al., 2017; Lawrence et al., 2016; Miao et al., 2019). Specifically, the effects of GBMs toward biofilms were monitored on single bacterial strains in order for the development of antimicrobial treatments to avoid the formation of pathogenic biofilms for biomedical purposes (Cacaci et al., 2020; Cao et al., 2021; Han et al., 2019; Liu et al., 2019). In this context, studies indicated that GO-coated surfaces could either promote or inhibit biofilm formation by *E.coli* and *S. aureus* (Guo et al., 2017; Ruiz et al., 2011; Yadav et al., 2017). However, these studies were performed under conditions that are not fully relevant within environmental-based contexts that are not sufficiently investigated (Jastrzębska and Olszyna, 2015; Montagner et al., 2016). Thus, understanding the toxicological effects of GBMs towards more complex communities is crucial to better characterize the ecotoxic potential of these nanomaterials and to further determine the possible consequences of their presence in freshwater environments on the ecosystem functioning. The aim of this study was to investigate the toxicity of a commercial GO and its reduced form towards a complex assembly composed by the diatom *Nitzschia palea* associated to a bacterial consortium. This biofilm was exposed under controlled conditions to GBMs at concentrations ranging from 0.1 to 10 $mg.L^{-1}$ to determine the effects on diatom physiology using flow cytometry as well as on bacterial community structure and activity using high throughput 16S sequencing and community-level physiological profiles, respectively.

2. Material and methods

2.1. Graphene-based nanomaterials

Graphene oxide was provided by Antolin Group and prepared by oxidizing Grupo Antolin Carbon Nanofibers (GANF®) (Grupo Antolín, Burgos, Spain) using the Hummer's method (Hummers Jr and Offeman, 1958; Lobato et al., 2016). We thermally reduced it at 200°C in H_2 atmosphere into reduced graphene oxide rGO, as previously described (Evariste et al., 2019b). GBMs were stored as dry powder in the dark and dispersions were prepared extemporaneously in order to avoid any possible change of material characteristics. Full characterization of the tested materials was detailed in previous work (Evariste et al., 2019b) and characterization data are summarized in table 1.

Tableau 31: Physico-chemical characteristics of graphene oxide (GO) and reduced graphene oxide (rGO) used in the study. TEM: transmission electron microscope; HRTEM: high resolution TEM; BET: Brunauer-Emett-Teller; at. %: atomic %.

	Graphene Oxide	**Reduced Graphene Oxide**
Carbon content	69.0 ± 0.4 at. %	83.8 ± 0.5 at. %
Oxygen content	31.0 ± 0.4 at. %	16.2 ± 0.3 at. %
Csp2 graphene	35.5 at. %	64.5 at. %
C–OH/C–O–C	24.7 at. %	7.8 at. %
C=O	2.5 at. %	5.8 at. %
O=C-O	5.3 at. %	1.3 at. %
Sat.	1.4 at. %	4.5 at. %
Number of layers (HRTEM)	1–5	1–5
Lateral size (TEM)	0.2 to 8 µm	0.2 to 8 µm
Specific surface area (BET)	228 ± 7 $m^2.g^{-1}$	16 0.5 $m^2.g^{-1}$

2.2. Complex biofilm model and exposure procedure

The experimental model for complex biofilms was composed of an association between an axenic strain of *Nitzschia palea* CPCC-160 provided by the Canadian Phycological Culture Center (University of Waterloo, Waterloo, ON, Canada) and a bacterial consortium isolated from water filters of the freshwater Museum-Aquarium of Nancy (France). After sampling, the consortium was suspended in 50% glycerol and stored at -80°C until use.

Before the beginning of the exposure to GBMs, microorganisms were sequentially introduced in culture Flasks (Falcon 355001, 600 mL - 150 cm^2) as follows. *N. palea* was cultured as previously described in a modified CHU no. 10 basic medium, called SPE medium (SPE; 6.4 < pH < 6.6) (Garacci et al., 2017). Standard growth conditions consisted in an incubation at 22°C ± 1 °C on a rotary shaker (50 rpm) in a culture room. An illumination of 50 µmol m^{-2} s^{-1} with a day/night period of 14h/10h respectively was applied. Two days prior to exposure (T_{-48h}), diatoms were transferred at a density of

$5x10^4$ cells/mL in a flask containing 50 mL of SPE medium. After 24 hours of growth in standard conditions (T_{-24h}), diatoms reached a concentration of $9x10^4$ cells/mL. Glycerol was removed from the bacterial consortium after centrifugation and the consortium was suspended in 100 mL of SPE medium. Thus, at T_{-24h}, flasks containing diatoms were inoculated with the bacterial consortium to reach the concentration of 3 $x10^4$ bacterial cells/mL, leading to the ratio of 3 diatoms per bacterial cells in each flask. After 24 hours, flasks were contaminated with GBMs (T0). For this purpose, nanomaterials were dispersed in SPE medium through the use of an ultrasonic bath for 10 min and autoclaved. Dilutions of the GBMs stock dispersions were carried out under axenic conditions in order to avoid contamination. Intermediary dispersions were prepared at 0.2, 2 and 20 $mg.L^{-1}$. A volume of 50 mL of GBMs-contaminated SPE media were added in the flasks to reach a final concentration of 0.1, 1 or 10 $mg.L^{-1}$ of GBMs while uncontaminated medium was added in the control groups (T0). Exposures were performed over 144 hours under standard conditions as previously indicated.

Biofilm was sampled after 48 and 144 hours of exposure with the different concentrations of GBMs (n=3 per time and GBM concentration). For each sampling, the biofilm was gently scrapped and flask content was homogenized and divided into two fractions of 50 mL. The first fraction was used for diatom and bacteria counts as well as analysis of the diatom physiological parameters using flow cytometry. In addition, this fraction was also used to perform community level physiological profiles (CLPP) analysis. The second 50 mL fraction was filtrated at 0.45 µm (Whatman® Nuclepore™) to collect the whole microorganism community and investigate the microbial community structure. Filters were stored individually in sterile tubes at -80°C prior to further processing.

2.3. Flow cytometry analysis

Flow cytometric (FCM) analysis of the diatom *N. palea* and bacterial counts were performed using a Beckman-Coulter Cytoflex flow cytometer equipped with a 488 nm laser and data were collected and analysed using Cytexpert v. 2.2.0.97 software.

2.3.1. Microorganisms counts and growth rate calculation

For *N. palea* counts, unstained algae were gated based on their Forward scatter parameters (FSC-A) and chlorophyll fluorescence (690/50 nm). Bacteria were accounted using SYTO9 dye (Invitrogen). Samples were incubated with 5µM of the probe for 15 minutes in the dark at room temperature. Bacteria were detected and enumerated based on the fluorescence emitted by SYTO9-positive events (525/40 nm) and Side scatter parameters (SSC-H). Normalized growth rates of the diatoms and bacteria were calculated as follows:

$$Growth\ rate = \left(\frac{Cs - Mic}{Mic}\right)$$

$$Normalized\ growth\ rate\ (\%) = \left(\frac{Growth\ rate}{MCtGr}\right)\ x\ 100$$

Cs corresponds to the organism concentration at sampling time, Mic is the mean initial concentration of organisms (at T_{-48h} for diatoms and at T_{-24h} for bacteria) and MCtGr is the mean growth rate in the control group at sampling time.

2.3.2. Diatom physiological parameters

The relative chlorophyll a content of *N. palea* was determined through the measurement of natural chlorophyll a fluorescence emitted at 690/50 nm. The mean fluorescence intensity (MFI in arbitrary unit) collected is expressed as a percentage of the negative control.

Diatom viability was evaluated using SYTOX® Green. After incubation with the probe for 10 minutes at a final concentration of 0.5 µM, cell suspensions were analysed by flow cytometry to measure the fluorescence emitted at 525/40 nm. Diatoms with injured or permeable membrane are positive to the green fluorescence-emitting probe bound to DNA. Results are expressed as viability percentage (100% – percentage of SYTOX-positive cells).

Neutral lipid relative content of the diatoms was evaluated using BODIPY (4,4-difluoro-1,3,5,7,-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene) (505/515). Algae were incubated for 1.5 min with the lipophilic dye at a final concentration of 1 µg.mL^{-1} before flow cytometry analysis. The BODIPY fluorescence emitted by the stained diatoms was collected using a 530/30 nm band-pass filter. The MFI measured is presented as a percentage of the negative control.

The intracellular reactive oxygen species (ROS) produced by the diatoms was measured using 2',7'-dicholorofluorescindiacetate (DCFH-DA), a marker of oxidative stress. Samples were stained for 30 min with the probe at a final concentration of 10 µM prior running flow cytometry measurements. Diatoms with elevated intracellular ROS are positively stained by the probe (Thamatrakoln et al., 2012). The results are presented as a percentage of the diatom population emitting probe-related fluorescence.

2.4. Analysis of community level physiological profiles (CLPP)

BIOLOG® EcoPlates, consisting of 96 wells plates containing a triplicate of 31 different carbon sources and a control with no carbon source, were used to analyse the CLPP of the microorganism communities. Samples were diluted 100 times with fresh SPE medium and 120 µL of the diluted

suspension were transferred into each well of the plate. After inoculation, EcoPlates were incubated in aerobic conditions at 22°C ± 1 °C in darkness for 144 hours. Optical density (OD) at 590 nm was measured immediately after microorganism plating (T_{in}) and was monitored daily over the 144 hours with a CLARIOStar plate reader (BMG Labtech). Over these 144 hours, OD increased linearly ($r^2 = 0.94$) and did not reached a plateau phase. For each substrate, absorbance was corrected by subtracting the absorbance of the control well containing media only. Negative values of the corrected readings were set to zero. The average well color development (AWCD) of substrate utilization was calculated across all wells per plate as follows:

$$AWCD = (\sum ODi)/31 ,$$

where ODi represent the corrected optical density of the ith well. AWCD was also calculated for each guild of carbon sources, grouped into 1) carbohydrates, 2) carboxylic acids, 3) amino acids, 4) amines and amides and 5) polymers as defined by Weber and Legee (Weber and Legge, 2009). To compensate the influence of the microorganism density on the AWCD measurement, corrected OD values were calculated per bacteria by dividing the OD value per the number of bacteria introduced in each well at T_{in}. The normalized carbon source utilization data were also subjected to principal components analysis (PCA). All the results reported refer to the 144h time point.

2.5. Analysis of bacterial community structure: DNA extraction, PCR, sequencing and data processing

After cutting filters into pieces, total DNA was extracted using the QIAGEN DNeasy PowerSoil kit following manufacturer's instructions. Extraction controls were performed using unused filters to ensure the absence of DNA contamination. The DNA extracts quantity and quality were analyzed using a NanoDrop 2000 UV spectrophotometer (Thermo Scientific). The V4-V5 region of 16S rRNA gene was targeted for *Archaea* and Bacteria using 515F (5'-GTGYAGCMGCCGCGGTA-3') and 928R (5'CCCCGYCAATTCMTTTRAGT-3') primers set (Wang and Qian, 2009). PCR reactions were run in a final volume of 50 µL containing: 37.5 µL of PCR water, 5 µL of 10X PCR buffer, 2 µL of DNA extract, 2 µL of both primer, 1 µL of dNTP (2.5 mM) and 0.5 µL of Taq DNA polymerase (5 U/µL – Sigma Aldrich). The following PCR protocol was applied: 94°C for 120 s, 30 cycles of 94°C for 60 s, 65°C for 40 s, 72°C 30 sec and 72°C for 10 min. Sequencing of the resulting amplicons was performed using Illumina MiSeq technology (2x250 pb) by the Get_PlaGe platform (Genotoul, Toulouse, France). Bioinformatic analysis was performed using FROGS (Find Rapidly Operational Taxonomic Units Galaxy Solution) pipeline on Galaxy (Escudié et al., 2018). Briefly, sequences with mismatch in the primers were excluded and PCR primers were trimmed. Reads were clustered into OTUs using the Swarm clustering method (Mahé et al., 2014). Chimera were removed and filters were applied to remove singletons and keep OTUs

present in at least 2 samples. OTUs were assigned at different taxonomic levels (from Kingdom to species) using RDP classifier and NCBI Blast+ against Silva 138 database (pintail 80) (Quast et al., 2012). Amplicons affiliated to the diatom chloroplast and mitochondria were removed from the dataset prior to data analysis.

2.6. Statistical analysis

As interactive effects were observed between the exposure duration and the contaminant concentrations using two-ways ANOVA, one-way ANOVA were performed at each sampling time to compare the effects induced by the different concentrations of contaminant. Thus, data related to microorganism growth rates, diatom physiological parameters and community physiological profiles were analysed using one-way ANOVA when assumptions of normality and homogeneity of variance were met. Otherwise, data were transformed to meet these assumptions and data were analysed using Minitab 16 Statistical software. Concentrations leading to 50% of bacterial growth inhibition (IC_{50}) were determined using non-linear Hill regression in Graphpad Prism software.

Sequencing data analyses for OTUs counts, alpha diversity indexes and Weighted Unifrac Distances calculations as well as multidimensional scaling (MDS) plot were carried out using the R package "Phyloseq" (McMurdie and Holmes, 2013). Differential abundance of bacterial genera between exposed conditions compared to the control group was examined using "Deseq2" R package (Love et al., 2014). PERMANOVA was performed using Adonis function from the "vegan" R package (Oksanen et al., 2015).

2.7. Data deposition

The original contributions presented in the study are publicly available. This data can be found in NCBI under accession number PRJNA674395.

3. Results

3.2. Effects on microorganism growth rates

Exposure to the GBMs led to a transitory growth stimulation of the diatom. At T_{48h}, the growth rate calculated in the control group reached a value of 5.4 ± 0.95 (Figure S1). Except after exposure to GO at 0.1 mg.L-1, a significant growth stimulation was observed in all GBMs-containing conditions (ANOVA $p < 0.001$), reaching 268 ± 31 % of the control group value after exposure to 10 $mg.L^{-1}$ of rGO (Figure 1A). After 144 hours of exposure, none of the growth rates calculated in the exposure conditions were significantly different from the control group (Figure 1B). In addition, growth rates of

the diatom calculated after 48 hours of exposure to GBMs reached values similar to the control group at T_{144h} (12.7 ± 2.6) (t-test; p = 0.604) (Figure S1).

For the bacterial compartment, exposure to GO led to a dose dependant growth inhibition from 1 mg.L^{-1} while only a slight inhibition was noticed after exposure to rGO at 10 mg.L^{-1} (Figure 1C). The calculated concentrations leading to a growth inhibition of 50% (IC_{50}) were 2.18 mg.L^{-1} and 13.25 mg.L^{-1} after 48h and 144h of exposure to GO, respectively. Contrary to the recovery observed for diatoms at 144h, bacterial growth rates were still significantly different from the control at 1 and 10 mg.L^{-1} of GO and at 10 mg.L^{-1} of rGO (Figure 1D).

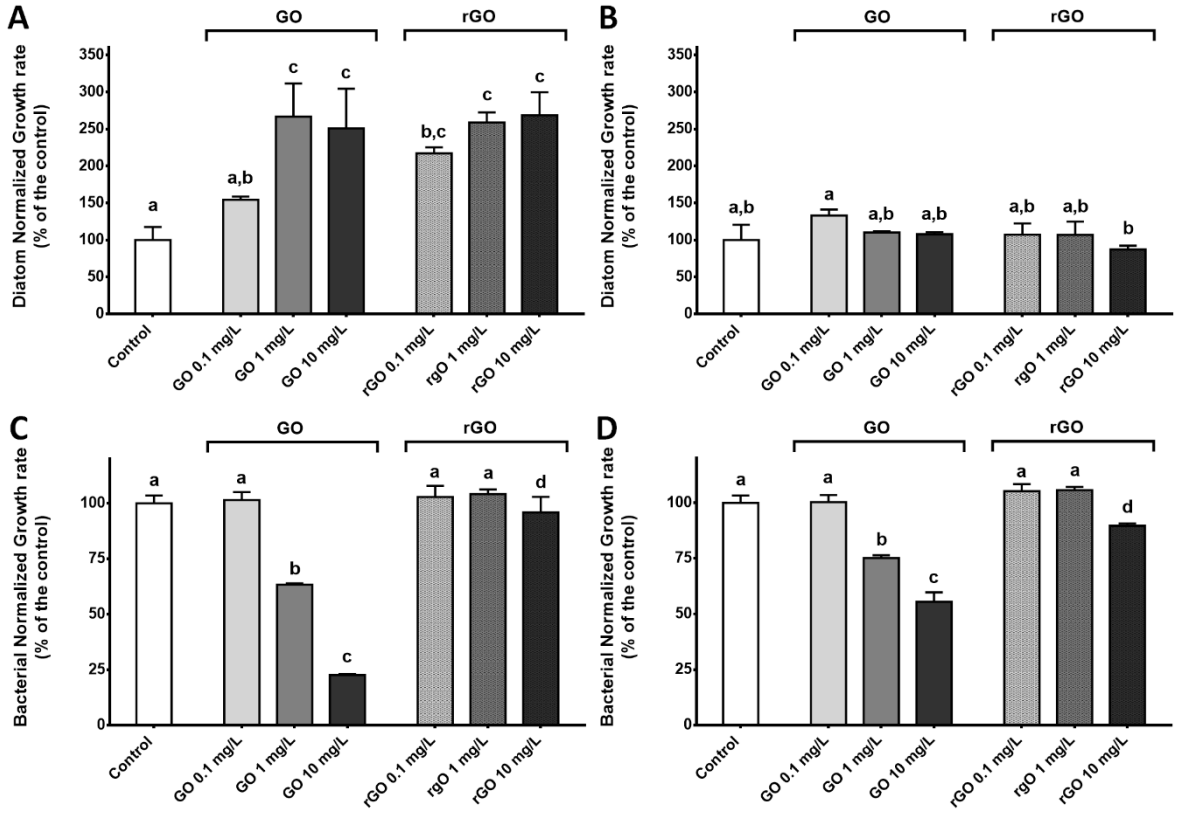

Figure 1: Normalized growth rate of the diatom Nitzschia palea calculated after 48 h (A) and 144 h (B) of exposure to graphene-based nanomaterials (GBMs). Normalized growth rate of the bacterial consortium calculated after 48 h (C) and 144 h (D) of exposure to GBMs. ANOVA was followed by Tukey test. Letters indicate significant differences between the tested conditions.

3.3. Effects on *N. palea* physiology

The relative chlorophyll content of the diatom remained unchanged after 48 hours of exposure to the GBMs (Figure 2A) while a higher relative chlorophyll content could be measured in the diatoms exposed to GO at 10 mg.L^{-1} during 144 hours (Figure 2B). On the contrary, exposure to rGO led to a slight decrease of the chlorophyll content after 144 hours of contact with rGO (Figure 2B).

Graphene oxide exposure did not lead to any significant change in the lipid content of the diatom while in rGO containing conditions, an accumulation of lipids was measured, with a more marked effect after 48 hours of exposure (Figure 2C, D).

Measurement of oxidative stress in the diatom indicated a significant oxidative stress after 48 hour of exposure to rGO at 10 mg.L^{-1} (Figure 2E) while no DCF-positive cells were observed at T_{144h} (data not shown). Monitoring of the diatom viability highlighted a significantly higher percentage of alive diatoms after 48 hours of exposure to GO at 1 and 10 mg.L^{-1} (ANOVA, p = 0.027, Figure 2F). At T_{144h}, no differences were observed between the different GBMs-containing conditions and the control group in the diatom viability that reached that 99 ± 0.64 % (data not shown).

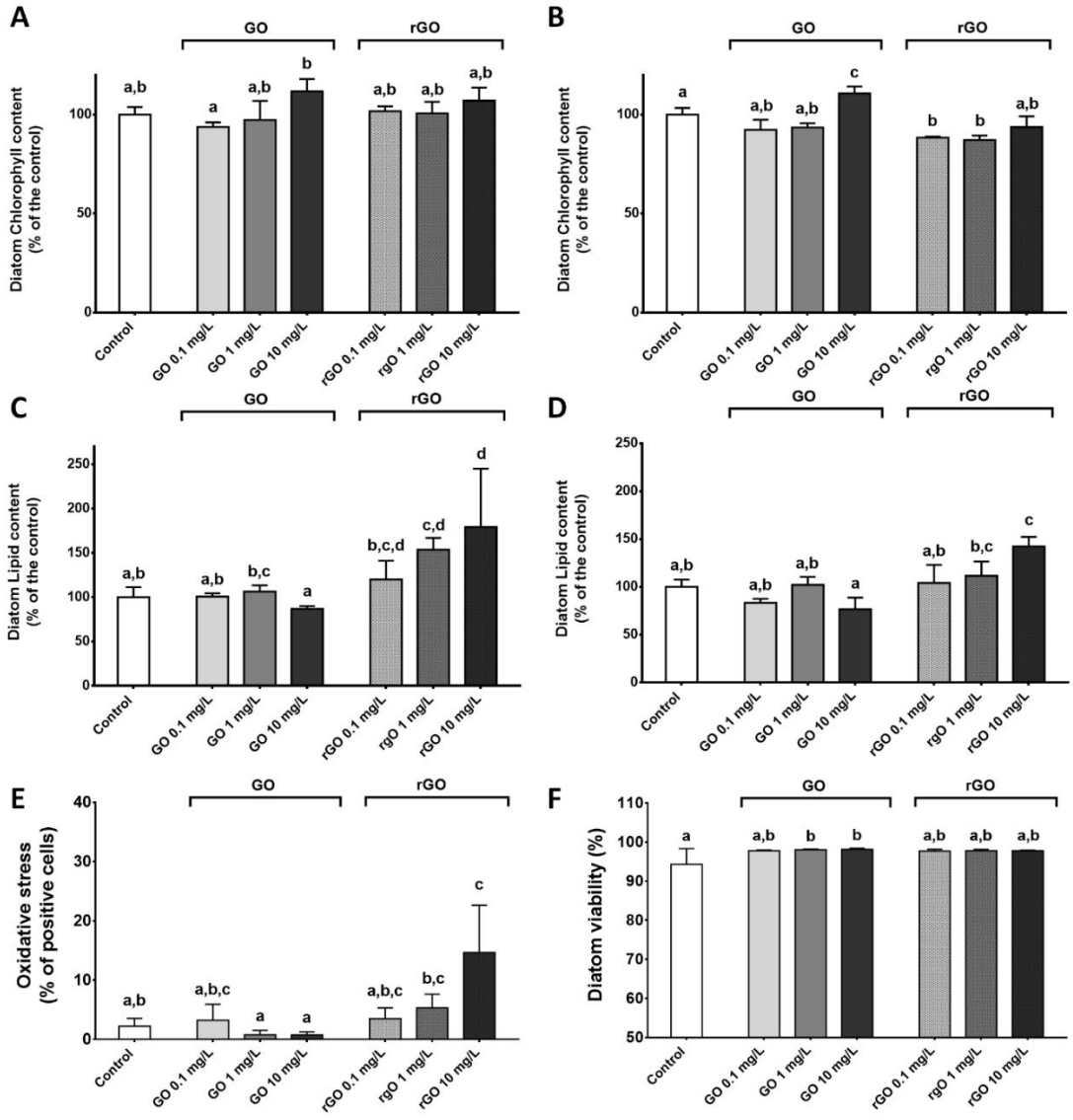

Figure 2: Physiological parameters of the diatom N. palea following exposure to GBMs. Normalized chlorophyll content measured after 48 h (A) and 144 h of exposure (B), normalized lipid content measured after 48 h (C) and 144 h (D), oxidative stress (E) and viability (F) following 48 h of exposure to GBMs. Values are presented as mean ± SD. ANOVA ($p < 0.05$) was followed by Tukey test. Letters indicate significant differences between the tested conditions.

3.4. Effects of GBMs exposure on community level physiological profiles

The community level physiological profile of the biofilm was monitored using Biolog® Ecoplate after 48 and 144 hours of exposure to the different concentrations of GBMs. As indicated by the normalized AWCD values as well as the PCA results, a dose-dependent increase of the overall utilization of carbon sources was noticed after 48 hours of exposure to GO while the substrate utilization did not differ from the control group after exposure to rGO (Figure 3A, Figure S2A, B). In the case of GO exposure, this increase of normalized AWCD values resulted from an increase of the utilization of all the different guilds of carbon sources (Figure S3A). At T_{144h}, the normalized AWCD values were significantly lower in the control group compared to T_{48h} (T-test, p = 0.016) and values were not significantly different from the control group after exposure to GBMs (Figure 3B). However, according to PCA results, carbon sources utilization appears to be different from the control in every GO-containing condition (Figure S2C). This is associated to an increased utilization of the polymers guild (Figure S3B). Similarly, PCA results suggest changes in the CLPP after 144 hours of exposure to rGO at 10 mg.L^{-1} compared to unexposed biofilm (Figure S2D). In this condition, carbon sources 4-Hydroxy Benzoic Acid, Itaconic Acid and D-Xylose appeared to be utilized by the microbial consortium while it was not the case in other conditions. The highest average AWCD values measured in the control group at both 48 and 144h was for the carbohydrate and amino acid guilds while after 144 hours of exposure to GO at 1 and 10 mg.L^{-1}, the utilization of the substrates from the polymers guild is favored.

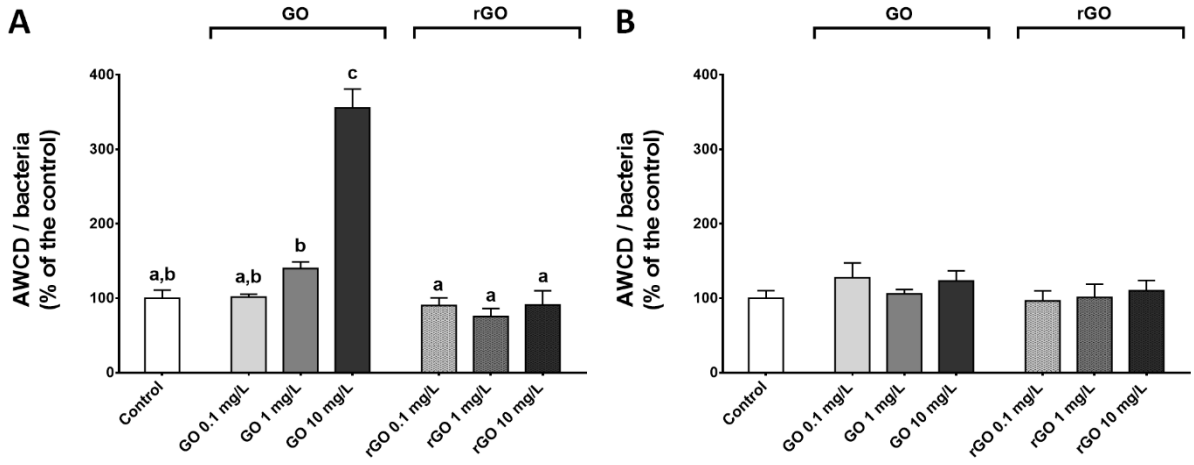

Figure 3: Normalized average well color development (AWCD) values measured after 48 h (A) and 144 h (B) of exposure to GBMs. ANOVA followed by Tukey test. Letters indicate significant differences between the tested conditions.

3.5. Effects on bacterial community structure

After 48 hours of exposure, the Shannon indexes calculated for the bacterial communities were similar in the GBMs containing conditions compared to the control group (ANOVA p = 0.305) (Figure 4A) and the bacterial community structure was not significantly affected as revealed by MDS and

PERMANOVA analysis using weighted UniFrac distances (PERMANOVA, $p = 0.221$) (Figure 4B). Between 48 and 144h, the trajectory of bacterial communities in control conditions resulted in a decrease of Shannon index (Figure 4B). However, after 144h of exposure to GO at 10 mg.L^{-1}, the Shannon index was significantly higher than in the control (ANOVA, $p < 0.001$; Figure 4C) when compared to the control group. At T_{144h}, the exposure to GBMs significantly affected the bacterial community structure (PERMANOVA: $p = 0.001$) and MDS analysis revealed that the effects were more marked after exposure to GO at 10 mg.L^{-1} (Figure 4D).

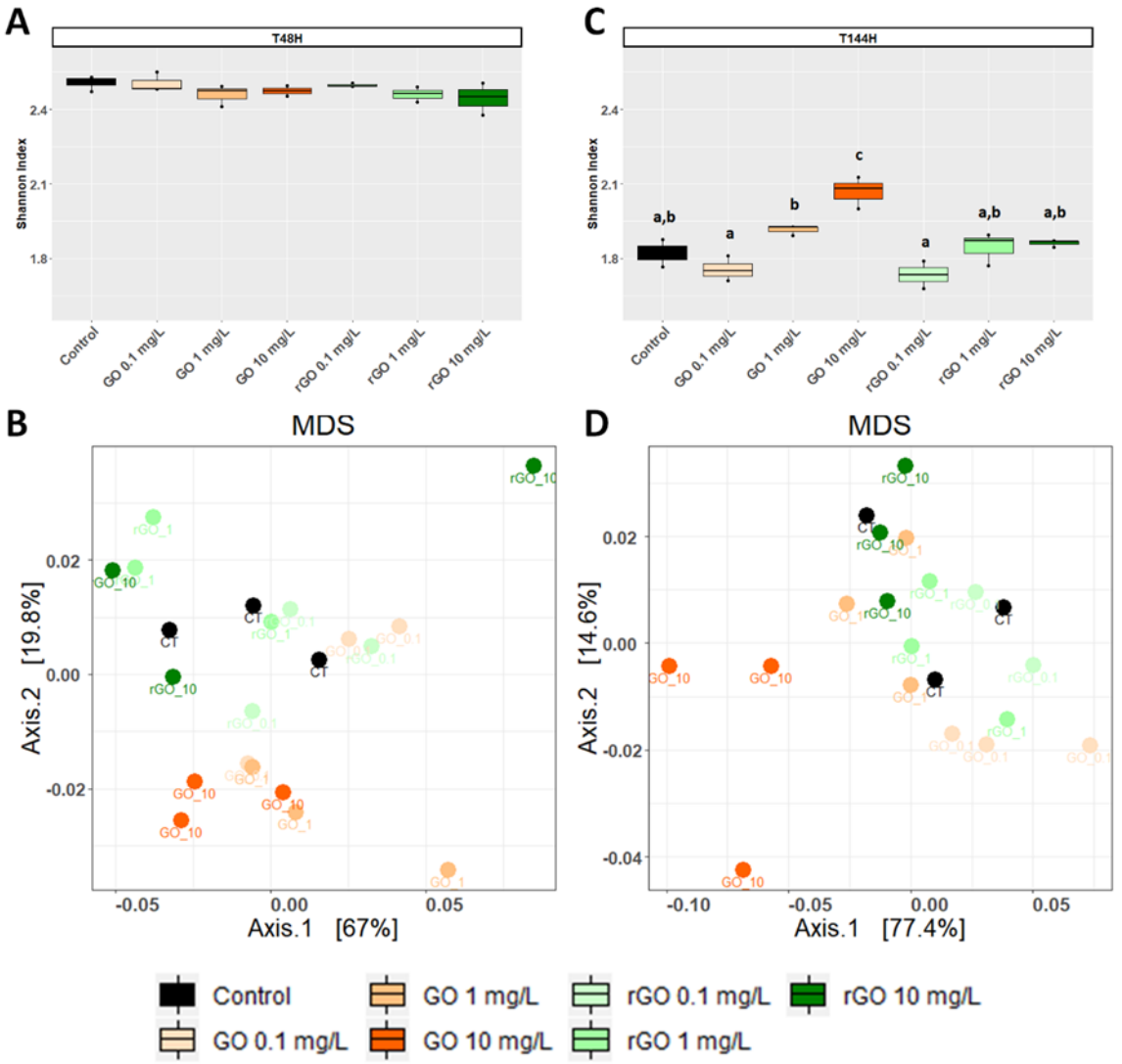

Figure 4: Effects of exposure to GBMs on bacterial communities from the biofilm. Shannon evenness index following 48 h (A) or 144 h of exposure to GBMs (C) are compared between the exposure conditions. ANOVA followed by Tukey test. Letters indicate significant differences between the tested conditions. Multidimensional scaling (MDS) plot of bacterial communities based on unweighted Unifrac distances after 48 h (B) and 144 h (D) of exposure to the different conditions

At T_{48h} in the control group, over 98% of the bacteria constituting the biofilm belonged to the phyla Proteobacteria and Bacteroidota, accounting for 60.7 ± 2.0 % and 38 ± 1.5 % of the total bacteria, respectively (Figure 5). At T144h, these two phyla represented over 99% of the whole community but

the relative abundance of the phylum Proteobacteria decreased to 37.0 ± 4.9 % while it increased to 62.5 ± 4.7% for the phylum Bacteroidota (Figure 5). At T_{48h}, the relative abundances of these two phyla were not affected by the GBMs exposure (Bacteroidota: ANOVA, p = 0.954; Proteobacteria: ANOVA, p = 0.944). After 144 hours of exposure to the different concentrations of GBMs, only the exposure to GO at 10 $mg.L^{-1}$ led to significant changes in the phyla distribution. In this condition, the relative abundance of the phylum Bacteroidota was significantly lower (51.8 ± 3.5 %) compared to the one observed in the control group (ANOVA, *p* = 0.001 followed by Tuckey test) while the relative abundance of the phylum Proteobacteria was significantly higher (47.8 ± 3.4 %) (ANOVA, *p* = 0.002 followed by Tuckey test).

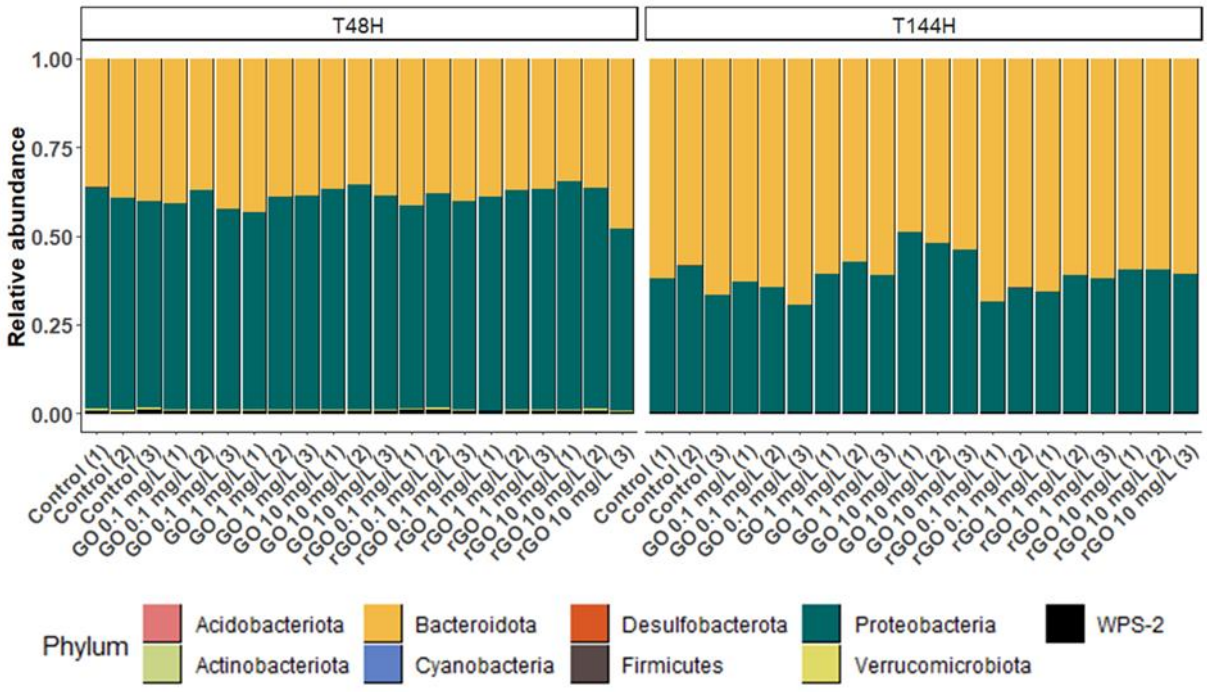

Figure 5: Relative abundance of bacterial phyla from the biofilm after 48 h (T48h) and 144 h (T144h) of exposure to GO or rGO at concentrations ranging from 0 to 10 mg.L−1.

At T_{48h}, OTUs assigned to the phylum Bacteroidota were mainly members of the orders *Chitinophagales* and *Sphingobacteriales* (Figure S4A). Members from the order *Burkholderiales* and *Rhodobacterales* predominated among OTUs affiliated to the phylum Proteobacteria (Figure S4B). While *Burkholderiales* and *Rhodobacterales* members still predominated over other Proteobacteria after 144h of incubation, the relative abundance of OTUs affiliated to the Order *Xanthomonadales* increased over time in all conditions (Figure S4B). Statistical analysis of the OTUs relative abundances in the biofilm indicated that 4 OTUs from the phylum Proteobacteria were differentially abundant upon exposure to GBMs, with a significance threshold fixed at p = 0.01. All four OTUs were more abundant after exposure to 10 $mg.L^{-1}$ of GO during 144 hours than in control condition. Two of these OTUs, with a log2-fold change of 6.79 ± 1.2 and 5.82 ± 1.1, were affiliated to the genus *Acidovorax* while the two

others with a log-2fold change of 1.81 ± 0.4 and 1.95 ± 0.2 belonged to the genus *Silanimonas* (Table 2). In the control group, the relative abundance of the two *Acidovorax* members (OTUs 29 and 18) decreased between T48h and T144h while it increased for the two *Silanimonas* sp. (OTUs 9 and 61) (Figure 6). Upon exposure to GO at 10 mg.L^{-1}, these OTUs followed different trajectories compared to the control conditions. Thus, the increases of the former OTUs were enhanced while the decreases were less marked over time for the latter OTUs (Figure 6). For example, the OTU 9 increased from 0.18 ± 0.02 % at T_{48h} to 1.7 ± 0.2 % at T_{144h} in the control group whereas it reached 6.2 ± 1.2 % following exposure to GO at 10 mg.L^{-1}.

Tableau 2: OTUs differentially abundant (p < 0.01) at 10 mg.L-1 of GO compared to the control group after 144 hours of exposure. Positive log2-fold change values indicate enriched OTUs in the exposure condition

OTU	Log2 foldchange	Phylum	Class	Order	Family	Genus
18	6.79	Proteobacteria	*Gammaproteobacteria*	*Burkholderiales*	*Comamonadaceae*	*Acidovorax*
29	5.82	Proteobacteria	*Gammaproteobacteria*	*Burkholderiales*	*Comamonadaceae*	*Acidovorax*
61	1.81	Proteobacteria	*Gammaproteobacteria*	*Xanthomonadales*	*Xanthomonadaceae*	*Silanimonas*
9	1.95	Proteobacteria	*Gammaproteobacteria*	*Xanthomonadales*	*Xanthomonadaceae*	*Silanimonas*

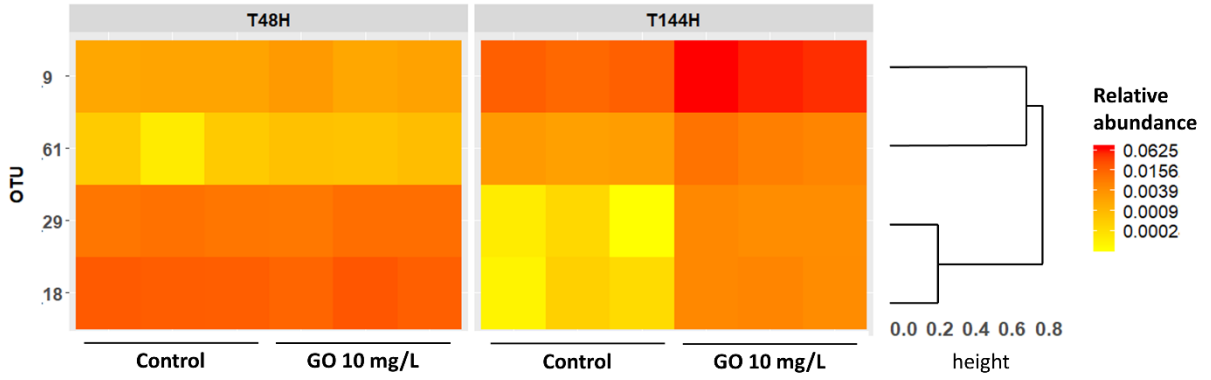

Figure 6: Heatmap showing the relative abundances of the discriminant OTUs identified by Deseq analysis. The dendrogram is based on Bray-Curtis distances metric and hierarchical clustering of OTUs using the complete method.

4. Discussion

Due to the multiple crucial roles played by microbial communities in the environment, studying the effects of GBMs towards these communities is essential to better assess the ecosystemic consequences of a contamination of the environment by these nanomaterials. For this purpose, many studies evaluated their ecotoxic potential through the use of single-species-based assays. These tests are relevant to determine the toxicological effects and pathways associated to GBMs exposure but they are not realistic and fail to inform the consequences that could occur when interacting species

are exposed. As litterature about GBMs impact on complex communities is scarce for the aquatic environment, this study aims to fill the gap on the subject.

4.2. Consequences of the GBMs exposure on the algal compartment

In our study, exposure to the different GBMs concentrations led to a growth stimulation of the diatom *N. palea*, reaching the maximum growth rate earlier compared to the control group, the growth rate of the latter being comparable to previous studies (Garacci et al., 2017). These results are contradictory with the vast majority of single-species-based studies which indicated that exposure to engineered nanoparticles led to algal growth inhibition associated to oxidative stress induced by cellular damages (Chen et al., 2019; Saxena et al., 2020). For example, this was observed for green pelagic algae such as *Raphidocelis subcapitata*, *Chlorella pyrenoidosa* or *Scenedesmus Obliquus* after exposure to GO or rGO (Du et al., 2016; Malina et al., 2019; Zhao et al., 2019, 2017). It was also indicated that the exposure of the freshwater diatom *Nitzschia palea* to few layer graphene (FLG) increased the production of EPS substances which mitigated its toxicity (Garacci et al., 2019, 2017). Despite the difference of sensitivity of the different algal species to GBMs, the concentrations leading to 50% of algal growth inhibitions all ranged from 20 to over 150 $mg.L^{-1}$ which is approximately one order of magnitude higher than the concentrations tested in our study (Du et al., 2016; Nogueira et al., 2015; Zhao et al., 2017). In our work, the similar trends observed on the increase of the diatom growth following exposure to GO or rGO suggest that this response may not be influenced by specific physico-chemical characteristics such as oxidation level. In addition, the weak oxidative stress measured in the diatom is consistent with the absence of growth impairment and highlights the protective effect associated to the biofilm lifestyle. Growth inhibitory effects were also hypothesized to be associated to indirect ecotoxic effects through shading as well as to nutrient depletion by GBMs (Garacci et al., 2017; Zhao et al., 2017). As the algal growth increased, these two hypotheses are unlikely under the exposure conditions used in this study or they could have been counterbalanced by favorable interactions with bacteria.

According to the flow cytometry analyses performed, we observed that exposure to GO led to an increase of chlorophyll content and to a decrease of lipid content in the diatom while opposite results were observed following rGO exposure. Although few studies monitored changes in algal physiological parameters, the results obtained in the latter case are in line with studies from the literature focusing on the effects associated to low-oxygen content graphene-based nanomaterials exposure. Indeed, a significant reduction of chlorophyll level and an under-expression of genes associated to chlorophyll biosynthesis resulted from an exposure to rGO or few layer graphene in the algae *Scenedesmus obliquus* or *N. palea* respectively (Du et al., 2016; Garacci et al., 2019). In addition,

exposure to graphene nanosheets was shown to favor lipid accumulation in *Chlorella pyrenoidosa* (Khanra et al., 2018). However, in the case of GO exposure, our results are contradictory with the single-species-based literature that usually reports a decrease of chlorophyll pigments (Hazeem et al., 2017; Hu et al., 2016; Malina et al., 2019; Tang et al., 2015). *N. palea* is a mixotrophic diatom able to grow using autotrophic metabolism (*e.g.*, photosynthesis) using an inorganic carbon source (CO_2) and/or through a heterotrophic metabolism using organic carbon sources (Villanova et al., 2017). It was reported that mixotrophic algae accumulated chlorophyll when cultured in autotrophy while this content decreased and lipids were accumulated by the algae under heterotrophic conditions (Cheirsilp and Torpee, 2012; da Silva Ferreira and Sant'Anna, 2017). Thus, our observations suggest that in *N. palea,* when it is associated to a bacterial consortium, autotrophic and heterotrophic metabolism were differentially balanced under GO or rGO exposure. In any case, these changes of the energy acquisition pathways in the diatom did not alter growth performance following 144 hours of exposure to GBMs.

4.3. Consequences of the GBMs exposure on the bacterial compartment

The effects of GBMs toward bacteria have been mainly investigated through the exposure of single bacterial strains. The effects towards bacterial communities were studied in soil (Du et al., 2015; Forstner et al., 2019b; Xiong et al., 2018) or in activated sludge (Ahmed and Rodrigues, 2013; Guo et al., 2018; Sha Yujie et al., 2020) but data remain scarce in aquatic ecosystems (Evariste et al., 2020). Given the important bacterial growth inhibition and the relatively weak consequences on microbial composition noticed after 48 hours of exposure to GO, we can suggest that the effects of this nanomaterial could be associated to a mechanism that impacts in a similar manner most bacterial species found in this biofilm. Previous studies suggested that the membrane composition, especially in gram-negative bacteria, as well as bacterial shape could constitute a criteria of resistance to GBMs (Akhavan and Ghaderi, 2010; Kang et al., 2009; Pulingam et al., 2019; Sengupta et al., 2019). Despite that the four OTUs benefiting from exposure to high GO concentrations are gram-negative bacteria, it is more likely that their metabolic capacities are involved in the greater tolerance to GO. Indeed, it was recently reported that bacteria from the genus *Acidovorax* sp. were tolerant to GO concentrations up to 95 $mg.L^{-1}$ in granulated sludge treating wastewater (Kedves et al., 2020). This genus is also well known to be able to degrade organic matter in wastewater treatment plants (Schulze et al., 1999) as well as aromatical compounds like phenanthrene (Singleton et al., 2018) or biphenyl (Ohtsubo et al., 2012). Similarly, *Silanimonas* spp. are categoricized as benzene-degrading species (Mosmeri et al., 2019). Thus, we can hypothesize that these graphene-tolerant bacteria benefited from the presence of GBMs in the media (i) by outcompeting other less tolerant species and (ii) because they could be able to degrade or modify the GO structure.

According to the literature, bactericidal activities of GO and rGO towards planktonic bacteria indicated generally stronger bactericidal effects of GO compared to rGO as observed in our study (Han et al., 2019). However, results concerning antibacterial effects towards bacterial biofilms are more contradictory. Indeed, strong bactericidal effects of GO were previously observed like in our study (Giulio et al., 2018; Mejías Carpio et al., 2012; Pandit et al., 2018; C. Song et al., 2018; Yadav et al., 2017) while others indicated that GO enhanced biofilm formation and that rGO exerted strong inhibitory effects (Guo et al., 2017; Ruiz et al., 2011). The interstudy discrepancies may be associated to several causes influencing the biological responses. Among the previously cited studies, when available, the characterization data indicate a wide variability within the range of oxygen content of the tested GO (from 27.8 to over 36 at. %), with different distribution of the types of oxygen-containing functions. In addition, depending on the method applied, the reduction of these materials lead to the production of a wide variety of rGO. This underline the need to provide detailed characterization data and the use of a classification framework to facilitate interstudy comparisons (Wick et al., 2014). Among other possible causes, it was indicated that the effects of GBMs may vary depending on the medium composition and/or on the biofilm maturity (Fallatah et al., 2019; Guo et al., 2017; Hui et al., 2014). The results obtained in our study are in line with the latter assumption as the IC_{50} values increased between T_{48h} and T_{144h}, indicating that the effects of GO on bacterial growth were mitigated over time with biofilm maturation. This suggests that bacterial growth was delayed by GO exposure and that bacterial communities were recovering. However, after 144 hours of exposure, the presence of GBMs in the media resulted in bacterial communities with diverging community structure trajectories compared to the control group. Further research would be needed to determine if bacterial communities are able to fully recover and to assess the time duration necessary for full recovery.

In addition to the effects on bacterial growth and diversity, exposure to GBMs was shown to influence microbial activities and could potentially lead to disturbances of carbon or nitrogen cycles (Yilihamu et al., 2020; Zhou et al., 2019). For example, previous studies indicated that exposure to GO or rGO could enhance the anaerobic ammonium oxidation activity that is involved in nitrogen removal in ecosystems (Tomaszewski et al., 2019; A. Wang et al., 2013; Yin et al., 2015). Extracellular enymatic activities involved in carbon cycling were also shown to be lowered by short term exposure to GO (Chung et al., 2015). The results obtained in our study using Biolog Ecoplates suggested that the effects of GBMs exposure on the community level physiological profiles were transitory. Indeed, the activity levels of the microbial communities were similar to the control group in the different tested conditions after 144 hours of exposure. However, this method does not allow to determine if the increased activity is associated to an increase of intra- or extracellular metabolism. The recovery of carbon-

related metabolic activities despite the changes occuring in microbial community composition could be explained by functional redundancy between the species composing the biofilm. Further experiment using other omics tools would be needed to examine the metabolic pathways that are influenced by GBMs exposure and to determine if the metabolism of compounds involved in algae-bacteria mutualistic interactions are modified (Cooper and Smith, 2015).

4.4. Consequences of the diatom-bacteria interactions on the response to GBMs exposure

In the case of mixed-species biofilms containing phototropic microorganisms like diatoms as in our study case, the EPS produced can be used by heterotrophic bacteria as carbon and energy sources (Mühlenbruch et al., 2018). In return, bacteria may benefit diatoms by providing sources of nutrients such as vitamins or nitrogen but are also able to reduce algal oxidative stress through the production of enzymes such as catalase (Amin et al., 2012; Hünken et al., 2008; Natrah et al., 2014). Diatom-associated microbiota from environmental samples was described to mainly belong to the phylum Proteobacteria and Bacteroidota (*ex* phylum Bacteroidetes) that are involved in EPS degradations (Amin et al., 2012; Bohórquez et al., 2017; Schäfer et al., 2002). Thus, the composition of the bacterial compartment in the biofilm of our study is consistent with the data from the literature. The heterotrophic bacteria remineralize the organic matter produced by the diatom, ensuring an efficient nutrient cycling (Christie-Oleza et al., 2017). The functioning of biofilms relies on this mutual benefit between the algae and the bacterial consortium. In the present study, diatom and bacteria growth were not correlated across our experimental conditions, demonstrating an interplay between multiple/complex interactions and GBMs direct effects.

It has been previously shown that the exposure to carbon-based nanomaterials such as carbon nanotubes and FLG increased the EPS excretion by *N. palea* (Garacci et al., 2017; Verneuil et al., 2015). This mechanism was suggested to constitute a strategy allowing toxicity mitigation for the algae. However, this could have several consequences for the bacterial compartment. Indeed, the embedment of GBMs into the biofilm EPS could increase contacts with bacteria and favor membrane impairments (Dizaj et al., 2015), which could explain the strong bacterial growth inhibition that we observed in presence of GO. The differential effects observed between GO and rGO on bacterial growth might be associated to the oxidation level of the materials. Indeed, the GBMs were shown to be able to interact with natural organic matter including polysaccharydes (Chowdhury et al., 2014). As these interactions depend on the nature of oxygen-containg functional groups (Saya et al., 2021), the interaction dynamics between EPS and GO or rGO could be different, influencing the contact with bacterial cells embeded in EPS. In addition to the increase in EPS excretion, the composition and the

quality of the EPS produced by the diatoms could be modified by the presence of GBMs. This was previously observed after exposure of bacteria or algae to metallic nanoparticles (Chen et al., 2019; Hou et al., 2017, 2015; You et al., 2015). Moreover, it was suggested that the energy balance between growth and EPS production could be modified following exposure to nanoparticles that is likely to occur in the case of the growth stimulation observed in our study (Taylor et al., 2016). As it was indicated that the EPS composition could affect the bacterial communities in biofilms (Bohórquez et al., 2017; Haynes et al., 2007), we can hypothesize that the changes observed in the bacterial communities could be associated to indirect effects associated to modifications of the EPS quantity and quality.

As discussed in paragraph IV.1, the growth stimulation observed in the diatom is more likely to be due to indirect effects. We can hypothesize that the overproduction of EPS associated to the presence of GBMs might benefit *in fine* to the diatoms through the increase of metabolite quantities produced by bacterial activity. In addition, the results obtained from the community level physiological profiles indicated an activation of heterotrophic metabolism of the biofilm following short term exposure to GO. This metabolic increase allowed to compensate the loss of activity that can be expected due to the bacterial growth inhibition measured in presence of GO. Indeed, considering the AWCD values for the whole biofilm (data not shown) instead of AWCD per bacterial cell as previously presented, the overall carbon-related metabolic activities are maintained at the level of the control group until 1 $mg.L^{-1}$ and a slight decrease is noticed at 10 $mg.L^{-1}$ of GO. This should allow to maintain a baseline carbon and nutrient cycling between the algae and the bacteria.

5. Conclusion

In this study, we observed that the biological responses of mixed microbial communities facing exposure to graphene-based nanomaterials were complex and contradictory to the results of single-species experiments found in the litterature. Here and according to the obtained data, we suggest that the biofilm responses were mainly associated to indirect effects initiated by the overproduction of EPS by the diatom. This potentially increased the amount of carbon available for bacterial metabolism and further benefit to the diatom. However, the oxidized form of graphene was shown to strongly impact bacterial biomass. The activities of carbon sources utilization were maintained in most conditions except at 10 $mg.L^{-1}$ of GO that is unlikely to occur under a scenario of chronic release into the environment. However, changes associated to the diatom physiology and changes in bacterial community composition might lead to modifications of the biofilm biochemical properties and potentially affect higher trophic level organisms feeding on it. Thus, future research on the environmental risk associated to GBMs should increase environmental relevance of the bioassays.

Acknowledgment

The authors thank the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No 785219. We thank the Genotoul bioinformatics platform Toulouse Midi-Pyrenees and Sigenae group for providing computing and storage resources through Galaxy.

Supplementary data

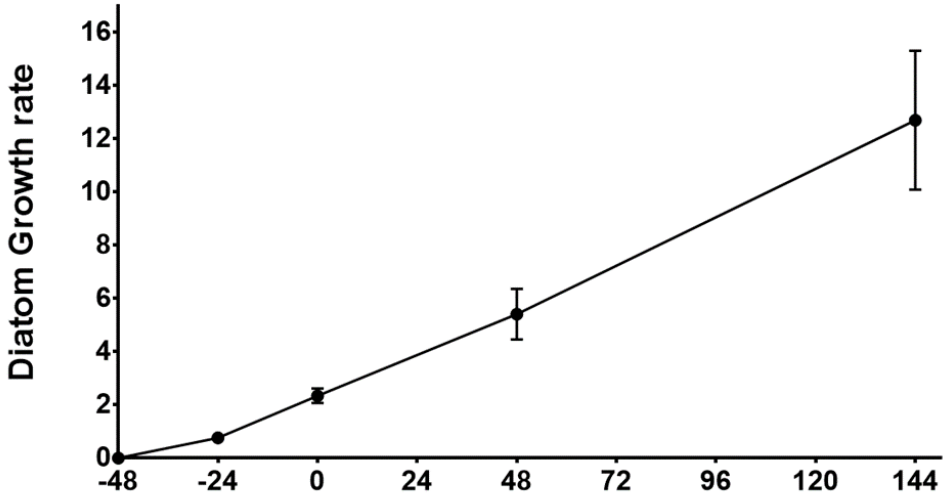

Figure 7: S1 - Growth rate curve of N. palea in control conditions over the experiment duration. Diatoms counting was carried out using flow cytometry. Results are presented as mean ± standard error of three replicates.

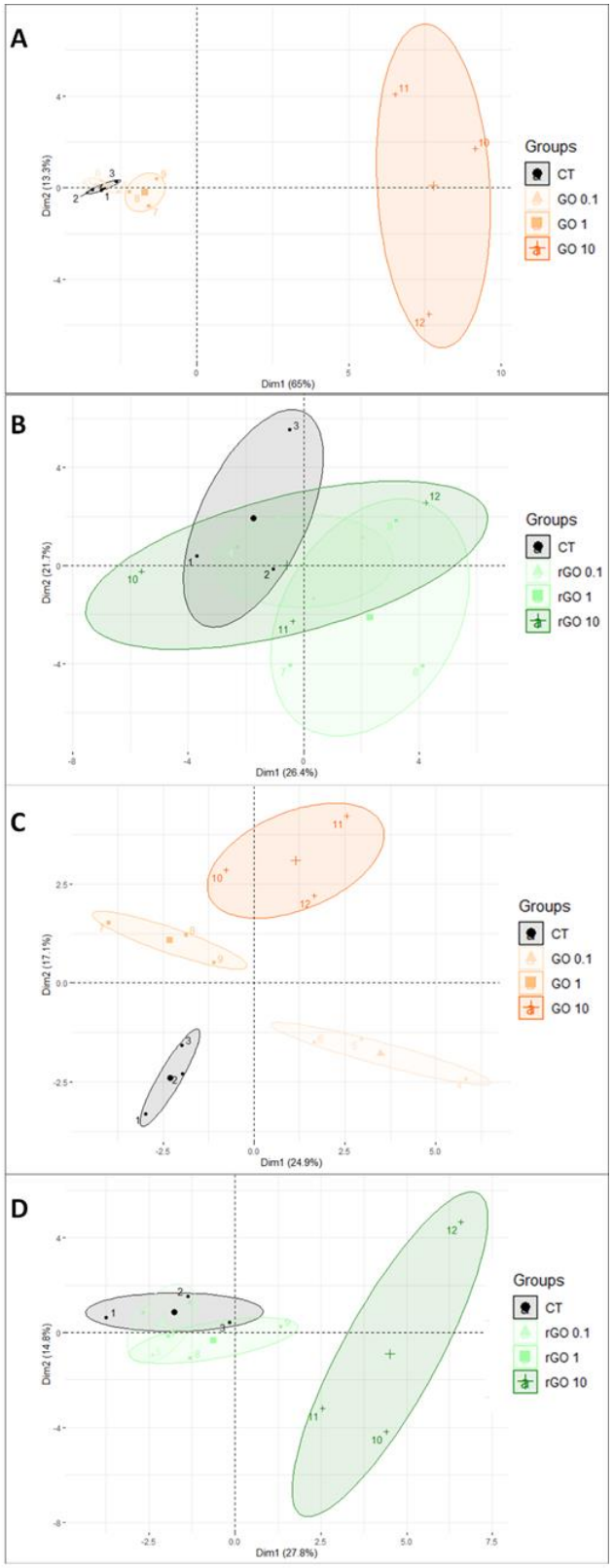

Figure 8: S2 - PCA of normalized AWCD data following 48 hours of exposure to GO (A) or rGO (B) and after 144 hours of exposure to GO (C) and rGO (D).

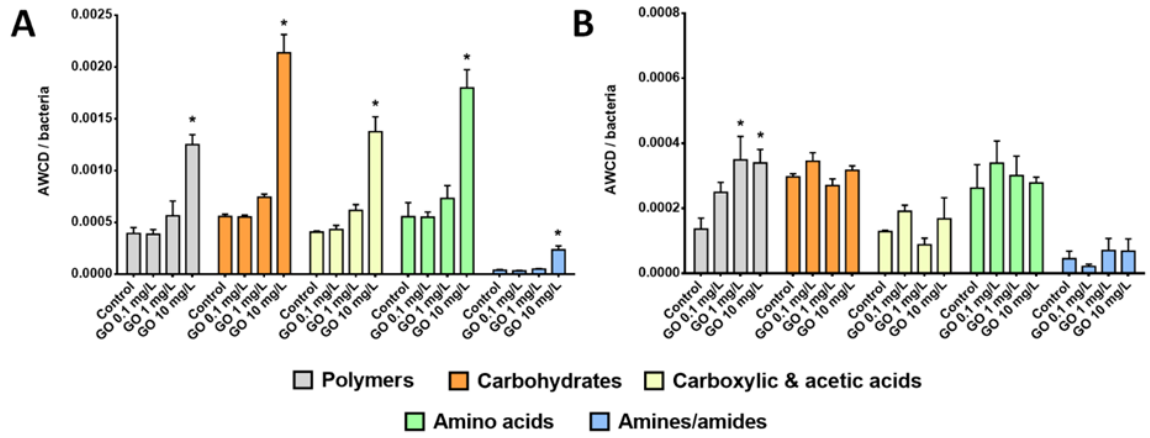

Figure 9: S3 - AWCD values measured for each guild of carbon sources after 48 hours (A) and 144 hours (B) of exposure to GBMs. ANOVA ($p < 0.05$) was followed by Tukey test. Asterisks indicate groups significantly different from the control group.

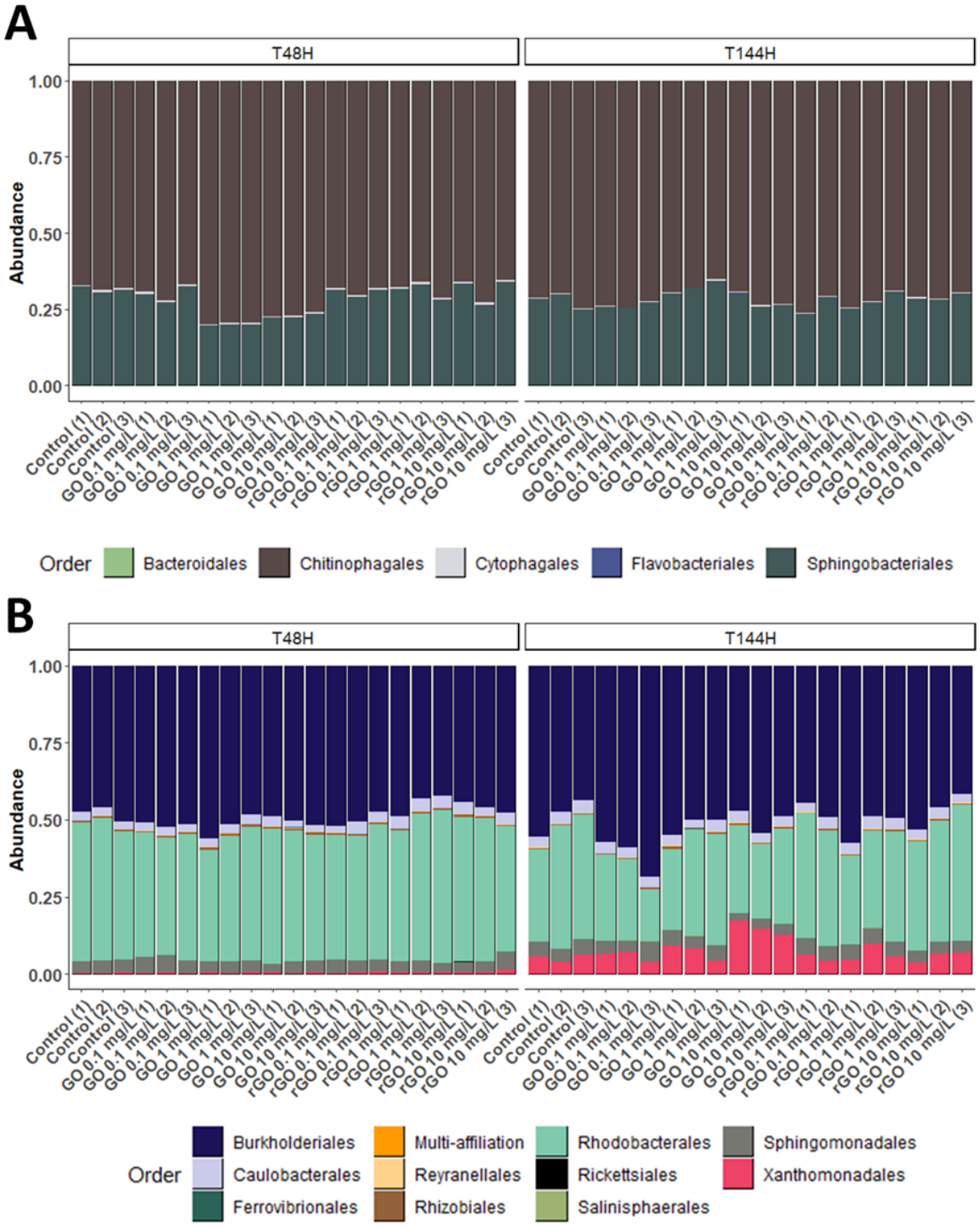

Figure 10 : S4: Relative abundance of bacterial Order from the phyla Bacteroidota (A) and Proteobacteria (B) following exposure to GBMs concentrations ranging from 0 to 10 mg/L.

Les GBMs, et particulièrement le GO, ont la capacité de détourner la dynamique d'une communauté microbienne en termes de composition taxonomique mais aussi d'activités. Au sein de ces communautés, la croissance de Nitzschia palea est stimulée, contrairement à ce qui a été observé dans les études précédentes portant sur les effets du GO sur microalgues non benthiques.

Chapitre 4 :
Effets de nanoparticules de graphène fonctionnalisées sur la diatomée *Nitzschia palea*

L'étude des effets du GO et rGO sur une communauté mixte composée d'un compartiment bactérien et d'un compartiment de diatomées *Nitzschia palea* ont mis en avant une augmentation de la croissance de l'espèce de diatomée. Ces résultats apparaissent en contradiction avec un consensus issu de la bibliographie sur les microalgues, montrant des effets plutôt négatifs des GBMs sur la croissance algale (cf. chapitre 1 – 4.). Les hypothèses formulées reposent sur l'amélioration des échanges et des relations entre le compartiment hétérotrophe et le compartiment phototrophe, profitant à *Nitzschia palea*. Afin de comprendre les interactions entre la diatomée et GBMs, des études ont été menées sur l'espèce *Nitzschia palea* seule en culture axénique. Ces travaux ayant pour objectif de comprendre le mécanisme d'action des deux nanoparticules GO et rGO. Une des expérimentations a été le fruit d'une collaboration et d'un séjour au laboratoire « Metabolism, bioengineering of Microalgae Molecules and Application » (MIMMA) de l'université du Mans. Une partie de ces travaux ont été rédigés sous forme d'article, ont été soumis dans le journal Carbon et sont actuellement en cours d'évaluation. Un résumé de ces résultats est présenté ci-dessous. L'article présenté est suivi d'expérimentations complémentaires non publiées visant à approfondir nos connaissances sur la relation entre les nanoparticules et la diatomée.

Résumé :

Afin de déterminer l'effet de nanoparticules de graphène sur la diatomée *Nitzschia palea*, celle-ci a été exposée à 0,1 mg/L , 1 mg/L et 10 mg/L de GO et rGO pendant 144h. A chaque temps de prélèvement (0, 24, 48, 96 et 144h), le nombre de cellules, le contenu en chlorophylle et de lipide ont été analysés en cytométrie en flux. Afin de mettre en évidence de possibles changements dans les rendements photosynthétiques des pigments chlorophylliens de la diatomée, des analyses de fluorescence PAM (pulse-amplitude modulated) ont été effectuées. L'absence d'effet du rGO nous a amené à nous focaliser uniquement sur le GO pour le reste des expériences. La capacité du GO souvent reporté dans la littérature à induire un effet d'ombrage a aussi été étudiée. La possible adsorption d'éléments sur le GO et pouvant favoriser la croissance a été évaluée par ICP-OES. Les processus de sédimentation et de collage des nanoparticules ont été suivis à l'aide de mesures de densités optiques (DO) dans la colonne d'eau, le collage dans les biofilms a été évalué par densitométrie avec l'utilisation d'image J, un logiciel de traitement d'image. Ces interactions ont aussi été imagées par microscopie électronique à balayage (MEB). Finalement les possibles modifications moléculaires du GO après une exposition de 144h avec *Nitzschia palea* ont été analysées par spectroscopie RAMAN.

Les résultats ont premièrement mis en évidence la capacité du GO, et non du rGO, à augmenter la croissance de la diatomée à 1 et 10 mg/L. Les expériences liées à la photosynthèse de *Nitzschia palea* ont mis en évidence que celle-ci pouvait contrer l'effet d'ombrage du GO en augmentant son contenu

en chlorophylle sans que le rendement de ceux-ci soit affecté. Ces augmentations du taux de chlorophylle ne sont observables que les premières 48h. Ces résultats ont pu être mis en relation avec la sédimentation et le collage du GO dans le biofilm durant cette même période de temps. Le collage induit par les EPS permettrait un éclaircissement de la colonne d'eau. L'observation au MEB du biofilm après 144h d'exposition au GO met en avant une étroite relation entre les EPS et les nanoparticules. Contrairement à ce qui a déjà été reporté dans la littérature avec les GBMs, aucun dommage mécanique et physique n'a été observé sur les cellules. Cette protection viendrait donc du collage des EPS jouant le rôle de barrière. Ceci a soulevé l'hypothèse de la modification du GO dans le biofilm. Les résultats RAMAN démontrent qu'après 144h, le GO est réduit et présente plus de défauts que le GO initial. Les différents groupements oxygénés pourrait servir dans des réactions extracellulaires, comme par exemple l'oxydation des EPS, leur permettant d'être mieux assimilés par la diatomée favorisant l'hétérotrophie de cette algue. Ces résultats sont en accord avec l'augmentation de croissance observée après 48h de culture dans l'obscurité totale de ces algues en présence de GO.

Effects of graphene oxide on the diatom *Nitzschia palea* are associated with carbon cycling disturbance

Paul Braylé[1]; Eric Pinelli[1]; Benoît Schoefs[2]; Emmanuel Flahaut[3]; Jérôme Silvestre[1]; Laury Gauthier[1]; Maialen Barret[1]*

[1]Laboratoire d'écologie fonctionnelle et environnement, Université de Toulouse, CNRS, Toulouse INP, Université Toulouse 3 – Paul Sabatier (UPS), Toulouse, France

[2]Metabolism Microalgal Engineering and Applications (MIMMA), Biologie des Organismes Stress Santé Environnement, IUML – FR 3473 CNRS, Le Mans Université, Le Mans, France

[3]Centre Inter-universitaire de Recherche et d'Ingénierie des Matériaux, Université Toulouse 3 Paul Sabatier, CNRS, INP Toulouse, Toulouse, France

Abstract

Graphene based nanomaterials (GBMs) have been drawing the attention of the scientific communities these past years. As their market is increasing every year, their potential environmental and health risk are to be assessed. As microbial communities represent the basis of every ecosystem, it is essential to evaluate the risks of GBMs on these communities and their different components. The effects of GBMs on bacteria has been widely studied, while the effects on phototrophic species are less represented in the literature. In this study, the diatom *Nitzschia palea* was exposed to two different GBMs, graphene oxide (GO) and reduced graphene oxide (rGO), at the following concentrations: 0.1, 1 and 10 mg.L^{-1}. rGO was found to have no effect on the diatom while GO at 10 mg.L^{-1} induced an increase in growth and chlorophyll contents. Further results showed that this growth increase did not result from an increase in the photosynthetic activities. The capacity of the biofilm formed by *N. palea* to stick and accumulate the GO was also underlined, favouring interactions between the biofilm and the GO which was visualized using SEM imaging. These interactions led to more defects and the reduction of GO as revealed by RAMAN spectrometry. In addition, increased heterotrophic activities were highlighted with GO, and led to different strategies in *Nitzschia palea*: lower concentrations (0.1 and 1 mg.L^{-1}) induced a storage of lipids, while with the highest concentration, the energy surplus could explain the differential growth between control diatoms and diatoms exposed to 10 mg.L^{-1} of GO.

Keywords: 2D nanoparticle – microalgae – biofilm - photosynthesis – heterotrophy

1. Introduction

In 2004, graphene was exfoliated from graphite for the first time by Novoselov and his co-workers (Novoselov et al., 2004). This discovery has led to the emergence of a multitude of graphene-based nanomaterials (GBMs) such as graphene oxide (GO) and reduced graphene oxide (rGO). Thanks to their unique properties, GBMs are used in a wide range of industries for electronics, photonics, clean energy and sensors (Huang et al., 2011), in regenerative medicine and biomedical devices (Kumar and Chatterjee, 2016), but also in environmental pollution treatment (Ch-Th et al., 2021; Lü et al., 2012). The applications and the market of graphene and its derivatives are continually growing and their value estimation is ranging from 180 million to 2.1 billion US dollars in 2025 (Reiss et al., 2019).

Even though GBMs are not yet detectable in the environment, their increased use will lead to their release in the environment such as surface waters. Microbial communities, especially biofilms, are at the basis of these ecosystems and endorse vital roles such as element cycling. Effect of GBMs on microbial mono species is a trending topic these past years. Showing the effects of GBMs at a community level is more environmentally relevant, but studying effects at single species level is also important in order (i) to understand the mechanisms of action of the nanoparticles and (ii) to determine the tolerance range of the species studied. Biofilms are composed of many species of bacteria, but also micro-algae and diatoms. Effects of GBMs on bacteria are today well documented in the literature and greatly reviewed (Hegab et al., 2016; Kumar and Chatterjee, 2016; Szunerits and Boukherroub, 2016). GBMs are described for their antibacterial activity related to oxidative stress, lipid peroxidation but also interactions with DNA. Even though the main effects of GBMs on bacteria are negative, some species seem to be more resistant than others, showing that GBM effects are species dependant. Despite their vital roles in carbon cycling and oxygen production (Benoiston et al., 2017), only few studies have been dedicated towards micro algae and especially diatoms. A review of the available literature establishes the negative impact of GBMs on the growth of micro algae, often related to a shading effect affecting the photosynthesis efficiency but also oxidative stress and physical damage (Du et al., 2016; Garacci et al., 2017; Malina et al., 2019; Nogueira et al., 2015; Yin et al., 2020; Zhao et al., 2017). Interestingly, in a complex community composed of bacteria and the diatom *Nitzschia palea*, GO had a positive impact on the division rate of the diatoms (Evariste et al., 2021). These results appeared contradictory with the negative effects on micro algae in multiple studies reported previously. The authors. hypothesized a differential balance between autotrophic and heterotrophic metabolism upon GO exposure, or an indirect effect resulting from the interaction with bacteria. Moreover, unlike micro algae studied in the literature, *Nitzschia palea* is benthic and lives in a biofilm embedded in exopolymeric substances (EPS). The study by Evariste *et al.* paved the way to

further investigations on *Nitzschia palea* alone in order to understand the mechanisms of action of GBMs on this diatom and to enrich the literature on the effects of GBMs on benthic microalgae.

In the present study, the effects of GO and rGO at 0.1, 1 and 10 $mg.L^{-1}$ were investigated on the diatom *Nitzschia palea*. First of all, the impact of GBMs on the replication capacity was analysed. Then, a series of experiments were done in order to gain insight into the effects of GO on the photosynthetic activities, such as chlorophyll content, shading effect and photosynthesis efficiency. To investigate more deeply the different interactions ongoing between the diatom cells and GO, the "sticking" of GO in the diatom biofilm was quantified and observed. The potential effect of GO on the bioavailability of the medium elements was also investigated. In order to evaluate the possible effects of *N. palea* on GO, RAMAN spectrometry was used for the nanoparticle characterisation. Finally, the possible enhancement of the heterotrophy of the diatom and related lipid contents were analysed.

2. Materials and methods

2.1. Preculture of the diatom *Nitzschia palea*

The diatom used for this experiment is a benthic axenic strain of *Nitzschia palea* CPCC160 provided by the Canadian Physiological Culture Centre of Waterloo University in Canada. The diatom was cultivated in sterile cell culture 100 mL flasks with SPE medium (Falcon 355001) (Garacci et al., 2017). Flasks were permanently agitated at 40 rpm at 20 ± 2°C and exposed under a LED white light delivering 50 µmol $photons.m^{-2}.s^{-1}$ with a cycle of 14h of light and 10h of darkness. Culture medium was changed every five days and the absence of bacterial contamination was checked using cytometry analysis with a SYTO9 marker (see 1.4 Cytometry analysis).

2.2. Graphene based materials

Two types of GBMs were used during this experiment: GO and rGO. The GO came from the "Antolin Group", prepared by exfoliation of carbon nanofibers of the "Grupo Antolin Carbon Nanofiber" (GANF®) (Grupo Antolin, Burgos, Spain) followed by an oxidation according to the Hummers method (Hummers and Offeman, 1958) and used as provided. The rGO was obtained from this same GO by a thermal reduction at 200°C in a H_2 atmosphere ($5L.h^{-1}$ flow rate), resulting in a partial reduction of the GO. These reduction steps and the characterisation of the different GBMs were all carried out by the "Centre Inter-Universitaire de Recherche et Ingénierie des Materiaux" (CIRIMAT) in Toulouse.

2.3. GBM-medium interaction

In order to evaluate the potential adsorption of chemical elements by GO in the culture medium, 10 mg.L^{-1} of GO were incubated in 15 mL of SPE medium for 24h and 5 replicates were done along with 5 replicates of SPE medium as a control. Samples were then filtered at 0.45 µm and acidified at 5% HNO_3. Dissolved elements were quantified by ICP-OES (quantification limit: 2–10000 µg.kg^{-1}, precision measure: 1–5%; AMETEK Spectro ARCOS FHX22, Kleve, Germany).

2.4. Effect of GO and rGO on diatom division rate, lipid and chlorophyll content

Exposure to GBMs was carried out in Falcon 6-well culture plates. Three concentrations of GO and rGO were tested: 0.1, 1 and 10 mg.L^{-1}. For each sampling point (t0h, t24h, t48h, t96h, t144h), three wells (triplicates) of each condition and control were prepared. Two days before exposure, wells were inoculated with 250 000 cells of *N. palea* in 1.5 mL of SPE medium to allow the diatoms to attach to the culture plates. At t0, diatoms were exposed to the different concentrations of GO and rGO and wells were all adjusted to 3 mL with SPE medium. Just before GBM addition, each suspension of GBM was bath sonicated for 1 minute in order to redisperse the materials.

In order to evaluate the effect of GO on the heterotrophy of the diatom (part 2.8), the protocol was slightly changed. Plates with control and 10 mg.L^{-1} of GO were placed in the dark for 48 hours just after the exposure started. Otherwise, all other factors were the same as described above.

At each sampling point, wells were gently scrapped in order to resuspend cells from the biofilm and samples collected from experiments were analysed by flow cytometry using a CytoFLEX© cytometer (Beckman Coulter) with a 488 nm excitation laser. Each experimental condition was analysed in technical triplicates of 200 µL of resuspended culture transferred into 96-well plates. Flow cytometry analysis was carried out on a homogeneous population based on the chlorophyll fluorescence in which reading doublets were avoided. Division rates were calculated using the following equation (Verneuil et al., 2015a):

$$Divison\ rate = \frac{\text{Cell concentration at sampling point} - \text{Cell concentration at t0}}{\text{Cell concentration at t0}}$$

Cytometry analysis coupled to fluorescent markers was used to investigate physiological changes in diatoms. Samples were incubated with Bodipy™ 493/503 at 1 µg.L^{-1} for 1 minute (Lynch et al., 2015) to mark neutral lipids and fluorescence was read at 525 nm. Chlorophyll content was also assessed, based on its natural fluorescence at 610 nm. At each sampling point, bacterial contamination was also investigated using a SYTO9 marker with 15 minutes of incubation at 5 µM (Vanhauteghem et al., 2019).

2.5. Shading effect of GO

The shading effect of GO was measured as described in the literature (Garacci et al., 2017; Verneuil et al., 2015a). The experiment consisted in exposing *Nitzschia palea* to shade induced by GO and by avoiding any contact between the biofilm and the GBM. Two 6-well culture plates were therefore overlayed and placed in a dark box allowing light to pass only through the top side. The bottom plate was inoculated with *Nitzschia palea* while the upper plate contained GO at 10 or 50 $mg.L^{-1}$. Exposure was then conducted as described in 1.4. Division rates and chlorophyll contents were then measured using the flow cytometry protocol detailed in 1.4.

2.6. Photosynthesis efficiency

For the photosynthesis parameters analysis, diatoms were grown in 6-well plates containing either 0 or 10 mg/L of GO. The exposure conditions were the same as detailed before. In addition to the 0h, 24h, 48h, 96h and 144h sampling points, additional sampling points were added each day: 8h, 32h, 56h, 104h and 152h. This was done in order to obtain information of the photosynthesis efficiency at the beginning and at the end of the light period. For each sampling point, growth medium was carefully discarded, removing at the same time cells that were not part of the benthic biofilm. Fresh SPE medium was then added (2 mL), and the biofilm was gently resuspended. The resulting suspension was transferred into 2 mL sterile tubes and placed in darkness for 15 min before fast fluorescence measurement using a Dual PAM 100 (Walz, Germany). Different parameters were determined: the maximum fluorescence yield (F_M), the minimal fluorescence yield (F_0) (mean of the florescence signal over 200 ms preceding the actinic illumination), the fluorescence yield at 300 µs ($F_{300\mu s}$) (used to determine the initial slope M0 of the relative variable fluorescence kinetics), the fluorescence yield at 2 ms (F_J) and finally the fluorescence yield at 30 ms (F_I). These yields were used to calculate different energy fluxes per reaction center (RC) (absorption, trapping, dissipation and electron transport) using the equations established by Stirbeta et al. (Stirbet and Govindjee, 2011).

2.7. 77k fluorescence spectroscopy

Three replicates of diatoms incubated during 144h with or without GO (10 $mg.L^{-1}$) were snap frozen in liquid nitrogen for 77K fluorescence spectrum recording using a Perkin Elmer LS-55B. The original spectra were treated according to the method described by Schoefs *et al.* (Schoefs et al., 2000). Excitation (440 nm) and emission (600-800 nm) slits were both set at 5 nm.

2.8. Sedimentation and "sticking" of GO

The sedimentation of GBMs was also assessed in 6-well culture plates and the experimental procedure was the same as described in section 1.4. A control without diatoms was also added in order to investigate the kinetics of GO sedimentation without diatom cells. At sampling times (t0h, t6h, t24h, t48h, t96h, t144h), 1.5 mL of top fraction of the water column was collected and the optical density was determined at 800 nm using a UVisco V-1600 spectrophotometer.

Once the liquid fractions collected, the wells were rinsed with SPE medium in order to remove all GO and diatoms that were not strongly attached in the biofilm. Six images of each well were recorded (18 per condition) using an Olympus SZX10 magnifier coupled with an Olympus SC30 colour camera. The images were then processed in ImageJ (v 1.53k, Wayne Rasband and contributors, National Institutes of Health, USA) for scaling, converting to a black and white binary images, optimising the colour threshold in order to detect the GO and finally calculating the surface covered by GO.

2.9. Scanning electron microscope (SEM)

To visualize the biofilm, SEM analyses were performed at the "Centre de Microscopie Electronique Appliquée à la Biologie" (CMEAB, Toulouse, France). In order to prepare the *Nitzchia palea* biofilms for SEM analysis, circular glass slides were deposited in the 6 wells of the culture plates. Exposure to GO was the same as described in 1.4. After 144h of exposure, the medium was removed and wells were rinsed with fresh SPE medium and emptied again. Adherent cells on the glass slides were fixed with 2% glutaraldehyde in Sörensen buffer at 0.1 M, pH 7.4, for 4 hours minimum. The slides were then washed in 3 consecutive water baths of 10 min. They were dehydrated in ascending alcohol solutions (30°, 50°, 70°, 95° for 10 min, and finally 15 min in 100° 3 times). Drying was then done by diverting the CO_2 critical point using a Leica EM CPD 300. Finally, samples were coated with 4 to 10 nm (60 mA) of platinum with a Leica EM MED020. Once samples were ready, SEM was performed with a FEG Quanta 250 FEI.

2.10. RAMAN analysis of GO

RAMAN spectrometry was used in order to evaluate possible alterations of GO after exposure with *Nitzschia palea*. Experiments were conducted on GO from experiments after 144h of exposure in 50 mL SPE in 100 mL Falcon 35501 flasks at 10 $mg.L^{-1}$ of GO. Different "types" of GO were identified for the analysis: the initial GO at 10 $mg.L^{-1}$ in SPE medium before exposure (GO 0H), the GO stuck in the biofilm after 144h of exposure (GO + DIATOMS 144H) and GO that was inoculated in SPE culture medium in absence of diatom cells (GO 144H) in order to observe the possible alteration of GO in the

medium alone. In order to separate GO from the diatoms, samples were sonicated in water baths for 10 minutes and deposited and spread on glass slides. All other samples underwent the same sonication and deposition on glass slides. In order to evaluate the possible changes in the RAMAN spectra resulting from interactions with extracellular components and components obtained after sonication, another control was added: diatom lysates were added to the GO 144H sample just before RAMAN analysis (GO 144H + *Np* lyses). RAMAN analyses were conducted by the team Equipex-Critex of the "Laboratoire de Chimie Agro-Industrielle" (LCA, INP, Toulouse, France). A LabRAM HR Evolution was used with the following parameters: 532 nm laser, 50 mW, 5% power reduction filter, x50 LWD (Olympus) long distance lens, 200 µm confocal hole, 5s acquisition and 7 accumulations. All spectra were then analysed in LabSpec 5 software. The baseline of each spectrum was redefined and the intensity of the D (I_D) and G (I_G) bands (respectively 1350 and 1580 cm^{-1} RAMAN shift) were recorded in order to calculate the I_D/I_G ratio of each GO type. The position of the peak of the different bands did not present any shifts between samples and/or conditions.

3. Results and discussion

3.1. Graphene based nanomaterials characteristics

As the effects and fate of GBMs can be greatly influenced by their properties, the characterisation of the different materials used is essential. The characteristics of the GO and rGO used during this study are summarized in table 1 and their SEM observation represented in figure 1. The 200°C thermal reduction of GO resulted in the loss of approximately half of the oxygen atoms that were in the form of C-OH, C-O-C and O=C-O in GO. RAMAN spectrums were also analysed and indicated an increase in the I_D/I_G ratio following the reduction. The increase of the I_D/I_G has been previously associated with the reduction of GO (Balaji Mohan et al., 2016; Minitha and Rajendrakumar, 2013; Wróblewska et al., 2017) but also with increased defects such as holes which are the result of loss of oxygen groups (Akhavan, 2015) and defects in edges generally due to the loss of carbon bonds (Bhatt et al., 2022). The reduction did not induce changes in the dimensional properties such as the number of layers, the lateral size and surface area. The surface chemistry of rGO was modified while the morphology remained the same, making the comparison with GO especially relevant. Oxygen and carbon content were comparable to GO in the studies of Yin *et al.* (Yin et al., 2020) and Malina *et al.* (2019). rGO used by Zhao *et al.* (2017) was more comparable to our GO, and the GO used in their study was much more oxidized, but lateral size were similar. Taken as a whole, the characteristics of the GO and rGO used in this study are in line those used in studies investigating the effects of GBMs on micro algae

Tableau 1 : Characteristics of GO and rGO used during the study and compared with other GO and rGO used in studies investigating effects on micro algae. at%: atomic %; HRTEM: high resolution transmission electron microscope; TEM: transmission electron microscope; BET: Brunauer-Emett-Teller

	GO (this study)	GO (Yin et al., 2020)	GO (Zhao et al., 2017)	GO (Malina et al., 2019)	rGO (this study)	rGO (Zhao et al., 2017)
Carbon content (at%)	68.62 %	66.1 %	39.1 %	-	83.01 %	62.3 %
Oxygen content (at%)	30.37 %	32.9 %	55.2 %	-	16.81 %	30.1 %
C/O	2.26	2.01	0.71	1.95	4.94	2.07
Csp2 graphene (at%)	35.5 %	-	-	-	64.5 %	-
C-OH / C-O-C (at%)	24.7 %	-	-	-	7.8%	-
C=O (at%)	2.5 %	-	-	-	5.8 %	-
O=C-O (at%)	5.3 %	-	-	-	1.3 %	-
Sat. (at%)	1.4 %	-	-	-	4.5 %	-
Number of layers (HRTEM)	1 – 5	-	-	-	1 – 5	-
Lateral size (TEM)	0.2 – 8 µm	-	2 µm	-	0.2 – 8 µm	1 µm
Surface area (BET)	152 $m^2.g^{-1}$	-	242 $m^2.g^{-1}$	-	155.7 $m^2.g^{-1}$	624 $m^2.g^{-1}$
I_D/I_G (RAMAN)	1.09 ± 0.06	-	0.86	0.98	1.26 ± 0.03	1.04

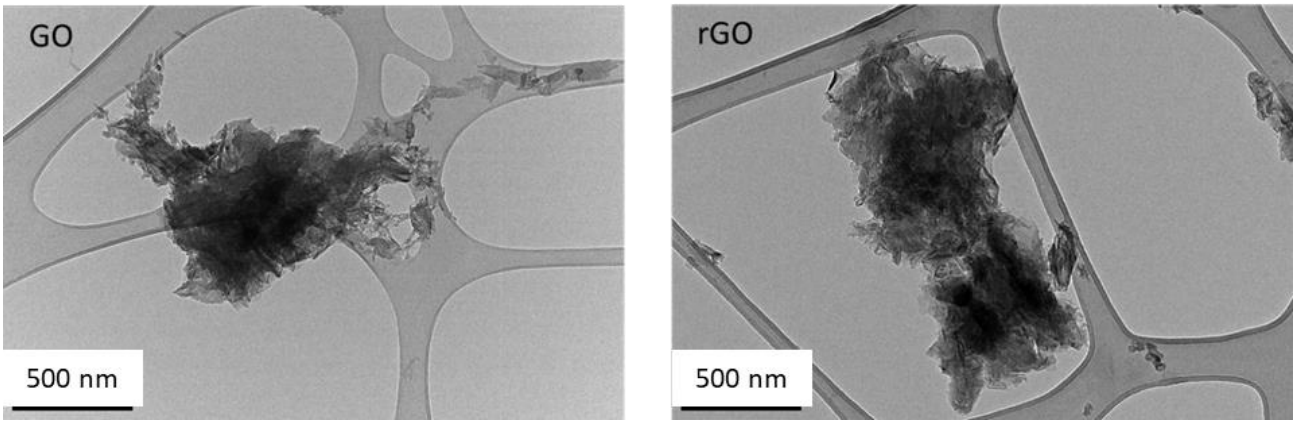

Figure 4-1 : TEM images of GO (left panel) and rGO (right panel

3.2. Increased division rate of *Nitzschia palea* by GO

Actual division rates of *Nitzschia palea* exposed to different doses of rGO and GO are presented in figure 2A and 2B. At the concentrations tested (0.1, 1 and 10 $mg.L^{-1}$), rGO had no significant effect on the diatom's division rate throughout the 144h of exposure. These results are opposite to the ones obtained in previous studies conducted on *Scenedesmus obliquus*, showing a negative effect of rGO at 72h of exposure in presence of 10 to 300 $mg.L^{-1}$ (Du et al., 2016), and on *Chlorella pyrenoidosa* after

96h with 20 to 200 mg.L^{-1} (Zhao et al., 2017). However, concentrations of rGO used in those studies were higher than the ones used in this present work. In the case of GO, it induced a dose dependent effect on the division rate. At 0.1 mg.L^{-1}, GO had no significant effect, regardless of the incubation time. At 1 mg/L, the actual division rate increased significantly at 48h. At 10 mg.L^{-1}, division increased significantly from 24 to 144h (ANOVA p-value < 0.05). These original results are not in line with the literature trend showing negative effects of GO on the growth rates of micro algae such as *Raphidocelis subcapitata* with 10 and 20 mg.L^{-1} (Nogueira et al., 2015) and with 0.39 to 200 mg.L^{-1} (Malina et al., 2019). Malina et. al also observed growth inhibitions with GO on the cyanobacteria *Synechococcus elongatus*. GO was also shown to have a negative effect on *Chlorella pyrenoidosa* (EC_{50}: 37.34 mg.L^{-1}) (Zhao et al., 2017). GO toxicity was often attributed to the formation of reactive oxygen species (ROS) leading to membrane lipid peroxidation, but also to mechanical physical damage. Interestingly, all these results were observed on pelagic algae whereas *N. palea* is a benthic diatom. The difference of GO effect on cyanobacteria (*Microcystis aeruginosa*), green algae (*Chlorella vulgaris, Scenedesmus obliquus* and *Chlamydomonas reinhardtii*) and diatoms (*Cyclotella sp*.) was tested. Even though it was shown that the diatom was one of the less affected species, growth inhibition was observed for all species tested with GO at 10 mg.L^{-1} (Yin et al., 2020). The diatom *Cyclotella sp*. was however not cultivated in the benthic biofilm form of life, while the biofilm form of life seems to be an important factor in the response and resistance to pollutants (Evans, 2003). The only available data about the effects of GBMs on a benthic diatom was on *Nitzschia palea* exposed to FLG, showing no effect on division rate up to 10 mg.L^{-1} (Garacci et al., 2017). FLG being more comparable to rGO than GO in terms of oxygen content, our results obtained upon rGO exposure corroborate the study of Garacci *et al*.. Our study suggests that the beneficial effect of GO on *Nitzschia palea* is strongly associated with its oxygen content. Although the ecotoxicity of GO and rGO had not been previously investigated on any benthic diatom species, one study investigated the effect of GO at 10 mg.L^{-1} on a complex biofilm composed of a bacterial community and *Nitzschia palea* (Evariste et al., 2021). The authors reported an increase in the division rate and suggested that these benefits were due to the association with the bacterial compartment. Our study proposes another hypothesis since *Nitzschia palea* benefited alone from the presence of GO.

3.3. Chlorophyll content increase and minor shading effect upon GO exposure

The dynamics of the chlorophyll relative content along the exposure time exhibited a similar pattern to the division rates. On one hand, all concentrations of rGO tested had no effect on the chlorophyll content compared to control (data not shown). On the other hand, GO at 10 mg.L^{-1} had a positive effect (figure 2C, ANOVA p-value < 0.05) on the chlorophyll content as soon as at 24h. We also

observed an increase with 1 mg.L^{-1} and a non-significant increase with 0.1 mg.L^{-1}. At 10 mg.L^{-1}, the chlorophyll content increase was observed at each sampling point except at 96h. Two previous studies showed decreases of chlorophyll contents in the presence of GBMs, which were related to decreased growth rates (Du et al., 2016; Yin et al., 2020). *Nitzschia palea* being mainly a phototrophic organism, and while observing an increase in its division rate, the increase in the chlorophyll content could be explained by a higher photosynthetic activity to sustain growth. A similar increase in chlorophyll content was reported with 10 mg.L^{-1} (Evariste et al., 2021) where GO had a positive impact on the division rate of *Nitzschia palea* cultured with a bacterial consortium. Besides, in a recent study with multiwall carbon nanotubes (MWCNTs), chlorophyll contents of the green microalgae *Dunaliella salina* was found to increase while the growth was inhibited (Zamani, 2023). Authors suggested that this increase was a strategy for compensating the shading effect induced by nanoparticles. Shading effect was indeed reported by GO on algae (Zhao et al., 2017) and also with FLG at 50 mg.L^{-1} on the diatom *Nitzschia palea* (Garacci et al., 2017). The increase in chlorophyll content observed in our experiment with GO could be a compensatory response to a potential shading effect.

The results of the shading effect experiment are presented in figure 2D. The shading resulting from 10 and 50 mg.L^{-1} of GO had no impact on the division rate of *Nitzschia palea* (ANOVA p-value > 0.05). Interestingly, the chlorophyll contents increased with both concentrations (ranging from 4 to 10% increase with 50 mg.L^{-1}, from 1 to 6% with 10 mg.L^{-1}), with the higher concentration inducing a higher increase in the chlorophyll content. These results confirm the hypothesis that the increased chlorophyll content during a normal exposure could be a strategy for overcoming the shading effect of GO, as already suggested in the literature (Zamani, 2023). Nevertheless, this shading compensation partially explained the chlorophyll content increase: after 24h of exposure with 10 mg.L^{-1} of GO, it represented +4.3% in shading condition against +13.0% in regular exposure. These results thus showed that the growth and chlorophyll content increase of *Nitzschia palea* did not only rely on a shading compensation but also on a contact with this GBM, either through a direct GO-diatom contact or indirectly through the biofilm matrix or the medium.

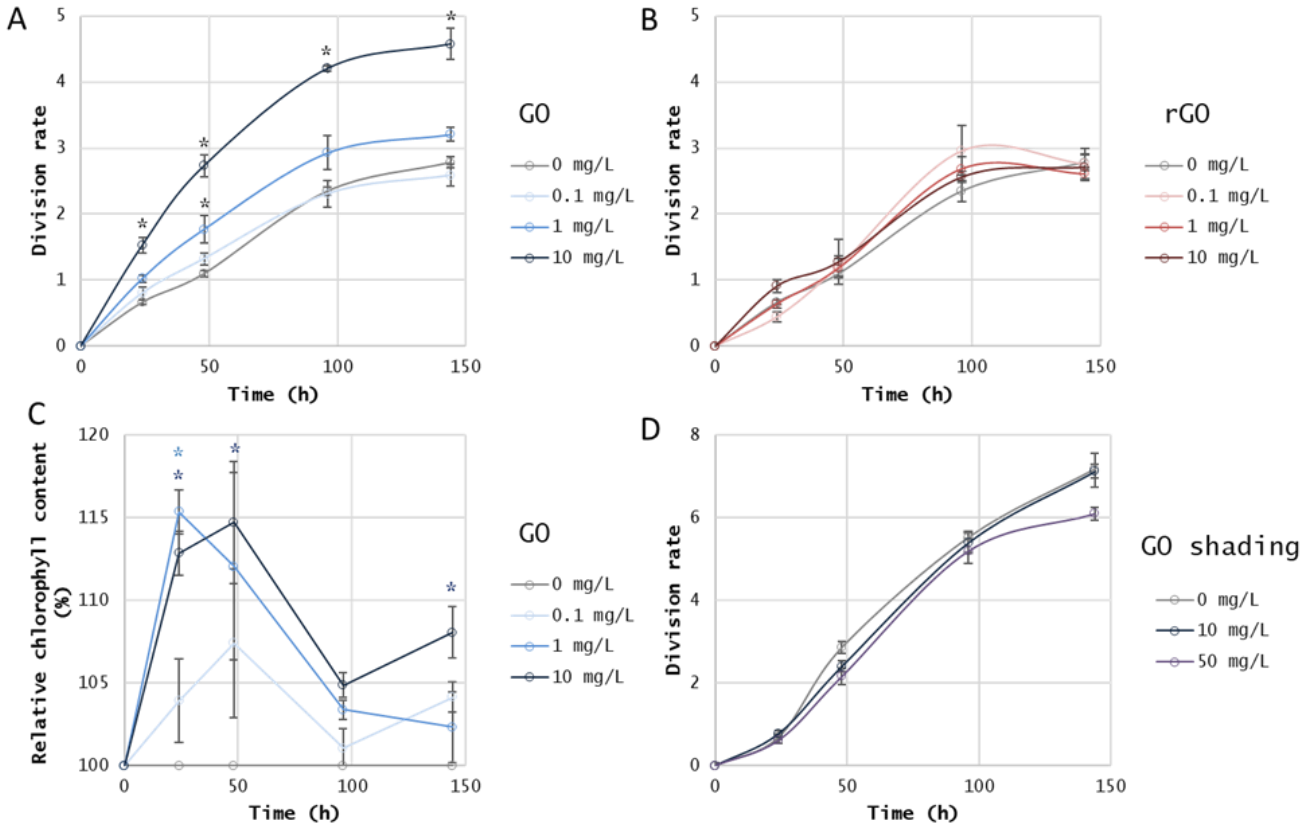

*Figure 2 : Division rates of Nitzschia palea when exposed to GO (A), to rGO (B) and to the shading of GO (D). Chlorophyll content in Nitzschia palea exposed to GO (C). * represents significant differences (ANOVA p-value < 0.05).*

3.4. Unchanged photosynthesis efficiency

Dynamic changes in chlorophyll fluorescence yield is a non-destructive method providing information on how the absorbed energy is managed in the photosynthetic membranes, serving as a proxy for estimating the organism fitness (Roháček et al., 2008). The photosynthetic machinery is composed by two photosystems working in series. The electrons are generated at the photosystem II (PSII) and transported to photosystem I (PSI) along an electron transport chain including the primary and secondary PSII electron acceptors, namely Q_A and Q_B. A typical OJIP Chl fluorescence induction kinetics recorded with nontreated samples is displayed in figure 3A. The capacity of the different samples to capture photons (ABS/RC parameter) was not affected by the presence of GO (figure 3B) while the relative chlorophyll cellular quota increased (figure 2C). This suggests that the additional chlorophyll molecules were used to form additional photosynthetic units, with a light harvesting capacity (RC/ABS parameter (Clark et al., 2000) = 0.99) similar to that present in the diatoms cultured in the absence of GO (RC/ABS = 0.91, t-student p-value > 0.05). Interestingly, energy trapped by RCII (TR_0/RC parameter), the energy used for injecting electrons in the photosynthetic electron transport chain (ET_0/RC parameter) and the flux of energy dissipated as heat and/or fluorescence were not

significantly different in the presence of GO when compared to the control conditions indicating that the photosynthetic capacity of the diatoms was not affected by GO.

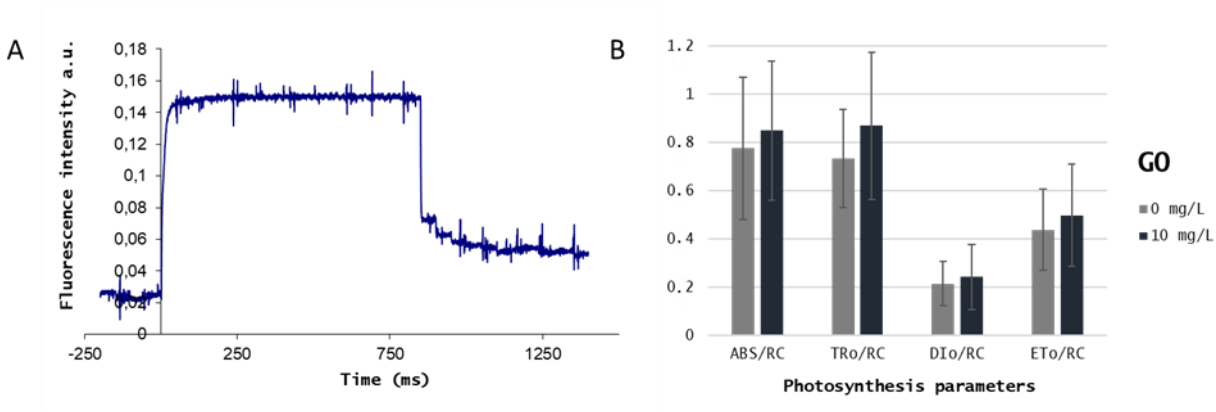

Figure 3 : (A) OJIP chlorophyll fluorescence induction kinetics of Nitzschia palea (B) Means of the different fluxes per reaction center of Nitzschia palea during the 144h of exposure to 10 mg.L^{-1} of GO compared to the control condition. RC: reaction center; ABS: Absorbance; TRo: Trapping; DIo: Dissipation; ETo: Electron transport.

The 77K fluorescence spectrum of the nontreated sample presents two bands at 690 and around 712 nm (Fig 4A), reflecting the presence of PSII and PSI, respectively (Sugahara et al., 1971). The F712/F690 band ratio in control condition is 1.01. In chlorophyll c containing algae, this ratio varies considerably between taxa (Sugahara et al., 1971)and is impacted by the developmental stages (Lamote et al., 2003) and the environmental conditions (Brown, 1967). The 2nd derivative spectrum reveals the spectral heterogeneity of the 712nm band with components at 705 and 721 nm (Fig. 4B). The component at 705 nm is widely distributed among photosynthetic organisms (Table SD2). The band associated to PSII is also spectrally heterogenous with components at 650 and 667 nm, reflecting the presence of pigment-protein complexes of unknown origin. The short-wavelength fluorescence emission at 622 and 638 nm might reflect chlorophyll c not integrated in photosystems (Lamote et al., 2003).

Qualitatively, the presence of GO does not affect the 77 K fluorescence spectrum (figure 4A). In the absence of reference 77K fluorescence spectrum in the literature, it is difficult to decide how much the spectrum of *Nitzschia palea* presented in figure 4A is impacted directly by the presence of GO or indirectly through a delay in the assembly of the photosynthetic apparatus in the diatoms cultivated in the presence of GO. From the quantitative point of view, the F712/F690 band ratio was lower (0.84) in the presence of GO. The decrease of ratio could be interpreted by an increase of the PSII production by *Nitzschia palea* in order to optimize photon capture in an environment characterized by a shading effect. It is also possible that the decrease in the band ratio is related to a decrease in the PSII to PSI energy transfer (Butler and Kitajima, 1975), and would explain the small differences in intensity of the negative bands present in the 2nd derivative spectrum (figure 4B).

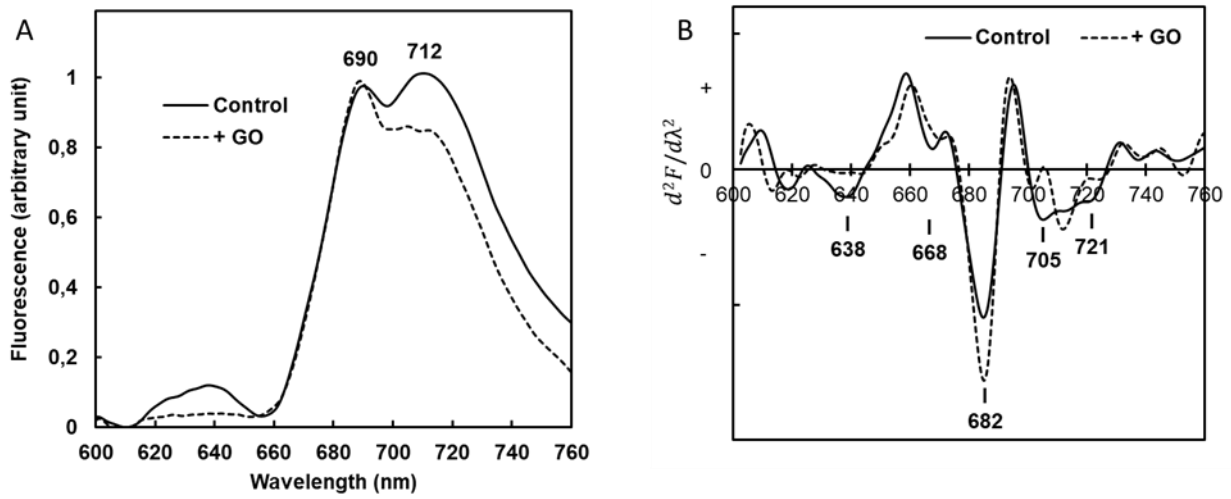

Figure 4 : (A) 77k fluorescence emission spectra of the diatom Nitzschia palea in control and exposed (10 mg.L-1 GO) conditions. (B) Second derivative spectra of the 77k fluorescence emission spectra of Nitzschia palea in control and exposed (10 mg.L-1 GO) conditions.

3.5. Sedimentation, "sticking" of GO and interactions with *Nitzschia palea*

To better understand the GBM-diatom interactions positively affecting the growth of *Nitzschia palea*, the GO sedimentation in the cell culture was monitored. The monitoring of OD values in the water column (figure 5A) results revealed that the presence of diatoms influenced the sedimentation of GO. In absence of diatoms, the 40 rpm agitation of the wells was enough to stabilise and maintain the GO dispersed in the water column until 144h. In the presence of diatoms, the OD in the wells containing 10 mg.L^{-1} decreased as soon as 24h (ANOVA p-value<0.05) and reached the values of non-exposed wells at 96h, showing a complete sedimentation of GO. Similar results were reported with FLG, but the sedimentation was faster (complete sedimentation at 24h) (Garacci et al., 2017). This slight difference is probably due to the different physico-chemical characteristics of the GBMs: as FLG is not oxidized, it is less stable in water than GO and therefore sediments faster.

Simultaneously with GO sedimentation, its sticking in biofilm was monitored and expressed as the percentage of surface covered (figure 5B). For concentrations below 10 mg.L^{-1}, the method was not sensitive enough to detect sticking. In presence of 10 mg.L^{-1}, a significant increase in the surface covered by GO was observed after 6h of incubation (ANOVA p-value < 0.05), and continued to increase with time with a maximum coverage observed at 144h. This accumulation of GO in the biofilm is in line with the sedimentation results (figure 5A) but also with the literature showing the capability of biofilms to retain and accumulate pollutants (Schorer and Eisele, 1997; Tahir and Yasmin, 2019). These results are consistent with the chlorophyll content dynamics (figure 2C): the increase in chlorophyll content in the first 24h could be partially related to the previously discussed shading effect, but after 96h, the

sedimentation and sticking of GO induced by the diatom supressed this shading effect, and the chlorophyll content decreased to reached similar values to that of control conditions.

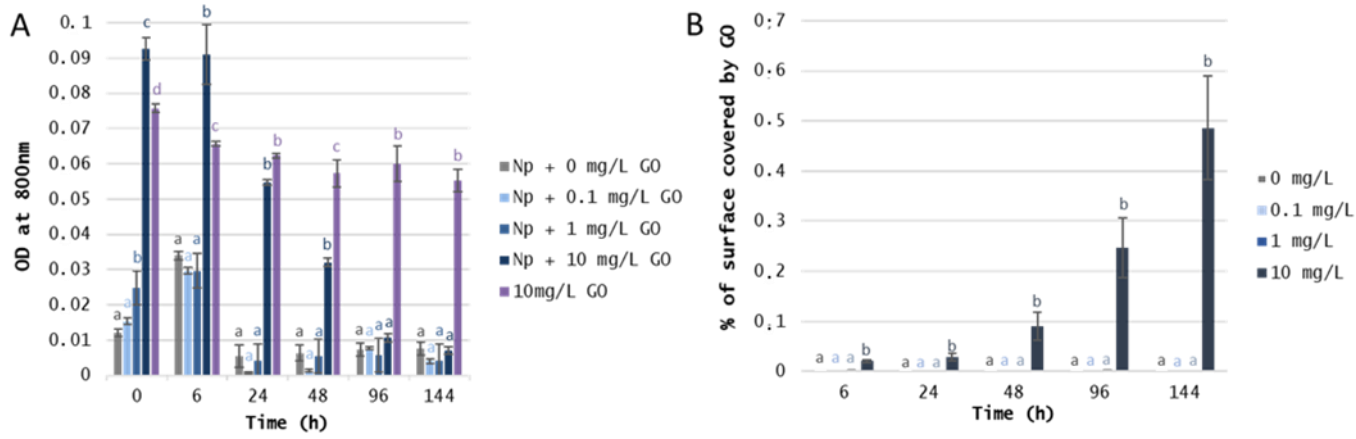

Figure 5 : Sticking of GO by Nitzschia palea through time. (A): OD at 800 nm of the water column as a function of time. (B): Percentage of surface covered by GO at the bottom of the well. Letters correspond to significantly different groups at each sampling point (ANOVA p-value < 0.05).

The SEM images derived from diatom growing in control conditions clearly highlights the diatoms and their EPS network attached to the glass slide (figure 6A) but also holding the cells together (figures 6B and 6C). In the exposed biofilm, GO was mainly found to be directly trapped into the EPS. A fraction of GO nanoparticles was captured in the EPS covering the glass slide (figure 6E, green frame), giving it a granular texture. A high proportion of GO was stuck and accumulated in the EPS binding the diatoms (figure 6E, yellow frame and figure 6F). These images are in accordance and confirm the previous results showing the "sticking" of the GO in the *Nitzschia palea* biofilm. GBMs are sharp and are known to damage the membranes of microorganisms (Zou et al., 2016). Physical damage to *Nitzschia palea* by FLG was previously observed by SEM (Garacci et al., 2017). However, GO particles are smaller than FLG and strongly stuck into the EPS produced by the diatoms. Despite all our observations (over 1000 cells), damage to diatoms frustule was never observed. This bonding of GO by EPS could greatly limit direct contact between GO and the cells, thus preventing physical damage by GO which is the main cause of membrane lipid peroxidation, oxidative stress and death. In addition to playing the role of barrier, the adhesion of GO in the EPS prevented the nanoparticles to obstruct the light received by the diatoms as it would when present in the water column. Finally, the observed accumulation of GO and its proximity with the biofilm could favour non-contact interactions between the nanoparticles and the diatom, which might explain the higher division rate observed.

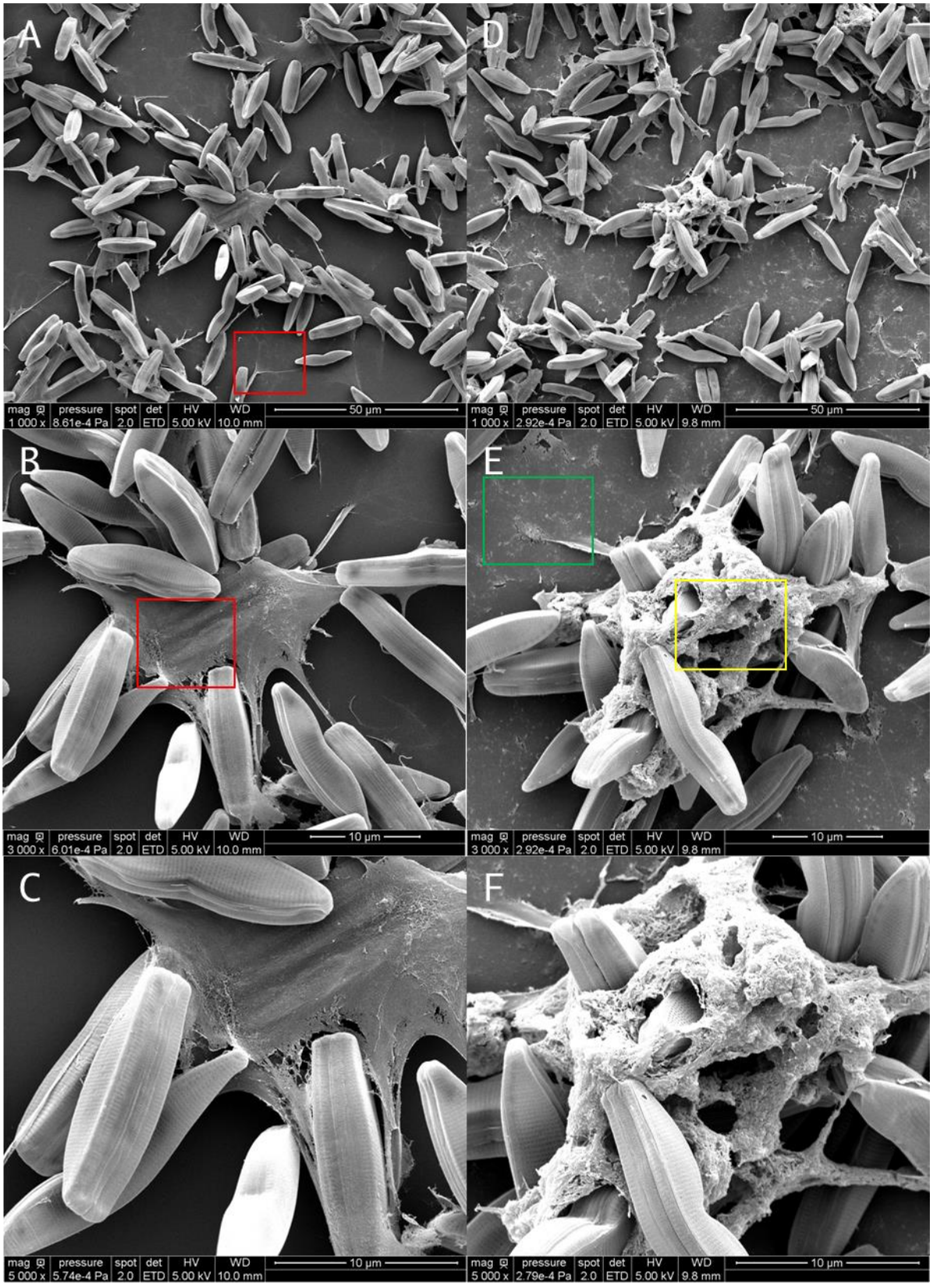

Figure 6 : SEM images of Nitzschia palea biofilm after 144h. A, B and C are images of the control biofilm at different magnification (x1000, x3000 and x5000 respectively). D, E and F are images of the biofilm exposed to 10 mg/L of GO (x1000, x3000 and x5000 respectively).

3.6. Effect of GO on the bioavailability of nutrients

One of the first possible interactions between GO and the biofilm could be the fixation of vital elements at the surface of GO, increasing their bioavailability once GO were stuck in the biofilm. GBMs were already reported to interact and adsorb mineral elements during the exposure of a bacterial community (Du et al., 2015). In the present study, the concentrations of elements that changed significantly (ANOVA p-value < 0.05) with the presence of 10 $mg.L^{-1}$ GO after 24h were the following: Al (-50.7%), B (-7.9%), Bi (-11.2%), Ca (-4.9%), Cl (-1.2%), Fe (-3.7%), Mg (-2.1%), Mn (+21.1%), Na (+0.9%), Si (-1.1%) and V (-9%) (all data presented in table SD2). A majority of these elements varied significantly, but the absolute variation was very low (ranging from -0.0001 to -0.005 mg/L) as the majority of these elements were only present as trace in the medium. The two elements that varied in a higher extent in terms of absolute difference were Ca (-0.2 $mg.L^{-1}$) and Cl (-0.3 $mg.L^{-1}$). Cl and Ca have a very important role in photosynthesis (Terry, 1977; Wang et al., 2019). The diatoms could have benefited from the fixation of these elements by sticking the GO in the biofilm which could induce the production of more reaction centers. But this is also very questionable as the concentration of Ca and Cl were already high in the medium (9.7 $mg.L^{-1}$and 29.6 $mg.L^{-1}$ respectively).

Interestingly, GO was shown to release Mn in the culture medium (+21.1%). This was predictable and in accordance with the Hummers method used in order to prepare GO, which uses potassium permanganate (Hummers and Offeman, 1958). Even though the variation of concentration was small (approx. 0.01 $mg.L^{-1}$), Mn is needed in small amounts and plays a crucial role in the photosystem II for water oxidation (Najafpour et al., 2020). For this reason, an experiment was conducted with the culture medium supplemented with 0.01 $mg.L^{-1}$ of Mn. This had no influence on the growth rate of the diatom cells (figure SD3).

Even though GO had the capacity to adsorb or release different nutrients, our results thus suggest that such interactions are unlikely to explain alone the increased growth.

3.7. GO modification after diatom exposure

RAMAN spectroscopy was used in order to reveal possible changes and modifications in the GO as indicated by the I_D/I_G ratio (figure 7). Increase in the I_D/I_G can be associated to a reduction and loss of oxygen content in GO (Minitha and Rajendrakumar, 2013; Shen et al., 2013) but also to increased defects (Beams et al., 2015). After 144h of exposure, interactions between GO and the culture medium as well as cell residuals resulted in a significant increase (ANOVA p-value < 0.05) in the I_D/I_G ratio. The observed modification of the GO by diatom lysate could also be the result of fast

reactions between cell elements, such as enzymes, and the nanomaterial. More importantly, the increase in the ratio (ANOVA p-value < 0.05) when GO was exposed with diatoms (1.11 to 1.22) overwhelmed the cumulative effect of GO-medium and GO-cell lysate interactions, revealing that biologically active cells caused a part of this increase. A ratio increase of similar magnitude (1.40 to 1.55) associated to GO reduction by bacteria was previously reported in the literature (Boutchich et al., 2013).

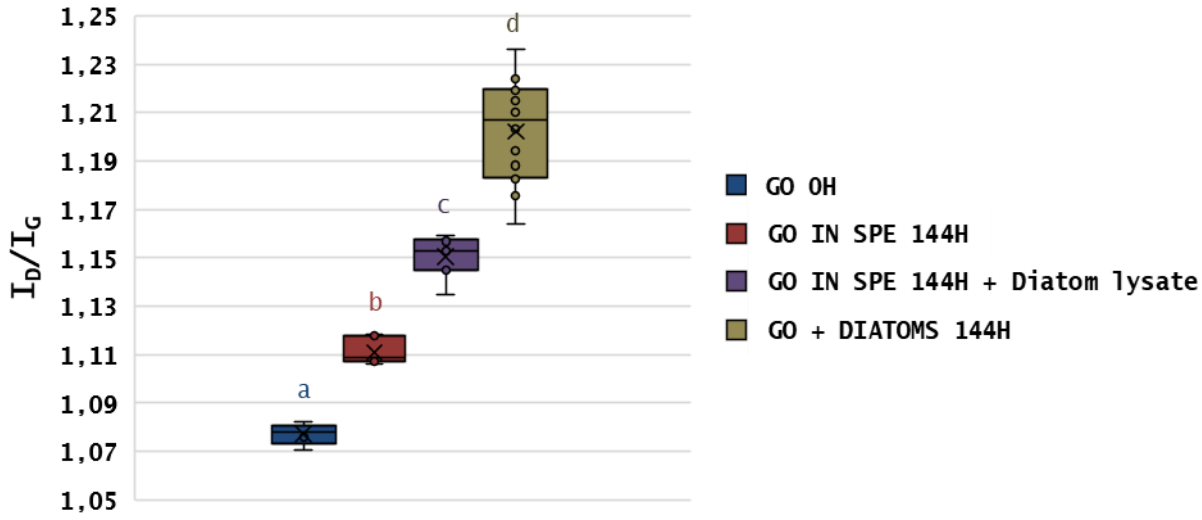

Figure 7 : I_D/I_G ratio of GO in different conditions. GO 0H: GO diluted in SPE before exposition. GO 144H: GO in SPE medium after 144h. GO 144H + Diatom lysate: GO in SPE medium after 144h with lysed diatoms added just before analysis. GO + DIATOMS 144H: GO after 144h of exposure with Nitzschia palea. Letters correspond to significantly different groups (ANOVA p-value < 0.05).

While there is a growing body of literature showing the potential of bacteria to reduce GO, data on algae remain scarce or even absent. It has been shown that reduction by bacteria could result from peroxidase type enzymatic activity (Chen et al., 2017). This type of enzymes are found in *Nitzschia palea* (Nguyen-Deroche et al., 2012). In our study, this enzymatic activity might have been upregulated upon exposure to GO, which could explain the reduction of GO by *Nitzschia palea*. The fact that rGO had no effect on the growth of the diatoms indicates that the oxygen-containing functional groups, more abundant in GO (Table 1), are related with the observed growth increase. The production by *N. palea* of enzymes able to reduce rGO being one hypothesis, another one is that the reduction of GO would be the consequence of interactions between the EPS and the nanoparticle along the 144h exposure. This could lead to the oxidation of the EPS and changes in their biochemical structure. As diatoms are able to assimilate energy and carbon from an external carbon source such as EPS (Villanova and Spetea, 2021), this second hypothesis could contribute to explain why the heterotrophic activity of *Nitzschia palea* was enhanced in presence of GO.

3.8. Possible enhancement of the heterotrophy of *Nitzschia palea*

In order to unravel the putative enhancement of heterotrophy in *Nitzschia palea*, the diatoms were exposed to GO in a dark condition in order to avoid photosynthesis and focus on the heterotrophy (figure 8). Exposure was carried out during 48h, since the growth enhancement was observed during the first 48 hours under dark/light conditions (subsection 2.2). The addition of GO induced a significant increase in growth after 24h and until the end of the 48h of exposure in the dark (ANOVA p-value < 0.05). This comforts our hypothesis on the possible enhancement of heterotrophic activity in *Nitzschia palea* with GO. Diatoms such as *Nitzschia palea* are well known to have a mixotrophic capacity (Tuchman et al., 2006). As rGO did not have any influence on the diatom's growth, the hypothetical use of the sp2 carbon present in graphene was excluded. If it was the case, the diatom would also have benefited from the carbon in rGO, and rGO would have induced a similar increase in growth to that induced by GO. However, carbon present in the different hydroxyl, epoxy and carboxyl groups, lost during the reduction steps of GO in rGO, could represent a potential carbon source. Moreover, the EPS produced during the first 48h before exposure settlement with a normal light/dark cycle also probably supported heterotrophy.

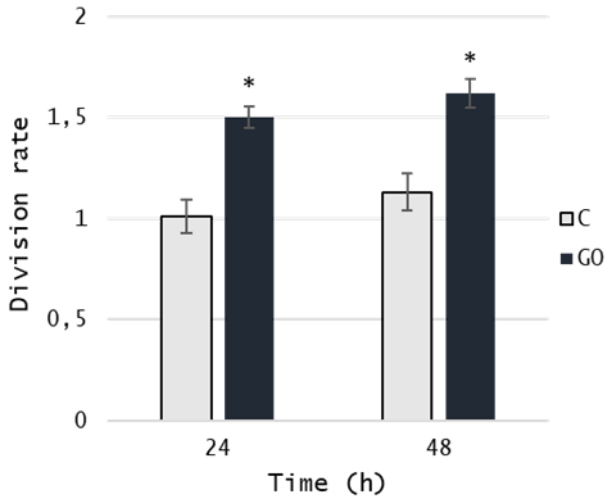

*Figure 8 : Division rates in dark conditions of control and exposed Nitzschia palea. * represent significant differences between each condition at each sampling point (ANOVA p-value < 0.05).*

3.9. Neutral lipid content

During heterotrophic activities, the production and storage of lipids such as triacylglycerols (TAGs) are generally increased in diatoms (Villanova and Spetea, 2021). This metabolic feature has led to the enhancement of the heterotrophy in diatoms, such as *Nitzschia palea,* for industrial applications (Touliabah et al., 2020). In order to evaluate the neutral lipid contents in the diatoms during a classical exposure to GO, we used a Bodipy marker and flow cytometry. This marker stains neutral lipids such

as TAGs in the diatom. After 24h hours of exposure, 0.1 and 1 mg.L^{-1} of GO induced a significant increase in lipid content (ANOVA p-value < 0.05) while 10 mg.L^{-1} had no effect on the lipid content (figure 9). The observed increase with 0.1 and 1 mg.L^{-1}could be first of all the result of an increased heterotrophic activity leading to a lipid storage. After 48h of exposure at 0.1 and 1 mg/L of GO, the lipid contents drastically dropped back to control values. It can be hypothesized that lipids hydrolysis provided the energy required for growth and EPS production. In the case of the exposure at 10 mg.L^{-1}, no significant changes were observed in the lipid content. Unlike the diatoms exposed to 0.1 and 1 mg.L^{-1}, those exposed to 10 mg.L^{-1} grew faster. In this case, it seems that the energy obtained by increased heterotrophic activity was not used for storage but to promote cell division. A slight, but not significant decrease is observed at 48h of exposure whatever the GO concentration. This could be, in the same case of 0.1 and 1mg.L^{-1}, the result of the use of lipid to produce EPS, which occurs at this time in addition to cell division. Our results thus suggest a dose-dependent response of *N. Palea* response to GO : the lower concentrations (0.1 and 1 mg.L^{-1}) induced a storage of the produced lipids, while with a higher concentration (10 mg.L^{-1}), the increase in energy production was invested to support growth.

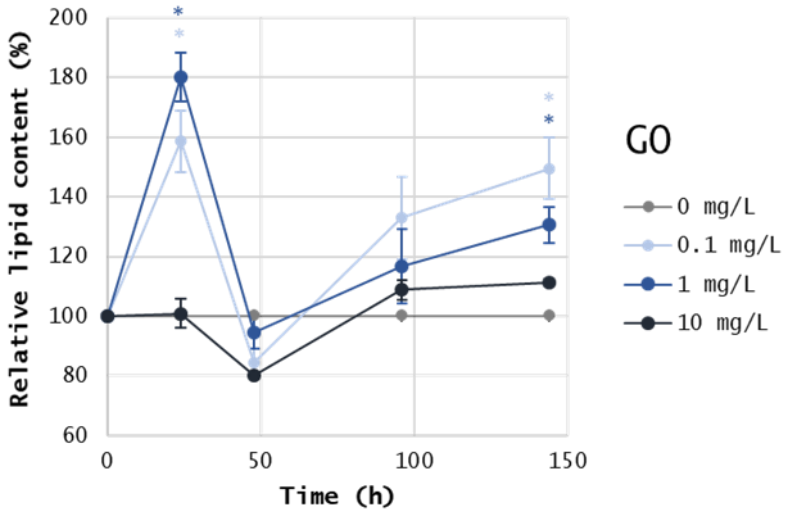

*Figure 9: Evolution of the relative lipid contents in Nitzschia palea during the 144h exposition to GO at 0.1 – 1 and 10 mg/L. * represents significant differences (ANOVA p-value < 0.05).*

4. Conclusion and perspectives

To conclude, this work demonstrated that GO stimulated the division rate of the diatom *Nitzschia palea*. Higher oxygen content present in GO was a key characteristic to the observed increase, since rGO did not influence the diatom growth. The phototrophic capacity of the diatom *Nitzschia palea* increased upon exposure to GO, with only a minor contribution of shading effect. These observations contrasted with the available literature on pelagic algae, which underlines the relevance and originality of this study conducted with a benthic diatom. Moreover, the benthic form of life of

Nitzschia palea resulted in GO sticking into the biofilm and water column purification. Sticking induced high proximity with the nanomaterials, which might explain why *Nitzschia palea* benefited from GO, probably through extracellular reactions which enhanced heterotrophic pathways. Future works should investigate the different ongoing interactions. A transcriptomic analysis could be interesting to understand the different mechanisms occurring by focusing on expressed genes related to potential enzymes known to reduce and degrade GO, but also expressed genes related to heterotrophic pathways and EPS production/consumption. As diatoms are at the basis of trophic chains, increases in heterotrophic pathways and growth could lead to environmental imbalance and disturbance of the carbon cycle.

Conflict of interest

All authors have declared that this article was carried out without any commercial and financial relationships that could be interpreted as a potential conflict of interest.

Acknowledgments

Authors would like to thank Brigitte Dubreuil from the “Laboratoire de Chimie Agro-Industrielle” (LCA) for her help on the RAMAN analysis, Isabelle Fourquaux from the “Centre de Microscopie Electronique Appliquée à la Biologie” (CMEAB) for her help for the preparation of samples for the SEM imaging, the European Union’s Horizon 2020 research and innovation program under grant agreement n°881603 and finally the French Ministry of Higher Education and Research for the PhD grant n°2020-11.

Supplementary data

Tableau 2 : Table SD1 ; None exhaustive presence of the fluorescent components around 705 and 720 nm in the 77K fluorescence spectra of algae. n.s.: not searched

Type of organisms	Taxon	Fluorescence bands		Reference
		705 nm	720 nm	
Brown marine seaweeds, thallus	*Ecklonia cava*	+	n.s.	Sugahara et al. (1971)
	Eisenia bicyclis	+	n.s.	Sugahara et al. (1971)
	Laminaria saccharina	+	+	Caron et al. (1985)
	Fucus serratus	+	+	Berkaloff et al. (1990)
Brown marine seaweed embryso	*Fucus serratus*	+	+	Lamote et al. (2003)
Green microalgae	*Chlamydomonas reinhardtii*	+	+	Wollman and Bennoun (1982)
Red microalga	*Rhodella violaceae*	+	+	Doan et al. (2003)
Diatoms	*Phaeodactulym tricornutum*	+	+	Sugahara et al. (1971), Berkaloff et al. (1990)
	Nitzschia palea	+	+	This study

Tableau 3 : Table SD2 ; Quantity of elements in ppm significantly different (t-student p-value <0.05) between the control (SPE medium alone) and GO condition (SPE medium + 10 mg.L^{-1} GO)

	Concentration in control (mg.L^{-1})	**Concentration with GO** (mg.L^{-1})	**Concentration equivalent to GO-absorbed fraction** (mg.L^{-1})	**% absorbed to GO**
Al	0.027 ± 0.002	0.0132668 ± 0.003	0.0136606	50.7
B	0.5528358 ± 0.005	0.5094432 ± 0.003	0.0433926	7.8
Bi	0.005107 ± 0.0003	0.0045354 ± 0.0003	0.0005716	11.2
Ca	9.6632 ± 0.02	9.1894 ± 0.05	0.4738	4.9
Cl	29.5418 ± 0.11	29.1936 ± 0.01	0.3482	1.2
Fe	0.1690998 ± 0.001	0.162838 ± 0.0008	0.0062618	3.7
Mg	2.1982 ± 0.005	2.1524 ± 0.008	0.0458	2.1
Mn	0.047115 ± 0.00008	0.0570782 ± 0.0002	-0.0099626	-21.1
Na	26.62 ± 0.07	26.3694 ± 0.1	0.2506	0.9
Si	12.708 ± 0.05	12.5644 ± 0.04	0.1436	1.1

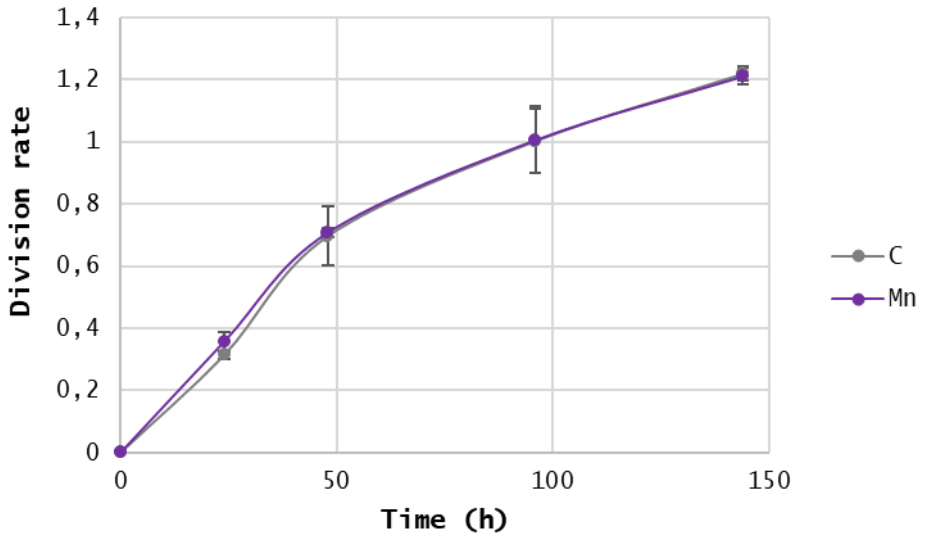

Figure 10 : Figure SD3 ; Division rate of Nitzschia palea in control condition and exposed to 0.01 mg.L^{-1} of Mn

5. Expérimentations supplémentaires

5.1. Validation de l'augmentation du taux de croissance de *Nitzschia palea*

Bien que les interférences mises en évidence entre cytométrie en flux et GBMs soient négligeables à 10 mg/L et en-deçà, le résultat d'augmentation de croissance a été confirmé en la mesurant par une méthode différente de la cytométrie.

L'exposition de *Nitzschia palea* à 10 mg/L de GO et rGO s'est faite comme décrite précédemment (cf. chapitre 2 – 2.2.1.) dans des plaques de cultures cellulaires 6 puits, avec des triplicatas de puits par condition. A chaque temps de prélèvements (0, 48 et 144h), chaque biofilm de chaque puits a été resuspendu et homogénéisé et la solution résultante a été utilisée pour effectuer un comptage en cellule de Malassez (figure 11). Deux à trois gouttes de suspension ont été dispersées entre la lame de Malassez et une lamelle. Le quadrillage de cette cellule présente 25 unités de comptage d'un volume de 0,01 µL divisé en 25 petits carrés. Pour chaque puits, le comptage s'est fait dans 10 unités de comptage aléatoires (soit 30 comptages de 0,01 µL par condition).

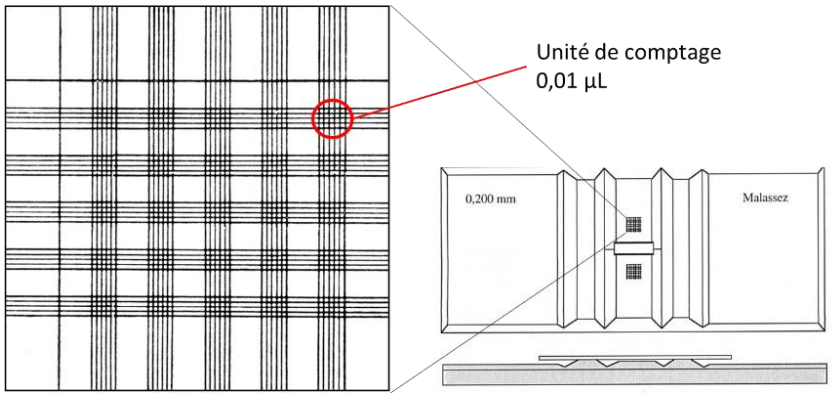

Figure 11 : Schéma d'une lame de Malassez et de ses unités de comptage

Les résultats du dénombrement par cellule de Malassez sont représentés en figure 12. Dès les premières 48h, on observe une augmentation du nombre de cellules en présence de 10 mg/L de GO par comparaison au contrôle, et ce jusqu'à la fin de l'exposition à 144h (p-value ANOVA < 0.05). L'ajout de 10 mg/L de rGO n'a eu aucune influence sur la croissance de la diatomée (p-value ANOVA > 0.05). Ces résultats viennent donc confirmer l'augmentation de croissance de *Nitzschia palea* par l'ajout de 10 mg/L de GO observée en cytométrie en flux.

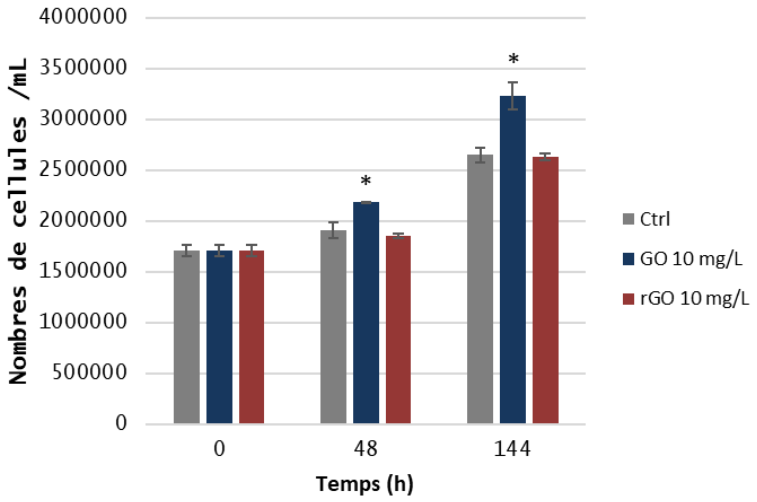

*Figure 12: Evolution du nombre de cellules de Nitzschia palea au cours du temps, en condition contrôle ou exposées à 10 mg/L de GO et de rGO. * représente une différence significative (ANOVA p-value < 0,05)*

5.2. Propriétés optiques du GO

5.2.1. Absorption lumineuse du GO

Afin d'évaluer l'effet d'ombrage que pourrait induire le GO pour les algues, la quantité de lumière absorbée par le GO dans la colonne d'eau a été mesurée dans des plaques de culture cellulaire à 6 puits. Trois réplicas des trois concentrations (0,1 – 1 – 10 mg/L) ont été préparés dans du milieu SPE dans un volume total de 3 mL (similaire aux conditions d'expositions). Des triplicatas de contrôle (milieu SPE seul) ont aussi été préparés. Les plaques ont été placées au phytotron et recevaient 50 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ de photons. La mesure de lumière perçue ($\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$) s'est faite sous chaque puit à l'aide d'un photomètre LI-250A (LI-COR® Biosciences). Les résultats obtenus suite aux mesures de lumière perçue sous les puits remplis aux différentes concentrations de GO et rGO sont représentés dans la figure 13.

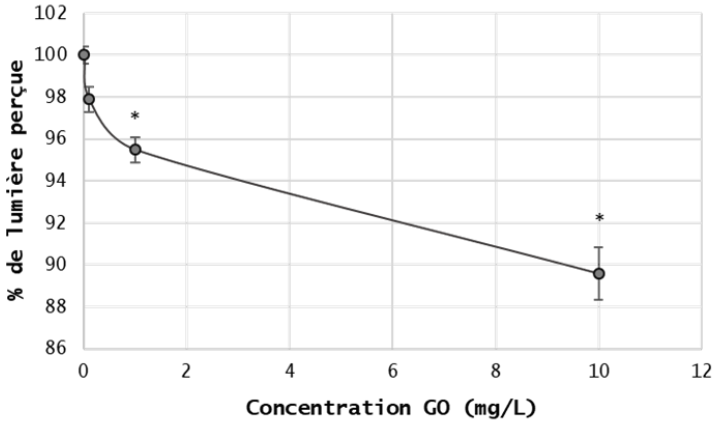

Figure 13: Pourcentage de lumière perçue dans le fond des puits en fonction de la concentration en GO

Les données ont été normalisées par rapport au contrôle (3 mL SPE, 0 mg/L). Dès 0,1 mg/L de GO, la lumière perçue dans les fonds des puits est légèrement plus faible, mais non significativement différente (p-value ANOVA > 0,05). A partir de 1 mg/L, la lumière perçue diminue significativement de plus de 4% (p-value ANOVA < 0,05) jusqu'à atteindre une perte lumineuse de l'ordre de 10% avec 10 mg/L de GO.

5.2.2. Spectre de transmission du GO

Le spectre de transmission du GO à 10 mg/L a été mesuré à l'aide d'un spectrophotomètre Perkin Elmer, modèle Lambda-25. Les mesures se sont faites dans des cuves en verre, avec un trajet lumineux de 1 cm. Les données sont exprimées en % de lumière transmise par longueur d'onde entre 400 et 700 nm.

Les pourcentages de lumière transmise par longueur d'onde sont représentés dans la figure 14. Les résultats sont cohérents avec l'absorption lumineuse du GO en puits. Entre 700 et 400 nm, le GO à 10 mg/L transmet en moyenne 76,8 % de la lumière. La différence avec les résultats obtenus en termes de lumière transmise (environ 90%) s'explique par un trajet optique plus court La lumière transmise entre 700 et 560 nm est relativement stable (75,6 %) tandis qu'entre 560 nm (longueur d'onde la plus transmise par le GO à 85%) et 400 nm, la transmission baisse de façon linéaire de 85% à 71,8 %.

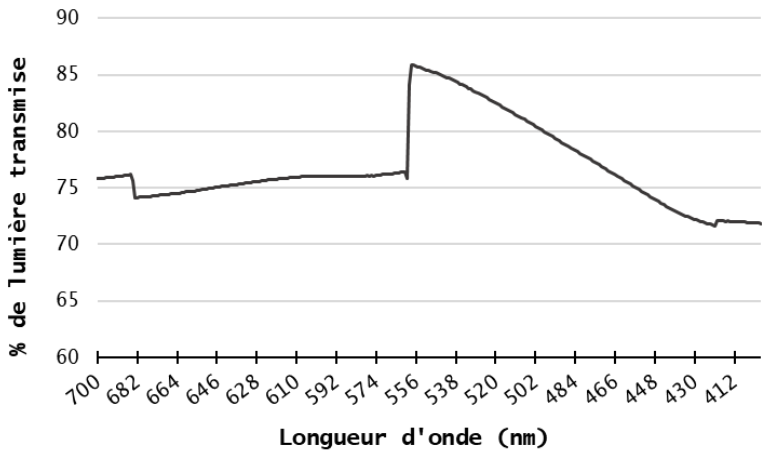

Figure 14: Spectre de transmission du GO à 10 mg/L de 400 à 700nm

5.2.3. Influence des propriétés optiques du GO sur *Nitzschia palea*

Les expériences menées sur les propriétés optiques montrent qu'en présence de 10 mg/L de GO, la lumière perçue par les diatomées diminue d'environ 10%. La perte d'intensité lumineuse reçue par les diatomées peut avoir des conséquences sur la physiologie de la diatomée, tel que sur la production de ses pigments chlorophylliens ou encore sa production de lipides (Jayakumar et al., 2021; Prins et

al., 2020). De plus, entre 400 et 500 nm, la transmission moyenne est de 74,8 %. Or les longueurs d'ondes d'excitation des différents pigments chlorophylliens se trouvent entre 400 et 500 nm ($ABSmax_{chl\text{-}a}$: 430 nm / $ABSmax_{chl\text{-}c}$: 444,5 nm). Il est donc envisageable que le GO à 10 mg/L ait une influence sur la lumière perçue par la diatomée et induit l'effet d'ombrage souvent répertorié (cf chapitre 1 – 4.). Afin de contrer cet effet d'ombrage (cf. chapitre 4 – 3.3.), *Nitzschia palea* voit son contenu en pigments chlorophylliens augmenter. Cependant, dans les 48 premières heures d'expositions, le GO se colle au biofilm et ce phénomène aboutit à l'épuration de la colonne d'eau, qui retrouve une densité optique similaire au contrôle (cf chapitre 4 – 3.5.). Bien que le GO à 10 mg/L ait la capacité d'influencer la lumière perçue par la diatomée, cet effet semble tout de même modéré, et le collage dans la biofilm restreint ce phénomène aux premiers jours d'exposition.

6. Comparaison avec une algue pélagique

La forme de vie benthique de *Nitzschia palea* et la formation de son biofilm à travers la production d'EPS semble être un facteur déterminant dans l'induction de sa croissance avec du GO. Afin de conforter cette hypothèse, l'algue pélagique *Raphidocelis subcapitata* a été exposée à du GO et rGO à 0,1 – 1 et 10 mg/L. Cette algue est une espèce dite bioindicatrice, présente à l'échelle globale et sensible aux différentes pollutions aquatiques. C'est pour cela qu'elle est grandement utilisée pour des tests écotoxicologiques (Amiard-Triquet et al., 2015). Bien qu'elle ait une forme de vie pélagique, cette algue produit aussi des EPS dans la colonne d'eau dont la production peut être modulée par la présence de nanoparticules comme des nano plastiques (Bellingeri et al., 2019). Cependant la forme de vie pélagique ne pourrait pas permettre une aussi forte proximité des algues avec les GBMs, créant un espace d'échange, d'interactions et de réactions extracellulaires comme dans un biofilm et qui pourrait être à la base de l'augmentation de croissance observée chez *Nitzschia palea.* Les résultats des expositions de *R. subcapitata* étaient aussi attendus au sein du projet Graphene Flagship. De ce fait, l'exposition s'est déroulée selon les normes OCDE 201.

6.1. Mise au point expérimentale et matériel et méthode

6.1.1. Mise au point expérimental selon la norme OCDE 201

La norme OCDE impose un facteur f de croissance (f=nbre de cellules au t72h/nombres de cellules au t0) de 16 pour le contrôle après 72h de croissance. L'essai en plaque 6 puits et avec du milieu SPE et une concentration initiale de 250 000 cellules pour 3 mL (condition d'exposition de *Nitzschia palea*) n'a pas abouti à ce taux de croissance. Le milieu SPE étant plus adapté à des diatomées (fortes concentrations en silice), de l'eau Volvic modifiée (composition en Annexe 2) a été utilisée pour les expositions. De plus, une agitation à 40 rpm induisait une sédimentation des cellules : l'agitation a été

augmentée à 100 rpm pour que les cellules restent en suspension et gardent une forme de vie pélagique. Afin de respecter la norme de croissance du contrôle, des essais ont été menés afin de déterminer le meilleur type de plaques et la concentration initiale en cellules à utiliser (tableau 4).

Tableau 4 : Conditions expérimentales de croissance de Raphidocelis subcapitata et facteur de croissance après 72h

Type de plaque	Concentration initiale en cellule (c/mL)	Temps (h)	Facteur de croissance
12 puits (2,5 mL/puit)	5000	24	5,6
		48	13,7
		72	29,3
	50 000	24	4,5
		48	11,3
		72	20,1
	250 000	24	3,9
		48	7,4
		72	13,5
	500 000	24	3,7
		48	6,4
		72	11,8
24 puits (1,5 mL/puit)	5000	24	3,6
		48	9,6
		72	67,8
	50 000	24	4,2
		48	8,2
		72	**37,3**
	250 000	24	3,6
		48	7,1
		72	16,2
	500 000	24	3,6
		48	6,1
		72	12,4

Plusieurs conditions respectent les normes de l'OCDE. Il a été choisi de faire l'exposition au GO et rGO dans des plaques 24 puits pour éviter de travailler avec un nombre de plaques trop élevées. La concentration initiale pouvait être de 5000, 50 000 ou 250 000 c/mL. 5000 était trop loin de l'exposition de *Nitzschia palea* (83 333 c/mL) et 250 000 semblait trop juste au niveau du facteur de croissance finale (x16,2). La concentration initiale en cellules choisie a donc été 50 000 c/mL.

6.1.2. Exposition de l'algue au GO et rGO

L'exposition aux trois concentrations de GO et rGO (0,1 – 1 – 10 mg/L) pendant 72h s'est donc faite dans des plaques 24 puits, dans un volume de 1,5 mL par puits d'eau Volvic modifiée dans le même phytotron qu'utilisé précédemment (cycle jour/nuit de 14/10h sous une lampe LED

délivrant 50 µmol.m^{-2}.s^{-1} de photons, 20±2°C) sous agitation permanente à 100 rpm. Trois réplicats par condition et par temps de prélèvements ont été préparés (24, 48 et 72h). A chaque temps de prélèvement, les puits ont été homogénéisés et 200 µL ont été transvasés dans des plaques 96 puits pour procéder à l'analyse en cytométrie en flux afin de déterminer les taux de croissance, les taux de chlorophylle et de lipides selon protocoles détaillés dans la partie cytométrie en flux (chapitre 2 – 3.).

6.2. Résultats

- Taux de croissance

Les taux de croissance de *R. subcapitata* exposée aux différentes concentrations de GO et rGO sont représentés dans la figure 15. Premièrement, les facteurs de croissance des cultures contrôles respectent bien les normes de l'OCDE (x35,9). Concernant l'effet des GBMs, aucune des trois concentrations de GO et rGO n'a eu un effet sur la croissance de l'algue au cours des 72h d'exposition. Une légère baisse du taux de croissance semble apparaître au bout de 72h avec les différentes concentrations de GO et 10 mg/L de rGO, mais n'est pas significative (p-value ANOVA > 0,05).

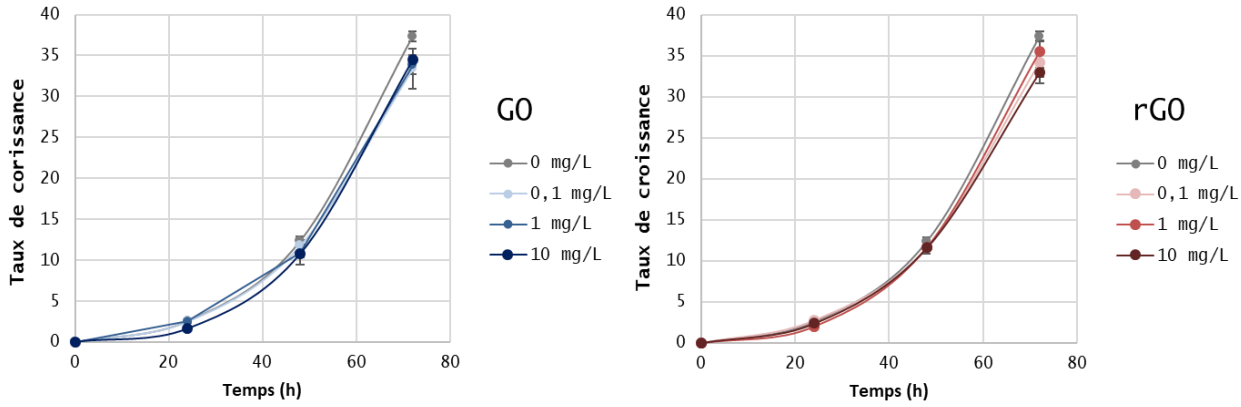

Figure 15 : Taux de croissance de Raphidocelis subcapitata à différentes concentrations de GO (panel de gauche) et de rGO (panel de droite)

- Taux de chlorophylle

Les variations des taux de chlorophylle dans les algues exposées au GO et rGO comparées aux cultures contrôles sont représentées dans la figure 16. Au bout de 24h d'exposition, ni le GO ni le rGO n'ont induit de changements significatifs des taux de chlorophylle, même si l'on peut observer une tendance à la diminution. C'est au bout de 48h qu'avec le GO, une baisse dose-dépendante est observée (p-value ANOVA < 0,05). Après 72h, une résilience est observée, revenant à la normale avec 1 mg/L et dépassant les valeurs du contrôle avec 0,1 mg/L. Les taux avec 10 mg/L restent encore bien en dessous des valeurs contrôles. Avec le rGO, la concentration de 10 mg/L induit aussi une baisse à 48h et une résilience est observable après les 72h d'exposition. La concentration de 0,1 mg/L de rGO a induit une légère augmentation significative (p-value ANOVA < 0,05) après 48h qui se stabilise jusqu'à

72h d'exposition. La concentration de 1 mg/L de rGO n'induit aucun effet significatif sur les taux de chlorophylle a (p-value ANOVA > 0,05) mais ces taux suivent la même tendance qu'avec 0,1 mg/L de rGO. Il semblerait que pour le GO et le rGO, l'influence des GBMs suivent une tendance similaire, avec des effets plus marqués avec le GO : légère baisse durant les deux premiers jours d'exposition et une résilience après 72h sauf pour le GO à 10 mg/L.

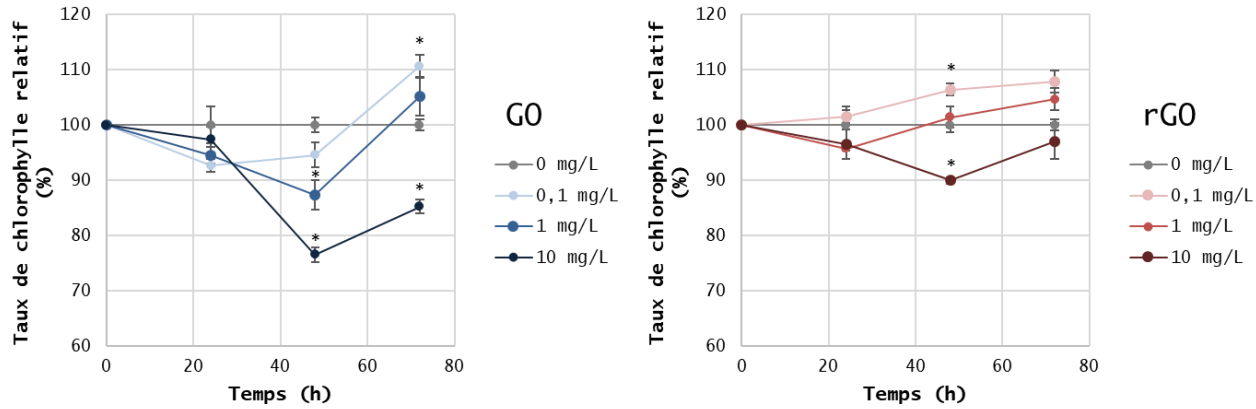

*Figure 16 : Evolution des taux de chlorophylle dans Raphidocelis subcapitata exposée à différentes concentrations de GO (panel de gauche) et de rGO (panel de droite). Les * correspondent à des valeurs significativement différentes du contrôle (ANOVA p-value < 0,05)*

- Taux de lipides

Les différents taux de lipides dans l'algue *R. subcapitata* sont représentés dans la figure 17. Malgré des variations semblant visuellement importantes, ni le GO ni le rGO n'ont induit de changement significatif dans les taux de lipides (ANOVA p-value > 0,05). Cela peut être discutable avec le GO même si les écarts types sont importants, les valeurs des p-value sont très proches du seuil 0,05 (ex. 48h, 10 mg/L GO, p-value ANOVA = 0,059 et 144h, 1 mg/L rGO, p-value ANOVA = 0,08). Dans la tendance, on observe, comme avec le taux de chlorophylle, une baisse des taux les deux premiers jours et une résilience après 72h d'exposition, voire une augmentation.

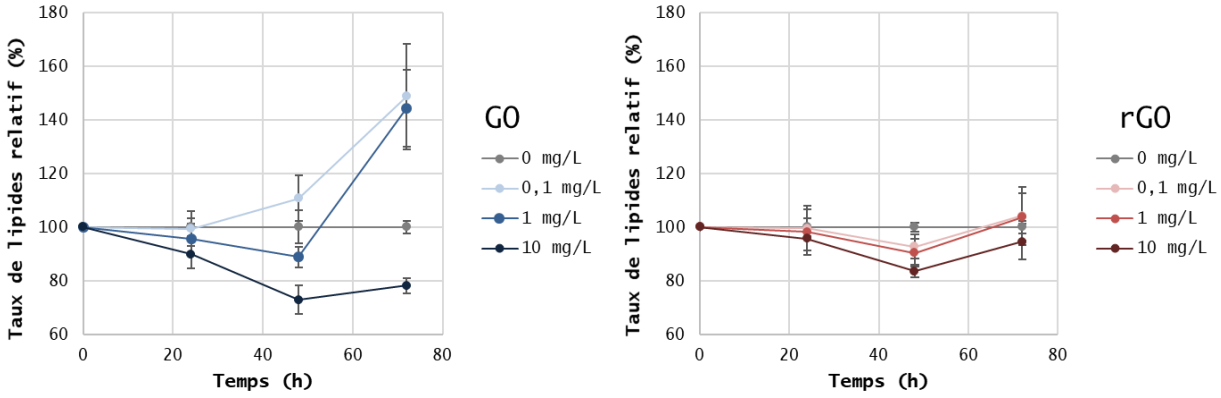

*Figure 17 : Evolution des taux de lipides dans Raphidocelis subcapitata exposée à différentes concentrations de GO (panel de gauche) et e rGO (panel de droite). Les * correspondent à des valeurs significativement différentes du contrôle (ANOVA p-value < 0,05)*

6.3. Discussion et conclusion

Les résultats obtenus lors des expositions de *R. subcapitata* sont semblables aux résultats présents dans la littérature. L'absence d'effets sur la croissance est le point le plus notable. En effet, il a été rapporté que le GO et rGO avaient un effet négatif sur la croissance de cette algue dû à un stress oxydatif et une perturbation de la paroi cellulaire par peroxydation des lipides (Nogueira et al., 2015a) mais aussi sur une algue largement utilisée pour les tests écotoxicologiques : *Scenedesmus obliquus* (Du et al., 2016). Mais dans ces études, les effets négatifs sur la croissance sont observables à des concentrations plus importantes que celles testés dans ces travaux de thèse (20 mg/L et 50 mg/L respectivement). Il semblerait que des concentrations de 10 mg/L et en dessous, ne soient pas suffisantes, pour induire des effets cytotoxiques. Les baisses de chlorophylle observées chez *R. subcapitata* dans notre étude sont en accord avec la littérature. En effet, des diminutions de taux de chlorophylle ont souvent été rapportées dans la littérature et ont été souvent associées à un effet d'ombrage des GBMs (Du et al., 2016; Garacci et al., 2017; Zhao et al., 2017) que nous avons confirmé dans la section 3.3. du chapitre 4. Les baisses de chlorophylle observées pourraient être un facteur expliquant la diminution des taux de croissance. Toutefois, cela n'a pas été le cas dans nos expérimentations. Après 72h d'exposition, nous pouvons observer une augmentation des taux de chlorophylle dans les cellules. Ces résultats peuvent être liés à une certaine sédimentation ou agrégation des GBMs, conduisant à un éclaircissement de la colonne d'eau et une diminution de l'effet d'ombrage. La baisse des taux de lipides observée les premières 24 heures pourrait être associée à une production d'EPS (non mesurée dans ces travaux), à l'origine du collage et de la sédimentation des GBMs. Les lipides servant de réserve énergétique chez cette espèce (Gonçalves et al., 2013). Cette réserve énergétique a pu être utilisée pour contrebalancer la possible perte d'énergie associée à la diminution du potentiel photosynthétique.

Les résultats obtenus avec *R. subcapitata* suite à une exposition à du GO et rGO apparaissent différents de ceux obtenus avec *Nitzschia palea*. Premièrement, le GO n'a pas eu d'effet bénéfique sur la microalgue contrairement à la diatomée. Deuxièmement, la stratégie pour contrer l'effet d'ombrage est différente : une augmentation des taux de chlorophylle est observée chez la diatomée tandis que l'on constate une baisse chez la microalgue. Il semblerait par ailleurs que cette espèce algale puise dans ses ressources lipidiques l'énergie nécessaire à sa croissance. Finalement, les teneurs en lipides semblent aussi opposées, une baisse chez la microalgue et une augmentation chez la diatomée. Cette différence de réponse pouvant s'expliquer par la capacité de *Nitzschia palea* à favoriser l'hétérotrophie en présence de GO. La forme de vie benthique de la diatomée serait un facteur majeur dans l'augmentation de l'hétérotrophie : sa forme de vie en biofilm serait un atout pour la fixation des GBMs

qui amélioreraient les voies hétérotrophiques de la diatomée. L'absence d'effet similaire chez une algue pélagique vient appuyer l'hypothèse que la proximité de *N. palea* avec le GO après un collage des matériaux dans son biofilm est un facteur déterminant dans l'amélioration de sa croissance.

Nitzschia palea est une diatomée résistante à l'exposition de GBMs à des concentrations de 0,1 à 10 mg/L. Elle contourne les effets généralement observés des GBMs grâce à l'augmentation de la production de pigments chlorophylliens et au collage des GBMs dans son biofilm. Elle tire même avantage du GO en augmentant son activité hétérotrophique, par des mécanismes rendus possibles par les fonctions oxygénées que porte le GO.

Chapitre 5 :
Discussion et conclusion

Au cours de ces travaux de thèse, le manque de connaissances sur les effets des GBMs sur des biofilms d'eaux douces mixtes mais aussi de diatomées seules a été mis en évidence. Par conséquent, l'influence de graphènes fonctionnalisés tel que le GO et rGO a été évaluée sur des biofilms mixtes, composés de microorganismes phototrophes et hétérotrophes mais aussi sur des biofilms monospécifiques de diatomée *Nitzschia palea.* Au travers les différents chapitres, a pu être mise en évidence la capacité du GO et du rGO à influencer la composition taxonomique des biofilms et les paramètres physiologiques des organismes présents, mais aussi la capacité du GO à augmenter la croissance de la diatomée *Nitzschia palea*. Ce dernier chapitre vise à discuter les résultats obtenus, en élargissant leur portée scientifique mais aussi à faire naître des perspectives de recherche.

Cette discussion s'articulera en 5 grands thèmes. Il sera d'abord abordé l'influence du mode de vie du biofilm benthique comparé au mode de vie pélagique dans la réponse des micro-organismes face à une exposition à des GBMs. L'influence du GO sur l'activité hétérotrophe de la diatomée *Nitzschia palea* sera ensuite discutée. Le degré d'oxydation des graphènes et son importance dans les effets observés sera aussi discuté. La complexité environnementale et son influence dans la réponse des biofilms face à une exposition à des GBMs sera par la suite mis en avant. Finalement, ce chapitre se clôturera par des hypothèses sur les possibles répercussions écosystémiques des effets des graphènes fonctionnalisés sur les biofilms d'eaux douces.

1. Influence de la vie benthique sur la réponse à l'exposition à du graphène fonctionnalisé

Le chapitre 4 portant sur l'évaluation de la toxicité du GO et du rGO sur la diatomée *Nitzschia palea* a permis de mettre en évidence des relations étroites entre les EPS du biofilm et les nanoparticules de GO. La capacité des biofilms d'eaux douces à accumuler des polluants via la production d'EPS est déjà largement documentée, que ce soit pour les pollutions métalliques (Cheng et al., 2018; Dong et al., 2003), organiques (Schorer and Eisele, 1997) ou encore les nanoparticules (Ikuma et al., 2015). L'accumulation du graphène et de ses dérivés est encore peu étudiée, mais les précédents travaux de Marion Garacci couplés à ces travaux de thèse mettent en évidence la capacité d'un biofilm de *Nitzschia palea* à accumuler des GBMs tels que le GO et le FLG. D'après la littérature, cette capacité de collage est attribuée à la production d'EPS. De plus l'affinité du GO et du rGO pour les EPS provenant de communautés microbiennes a déjà été mise en évidence (Lee and Hur, 2016). Le collage des GBMs dans les biofilms pourrait être interprété comme un facteur augmentant les possibilités de contact entre les microorganismes et les matériaux et donc augmenter la toxicité des GBMs qui se retrouvent en plus grande quantité sur une surface réduite en contact avec les cellules. A l'inverse, les EPS pourraient fournir une barrière physique protectrice pour les organismes et retarder leur contact avec

le polluant. Ce phénomène de barrière a déjà été mis en avant chez la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* avec des éléments traces métalliques (Teitzel and Parsek, 2003). Cultivée à la fois de façon benthique en biofilm et à la fois sous la forme pélagique, la forme benthique résistait jusqu'à 600 fois plus que la forme pélagique à l'exposition, notamment au stress oxydatif. Dans le cas de ces travaux de thèse, en plus de ne présenter aucune réponse négative face à une exposition à des GBMs, le GO a montré une influence positive sur la croissance de la diatomée dans sa forme de vie benthique. Il aurait été pertinent de vérifier l'effet du GO sur *Nitzschia palea* en la cultivant en suspension sous une forme pélagique (en empêchant sa sédimentation avec une forte agitation). Il est imaginable que la réponse de *Nitzschia palea* soit différente. Cependant, cultiver cette espèce sous une forme pélagique présenterait un stress qui risque de modifier la physiologie de cette espèce. Afin d'avoir des éléments de comparaison, il a été choisi de travailler avec l'algue pélagique *Raphidocelis subcapitata* dans des conditions quasi-similaires et aux mêmes concentrations de nanoparticules. A ces concentrations, aucun effet n'a été observé sur la croissance, mais seulement sur les paramètres physiologiques. Dans la littérature, il est démontré que des concentrations plus élevées avaient un effet négatif sur la croissance de *Raphidocelis subcapitata* et les algues pélagiques en général. Aux concentrations testées, nos résultats sur *Nitzschia palea* montrent le contraire.

La formation d'un biofilm benthique n'est pas réservée aux microalgues mais concerne plus largement les communautés microbiennes. Même si, au travers du chapitre traitant des effets du graphène sur les biofilms mixtes, l'absorption des GBMs et leur collage dans le biofilm n'a pas été mesuré, il est évident que ce phénomène est attendu et que la réponse de la communauté benthique et celle de la communauté pélagique soit différente. Dans une étude en microcosme ou des organismes ont été exposés à différents types de GBMs, les communautés microbiennes pélagique et benthique, provenant du même inoculum microbien de départ, n'ont pas évolué de la même manière en présence de GO ou de rGO. Ces résultats démontrent des effets différents en fonction du mode de vie des microorganismes (Evariste et al., 2020).

Ainsi, la vie benthique en biofilm semble offrir à la fois une protection physique des cellules aux GBMs, tout en maintenant ces matériaux à proximité. Les GBMs sont alors susceptibles d'interagir avec les EPS et/ou les cellules, dépendamment de leur niveau d'oxydation. Ces interactions semblent être au cœur de l'augmentation potentielle de l'hétérotrophie de *Nitzschia palea*, résultant en une augmentation de la croissance de ces cellules observées sur la durée des expérimentations (144h).

2. Le GO et son influence sur l'hétérotrophie de la diatomée *Nitzschia palea*

La stimulation de la croissance de *Nitzschia palea* par la présence de GO reste le résultat le plus surprenant de ces travaux de thèse et nécessite encore des éclaircissements pour en comprendre les mécanismes exacts. Il a été démontré au cours de ces travaux que le GO était plus fortement réduit en présence de cellules vivantes. Ce résultat souligne une implication des cellules dans la réduction du GO, cette réduction pouvant avoir lieu de manière directe (ex. production d'enzyme visant à réduire) ou indirecte (ex. suite à l'interaction avec les EPS produits par la diatomée). Le rGO n'induisant aucun effet sur la diatomée, il a été proposé que le GO de par ses groupements carboxyle, époxyde, hydroxyle, cétone…, participaient à des réactions extracellulaires promouvant l'hétérotrophie de la diatomée, car le GO possède ces groupements avec une densité supérieure au rGO.

Une première hypothèse (figure 1 – I) peut être l'interaction du GO avec les EPS, aboutissant à l'oxydation de composés carbonés, les rendant plus disponibles pour la diatomée. Cette hypothèse pourrait être vérifiée en analysant les EPS du biofilm après exposition au GO par chromatographie liquide haute résolution couplée à de la spectrométrie de masse. Ceci permettrait d'établir le profil des EPS présent après expositions au GO et de déterminer si les sources de carbones utilisables par la diatomée sont présentes en plus grande quantité.

Le rGO n'induisant pas de croissance, l'utilisation des atomes de carbone en état d'hybridation sp2 par la diatomée semble impossible. Cependant le GO possède aussi des atomes de carbone plus « accessibles » au sein des groupements oxygénées qui sont présents en moins grande quantitée dans le rGO, notamment les fonctions hydroxyl et époxy. Dans nos conditions d'exposition de 3 mL, ce carbone représente environ $0{,}9 \times 10^{-2}$ mg de C (33% de C non sp^2 dans le GO), alors que le carbone présent dans les cellules de diatomées supplémentaires entre la condition GO à 10 mg/L et contrôle après 144h d'exposition représente $1{,}17 \times 10^{-2}$ mg de C (832 920 cellules en plus, avec 14 pg C/cellule de *Nitzschia* (Linacre et al., 2021)). Bien que la quantité de carbone présent dans les fonctions oxygénées ne puisse pas expliquer et supporter toute la croissance supplémentaire observée en présence de GO, son utilisation, et notamment des groupements hydroxyl et époxy grandement perdu lors de la réduction en rGO, peut être une hypothèse. Dans ce cas-là, la diatomée produirait des enzymes capables de rompre certaines liaisons et libérer des groupements carbonés du GO, aboutissant à la libération de carbone libre et assimilable pour la diatomée. Cette hypothèse (figure 1 – II) pourrait aussi expliquer la réduction et l'augmentation de défauts observés sur le GO par spectroscopie RAMAN.

L'absorption de GBMs via la production de lysosomes a déjà été mise en avant chez la microalgue *Chlorella vulgaris* (Hu et al., 2015). Le GO pourrait être internalisé par *Nitzschia palea,* celui-ci participerait par la suite à des réactions intracellulaires, ou serait tout simplement dégradé et libérerait du carbone disponible comme décrit dans le paragraphe précédent. Il a aussi par exemple été démontré que les groupements oxygénés du GO participaient à l'estérification des glucides en di- et triglycérides (Gao et al., 2015) qui sont les produits finaux de la biosynthèse lipidiques et de l'hétérotrophie chez les diatomées (Zulu et al., 2018). Cette hypothèse (figure 1 – III) pourrait expliquer les augmentations de lipides observées durant une exposition à du GO. Cette possible internalisation pourrait s'observer à l'aide de carbone radiomarqué. Cette technique a récemment était utilisé pour démontrer que la micro algue *Chlamydomonas reinhardtii* avait la capacité d'internaliser le FLG, de le minéraliser en CO_2, et que celui-ci participait à des processus métaboliques vitaux tel que le cycle de Calvin (Lu et al., 2023).

Afin de vérifier ces différentes hypothèses, l'analyse transcriptomique de *Nitzschia palea* suite à une exposition à des GBMs serait un outil pouvant donner des informations cruciales sur les différents mécanismes biologiques mis en jeu. L'expression de gènes liés aux différentes voies métaboliques de l'hétérotrophie et de la biosynthèse des lipides, bien décrites et documentées dans la littérature (Zulu et al., 2018), seraient à analyser principalement, mais aussi des gènes liés à la production d'EPS, d'enzymes capables de dégrader/réduire le GO ou encore à la production de lysosomes.

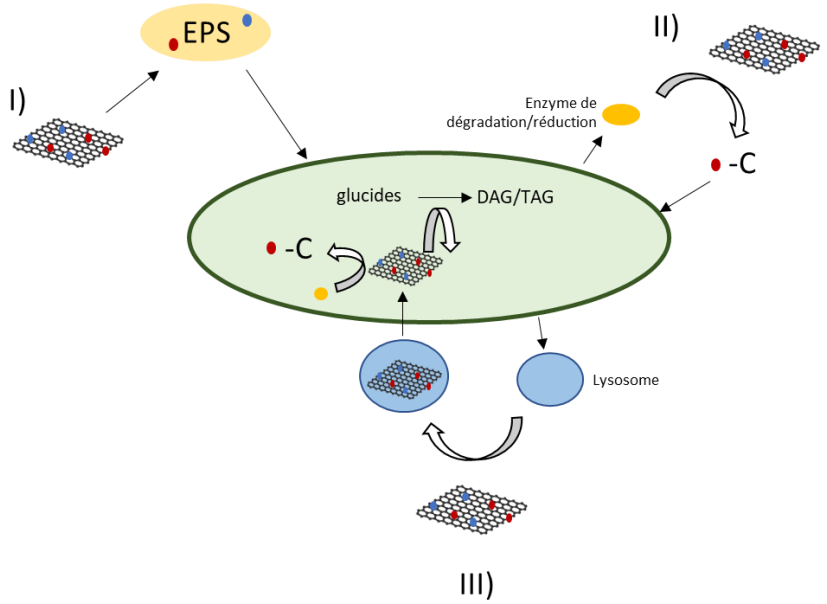

Figure 1 : Schématisation des différentes hypothèses des interactions entre Nitzschia palea et le GO. I) Les groupements oxygénés interagissent avec les EPS et les rendent plus facilement assimilable par la diatomée. II) La diatomée produit des enzymes capables de dégrader et réduire le GO, aboutissant à la libération de carbone assimilables. III) Production de lysosome par la diatomée et internalisation du GO : le GO est soit dégradé par des enzymes et utilisé par la diatomée, soit participe à la biosynthèse de lipides (estérification de glucides en DAG et TAG).

3. Influence du taux d'oxydation du graphène

Au cours de ces travaux de thèse, deux nanoparticules de graphène fonctionnalisées aux taux d'oxydation différents ont été étudiées : le GO (%O : 30,37) et le rGO (%O : 16,81). Avec une taille et surface spécifique similaires, les effets induits sur les biofilms n'ont pas été les mêmes. Bien que le rGO soit moins stable dans la colonne d'eau et soit amené à sédimenter plus rapidement (Zhao et al., 2014) et donc interagir avec les biofilms plus rapidement, seul le GO a induit des changements significatifs dans la composition de la communauté, mais a aussi été le seul à induire une augmentation de croissance chez la diatomée *Nitzschia palea* en culture pure. Ces travaux sont une mise en évidence de l'importance du taux d'oxydation des GBMs et donc de leurs caractérisations dans les études écotoxicologiques. La littérature traitant de l'écotoxicité des GBMs fonctionnalisés sur les différents organismes des écosystèmes aquatiques est en pleine expansion. Tandis que l'influence de la taille et du nombre de couches sur la toxicité de ces matériaux est bien étudiée (Perreault et al., 2015), l'influence du taux d'oxydation reste généralement utilisée pour justifier le comportement du matériel dans le milieu aquatique, et non pour déterminer son influence sur les effets écotoxicologiques (Ghulam et al., 2022). Effectivement, la présence de groupements oxygénés peut avoir, dans des milieux aqueux plus complexes, une forte influence sur le comportement des matériaux, comme décrit dans l'étude bibliographique de ce manuscrit. Ces nanomatériaux peuvent aussi interagir avec d'autres molécules (métaux, composés organiques…) et induire par exemple, des effets antimicrobiens plus importants. La toxicité de l'interactions entre GBMs et autres molécules a été évaluée dans plusieurs études, et est aussi au cœur de recherches visant à développer de nouveaux agents antimicrobiens (Lukowiak et al., 2016). On peut aussi attribuer au taux d'oxydation l'influence sur l'affinité avec les EPS (Lee and Hur, 2016) et donc le collage des matériaux. Le point le plus développé dans l'influence directe du taux d'oxygène dans la toxicité des GBMs est la capacité à induire du stress oxydatif chez les micro-organismes (Akhavan and Ghaderi, 2010; Gurunathan et al., 2012; Liu et al., 2011). Cependant, à travers la littérature (Braylé et al., 2022) et les expérimentations de cette thèse, il semblerait que les groupes fonctionnalisés du GO soient aussi impliqués dans des réactions extracellulaires pouvant influencer certains processus microbiens. La conductivité des GBMs, aussi influencée par le taux d'oxydation, peut aussi avoir une utilité dans des processus microbiens. Un des processus microbiens pouvant être influencé par le taux d'oxydation des GBMs est le transfert direct d'électrons inter-espèces (DIET) : une espèce productrice d'électrons en transmet à une espèce consommatrice. Il a été démontré que le rGO avait une meilleure capacité que le GO à améliorer ce phénomène et par la suite d'améliorer le procédé de méthanogénèse qui dépend du DIET (Igarashi et al., 2020). Bien que cela soit un facteur favorable dans le cadre d'un bioréacteur, cela reste une perturbation en milieu naturel. Il semble donc essentiel de poursuivre les efforts de recherche pour

comprendre les effets des groupements oxygénés des GBMs dans différents processus microbiens, ainsi que sur les voies métaboliques de ces organismes, afin de mieux cerner l'ensemble des mécanismes mis en jeu.

Dans les applications industrielles, le GO et le rGO n'ont pas les mêmes utilités (plus le matériel est oxydé, moins il est conducteur). Cependant, dans un cadre de « safer by design » et d'innovations plus sûres, de plus en plus considéré dans le cadre du graphène (Park et al., 2017), il est essentiel de prendre en considération le taux d'oxydation de ces matériaux et de relever le défi de proposer des matériaux moins néfastes pour l'environnement, tout en gardant une efficacité industrielle satisfaisante.

4. Influence de la complexité environnementale sur la réponse des biofilms à l'exposition à du graphène fonctionnalisé

Durant ce travail de thèse, les cellules de diatomée *Nitzschia palea* ont été exposées dans deux contextes différents : en culture pure ou bien associée à un consortium bactérien. On peut premièrement souligner que le GO a dans les deux cas induit des augmentations de croissance de la diatomée avec des changements physiologiques similaires. Cependant la réponse à une exposition au rGO conduit à des résultats différents : augmentation de la croissance et changement des paramètres physiologiques en présence d'une communauté microbienne, et aucun effet en culture pure. Dans le chapitre traitant des effets du GO et rGO sur la communauté, il est proposé que quel que soit le GBM utilisé, *Nitzschia palea* tire avantage de l'activité du consortium bactérien, modifiée en présence des GBMs, lui fournissant des éléments stimulant sa croissance. Effectivement, comme décrit dans le travail bibliographique de cette thèse, la vie en communauté et notamment en biofilm, apporte aux organismes présents la possibilité d'interagir avec d'autres espèces et de bénéficier positivement de ces interactions.

Cependant, en culture pure, ces interactions sont absentes et la diatomée profite aussi de la présence du GO en améliorant possiblement son hétérotrophie. Les résultats obtenus en culture pure ne peuvent pas confirmer ou infirmer les hypothèses émises au cours de travaux sur les effets en communauté, mais les complémentent. *Nitzschia palea* bénéficie du GO en augmentant son hétérotrophie, mais aussi des interactions avec le consortium bactérien dans le cas du GO et du rGO. Ces travaux sont un bon exemple de l'importance d'étudier les effets écotoxiques de polluants à différents niveaux de complexité environnementale. Plus la complexité augmente, plus le réalisme environnemental augmente, mais le nombres d'interactions et de facteurs aussi. L'étude monospécifique permet quant à elle, de déceler des mécanismes et des interactions qui seraient plus difficilement mis en avant dans des systèmes plus complexes.

A plus grande échelle, les biofilms sont soumis à d'autre facteurs pouvant influencer leur réponse à une exposition de GBMs : apport de nouveaux microorganismes par la colonne d'eau, interactions avec les niveaux trophiques supérieurs (broutage, apport de nouveaux microorganismes par les fèces…) et aussi tout un nombre de facteurs abiotiques telle que les saisons, les changements de température de l'eau, d'ensoleillement mais aussi la composition physico-chimique de l'eau. En effet, la composition physico-chimique aura une forte influence sur la composition de ces biofilms (Renner and Weibel, 2011), mais aussi sur le comportement des GBMs (Zhao et al., 2014).

Dans l'idéal, l'étude des effets des GBMs sur les biofilms devrait se faire *in situ* (non en ajoutant des GBMs dans les milieux naturels, mais avec ceux déjà présents), mais le nombre de facteurs présents en milieu naturel, incluant la présence d'un large panel d'autre polluants, rendrait l'analyse des effets provenant seulement des GBMs quasi-impossible. De plus, à l'heure actuelle, les concentrations présentent dans le milieu naturel sont très faibles et les techniques existantes de quantification des GBMs dans l'environnement ne permettent pas de les détecter correctement (Goodwin et al., 2018). C'est pour cela que l'étude des effets en laboratoire, dans des conditions contrôlées, à des niveaux de complexité environnementale plus faible, est un bon moyen d'appréhender les conséquences des GBMs sur les biofilms en milieux naturels. L'approche en mésocosme ou microcosme (Caquet et al., 2000; Landner et al., 1989), reconstruisant des écosystèmes aquatiques, permettrait d'étudier la réponse des biofilms aux GBMs, dans des conditions plus proches de la réalité, tout en les contrôlant. Elle permettrait aussi d'exposer des biofilms et des chaînes trophiques basées sur ces biofilms. Ces systèmes expérimentaux permettent également d'explorer différents scénarios : co-contamination, types d'expositions (chronique ou aiguë) ou encore la variation de conditions environnementales. Ce type d'exposition sera discuté dans la partie 5 de cette discussion.

5. Répercussions écosystémiques des impacts de graphènes fonctionnalisés sur les biofilms d'eau douce

Bien que ces travaux de thèse étudient l'effet de nanoparticules de graphène sur les biofilms d'eaux douces, les expositions ne permettent pas de déterminer les répercussions de ces effets à l'échelle de l'écosystème. Il est tout de même possible de les envisager avec toute la prudence requise, tels que schématisés dans la figure 2.

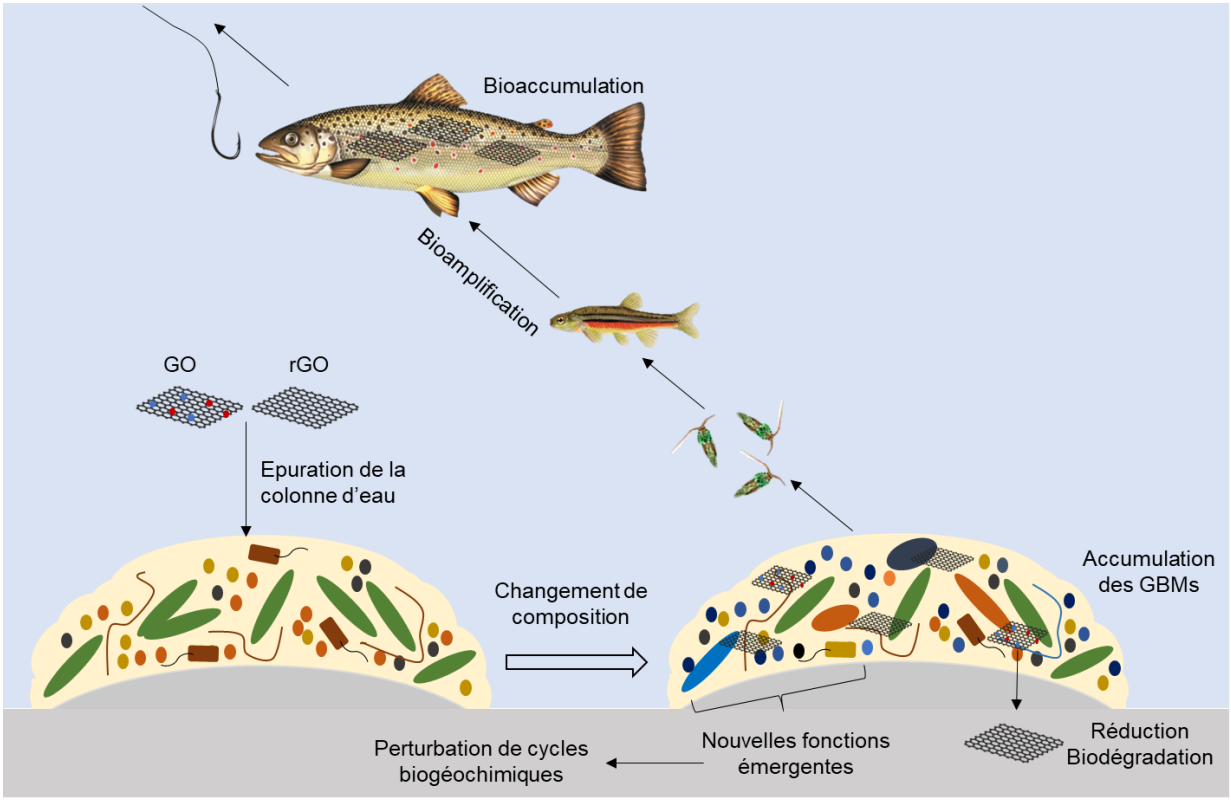

Figure 2: Schématisation des répercussions écosystémiques des effets des GBMs sur les biofilms. Une fois introduits dans la colonne d'eau, les GBMs sont collés par les biofilms, ce qui aboutit à l'épuration de la colonne d'eau. Par la suite, les GBMs vont modifier la composition des biofilms., leur conférant de nouvelles fonctions. Au sein du biofilm, les GBMs peuvent être biodégradés et/ou réduits. Leur accumulation dans les biofilms entrainera leur assimilation dans la chaîne trophique aquatique et aboutira à une bioamplification.

A travers de nos résultats, mais aussi la littérature traitant des effets des GBMs sur les communautés microbiennes, il a été démontré que le graphène et ses dérivés avaient la capacité de détourner la dynamique normale des biofilms et donc de changer leur composition. En temps normal, les procédés microbiens participent à l'homéostasie de la biosphère (Madsen, 2011). Un changement dans la composition sera accompagné de changements des fonctions de cette communauté. Cette nouvelle communauté sera probablement plus résiliente face à des GBMs, mais l'apparition de nouvelles fonctions, à défaut des fonctions de base de la communauté, peut avoir des effets plus globaux sur les écosystèmes. Plusieurs processus dépendent de la présence de plusieurs espèces, ou encore de la présence d'hétérotrophes, de phototrophes et de chimiotrophe dans des ratios précis (Paerl and Pinckney, 1996). Les changements dans la communauté aboutiraient à des changements de rendement des processus, voire à leur suppression, et impacteraient les cycles biogéochimiques du carbone, de l'azote et des autres éléments avec lesquels ils sont inter-reliés. En milieu aquatique, cela peut se traduire par une eutrophisation du milieu (perturbation du cycle du phosphore et/ou de l'azote), reconnu dans le milieu scientifique depuis les années 1950 et souvent lié aux pollutions minérales et/ou organiques (Harper, 1992). Des perturbations dans l'utilisation de la matière organique, de sa décomposition et de l'activité hétérotrophique, souligné dans ces travaux,

aboutiraient à des conséquences non négligeables sur le renouvellement de la matière inorganique, essentielle au niveaux trophiques supérieurs, mais aussi essentielle dans la régulation et la stabilisation de paramètres physicochimique du milieu tel que le pH ou encore la disponibilité en oxygène (Naiman and Bilby, 2001).

Sur la base de nos résultats et ceux de la littérature, il semble établi que les biofilms, de par leur capacité à adsorber les GBMs via la production d'EPS, jouent un rôle important dans d'épuration de la colonne d'eau. Ce phénomène permet de fixer les GBMs et limiter leur remise en suspension dans le milieu. Ceci pourrait empêcher le contact direct des organismes pélagiques avec le graphène et ses dérivés, et donc leur toxicité sur les autres espèces du milieu aquatique.

Une fois les GBMs fixés dans les biofilms, les communautés microbiennes des biofilms peuvent abriter des espèces capables de dégrader et ou/réduire le graphène. De plus en plus d'espèces sont mises en avant pour leur capacité à biodégrader les GBMs, notamment via l'action de peroxydases (Chen et al., 2017). Nos résultats semblent montrer une réduction du GO : cette modification pourrait être bénéfique aux écosystèmes aquatiques car il est admis dans la littérature que les matériaux moins oxydés apparaissent moins toxiques pour les organismes aquatiques. Cette capacité de réduction a aussi été observée dans la littérature chez d'autres espèces de bactéries (Chen et al., 2017). Malgré tout, la caractérisation des GBMs après exposition est rarement prise en compte dans la littérature, alors qu'il semble essentiel de déterminer leur état après exposition à des biofilms. Cela permettrait de renseigner sur les différents mécanismes qui ont lieu pendant l'exposition, mais aussi sur la toxicité restante pour les organismes aquatiques. L'analyse RAMAN effectuée après exposition semble pertinente, et pourrait être améliorée en poussant l'analyse des spectres : sa déconvolution complète permettrait d'identifier des bandes très spécifiques mettant en évidence des informations sur le contenu en oxygène, sa cristallinité mais aussi ses défauts (Lee et al., 2021). De plus, cette analyse pourrait être couplée à une analyse en spectroscopie à photoémission de rayons X (XPS) ou bien en spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) (Aliyev et al., 2019), pouvant nous donner des informations sur la structure des atomes de carbone et des types de groupements présents à la surface du GO.

Même si la communauté du biofilm présente la capacité de dégrader et/ou réduire les GBMs, cela reste un processus long et la biodégradation complète des GBMs semble inenvisageable. Les matériaux vont donc être emmenés à s'accumuler et se concentrer dans les biofilms. Les biofilms étant une source de nourriture importante pour des organismes de niveaux trophiques supérieurs comme les brouteurs, les GBMs seront absorbés par ces consommateurs. Cela pourrait donner lieu à un phénomène de bioaccumulation au sein des organismes, mais aussi de bioamplification tout au long

de la chaîne, où les super-prédateurs seraient finalement exposés aux GBMs initialement présents dans les biofilms. Bien qu'assez faible, le transfert de graphène à travers une chaine trophique a déjà été mis en évidence au travers de 4 niveaux trophiques (*E. coli – T. thermophila – D. magna – D. rerio*) (Dong et al., 2018). Cependant le compartiment microbien était seulement composé de *E. Coli* et la durée d'exposition était limitée à 1 jour. Ces conditions semblent moins favorables au collage et à l'accumulation de GBMs que dans un biofilm naturel. Il paraît raisonnable d'imaginer que le phénomène de collage pourrait avoir lieu de façon plus importante dans des systèmes plus complexes et avec des durées d'expositions plus longues. Une fois introduits dans la chaîne trophique, les GBMs peuvent rapidement avoir des effets chez les consommateurs primaires comme les daphnies (Lu et al., 2017) ou encore chez les brouteurs comme *Lymnaea stagnalis* ou *Rhithrogena semicolorata* (Weise et al., 2023). Des effets sont aussi reconnus chez les prédateurs, notamment chez les poissons où les GBMs peuvent être responsables notamment de dysbiose intestinale (Jia et al., 2019; Lu et al., 2017; Zheng et al., 2019). Cependant, la majorité de ces études sont menées sur des espèces seules, et non en reconstituant une chaîne trophique. Bien que la toxicité des GBMs soit reconnue chez les espèces aquatiques, il semble nécessaire de faire des études avec plus de réalisme environnemental. Une étude menée dans notre laboratoire a été réalisée en microcosme, avec une chaine trophique à trois maillons avec à sa base un biofilm mixte composé d'un compartiment de diatomées *Nitzschia palea* et d'un compartiment bactérien. Dans ces conditions, le GO a induit des changements notables sur le comportement nutritif du consommateur primaire (larves de *Chironomus riparius*) et des effets génétiques (micronoyaux) marqués chez le consommateur secondaire (larves de *Pleurodeles*) (Evariste et al., 2020). Ces travaux sont un début de compréhension des effets des GBMs à l'échelle des écosystèmes et des chaînes trophiques. Ce genre d'études doit être plus répandu, tout en y ajoutant et améliorant les analyses. Le suivi des GBMs dans la chaîne trophique peut être réalisé à l'aide de carbone radiomarqué permettant de déterminer les facteurs de transfert entre compartiments, mais aussi la voie de contamination des organismes (Dong et al., 2018). L'approche en mésocosme permet aussi de suivre des marqueurs intégrateurs de l'activité de plusieurs organismes présents, notamment la décomposition des feuilles, les différents échanges gazeux ou encore la disponibilité des nutriments présents dans la colonne d'eau, qui permettent de qualifier l'état et le fonctionnement de cet écosystème. Les études écotoxicologiques menées en mésocosmes et en microcosmes seraient donc l'approche intégrative la plus adaptée à l'étude des répercussions écosystémiques des effets des GBMs sur les biofilms, mais aussi des effets globaux des GBMs sur les écosystèmes aquatiques.

BIBLIOGRAPHIE

Adeleye, A.S., Ho, K.T., Zhang, M., Li, Y., Burgess, R.M., 2019. Fate and Transformation of Graphene Oxide in Estuarine and Marine Waters. Environ. Sci. Technol. 53, 5858–5867. https://doi.org/10.1021/acs.est.8b06485

Ahirwar, A., Gupta, S., Kashyap, M., Shukla, P., Vinayak, V., 2020. Differential cell viability in Nitzschia palea on exposure to different organic and inorganic environmental effluents. Int. J. Environ. Sci. Technol. 17, 493–504. https://doi.org/10.1007/s13762-019-02309-3

Ahmed, F., Rodrigues, D.F., 2013. Investigation of acute effects of graphene oxide on wastewater microbial community: A case study. Journal of Hazardous Materials 256–257, 33–39. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.03.064

Akhavan, O., 2015. Bacteriorhodopsin as a superior substitute for hydrazine in chemical reduction of single-layer graphene oxide sheets. Carbon 81, 158–166. https://doi.org/10.1016/j.carbon.2014.09.044

Akhavan, O., Ghaderi, E., 2010. Toxicity of Graphene and Graphene Oxide Nanowalls Against Bacteria. ACS Nano 4, 5731–5736. https://doi.org/10.1021/nn101390x

Alam, M.M., Masud, A., Scharf, B., Bradley, I., Aich, N., 2022. Long-Term Exposure and Effects of rGO–nZVI Nanohybrids and Their Parent Nanomaterials on Wastewater-Nitrifying Microbial Communities. Environ. Sci. Technol. 56, 512–524. https://doi.org/10.1021/acs.est.1c02586

Aliyev, E., Filiz, V., Khan, M.M., Lee, Y.J., Abetz, C., Abetz, V., 2019. Structural Characterization of Graphene Oxide: Surface Functional Groups and Fractionated Oxidative Debris. Nanomaterials (Basel) 9, 1180. https://doi.org/10.3390/nano9081180

Allen, A.E., Dupont, C.L., Oborník, M., Horák, A., Nunes-Nesi, A., McCrow, J.P., Zheng, H., Johnson, D.A., Hu, H., Fernie, A.R., Bowler, C., 2011. Evolution and metabolic significance of the urea cycle in photosynthetic diatoms. Nature 473, 203–207. https://doi.org/10.1038/nature10074

Amiard-Triquet, C., Amiard, J.-C., Mouneyrac, C., 2015. Aquatic Ecotoxicology: Advancing Tools for Dealing with Emerging Risks. Academic Press.

Amin, S.A., Parker, M.S., Armbrust, E.V., 2012. Interactions between Diatoms and Bacteria. Microbiol Mol Biol Rev 76, 667–684. https://doi.org/10.1128/MMBR.00007-12

Apul, O.G., Wang, Q., Zhou, Y., Karanfil, T., 2013. Adsorption of aromatic organic contaminants by graphene nanosheets: Comparison with carbon nanotubes and activated carbon. Water Research 47, 1648–1654. https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.12.031

Araújo, C.V.M., Blasco, J., Moreno-Garrido, I., 2010. Microphytobenthos in ecotoxicology: A review of the use of marine benthic diatoms in bioassays. Environment International 36, 637.

Armbrecht, L.H., Smetacek, V., Assmy, P., Klaas, C., 2014. Cell death and aggregate formation in the giant diatom Coscinodiscus wailesii (Gran & Angst, 1931). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 452, 31–39. https://doi.org/10.1016/j.jembe.2013.12.004

Armbrust, E.V., 2009. The life of diatoms in the world's oceans. Nature 459, 185–192. https://doi.org/10.1038/nature08057

Arvidsson, R., Molander, S., Sandén, B.A., 2013. Review of Potential Environmental and Health Risks of the Nanomaterial Graphene. Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal 19, 873–887. https://doi.org/10.1080/10807039.2012.702039

Avant, B., Bouchard, D., Chang, X., Hsieh, H.-S., Acrey, B., Han, Y., Spear, J., Zepp, R., Knightes, C.D., 2019. Environmental fate of multiwalled carbon nanotubes and graphene oxide across different aquatic ecosystems. NanoImpact 13, 1–12. https://doi.org/10.1016/j.impact.2018.11.001

Avouris, P., Dimitrakopoulos, C., 2012. Graphene: synthesis and applications. Materials Today 15, 86–97. https://doi.org/10.1016/S1369-7021(12)70044-5

Azim, M.E., Verdegem, M.C.J., Dam, A.A. van, Beveridge, M.C.M., 2005. Periphyton: Ecology, Exploitation and Management. CABI.

Bagmet, V.B., Abdullin, Sh.R., Mazina, S.E., Nikulin, A.Yu., Nikulin, V.Yu., Gontcharov, A.A., 2020. Life Cycle of Nitzschia palea (Kützing) W. Smith (Bacillariophyta). Russ J Dev Biol 51, 106–114. https://doi.org/10.1134/S1062360420020022

Bakshi, S., He, Z.L., Harris, W.G., 2015. Natural Nanoparticles: Implications for Environment and Human Health. Critical Reviews in Environmental Science and Technology 45, 861–904. https://doi.org/10.1080/10643389.2014.921975

Balaji Mohan, V., Stamm, Debes Bhattacharyya, M., Liu, D., Jayaraman, K., 2016. Improvements In Electronic Structure And Properties Of Graphene Derivatives. Advanced Materials Letters 7, 421–429. https://doi.org/10.5185/amlett.2016.6123

Balandin, A.A., Ghosh, S., Bao, W., Calizo, I., Teweldebrhan, D., Miao, F., Lau, C.N., 2008. Superior Thermal Conductivity of Single-Layer Graphene. Nano Lett. 8, 902–907. https://doi.org/10.1021/nl0731872

Baraton, L., He, Z., Lee, C.S., Maurice, J.-L., Cojocaru, C.S., Gourgues-Lorenzon, A.-F., Lee, Y.H., Pribat, D., 2011. Synthesis of few-layered graphene by ion implantation of carbon in nickel thin films. Nanotechnology 22, 085601. https://doi.org/10.1088/0957-4484/22/8/085601

Barranguet, C., Veuger, B., Van Beusekom, S.A.M., Marvan, P., Sinke, J.J., Admiraal, W., 2005. Divergent composition of algal-bacterial biofilms developing under various external factors. European Journal of Phycology 40, 1–8. https://doi.org/10.1080/09670260400009882

Battin, T.J., Besemer, K., Bengtsson, M.M., Romani, A.M., Packmann, A.I., 2016. The ecology and biogeochemistry of stream biofilms. Nat Rev Microbiol 14, 251–263. https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.15

Beams, R., Cançado, L.G., Novotny, L., 2015. Raman characterization of defects and dopants in graphene. J. Phys.: Condens. Matter 27, 083002. https://doi.org/10.1088/0953-8984/27/8/083002

Bellingeri, A., Bergami, E., Grassi, G., Faleri, C., Redondo-Hasselerharm, P., Koelmans, A.A., Corsi, I., 2019. Combined effects of nanoplastics and copper on the freshwater alga Raphidocelis subcapitata. Aquatic Toxicology 210, 179–187. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.02.022

Benoiston, A.-S., Ibarbalz, F.M., Bittner, L., Guidi, L., Jahn, O., Dutkiewicz, S., Bowler, C., 2017. The evolution of diatoms and their biogeochemical functions. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences 372, 20160397. https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0397

Bhatt, M.D., Kim, H., Kim, G., 2022. Various defects in graphene: a review. RSC Adv 12, 21520–21547. https://doi.org/10.1039/d2ra01436j

Boholm, M., Arvidsson, R., 2016. A Definition Framework for the Terms Nanomaterial and Nanoparticle. Nanoethics 10, 25–40. https://doi.org/10.1007/s11569-015-0249-7

Bohórquez, J., McGenity, T.J., Papaspyrou, S., García-Robledo, E., Corzo, A., Underwood, G.J.C., 2017. Different Types of Diatom-Derived Extracellular Polymeric Substances Drive Changes in Heterotrophic Bacterial Communities from Intertidal Sediments. Front. Microbiol. 8. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00245

Boutchich, M., Jaffré, A., Alamarguy, D., Alvarez, J., Barras, A., Tanizawa, Y., Tero, R., Okada, H., Thu, T.V., Kleider, J.P., Sandhu, A., 2013. Characterization of graphene oxide reduced through chemical and biological processes. J. Phys.: Conf. Ser. 433, 012001. https://doi.org/10.1088/1742-6596/433/1/012001

Brar, S.K., Verma, M., Tyagi, R.D., Surampalli, R.Y., 2010. Engineered nanoparticles in wastewater and wastewater sludge--evidence and impacts. Waste Manag 30, 504–520. https://doi.org/10.1016/j.wasman.2009.10.012

Braylé, P., Pinelli, E., Gauthier, L., Mouchet, F., Barret, M., 2022. Graphene-based nanomaterials and microbial communities: a review of their interactions, from ecotoxicology to bioprocess engineering perspectives. Environ. Sci.: Nano 9, 3725–3741. https://doi.org/10.1039/D2EN00547F

Bueno-López, J.I., Nguyen, C.H., Rangel-Mendez, J.R., Sierra-Alvarez, R., Field, J.A., Cervantes, F.J., 2020. Effects of graphene oxide and reduced graphene oxide on acetoclastic,

hydrogenotrophic and methylotrophic methanogenesis. Biodegradation 31, 35–45. https://doi.org/10.1007/s10532-020-09892-0

Bussard, A., 2015. Capacités d'acclimatation des diatomées aux contraintes environnementales.

Butcher, R.W., 1947. Studies in the Ecology of Rivers: VII. The Algae of Organically Enriched Waters. Journal of Ecology 35, 186–191. https://doi.org/10.2307/2256507

Butler, W.L., Kitajima, M., 1975. Energy transfer between Photosystem II and Photosystem I in chloroplasts. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics 396, 72–85. https://doi.org/10.1016/0005-2728(75)90190-5

Cacaci, M., Martini, C., Guarino, C., Torelli, R., Bugli, F., Sanguinetti, M., 2020. Graphene Oxide Coatings as Tools to Prevent Microbial Biofilm Formation on Medical Device. Adv Exp Med Biol 1282, 21–35. https://doi.org/10.1007/5584_2019_434

Caesemaeker, J.D., 2005. A MODEL SYSTEM APPROACH TO THE STUDY OF DIATOM BIOLOGY.

Callieri, C., Eckert, E.M., Di Cesare, A., Bertoni, F., 2019. Microbial Communities, in: Encyclopedia of Ecology. Elsevier, pp. 126–134. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.11222-9

Candotto Carniel, F., Fortuna, L., Zanelli, D., Garrido, M., Vázquez, E., González, V.J., Prato, M., Tretiach, M., 2021. Graphene environmental biodegradation: Wood degrading and saprotrophic fungi oxidize few-layer graphene. Journal of Hazardous Materials 414, 125553. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125553

Cao, G., Yan, J., Ning, X., Zhang, Q., Wu, Q., Bi, L., Zhang, Y., Han, Y., Guo, J., 2021. Antibacterial and antibiofilm properties of graphene and its derivatives. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 200, 111588. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.111588

Capdeville, B., Rols, J.L., 1992. Introduction to Biofilms in Water and Wastewater Treatment, in: Melo, L.F., Bott, T.R., Fletcher, M., Capdeville, B. (Eds.), Biofilms — Science and Technology, NATO ASI Series. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 13–20. https://doi.org/10.1007/978-94-011-1824-8_2

Caquet, T., Lagadic, L., Sheffield, S.R., 2000. Mesocosms in Ecotoxicology (1): Outdoor Aquatic Systems, in: Ware, G.W. (Ed.), Reviews of Environmental Contamination and Toxicology: Continuation of Residue Reviews, Reviews of Environmental Contamination and Toxicology. Springer, New York, NY, pp. 1–38. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-1172-3_1

Castro Neto, A.H., Guinea, F., Peres, N.M.R., Novoselov, K.S., Geim, A.K., 2009. The electronic properties of graphene. Rev. Mod. Phys. 81, 109–162. https://doi.org/10.1103/RevModPhys.81.109

Castro, V.L., Clemente, Z., Jonsson, C., Silva, M., Vallim, J.H., de Medeiros, A.M.Z., Martinez, D.S.T., 2018. Nanoecotoxicity assessment of graphene oxide and its relationship with humic acid:

Nanoecotoxicity of graphene oxide and humic acid. Environmental Toxicology and Chemistry 37, 1998–2012. https://doi.org/10.1002/etc.4145

Chan, K.T., Neaton, J.B., Cohen, M.L., 2008. First-principles study of metal adatom adsorption on graphene. Phys. Rev. B 77, 235430. https://doi.org/10.1103/PhysRevB.77.235430

Cheirsilp, B., Torpee, S., 2012. Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: Effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation. Bioresource Technology 110, 510–516. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.125

Chen, F., Xiao, Z., Yue, L., Wang, J., Feng, Y., Zhu, X., Wang, Z., Xing, B., 2019. Algae response to engineered nanoparticles: current understanding, mechanisms and implications. Environ. Sci.: Nano 6, 1026–1042. https://doi.org/10.1039/C8EN01368C

Chen, M., Qin, X., Zeng, G., 2017. Biodegradation of Carbon Nanotubes, Graphene, and Their Derivatives. Trends in Biotechnology, Special Issue: Environmental Biotechnology 35, 836–846. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.12.001

Chen, W., Yan, L., Bangal, P.R., 2010. Chemical Reduction of Graphene Oxide to Graphene by Sulfur-Containing Compounds. J. Phys. Chem. C 114, 19885–19890. https://doi.org/10.1021/jp107131v

Cheng, X., Xu, W., Wang, N., Mu, Y., Zhu, J., Luo, J., 2018. Adsorption of Cu2+ and mechanism by natural biofilm. Water Science and Technology 78, 721–731. https://doi.org/10.2166/wst.2018.308

Chénier, M.R., Beaumier, D., Roy, R., Driscoll, B.T., Lawrence, J.R., Greer, C.W., 2003. Impact of Seasonal Variations and Nutrient Inputs on Nitrogen Cycling and Degradation of Hexadecane by Replicated River Biofilms. Appl Environ Microbiol 69, 5170–5177. https://doi.org/10.1128/AEM.69.9.5170-5177.2003

Chepurnov, V.A., Mann, D.G., von Dassow, P., Armbrust, E.V., Sabbe, K., Dasseville, R., Vyverman, W., 2006. OOGAMOUS REPRODUCTION, WITH TWO-STEP AUXOSPORULATION, IN THE CENTRIC DIATOM *THALASSIOSIRA PUNCTIGERA* (BACILLARIOPHYTA). Journal of Phycology 42, 845–858. https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2006.00244.x

Chowdhury, I., Duch, M.C., Mansukhani, N.D., Hersam, M.C., Bouchard, D., 2014. Interactions of Graphene Oxide Nanomaterials with Natural Organic Matter and Metal Oxide Surfaces. Environ. Sci. Technol. 48, 9382–9390. https://doi.org/10.1021/es5020828

Chowdhury, I., Duch, M.C., Mansukhani, N.D., Hersam, M.C., Bouchard, D., 2013. Colloidal Properties and Stability of Graphene Oxide Nanomaterials in the Aquatic Environment. Environ. Sci. Technol. 47, 6288–6296. https://doi.org/10.1021/es400483k

Christie-Oleza, J.A., Sousoni, D., Lloyd, M., Armengaud, J., Scanlan, D.J., 2017. Nutrient recycling facilitates long-term stability of marine microbial phototroph–heterotroph interactions. Nat Microbiol 2, 1–10. https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.100

Ch-Th, T., Manisekaran, R., Santoyo-Salazar, J., Schoefs, B., Velumani, S., Castaneda, H., Jantrania, A., 2021. Graphene oxide decorated TiO2 and BiVO4 nanocatalysts for enhanced visible-light-driven photocatalytic bacterial inactivation. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry 418, 113374. https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2021.113374

Chung, H., Kim, M.J., Ko, K., Kim, J.H., Kwon, H., Hong, I., Park, N., Lee, S.-W., Kim, W., 2015. Effects of graphene oxides on soil enzyme activity and microbial biomass. Science of The Total Environment 514, 307–313. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.01.077

Clark, A.J., Landolt, W., Bucher, J.B., Strasser, R.J., 2000. Beech (Fagus sylvatica) response to ozone exposure assessed with a chlorophyll a fluorescence performance index. Environmental Pollution 109, 501–507. https://doi.org/10.1016/S0269-7491(00)00053-1

Clemente, Z., Silva, G.H., de Souza Nunes, M.C., Martinez, D.S.T., Maurer-Morelli, C.V., Thomaz, A.A., Castro, V.L.S.S., 2019. Exploring the mechanisms of graphene oxide behavioral and morphological changes in zebrafish. Environ Sci Pollut Res 26, 30508–30523. https://doi.org/10.1007/s11356-019-05870-z

Cole, M., Lindeque, P., Halsband, C., Galloway, T.S., 2011. Microplastics as contaminants in the marine environment: A review. Marine Pollution Bulletin 62, 2588–2597. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.09.025

Condron, L., Stark, C., O'Callaghan, M., Clinton, P., Huang, Z., 2010. The Role of Microbial Communities in the Formation and Decomposition of Soil Organic Matter, in: Dixon, G.R., Tilston, E.L. (Eds.), Soil Microbiology and Sustainable Crop Production. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 81–118. https://doi.org/10.1007/978-90-481-9479-7_4

Cooper, M.B., Smith, A.G., 2015. Exploring mutualistic interactions between microalgae and bacteria in the omics age. Current Opinion in Plant Biology 26, 147–153. https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.07.003

Cote, L.J., Kim, J., Tung, V.C., Luo, J., Kim, F., Huang, J., 2010. Graphene oxide as surfactant sheets. Pure and Applied Chemistry 83, 95–110. https://doi.org/10.1351/PAC-CON-10-10-25

Cvitkovitch, D.G., 2004. Genetic Exchange in Biofilms, in: Microbial Biofilms. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 192–205. https://doi.org/10.1128/9781555817718.ch11

da Silva Ferreira, V., Sant'Anna, C., 2017. Impact of culture conditions on the chlorophyll content of microalgae for biotechnological applications. World J. Microbiol. Biotechnol. 33, 20. https://doi.org/10.1007/s11274-016-2181-6

Dasari Shareena, T.P., McShan, D., Dasmahapatra, A.K., Tchounwou, P.B., 2018. A Review on Graphene-Based Nanomaterials in Biomedical Applications and Risks in Environment and Health. Nano-Micro Lett. 10, 53. https://doi.org/10.1007/s40820-018-0206-4

Davies, D., 2003. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. Nat Rev Drug Discov 2, 114–122. https://doi.org/10.1038/nrd1008

Davies, D.G., Parsek, M.R., Pearson, J.P., Iglewski, B.H., Costerton, J.W., Greenberg, E.P., 1998. The Involvement of Cell-to-Cell Signals in the Development of a Bacterial Biofilm. Science 280, 295–298. https://doi.org/10.1126/science.280.5361.295

De Marchi, L., Pretti, C., Gabriel, B., Marques, P.A.A.P., Freitas, R., Neto, V., 2018. An overview of graphene materials: Properties, applications and toxicity on aquatic environments. Science of The Total Environment 631–632, 1440–1456. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.132

Debenest, T., Silvestre, J., Coste, M., Delmas, F., Pinelli, E., 2009. A new cell primo-culture method for freshwater benthic diatom communities. J Appl Phycol 21, 65–73. https://doi.org/10.1007/s10811-008-9325-5

Destoumieux-Garzón, D., Mavingui, P., Boetsch, G., Boissier, J., Darriet, F., Duboz, P., Fritsch, C., Giraudoux, P., Le Roux, F., Morand, S., Paillard, C., Pontier, D., Sueur, C., Voituron, Y., 2018. The One Health Concept: 10 Years Old and a Long Road Ahead. Front. Vet. Sci. 5. https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00014

Dizaj, S.M., Mennati, A., Jafari, S., Khezri, K., Adibkia, K., 2015. Antimicrobial activity of carbon-based nanoparticles. Advanced pharmaceutical bulletin 5, 19.

Dong, B., Xia, Z., Sun, J., Dai, X., Chen, X., Ni, B.-J., 2019. The inhibitory impacts of nano-graphene oxide on methane production from waste activated sludge in anaerobic digestion. Science of The Total Environment 646, 1376–1384. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.424

Dong, D., Li, Y., Zhang, J., Hua, X., 2003. Comparison of the adsorption of lead, cadmium, copper, zinc and barium to freshwater surface coatings. Chemosphere 51, 369–373. https://doi.org/10.1016/S0045-6535(02)00835-4

Dong, S., Xia, T., Yang, Y., Lin, S., Mao, L., 2018. Bioaccumulation of 14C-Labeled Graphene in an Aquatic Food Chain through Direct Uptake or Trophic Transfer. Environ. Sci. Technol. 52, 541–549. https://doi.org/10.1021/acs.est.7b04339

Du, J., Hu, X., Zhou, Q., 2015. Graphene oxide regulates the bacterial community and exhibits property changes in soil. RSC Adv. 5, 27009–27017. https://doi.org/10.1039/C5RA01045D

Du, J., Zhou, Q., Wu, J., Li, Guifeng, Li, Guoqin, Wu, Y., 2020. Soil bacterial communities respond differently to graphene oxide and reduced graphene oxide after 90 days of exposure. Soil Ecol. Lett. 2, 176–179. https://doi.org/10.1007/s42832-020-0043-5

Du, S., Zhang, P., Zhang, R., Lu, Q., Liu, L., Bao, X., Liu, H., 2016. Reduced graphene oxide induces cytotoxicity and inhibits photosynthetic performance of the green alga Scenedesmus obliquus. Chemosphere 164, 499–507. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.08.138

Duperron, S., Halary, S., Gallet, A., Marie, B., 2020. Microbiome-Aware Ecotoxicology of Organisms: Relevance, Pitfalls, and Challenges. Front. Public Health 8. https://doi.org/10.3389/fpubh.2020.00407

Eda, G., Fanchini, G., Chhowalla, M., 2008. Large-area ultrathin films of reduced graphene oxide as a transparent and flexible electronic material. Nature Nanotech 3, 270–274. https://doi.org/10.1038/nnano.2008.83

Elreedy, A., Ismail, S., Ali, M., Ni, S.-Q., Fujii, M., Elsamadony, M., 2021. Unraveling the capability of graphene nanosheets and γ-Fe2O3 nanoparticles to stimulate anammox granular sludge. Journal of Environmental Management 277, 111495. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111495

Escudié, F., Auer, L., Bernard, M., Mariadassou, M., Cauquil, L., Vidal, K., Maman, S., Hernandez-Raquet, G., Combes, S., Pascal, G., 2018. FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution. Bioinformatics 34, 1287–1294. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx791

Evans, L.V., 2003. Biofilms: Recent Advances in their Study and Control. CRC Press.

Evariste, L., Barret, M., Mottier, A., Mouchet, F., Gauthier, L., Pinelli, E., 2019a. Gut microbiota of aquatic organisms: A key endpoint for ecotoxicological studies. Environ Pollut 248, 989–999. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.02.101

Evariste, L., Braylé, P., Mouchet, F., Silvestre, J., Gauthier, L., Flahaut, E., Pinelli, E., Barret, M., 2021. Graphene-based nanomaterials modulate internal biofilm interactions and microbial diversity. Front. Microbiol. 12. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.623853

Evariste, L., Lagier, L., Gonzalez, P., Mottier, A., Mouchet, F., Cadarsi, S., Lonchambon, P., Daffe, G., Chimowa, G., Sarrieu, C., Ompraret, E., Galibert, A.-M., Ghimbeu, C.M., Pinelli, E., Flahaut, E., Gauthier, L., 2019b. Thermal reduction of graphene oxide mitigates its in vivo genotoxicity toward Xenopus laevis tadpoles. Nanomaterials 9, 584. https://doi.org/10.3390/nano9040584

Evariste, L., Mottier, A., Lagier, L., Cadarsi, S., Barret, M., Sarrieu, C., Soula, B., Mouchet, F., Flahaut, E., Pinelli, E., Gauthier, L., 2020. Assessment of graphene oxide ecotoxicity at several trophic levels using aquatic microcosms. Carbon 156, 261–271. https://doi.org/10.1016/j.carbon.2019.09.051

Fadeel, B., Bussy, C., Merino, S., Vázquez, E., Flahaut, E., Mouchet, F., Evariste, L., Gauthier, L., Koivisto, A.J., Vogel, U., Martín, C., Delogu, L.G., Buerki-Thurnherr, T., Wick, P., Beloin-Saint-Pierre, D., Hischier, R., Pelin, M., Candotto Carniel, F., Tretiach, M., Cesca, F., Benfenati, F., Scaini, D.,

Ballerini, L., Kostarelos, K., Prato, M., Bianco, A., 2018. Safety assessment of graphene-based materials: Focus on human health and the environment. ACS Nano 12, 10582–10620. https://doi.org/10.1021/acsnano.8b04758

Falcao, E.H., Wudl, F., 2007. Carbon allotropes: beyond graphite and diamond. Journal of Chemical Technology & Biotechnology 82, 524–531. https://doi.org/10.1002/jctb.1693

Falkowski, P.G., Fenchel, T., Delong, E.F., 2008. The Microbial Engines That Drive Earth's Biogeochemical Cycles. Science 320, 1034–1039. https://doi.org/10.1126/science.1153213

Falkowski, P.G., Raven, J.A., 2007. Aquatic Photosynthesis.

Fallatah, H., Elhaneid, M., Ali-Boucetta, H., Overton, T.W., El Kadri, H., Gkatzionis, K., 2019. Antibacterial effect of graphene oxide (GO) nano-particles against Pseudomonas putida biofilm of variable age. Environ Sci Pollut Res 26, 25057–25070. https://doi.org/10.1007/s11356-019-05688-9

Fan, Y., Pedersen, O., 2021. Gut microbiota in human metabolic health and disease. Nat Rev Microbiol 19, 55–71. https://doi.org/10.1038/s41579-020-0433-9

Fernandez-Jaramillo, A.A., Duarte-Galvan, C., Contreras-Medina, L.M., Torres-Pacheco, I., Romero-Troncoso, R. de J., Guevara-Gonzalez, R.G., Millan-Almaraz, J.R., 2012. Instrumentation in Developing Chlorophyll Fluorescence Biosensing: A Review. Sensors 12, 11853–11869. https://doi.org/10.3390/s120911853

Fernández-Merino, M.J., Guardia, L., Paredes, J.I., Villar-Rodil, S., Solís-Fernández, P., Martínez-Alonso, A., Tascón, J.M.D., 2010. Vitamin C Is an Ideal Substitute for Hydrazine in the Reduction of Graphene Oxide Suspensions. J. Phys. Chem. C 114, 6426–6432. https://doi.org/10.1021/jp100603h

Flemming, H.-C., Neu, T.R., Wozniak, D.J., 2007. The EPS Matrix: The "House of Biofilm Cells." Journal of Bacteriology 189, 7945–7947. https://doi.org/10.1128/JB.00858-07

Flemming, H.-C., Wingender, J., 2010. The biofilm matrix. Nat Rev Microbiol 8, 623–633. https://doi.org/10.1038/nrmicro2415

Flemming, H.-C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S.A., Kjelleberg, S., 2016. Biofilms: an emergent form of bacterial life. Nat Rev Microbiol 14, 563–575. https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94

Forstner, C., Orton, T.G., Skarshewski, A., Wang, P., Kopittke, P.M., Dennis, P.G., 2019a. Effects of graphene oxide and graphite on soil bacterial and fungal diversity. Science of The Total Environment 671, 140–148. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.360

Forstner, C., Orton, T.G., Wang, P., Kopittke, P.M., Dennis, P.G., 2019b. Effects of carbon nanotubes and derivatives of graphene oxide on soil bacterial diversity. Science of The Total Environment 682, 356–363. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.162

Gaffet, E., 2011. Nanomatériaux : Une revue des définitions, des applications et des effets sur la santé. Comment implémenter un développement sûr. Comptes Rendus Physique, Nanoscience and nanotechnologies: hopes and concerns 12, 648–658. https://doi.org/10.1016/j.crhy.2011.06.002

Gao, X., Olapade, O.A., Leff, L.G., 2005. Comparison of benthic bacterial community composition in nine streams. Aquatic Microbial Ecology 40, 51.

Gao, X., Zhu, S., Li, Y., 2015. Graphene oxide as a facile solid acid catalyst for the production of bioadditives from glycerol esterification. Catalysis Communications 62, 48–51. https://doi.org/10.1016/j.catcom.2015.01.007

Garacci, M., 2018. Évaluation de la réponse cellulaire et moléculaire d'une diatomée benthique d'eau douce à l'exposition à des nanoparticules carbonées. Université Paul Sabatier.

Garacci, M., Barret, M., Folgoas, C., Flahaut, E., Chimowa, G., Bertucci, A., Gonzalez, P., Silvestre, J., Gauthier, L., Zouine, M., Pinelli, E., 2019. Transcriptomic response of the benthic freshwater diatom Nitzschia palea exposed to Few Layer Graphene. Environ. Sci.: Nano. https://doi.org/10.1039/C8EN00987B

Garacci, M., Barret, M., Mouchet, F., Sarrieu, C., Lonchambon, P., Flahaut, E., Gauthier, L., Silvestre, J., Pinelli, E., 2017. Few Layer Graphene sticking by biofilm of freshwater diatom Nitzschia palea as a mitigation to its ecotoxicity. Carbon 113, 139–150. https://doi.org/10.1016/j.carbon.2016.11.033

Ge, Y., Priester, J.H., Mortimer, M., Chang, C.H., Ji, Z., Schimel, J.P., Holden, P.A., 2016. Long-Term Effects of Multiwalled Carbon Nanotubes and Graphene on Microbial Communities in Dry Soil. Environ. Sci. Technol. 50, 3965–3974. https://doi.org/10.1021/acs.est.5b05620

Ge, Y., Shen, C., Wang, Y., Sun, Y.-Q., Schimel, J.P., Gardea-Torresdey, J.L., Holden, P.A., 2018. Carbonaceous Nanomaterials Have Higher Effects on Soybean Rhizosphere Prokaryotic Communities During the Reproductive Growth Phase than During Vegetative Growth. Environ. Sci. Technol. 52, 6636–6646. https://doi.org/10.1021/acs.est.8b00937

Geim, A.K., 2009. Graphene: Status and Prospects. Science 324, 1530–1534. https://doi.org/10.1126/science.1158877

Ghulam, A.N., dos Santos, O.A.L., Hazeem, L., Pizzorno Backx, B., Bououdina, M., Bellucci, S., 2022. Graphene Oxide (GO) Materials—Applications and Toxicity on Living Organisms and Environment. Journal of Functional Biomaterials 13, 77. https://doi.org/10.3390/jfb13020077

Gibiino, G., Lopetuso, L.R., Scaldaferri, F., Rizzatti, G., Binda, C., Gasbarrini, A., 2018. Exploring Bacteroidetes: Metabolic key points and immunological tricks of our gut commensals. Digestive and Liver Disease 50, 635–639. https://doi.org/10.1016/j.dld.2018.03.016

Giulio, M.D., Zappacosta, R., Lodovico, S.D., Campli, E.D., Siani, G., Fontana, A., Cellini, L., 2018. Antimicrobial and Antibiofilm Efficacy of Graphene Oxide against Chronic Wound Microorganisms. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 62. https://doi.org/10.1128/AAC.00547-18

Gonçalves, A.L., Pires, J.C., Simões, M., 2013. Lipid production of Chlorella vulgaris and Pseudokirchneriella subcapitata. Int J Energy Environ Eng 4, 14. https://doi.org/10.1186/2251-6832-4-14

González, A.G., Mombo, S., Leflaive, J., Lamy, A., Pokrovsky, O.S., Rols, J.-L., 2015. Silver nanoparticles impact phototrophic biofilm communities to a considerably higher degree than ionic silver. Environ Sci Pollut Res 22, 8412–8424. https://doi.org/10.1007/s11356-014-3978-1

Goodwin, D.G., Adeleye, A.S., Sung, L., Ho, K.T., Burgess, R.M., Petersen, E.J., 2018. Detection and Quantification of Graphene-Family Nanomaterials in the Environment. Environ. Sci. Technol. 52, 4491–4513. https://doi.org/10.1021/acs.est.7b04938

Gottschalk, F., Sun, T., Nowack, B., 2013. Environmental concentrations of engineered nanomaterials: review of modeling and analytical studies. Environ Pollut 181, 287–300. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.06.003

Guardia, L., Fernández-Merino, M.J., Paredes, J.I., Solís-Fernández, P., Villar-Rodil, S., Martínez-Alonso, A., Tascón, J.M.D., 2011. High-throughput production of pristine graphene in an aqueous dispersion assisted by non-ionic surfactants. Carbon 49, 1653–1662. https://doi.org/10.1016/j.carbon.2010.12.049

Guo, C., Wang, Y., Luo, Y., Chen, X., Lin, Y., Liu, X., 2018a. Effect of graphene oxide on the bioactivities of nitrifying and denitrifying bacteria in aerobic granular sludge. Ecotoxicology and Environmental Safety 156, 287–293. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.03.036

Guo, M.-T., Zhang, G.-S., 2017. Graphene oxide in the water environment could affect tetracycline-antibiotic resistance. Chemosphere 183, 197–203. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.04.145

Guo, Z., Xie, C., Zhang, P., Zhang, J., Wang, G., He, X., Ma, Y., Zhao, B., Zhang, Z., 2017. Toxicity and transformation of graphene oxide and reduced graphene oxide in bacteria biofilm. Science of The Total Environment 580, 1300–1308. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.12.093

Gupta, A., Vakhare, D., Chaphalkar, S.R., 2016. Flow cytometry: an overview in optical system and application in biological studies. European Journal of Biological Research 6, 186–192. https://doi.org/10.5281/zenodo.59277

Gurunathan, S., Han, J.W., Dayem, A.A., Eppakayala, V., Kim, J.-H., 2012. Oxidative stress-mediated antibacterial activity of graphene oxide and reduced graphene oxide in Pseudomonas aeruginosa. International Journal of Nanomedicine 7, 5901–5914. https://doi.org/10.2147/IJN.S37397

Han, W., Wu, Z., Li, Y., Wang, Y., 2019. Graphene family nanomaterials (GFNs)—promising materials for antimicrobial coating and film: A review. Chemical Engineering Journal 358, 1022–1037. https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.10.106

Hao, M., Chen, H., He, Y., Wang, X., Zhang, Y., Lao, H., Song, H., Chen, W., Xue, G., 2022. Recycling sludge-derived hydrochar to facilitate advanced denitrification of secondary effluent: Role of extracellular electron transfer. Chemosphere 291, 132683. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132683

Harper, D., 1992. What is eutrophication?, in: Harper, D. (Ed.), Eutrophication of Freshwaters: Principles, Problems and Restoration. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 1–28. https://doi.org/10.1007/978-94-011-3082-0_1

Haynes, K., Hofmann, T.A., Smith, C.J., Ball, A.S., Underwood, G.J.C., Osborn, A.M., 2007. Diatom-Derived Carbohydrates as Factors Affecting Bacterial Community Composition in Estuarine Sediments. Appl. Environ. Microbiol. 73, 6112–6124. https://doi.org/10.1128/AEM.00551-07

Hazeem, L.J., Bououdina, M., Dewailly, E., Slomianny, C., Barras, A., Coffinier, Y., Szunerits, S., Boukherroub, R., 2017. Toxicity effect of graphene oxide on growth and photosynthetic pigment of the marine alga Picochlorum sp. during different growth stages. Environ Sci Pollut Res 24, 4144–4152. https://doi.org/10.1007/s11356-016-8174-z

He, K., Chen, G., Zeng, G., Peng, M., Huang, Z., Shi, J., Huang, T., 2017. Stability, transport and ecosystem effects of graphene in water and soil environments. Nanoscale 9, 5370–5388. https://doi.org/10.1039/C6NR09931A

Hegab, H.M., ElMekawy, A., Zou, L., Mulcahy, D., Saint, C.P., Ginic-Markovic, M., 2016. The controversial antibacterial activity of graphene-based materials. Carbon 105, 362–376. https://doi.org/10.1016/j.carbon.2016.04.046

Hill, T.C.J., Walsh, K.A., Harris, J.A., Moffett, B.F., 2003. Using ecological diversity measures with bacterial communities. FEMS Microbiology Ecology 43, 1–11. https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2003.tb01040.x

Holden, P.A., Gardea-Torresdey, J., Klaessig, F., Turco, R.F., Mortimer, M., Hund-Rinke, K., Hubal, E.A.C., Avery, D., Barceló, D., Behra, R., Cohen, Y., Deydier-Stephan, L., Lee Ferguson, P., Fernandes, T.F., Harthorn, B.H., Henderson, W.M., Hoke, R.A., Hristozov, D., Johnston, J.M., Kane, A.B., Kapustka, L., Keller, A.A., Lenihan, H.S., Lovell, W., Murphy, C.J., Nisbet, R.M., Petersen, E.J., Salinas, E.R., Scheringer, M., Sharma, M., Speed, D.E., Sultan, Y., Westerhoff, P., White, J.C., Wiesner, M.R., Wong, E.M., Xing, B., Horan, M.S., Godwin, H.A., Nel, A.E., 2016. Considerations of Environmentally Relevant Test Conditions for Improved Evaluation of Ecological Hazards of Engineered Nanomaterials. Environ Sci Technol 50, 6124–6145. https://doi.org/10.1021/acs.est.6b00608

Holden, P.A., Klaessig, F., Turco, R.F., Priester, J.H., Rico, C.M., Avila-Arias, H., Mortimer, M., Pacpaco, K., Gardea-Torresdey, J.L., 2014. Evaluation of Exposure Concentrations Used in Assessing Manufactured Nanomaterial Environmental Hazards: Are They Relevant? Environ. Sci. Technol. 48, 10541–10551. https://doi.org/10.1021/es502440s

Hong, B.J., Compton, O.C., An, Z., Eryazici, I., Nguyen, S.T., 2012. Successful Stabilization of Graphene Oxide in Electrolyte Solutions: Enhancement of Biofunctionalization and Cellular Uptake. ACS Nano 6, 63–73. https://doi.org/10.1021/nn202355p

Hou, J., Miao, L., Wang, C., Wang, P., Ao, Y., Lv, B., 2015. Effect of CuO nanoparticles on the production and composition of extracellular polymeric substances and physicochemical stability of activated sludge flocs. Bioresource Technology 176, 65–70. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.11.020

Hou, J., Yang, Y., Wang, P., Wang, C., Miao, L., Wang, X., Lv, B., You, G., Liu, Z., 2017. Effects of CeO2, CuO, and ZnO nanoparticles on physiological features of Microcystis aeruginosa and the production and composition of extracellular polymeric substances. Environ Sci Pollut Res 24, 226–235. https://doi.org/10.1007/s11356-016-7387-5

Hu, X., Gao, Y., Fang, Z., 2016. Integrating metabolic analysis with biological endpoints provides insight into nanotoxicological mechanisms of graphene oxide: From effect onset to cessation. Carbon 109, 65–73. https://doi.org/10.1016/j.carbon.2016.07.068

Hu, X., Ouyang, S., Mu, L., An, J., Zhou, Q., 2015. Effects of Graphene Oxide and Oxidized Carbon Nanotubes on the Cellular Division, Microstructure, Uptake, Oxidative Stress, and Metabolic Profiles. Environ. Sci. Technol. 49, 10825–10833. https://doi.org/10.1021/acs.est.5b02102

Huang, X., Yin, Z., Wu, S., Qi, X., He, Q., Zhang, Q., Yan, Q., Boey, F., Zhang, H., 2011. Graphene-Based Materials: Synthesis, Characterization, Properties, and Applications. Small 7, 1876–1902. https://doi.org/10.1002/smll.201002009

Hui, L., Piao, J.-G., Auletta, J., Hu, K., Zhu, Y., Meyer, T., Liu, H., Yang, L., 2014. Availability of the Basal Planes of Graphene Oxide Determines Whether It Is Antibacterial. ACS Appl. Mater. Interfaces 6, 13183–13190. https://doi.org/10.1021/am503070z

Hummers, W.S., Offeman, R.E., 1958. Preparation of Graphitic Oxide. J. Am. Chem. Soc. 80, 1339–1339. https://doi.org/10.1021/ja01539a017

Hünken, M., Harder, J., Kirst, G.O., 2008. Epiphytic bacteria on the Antarctic ice diatom Amphiprora kufferathii Manguin cleave hydrogen peroxide produced during algal photosynthesis. Plant Biol (Stuttg) 10, 519–526. https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2008.00040.x

Igarashi, K., Miyako, E., Kato, S., 2020. Direct Interspecies Electron Transfer Mediated by Graphene Oxide-Based Materials. Front. Microbiol. 10. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03068

Ikuma, K., Decho, A.W., Lau, B.L.T., 2015. When nanoparticles meet biofilms—interactions guiding the environmental fate and accumulation of nanoparticles. Front. Microbiol. 6. https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00591

Jastrzębska, A.M., Olszyna, A.R., 2015. The ecotoxicity of graphene family materials: current status, knowledge gaps and future needs. Journal of Nanoparticle Research 17, 40. https://doi.org/10.1007/s11051-014-2817-0

Jayakumar, S., Bhuyar, P., Pugazhendhi, A., Rahim, M.H.Ab., Maniam, G.P., Govindan, N., 2021. Effects of light intensity and nutrients on the lipid content of marine microalga (diatom) Amphiprora sp. for promising biodiesel production. Science of The Total Environment 768, 145471. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145471

Jeevanandam, J., Barhoum, A., Chan, Y.S., Dufresne, A., Danquah, M.K., 2018. Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations. Beilstein J. Nanotechnol. 9, 1050–1074. https://doi.org/10.3762/bjnano.9.98

Jenkins, S.R., Arenas, F., Arrontes, J., Bussell, J., Castro, J., Coleman, R.A., Hawkins, S.J., Kay, S., Martínez, B., Oliveros, J., F.Roberts, M., Sousa, S., Thompson, R.C., Hartnoll, R.G., 2001. European-scale analysis of seasonal variability in limpet grazing activity and microalgal abundance. Marine Ecology Progress Series 211, 193–203. https://doi.org/10.3354/meps211193

Ji, H., Sun, H., Qu, X., 2016. Antibacterial applications of graphene-based nanomaterials: Recent achievements and challenges. Advanced Drug Delivery Reviews 105, 176–189. https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.04.009

Jia, P.-P., Sun, T., Junaid, M., Xiong, Y.-H., Wang, Y.-Q., Liu, L., Pu, S.-Y., Pei, D.-S., 2019. Chronic exposure to graphene oxide (GO) induced inflammation and differentially disturbed the

intestinal microbiota in zebrafish. Environ. Sci.: Nano 6, 2452–2469. https://doi.org/10.1039/C9EN00364A

Jiao, Y., Qian, F., Li, Y., Wang, G., Saltikov, C.W., Gralnick, J.A., 2011. Deciphering the Electron Transport Pathway for Graphene Oxide Reduction by Shewanella oneidensis MR-1. Journal of Bacteriology 193, 3662–3665. https://doi.org/10.1128/JB.00201-11

Kang, S., Mauter, M.S., Elimelech, M., 2009. Microbial Cytotoxicity of Carbon-Based Nanomaterials: Implications for River Water and Wastewater Effluent. Environ. Sci. Technol. 43, 2648–2653. https://doi.org/10.1021/es8031506

Katz, M.E., Wright, J.D., Miller, K.G., Cramer, B.S., Fennel, K., Falkowski, P.G., 2005. Biological overprint of the geological carbon cycle. Marine Geology, Ocean Chemistry over the Phanerozoic and its links to Geological Processes 217, 323–338. https://doi.org/10.1016/j.margeo.2004.08.005

Kedves, A., Rónavári, A., Kónya, Z., 2021. Long-term effect of graphene oxide on the aerobic granular sludge wastewater treatment process. Journal of Environmental Chemical Engineering 9, 104853. https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.104853

Kedves, A., Sánta, L., Balázs, M., Kesserű, P., Kiss, I., Rónavári, A., Kónya, Z., 2020. Chronic responses of aerobic granules to the presence of graphene oxide in sequencing batch reactors. Journal of Hazardous Materials 389, 121905. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121905

Kelly, M.G., Cazaubon, A., Coring, E., Dell'Uomo, A., Ector, L., Goldsmith, B., Guasch, H., Hürlimann, J., Jarlman, A., Kawecka, B., Kwandrans, J., Laugaste, R., Lindstrøm, E.-A., Leitao, M., Marvan, P., Padisák, J., Pipp, E., Prygiel, J., Rott, E., Sabater, S., van Dam, H., Vizinet, J., 1998. Recommendations for the routine sampling of diatoms for water quality assessments in Europe. Journal of Applied Phycology 10, 215–224. https://doi.org/10.1023/A:1008033201227

Khanra, A., Sangam, S., Shakeel, A., Suhag, D., Mistry, S., Rai, M.P., Chakrabarti, S., Mukherjee, M., 2018. Sustainable Growth and Lipid Production from Chlorella pyrenoidosa Using N-Doped Carbon Nanosheets: Unravelling the Role of Graphitic Nitrogen. ACS Sustainable Chem. Eng. 6, 774–780. https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b03103

Kiew, S.F., Kiew, L.V., Lee, H.B., Imae, T., Chung, L.Y., 2016. Assessing biocompatibility of graphene oxide-based nanocarriers: A review. Journal of Controlled Release 226, 217–228. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.02.015

Kim, Keun Soo, Zhao, Y., Jang, H., Lee, S.Y., Kim, J.M., Kim, Kwang S., Ahn, J.-H., Kim, P., Choi, J.-Y., Hong, B.H., 2009. Large-scale pattern growth of graphene films for stretchable transparent electrodes. Nature 457, 706–710. https://doi.org/10.1038/nature07719

Kim, M.-J., Ko, D., Ko, K., Kim, D., Lee, J.-Y., Woo, S.M., Kim, W., Chung, H., 2018. Effects of silver-graphene oxide nanocomposites on soil microbial communities. Journal of Hazardous Materials 346, 93–102. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.11.032

Ko, K., Kim, M.-J., Lee, J.-Y., Kim, W., Chung, H., 2019. Effects of graphene oxides and silver-graphene oxides on aquatic microbial activity. Science of The Total Environment 651, 1087–1095. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.124

Kociolek, P., 2011. Nitzschia palea. In Diatoms of North America. Retrieved August 07, 2023, from https://diatoms.org/species/nitzschia_palea. Diatom Research. https://doi.org/10.1080/0269249X.2021.2006790

Koshila Ravi, R., Anusuya, S., Balachandar, M., Muthukumar, T., 2019. Microbial Interactions in Soil Formation and Nutrient Cycling, in: Varma, A., Choudhary, D.K. (Eds.), Mycorrhizosphere and Pedogenesis. Springer, Singapore, pp. 363–382. https://doi.org/10.1007/978-981-13-6480-8_21

Kuczynska, P., Jemiola-Rzeminska, M., Strzalka, K., 2015. Photosynthetic Pigments in Diatoms. Marine Drugs 13, 5847–5881. https://doi.org/10.3390/md13095847

Kumar, P., Huo, P., Zhang, R., Liu, B., 2019. Antibacterial Properties of Graphene-Based Nanomaterials. Nanomaterials 9, 737. https://doi.org/10.3390/nano9050737

Kumar, P., Singh, A., Hussain, S., Hui, K., Kwan, S., Hui, Eom, J., Jung, J., Singh, J., 2013. Graphene: Synthesis, Properties and Application in Transparent Electronic Devices. Reviews in Advanced Sciences and Engineering 2, 1–21. https://doi.org/10.1166/rase.2013.1043

Kumar, S., Chatterjee, K., 2016. Comprehensive Review on the Use of Graphene-Based Substrates for Regenerative Medicine and Biomedical Devices. ACS Appl. Mater. Interfaces 8, 26431–26457. https://doi.org/10.1021/acsami.6b09801

Lalwani, G., Xing, W., Sitharaman, B., 2014. Enzymatic degradation of oxidized and reduced graphene nanoribbons by lignin peroxidase. J. Mater. Chem. B 2, 6354–6362. https://doi.org/10.1039/C4TB00976B

Lamote, M., Darko, E., Schoefs, B., Lemoine, Y., 2003. Assembly of the photosynthetic apparatus in embryos from Fucus serratus L. Photosynthesis Research 77, 45–52. https://doi.org/10.1023/A:1024999024157

Landner, L., Blanck, H., Heyman, U., Lundgren, A., Notini, M., Rosemarin, A., Sundelin, B., 1989. Community Testing, Microcosm and Mesocosm Experiments: Ecotoxicological Tools with High Ecological Realism, in: Landner, L. (Ed.), Chemicals in the Aquatic Environment: Advanced Hazard Assessment, Springer Series on Environmental Management. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 216–254. https://doi.org/10.1007/978-3-642-61334-0_10

Lanphere, J.D., Luth, C.J., Walker, S.L., 2013. Effects of Solution Chemistry on the Transport of Graphene Oxide in Saturated Porous Media. Environ. Sci. Technol. 47, 4255–4261. https://doi.org/10.1021/es400138c

Lanphere, J.D., Rogers, B., Luth, C., Bolster, C.H., Walker, S.L., 2014. Stability and Transport of Graphene Oxide Nanoparticles in Groundwater and Surface Water. Environmental Engineering Science 31, 350–359. https://doi.org/10.1089/ees.2013.0392

Lavin-Lopez, M.P., Paton-Carrero, A., Sanchez-Silva, L., Valverde, J.L., Romero, A., 2017. Influence of the reduction strategy in the synthesis of reduced graphene oxide. Advanced Powder Technology 28, 3195–3203. https://doi.org/10.1016/j.apt.2017.09.032

Lawrence, J.R., Neu, T.R., 2003. Microscale Analyses of the Formation and Nature of Microbial Biofilm Communities in River Systems. Re/Views in Environmental Science and Bio/Technology 2, 85–97. https://doi.org/10.1023/B:RESB.0000040472.53337.57

Lawrence, J.R., Waiser, M.J., Swerhone, G.D.W., Roy, J., Tumber, V., Paule, A., Hitchcock, A.P., Dynes, J.J., Korber, D.R., 2016. Effects of fullerene (C60), multi-wall carbon nanotubes (MWCNT), single wall carbon nanotubes (SWCNT) and hydroxyl and carboxyl modified single wall carbon nanotubes on riverine microbial communities. Environ Sci Pollut Res 23, 10090–10102. https://doi.org/10.1007/s11356-016-6244-x

Lee, A.Y., Yang, K., Anh, N.D., Park, C., Lee, S.M., Lee, T.G., Jeong, M.S., 2021. Raman study of D* band in graphene oxide and its correlation with reduction. Applied Surface Science 536, 147990. https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2020.147990

Lee, B.-M., Hur, J., 2016. Adsorption Behavior of Extracellular Polymeric Substances on Graphene Materials Explored by Fluorescence Spectroscopy and Two-Dimensional Fourier Transform Infrared Correlation Spectroscopy. Environ. Sci. Technol. 50, 7364–7372. https://doi.org/10.1021/acs.est.6b01286

Lee, C., Wei, X., Kysar, J.W., Hone, J., 2008. Measurement of the Elastic Properties and Intrinsic Strength of Monolayer Graphene. Science 321, 385–388. https://doi.org/10.1126/science.1157996

Li, A., Zhang, C., Zhang, Y.-F., 2017. Thermal Conductivity of Graphene-Polymer Composites: Mechanisms, Properties, and Applications. Polymers 9, 437. https://doi.org/10.3390/polym9090437

Li, H., Chi, Z., Yan, B., 2019. Long-term impacts of graphene oxide and Ag nanoparticles on anammox process: Performance, microbial community and toxic mechanism. Journal of Environmental Sciences 79, 239–247. https://doi.org/10.1016/j.jes.2018.07.012

Li, X., Cai, W., An, J., Kim, S., Nah, J., Yang, D., Piner, R., Velamakanni, A., Jung, I., Tutuc, E., Banerjee, S.K., Colombo, L., Ruoff, R.S., 2009. Large-Area Synthesis of High-Quality and Uniform Graphene Films on Copper Foils. Science 324, 1312–1314. https://doi.org/10.1126/science.1171245

Li, Y., Lu, Y., Zhang, W., Wu, H., Zhang, C., Wang, L., Niu, L., Zhang, H., 2020. Enhanced biological nitrogen removal from sediment by graphene derivative-mediated community assembly. Bioresource Technology 306, 123187. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123187

Li, Y., Wang, Q., Liu, L., Tabassum, S., Sun, J., Hong, Y., 2021. Enhanced phenols removal and methane production with the assistance of graphene under anaerobic co-digestion conditions. Science of The Total Environment 759, 143523. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143523

Lian, S., Qu, Y., Li, S., Zhang, Z., Zhang, H., Dai, C., Deng, Y., 2020. Interaction of graphene-family nanomaterials with microbial communities in sequential batch reactors revealed by high-throughput sequencing. Environmental Research 184, 109392. https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109392

Liang, L.-J., Wu, T., Kang, Y., Wang, Q., 2013. Dispersion of Graphene Sheets in Aqueous Solution by Oligodeoxynucleotides. ChemPhysChem 14, 1626–1632. https://doi.org/10.1002/cphc.201201084

Liang, M., Luo, B., Zhi, L., 2009. Application of graphene and graphene-based materials in clean energy-related devices. Int. J. Energy Res. 33, 1161–1170. https://doi.org/10.1002/er.1598

Liao, Y., Li, S., Zhu, X., Dang, Z., Tang, S., Ji, G., 2021. The promotion and inhibition effect of graphene oxide on the process of microbial denitrification at low temperature. Bioresource Technology 340, 125636. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125636

Lin, L., Peng, H., Liu, Z., 2019. Synthesis challenges for graphene industry. Nature Materials 18, 520–524. https://doi.org/10.1038/s41563-019-0341-4

Linacre, L., Sánchez-Robles, C., Mirabal-Gómez, U., Lara-Lara, J.R., Bazán-Guzmán, C., 2021. Cell carbon content and biomass assessments of dinoflagellates and diatoms in the oceanic ecosystem of the Southern Gulf of Mexico. PLOS ONE 16, e0247071. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0247071

Liu, J., 2012. Adsorption of DNA onto gold nanoparticles and graphene oxide: surface science and applications. Phys. Chem. Chem. Phys. 14, 10485–10496. https://doi.org/10.1039/C2CP41186E

Liu, L., Zhu, C., Fan, M., Chen, C., Huang, Y., Hao, Q., Yang, J., Wang, H., Sun, D., 2015. Oxidation and degradation of graphitic materials by naphthalene-degrading bacteria. Nanoscale 7, 13619–13628. https://doi.org/10.1039/c5nr02502h

Liu, S., Zeng, T.H., Hofmann, M., Burcombe, E., Wei, J., Jiang, R., Kong, J., Chen, Y., 2011. Antibacterial Activity of Graphite, Graphite Oxide, Graphene Oxide, and Reduced Graphene Oxide: Membrane and Oxidative Stress. ACS Nano 5, 6971–6980. https://doi.org/10.1021/nn202451x

Liu, Y., Shi, L., Su, L., Mei, H.C. van der, Jutte, P.C., Ren, Y., Busscher, H.J., 2019. Nanotechnology-based antimicrobials and delivery systems for biofilm-infection control. Chem. Soc. Rev. 48, 428–446. https://doi.org/10.1039/C7CS00807D

Lobato, B., Merino, C., Barranco, V., Centeno, T.A., 2016. Large-scale conversion of helical-ribbon carbon nanofibers to a variety of graphene-related materials. RSC Advances 6, 57514–57520. https://doi.org/10.1039/C6RA08865A

Love, M.I., Huber, W., Anders, S., 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. Genome Biology 15. https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8

Lu, K., Dong, S., Petersen, E.J., Niu, J., Chang, X., Wang, P., Lin, S., Gao, S., Mao, L., 2017. Biological Uptake, Distribution, and Depuration of Radio-Labeled Graphene in Adult Zebrafish: Effects of Graphene Size and Natural Organic Matter. ACS Nano 11, 2872–2885. https://doi.org/10.1021/acsnano.6b07982

Lu, K., Hu, Q., Zhai, L., Zhu, Z., Xu, Y., Ding, Z., Zeng, H., Dong, S., Gao, S., Mao, L., 2023. Mineralization of Few-Layer Graphene Made It Bioavailable in Chlamydomonas reinhardtii. Environ. Sci. Technol. 57, 15255–15265. https://doi.org/10.1021/acs.est.3c04549

Lü, K., Zhao, G., Wang, X., 2012. A brief review of graphene-based material synthesis and its application in environmental pollution management. Chin. Sci. Bull. 57, 1223–1234. https://doi.org/10.1007/s11434-012-4986-5

Lukowiak, A., Kedziora, A., Strek, W., 2016. Antimicrobial graphene family materials: Progress, advances, hopes and fears. Advances in Colloid and Interface Science 236, 101–112. https://doi.org/10.1016/j.cis.2016.08.002

Luther, G.W., Rickard, D.T., 2005. Metal Sulfide Cluster Complexes and their Biogeochemical Importance in the Environment. J Nanopart Res 7, 389–407. https://doi.org/10.1007/s11051-005-4272-4

Lv, X., Yang, Y., Tao, Y., Jiang, Y., Chen, B., Zhu, X., Cai, Z., Li, B., 2018. A mechanism study on toxicity of graphene oxide to Daphnia magna: Direct link between bioaccumulation and oxidative stress. Environmental Pollution 234, 953–959. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.12.034

Lyautey, E., Jackson, C.R., Cayrou, J., Rols, J.-L., Garabétian, F., 2005. Bacterial Community Succession in Natural River Biofilm Assemblages. Microb Ecol 50, 589–601. https://doi.org/10.1007/s00248-005-5032-9

Lynch, F., Santana-Sánchez, A., Jämsä, M., Sivonen, K., Aro, E.-M., Allahverdiyeva, Y., 2015. Screening native isolates of cyanobacteria and a green alga for integrated wastewater treatment, biomass accumulation and neutral lipid production. Algal Research 11, 411–420. https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.05.015

Madsen, E.L., 2011. Microorganisms and their roles in fundamental biogeochemical cycles. Current Opinion in Biotechnology, Energy biotechnology – Environmental biotechnology 22, 456–464. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.01.008

Mahé, F., Rognes, T., Quince, C., de Vargas, C., Dunthorn, M., 2014. Swarm: robust and fast clustering method for amplicon-based studies. PeerJ 2, e593. https://doi.org/10.7717/peerj.593

Malina, T., Maršálková, E., Holá, K., Tuček, J., Scheibe, M., Zbořil, R., Maršálek, B., 2019. Toxicity of graphene oxide against algae and cyanobacteria: Nanoblade-morphology-induced mechanical injury and self-protection mechanism. Carbon 155, 386–396. https://doi.org/10.1016/j.carbon.2019.08.086

Mann, D.G., Chepurnov, V.A., Idei, M., 2003. Mating System, Sexual Reproduction, and Auxosporulation in the Anomalous Raphid Diatom Eunotia (bacillariophyta)1. Journal of Phycology 39, 1067–1084. https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.2003.03-011.x

Manz, W., Wendt-Potthoff, K., Neu, T.R., Szewzyk, U., Lawrence, J.R., 1999. Phylogenetic Composition, Spatial Structure, and Dynamics of Lotic Bacterial Biofilms Investigated by Fluorescent in Situ Hybridization and Confocal Laser Scanning Microscopy. Microb Ecol 37, 225–237. https://doi.org/10.1007/s002489900148

McMurdie, P.J., Holmes, S., 2013. phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. PLoS ONE 8, e61217. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217

Mejías Carpio, I.E., Santos, C.M., Wei, X., Rodrigues, D.F., 2012. Toxicity of a polymer–graphene oxide composite against bacterial planktonic cells, biofilms, and mammalian cells. Nanoscale 4, 4746. https://doi.org/10.1039/c2nr30774j

Miao, A.-J., Schwehr, K.A., Xu, C., Zhang, S.-J., Luo, Z., Quigg, A., Santschi, P.H., 2009. The algal toxicity of silver engineered nanoparticles and detoxification by exopolymeric substances. Environ Pollut 157, 3034–3041. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.05.047

Miao, L., Wang, P., Hou, J., Yao, Y., Liu, Z., Liu, S., 2019. Low concentrations of copper oxide nanoparticles alter microbial community structure and function of sediment biofilms. Science of The Total Environment 653, 705–713. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.354

Minitha, C.R., Rajendrakumar, R.T., 2013. Synthesis and Characterization of Reduced Graphene Oxide. Advanced Materials Research 678, 56–60. https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.678.56

Mohan, V.B., Lau, K., Hui, D., Bhattacharyya, D., 2018. Graphene-based materials and their composites: A review on production, applications and product limitations. Composites Part B: Engineering 142, 200–220. https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2018.01.013

Montagner, A., Bosi, S., Tenori, E., Bidussi, M., Alshatwi, A.A., Tretiach, M., Prato, M., Syrgiannis, Z., 2016. Ecotoxicological effects of graphene-based materials. 2D Materials 4, 012001. https://doi.org/10.1088/2053-1583/4/1/012001

Moons, P., Michiels, C.W., Aertsen, A., 2009. Bacterial interactions in biofilms. Critical Reviews in Microbiology 35, 157–168. https://doi.org/10.1080/10408410902809431

Mosmeri, H., Gholami, F., Shavandi, M., Dastgheib, S.M.M., Alaie, E., 2019. Bioremediation of benzene-contaminated groundwater by calcium peroxide (CaO2) nanoparticles: Continuous-flow and biodiversity studies. Journal of Hazardous Materials 371, 183–190. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.02.071

Mottier, A., Mouchet, F., Pinelli, É., Gauthier, L., Flahaut, E., 2017. Environmental impact of engineered carbon nanoparticles: from releases to effects on the aquatic biota. Current Opinion in Biotechnology 46, 1–6. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.11.024

Mühlenbruch, M., Grossart, H.-P., Eigemann, F., Voss, M., 2018. Mini-review: Phytoplankton-derived polysaccharides in the marine environment and their interactions with heterotrophic bacteria. Environmental Microbiology 20, 2671–2685. https://doi.org/10.1111/1462-2920.14302

Muratçobanoğlu, H., Gökçek, Ö.B., Mert, R.A., Zan, R., Demirel, S., 2021. The impact of reduced graphene oxide (rGO) supplementation on cattle manure anaerobic digestion: Focusing on process performance and microbial syntrophy. Biochemical Engineering Journal 173, 108080. https://doi.org/10.1016/j.bej.2021.108080

Myhre, G., Shindell, D., Pongratz, J., 2014. Anthropogenic and Natural Radiative Forcing, in: Stocker, T. (Ed.), Climate Change 2013 : The Physical Science Basis; Working Group I Contribution to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Ludwig-Maximilians-Universität München, Cambridge, pp. 659–740. https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.018

Nag, A., Mitra, A., Mukhopadhyay, S.C., 2018. Graphene and its sensor-based applications: A review. Sensors and Actuators A: Physical 270, 177–194. https://doi.org/10.1016/j.sna.2017.12.028

Naiman, R., Bilby, R.E., 2001. River Ecology and Management: Lessons from the Pacific Coastal Ecoregion. Springer Science & Business Media.

Nair, R.R., Blake, P., Grigorenko, A.N., Novoselov, K.S., Booth, T.J., Stauber, T., Peres, N.M.R., Geim, A.K., 2008. Fine structure constant defines visual transparency of graphene. Science 320, 1308. https://doi.org/10.1126/science.1156965

Najafpour, M.M., Zaharieva, I., Zand, Z., Maedeh Hosseini, S., Kouzmanova, M., Hołyńska, M., Tranca, I., Larkum, A.W., Shen, J.-R., Allakhverdiev, S.I., 2020. Water-oxidizing complex in Photosystem II: Its structure and relation to manganese-oxide based catalysts. Coordination Chemistry Reviews 409, 213183. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2020.213183

Natrah, F.M.I., Bossier, P., Sorgeloos, P., Yusoff, F.M., Defoirdt, T., 2014. Significance of microalgal–bacterial interactions for aquaculture. Reviews in Aquaculture 6, 48–61. https://doi.org/10.1111/raq.12024

Nguyen, H.N., Rodrigues, D.F., 2018. Chronic toxicity of graphene and graphene oxide in sequencing batch bioreactors: A comparative investigation. Journal of Hazardous Materials 343, 200–207. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.09.032

Nguyen-Deroche, T.L.N., Caruso, A., Le, T.T., Bui, T.V., Schoefs, B., Tremblin, G., Morant-Manceau, A., 2012. Zinc Affects Differently Growth, Photosynthesis, Antioxidant Enzyme Activities and Phytochelatin Synthase Expression of Four Marine Diatoms. The Scientific World Journal 2012, e982957. https://doi.org/10.1100/2012/982957

Nogueira, P.F.M., Nakabayashi, D., Zucolotto, V., 2015. The effects of graphene oxide on green algae Raphidocelis subcapitata. Aquatic Toxicology 166, 29–35. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.07.001

Novoselov, K.S., Geim, A.K., Morozov, S.V., Jiang, D., Zhang, Y., Dubonos, S.V., Grigorieva, I.V., Firsov, A.A., 2004. Electric Field Effect in Atomically Thin Carbon Films. Science, New Series 306, 666–669.

Ohtsubo, Y., Maruyama, F., Mitsui, H., Nagata, Y., Tsuda, M., 2012. Complete genome sequence of Acidovorax sp. strain KKS102, a polychlorinated-biphenyl degrader. J. Bacteriol. 194, 6970–6971. https://doi.org/10.1128/JB.01848-12

Oksanen, J., Blanchet, F.G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P.R., O'hara, R.B., Simpson, G.L., Solymos, P., Stevens, M.H.H., Wagner, H., 2015. Package 'vegan.' Community ecology package, version 2.

Olabi, A.G., Abdelkareem, M.A., Wilberforce, T., Sayed, E.T., 2021. Application of graphene in energy storage device – A review. Renewable and Sustainable Energy Reviews 135, 110026. https://doi.org/10.1016/j.rser.2020.110026

Ouyang, S., Hu, X., Zhou, Q., 2015. Envelopment–Internalization Synergistic Effects and Metabolic Mechanisms of Graphene Oxide on Single-Cell Chlorella vulgaris Are Dependent on the

Nanomaterial Particle Size. ACS Appl. Mater. Interfaces 7, 18104–18112. https://doi.org/10.1021/acsami.5b05328

Paerl, H.W., Pinckney, J.L., 1996. A mini-review of microbial consortia: Their roles in aquatic production and biogeochemical cycling. Microb Ecol 31, 225–247. https://doi.org/10.1007/BF00171569

Paital, B., Guru, D., Mohapatra, P., Panda, B., Parida, N., Rath, S., Kumar, V., Saxena, P.S., Srivastava, A., 2019. Ecotoxic impact assessment of graphene oxide on lipid peroxidation at mitochondrial level and redox modulation in fresh water fish Anabas testudineus. Chemosphere 224, 796–804. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.02.156

Pamp, S.J., Sternberg, C., Tolker-Nielsen, T., 2009. Insight into the microbial multicellular lifestyle via flow-cell technology and confocal microscopy. Cytometry Part A 75A, 90–103. https://doi.org/10.1002/cyto.a.20685

Pan, B., Xing, B., 2008. Adsorption Mechanisms of Organic Chemicals on Carbon Nanotubes. Environ. Sci. Technol. 42, 9005–9013. https://doi.org/10.1021/es801777n

Pan, Y., Sahoo, N.G., Li, L., 2012. The application of graphene oxide in drug delivery. Expert Opinion on Drug Delivery 9, 1365–1376. https://doi.org/10.1517/17425247.2012.729575

Pandey, L.K., Bergey, E.A., Lyu, J., Park, J., Choi, S., Lee, H., Depuydt, S., Oh, Y.-T., Lee, S.-M., Han, T., 2017. The use of diatoms in ecotoxicology and bioassessment: Insights, advances and challenges. Water Research 118, 39–58. https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.01.062

Pandit, S., Cao, Z., Mokkapati, V.R.S.S., Celauro, E., Yurgens, A., Lovmar, M., Westerlund, F., Sun, J., Mijakovic, I., 2018. Vertically Aligned Graphene Coating is Bactericidal and Prevents the Formation of Bacterial Biofilms. Advanced Materials Interfaces 5, 1701331. https://doi.org/10.1002/admi.201701331

Papageorgiou, D.G., Kinloch, I.A., Young, R.J., 2017. Mechanical properties of graphene and graphene-based nanocomposites. Progress in Materials Science 90, 75–127. https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2017.07.004

Park, M.V.D.Z., Bleeker, E.A.J., Brand, W., Cassee, F.R., van Elk, M., Gosens, I., de Jong, W.H., Meesters, J.A.J., Peijnenburg, W.J.G.M., Quik, J.T.K., Vandebriel, R.J., Sips, A.J.A.M., 2017. Considerations for Safe Innovation: The Case of Graphene. ACS Nano 11, 9574–9593. https://doi.org/10.1021/acsnano.7b04120

Parvez, K., Yang, S., Feng, X., Müllen, K., 2015. Exfoliation of graphene via wet chemical routes. Synthetic Metals, Reviews of Current Advances in Graphene Science and Technology 210, 123–132. https://doi.org/10.1016/j.synthmet.2015.07.014

Pei, S., Cheng, H.-M., 2012. The reduction of graphene oxide. Carbon, Festschrift dedicated to Peter A. Thrower, Editor-in-Chief, 1972 - 2012 50, 3210–3228. https://doi.org/10.1016/j.carbon.2011.11.010

Perreault, F., de Faria, A.F., Nejati, S., Elimelech, M., 2015. Antimicrobial Properties of Graphene Oxide Nanosheets: Why Size Matters. ACS Nano 9, 7226–7236. https://doi.org/10.1021/acsnano.5b02067

Persson, L., Carney Almroth, B.M., Collins, C.D., Cornell, S., de Wit, C.A., Diamond, M.L., Fantke, P., Hassellöv, M., MacLeod, M., Ryberg, M.W., Søgaard Jørgensen, P., Villarrubia-Gómez, P., Wang, Z., Hauschild, M.Z., 2022. Outside the Safe Operating Space of the Planetary Boundary for Novel Entities. Environ. Sci. Technol. 56, 1510–1521. https://doi.org/10.1021/acs.est.1c04158

Potts, J.R., Dreyer, D.R., Bielawski, C.W., Ruoff, R.S., 2011. Graphene-based polymer nanocomposites. Polymer 52, 5–25. https://doi.org/10.1016/j.polymer.2010.11.042

Prins, A., Deleris, P., Hubas, C., Jesus, B., 2020. Effect of Light Intensity and Light Quality on Diatom Behavioral and Physiological Photoprotection. Frontiers in Marine Science 7.

Prygiel, J., Coste, M., Bukowska, J., 1996. Les diatomées et les indices diatomiques dans les réseaux de mesure de la qualité des cours d'eau français : historique et avenir. Bull. Fr. Pêche Piscic. 65–79. https://doi.org/10.1051/kmae:1996006

Pulingam, T., Thong, K.L., Ali, Md.E., Appaturi, J.N., Dinshaw, I.J., Ong, Z.Y., Leo, B.F., 2019. Graphene oxide exhibits differential mechanistic action towards Gram-positive and Gram-negative bacteria. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 181, 6–15. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.05.023

Pyl'nik, S.V., Dueck, J.H., Min'kov, L.L., 2007. Equilibrium thickness of a biofilm. Theor Found Chem Eng 41, 430–435. https://doi.org/10.1134/S004057950704015X

Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., Glöckner, F.O., 2012. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. Nucleic Acids Research 41, D590–D596. https://doi.org/10.1093/nar/gks1219

Quigg, A., Chin, W.-C., Chen, C.-S., Zhang, S., Jiang, Y., Miao, A.-J., Schwehr, K.A., Xu, C., Santschi, P.H., 2013. Direct and Indirect Toxic Effects of Engineered Nanoparticles on Algae: Role of Natural Organic Matter. ACS Sustainable Chem. Eng. 1, 686–702. https://doi.org/10.1021/sc400103x

Randrianjatovo-Gbalou, I., Rouquette, P., Lefebvre, D., Girbal-Neuhauser, E., Marcato-Romain, C. -E., 2017. In situ analysis of Bacillus licheniformis biofilms: amyloid-like polymers and eDNA are involved in the adherence and aggregation of the extracellular matrix. Journal of Applied Microbiology 122, 1262–1274. https://doi.org/10.1111/jam.13423

Reiss, T., Hjelt, K., Ferrari, A.C., 2019. Graphene is on track to deliver on its promises. Nat. Nanotechnol. 14, 907–910. https://doi.org/10.1038/s41565-019-0557-0

Ren, W., Ren, G., Teng, Y., Li, Z., Li, L., 2015. Time-dependent effect of graphene on the structure, abundance, and function of the soil bacterial community. Journal of Hazardous Materials 297, 286–294. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.05.017

Renner, L.D., Weibel, D.B., 2011. Physicochemical regulation of biofilm formation. MRS Bulletin 36, 347–355. https://doi.org/10.1557/mrs.2011.65

Roco, M.C., Mirkin, C.A., Hersam, M.C., 2011. Nanotechnology research directions for societal needs in 2020: summary of international study. J Nanopart Res 13, 897–919. https://doi.org/10.1007/s11051-011-0275-5

Roháček, K., Soukupová, J., Bartak, M., 2008. Chlorophyll fluorescence: A wonderful tool to study plant physiology and plant stress. Plant Cell Compartments - Selected Topics 41–104.

Romaní, A.M., Fund, K., Artigas, J., Schwartz, T., Sabater, S., Obst, U., 2008. Relevance of Polymeric Matrix Enzymes During Biofilm Formation. Microb Ecol 56, 427–436. https://doi.org/10.1007/s00248-007-9361-8

Round, F.E., Crawford, R.M., Mann, D.G., 1990. Diatoms: Biology and Morphology of the Genera. Cambridge University Press.

Rowley-Neale, S.J., Randviir, E.P., Abo Dena, A.S., Banks, C.E., 2018. An overview of recent applications of reduced graphene oxide as a basis of electroanalytical sensing platforms. Applied Materials Today 10, 218–226. https://doi.org/10.1016/j.apmt.2017.11.010

Ruiz, O.N., Fernando, K.A.S., Wang, B., Brown, N.A., Luo, P.G., McNamara, N.D., Vangsness, M., Sun, Y.-P., Bunker, C.E., 2011. Graphene Oxide: A Nonspecific Enhancer of Cellular Growth. ACS Nano 5, 8100–8107. https://doi.org/10.1021/nn202699t

Saxena, P., Sangela, V., Ranjan, S., Dutta, V., Dasgupta, N., Phulwaria, M., Rathore, D.S., Harish, 2020. Aquatic nanotoxicology: impact of carbon nanomaterials on algal flora. Energ. Ecol. Environ. 5, 240–252. https://doi.org/10.1007/s40974-020-00151-9

Saya, L., Gautam, D., Malik, V., Singh, W.R., Hooda, S., 2021. Natural Polysaccharide Based Graphene Oxide Nanocomposites for Removal of Dyes from Wastewater: A Review. J. Chem. Eng. Data 66, 11–37. https://doi.org/10.1021/acs.jced.0c00743

Scala, S., Bowler, C., 2001. Molecular insights into the novel aspects of diatom biology. CMLS, Cell. Mol. Life Sci. 58, 1666–1673. https://doi.org/10.1007/PL00000804

Schäfer, H., Abbas, B., Witte, H., Muyzer, G., 2002. Genetic diversity of “satellite” bacteria present in cultures of marine diatoms. FEMS Microbiol. Ecol. 42, 25–35. https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2002.tb00992.x

Schoefs, B., Bertrand, M., Franck, F., 2000. Spectroscopic Properties of Protochlorophyllide Analyzed In Situ in the Course of Etiolation and in Illuminated Leaves ¶. Photochemistry and Photobiology 72, 85–93. https://doi.org/10.1562/0031-8655(2000)0720085SPOPAI2.0.CO2

Schorer, M., Eisele, M., 1997. Accumulation of inorganic and organic pollutants by biofilms in the aquatic environment. Water Air Soil Pollut 99, 651–659. https://doi.org/10.1007/BF02406904

Schulze, R., Spring, S., Amann, R., Huber, I., Ludwig, W., Schleifer, K.-H., Kämpfer, P., 1999. Genotypic Diversity of Acidovorax Strains Isolated from Activated Sludge and Description of Acidovorax defluvii sp. nov. Systematic and Applied Microbiology 22, 205–214. https://doi.org/10.1016/S0723-2020(99)80067-8

Sengupta, I., Bhattacharya, P., Talukdar, M., Neogi, S., Pal, S.K., Chakraborty, S., 2019. Bactericidal effect of graphene oxide and reduced graphene oxide: Influence of shape of bacteria. Colloid and Interface Science Communications 28, 60–68. https://doi.org/10.1016/j.colcom.2018.12.001

Sha, Y., Liu, J., Yu, J., Xu, S., Yan, W., Li, Z., Shahbaz, M., 2020. Effect of Graphene Oxide on the Ammonia Removal and Bacterial Community in a Simulated Wastewater Treatment Process. J. Environ. Eng. 146, 04020097. https://doi.org/10.1061/(ASCE)EE.1943-7870.0001781

Sha Yujie, Liu Jian, Yu Jiafeng, Xu Shicai, Yan Wenning, Li Zhenghua, Shahbaz Muhammad, 2020. Effect of Graphene Oxide on the Ammonia Removal and Bacterial Community in a Simulated Wastewater Treatment Process. Journal of Environmental Engineering 146, 04020097. https://doi.org/10.1061/(ASCE)EE.1943-7870.0001781

Sharma, N.K., Rai, A.K., 2011. Biodiversity and biogeography of microalgae: progress and pitfalls. Environ. Rev. 19, 1–15. https://doi.org/10.1139/a10-020

Sharma, P., Das, M.R., 2013. Removal of a Cationic Dye from Aqueous Solution Using Graphene Oxide Nanosheets: Investigation of Adsorption Parameters. J. Chem. Eng. Data 58, 151–158. https://doi.org/10.1021/je301020n

Shaw, D.R., Ali, M., Katuri, K.P., Gralnick, J.A., Reimann, J., Mesman, R., van Niftrik, L., Jetten, M.S.M., Saikaly, P.E., 2020. Extracellular electron transfer-dependent anaerobic oxidation of ammonium by anammox bacteria. Nat Commun 11, 2058. https://doi.org/10.1038/s41467-020-16016-y

Shen, Y., Fang, Q., Chen, B., 2015. Environmental Applications of Three-Dimensional Graphene-Based Macrostructures: Adsorption, Transformation, and Detection. Environ. Sci. Technol. 49, 67–84. https://doi.org/10.1021/es504421y

Shen, Y., Yang, S., Zhou, P., Sun, Q., Wang, P., Wan, L., Li, J., Chen, L., Wang, X., Ding, S., Zhang, D.W., 2013. Evolution of the band-gap and optical properties of graphene oxide with controllable reduction level. Carbon 62, 157–164. https://doi.org/10.1016/j.carbon.2013.06.007

Shin, N.-R., Whon, T.W., Bae, J.-W., 2015. Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. Trends in Biotechnology 33, 496–503. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.06.011

Si, Y., Samulski, E.T., 2008. Synthesis of Water Soluble Graphene. Nano Lett. 8, 1679–1682. https://doi.org/10.1021/nl080604h

Sialve, B., Steyer, J.-P., 2013. Les microalgues, promesses et défis. Innovations Agronomiques 26, 25–39.

Singh, R., Paul, D., Jain, R.K., 2006. Biofilms: implications in bioremediation. Trends in Microbiology 14, 389–397. https://doi.org/10.1016/j.tim.2006.07.001

Singleton, D.R., Lee, J., Dickey, A.N., Stroud, A., Scholl, E.H., Wright, F.A., Aitken, M.D., 2018. Polyphasic characterization of four soil-derived phenanthrene-degrading Acidovorax strains and proposal of Acidovorax carolinensis sp. nov. Syst Appl Microbiol 41, 460–472. https://doi.org/10.1016/j.syapm.2018.06.001

Smith, A.T., LaChance, A.M., Zeng, S., Liu, B., Sun, L., 2019. Synthesis, properties, and applications of graphene oxide/reduced graphene oxide and their nanocomposites. Nano Materials Science 1, 31–47. https://doi.org/10.1016/j.nanoms.2019.02.004

Smith, W., West, T., 1853. A synopsis of the British Diatomaceæ : with remarks on their structure, functions and distribution; and instructions for collecting and preserving specimens. Printed for Smith and Beck, Pub. by J. Van Voorst, London. https://doi.org/10.5962/bhl.title.10706

Song, C., Yang, C.-M., Sun, X.-F., Xia, P.-F., Qin, J., Guo, B.-B., Wang, S.-G., 2018. Influences of graphene oxide on biofilm formation of gram-negative and gram-positive bacteria. Environ Sci Pollut Res Int 25, 2853–2860. https://doi.org/10.1007/s11356-017-0616-8

Song, J., Duan, C., Sang, Y., Wu, S., Ru, J., Cui, X., 2018. Effects of Graphene on Bacterial Community Diversity and Soil Environments of Haplic Cambisols in Northeast China. Forests 9, 677. https://doi.org/10.3390/f9110677

Sophia, A.C., Lima, E.C., Allaudeen, N., Rajan, S., 2016. Application of graphene based materials for adsorption of pharmaceutical traces from water and wastewater- a review. Desalination and Water Treatment 57, 27573–27586. https://doi.org/10.1080/19443994.2016.1172989

Stirbet, A., Govindjee, 2011. On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll a fluorescence induction) and Photosystem II: Basics and applications of the OJIP fluorescence transient. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, Special Issue on Recent Progress in the

Studies of Structure and Function of Photosystem II 104, 236–257. https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2010.12.010

SUGAHARA, K., MURATA, N., TAKAMIYA, A., 1971. Fluorescence of chlorophyll in brown algae and diatoms. Plant and Cell Physiology 12, 377–385. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a074631

Sun, T.Y., Bornhöft, N.A., Hungerbühler, K., Nowack, B., 2016. Dynamic Probabilistic Modeling of Environmental Emissions of Engineered Nanomaterials. Environ. Sci. Technol. 50, 4701–4711. https://doi.org/10.1021/acs.est.5b05828

Sun, T.Y., Gottschalk, F., Hungerbühler, K., Nowack, B., 2014. Comprehensive probabilistic modelling of environmental emissions of engineered nanomaterials. Environmental Pollution 185, 69–76. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.10.004

Sun, Z., Yan, Z., Yao, J., Beitler, E., Zhu, Y., Tour, J.M., 2010. Growth of graphene from solid carbon sources. Nature 468, 549–552. https://doi.org/10.1038/nature09579

Szunerits, S., Boukherroub, R., 2016. Antibacterial activity of graphene-based materials. J. Mater. Chem. B 4, 6892–6912. https://doi.org/10.1039/C6TB01647B

Tahir, U., Yasmin, A., 2019. Role of bacterial extracellular polymeric substances (EPS) in uptake and accumulation of co-contaminants. Int. J. Environ. Sci. Technol. 16, 8081–8092. https://doi.org/10.1007/s13762-019-02360-0

Tang, Y., Tian, J., Li, S., Xue, C., Xue, Z., Yin, D., Yu, S., 2015. Combined effects of graphene oxide and Cd on the photosynthetic capacity and survival of Microcystis aeruginosa. Science of The Total Environment 532, 154–161. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.05.081

Tarcan, R., Todor-Boer, O., Petrovai, I., Leordean, C., Astilean, S., Botiz, I., 2020. Reduced graphene oxide today. J. Mater. Chem. C 8, 1198–1224. https://doi.org/10.1039/C9TC04916A

Tashan, H., Khosravi-Darani, K., Yazdian, F., Omidi, M., Sheikhpour, M., Farahani, M., Omri, A., 2019. Antibacterial Properties of Graphene Based Nanomaterials: An Emphasis on Molecular Mechanisms, Surface Engineering and Size of Sheets. Mini-Reviews in Organic Chemistry 16, 159–172. https://doi.org/10.2174/1570193X15666180712120309

Taylor, C., Matzke, M., Kroll, A., Read, D.S., Svendsen, C., Crossley, A., 2016. Toxic interactions of different silver forms with freshwater green algae and cyanobacteria and their effects on mechanistic endpoints and the production of extracellular polymeric substances. Environ. Sci.: Nano 3, 396–408. https://doi.org/10.1039/C5EN00183H

Teitzel, G.M., Parsek, M.R., 2003. Heavy Metal Resistance of Biofilm and Planktonic Pseudomonas aeruginosa. Appl Environ Microbiol 69, 2313–2320. https://doi.org/10.1128/AEM.69.4.2313-2320.2003

Terry, N., 1977. Photosynthesis, Growth, and the Role of Chloride 1 2. Plant Physiology 60, 69–75. https://doi.org/10.1104/pp.60.1.69

Thamatrakoln, K., Korenovska, O., Niheu, A.K., Bidle, K.D., 2012. Whole-genome expression analysis reveals a role for death-related genes in stress acclimation of the diatom Thalassiosira pseudonana. Environmental Microbiology 14, 67–81. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02468.x

Theng, B.K.G., Yuan, G., 2008. Nanoparticles in the Soil Environment. Elements 4, 395–399. https://doi.org/10.2113/gselements.4.6.395

Thermo Fisher Scientific, 2019. Characterizing graphene with Raman spectroscopy.

Thompson, R.C., Swan, S.H., Moore, C.J., vom Saal, F.S., 2009. Our plastic age. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences 364, 1973–1976. https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0054

Tian, T., Qiao, S., Li, X., Zhang, M., Zhou, J., 2017. Nano-graphene induced positive effects on methanogenesis in anaerobic digestion. Bioresource Technology 224, 41–47. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.10.058

Tian, Y., Yu, D., Wang, Y., Chen, G., 2021. Performance and responses of aerobic granular sludge at different concentrations of graphene oxide after a single administered dose. Water Environment Research 93, 2210–2222. https://doi.org/10.1002/wer.1593

Tomaszewski, M., Cema, G., Ciesielski, S., Łukowiec, D., Ziembińska-Buczyńska, A., 2019. Cold anammox process and reduced graphene oxide - Varieties of effects during long-term interaction. Water Research 156, 71–81. https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.03.006

Touliabah, H.E., Abdel-Hamid, M.I., Almutairi, A.W., 2020. Long-term monitoring of the biomass and production of lipids by Nitzschia palea for biodiesel production. Saudi Journal of Biological Sciences 27, 2038–2046. https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.04.014

Tremaroli, V., Bäckhed, F., 2012. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. Nature 489, 242–249. https://doi.org/10.1038/nature11552

Tuchman, N.C., Schollett, M.A., Rier, S.T., Geddes, P., 2006. Differential Heterotrophic Utilization of Organic Compounds by Diatoms and Bacteria under Light and Dark Conditions. Hydrobiologia 561, 167–177. https://doi.org/10.1007/s10750-005-1612-4

Utembe, W., Tlotleng, N., Kamng'ona, A., 2022. A systematic review on the effects of nanomaterials on gut microbiota. Current Research in Microbial Sciences 3, 100118. https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2022.100118

van Bruggen, A.H.C., Goss, E.M., Havelaar, A., van Diepeningen, A.D., Finckh, M.R., Morris, J.G., 2019. One Health - Cycling of diverse microbial communities as a connecting force for soil, plant,

animal, human and ecosystem health. Science of The Total Environment 664, 927–937. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.02.091

Vanhauteghem, D., Audenaert, K., Demeyere, K., Hoogendoorn, F., Janssens, G.P.J., Meyer, E., 2019. Flow cytometry, a powerful novel tool to rapidly assess bacterial viability in metal working fluids: Proof-of-principle. PLoS One 14. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211583

Verneuil, L., Silvestre, J., Mouchet, F., Flahaut, E., Boutonnet, J.-C., Bourdiol, F., Bortolamiol, T., Baqué, D., Gauthier, L., Pinelli, E., 2015a. Multi-walled carbon nanotubes, natural organic matter, and the benthic diatom Nitzschia palea : "A sticky story." Nanotoxicology 9, 219–229. https://doi.org/10.3109/17435390.2014.918202

Verneuil, L., Silvestre, J., Randrianjatovo, I., Marcato-Romain, C.-E., Girbal-Neuhauser, E., Mouchet, F., Flahaut, E., Gauthier, L., Pinelli, E., 2015b. Double walled carbon nanotubes promote the overproduction of extracellular protein-like polymers in Nitzschia palea: An adhesive response for an adaptive issue. Carbon 88, 113–125. https://doi.org/10.1016/j.carbon.2015.02.053

Villanova, V., Fortunato, A.E., Singh, D., Bo, D.D., Conte, M., Obata, T., Jouhet, J., Fernie, A.R., Marechal, E., Falciatore, A., Pagliardini, J., Le Monnier, A., Poolman, M., Curien, G., Petroutsos, D., Finazzi, G., 2017. Investigating mixotrophic metabolism in the model diatom Phaeodactylum tricornutum. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 372. https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0404

Villanova, V., Spetea, C., 2021. Mixotrophy in diatoms: Molecular mechanism and industrial potential. Physiologia Plantarum 173, 603–611. https://doi.org/10.1111/ppl.13471

Wang, A., Pu, K., Dong, B., Liu, Y., Zhang, L., Zhang, Z., Duan, W., Zhu, Y., 2013. Role of surface charge and oxidative stress in cytotoxicity and genotoxicity of graphene oxide towards human lung fibroblast cells: Toxicity of graphene oxide to HLF cells. Journal of Applied Toxicology 33, 1156–1164. https://doi.org/10.1002/jat.2877

Wang, D., Wang, G., Zhang, G., Xu, X., Yang, F., 2013. Using graphene oxide to enhance the activity of anammox bacteria for nitrogen removal. Bioresource Technology 131, 527–530. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.099

Wang, H., Hu, B., Gao, Z., Zhang, F., Wang, J., 2021. Emerging role of graphene oxide as sorbent for pesticides adsorption: Experimental observations analyzed by molecular modeling. Journal of Materials Science & Technology 63, 192–202. https://doi.org/10.1016/j.jmst.2020.02.033

Wang, P., Zheng, Y., Lin, P., Li, J., Dong, H., Yu, H., Qi, L., Ren, L., 2021. Effects of graphite, graphene, and graphene oxide on the anaerobic co-digestion of sewage sludge and food waste: Attention to methane production and the fate of antibiotic resistance genes. Bioresource Technology 339, 125585. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125585

Wang, Q., Yang, S., Wan, S., Li, X., 2019. The Significance of Calcium in Photosynthesis. International Journal of Molecular Sciences 20, 1353. https://doi.org/10.3390/ijms20061353

Wang, Y., Qian, P.-Y., 2009. Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S Ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. PLOS ONE 4, e7401. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007401

Wang, Y., Shi, Z., Yin, J., 2011. Facile Synthesis of Soluble Graphene via a Green Reduction of Graphene Oxide in Tea Solution and Its Biocomposites. ACS Appl. Mater. Interfaces 3, 1127–1133. https://doi.org/10.1021/am1012613

Weber, K.P., Legge, R.L., 2009. One-dimensional metric for tracking bacterial community divergence using sole carbon source utilization patterns. Journal of Microbiological Methods 79, 55–61. https://doi.org/10.1016/j.mimet.2009.07.020

Weise, K., Kurth, T., Schmidt, A., Winkelmann, C., Becker, J., Kretschmar, S., Berendonk, T.U., Jungmann, D., 2023. Impact of weathered multi-walled carbon nanotubes on the epithelial cells of the intestinal tract in the freshwater grazers Lymnaea stagnalis and Rhithrogena semicolorata. Environ Sci Pollut Res 30, 407–419. https://doi.org/10.1007/s11356-022-22225-3

Wenten, I.G., Khoiruddin, K., Harimawan, A., Ting, Y.P., Boopathy, R., 2020. Membrane Biosorption: Recent Advances and Challenges. Curr Pollution Rep 6, 152–172. https://doi.org/10.1007/s40726-020-00145-5

Werner, D., 1977. The Biology of Diatoms. University of California Press.

Wick, P., Louw-Gaume, A.E., Kucki, M., Krug, H.F., Kostarelos, K., Fadeel, B., Dawson, K.A., Salvati, A., Vázquez, E., Ballerini, L., Tretiach, M., Benfenati, F., Flahaut, E., Gauthier, L., Prato, M., Bianco, A., 2014. Classification Framework for Graphene-Based Materials. Angew. Chem. Int. Ed. 53, 7714–7718. https://doi.org/10.1002/anie.201403335

Wróblewska, A., Dużyńska, A., Judek, J., Stobiński, L., Żerańska, K., Gertych, A.P., Zdrojek, M., 2017. Statistical analysis of the reduction process of graphene oxide probed by Raman spectroscopy mapping. J. Phys.: Condens. Matter 29, 475201. https://doi.org/10.1088/1361-648X/aa92fe

Wu, F., Jiao, S., Hu, J., Wu, X., Wang, B., Shen, G., Yang, Y., Tao, S., Wang, X., 2021. Stronger impacts of long-term relative to short-term exposure to carbon nanomaterials on soil bacterial communities. Journal of Hazardous Materials 410, 124550. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124550

Xie, J., Zhao, M., Wang, C., Yong, Y., Gu, Z., 2022. Recent advances in understanding the effects of nanomaterials on gut microbiota. Chemical Engineering Journal 435, 134976. https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.134976

Xiong, T., Yuan, X., Wang, H., Leng, L., Li, H., Wu, Z., Jiang, L., Xu, R., Zeng, G., 2018. Implication of graphene oxide in Cd-contaminated soil: A case study of bacterial communities. Journal of Environmental Management 205, 99–106. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.09.067

Xu, L., Zhao, J., Liu, Z., Wang, Z., Yu, K., Xing, B., 2019. Cleavage and transformation inhibition of extracellular antibiotic resistance genes by graphene oxides with different lateral sizes. Science of The Total Environment 695, 133932. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.133932

Xu, Y., Cao, H., Xue, Y., Li, B., Cai, W., 2018. Liquid-Phase Exfoliation of Graphene: An Overview on Exfoliation Media, Techniques, and Challenges. Nanomaterials 8, 942. https://doi.org/10.3390/nano8110942

Yadav, N., Dubey, A., Shukla, S., Saini, C.P., Gupta, G., Priyadarshini, R., Lochab, B., 2017. Graphene Oxide-Coated Surface: Inhibition of Bacterial Biofilm Formation due to Specific Surface-Interface Interactions. ACS Omega 2, 3070–3082. https://doi.org/10.1021/acsomega.7b00371

Yan, C., Huang, J., Cao, C., Wang, Y., Lin, X., Qian, X., 2022a. Response of constructed wetland for wastewater treatment to graphene oxide: Perspectives on plant and microbe. Journal of Hazardous Materials 422, 126911. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126911

Yan, C., Huang, J., Wang, Y., Lin, X., Cao, C., Qian, X., 2022b. Assessment on the treatment of nitrogen contaminant by constructed wetland exposed to different concentrations of graphene oxide. Journal of Cleaner Production 338, 130567. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.130567

Yan, Z., Yang, X., Lynch, I., Cui, F., 2022. Comparative evaluation of the mechanisms of toxicity of graphene oxide and graphene oxide quantum dots to blue-green algae Microcystis aeruginosa in the aquatic environment. Journal of Hazardous Materials 425, 127898. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127898

Yang, Z., Yan, H., Yang, H., Li, H., Li, A., Cheng, R., 2013. Flocculation performance and mechanism of graphene oxide for removal of various contaminants from water. Water Research 47, 3037–3046. https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.03.027

Yilihamu, A., Ouyang, B., Ouyang, P., Bai, Y., Zhang, Q., Shi, M., Guan, X., Yang, S.-T., 2020. Interaction between graphene oxide and nitrogen-fixing bacterium Azotobacter chroococcum: Transformation, toxicity and nitrogen fixation. Carbon 160, 5–13. https://doi.org/10.1016/j.carbon.2020.01.014

Yin, J., Fan, W., Du, J., Feng, W., Dong, Z., Liu, Y., Zhou, T., 2020. The toxicity of graphene oxide affected by algal physiological characteristics: A comparative study in cyanobacterial, green algae, diatom. Environmental Pollution 260, 113847. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113847

Yin, X., Qiao, S., Yu, C., Tian, T., Zhou, J., 2015. Effects of reduced graphene oxide on the activities of anammox biomass and key enzymes. Chemical Engineering Journal 276, 106–112. https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.04.073

Yola, M.L., 2019. Development of Novel Nanocomposites Based on Graphene/Graphene Oxide and Electrochemical Sensor Applications. Current Analytical Chemistry 15, 159–165.

Yool, A., Tyrrell, T., 2003. Role of diatoms in regulating the ocean's silicon cycle. Global Biogeochemical Cycles 17. https://doi.org/10.1029/2002GB002018

Yoon, K.Y., An, S.J., Chen, Y., Lee, J.H., Bryant, S.L., Ruoff, R.S., Huh, C., Johnston, K.P., 2013. Graphene oxide nanoplatelet dispersions in concentrated NaCl and stabilization of oil/water emulsions. Journal of Colloid and Interface Science 403, 1–6. https://doi.org/10.1016/j.jcis.2013.03.012

You, G., Hou, J., Xu, Y., Wang, C., Wang, P., Miao, L., Ao, Y., Li, Y., Lv, B., 2015. Effects of CeO2 nanoparticles on production and physicochemical characteristics of extracellular polymeric substances in biofilms in sequencing batch biofilm reactor. Bioresource Technology 194, 91–98. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.07.006

Yu, W., Sisi, L., Haiyan, Y., Jie, L., 2020. Progress in the functional modification of graphene/graphene oxide: a review. RSC Advances 10, 15328–15345. https://doi.org/10.1039/D0RA01068E

Yu, W., Zhan, S., Shen, Z., Zhou, Q., Yang, D., 2017. Efficient removal mechanism for antibiotic resistance genes from aquatic environments by graphene oxide nanosheet. Chemical Engineering Journal 313, 836–846. https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.10.107

Zamani, H., 2023. Effect of co-exposure of multi-wall carbon nanotubes and cadmium on microalga Dunaliella salina. J Appl Phycol 35, 661–671. https://doi.org/10.1007/s10811-023-02908-1

Zhang, Caili, Wu, L., Cai, D., Zhang, Caiyun, Wang, N., Zhang, J., Wu, Z., 2013. Adsorption of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (Fluoranthene and Anthracenemethanol) by Functional Graphene Oxide and Removal by pH and Temperature-Sensitive Coagulation. ACS Appl. Mater. Interfaces 5, 4783–4790. https://doi.org/10.1021/am4002666

Zhang, J., Wang, Z., Wang, Y., Zhong, H., Sui, Q., Zhang, C., Wei, Y., 2017. Effects of graphene oxide on the performance, microbial community dynamics and antibiotic resistance genes reduction during anaerobic digestion of swine manure. Bioresource Technology 245, 850–859. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.217

Zhang, R., Gu, J., Wang, X., Li, Y., Liu, J., Lu, C., Qiu, L., 2019. Response of antibiotic resistance genes abundance by graphene oxide during the anaerobic digestion of swine manure with copper pollution. Science of The Total Environment 654, 292–299. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.094

Zhang, X., Zhou, Q., Zou, W., Hu, X., 2017. Molecular Mechanisms of Developmental Toxicity Induced by Graphene Oxide at Predicted Environmental Concentrations. Environ. Sci. Technol. 51, 7861–7871. https://doi.org/10.1021/acs.est.7b01922

Zhang, Y., Mortimer, M., Guo, L.-H., 2020. Interplay between engineered nanomaterials and microbiota. Environ. Sci.: Nano 7, 2454–2485. https://doi.org/10.1039/D0EN00557F

Zhang, Y., Tan, Y.-W., Stormer, H.L., Kim, P., 2005. Experimental observation of the quantum Hall effect and Berry's phase in graphene. Nature 438, 201–204. https://doi.org/10.1038/nature04235

Zhao, J., Cao, X., Wang, Z., Dai, Y., Xing, B., 2017. Mechanistic understanding toward the toxicity of graphene-family materials to freshwater algae. Water Research 111, 18–27. https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.12.037

Zhao, J., Li, Y., Cao, X., Guo, C., Xu, L., Wang, Z., Feng, J., Yi, H., Xing, B., 2019. Humic acid mitigated toxicity of graphene-family materials to algae through reducing oxidative stress and heteroaggregation. Environ. Sci.: Nano 6, 1909–1920. https://doi.org/10.1039/C9EN00067D

Zhao, J., Wang, Z., White, J.C., Xing, B., 2014. Graphene in the Aquatic Environment: Adsorption, Dispersion, Toxicity and Transformation. Environ. Sci. Technol. 48, 9995–10009. https://doi.org/10.1021/es5022679

Zhao, Y., Jafvert, C.T., 2015. Environmental photochemistry of single layered graphene oxide in water. Environ. Sci.: Nano 2, 136–142. https://doi.org/10.1039/C4EN00209A

Zhao, Y., Liu, Y., Zhang, X., Liao, W., 2021. Environmental transformation of graphene oxide in the aquatic environment. Chemosphere 262, 127885. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127885

Zheng, M., Lu, J., Lin, G., Su, H., Sun, J., Luan, T., 2019. Dysbiosis of gut microbiota by dietary exposure of three graphene-family materials in zebrafish (Danio rerio). Environmental Pollution 254, 112969. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.112969

Zhou, N., Zhao, Z., Wang, H., Chen, X., Wang, M., He, S., Liu, W., Zheng, M., 2019. The effects of graphene oxide on nitrification and N2O emission: Dose and exposure time dependent. Environmental Pollution 252, 960–966. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.06.009

Zou, X., Zhang, L., Wang, Z., Luo, Y., 2016. Mechanisms of the Antimicrobial Activities of Graphene Materials. J. Am. Chem. Soc. 138, 2064–2077. https://doi.org/10.1021/jacs.5b11411

Zulu, N.N., Zienkiewicz, K., Vollheyde, K., Feussner, I., 2018. Current trends to comprehend lipid metabolism in diatoms. Progress in Lipid Research 70, 1–16. https://doi.org/10.1016/j.plipres.2018.03.001

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE 1 :

Figure 1: Représentation schématique d'une échelle de taille du dixième de nanomètre (angström) au millimètre accompagnée d'éléments de tailles correspondantes. 14
Figure 2: Représentation schématique de deux allotropes du carbone, le diamant et le graphite, et de leur forme hybridée respectives sp^3 et sp^2. 15
Figure 3: Représentation schématique des différents nanoparticules à base de graphène d'après (Kiew et al., 2016)..... 17
Figure 4: Comportement des GBMs oxydés (GO) (A) et réduits (rGO) (B) dans l'environnement aquatique d'après (Zhao et al., 2014). 20
Figure 5: Représentation schématique d'un biofilm de rivière.. 22
Figure 6: Représentation schématique des différentes classes de diatomées en fonction de leur frustule d'après Mathieu et al. 2011. 24
Figure 7: Structure et composition cellulaire d'une diatomée pennée d'après Garacci, 2018 25
Figure 8: Cycle de vie des diatomées d'après Garacci, 2018.. 26
Figure 9: Images de la diatomée *Nitzschia palea*..... 29
Figure 10: Number of publications per year since 2013 for the terms ALL=(graphene) AND (ALL=(microbial communit*) OR ALL=(bacterial communit*) OR ALL=(prokaryotic communit*) OR ALL=(microbiome) OR ALL=(microbiota)) indexed in Web of Science™ 34
Figure 11: Distribution of studies documenting the interactions between GBMs and microbial communities as a function of the experimental model studied. 36
Figure 12: Types of GBMs and number of times they occurred in the literature. The number of articles contributing to each category is indicated in brackets. 40
Figure 13: GBMs concentrations (left panel) and time of exposure (right panel) used in the studies. 41

CHAPITRE 2 :

Figure 1 : Images du GO et rGO utilisés obtenues au MEB (microscopie électronique à balayage). ... 64
Figure 2 : Image de flasques Falcon placées au phytotron et contenant chacune un biofilm de Nitzschia palea 66
Figure 3 : Déroulé expérimental d'une exposition de *Nitzschia palea* en plaques 6 puits. 68
Figure 4 : Déroulement de l'exposition du biofilm dans les flasques Falcon 33501..... 70
Figure 5 : Représentation schématique de la cytométrie en flux adapté de Gupta et al., 2016. 71

Figure 6 : Discrimination des doublets de lecture (A) et sélection d'une population homogène (B) en cytométrie en flux 72
Figure 7 : Différenciation des bactéries des débris et éléments à l'aide du marqueur SYTO9. 73
Figure 8 : Spectre d'absorbance et de fluorescence de la chlorophylle d'après (Fernandez-Jaramillo et al., 2012). 74
Figure 9 : Spectre d'absorption (pointillés) et fluorescence (plein) du marqueur SYTOX Green. 74
Figure 10 : Différentiation de cellules vivantes et sénescente à l'aide du marqueur SYTOX Green.. .. 75
Figure 11 : Représentation schématique des 8 différents échantillons analysés en cytométrie en flux afin de comparer leur analyse seule et puis couplé à deux concentrations de GO (10 et 50 mg/L). ... 76
Figure 12 : Analyse SSC/FSC (complexité/taille) de *Nitzschia palea* (A), de résidus cellulaires (B) de Nitzschia palea et du GO à 10 mg/L (C). 76
Figure 13 : Analyse FSC/SSC (complexité/taille) de *Nitzschia palea* seule (gauche) puis en présence de 10mg/L de GO (milieu) et de 50 mg/L de GO (droite). 77
Figure 14 : Analyse en cyrtométrie en flux en fonction de la fluorescence à 610nm (filtre APC). 78
Figure 15 : Phénomène de « quenching » de la fluorescence de *Nitzschia palea* à 610nm (filtre APC) induit par 50 mg/L de GO et de son analyse en cytométrie en flux..... 79

CHAPITRE 3 :

Figure 1 : Normalized growth rate of the diatom *Nitzschia palea* 91
Figure 2 : Physiological parameters of the diatom *N. palea* following exposure to GBMs. 92
Figure 3 : Normalized average well color development (AWCD) values measured after 48 h (A) and 144 h (B) of exposure to GBMs.. 93
Figure 4 : Effects of exposure to GBMs on bacterial communities from the biofilm..... 94
Figure 5 : Relative abundance of bacterial phyla from the biofilm after 48 h (T48h) and 144 h (T144h) of exposure to GO or rGO at concentrations ranging from 0 to 10 mg.L−1. 95
Figure 6 : Heatmap showing the relative abundances of the discriminant OTUs identified by Deseq analysis 96
Figure 7 : S1 - Growth rate curve of *N. palea* in control conditions over the experiment duration... 102
Figure 8 : S2 - PCA of normalized AWCD data following 48 hours of exposure to GO (A) or rGO (B) and after 144 hours of exposure to GO (C) and rGO (D). 103
Figure 9 : S3 - AWCD values measured for each guild of carbon sources after 48 hours (A) and 144 hours (B) of exposure to GBMs. 104
Figure 10 : S4: Relative abundance of bacterial Order from the phyla Bacteroidota (A) and Proteobacteria (B) following exposure to GBMs concentrations ranging from 0 to 10 mg/L. 105

CHAPITRE 4 :

Figure 1 : TEM images of GO (left panel) and rGO (right panel 117
Figure 2 : Division rates of *Nitzschia palea* when exposed to GO (A), to rGO (B) and to the shading of GO (D). Chlorophyll content in *Nitzschia palea* exposed to GO (C). 120
Figure 3 : (A) OJIP chlorophyll fluorescence induction kinetics of *Nitzschia palea* (B) Means of the different fluxes per reaction center of *Nitzschia palea* during the 144h of exposure to 10 mg.L^{-1} of GO compared to the control condition.. 121
Figure 4 : (A) 77k fluorescence emission spectra of the diatom *Nitzschia palea* in control and exposed (10 mg.L-1 GO) conditions. (B) Second derivative spectra of the 77k fluorescence emission spectra of Nitzschia palea in control and exposed (10 mg.L-1 GO) conditions. 122
Figure 5 : Sticking of GO by *Nitzschia palea* through time. 123
Figure 6 : SEM images of *Nitzschia palea* biofilm after 144h. 124
Figure 7 : I_D/I_G ratio of GO in different conditions. 126
Figure 8 : Division rates in dark conditions of control and exposed *Nitzschia palea*. 127
Figure 9 : Evolution of the relative lipid contents in *Nitzschia palea* during the 144h exposition to GO at 0.1 – 1 and 10 mg/L. 128
Figure 10 : Figure SD3 ; Division rate of *Nitzschia palea* in control condition and exposed to 0.01 mg.L^{-1} of Mn 131
Figure 11 : Schéma d'une lame de Malassez et de ses unités de comptage 132
Figure 12: Evolution du nombre de cellules de *Nitzschia palea* au cours du temps, en condition contrôle ou exposées à 10 mg/L de GO et de rGO. 133
Figure 13: Pourcentage de lumière perçue dans le fond des puits en fonction de la concentration en GO 133
Figure 14: Spectre de transmission du GO à 10 mg/L de 400 à 700nm 134
Figure 15 : Taux de croissance de *Raphidocelis subcapitata* à différentes concentrations de GO (panel de gauche) et de rGO (panel de droite) 137
Figure 16 : Evolution des taux de chlorophylle dans *Raphidocelis subcapitata* exposée à différentes concentrations de GO (panel de gauche) et de rGO (panel de droite). 138
Figure 17 : Evolution des taux de lipides dans *Raphidocelis subcapitata* exposée à différentes concentrations de GO (panel de gauche) et e rGO (panel de droite). 138

CHAPITRE 5 :

Figure 1 : Schématisation des différentes hypothèses des interactions entre *Nitzschia palea* et le GO 146
Figure 2: Schématisation des répercutions écosystémiques des effets des GBMs sur les biofilms. .. 150

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE 1 :

Tableau 1 : Summary of results obtained across the literature..... 37
Tableau 2 : Résumé des études évaluant la toxicité de GBMs sur les algues et organismes phototrophes unicellulaires. 60

CHAPITRE 2 :

Tableau 1 : Caractéristiques du GO et rGO utilisés..... 63
Tableau 2 : Adaptations du protocole d'exposition de *Nitzschia palea* en fonction du questionnement scientifique 68
Tableau 3 : Paramètres constructeurs de la cytométrie en flux en fonction du type cellulaire à analyser. 71
Tableau 4 : Nombre d'évènements compris dans l'analyse de base de diatomée (carré vert de la figure 13) parmi tous les évènements analysés en cytométrie en flux. 77
Tableau 5 : Nombre d'évènement compris dans le panel de gauche (normalement comptabilisé résidus et GO) et le panel de droite (normalement comptabilisé *Nitzschia palea*) scindé par le seuil de fluorescence à 610 nm dans la figure 14..... 79

CHAPITRE 3 :

Tableau 1 : Physico-chemical characteristics of graphene oxide (GO) and reduced graphene oxide (rGO) used in the study 86
Tableau 2 : OTUs differentially abundant ($p < 0.01$) at 10 mg.L-1 of GO compared to the control group after 144 hours of exposure. 96

CHAPITRE 4 :

Tableau 1 : Characteristics of GO and rGO used during the study and compared with other GO and rGO used in studies investigating effects on micro algae..... 117
Tableau 2 : Table SD1 ; None exhaustive presence of the fluorescent components around 705 and 720 nm in the 77K fluorescence spectra of algae. 130
Tableau 3 : Table SD2 ; Quantity of elements in ppm significantly different 130
Tableau 4 : Conditions expérimentales de croissance de Raphidocelis subcapitata et facteur de croissance après 72h 136

ANNEXES

Annexe 1 : Composition du milieu SPE

	Eléments (MM)	Concentration (mg/L)
Eléments majeurs	$MgSO_4$ $7H_2O$ (246,48)	25
	K_2HPO_4 (174,18)	10
	Na_2CO_3 (105,99)	20
	$NaSiO_3$ $5H_2O$ (212,14)	90
	H_3BO_3 (61,83)	2,86
	$Ca(NO_3)_2 4H_2O$ (236,15)	60
Eléments mineurs (ATE)	$MnCl_2$ $4H_2O$ (197,844)	0,18
	$CuSO_4$ $5H_2O$ (249,612)	0,0001
	$ZnSO_4$ $7H_2O$ (287,54)	0,02
	$CoCl_2$ $6H_2O$ (237,839)	0,01
	Na_2MoO_4 $2H_2O$ (241,92)	0,02
	H_2SeO_3	0,0016
	$NaVO_3$ (121,93)	0,0012
	Na_2EDTA $2H_2O$ (372,2)	4,36
	FeCl3 6H2O	1,5
Vitamines	Thiamine HCl : $C_{12}H_{17}ClN_4OS,HCl$	0,01
	Vitamine B12 : $C_{63}H_{88}CoN_{14}O_{14}P$	0,0005
	Biotine (B7) : $C_{10}H_{16}N_2SO_3$	0,00055

Annexe 2 : Composition du milieu Volvic

	Eléments	Concentration (mg/L) à rajouter à 1L de Volvic
Eléments majeurs	$NaNO_3$	76,5
	KH_2PO_4	8,72
	H_3BO_3	21,22
Eléments mineurs	$MnCl_2$ $4H_2O$ (197,844)	0,18
	$CuSO_4$ $5H_2O$ (249,612)	0,0001
	$ZnSO_4$ $7H_2O$ (287,54)	0,02
	$CoCl_2$ $6H_2O$ (237,839)	0,01
	Na_2MoO_4 $2H_2O$ (241,92)	0,02
	H_2SeO_3	0,0016
	$NaVO_3$ (121,93)	0,0012
	Na_2EDTA $2H_2O$ (372,2)	4,36
	FeCl3 6H2O	1,5
Vitamines	Thiamine HCl	0,01
	Biotine B7	0,005
	Vitamines B12	0,00055

LISTES DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Publications écrites publiées :

P. Braylé, E. Pinelli, L. Gauthier, F. Mouchet, M. Barret. 2022. **Graphene-based nanomaterials and microbial communities: a review of their interactions, from ecotoxicology to bioprocess engineering perspectives**, Environ. Sci.: Nano, 2022,9, 3725-3741; https://doi.org/10.1039/D2EN00547F

L. Evariste, **P. Braylé**, F. Mouchet, J. Silvestre, L. Gauthier, E. Flahaut, E. Pinelli, M. Barret. 2021. **Graphene-Based Nanomaterials Modulate Internal Biofilm Interactions and Microbial Diversity**, Front. Microbiol. 12:623853; https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.623853

N. Gallois, R. Dhommée, **P. Braylé**, L. Evariste, I. Soumaoro, C. Diaz-Vanegas, F.Larras, G. Cheloni. 2022. **Federating young researchers in microbial ecotoxicology: EcotoxicoMicYR 2021, the first international webinar organized for and by young microbial ecotoxicology researchers**, Environmental Science and Pollution Research volume 29, 65880–65885; https://doi.org/10.1007/s11356-022-22410-4 (Présenté à la suite)

Publication écrite soumise :

P. Braylé, E. Pinelli, B. Schoefs, E. Flahaut, J. Silvestre, L. Gauthier, M. Barret. 2023. **Effects of graphene oxide and the diatom *Nitzschia palea* are associated with carbon cycling disturbance**, soumis dans le journal Carbon.

Communications orales :

Graphene Flagship, WP4 Meeting, présentations des résultats de l'équipe ECI :

- Septembre 2021, Stockholm, Suède
- Avril 2022, Venise, Italie
- Octobre 2022, Sounio, Grèce

Congrès de doctorants, 2021, Novembre 2021, Perpignan, France : **Ecotoxicité des matériaux à base de graphène sur des biofilms mixtes (diatomée/bactérie)**

EcotoxicoMic, 3rd International Conference on Microbial Ecotoxicology, Novembre 2022, Montpellier, France: **Impact of graphene oxide on *Nitzschia palea*: approach in flow cytometry**

Communication orale pour le Congrès des doctorants, Perpignan 2022

Ecotoxicité des matériaux à base de graphène sur des biofilms mixtes (diatomée/bactérie)

Braylé Paul[1]; Barret Maialen[1]; Emmanuel Flahaut[2]; Evariste Lauris[1]; Pinelli Eric[1]

[1]Laboratoire Ecologie fonctionnelle et environnement, Université de Toulouse, CNRS, Toulouse INP, Université Toulouse 3 – Paul Sabatier (UPS), Toulouse, France

[2]Centre Inter-universitaire de Recherche et d'Ingénierie des Matériaux, Université Toulouse 3 Paul Sabatier, CNRS, INP Toulouse, Toulouse, France

Abstract :

Découvert en 2004, les matériaux à base de graphène disposent de propriétés très intéressantes telles que leur rigidité, conduction thermique et électrique. De ce fait, ces matériaux sont de plus en plus utilisés dans différents secteurs tel que l'énergie, la nano médecine, la conception de matériaux ou encore le traitement des eaux. L'augmentation de leur utilisation entraine un relargage dans l'environnement tel que les eaux de surface, un des réceptacles finaux de ces matériaux. A la base de ces eaux de surface se trouve les biofilms, composés de diverses espèces telles que des bactéries et des algues. Ces communautés microbiennes représentent, entre autres, la première source de carbone pour les maillons trophiques supérieurs et assurent des fonctions indispensables dans les cycles biochimiques des éléments tel que le carbone et l'azote. Une détérioration de ces communautés pourrait donc avoir des conséquences plus larges pour les écosystèmes. Le but de ces travaux est de déterminer les potentiels effets des matériaux à base de graphène sur ces communautés mixtes (bactéries/diatomée *Nitzschia palea*), mais aussi sur la diatomée seule. Des effets sur la diversité microbienne mettant en avant de possibles espèces sensibles et tolérantes ont étés démontrés à l'aide du séquençage de l'ARN 16s, tandis que des effets bénéfiques sur la croissance et la physiologie des diatomées, tel que les taux en chlorophylles et lipides, ont été démontrés par cytométrie en flux.

Mots-clés : Nanoparticules de graphène, diversité microbienne, *Nitzschia palea*, toxicité environnementale

Communication orale pour la 3ème Conférence Internationale en Ecotoxicologie Microbienne : EcotoxicoMic 2022

Impact of graphene oxide on *Nitzschia palea*: approach in flow cytometry

Braylé Paul[1]; Barret Maialen[1]; Mouchet Florence[1]; Gauthier Laury[1]; Evariste Lauris[1]; Emmanuel Flahaut[2]; Pinelli Eric[1]

[1]Laboratoire Ecologie fonctionnelle et environnement, Université de Toulouse, CNRS, Toulouse INP, Université Toulouse 3 – Paul Sabatier (UPS), Toulouse, France

[2]Centre Inter-universitaire de Recherche et d'Ingénierie des Matériaux, Université Toulouse 3 Paul Sabatier, CNRS, INP Toulouse, Toulouse, France

Abstract:

Graphene oxide (GO) is a carbon nanoparticle discovered in 2004. Its properties have made it a very coveted material, leading to an increase of its production and subsequently its release in the environment. One of the main receptacles of graphene are surface waters. At their basis, biofilms are a key biological compartment for the aquatic ecosystem health as they represent the first carbon source for higher trophic levels. One of the main components of biofilms are diatoms, responsible for primary production. Therefore, in order to evaluate the potential harm of GO on the aquatic ecosystem, it is crucial to understand the interactions between GO and diatoms. In this study, the diatom *Nitzschia palea* was exposed to 0.1 -1 and 10 mg/L of GO for 144h. Flow cytometry, coupled with fluorescent markers, allows a high throughput, quantitative and qualitative analysis of cells. It was used in order to enumerate cells and quantify lipid and chlorophyll content in order to underline physiological changes. Limits to the use of flow cytometry with graphene oxide were underlined and discussed such as nanoparticle concentration. Results show an interesting increase of cell growth, whereas, by monitoring the oxygen content throughout the 144h of exposition, it was revealed that the photosynthesis and respiration cycle was reduced by 10 mg/L of GO. To understand the interaction between the diatom and GO, electronic microscopy and RAMAN analyses were done in order to investigate the bonding of GO by the exopolymeric substances produced by *Nitzschia palea* and the potential change of structure of GO after exposition.

Keywords: 2D nanoparticle, primary producer, physiological response, analytical limits

Federating young researchers in microbial ecotoxicology: EcotoxicoMicYR 2021, the first international webinar organized for and by young microbial ecotoxicology researchers

Nicolas GALLOIS[1*+], Roxane DHOMMÉE[2 3*], Paul BRAYLÉ[4], Lauris EVARISTE[5], Idrissa SOUMAORO[6], Camila DIAZ-VANEGAS[7], Floriane LARRAS[8], Giulia CHELONI[9]

[1] Université de Lorraine, CNRS, LIEC, 54000, Nancy, France

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

[3] Université Clermont Auvergne, CNRS, Institut de Chimie de Clermont-Ferrand (ICCF), F-63000 Clermont- Ferrand, France

[4] Laboratoire d'écologie fonctionnelle et environnement, Université de Toulouse, CNRS, Toulouse INP, Université Toulouse 3 – Paul Sabatier (UPS), Toulouse, France

[5] Toxalim UMR1331 (Research Centre in Food Toxicology), Toulouse University, INRAE, ENVT, INP-Purpan, UPS, Toulouse, France.

[6] Regional Centre of Excellency in Avian Science (CERSA), University of Lomé, Togo

[7] HydroSciences Montpellier, Université de Montpellier, CNRS, IRD, Montpellier, France

[8] KREATiS, L'Isle-d'Abeau, France.

[9] MARBEC, University Montpellier, CNRS, Ifremer, IRD, 34095 Montpellier, France

*Equal contribution

Abstract:

The EcotoxicoMicYR group was initially composed of 4 Ph.D. students and 4 post-doctoral researchers. In brief, the EcotoxicoMicYR webinar took place three Monday afternoons in a row from November 22, 2021 to December 6, 2021. These three half-day webinars reached a success beyond our expectations with 25 countries and 41 presentations. Keynote lectures were delivered by Dr Fabio Roldan (Pontificia Universidad Javeriana, Colombia), Dr Belinda Ferrari (The University of New South Wales, Australia), and Dr Ahmed Tlili (Eawag, Switzerland). Their presentations provided an insight on latest research developments in the microbial ecotoxicology field and highlighted their specific contribution to this discipline. 22 oral presentations and 16 pre-recorded presentations were diffused.

Key-words:

EcotoxicoMic, EcotoxicoMicYR, microbial ecotoxicology, webinar, network

Context and objectives:

EcotoxicoMic is an open international network of partners from research, industry, and public administration. They share common interest for problematics related to Microbial Ecotoxicology, an emerging discipline facing contemporary environmental threats (Ghiglione *et al.*, 2016; Pesce *et al.*, 2020; Cébron *et al.*, 2022). More information on the network can be found on the website (https://ecotoxicomic.org/). This network, initially francophone, was opened to other countries thanks to the organization of a first international conference in 2017 (Lyon, France) and a virtual one in 2020. As of 1st January 2022, the number of members, including about one third of M.Sc., Ph.D. students and post-doctoral researchers, was 210 with 42 countries represented in the network. The EcotoxicoMic network is in full expansion and is glad to welcome new members (30 to 40 members join each year). To do so, simply fill out the form at the following address https://ecotoxicomic.org/become-a-member/.

In order to increase and encourage the participation of young researchers (M.Sc., Ph.D. students and post-doctoral researchers) in the network, a sub-network entitled "EcotoxicoMicYR" for EcotoxicoMic Young Researchers, dedicated to and led by them, was created in 2021. This sub-group of young EcotoxicoMic members, supported by senior members, decided to get together and to propose a series of activities/initiatives. This section welcomes any M.Sc. and Ph.D. students as well as post-doctoral researchers with the desire to promote this sub-network at the international scale, with possible actions at the national level. While newly created, the EcotoxicoMicYR group, initially composed of 4 Ph.D. students and 4 post-doctoral researchers (Figure 1) was gathered with the aim to organize an international webinar: EcotoxicoMicYR 2021.



Figure 1 : organizing committee from left to right, top lane: Ph.D. students Paul Braylé, Roxane Dhommée, Camila Diaz-Vanegas, Idrissa Soumaoro; bottom lane: post-doctoral researchers Giulia Cheloni, Lauris Evariste, Nicolas Gallois, Floriane Larras.

EcotoxicoMicYR 2021 proceedings:

Organized by and dedicated to young microbial ecotoxicologists, this series of three half-day webinars took place three Monday afternoons in a row from November 22, 2021 to December 6, 2021 (https://ecotoxicomic.org/ecotoxicomicyr_2021/). International keynote speakers, M.Sc., Ph.D. students, and post-doctoral researchers presented their research in microbial ecotoxicology to the international community as pre-recorded (3-minutes long) or live (12-minutes long) presentations. The registration was free of charges and opened to everyone (the organization costs were covered by the EcotoxicoMic network). The three webinars reached the presence of 75, 87 and 98 attendees (November 22, November 29, and December 6 respectively), representing a total of more than 760 viewing hours. Moreover, most of them stayed each Monday for the full duration of the 4 hours webinars.

Keynote lectures were delivered by Dr Fabio Roldan (Pontificia Universidad Javeriana, Colombia), Dr Belinda Ferrari (The University of New South Wales, Australia), Dr Ahmed Tlili (Eawag, Switzerland). They presented talks entitled “Bioremediation case studies from the lab to the field: dealing with recalcitrant compounds”, “Using microbial communities as indicators of soil health in the Antarctic environment” and “Aquatic biofilms in a changing world: why they matter when assessing impacts of multiple stressors?”, respectively. Their presentations provided an insight on latest research developments in the microbial ecotoxicology field and highlighted their specific contribution to this discipline.

During the webinar, 22 oral presentations and 16 prerecorded presentations were diffused. 61% of the presenters were Ph.D. students and 27% post-doctoral researchers (Figure 2). Finally, the participation of M.Sc. students was lower than expected (12%) probably because their research time is shorter, and our webinar was scheduled during autumn long after the end of their research training period (at least in France). Nevertheless, we can only embrace that we achieve to reach M.Sc. students. University lecturers of the EcotoxicoMic network used the webinar as teaching activity for their students. The webinar participation fostered the student’s curiosity for scientific research and provided an example of international science communication activities. This educational approach was particularly interesting as one of the main objectives of the EcotoxicoMicYR team is to share and to make such events accessible to students.

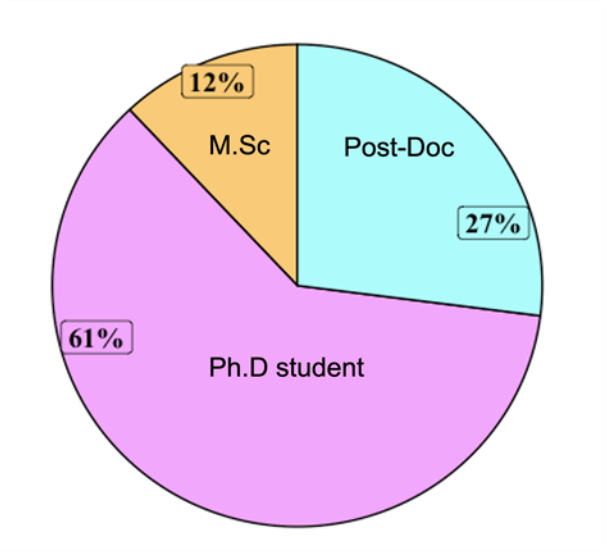

Figure 2 : EcotoxicoMicYR attendees' grade

Organizers choose the SpatialChat platform to gather together speakers and participants. One of the main advantages of this virtual conference tool is the possibility to speak privately to a person while being in the same space as others (as in real life). A playful virtual space was created for all attendees with different online rooms: welcoming room**,** plenary room, coffee-break room and 6 poster rooms with the pre-recorded presentations that were accessible during the whole event. Comparably to a live congress, the interactions between attendees were possible in every room, with exception for the plenary room where only speakers allowed to reach the virtual stage could publicly communicate with the audience.

Overall, attendees were coming from up to 25 countries (Figure 3). The top 5 countries were France, Germany, Switzerland, Sweden and Spain. The 41 scientists (3 keynote speakers, 22 conference talks and 16 pre-recorded presentations) that provided a scientific communication represented 12 different countries. The majority of participants connected from France. However, participants from all continents joined the webinar over the three afternoons, indicating that the EcotoxicomiYR webinar have the potential to become an event that may bring together young microbial ecotoxicology researchers from all over the world.

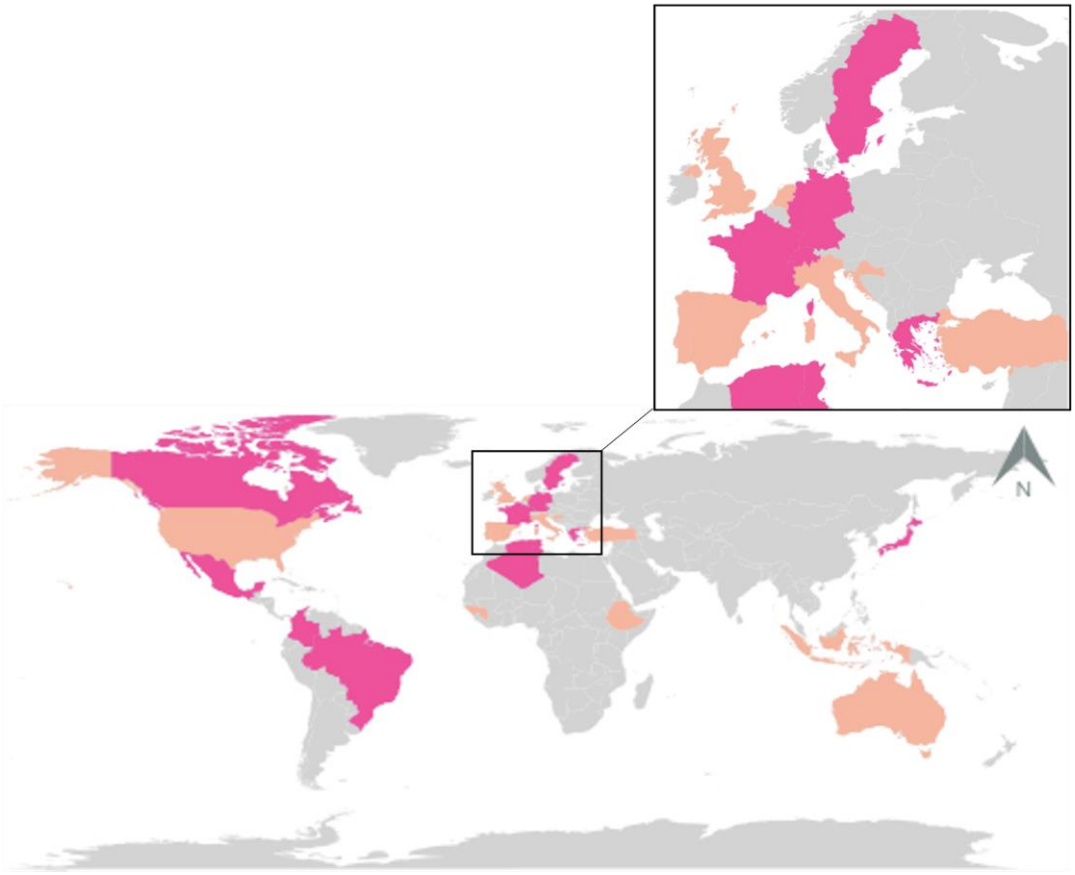

Figure 0-3 : attendees' country of EcotoxicoMicYR 2021 webinar. In light orange: origin of EcotoxicoMicYR webinar attendees. In pink: origin of EcotoxicoMicYR webinar participants including keynote speakers, talks and poster presentations. The frame in black represents a focus on the European attendees.

Conference sessions and highlights

The six sessions were rather ambitious in their scope, covering some of the main questions in the field of microbial ecotoxicology. The first afternoon, we aimed at exploring the research on the role of microorganisms on contaminant dynamics, biotransformation, and bioremediation. During the second afternoon, presentations focused on microbial responses to contaminants across multiple levels of biological organization. A special session was dedicated to introducing emerging approaches in microbial ecotoxicology (*i.e.*, volatolomics (Hidalgo *et al.*, 2019)). We also looked at how contaminants impacted biotic interactions. On the third afternoon, to have some insights for stakeholders, some talks focused on the use of microorganisms for environmental quality assessment. Finally, the last session aimed to investigate what are the combined responses and effects of microorganisms exposed to multiple stressors.

Our virtual conference covered a large diversity of research topics in the microbial ecotoxicology field. Works with different toxicants (metals, pesticides, antibiotics, nanoparticles, *etc.*), environments (soil,

sediment, wastewater, seawater, deep-sea hydrothermal vent, *etc*.), and levels of biological organization (community, holobiont, pure culture, *etc*.) were presented. Figure 4 highlights the word cloud created using the titles of the presentations. This is a good illustration of the research areas covered by the microbial ecotoxicology which correspond to concerns of the EcotoxicoMic network with interests, among others, in microbial communities from different environments facing various contaminants.

For each afternoon, a prize was awarded for the best oral presentation. The awarded Ph.D. students and post-doctoral (Katharine Thompson, "Glyphosate degradation by two novel *Ochrobactrum pituitosum* strains", Microbial Ecology, Department of Geosciences, University of Tübingen, Germany - Lilian Gréau, "Response of *Populus* x *canadensis* and associated fungal endophytic communities to a PAH contamination gradient", Université de Lorraine, CNRS, LIEC, Nancy, France - Louis Carles, "Role of wastewater microorganisms in the establishment of tolerance to micropollutants in stream periphyton", Eawag: Swiss Federal Institute of Aquatic Science and Technology, Dübendorf, Switzerland) have been invited to present their work as speakers at the live EcotoxicoMic 2022 Conference (Montpellier, France, 15-18 November 2022). Information about this conference can be found at https://ecotoxicomic.org/ecotoxicomic-2022/.



Figure 4 : words cloud from the titles of the abstracts presented during the EcotoxicomicYR 2021 webinar

Conference outcomes and main conclusions

In brief, EcotoxicoMicYR webinar (1st edition) reached a success beyond our expectations with 25 countries and 41 presentations. EcotoxicoMic's Young Researchers have the desire to repeat this event

(each two years alternating with EcotoxicoMic International congress). As the format seemed to be appreciated, the EcotoxicoMicYR team will probably propose a similar webinar event for the next edition that is scheduled in November 2023. Moreover, a focus will be made to promote the broadcasting of the webinar during classes of M.Sc. students. Also, EcotoxicoMicYR wishes to promote young researchers' actions and reinforce networking at the international scale. The EcotoxicoMicYR group will organize a social evening during EcotoxicoMic 2022. This will be a great opportunity for Ph.D. students and post-doctoral researchers from different labs and countries to meet and to share experiences. The current board would be glad to count for new members coming from different institutions and geographic locations for the upcoming EcotoxicoMicYR event. Anyone interested in joining the existing network or that wish to contribute to the organization of 2023 EcotoxicoMicYR webinar event, is warmly invited to contact us through our email address 'ecotoxicomicyr@gmail.com'.

Acknowledgments

We would like to thank Drs Stéphane Pesce, Aurélie Cébron and Abdulsamie Hanano, members of the EcotoxicoMic steering committee, for their support during the whole process of organization, from the first meeting of the committee to the corrections of this manuscript. We also want to express our gratitude to the Rovaltain foundation for their involvement in the diffusion of the webinar and the financial management. A special acknowledgment is given to the Environmental Science and Pollution Research (ESPR) journal for the three grants awarded to the best presentations of each afternoon.

Ethical Approval

Not applicable

Consent to Participate

All authors have given their consent to participate to the writing and the submission of this paper.

Consent to Publish

All authors have approved the version to be published and given their consent for the publication of this paper.

Authors Contributions

Nicolas GALLOIS and Roxane DHOMMÉE have equally contributed to this paper as first authors. Nicolas GALLOIS, Roxane DHOMMÉE, Paul BRAYLÉ, Lauris EVARISTE, Idrissa SOUMAORO, Camila DIAZ-

VANEGAS, Floriane LARRAS, Giulia CHELONI have contributed to the writing and reviewed the manuscript prior to submission.

Funding

Not applicable

Competing Interests

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Availability of data and materials

All information about the webinar is available on the website https://ecotoxicomic.org/

References

Cébron A., Karpouzas D.G., Martin-Laurent F., Morin S., Palacios C. and Schmitt-Jansen M. (2022). Editorial: Microbial Ecotoxicology Advances to Improve Environmental and Human Health Under Global Change. Front. Microbiol. 13:870404. doi: 10.3389/fmicb.2022.870404

Ghiglione J. F., Martin-Laurent F., and Pesce S. (2016). Microbial ecotoxicology: an emerging discipline facing contemporary environmental threats. Environ. Sci. Pollut. Res. 23, 3981–3983. doi: 10.1007/s11356-015-5763-1

Hidalgo K., Ratel J., Mercier F., Gauriat B., Bouchard P., and Engel E. (2019). Volatolomics in bacterial ecotoxicology, a novel method for detecting signatures of pesticide exposure? *Frontiers in Microbiology*, 9, 3113. doi: 10.3389/fmicb.2018.03113

Pesce S., Ghiglione J.-F., Topp E., and Martin-Laurent F. (2020). Editorial: microbial ecotoxicology. *Front. Microbiol.* 11:1342. doi: 10.3389/fmicb.2020.01342

TITRE DE THESE : Ecotoxicité des nanoparticules de graphène fonctionnalisées sur des biofilms d'eau douce

AUTEUR : Paul Braylé

DIRECTEURS : Eric Pinelli et Maialen Barret

RESUME :

L'usage croissant des nanoparticules de carbone au cours de ces derniers années suscite de plus en plus de questions sur leurs rejets dans l'environnement et leurs potentiels effets sur les écosystèmes. Au cours de ces travaux, les impacts de nanoparticules de graphène oxydé (GO) et de graphène oxydé réduit (rGO) sur un biofilm mixte d'eau douce, composé d'un consortium bactérien accompagné de la diatomée *Nitzschia palea*, ont été évalués. Une analyse de la composition de la communauté bactérienne a permis de mettre en évidence la capacité des nanoparticules à dévier la dynamique temporelle de la communauté formant le biofilm. L'effet de ces nanomatériaux sur la diversité microbienne s'est accompagné de modifications fonctionnelles, en particulier de l'activité hétérotrophique de la communauté. La diatomée *Nitzschia palea* quant à elle, voit sa croissance améliorée en présence du GO et du rGO. Ces résultats originaux ont conduit dans la suite des travaux de recherche à essayer de comprendre les mécanismes à l'origine des effets positifs du GO et rGO sur la croissance de la diatomée en culture pure. Lorsque les cellules sont exposées avec ces nanoparticules, seul le GO améliore significativement les paramètres de croissance de *N. palea.* Les résultats montrent aussi des changements dans la physiologie de ces cellules. L'absence d'effet observé en présence de rGO met en évidence l'importance des groupements oxygénés présents à la surface du graphène dans l'induction de la croissance cellulaire. Ainsi, la réponse de *N. palea* à la présence du GO se traduit par (i) l'augmentation de son contenu en pigments chlorophylliens et (ii) le collage du GO dans le biofilm formé par la diatomée en produisant des substances polymériques extracellulaires (EPS). Ce collage permet d'épurer la colonne d'eau et d'écarter tout effet pouvant impacter le système photosynthétique. Il a par la suite été démontré que le GO avait la capacité d'augmenter l'activité hétérotrophique de la diatomée. Les EPS, qui fournissent une barrière physique, tout en augmentant la proximité de la diatomée avec les nanoparticules, seraient la source de carbone permettant cette activité. La proximité biofilm-GO a abouti à l'augmentation de défauts et à une réduction du GO, mises en évidence par spectroscopie RAMAN. Les processus liant la modification du GO à l'augmentation du potentiel photosynthétique, de l'hétérotrophie et du taux de croissance chez cette espèce restent à élucider. Ces travaux mettent en évidence la capacité des nanoparticules de graphène à moduler les biofilms d'eaux douces à différents niveaux de complexité environnementale. Ils révèlent aussi la capacité d'adaptation ponctuelle de *Nitzschia palea* face à une exposition à des nanoparticules de graphène fonctionnalisées. Ayant des rôles vitaux dans les cours d'eaux, la perturbation des biofilms et de leur rôle dans le cycle du carbone pourrait avoir des conséquences plus importantes au niveau des écosystèmes.

Mots-clefs : écotoxicologie, graphène, microbiologie, métabarcoding, photosynthèse, physiologie