



Université du Québec  
à Rimouski

**Effets de la contamination chronique ou aiguë au diesel  
maritime sur la structure et le métabolisme de la communauté  
bactérienne de l'Estuaire du Saint-Laurent**

Mémoire présenté

dans le cadre du programme de maîtrise en océanographie

en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences

PAR

© ELSA GADOIN

Avril 2018





**Composition du jury :**

**Émilien Pelletier, président du jury, UQAR-ISMER**

**Karine Lemarchand, directrice de recherche, UQAR-ISMER**

**Gustavo Ferreyra, codirecteur de recherche, UQAR-ISMER**

**Michel Starr, codirecteur de recherche, Institut Maurice-Lamontagne, Pêche et Océan  
Canada**

**Christian Nozais, examinateur externe, UQAR**

Dépôt initial le 15 décembre 2017

Dépôt final le 23 avril 2018



UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À RIMOUSKI  
Service de la bibliothèque

Avertissement

La diffusion de ce mémoire ou de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire « *Autorisation de reproduire et de diffuser un rapport, un mémoire ou une thèse* ». En signant ce formulaire, l'auteur concède à l'Université du Québec à Rimouski une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de son travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, l'auteur autorise l'Université du Québec à Rimouski à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de son travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits moraux ni à ses droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, l'auteur conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont il possède un exemplaire.



« La sagesse, c'est d'avoir des rêves suffisamment grands pour ne pas les perdre de vue lorsqu'on leur court après. » Oscar Wilde

« Va vers ton bonheur, saisis ta chance, à te voir ils s'habitueront. » René Char





## REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier très chaleureusement ma directrice, Karine Lemarchand ainsi que mes co-directeurs, Gustavo Ferreyra et Michel Starr. Merci de m'avoir fait confiance, de m'avoir accompagné et soutenu tout au long de ce projet. Merci pour votre temps et tous vos conseils qui m'ont permis de mûrir, tant sur le plan professionnel que personnel.

Merci également à Kim Doiron, Liliane St-Amand, Kasey Cameron-Bergeron, Pascal Rioux et Sonia, pour leur aide précieuse en laboratoire. Merci à nos collaborateurs mexicains et à l'équipe des mésocosmes au grand complet, pour tous les efforts et cette bonne humeur tout au long de ce beau projet.

Ces deux années à Rimouski n'ont été qu'une succession de découvertes, de rencontres et de très beaux moments. Pour cela je souhaite remercier tout d'abord l'ensemble de ma cohorte, pour chacun des moments que nous avons partagés dans et hors des murs de l'Ismer. Merci aux membres du *Némo* et de la *Nature dans tous ces états* qui ont si bien animé ma vie à Rimouski.

Du fond du cœur, je souhaite remercier Naïs et Valentin, pour leur éternelle bonne humeur, pour leur incommensurable soutien et leur infinie patience tout au long de ma rédaction. Merci pour votre amitié, qui malgré la distance aujourd'hui, m'est infiniment précieuse. Un immense merci également à Maude, Angy, Grégoire, Clémence, Enzo et Quentin, pour tout ce que nous avons partagé pendant deux ans. Merci à vous tous d'avoir été mes piliers, ma famille pendant ces deux merveilleuses années. Et merci à Thomas, pour son aide et surtout son soutien constant depuis plus d'un an.

Enfin, je n'ai pas de mots assez forts pour remercier mes parents. Merci de m'avoir toujours soutenue, d'avoir toujours cru en moi. Merci de m'avoir appris la persévérance, à ne jamais lâcher et à aller au bout de mes rêves. Merci d'avoir compris et encouragé chacun de mes projets. Merci de votre amour infini, qui me permet de toujours aller de l'avant.

## RÉSUMÉ

L'importance de la voie navigable du Saint-Laurent pour le transport maritime et les projets d'exploitation off-shore d'hydrocarbures dans le Golfe, augmentent les risques de déversements chroniques ou aiguës d'hydrocarbures dans l'Estuaire du Saint-Laurent (ESL) où leurs conséquences sur les communautés planctoniques sont encore largement méconnues. En milieu naturel, la biodégradation des hydrocarbures est principalement effectuée par des bactéries hydrocarbonoclastes, capables d'utiliser ces composés comme source de carbone. La structure et le métabolisme de la communauté bactérienne des milieux contaminés peuvent être profondément modifiés par le développement de ces bactéries spécialisées, dont quelques souches ont été identifiées dans l'ESL. Des expériences en conditions contrôlées, en mésocosmes ont permis de suivre, durant le développement d'une floraison phytoplanctonique, la réponse de la communauté bactérienne de l'ESL face à l'introduction, chronique ou aiguë de diesel maritime. Un échantillonnage journalier a permis de suivre l'abondance des bactéries libres et attachées à des particules, de mesurer la production et la richesse taxonomique de la communauté bactérienne au cours du temps. L'introduction de diesel n'a pas influencé l'abondance des bactéries libres, mais a significativement stimulé l'abondance des bactéries attachées. De plus, l'analyse des empreintes génétiques de la communauté bactérienne obtenu par l'amplification du gène d'ADNr 16S a démontré une évolution de la structure de la communauté bactérienne au cours du temps et le développement de nouvelles unités taxonomiques spécifiques en présence de diesel. Ces résultats démontrent une adaptation rapide de la communauté bactérienne de l'ESL à l'introduction de diesel et ce malgré la faible température expérimentale (8°C). La plus forte biomasse de bactéries attachées dans les mésocosmes contaminés de façon chronique démontre l'influence du type de contamination sur la réponse de la communauté bactérienne. Une des hypothèses avancées pour expliquer l'augmentation des bactéries attachées est que ces populations ont pu tirer avantage de l'augmentation de la matière organique et des exsudats phytoplanctoniques, résultants des effets du diesel sur le phytoplancton. Cette étude permet donc de démontrer que la réponse de la communauté bactérienne varie selon le type de contamination (chronique ou aiguë) et est la conséquence d'effets directs et indirects de l'introduction de diesel au court de la succession planctonique.

*Mots clés* : Communauté bactérienne – Hydrocarbures - Estuaire du Saint-Laurent- Mésocosmes – Bactéries attachées.

## ABSTRACT

The importance of the St. Lawrence for marine transportation and off-shore hydrocarbon exploitation projects in the Gulf are increasing the risk of chronic or acute oil spills in the St. Lawrence Estuary (SLE) where consequences for planktonic communities are still unknown. In aquatic environments, hydrocarbons biodegradation is essentially performed by oil-degrading bacteria (ODB), a specialized group of bacterial species able to use these compounds as a carbon source. In oil-contaminated environments, the structure and the metabolism of the bacterial community can be profoundly modified by the development of these specialized bacteria. Experiments under controlled conditions, in mesocosms, were performed to follow, during the development of the phytoplankton bloom, the response of the SLE bacterial community to the chronic or acute introduction of marine diesel. Daily sampling was used to follow the abundance of both free-living and particle-attached bacteria, to measure the production and estimate the taxonomic richness of the indigenous bacterial community. The introduction of diesel did not influence the abundance of free-living bacteria but significantly stimulated the abundance of particle-attached bacteria. Moreover, analysis of 16S RDNA fingerprints demonstrated the evolution of the bacterial community structure over time and the development of new specific taxonomic units in the presence of diesel. These results demonstrated a rapid adaptation of the SLE microbial community to diesel introduction, despite the low experimental temperatures (8°C). The greater biomass of particle-attached in chronic contaminated mesocosms demonstrated the influence of contamination method on the response of the bacterial community. One hypothesis to explain the increase of particle-attached bacteria is that these populations may have benefit of the increase of organic matter and phytoplanktonic exudates resulting from the effects of diesel on phytoplankton. This study therefore demonstrated that the response of the bacteria community vary with the contamination method (chronic or acute) and is the consequence of both direct and indirect effects of diesel during the planktonic succession.

*Keywords:* Bacterial community – Hydrocarbons – St-Lawrence Estuary – Mesocosms- Particle-attached bacteria.

## TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS .....	x
RÉSUMÉ .....	xi
ABSTRACT .....	xii
TABLE DES MATIÈRES.....	xiii
LISTE DES TABLEAUX .....	xv
LISTE DES FIGURES .....	xvi
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES .....	xviii
LISTE DES SYMBOLES .....	xix
INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
LES COMMUNAUTÉS BACTÉRIENNES MARINES, ACTRICES MAJEURES DE LA BIODÉGRADATION DES HYDROCARBURES EN MILIEU MARIN .....	1
ÉTAT DES CONNAISSANCES DES CAPACITÉS DE BIODÉGRADATION DES HYDROCARBURES PAR LA COMMUNAUTÉ BACTÉRIENNE DE L'ESTUAIRE DU SAINT-LAURENT.....	12
OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES DE L'ÉTUDE .....	17
CHAPITRE 1.....	19
Effets de contaminations chronique et aiguë au diesel maritime sur la structure et le métabolisme de la communauté bactérienne de l'Estuaire du Saint-Laurent.....	19
1.1 RÉSUMÉ EN FRANÇAIS DU PREMIER ARTICLE .....	19
1.2 INTRODUCTION .....	21
1.3 MATERIALS AND METHODS .....	24
1.3.1 Experimental set-up.....	24
1.3.2 Microbiological analysis.....	26
1.3.3 Statistical analysis.....	30
1.4 RESULTS .....	31
1.4.1 Bacterial abundance.....	31
1.4.2 Bacterial production.....	35
1.4.3 Bacterial richness.....	37
1.5 DISCUSSION .....	42
1.5.1 Dynamic of the bacterial community during the phytoplankton succession.....	42

1.5.2 Bacterial responses to chronic and acute diesel contaminations .....	46
CONCLUSION GÉNÉRALE .....	54
ANNEXES .....	60
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	66

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Liste des principaux composants du pétrole brut (modifié de American Academy of Microbiology, 2011). .....	5
Tableau 2: Principaux facteurs abiotiques susceptibles d'influencer la biodégradation des hydrocarbures par les communautés bactériennes marines (inspiré de Lemarchand and Desbiens, 2015). .....	11
Tableau 3 : Mean bacteria production ( $\text{cells.L}^{-1}.\text{d}^{-1} \pm \text{SD}$ ) and mean cell-specific bacterial production ( $\text{d}^{-1} \pm \text{SD}$ ) in the Control, Chronic and Acute treatments. ....	36
Table 4: Jaccard coefficient similarity indices between mesocosms of the Control (CTR), Chronic (C) and Acute (A) treatments at the different sampling days. ....	41

## LISTE DES FIGURES

Figure 1: Processus influençant le devenir des hydrocarbures pétroliers en milieu marin (GENIVAR, 2013). .....	6
Figure 2 : Évolution temporelle de la composition d'un déversement pétrolier et changements associés dans les abondances des microorganismes clés (modifié à partir de Head et al., 2006). .....	9
Figure 3: Système hydrographique du Saint-Laurent, comprenant les Grands Lacs, les différents tronçons fluviaux, l'Estuaire maritime et le Golfe du Saint-Laurent (Plan d'action Saint-Laurent, 2014). .....	13
Figure 4: Map of the St. Lawrence Estuary. Red points represent the Escoumins Bay area where water was collected, and the ISMER marine research station in Pointe-au-Père, where experiments were conducted. (map ©Thomas Trombetta) .....	25
Figure 5: Mean abundance ( $\times 10^6$ cells.mL <sup>-1</sup> $\pm$ SD) of total free-living bacteria (TFB; lines) and of HNA free-living bacteria (HNA-F; bars), in Control, Chronic and Acute treatments. Vertical bars represent standard deviation (n=3 mesocosms per treatment). .....	32
Figure 6: Mean abundance ( $\times 10^4$ cells.mL <sup>-1</sup> $\pm$ SD) of total particle-attached bacteria (TAB; lines) and of particle-attached HNA bacteria (HNA-A; bars) in Control, Chronic and Acute treatments. Vertical bars represent standard deviation (n=3 mesocosms per treatment). .....	34
Figure 7: Net accumulation of total free-living (A) and particle-attached (B) bacteria and of HNA bacteria in free-living (C) and particle-attached (D) bacterial communities. Vertical bars represent standard deviation (n=3 mesocosms per treatment) (***) p < 0.001 ; ** p < 0.01). .....	35



Figure 9 : Average evolution of the bacterial community richness in Control, Chronic and Acute treatments (n=3 mesocosms per treatment)..... 39

Figure 10: Dendrogram of the DGGE fingerprint patterns of the bacterial community in Control (Ctrl), Chronic (C) and Acute (A) treatments at sampling days 0, 2, 4, 8, 10 and 12. .... 40

## LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

<b>ESL / SLE</b>	Estuaire du Saint-Laurent / St. Lawrence Estuary
<b>OTU</b>	Operational taxonomic unit
<b>HAP</b>	Hydrocarbures aromatiques polycycliques
<b>UV</b>	Ultra-violet
<b>PCR</b>	Polymerase chain reaction
<b>DGGE</b>	Denaturing gradient gel electrophoresis
<b>H<sup>3</sup>-TdR</b>	Thymidine tritiée
<b>HCs</b>	Hydrocarbons
<b>ODB</b>	Oil degrading bacteria
<b>FCM</b>	Flow cytometry
<b>HNA</b>	High nucleic acid
<b>LNA</b>	Low nucleic acid
<b>DNA</b>	Deoxyribonucleic acid
<b>RNA</b>	Ribonucleic acid
<b>rDNA</b>	Ribosomal deoxyribonucleic acid
<b>CCF</b>	Carbon conversion factor
<b>SD</b>	Standard deviation
<b>TCF</b>	Thymidine conversion factor
<b>TFB</b>	Total free-living bacteria
<b>HNA-F</b>	Free-living HNA bacteria
<b>TAB</b>	Total particle-attached bacteria
<b>HNA-A</b>	Particle-attached HNA bacteria

## LISTE DES SYMBOLES

$\varnothing$   
 $\lambda$

Diamètre  
Longueur d'onde (nm)



## **INTRODUCTION GÉNÉRALE**

### **LES COMMUNAUTÉS BACTÉRIENNES MARINES, ACTRICES MAJEURES DE LA BIODÉGRADATION DES HYDROCARBURES EN MILIEU MARIN**

#### **Les bactéries dans les milieux marins**

Les communautés bactériennes jouent un rôle essentiel dans le fonctionnement des écosystèmes marins. Ces microorganismes, qui représentent plus de 90% de la biomasse marine, sont très abondants ( $10^8$ - $10^9$  cellules.L<sup>-1</sup> en moyenne) dans les milieux pélagiques, qu'ils soient tempérés ou plus extrêmes (milieux polaires, cheminées hydrothermales etc.). Cette omniprésence du bactérioplancton dans l'océan mondial s'explique par la très grande diversité génétique et physiologique des espèces bactériennes (autotrophes ou hétérotrophes capables d'utiliser différents composés inorganiques ou organiques comme sources d'énergie) (Byrne, 2008).

La diversité et la dynamique des communautés bactériennes sont régulées par les caractéristiques environnementales du milieu, parmi lesquelles on distingue des facteurs abiotiques (physico-chimiques) et biotiques (impliquant d'autres acteurs biologiques). Plusieurs facteurs abiotiques, tels que la température ou la salinité, spécifiques d'un milieu, permettent le développement de différentes espèces bactériennes, adaptées à ces conditions thermo-halines. À titre d'exemple, les espèces hyperthermophiles ne peuvent se développer que dans des milieux particulièrement chauds (entre 65 et 110°C), tandis qu'à l'inverse les espèces psychrophiles se développent à des températures beaucoup plus froides (entre -10 et +15°C). De même, les bactéries halophiles ne peuvent se développer que dans des milieux salés, contrairement aux espèces halophobes, qui vivent en milieux non salés. Outre la

température et la salinité, d'autres facteurs physico-chimiques tels que le pH, la pression, la disponibilité des nutriments, ou encore la présence de lumière, favorisent le développement de différentes espèces, influençant ainsi la diversité et la dynamique des communautés bactériennes.

Différents facteurs biotiques, tels que les interactions du bactérioplancton avec les autres groupes planctoniques (virus, phytoplancton, ciliés, etc.) influencent également la structure des communautés bactériennes (Grossart and Simon, 2007). En effet, des processus tels que le broutage de bactéries par d'autres organismes ou encore la lyse virale (notamment le phénomène du « kill the winner » (Paepe et al., 2014)), permettent de réguler l'évolution des communautés bactériennes.

La grande diversité taxonomique et métabolique du bactérioplancton confère à ces organismes plusieurs rôles importants pour le fonctionnement des écosystèmes marins. Les espèces autotrophes, telles que les cyanobactéries, sont ainsi responsables d'un quart de la production primaire globale en milieu aquatique (Zahn, 2017). Les bactéries hétérotrophes sont cependant majoritaires dans les milieux marins et jouent un rôle essentiel dans la reminéralisation de la matière organique particulaire et dans la boucle microbienne (McDonald et al., 2017; Smith et al., 1995). Ce concept, établi par Azam et al. (1983), désigne l'utilisation de la matière organique dissoute par les bactéries hétérotrophes, conduisant à la production de biomasse. Par la suite, ces bactéries hétérotrophes sont broutées par différents protistes, tels que les ciliés et les flagellés, et contribuent donc au transfert de l'énergie dans les écosystèmes marins (Legendre and Rassoulzadegan, 1995; Yu et al., 2014).

De plus, grâce à l'action d'enzymes spécifiques, certaines bactéries hétérotrophes sont responsables de la biodégradation de polluants d'importance pour les milieux marins, tels que les hydrocarbures ou bien certains plastiques (Dash and Mangwani, 2013). Ces bactéries sont capables de décomposer ces polluants en sous-produits, pouvant ensuite être métabolisés par d'autres microorganismes ou par des organismes de niveaux trophiques supérieurs. Dans un contexte d'anthropisation des milieux océaniques et côtiers, l'étude des mécanismes de

biodégradation des polluants majeurs tels que les hydrocarbures par des espèces bactériennes devient essentielle pour mieux évaluer les capacités de résilience des écosystèmes marins (Lemarchand and Desbiens, 2015).

### **Origines et devenir des hydrocarbures en milieu marin**

Les composés pétroliers présents dans les milieux marins peuvent être d'origine naturelle ou anthropique. Environ 9% des hydrocarbures en milieu marin sont issus de résurgences naturelles (GENIVAR, 2013), provenant de gisements enfouis sous le plancher océanique, tels qu'observés dans le Golfe du Mexique (États-Unis) et le Golfe de San Jorge (Kennicutt et al., 1988; Lemarchand and Desbiens, 2015). Les rejets d'origine anthropique sont donc les principales sources d'hydrocarbures dans les écosystèmes marins (GENIVAR, 2013). Il peut alors s'agir de rejets de pétrole brut ou bien de produits transformés, tels que les carburants (diesel, essences raffinées). Les déversements de pétrole brut surviennent lors d'accidents résultant de l'exploitation des hydrocarbures ou du transport par voie maritime (exemple de l'accident de *DeepWater Horizon* (2010) ou des naufrages des navires *Prestige* (2002) et *Exxon Valdez* (1989)). En raison de leur ponctualité et des grandes quantités d'hydrocarbures déversés (estimé à 500 000 m<sup>3</sup> pour l'accident *DeepWater Horizon*, (Beyer et al., 2016)), ces accidents constituent une contamination aiguë pour l'environnement marin. Les forts impacts écologiques de ce type de déversement, tels que l'importante mortalité des organismes marins, la diminution des taux de reproduction, la contamination des tissus etc. ont été largement étudiés (revue par Bodkin et al., 2014; Beyer et al., 2016). Ces accidents majeurs ne représentent toutefois que 12% des sources d'hydrocarbures dans les océans (GENIVAR, 2013). En effet, les déversements chroniques de composés pétroliers transformés, issus des zones industrielles et urbaines, représentent environ 53% des voies d'introduction des hydrocarbures dans les milieux marins (GENIVAR, 2013). Ces contaminations chroniques peuvent être dues à des sources naturelles de pétrole (résurgences océaniques) ou à des

sources exogènes (rejets industriels, trafic maritime commercial ou de plaisance) et contribuent de façon significative à l'introduction de plus faibles quantités d'hydrocarbures, à une fréquence plus constante que les accidents pétroliers majeurs (GENIVAR, 2013). La fréquence de ces rejets, tout comme les quantités d'hydrocarbures ainsi déversées, sont mal recensées mais contribue indéniablement à l'introduction d'hydrocarbures dans les écosystèmes marins.

La résilience des milieux marins face aux déversements d'hydrocarbures dépend tout d'abord de la nature des composés déversés, de leurs propriétés physico-chimiques et de leurs concentrations. En effet, ces facteurs influencent les processus biotiques et abiotiques responsables de l'élimination des hydrocarbures en milieu marin.

Le pétrole brut est un assemblage complexe de différents composés, dont les principales caractéristiques sont répertoriées dans le Tableau 1. En fonction des gisements, ces composés se retrouvent en proportions variables et confèrent aux différents types de pétrole leurs propriétés physiques et chimiques ainsi que leur toxicité.



Tableau 1: Liste des principaux composants du pétrole brut (modifié de American Academy of Microbiology, 2011).

Composés volatiles	Composés à faible poids moléculaire, présentant une forte toxicité, mais rapidement évaporés.
Hydrocarbures saturés	Longues chaînes composés d'hydrogène et de carbone liés par des liaisons simples. Plus les chaînes sont courtes, plus ces hydrocarbures sont facilement biodégradables.
Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)	Porteurs d'au moins deux cycles aromatiques, ces composés confèrent au pétrole sa toxicité et figurent sur la liste de polluants prioritaires de l'USEPA (US Environmental Protection Agency).
Résines et asphaltines	Composés polaires, difficilement biodégradables qui confèrent au pétrole sa viscosité, sa forte densité et son adhérence.

En plus de ces principaux composés, les carburants tels que le diesel et l'essence, comprennent également différents produits chimiques (biocides, colorants etc.), ajoutés lors du raffinage du pétrole brut (Boust and Lebreton, 2006).

### **Influence des facteurs abiotiques environnementaux sur la dégradation des hydrocarbures en milieu marin.**

Outre leur nature et leurs propriétés physico-chimiques, la dégradation des hydrocarbures en milieu marin dépend également de l'action de différents processus abiotiques spécifiques aux milieux contaminés. Suite à un déversement d'hydrocarbures en milieu marin, des processus

abiotiques tels que l'évaporation, la photo-oxydation, la dispersion, la dissolution et la sédimentation vont influencer le devenir des composés pétroliers déversés (Figure 1).

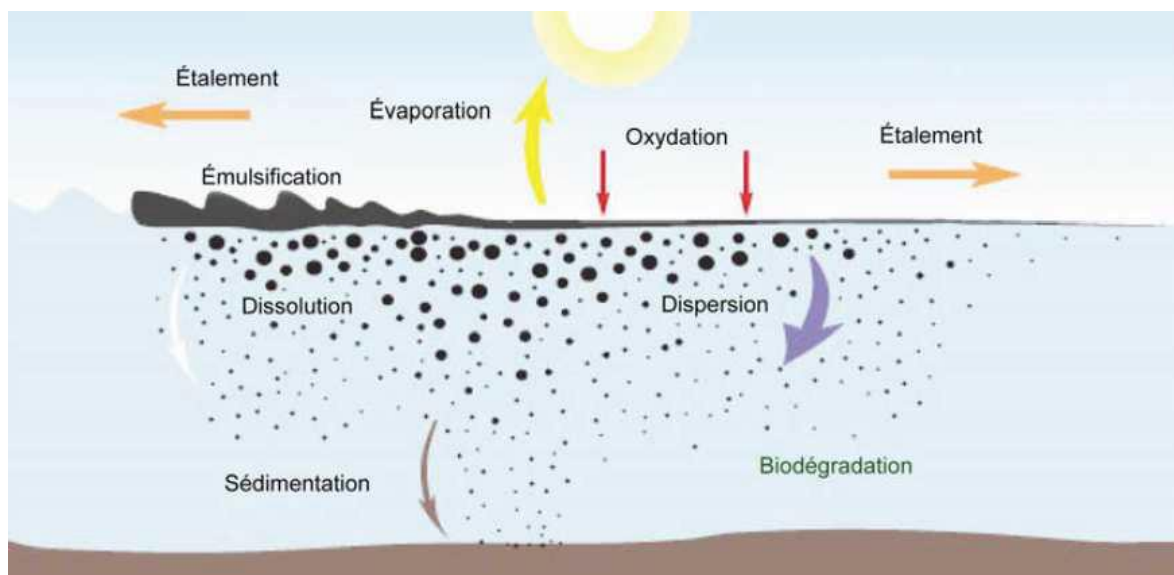


Figure 1: Processus influençant le devenir des hydrocarbures pétroliers en milieu marin (GENIVAR, 2013).

En fonction de la nature des composés pétroliers et des conditions environnementales, ces processus abiotiques peuvent modifier la toxicité des hydrocarbures déversés. Par exemple, la photo-oxydation par les rayons UV peut modifier la structure et augmenter la toxicité des produits déversés (Macnaughton et al., 1999). À l'inverse, d'autres processus comme l'évaporation des composés légers, permettent d'éliminer de l'environnement marin une partie des composés les plus toxiques (méthane, propane), notamment dans les milieux tempérés et chauds (American Academy of Microbiology, 2011). Dans les milieux froids en revanche, les faibles températures limitent l'évaporation des composés volatiles, dont la toxicité est fortement nuisible aux organismes marins (Yang et al., 2009).

Cependant ces processus abiotiques ne permettent que l'élimination partielle des hydrocarbures. La principale voie d'élimination des hydrocarbures est leur biodégradation par des microorganismes du milieu, plus particulièrement par les bactéries hydrocarbonoclastes (Atlas 1981; Head et al., 2006; Sauret et al., 2015).

## **Biodégradation des hydrocarbures par les communautés bactériennes marines**

Les organismes hydrocarbonoclastes sont des microorganismes, soit des bactéries ou des champignons, capables de dégrader les hydrocarbures en les utilisant comme source de carbone, obligatoire ou facultative, selon les espèces. En milieu marin, les bactéries hydrocarbonoclastes sont les actrices principales de la biodégradation des hydrocarbures (Atlas 1981; Head et al., 2006). Les espèces hydrocarbonoclastes sont ubiquistes, et plusieurs genres (ex. *Alcanivorax*, *Thalassolitus*, *Cycloclasticus* spp.) ont été recensés dans différents milieux (arctique et subarctique, tempérés, pélagiques ou côtiers) (Dyksterhouse et al., 1995; Yakimov et al., 1998,2004; Head et al., 2006).

Dans les milieux marins non exposés aux hydrocarbures, les bactéries hydrocarbonoclastes sont minoritaires dans la communauté bactérienne indigène (environ 0.1% des espèces présentes) (Atlas 1981; Head et al., 2006; Sauret et al., 2015). Suite à l'introduction d'hydrocarbures, les espèces hydrocarbonoclastes sont les seules capables d'utiliser les hydrocarbures comme source de carbone. Dans ces conditions, les bactéries hydrocarbonoclastes sont plus compétitives que les autres espèces hétérotrophes et vont se développer, puis devenir majoritaires dans la communauté, jusqu'à représenter 100% des espèces présentes dans la communauté bactérienne active (Head et al., 2006; Dash and Mangwani, 2013).

La biodégradation des hydrocarbures est basée sur l'activité d'enzymes spécifiques, capables d'hydrolyser certains types de composés pétroliers. Tel que mentionné précédemment, qu'ils soient d'origine naturelle ou anthropique, les hydrocarbures déversés dans les milieux marins sont des assemblages complexes de plusieurs composés pétroliers (American Academy of Microbiology, 2011). La biodégradation des hydrocarbures requiert donc l'action combinée

de différentes enzymes spécifiques, produites par plusieurs espèces hydrocarbonoclastes. Ces regroupements d'espèces dégradant les hydrocarbures sont désignés comme des consortia de dégradation. La diversité des espèces présentes au sein de ces consortia dépend de la composition initiale des communautés bactériennes indigènes, des types de composés pétroliers déversés mais également de l'état de dégradation des hydrocarbures déversés. En effet, l'utilisation de ces composés pétroliers par les hydrocarbonoclastes recrutées suite au déversement, conduit à la diminution de leurs concentrations dans le milieu et à une augmentation de la concentration des sous-produits issus de leur dégradation. Ces nouveaux composés favorisent alors le développement de nouvelles espèces bactériennes, capables de les utiliser comme source de carbone. Celles-ci deviennent alors majoritaires dans la communauté bactérienne, car elles sont plus compétitives que les premières hydrocarbonoclastes, désormais privées de leurs principales ressources. Les espèces bactériennes formant le consortium de dégradation vont ainsi se succéder au fur et à mesure de l'élimination des composés pétroliers ; on parle alors de « consortium dynamique », schématisé dans la Figure 2 (Head et al., 2006; Dubinsky et al., 2013; Lemarchand and Desbiens, 2015).

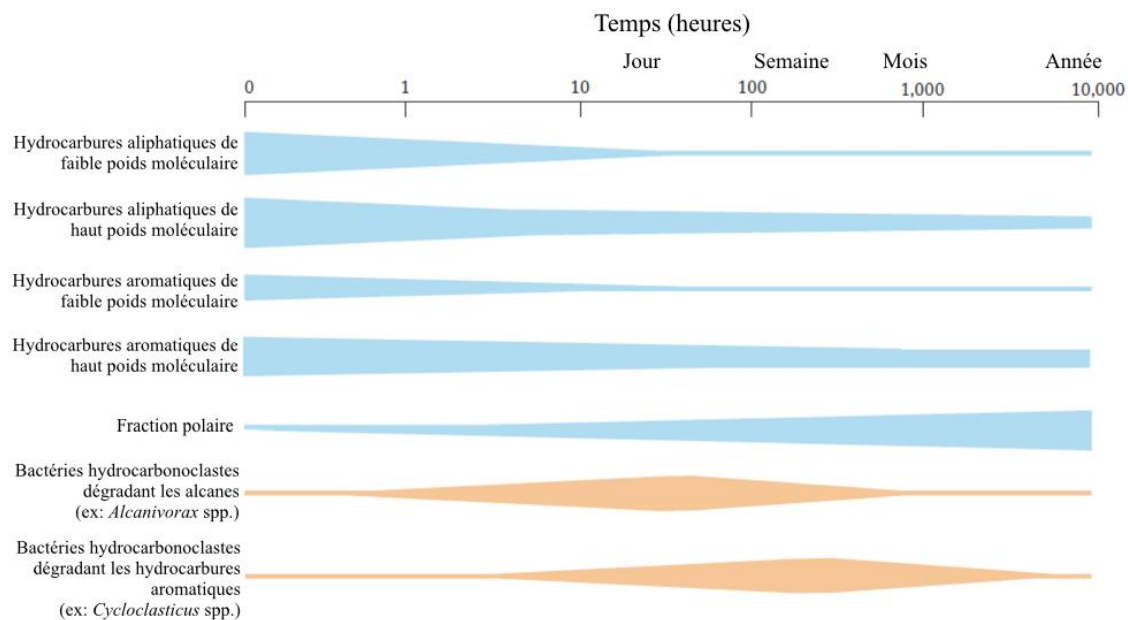


Figure 2 : Évolution temporelle de la composition d'un déversement pétrolier et changements associés dans les abondances des microorganismes clés (modifié à partir de Head et al., 2006).

L'efficacité de la biodégradation des hydrocarbures par les consortia spécialisés dépend de nombreux paramètres (Leahy and Colwell, 1990). Tel que mentionné précédemment, l'efficacité de la biodégradation bactérienne dépend de la nature des composés pétroliers déversés et de leur comportement dans le milieu (évaporation, dispersion, dissolution), mais également de l'adaptation des communautés bactériennes indigènes à la présence naturelle d'hydrocarbures dans leur milieu.

Dans les environnements soumis à des introductions chroniques d'hydrocarbures, d'origine naturelle ou anthropique, les bactéries hydrocarbonoclastes peuvent être majoritaires dans la communauté (American Academy of Microbiology, 2011). Les espèces hydrocarbonoclastes étant déjà présentes dans la communauté, en cas de nouvelle contamination aux

hydrocarbures, la réponse de ces communautés « adaptées » sera rapide et la biodégradation efficace. De telles communautés bactériennes ont été observées dans le Golfe du Mexique, en réponse aux résurgences naturelles chroniques dans ce milieu, mais également dans des zones portuaires, où le trafic maritime a conduit à des contaminations chroniques du milieu aux hydrocarbures transformés (Bargiela et al., 2015; Gertler et al., 2012). A l'inverse, dans les milieux peu ou pas impactés, l'introduction d'hydrocarbures nécessite tout d'abord une modification de la structure de la communauté indigène par une sélection des espèces hydrocarbonoclastes, dont dépend la biodégradation (Ortmann and Lu, 2015).

La biodégradation des hydrocarbures étant un processus essentiel pour la résilience des écosystèmes suite à des déversements pétroliers, de nombreuses études ont permis d'identifier les différents facteurs abiotiques influençant l'activité des consortia de dégradation (Tableau 2) (Atlas and Bartha, 1972; Leahy and Colwell, 1990; Coulon et al., 2007; Delille et al., 2009).

Tableau 2: Principaux facteurs abiotiques susceptibles d'influencer la biodégradation des hydrocarbures par les communautés bactériennes marines (inspiré de Lemarchand and Desbiens, 2015).

Facteurs	Effets sur la biodégradation des hydrocarbures
Température	La température modifie les caractéristiques physiques et chimiques des hydrocarbures (viscosité, solubilité), ce qui peut rendre leur biodégradation plus difficile. Les faibles températures vont également limiter l'évaporation des composés volatils, très toxiques. Enfin, une diminution de la température en dessous des valeurs optimales de croissance bactérienne, va ralentir le métabolisme des microorganismes et donc leur taux de biodégradation.
Nutriments	La disponibilité des nutriments favorise la croissance et le métabolisme des microorganismes. De nombreuses études ont démontré l'importance de la disponibilité des nutriments pour augmenter le taux de biodégradation des hydrocarbures.
Salinité	Les variations de salinité (en milieu estuarien notamment) favorisent le développement d'espèces halophiles ou halotolérantes, ce qui peut indirectement influencer sur la sélection des espèces bactériennes capables de se développer en présence d'hydrocarbures
Oxygène	La biodégradation des hydrocarbures peut être effectuée en aérobie ou en anaérobie. Cependant en conditions d'aérobie, on observe un meilleur rendement de la biodégradation.
pH	Les variations du pH régulent le métabolisme bactérien et peuvent ainsi diminuer le rendement de la biodégradation des hydrocarbures.
Pression	Les conditions de pression influencent la diversité des communautés bactérienne et peuvent ajouter une contrainte supplémentaire pour le développement d'un consortium de biodégradation.

Si l'influence de ces différents facteurs abiotiques a souvent été étudiée, peu d'informations permettent de comprendre pleinement les effets des interactions et de la compétition avec les autres organismes indigènes (virus, phytoplancton) sur les capacités de dégradation des hydrocarbures par les communautés bactériennes indigènes.

Les déversements de composés pétroliers dans l'environnement ont des impacts sur tous les groupes d'organismes marins (virus, phytoplancton, zooplancton, poissons, mammifères, oiseaux etc.) (Beyer et al., 2016; Perhar and Arhonditsis, 2014). Les réponses de ces organismes face aux hydrocarbures sont susceptibles de modifier leurs interactions avec les espèces bactériennes. Or, il est clairement démontré que ces interactions sont susceptibles de moduler la dynamique et la diversité des communautés bactériennes (Grossart and Simon, 2007; Legendre and Rassoulzadegan, 1995). Afin de mieux appréhender la réponse des communautés bactériennes et les capacités de résilience d'un écosystème suite à un déversement d'hydrocarbures, il est donc nécessaire de considérer l'influence que peuvent avoir ces interactions biotiques sur l'évolution des populations bactériennes et leur capacité de biodégradation.

#### **ÉTAT DES CONNAISSANCES DES CAPACITÉS DE BIODÉGRADATION DES HYDROCARBURES PAR LA COMMUNAUTÉ BACTÉRIENNE DE L'ESTUAIRE DU SAINT-LAURENT.**

##### **Caractéristiques de l'Estuaire du Saint-Laurent et risques de déversements d'hydrocarbures.**

L'Estuaire du Saint-Laurent (ESL) est un écosystème subarctique complexe et riche, abritant plus de 27 000 espèces animales et végétales. Cet écosystème est le support de nombreuses activités socio-économiques, telles que le tourisme, les loisirs nautiques, la pêche etc. Relié aux Grands Lacs à l'ouest par le fleuve du Saint-Laurent et ouvert sur l'Atlantique à l'est via



le Golfe du Saint-Laurent (Figure 3), l'ESL est une voie navigable majeure, jouant un rôle essentiel dans le commerce international canadien (SODES, 2012).



Figure 3: Système hydrographique du Saint-Laurent, comprenant les Grands Lacs, les différents tronçons fluviaux, l'Estuaire maritime et le Golfe du Saint-Laurent (Plan d'action Saint-Laurent, 2014).

Le Québec importe presque la totalité de ses besoins en hydrocarbures, leur acheminement le long de cet axe est un facteur important de l'économie québécoise (Innovation Maritime, 2014). Chaque année, environ 20 Mt d'hydrocarbures sont transportées le long du système du Saint-Laurent (Innovation Maritime, 2014). Une grande partie de ces hydrocarbures est destinée aux raffineries Valéro (Québec) et Suncor (Montréal), qui transforment en diesel et en fuel du pétrole brut importé par voie maritime depuis l'Afrique, la Mer du Nord, ou bien acheminé depuis l'Ouest Canadien par pipeline (Innovation Maritime, 2014). Si le transport maritime reste la principale voie d'importation d'hydrocarbures au Québec, il est important

de noter que la part de pétrole brut acheminé par pipeline depuis l'Amérique du Nord et l'Ouest Canadien est en augmentation depuis quelques années (Innovation Maritime, 2014). Ce mode de transport peut conduire, en cas d'accident, à la contamination des milieux aquatiques terrestres aussi bien que maritimes.

Actuellement, le transport annuel de pétrole au Québec est assuré par environ 250 navires pétroliers internationaux, pouvant acheminer jusqu'à 150 000 t de pétrole à travers l'Atlantique. Parmi ces navires, environ 90 sont capables d'emprunter le chenal Laurentien et de se rendre jusqu'à Lévis (Québec, Canada), terminal de la voie maritime et début de la section estuarienne (Innovation Maritime, 2014) (Figure 3). A ces grands pétroliers s'ajoutent environ 150 navires citernes canadiens, affrétant de plus petits volumes de pétrole brut le long du Saint-Laurent, du Golfe jusqu'aux Grands-Lacs (Innovation Maritime, 2014). Pour que le transport d'hydrocarbures soit rentable, chaque navire doit être chargé au maximum de ses capacités. Au regard des quantités de pétrole transitant au sein du système du Saint-Laurent, il est certain que des déversements accidentels d'hydrocarbures conduiraient à une contamination aiguë du milieu, avec des conséquences importantes sur cet écosystème. Il est important de noter que le trafic maritime d'hydrocarbures sur le Saint-Laurent pourrait encore augmenter dans les prochaines années. En effet, si les projets d'exploitation pétrolière du gisement de Old Harry, situé dans le Golfe du Saint-Laurent (Figure 3), voient le jour, les quantités de produits pétroliers et le nombre de navires pétroliers transitant sur cet axe vont augmenter, multipliant ainsi les risques d'accidents et donc de déversements aigus.

Outre les pétroliers, de très nombreux navires marchands circulent chaque année sur l'ESL, représentant près de 110 millions de tonnes de marchandises en tout genre (SODES, 2012). En 2013, les ports de Québec et Montréal ont accueilli respectivement 1127 et 1200 navires marchands (Port de Québec, 2013 ; Pêches et Océans Canada, 2012). Le gouvernement québécois souhaitant favoriser le trafic maritime le long du Saint-Laurent, ces chiffres sont

susceptibles d'augmenter dans les prochaines années (Allard, 2015). Or, les navires marchands, pétroliers ou non, transportent avec eux des réserves de carburant proportionnelle à leur taille, pouvant aller jusqu'à 10 000 t pour les plus gros navires circulant sur le Saint-Laurent (Innovation Maritime, 2014).

Ainsi, en plus des risques de déversements aiguës de pétrole brut liés au trafic maritime d'hydrocarbures, les accidents de navires (tous types confondus) et les rejets accidentels ou sauvages de carburants dans l'ESL, peuvent conduire à des contaminations chroniques et/ou aiguës du milieu.

Contrairement au Golfe du Mexique, aucune résurgence naturelle d'hydrocarbures n'a été recensée dans l'ESL. Les communautés bactériennes indigènes ne sont donc *a priori* pas adaptées à la présence de composés pétroliers, ce qui peut limiter leur biodégradation. De plus, l'ESL est un milieu froid, soumis à de fortes variations saisonnières. Les températures de surface peuvent varier entre  $<0^{\circ}\text{C}$  et  $15^{\circ}\text{C}$  au cours de l'année (Gilbert and Pettigrew, 1997). En période hivernale, un couvert de glace dont la taille varie en fonction des années, s'étend sur l'ESL entre décembre et mars. Tel que mentionné précédemment (Tableau 2), la présence de glace et les faibles températures dans l'ESL peuvent significativement influencer le devenir des hydrocarbures dans le milieu et diminuer leur taux de biodégradation par les communautés bactériennes locales (Atlas and Bartha, 1972; Yang et al., 2009).

### **Connaissances actuelles sur la capacité de biodégradation de la communauté bactérienne de l'ESL.**

Depuis les années 1990, plusieurs études ont cherché à caractériser les effets de déversements d'hydrocarbures dans le fleuve et l'ESL (Delille et al., 1993; Siron et al., 1991, 1993, 1995, 1996; Padros et al., 1999; Sargian et al., 2005). Cependant, les données actuellement disponibles ne permettent pas d'évaluer les capacités de biodégradation des hydrocarbures par l'ensemble des communautés bactériennes indigènes (Lemarchand and Desbiens, 2015).

Ce manque de connaissances est essentiellement lié au fait que la communauté bactérienne de l'ESL n'a jamais été caractérisée dans sa globalité, en termes d'abondance, de diversité et de métabolisme des populations microbiennes au fil des saisons (Lemarchand and Desbiens, 2015).

Dans les années 1990, les études de Siron et al. (1993, 1995) ont apporté une première observation de la biodégradation des hydrocarbures dans l'ESL. Grâce à des expériences en mésocosmes, et via des méthodes de culture en laboratoire, les auteurs ont pu démontrer la présence d'espèces hydrocarbonoclastes indigènes des genres *Pseudomonas* spp. et *Vibrio* spp. suite à l'introduction de pétrole brut. Dans ces expériences, les auteurs ont également pu établir une corrélation positive entre le taux de croissance de ces bactéries hydrocarbonoclastes et les quantités d'hydrocarbures présentes dans les mésocosmes. Ces résultats ont permis une première identification de bactéries hydrocarbonoclastes dans l'ESL et mettent en évidence leur capacité à biodégrader les hydrocarbures, et ce malgré les faibles températures expérimentales (-1.8 à 5.5°C).

Cependant, l'acquisition de ces données repose sur des méthodes de culture en laboratoire. Or, il est aujourd'hui clairement établi que l'utilisation de ces techniques n'offre qu'une

vision limitée des communautés bactériennes environnementales. En effet, les milieux de cultures synthétiques sont très éloignés des conditions environnementales et seulement 1% des bactéries marines sont capables de se développer sur ces milieux. De ce fait, bien que les études de Siron et al. (1993, 1995) aient permis d'identifier des bactéries hydrocarbonoclastes dans l'ESL, ces données sont insuffisantes pour avoir une vision globale des effets des hydrocarbures sur l'ensemble de la communauté bactérienne indigène.

En conclusion, il n'existe actuellement aucune donnée permettant d'évaluer précisément la réponse de l'ensemble de la communauté bactérienne de l'ESL face à l'introduction chronique ou aiguë d'hydrocarbures (Lemarchand and Desbiens, 2015).

### **OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES DE L'ÉTUDE**

L'objectif principal de cette maîtrise est d'étudier les effets de deux types de contamination, chronique et aiguë, au diesel maritime sur la structure et le métabolisme de la communauté bactérienne de l'ESL dans des conditions contrôlées en mésocosmes.

Le premier objectif spécifique est d'étudier les variations de la structure de la communauté bactérienne, en termes d'abondance des bactéries libres et attachées et de richesse spécifique globale, en réponse aux introductions chronique et aiguë de diesel. Afin d'observer la composante bactérienne dans sa globalité, l'abondance et la diversité des populations ont été déterminées grâce à des techniques ne nécessitant pas de culture en laboratoire (cytométrie en flux et PCR/DGGE, respectivement).

Le second objectif spécifique vise à comprendre l'évolution du métabolisme de la communauté bactérienne, en termes de production bactérienne, en réponse aux introductions

chronique et aiguë de diesel. Pour cela, le taux d'incorporation de thymidine tritiée ( $H^3$ -TdR) a été utilisé pour estimer le taux de répllication au sein de la communauté bactérienne.

Les données disponibles dans la littérature permettent d'établir les hypothèses suivantes :

Hypothèse 1 : La structure et le métabolisme de la communauté bactérienne indigène de l'ESL pourraient être modifiés suite à la sélection des populations microbiennes les plus compétitives en présence de diesel.

Hypothèse 2 : La réponse de la communauté bactérienne de l'ESL face à l'introduction de diesel sera dépendante des facteurs environnementaux biotiques (interactions avec d'autres groupes planctoniques) et abiotiques (température, concentrations en nutriments) prévalent dans les mésocosmes.

Hypothèse 3 : La réponse de la communauté bactérienne de l'ESL sera dépendante du type de contaminations, chronique ou aiguë.

Cette maîtrise fait partie d'un projet multidisciplinaire, issu de la collaboration d'équipes québécoises (UQAR-ISMER, Pêche et Océan Canada) et mexicaines (Colegio de la Frontera Sur – Unidad Campeche, Centro de Investigacion y de Estudios Avanzados – Unidad Merida).

## **CHAPITRE 1**

### **EFFETS DE CONTAMINATIONS CHRONIQUE ET AIGUË AU DIESEL MARITIME SUR LA STRUCTURE ET LE MÉTABOLISME DE LA COMMUNAUTÉ BACTÉRIENNE DE L'ESTUAIRE DU SAINT-LAURENT**

#### **1.1 RÉSUMÉ EN FRANÇAIS DU PREMIER ARTICLE**

L'importance de la voie navigable du Saint-Laurent pour le transport maritime et les projets d'exploitation off-shore d'hydrocarbures dans le Golfe, augmentent les risques de déversements chroniques ou aigus d'hydrocarbures dans l'Estuaire du Saint-Laurent (ESL) où leurs conséquences sur les communautés planctoniques sont encore largement méconnues. En milieu naturel, la biodégradation des hydrocarbures est principalement effectuée par des bactéries hydrocarbonoclastes, capables d'utiliser ces composés comme source de carbone. La structure et le métabolisme de la communauté bactérienne des milieux contaminés peuvent être profondément modifiés par le développement de ces bactéries spécialisées, dont quelques souches ont été identifiées dans l'ESL. Des expériences en conditions contrôlées, en mésocosmes ont permis de suivre, durant le développement d'une floraison phytoplanctonique, la réponse de la communauté bactérienne de l'ESL face à l'introduction, chronique ou aiguë de diesel maritime. Un échantillonnage journalier a permis de suivre l'abondance des bactéries libres et attachées à des particules, de mesurer la

production et la richesse taxonomique de la communauté bactérienne au cours du temps. L'introduction de diesel n'a pas influencé l'abondance des bactéries libres, mais a significativement stimulé l'abondance des bactéries attachées. De plus, l'analyse des empreintes génétiques de la communauté bactérienne obtenu par l'amplification du gène d'ADNr 16S a démontré une évolution de la structure de la communauté bactérienne au cours du temps et le développement de nouvelles unités taxonomiques spécifiques en présence de diesel. Ces résultats démontrent une adaptation rapide de la communauté bactérienne de l'ESL à l'introduction de diesel et ce malgré la faible température expérimentale (8°C). La plus forte biomasse de bactéries attachées dans les mésocosmes contaminés de façon chronique démontre l'influence du type de contamination sur la réponse de la communauté bactérienne. Une des hypothèses avancées pour expliquer l'augmentation des bactéries attachées est que ces populations ont pu tirer avantage de l'augmentation de la matière organique et des exsudats phytoplanctoniques, résultants des effets du diesel sur le phytoplancton. Cette étude permet donc de démontrer que la réponse de la communauté bactérienne varie selon le type de contamination (chronique ou aiguë) et est la conséquence d'effets directs et indirects de l'introduction de diesel au court de la succession planctonique.



## 1.2 INTRODUCTION

In the last decades, several major accidental oil spills related to crude oil extraction (*DeepWater Horizon*, USA 2010) or transportation (*Exxon Valdez*, USA 1989; *Sea Empress*, UK 1996; *Prestige*, Spain 2002) led to numerous studies on hydrocarbons impacts on marine ecosystems (reviewed in Head et al., 2006; Perhar and Arhonditsis, 2014; Beyer et al., 2016). In marine environments, the degradation of spilled hydrocarbons (HCs) is, in part, ensured by several physical and chemical processes including the evaporation of light components, the photo-oxidation by UV rays, as well as the dispersion and dissolution processes (GENIVAR, 2013; Perhar and Arhonditsis, 2014). Nevertheless, biodegradation of oil components by specific bacterial species, the Oil-Degrading Bacteria (ODB), is the main elimination pathway of HCs in marine environments (Atlas, 1981; Leahy and Colwell, 1990; Head et al., 2006). Considering the heterogeneity of petroleum derived products and their complex molecular assemblage, their complete degradation requires a full bacterial consortium, made of several bacterial species with specific affinities for each hydrocarbons components (Atlas, 1995; Röling et al., 2002; Mason et al., 2012; Dubinsky et al., 2013). ODB have been identified in various marine subsystems such as the water column, sea bottom, beaches and sea-ice (Hazen et al., 2010; Gerdes et al., 2005) and are quite ubiquitous in marine environments. In the absence of hydrocarbons, ODB represent only a small part of the seawater bacterial community (Atlas, 1981). Due to their ability to efficiently use hydrocarbons as their main source of carbon, ODB are highly competitive in oil polluted environments, and can constitute the major component of the indigenous bacterial community in hydrocarbons contaminated areas (Head et al., 2006; Hazen et al., 2016; Beyer et al., 2016).

Major crude oil spills represent sudden, acute and important introduction of hydrocarbons in marine systems. Nevertheless, such acute contaminations are not the only sources of hydrocarbons in marine environments (GENIVAR, 2013). Petroleum derived components can also be chronically released in these environments from industrial and urban areas, as

well as from accidental spills of boat diesel (GENIVAR, 2013). Those contaminations, less studied than acute oil spills, might have important ecological impacts on marine ecosystems by significantly affecting their productivity and their biodiversity, especially at the microbial level. Contrary to acute contamination where toxic effects of hydrocarbons are often rapidly observed, chronic exposure to oil components might induce an adaptation of the bacterial community and modify the composition of the natural bacterial communities inhabiting contaminated areas. For example, in environments naturally exposed to hydrocarbons, such as the Gulf of Mexico (USA), where natural leakages from oil reservoirs are common, ODB represent an important part of the indigenous bacterial community. As a consequence, the development of a complex oil degrading consortium in response to oil spills might be faster in such adapted environments than in pristine environments (Balestra et al., 2011; Ortmann and Lu, 2015).

The development of complex oil degrading microbial consortia after oil spills has been investigated in various environments to assess ecosystem resilience capacity. Numerous studies have demonstrated that abiotic factors such as high nutrient concentrations and warm temperatures promoted the consortium development and favoured the rapid biodegradation of hydrocarbons (Atlas and Bartha, 1972; Leahy and Colwell, 1990; Coulon et al., 2007; Gertler et al., 2012). In aquatic environments, the bacterial community dynamic is regulated by several biotic factors, including viral lysis, grazing by flagellates and interactions with phytoplankton (Grossart and Simon, 2007). Fewer ecotoxicological studies have investigated the role of these factors on the bacterial community after oil spills (Sauret et al., 2015). As bacterial biomass and diversity are regulated by the combination of biotic and abiotic processes prevailing in the ecosystem (Legendre and Rassoulzadegan, 1995), it is essential to take biotic interactions into account to better understand the behaviour of the bacterial community and the development of the degrading microbial consortium after an oil spill.

The St. Lawrence Estuary (SLE), located in Quebec (Canada), is a large cold subarctic environment, characterized by a strong seasonality. By its connection to the Great Lakes by

the St. Lawrence River and to the Atlantic via the Gulf of St. Lawrence, this estuary is an important support for Canadian international trade. Unlike the Gulf of Mexico, the St. Lawrence system is not naturally exposed to oil leakages. Combination of important shipping traffic on the St. Lawrence sea route with potential development of petroleum extraction projects in the Gulf could severely increase the risks of acute or chronic hydrocarbons spills in the SLE (Lemarchand and Desbiens, 2015).

Bacterial degradation of hydrocarbons has been previously observed in cold environments (Atlas and Bartha, 1972; Coulon et al., 2004; Gerdes et al., 2005). Results of these studies demonstrated that in such environments, the development of the oil-degrading consortium might be delayed by the reduced bacterial metabolism at low temperature (Yang et al., 2009). Only few information is available concerning the diversity of the SLE bacterial community and only scarce studies have focused on the occurrence of ODB within this community by culture methods (Siron et al., 1993, 1995). Considering the increasing risks of hydrocarbons spills in the SLE, it is essential to better characterize the biodegradation potential of the natural bacterial community of the SLE to accurately evaluate the potential resilience capacities of this complex ecosystem.

The aim of this study was to study experimentally the effects of chronic and acute diesel contamination on the indigenous bacterial community of the SLE in mesocosms during a phytoplankton bloom period. Bacterial abundances and richness were determined to assess the evolution of the bacterial community structure, whereas bacterial production was used to compare the metabolism of the bacterial community subjected or not to diesel contamination.

## 1.3 MATERIALS AND METHODS

### 1.3.1 Experimental set-up

Mesocosm experiments were conducted at the ISMER marine research station of Rimouski (Quebec, Canada) (48°30'54" N 68°28'04.9" W) from June 20<sup>th</sup> to July 6<sup>th</sup>, 2016. The experimental system consisted of twelve mesocosms (2.5 m<sup>3</sup>, 140 cm diameter, 2.70 m high) placed inside two temperature-regulated containers, six in each (Annex 1).

Before seawater filling, the mesocosms were washed with clean tap water using a pressure washer, decontaminated with diluted Virkon<sup>®</sup> according to the manufacturer's instructions (Antec International Limited), and finally rinsed with clean tap water. After this cleaning, mesocosms were filled up with surface St. Lawrence Estuary (SLE) water from the upwelling area of the Laurentian Channel (Escoumins Bay) (48°20'52" N, 69°24'21" W) (Figure 4). Water was distributed equally in all mesocosms using a gravity system connected to hoses, as in Thyssen et al. (2011). To remove large organisms, water was pre-filtered through a 300 µm Nitex net installed in the water distribution system.

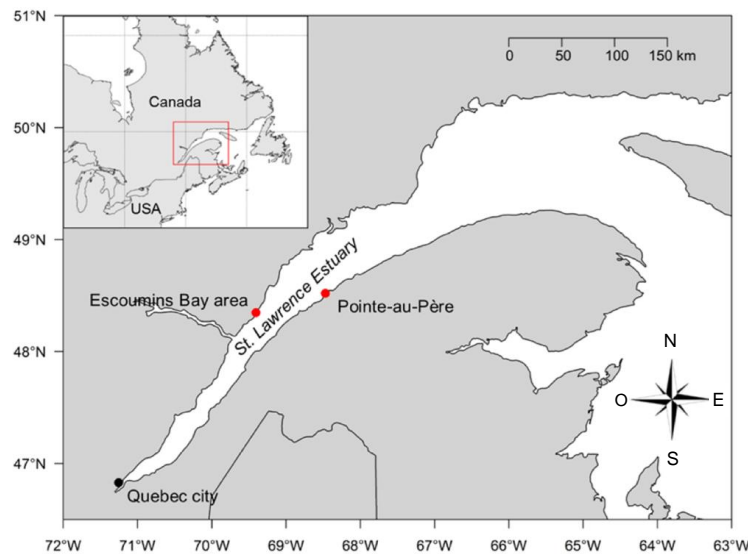


Figure 4: Map of the St. Lawrence Estuary. Red points represent the Escoumins Bay area where water was collected, and the ISMER marine research station in Pointe-au-Père, where experiments were conducted. (map ©Thomas Trombetta)

Experiment started after a 12 h adaptation period of the plankton community in mesocosms and then lasted 15 days. Rotors placed in each mesocosm during the whole experiment ensured homogeneous vertical mixing of the water column. Plexiglas plates were placed at the top of the mesocosms to allow exposure to natural light and prevent external contaminations. The twelve mesocosms were equipped with individual probes to daily monitor changes in pH, temperature, O<sub>2</sub> (data not shown) and chlorophyll *a* concentrations (Annex 4), as well as with an automated control of the temperature. During the whole experiment, water temperature was controlled and set to 8°C in all mesocosms, to mimic the water temperature conditions at the water-sampling site.

Three different diesel treatments were applied, in triplicates, in randomly chosen mesocosms: Control (without diesel), Chronic (two consecutive additions of diesel) and Acute (one punctual addition of diesel). Diesel additions for Chronic and Acute treatments were performed considering the period of phytoplankton bloom development observed in the

mesocosms (based on daily chlorophyll *a* values – Annex 4). The Chronic treatment consisted of two successive contaminations with 10 mL of maritime diesel ( $C_i = 0.85 \text{ g.mL}^{-1}$ ), at days 4 and 6 (before and during the maximum chlorophyll biomass), whereas the Acute treatment corresponded to a single injection of 20 mL of maritime diesel ( $C_i = 0.85 \text{ g.mL}^{-1}$ ) at day 6 (during the maximum chlorophyll biomass). Diesel additions were done in the morning, just after the daily sampling. Applied diesel contaminations were calculated based on Brussaard et al. (2016), to be representative of a medium oil spill event. The final diesel concentration in contaminated mesocosms reached a maximum of  $17 \mu\text{g.L}^{-1}$  and was daily monitored with a Cyclop<sup>®</sup> probe (Annex 6).

Four litres of water were sampled daily in clean plastic containers (rinsed with nanopure water), specifically attributed to each mesocosm for the whole experiment. Before the sampling, all containers were rinsed three times with the mesocosms' water. In addition to this general sampling procedure, 20 mL of mesocosms' water were sampled directly in glass Erlenmeyers flasks every two days for bacterial production measurements.

### 1.3.2 Microbiological analysis

#### a) Abundance of heterotrophic bacteria

Abundance of free-living and particle-attached bacteria were determined daily from day 0 to day 14 by flow cytometry (FCM), according to the protocol used by Lapoussière et al. (2011).

For free-living bacteria counts, three 4.95 mL replicates were sampled in each mesocosm, each fixed with 50  $\mu\text{L}$  glutaraldehyde Grade I ( $C_f = 0.1 \%$ , Sigma) and placed at  $4^\circ\text{C}$  in the dark during 30 min. Then, the samples were stored at  $-80^\circ\text{C}$  until further FCM counts. For particle-attached bacteria, 50 mL of mesocosm water sample were filtered in duplicates on 5  $\mu\text{m}$  Nucleopore membranes ( $\varnothing$  47 mm, VWR) to retain large particles to which bacteria

could potentially be attached. Each filters were immersed in 4.95 mL of sterile seawater (seawater 0.2  $\mu\text{m}$  filtered), fixed with 50  $\mu\text{L}$  glutaraldehyde Grade I, and then treated according the same protocol than for free-living bacteria until FCM analyses.

All samples were thawed at ambient temperature before FCM counts. Particle-attached bacteria were released from the filters by 15 s sonication in 5 mL of sodium pyrophosphate (2 mM, Sigma) prior to FCM analysis (Lapoussière et al., 2011). All samples were then filtered on 53  $\mu\text{m}$  to reduce particles background and diluted in a solution of TE buffer ( $C_f = 0.1\%$ , 10 mM Tris, 1 mM EDTA, Sigma) and SYBR-Green I ( $C_f = 0.01\%$ , Molecular Probes Inc) in a final volume of 5 mL to reach countable amount of bacteria, according to Marie et al. (1997) and Belzile et al. (2008). Samples were placed 15 min in the dark in a 80°C water bath to optimize the staining (Marie et al., 1999).

After 30 min cooling at room temperature, 2 mL subsamples were read in duplicates during two minutes, at a calibrated flow rate of 14.397  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ , on a FACSCalibur flow cytometer (Becton and Dickinson, San Jose, CA), equipped with a 488 nm argon laser.

The side angle light scatter (SSC) and the green fluorescence (FL1;  $\lambda = 607 \text{ nm}$ ) were used as proxy of the cell size (Troussellier et al., 1999) and of nucleic acid content (Marie et al., 1997), respectively. Characterization and dissociation of bacteria with high (HNA) and low (LNA) nucleic acid contents were based on the SSC/FL1 ratio (Lapoussière et al., 2011; Lebaron et al., 2001).

#### b) Taxonomic diversity

Taxonomic diversity of bacterial community was determined in each mesocosm at days 0, 2, 4, 8, 10 and 12 using polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis (PCR/DGGE) (Schäfer and Muyzer, 2001).

One litre of water from each mesocosm was filtered in triplicates on PVDF filters (0.2  $\mu\text{m}$  pore-sized,  $\varnothing$  47 mm, Durapore filters) and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  before further molecular analyses.

To extract DNA, filters were cut and incubated 45 min with 840  $\mu\text{L}$  of lysis buffer (EDTA 40 mM, TRIZMA base 50 mM, sucrose 0.75 M, pH 8) and 50  $\mu\text{L}$  of lysozyme ( $C_i = 20 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) in a  $37^{\circ}\text{C}$  water-bath. Then 100  $\mu\text{L}$  of 10 % SDS and 10  $\mu\text{L}$  of Proteinase K ( $C_i = 20 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) were added to the mix before incubation at  $55^{\circ}\text{C}$  for 1 h. Then 800  $\mu\text{L}$  of phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1) were added to the mix before a centrifugation step of 10 min at 12000 rpm (rotation per minute). The resulting aqueous phase was then collected and the previous extraction step was repeated. Then, chloroform-isoamyl alcohol (24:1) was added in equivalent volume of the resulting aqueous phase and centrifuged 10 min at 12000 rpm. 500  $\mu\text{L}$  of isopropanol 100 % were added to the final collected aqueous phase, and samples were placed 2 h at  $-20^{\circ}\text{C}$  to precipitate DNA. The total extracted DNA was collected after a centrifugation of 30 min at 13200, and 500  $\mu\text{L}$  of ethanol 70 % were added to the resulting pellet. After 20 min centrifugation at 13200 rpm and ethanol discarded, 100  $\mu\text{L}$  of EB buffer (10 mM Tris-Cl, pH 8.5, QIAGEN) and 5  $\mu\text{L}$  of RNase ( $C_i = 10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) were added to conserve only the DNA. Samples were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until further PCR amplifications.

Both DNA concentration and purity were assessed by spectrophotometry, using a Nanovue system (Biochrom), reading the absorbance at 260 nm (DNA), 270 nm (phenol) and 280 nm (proteins). Protein and phenol contaminations were respectively checked by both 260/280 (Lemarchand et al., 2005) and 260/270 ratios (Planken et al., 2005).

16S rDNA amplification was achieved using the following set of primers: 907R (5'-CCGTCA-ATT-CMT-TTG-AGT-TT-3') and 341F-GC (5'-CGC-CCG-CCG-CGC-CCC-GCG-CCC-GTC-CCGCCG-CCC-CCG-CCC-GCC-TAC-GGG-AGG-CGA-CAG-3') (Schäfer and Muyzer, 2001). Amplification reaction was made in a final volume of 50  $\mu\text{L}$  containing 1X PCR buffer (QIAGEN), 200  $\mu\text{M}$  dNTPs (QIAGEN), 50 pmol of each primers



(QIAGEN), 1 U of HotStar Taq polymerase (QIAGEN), and 200 ng of DNA in water. All samples were amplified in triplicates to avoid PCR bias on taxonomic diversity of the community (Perreault et al., 2007). PCR amplification cycles consisted of a first denaturation step at 94°C for 15 min, followed by 20 cycles of 1 min denaturation at 94°C, 1 min primers hybridization at 65°C (with a decrease of 0.5 °C at each cycle, called “touch-down”) and 3 min elongation at 72°C. Then 15 cycles of 1 min denaturation at 94°C, 1 min primers hybridization at 55°C and 3 min elongation at 72°C were performed before a final elongation step at 72°C for 7 min.

Triplicate amplicons were then pooled and purified with the MinElute<sup>®</sup> purification column (QIAGEN), following the manufacturer’s instructions. Samples were stored at -20 °C until further analyses. DGGE migrations were performed using a DGGE-4001-Rev-B system (C.B.S. Scientific Company, CA, USA). Briefly, bacterial richness was revealed on a 6% (acrylamide/bisacrylamide) (37.5:1) gel, in a 20-80 % denaturing gradient, after a 16 h migration at 100 V (Schäfer and Muyzer, 2001). Gels were then stained with a half-diluted solution of SYBR-Gold (10,000x, ThermoFisher) for 1 h according to the manufacturer’s instructions. Gels were photographed under UV light using a AlphaImager<sup>®</sup>HP system (AlphaInnotech) and DGGE profiles were analysed using Phoretix 1D Pro software (Nonlinear Dynamics, Newcastle upon Tyne, UK).

### c) Bacterial production

Bacterial production was estimated in each mesocosm at days 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 and 14 by measuring incorporation rates of tritiated-thymidine ( $H^3$ -TdR), using an incubation and filtration protocol based on Fuhram and Azam (1980, 1982).

20 mL water sub-samples were transferred from glass Erlenmeyers to two sterile glass vials, and identified as "measure" and "blank". In all "blank" vials, 0.2 mL of formaldehyde 37 % were added, immediately after the sampling to stop all biological activities. Then 1 mL of

$H^3$ -TdR solution (4  $\mu$ M), prepared from commercial solution (63 Curie.mmol<sup>-1</sup>; 1 mCurie.mL<sup>-1</sup>, 10  $\mu$ M  $H^3$ -TdR, MPBiomedical), was added in all "measure" and "blank" vials. Samples were incubated 2h30 min at 8°C and then 0.2 mL of formaldehyde 37% were immediately added in all "measure" vials. Bacteria were then collected by filtration ( $\varnothing$  25 mm; 0.2  $\mu$ m porosity) and filters treated according to Fuhram and Azam (1980, 1982).  $H^3$ -TdR incorporation was measured using a scintillation counter (Beckman LS5801) and results were expressed in dpm (disintegration per minute). "Blank" values were subtracted to "measure" values to remove background radioactivity.  $H^3$ -TdR incorporation rates were converted in mole of  $H^3$ -TdR incorporated per unit of volume and time. Then moles of incorporated  $H^3$ -TdR were converted to cell produced, using the TCF factor (thymidine conversion factor =  $2 \times 10^{18}$  cells.mol<sup>-1</sup>  $H^3$ -TdR) (Bell, 1993). Then the CCF factor (carbon conversion factor =  $2.50 \times 10^{-8}$  carbon.cell<sup>-1</sup>) (Bell, 1993) allowed the conversion from cell produced to amount of carbon produced by unit of volume and time. Total bacterial abundance were combined to bacterial production data to calculate specific bacterial production (Bell, 1993).

### 1.3.3 Statistical analysis

The three treatments were analysed by pairs during the three succession periods: pre-bloom (day 0 to day 4), bloom (day 4 to day 10), post-bloom (day 10 to 14). Multivariate ANOVA of repeated measures were used to evaluate the significance of the differences in bacterial abundance and production rates observed in the three treatments. Daily measures of bacterial production as well as abundance (for free-living, particle-attached and HNA bacteria) were integrated and the difference between treatments was analysed with one way ANOVA. All statistical analyses were performed with the R studio software. Analysis of DGGE gels was performed with the Phoretix 1D Pro software (Nonlinear Dynamics, Newcastle upon Tyne, UK) producing similarity matrices based on Jaccard coefficient similarity indices.

## 1.4 RESULTS

### 1.4.1 Bacterial abundance

#### a) Free-living bacteria

Total and HNA cells abundance were determined daily in each treatment throughout the experiment.

In Control mesocosms, total free-living bacteria abundance (TFB) increased at the beginning of the experiment, from  $1.94 \times 10^6$  cells.mL<sup>-1</sup> to  $4.85 \times 10^6$  cells.mL<sup>-1</sup>, from day 0 to day 4, respectively (Figure 5) (Annex 2). From days 5 to 10, TFB decreased from  $4.07 \times 10^6$  cells.mL<sup>-1</sup> to  $0.49 \times 10^6$  cells.mL<sup>-1</sup> and remained stable until day 14.

In both Chronic and Acute treatments, day-to-day variations in TFB abundance were similar to those occurring in the Control ( $p > 0.05$ ) (Annex 2). By the end of the experiment, significant differences between Chronic treatment and Control were observed from day 11 to day 14 ( $p < 0.009$ ).

In all treatments, the abundance of free-living HNA bacteria (HNA-F) varied according to TFB abundance (Figure 5) (Annex 2). In the Control, as well as in Chronic and Acute treatments, HNA-F was the dominant sub-population, as their percent contribution to TFB remained >50% during the whole experiment. During the last 4 days of the experiment, HNA-F abundance in the Control were significantly lower than in Chronic ( $p < 0.003$ ) and Acute ( $p < 0.03$ ) treatments.

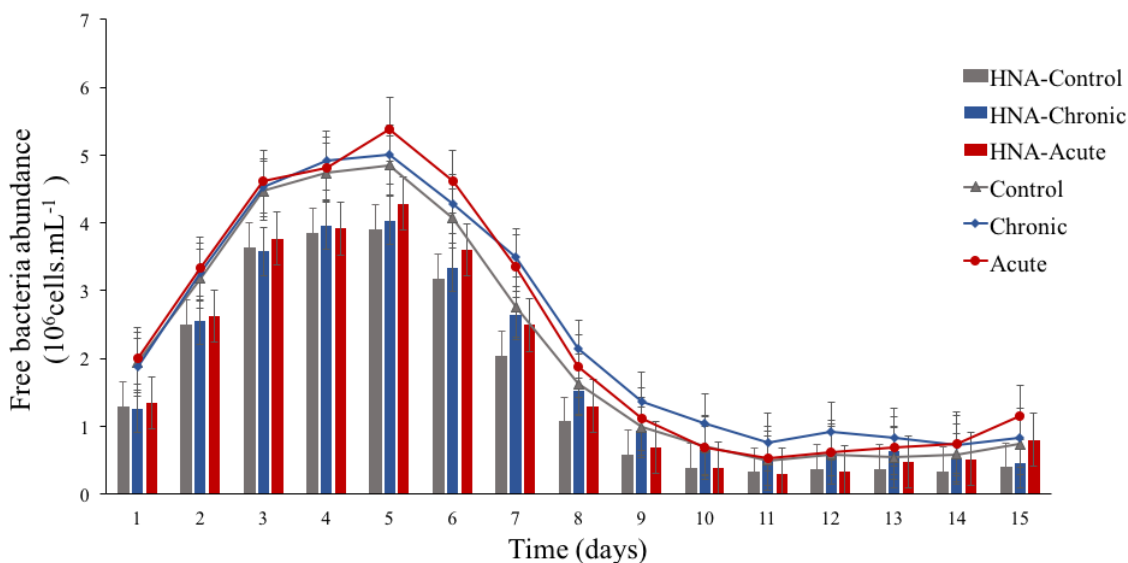


Figure 5: Mean abundance ( $\times 10^6$  cells.mL<sup>-1</sup>  $\pm$  SD) of total free-living bacteria (TFB; lines) and of HNA free-living bacteria (HNA-F; bars), in Control, Chronic and Acute treatments. Vertical bars represent standard deviation (n=3 mesocosms per treatment).

#### b) Particle-attached bacteria

In Control mesocosms, the total abundance of particle-attached bacteria (TAB) increased at the beginning of the experiment, from  $1.48 \times 10^4$  cells.mL<sup>-1</sup> to  $9.50 \times 10^4$  cells.mL<sup>-1</sup>, from day 0 to day 4, respectively (Figure 6) (Annex 3). Between days 5 and 10, the abundance of TAB remained around  $8.62 \times 10^4$  cells.mL<sup>-1</sup> without significant temporal variations. By the end of the experiment (days 11 to 14), a high day-to-day variability was observed but TAB abundance globally increased in Control mesocosms to reach  $9.42 \times 10^4$  cells.mL<sup>-1</sup> at day 14.

From days 0 to day 4, TAB abundance were very variable in Chronic and Acute treatments (Figure 6), but they globally increased further (Chronic:  $1.78 \times 10^4$  cells.mL<sup>-1</sup> at day 0 to  $6.05 \times 10^4$  cells.mL<sup>-1</sup> at day 4; Acute:  $2.21 \times 10^4$  cells.mL<sup>-1</sup> at day 0 to  $10.43 \times 10^4$  cells.mL<sup>-1</sup> at day 4).

In the Chronic treatment, high TAB abundance was observed at day 6 ( $15.96 \times 10^4$  cells.mL<sup>-1</sup>), followed by a decrease at day 8 ( $5.8 \times 10^4$  cells.mL<sup>-1</sup>). Then, TAB abundance were very variable from day 9 until the end of the experiment, but globally increased to reach  $16.3 \times 10^4$  cells.mL<sup>-1</sup> at day 14.

In the Acute treatment, TAB abundance were highly variable between day 5 and day 10 (Figure 6). An increase was observed at day 6 ( $12.65 \times 10^4$  cells.mL<sup>-1</sup>), followed by a decrease at day 7 ( $5.58 \times 10^4$  cells.mL<sup>-1</sup>) and a second increase at day 8 ( $10.46 \times 10^4$  cells.mL<sup>-1</sup>). TAB abundance then decreased until day 10 ( $4.04 \times 10^4$  cells.mL<sup>-1</sup>) and globally increased from day 11 to the end of the experiment.

Despite a great day-to-day variability, TAB abundance were significantly higher in the diesel-contaminated treatments than in the Control, from days 11 to 14 ( $p < 0.001$ ).

The abundance of particle-attached HNA bacteria (HNA-A) varied differently in the Control and in the diesel contaminated treatments (Figure 6) (Annex 3). From days 11 to 14, HNA-A were significantly less abundant in the Control than in both Chronic ( $p < 0.001$ ) and Acute ( $p < 0.006$ ) treatments.

Between days 0 and 10, HNA-A abundance remained low and were not the major sub-population in the Control and in both diesel treatments (Figure 6) (Annex 3). At that time, the percent contribution of HNA-A (%HNA-A) to TAB abundance remained below 50%. From day 10 to day 14, HNA-A cells followed the TAB abundance increase and became the major sub-population in all treatments, with higher %HNA-A in Chronic (73%) and Acute (63%) treatments than in the Control (52%).

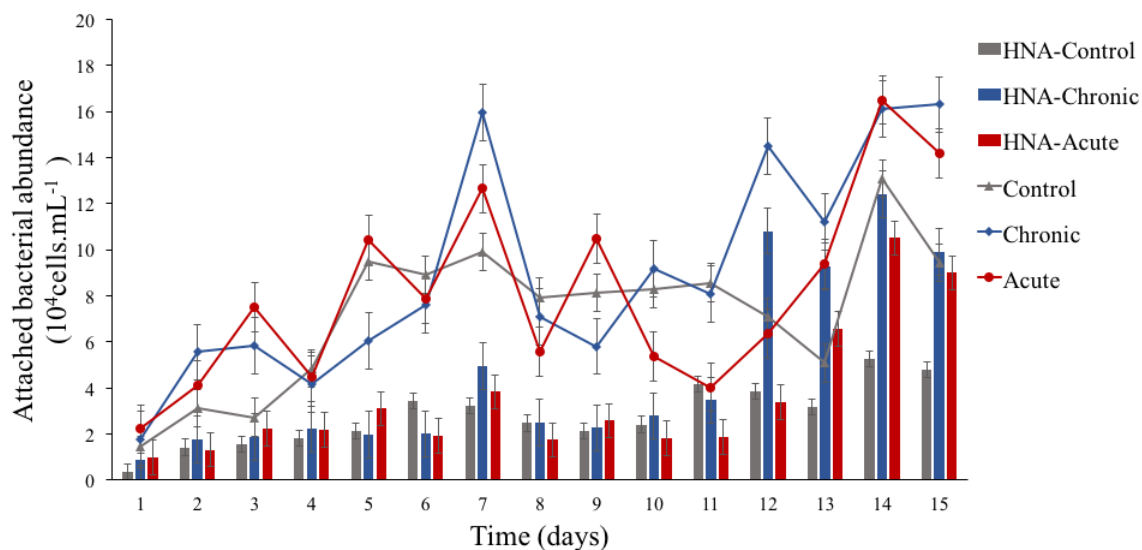


Figure 6: Mean abundance ( $\times 10^4$  cells.mL<sup>-1</sup>  $\pm$  SD) of total particle-attached bacteria (TAB; lines) and of particle-attached HNA bacteria (HNA-A; bars) in Control, Chronic and Acute treatments. Vertical bars represent standard deviation (n=3 mesocosms per treatment).

### c) Integrated biomass

In each mesocosm, mean net bacterial accumulation during the whole experiment was estimated by integrating daily abundance for both free-living and particle-attached bacteria (these values being divided by the duration of the experiment, i.e. 15 days) (Figure 7).

No significant differences were observed between net accumulation of total free-living and HNA bacteria in the different treatments (Figure 7, A, B). In contrast, net accumulation of total particle-attached bacteria was significantly greater in the Chronic treatment compared to the Acute treatment and the Control ( $p < 0.004$ ) (Figure 7C). In addition, accumulation of particle-attached HNA bacteria was significantly greater in Chronic ( $p < 0.001$ ) and Acute ( $p < 0.007$ ) treatments than in the Control (Fig 7D).

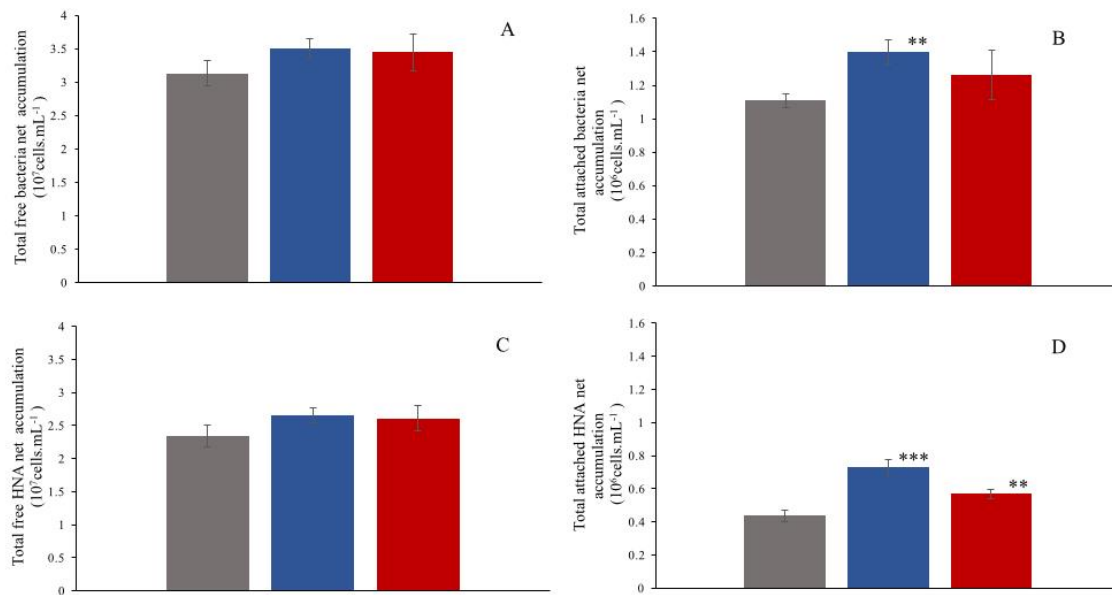


Figure 7: Net accumulation of total free-living (A) and particle-attached (B) bacteria and of HNA bacteria in free-living (C) and particle-attached (D) bacterial communities. Vertical bars represent standard deviation (n=3 mesocosms per treatment) (\*\*\*)  $p < 0.001$  ; \*\*  $p < 0.01$ ).

#### 1.4.2 Bacterial production

Daily values of bacterial production were very variable in the three treatments, and SD remained high all through the experiment period (Table 3). Nevertheless, high bacterial production was recorded in the Acute treatment at days 8 and 10.

Considering the 15 days of the experiment, net bacteria production was significantly greater in the Acute treatment than in the Control ( $p < 0.05$ ) (Figure 8A).

Cell-specific bacterial production was determined based on total bacterial abundance (free-living and particle-attached bacteria), to monitor the average cellular production for each mesocosm throughout the experiment. In all mesocosms, daily cell-specific bacterial

production remained low from days 0 to 6 (Table 3). Cell-specific production increased at days 8 and 10 in the Acute treatment, whereas it remained lower in the Chronic treatment and the Control.

Tableau 3 : Mean bacteria production ( $\text{cells.L}^{-1}.\text{d}^{-1} \pm \text{SD}$ ) and mean cell-specific bacterial production ( $\text{d}^{-1} \pm \text{SD}$ ) in the Control, Chronic and Acute treatments.

Day	Control		Chronic		Acute	
	Bacteria production	Cell-specific production	Bacteria production	Cell-specific production	Bacteria production	Cell-specific production
0	N. A.	N. A.	105.32	$0.02 \pm 0.03$	261.58	$0.05 \pm 0.08$
2	$380.16 \pm 231.67$	$0.06 \pm 0.06$	$372.47 \pm 69.59$	$0.06 \pm 0.05$	$293.20 \pm 167.33$	$0.06 \pm 0.03$
4	$75.17 \pm 73.32$	$0.01 \pm 0.01$	$101.09 \pm 41.90$	$0.02 \pm 0.01$	161.25	$0.01 \pm 0.02$
6	$169.24 \pm 73.29$	$0.06 \pm 0.03$	$210.77 \pm 119.75$	$0.06 \pm 0.03$	$224.63 \pm 122.54$	$0.06 \pm 0.03$
8	$58.73 \pm 67.43$	$0.05 \pm 0.08$	$49.15 \pm 48.19$	$0.03 \pm 0.02$	$157.41 \pm 146.19$	$0.18 \pm 0.2$
10	$158.08 \pm 173.44$	$0.22 \pm 0.33$	$170.83 \pm 127.05$	$0.16 \pm 0.2$	$337.53 \pm 149.05$	$0.64 \pm 0.26$
12	$171.94 \pm 79$	$0.31 \pm 0.07$	$51.98 \pm 67.19$	$0.08 \pm 0.11$	$145.42 \pm 57.78$	$0.22 \pm 0.09$
14	73.77	$0.03 \pm 0.06$	$307.11 \pm 187.73$	$0.4 \pm 0.31$	$165.79 \pm 85.46$	$0.14 \pm 0.07$

Considering the whole 15 days of the experiment, although no significant differences were observed between the treatments ( $p > 0.05$ ), net cell-specific bacterial production was greater in the Acute treatment than in the Control and Chronic treatment (Figure 8B) (N.A. = not available).



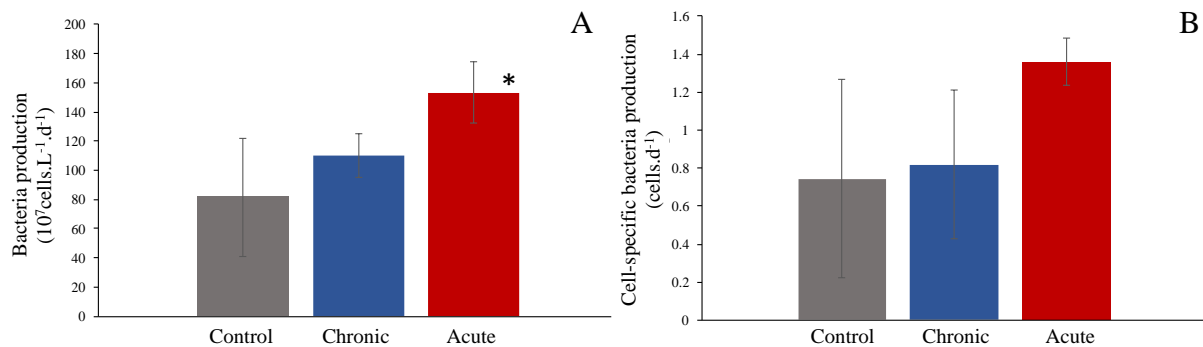


Figure 8 : Net bacteria production (A) and net cell-specific bacterial production (B) in the three treatments. Vertical bars represent standard deviation (n=3 mesocosms per treatment) (\* p <0.05).

### 1.4.3 Bacterial richness

Dendrogram of the DGGE fingerprinting pattern showed the variations of the global bacterial community richness (free-living and particle-attached bacteria) with time and between the treatments (Figure 10). Individual bands on the dendrogram correspond to one Operational Taxonomic Unit (OTU), and their intensity is an indication of their contribution to the bacterial richness. Thicker bands are considered as majors OTUs, while bands showing less intensity are considered as minor OTUs in the bacterial community (Figure 10).

In Control mesocosms, bacterial community richness increased from 10 Operational Taxonomic Units (OTUs) at day 0 to 20 OTUs at days 2 and 4 (Figure 9). Bacterial richness then decreased to 10 OTUs at day 8, before increasing to 12 OTUs at day 10. Finally, bacterial richness dropped to 5 OTUs at day 12.

A different pattern was observed in Chronic mesocosms, where bacterial community richness increased from 11 OTUs at day 0 to the maximal count of 29 OTUs at day 8 (Figure 9). Then bacterial richness decreased to 16 and 12 OTUs at days 10 and 12, respectively.

In turn, in the Acute treatment, bacterial richness increased from 14 OTUs at day 0 to 26 OTUs at day 4 (Figure 9). Then bacterial richness decreased to 18 OTUs at day 8, before reaching 21 OTUs at day 10. Finally, bacterial community richness dropped to 11 OTUs at day 12.

Jaccard coefficient index showed variability of the similarity between the three different treatments throughout the experiment (Table 5). Days prior to diesel injection, similarity between the three treatments was globally >50%. At day 4, similarity between the Control and Chronic treatment (55%) was greater than with Acute mesocosms (47%). At day 8, a very low similarity (13%) was recorded between the Control and the two diesel contaminated treatments. However, Acute and Chronic mesocosms showed 52% of similarity. At day 10, Control and Chronic mesocosms were similar at 65%, whereas the Acute treatment showed 47% similarity with the two others. Finally, at day 12, both diesel treatments showed 53% inter similarity and only 38% similarity with the Control. At days 2 and 4, similar major bands (showing greater intensity) were observed in all mesocosms (Figure 10). However, at days 8 and 10, those major bands had changed and were more intense in both Chronic and Acute treatments than in the Control.

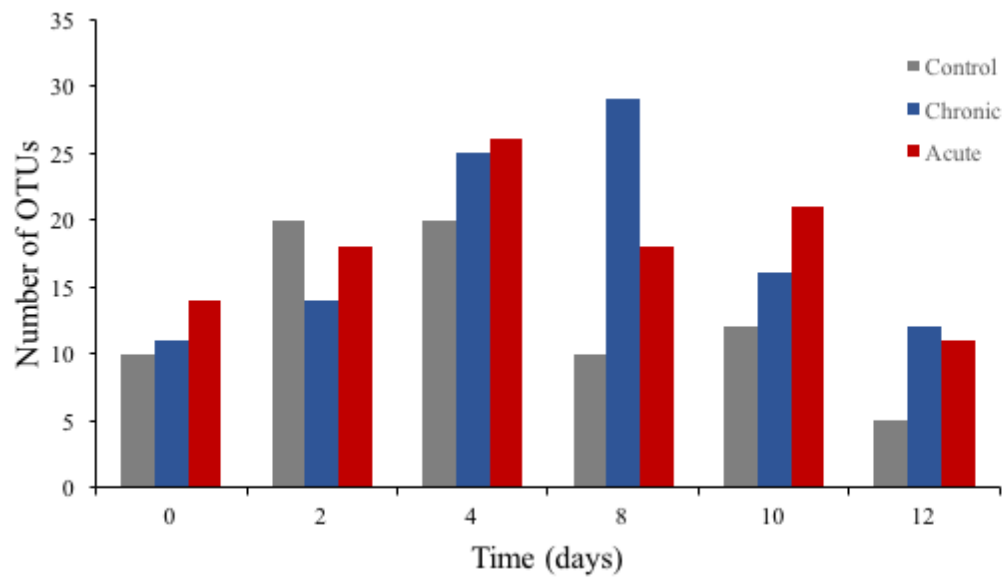


Figure 8 : Average evolution of the bacterial community richness in Control, Chronic and Acute treatments (n=3 mesocosms per treatment).

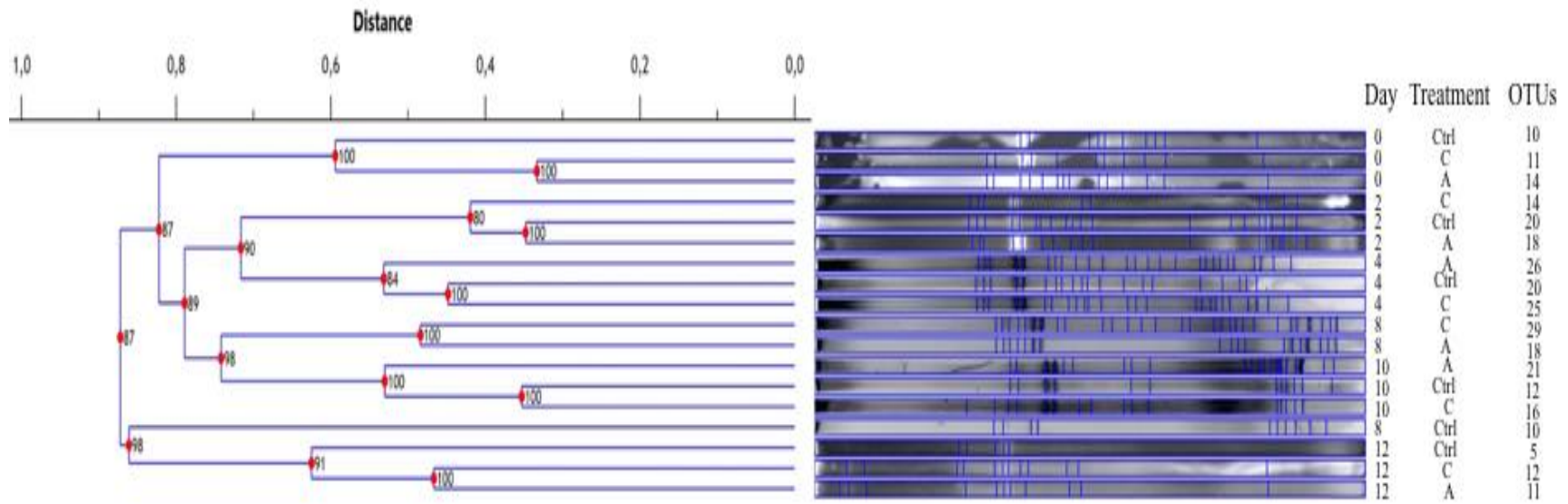


Figure 9: Dendrogram of the DGGE fingerprint patterns of the bacterial community in Control (Ctrl), Chronic (C) and Acute (A) treatments at sampling days 0, 2, 4, 8, 10 and 12.



## 1.5 DISCUSSION

In marine environment, the dynamic and diversity of bacterial communities are regulated by the combination of several biotic (symbiosis, viral lysis, grazing etc.) and abiotic factors (temperature, nutrients availability etc.) (Grossart and Simon, 2007). During the past decades, numerous studies have investigated the effects of hydrocarbons on bacterial community dynamics, since they are the major biological degrader of petroleum components in natural environments. Although it has been reported that different abiotic factors play important role in the bacterial biodegradation (Leahy and Colwell, 1990), few studies have observed the effects of HCs on bacterial population within indigenous planktonic communities. However, trophic interactions between bacteria and other planktonic organisms might also influence the biodegradation of HCs (Sauret et al., 2015). Therefore, the aim of this study was to monitor the development of the bacterial community within the natural planktonic community, in response to chronic and acute diesel contamination, under controlled conditions.

### 1.5.1 Dynamic of the bacterial community during the phytoplankton succession

At the beginning of the experiment (from day 0 to day 4), prior to the bloom development, the total bacterial abundance (free-living and particle-attached populations), increased in the Control. Free-living bacteria represented the main fraction of the bacterial community (around  $10^6$  cells.mL<sup>-1</sup>), while particle-attached bacteria (around  $10^4$  cells.mL<sup>-1</sup>) represented less than 10% of the community. Similar patterns have been observed during the pre-bloom period, in other mesocosms studies focusing on bacterial dynamic under uncontaminated bloom (Smith et al., 1995; Riemann et al., 2000; Ferreyra et al., 2006). Simultaneously to the bacterial abundance increase, both total bacterial production and community richness increased until day 4, demonstrating a rapid development of the bacterial community. The

concentration of nutrients in the mesocosms (Annex 5) were sufficient to allow the growth of all planktonic groups with only limited competition for resources (Legendre and Rassoulzadegan, 1995). Increase of bacteria populations at the beginning of the experiment might also be the result of cellular lysis from micro- and phytoplankton cells during the mesocosms filling (Landa et al., 2013).

At day 4, the biomass increased as phytoplanktonic cells grew (Annex 4) and led to nitrates depletion at day 6. Such low nitrate concentrations usually increase the competition between heterotrophic bacteria and phytoplankton ((Howarth, 1988; Legendre and Rassoulzadegan, 1995). This may explain the observed reduction of 80 % of free-living bacteria abundance during the bloom (from day 4 to day 8), while particle-attached bacteria remained stable throughout the bloom period. Riemann et al. (2000) also observed a reduction of free-living bacteria and low variations in particle-attached bacterial abundance during a diatom bloom in similar experimental conditions.

Aggregation of bacteria as well as their attachment to phytoplanktonic particles could explain the stability of particle-attached bacteria population during the phytoplankton growth cycle. As a response to stress induced by nutrient limited conditions, phytoplanktonic cells would excrete more surface-bound polysaccharides, which constitute a substrate-rich microhabitat and is usually considered as “hot-spot” for bacterial colonization and growth (Buchan et al., 2014). In return, phytoplankton would benefit from bacterial products such as remineralised nutrients, vitamins and other growth factors (Azam and Smith, 1991). Such exchanges between bacteria and algae has been previously reported during phytoplankton blooms (Grossart and Simon, 2007). Moreover, although the use of  $\text{NH}_4$  as a source of N has not been measured in this experiment, it might have allowed the development of particle-attached bacteria, despite the  $\text{NO}_3$  depletion. On the opposite, free-living bacteria would not have

benefit of such an N source, which might explain the decrease of their abundance under the pressure of the high nutrient competition with phytoplankton.

Concomitantly with the decrease of total bacterial abundance, the bacterial richness decreased by ~50 % at day 8 and induced a restructuration of the community, as supported by the change in the dominant OTUs relative to those observed during the pre-bloom (Figure 9). This evolution of the bacterial community demonstrated the selection of highly competitive species, resulting from the conditions prevailing in the mesocosms during the phytoplanktonic bloom (Legendre and Rassoulzadegan, 1995).

The last days of the experiment (from day 9 to day 14), during the decline of the bloom, total and free-living bacterial abundance remained stable. However, particle-attached bacterial abundance were more variable, but globally increased until the end of the experiment, reaching about 20 % of the total bacterial abundance at day 14. In a mesocosm study reproducing a diatom bloom, Riemann et al. (2000) also observed opposed trends of free-living and particle-attached bacterial populations during the breakdown of the bloom, as well as the increase of particle-attached bacteria proportion in the bacterial community. Such increase of particle-attached bacteria population by the end of the planktonic succession could have been supported by both the exudation of polysaccharide by phytoplankton and the increase of detrital organic matter in mesocosms (Buchan et al., 2014; Riemann et al., 2000).

This increase of particle-attached bacteria overlaps the modification of the bacterial community composition, revealed by the development of new OTUs. Studies focusing on planktonic succession in mesocosms, under uncontaminated conditions, have demonstrated that the increase of organic matter during the post-bloom period induced modifications of the bacterial community diversity (Riemann et al., 2000; Riemann and Winding, 2001). Traving et al. (2017) have demonstrated those changes of the bacterial community structure, induced



by the development of new particle-attached bacterial species, was a specific response to the increase of organic matter and its composition.

Surprisingly, the evolution of the cell-specific bacterial production showed low variation during the phytoplanktonic bloom development. In the present study, very high values of the standard deviation, due to major differences between  $H^3$ -TdR incorporation rates in each mesocosm might explain the heterogeneity of bacterial production results. In Control mesocosms, cell-specific production slightly increased at days 10 and 12, during the bloom fading. The increase of detrital organic matter in the mesocosms might have enhanced the bacterial production, resulting in the increase of particle-attached bacterial abundance at day 14. The occurrence of grazing or viral lysis in the mesocosms might explain this mismatch between bacterial production and abundance. While bacterial production was increasing, viral lysis and grazing might have reduced the bacterial abundance and therefore have hidden the increase of bacterial biomass.

However, it is commonly accepted that local bacterial population might favour endogenous TdR, for exogenous  $H^3$ -TdR might be harder to incorporate (Kirchman, 2001). In the present experiment, exogenous  $H^3$ -TdR might have not reached the centre of the numerous aggregates of organic matter, therefore particle-attached bacteria within those structure might have used endogenous TdR for their replication. Therefore, bacterial production rates in this study might have been under estimated, due to a bias of the method. Our bacterial production data did not permit to discriminate respective metabolic activities of free-living and particle-attached bacteria. However, several environmental and mesocosms studies have demonstrated that during phytoplanktonic bloom development, both free-living and particle-attached bacteria communities differ not only by their structure but also by their metabolism rates and should be characterized to deeply understand the bacterial community evolution under natural environmental conditions (Crump et al., 1999; Riemann et al., 2000; Judd et al., 2006).

Our results suggested that the natural evolution of the planktonic community switched from an autotrophic to an heterotrophic food-web along the experiment under uncontaminated conditions, which is consistent with the model of Legendre and Rassoulzadegan (1995). The evolution of the bacterial community during this planktonic succession was probably driven by biotic and abiotic factors such as the trophic link with phytoplankton (mutualism or competition) and inorganic nutrients concentrations. Results obtained in Control mesocosms are in agreement with the common literature and demonstrated that the phytoplanktonic succession occurring in this experimental set-up was similar to the natural expected pattern. Those natural-like results would allow us to identify modifications of the SLE bacterial community, in response to both chronic and acute diesel contaminations.

### **1.5.2 Bacterial responses to chronic and acute diesel contaminations**

In addition to the “natural” evolution of the bacterial community during the phytoplanktonic succession described above, specific modifications related to the diesel introduction were observed in the Chronic and Acute diesel contaminated treatments.

Diesel addition induced a significant increase of particle-attached bacteria abundance. In contrast, free-living bacteria abundance showed similar trends to those observed in the Control throughout the whole experiment. It should be noticed that most studies related to the effects of HCs made no distinction between free-living and particle-attached bacterial communities (Gertler et al., 2012; Sauret et al., 2015). Although during this experiment particle-attached bacteria remained the minor component of the whole bacterial community (20-25 %), our data demonstrated that they were highly stimulated by diesel introductions.

In the Chronic treatment, the first introduction of diesel during the pre-bloom period enhanced the increase of particle-attached bacteria. This growth may be attributed to the high nutrient availability, low competition with phytoplankton and dead biomass resulting from the mesocosms filling operation, as previously evidenced in the Control. Diesel introduction during the pre-bloom was the only stress applied to bacterial population that might have taken advantage of the favourable environmental conditions in the mesocosms to grow despite the diesel addition. These results are in agreement with previous studies run in nutrient-enriched mesocosms and microcosms, where diesel introduction led to the continuous increase of total bacterial abundance during 6 to 12 days after the contamination (Canul-Chan et al., 2017; Sauret et al., 2015).

Chronic and Acute diesel additions during the bloom period had different effects on the abundance of particle-attached bacteria. In the Chronic treatment, the second injection induced a reduction of particle-attached bacteria abundance for 48 h, and then particle-attached bacteria abundance were very variable but globally increased until the end of the experiment. However, in the Acute treatment an important variability of particle-attached bacteria abundance was observed 96 h after the contamination. Following this period, particle-attached bacteria finally grew from day 10 until the end of the experiment. The reduction in abundance of particle-attached bacteria after the acute diesel input could be the result of direct HCs toxicity on cells (Atlas, 1995; Macnaughton et al., 1999). The reduction of bacterial populations was probably due to the death of the most sensitive species to HCs, while competitive bacterial populations adapted to these toxic compounds would progressively develop in the mesocosms (Macnaughton et al., 1999). In addition, low nutrient concentrations and high competition with phytoplankton during the bloom might have influenced the particle-attached bacteria dynamics and delayed the development of more diesel-resistant species. The observed reduction of total bacterial abundance (particle-attached and free-living bacteria) in response to the diesel introduction contrasted with the

results of several studies run under nutrient-enriched conditions, that showed an increase of the total bacterial abundance following HCs contaminations (Coulon et al., 2007; Gertler et al., 2012; Sauret et al., 2015).

Integrated daily abundance data showed that particle-attached bacteria accumulation during the whole experiment was significantly greater in the Chronic than in the Acute treatment. Therefore, in addition to biotic and abiotic factors, the contamination nature seems to have influenced the development of particle-attached bacteria after the diesel addition. The progressive introduction of diesel performed in the Chronic treatment might have allowed the progressive adaptation of the SLE bacterial community, leading to the progressive development of ODB and less damaging effects on the global bacterial community. ODB have been identified in environments submitted to chronic HCs contaminations, originating from natural leaks from natural oil reservoirs (Gulf of Mexico, USA) or from anthropic HCs spills (harbours, oil transformation or transportation sites) (American Academy of Microbiology, 2011). The presence of those species demonstrated the adaptation of the indigenous bacterial community to HCs occurrence, by the selection of oil-resistant species able to use them as a source of carbon. In case of a new HCs inputs, ODB would rapidly develop in these bacterial communities, enhancing the biodegradation process (Ortmann and Lu, 2015). Gertler et al. (2012) observed the different responses of indigenous bacterial communities to crude oil contamination on three coastal zones (Irish Sea, North Sea and Mediterranean sites) using similar mesocosms set-up. Unlike the Irish and North Seas studied sites, the Mediterranean site was characterised by greater shipping activities that induced its chronic HCs contamination. At this site, a mature degrading bacterial consortium was established within 3 days after the crude oil contamination, while similar degrading consortia were developed within 6 to 12 days in the two other studied sites. This study demonstrated that chronic exposure to HCs and the adaptation of the bacterial community via the selection of ODB, induced faster development of the degrading consortium. Unlike the Gulf of Mexico

or the Mediterranean Sea, the SLE is considered as poorly adapted to HCs biodegradation, as it is a cold environment where no natural HCs leaks have been recorded. Studies performed in cold environments demonstrated that low temperature delayed the bacterial response to HCs contamination and development of ODB would require several weeks (reviewed in Yang et al., 2009). This time laps of the bacterial response is mainly due to the reduced cellular metabolism in cold environments (Nedwell, 1999). During our experimentation, the SLE indigenous bacterial community responded to chronic and acute diesel contamination within two weeks, demonstrating that this community is able to rapidly adapt to the presence of HCs. In agreement with the previous studies detailed above, the contamination nature significantly influenced the bacterial response, for particle-attached bacteria abundance was greater in the Chronic than in the Acute treatment.

In addition, the enhanced abundance of particle-attached bacteria in both contaminated treatments could be an indirect effect of diesel introduction and environmental conditions in the mesocosms. As shown in the Control, the development of particle-attached bacteria during the bloom might have been enhanced by the increase of phytoplankton exudates, used as a source of carbon by bacterial populations (Azam and Smith, 1991). Such compounds are recognized to promote the formation of particle aggregates and to stimulate particle-attached bacteria development, for they offered shelter from grazing (Cho and Azam, 1988) as well as nutrients for bacterial development (Smith et al., 1992).

As an indirect effect on bacterial community, diesel toxicity might be responsible for the accumulation of dead cells in the mesocosms that could have favoured the development of particle-attached bacteria. Previous studies have demonstrated that phytoplanktonic cells might excrete more polysaccharide exudates in various stressing conditions, such as nutrients depletion (Buchan et al., 2014; Annane et al., 2015) but also due to pollutants, as shown in the Gulf of Mexico by Passow et al. (2012; 2014). In our experiment, abundant aggregates and detrital phytoplankton cells were observed in contaminated mesocosms by microscopy

analyses (Michel Starr, personal communication). This accumulation of large detrital materials could partly explain the greater accumulation of particle-attached bacteria in the Chronic than in the Acute treatment.

The results obtained during this study demonstrated that 1) biotic factors should be further considered in order to deeply understand the bacterial ability to degrade HCs in complex marine ecosystems and 2) particle-attached bacteria were significantly stimulated by diesel introduction and could be major drivers of HCs biodegradation. This demonstrated that total bacterial abundance is not precise enough, and both free-living and particle-attached bacteria dynamics should be investigated to better evaluate the effects of hydrocarbons on the bacterial community.

Significant effects of diesel contamination on the bacterial community production were observed only in the Acute treatment, where cell-specific bacterial production increased at day 8 and 10, shortly after the acute contamination. In their mesocosms study, Sauret et al. (2015) also recorded higher bacterial production under diesel-polluted nutrient-enhanced conditions, thus demonstrating a stimulatory effect of diesel on bacterial production.

However, as in Control mesocosms, the increase of the bacterial production in the Acute treatment is mismatching with the particle-attached abundance, which decreased at day 8 and 10. As previously explained, viral lysis and/or grazing might have reduced the newly produced bacterial biomass. But as previously demonstrated, particle-attached bacteria represented only 20 - 25 % of the total bacterial community at the beginning of the experiment. Therefore, increase of their specific production might have been hidden by the stability of free-living bacteria, which remained the major component of the global bacterial community (75 - 80 %). Bacterial production of these two groups needs to be discriminated to better understand effects of diesel on these assemblages, which was not within the scope of this study. Thus,

total bacterial abundance could be mainly composed of inactive cells, with low production rates, and fewer bacteria with greater production rates.

Bacterial community might also be characterized by the proportion of HNA cells within the community (Lebaron et al., 2001). FCM analysis enables the characterization of cells nucleic acid content, using the ratio between cell size and its fluorescence to distinguish between HNA and LNA bacteria. A high proportion of HNA cells in the community might be used as a proxy of a high proportion of active cells in the population. Since FCM can not allow to discriminate between DNA and RNA, the increase of HNA cells could reflect 1) an increase of the cell replication or 2) a greater transcriptional activity of new settling populations, potentially producing specific degradation enzymes (Haritash and Kaushik, 2009; Hazen et al., 2010; Mason et al., 2012). Even if the use of HNA as a proxy of microbial activity is controversial among the microbial ecology scientific community (Sherr et al., 2006), this proxy was used in the present study to mainly compare the structure of the bacterial community in the different treatments. The free-living bacteria community was dominated by large HNA cells throughout the 15 days experiment, with no significant effects of diesel. However, variations in abundance of particle-attached bacteria came with the evolution of its HNA/LNA ratio. Before the post-bloom period, during the increase of particle-attached bacteria abundance, LNA cells remained dominant in the bacterial population (>60%). Nevertheless, at the end of the experiment, we observed a strong increase in abundance of particle-attached HNA bacteria, accounting for >70 % of the community. These results demonstrated a clear evolution of particle-attached bacteria community, shifting from LNA to HNA cells bacteria dominance.

Effects of the diesel introduction on the bacterial community were detected by day 8, more than 48h after chronic and acute contaminations. These results are similar to the observation reported in the literature where HCs impacts on bacteria are usually observed within 6-12

days after the contamination (Atlas, 1995; Gertler et al., 2012). In addition, in cold environments, such as in the SLE, the response of bacterial communities might be longer than in temperate ecosystems (Atlas and Bartha, 1972; Yang et al., 2009; Bargiela et al., 2015), as low temperatures reduce the bacterial metabolism (Nedwell, 1999) and increased HCs toxicity (Leahy and Colwell, 1990). At day 8, the greater bacterial richness in the Chronic treatment (29 OTUs) than in the Acute treatment (18 OTUs) could be an effect of the diesel contamination type. The acute contamination might have induced a rapid and strong selection of resistant species and accelerated the decrease of sensitive bacteria in the community (Head et al., 2006), while chronic introductions of diesel might have reduced the selection of resistant species by allowing the development of other populations than ODB, not much affected by low diesel concentrations. The prior adaptation to low diesel concentration might have contributed to the temporal stability of sensitive species after the second contamination.

During the last days of the experiment, both Chronic and Acute treatments showed similar decreases in bacterial richness. Nevertheless, total OTUs in diesel treatments remained higher than in the Control. This result is in agreement with the literature and demonstrate that bacterial community of the SLE is able to rapidly adapt to diesel contamination (Bargiela et al., 2015; Gertler et al., 2012). Most interestingly, several specific OTUs were only observed in the diesel contaminated samples. Development of such specific bacterial community in diesel contaminated mesocosms strongly supports the hypothesis of a selection of ODB in the SLE indigenous community (Gertler et al., 2012; Röling et al., 2002; Viggor et al., 2013). The evolution of the SLE bacterial community richness could be the result of 1) the selection and subsequent growth of ODB bacteria within the bacterial community and/or 2) to the deleterious effects of diesel on more sensitive planktonic species (Head et al., 2006; Dash and Mangwani, 2013).



The results of this study provided the first observation of the evolution of the SLE bacterial community in response to diesel contamination, during a complete planktonic succession cycle. These results demonstrated that despite low temperature and nutrient depletion, the assumed non-adapted indigenous community responded to diesel contamination within two weeks. This response was mainly driven by particle-attached bacteria, which were stimulated by both chronic and acute diesel contamination, and by the negative effects of diesel on phytoplankton. Abundance of particle-attached bacteria were greater in Chronic than in Acute treatment, and this observation further demonstrated the importance of adaptation to HCs in the bacterial response to petroleum spill. results of this study demonstrated the importance of particle-attached populations within the bacterial community dynamics, but also the significance of trophic interactions in the bacterial responses to HCs. Finally, the development of specific OTUs in diesel contaminated mesocosms suggests the development of ODB, that should be confirmed by genomic analysis of archived samples. Further studies should investigate the biodegradation potential of the indigenous bacterial community under similar experimentally controlled conditions, i.e. considering both free-living and particle-attached bacteria in interaction with the global planktonic community. Finally, the biodegradation potential of the whole SLE bacterial community should be investigated in winter conditions, to better evaluate the resilience capacities of this ecosystem in case of HC spills under the seasonal perspective.

## CONCLUSION GÉNÉRALE

Les résultats de cette étude ont permis de mettre clairement en évidence pour la première fois, les effets du diesel maritime sur la communauté bactérienne naturelle de l'ESL et ont apporté de nouvelles informations essentielles à la compréhension des effets des hydrocarbures sur la communauté bactérienne indigène.

L'objectif principal de cette étude était d'observer les effets de deux types de contamination au diesel maritime, l'une chronique l'autre aiguë, sur la communauté bactérienne de l'ESL lors de la succession planctonique. L'ensemble des résultats de cette étude a démontré une rapide évolution de la communauté bactérienne indigène sous l'effet du diesel quel que soit le type de contamination. En effet, après seulement 15 jours d'incubation à une faible température (8°C), une modification significative de la structure de la communauté bactérienne, en termes d'abondance et de diversité des populations, a pu être observée en réponse aux contaminations chronique et aiguë de diesel. En milieu marin, la température est un facteur abiotique qui limite grandement la dégradation des hydrocarbures et il est clairement démontré qu'en milieu froid, le métabolisme bactérien est réduit ce qui diminue les capacités d'adaptation et la capacité de biodégradation potentielle des populations microbiennes en présence d'hydrocarbures. Cependant, les résultats de cette étude ont permis de démontrer que la communauté bactérienne de l'ESL, supposée non-adaptée à la présence d'hydrocarbure, est capable de répondre rapidement à l'introduction de diesel.

Les résultats obtenus au cours de cette étude ont démontré que les contaminations chroniques et aiguës au diesel maritime induisent des réponses différentes de la communauté bactérienne. Ces résultats sont en accord avec les données de la littérature et valident l'hypothèse 3, selon laquelle le type de contamination influence la réponse de la communauté

bactérienne. Le suivi de l'abondance des bactéries attachées a permis de mettre en évidence une diminution temporaire plus importante de ces populations, en réponse à une contamination aiguë par rapport à celle observée dans le cas d'une contamination chronique. A l'inverse, les contaminations chroniques ont eu moins d'effets négatifs, et ont permis une accumulation nette plus importante des bactéries attachées dans ces mésocosmes au cours de cette expérience. Ces résultats démontrent clairement l'influence des conditions d'introductions des hydrocarbures sur la réponse des communautés indigènes, et s'avèrent essentiels à la compréhension et à l'estimation des capacités de résilience de l'ESL, face à l'augmentation des risques de contaminations chroniques et aiguës.

Le suivi de l'évolution des abondances bactériennes a permis de démontrer que les bactéries attachées jouent un rôle majeur dans la réponse de la communauté indigène face aux contaminations chroniques et aiguës de diesel. Bien que les bactéries attachées ne représentent que 20 à 25% des abondances totales tout au long de l'expérimentation, elles ont été significativement stimulées par les ajouts de diesel, contrairement aux bactéries libres, majoritaires dans la communauté bactérienne (75-80%), dont les abondances n'ont pas été modifiées dans les différents traitements. La majorité des études portant sur les effets des hydrocarbures sur les communautés bactériennes ne différencient pas la réponse des populations de bactéries libres et attachées face à ces contaminations. Les données de cette étude apportent donc de nouvelles informations susceptibles d'élargir notre compréhension des effets des hydrocarbures sur la dynamique des communautés bactériennes marines de l'ESL.

Plusieurs hypothèses sont susceptibles d'expliquer l'augmentation de l'abondance des bactéries attachées observées dans les mésocosmes contaminés au diesel. Tout d'abord, tel que démontré dans la littérature, l'introduction de diesel peut avoir directement stimulé le développement des bactéries attachées. De plus, l'augmentation de la matière organique et des exsudats phytoplanctoniques dans les mésocosmes contaminés, résultant des effets

négatifs du diesel sur ces organismes, peut avoir favorisé le développement des bactéries attachées. Enfin, il est possible que la présence de diesel ait augmenté l'agrégation des cellules planctoniques dans les mésocosmes, ce qui pourrait également avoir favorisé le développement des bactéries attachées. L'ensemble de ces résultats et hypothèses mettent en évidence la complexité de la réponse bactérienne face aux hydrocarbures, et soutiennent l'hypothèse 2 de ce travail, selon laquelle la réponse de la communauté bactérienne face à l'introduction de diesel dépend de plusieurs facteurs environnementaux, qu'ils soient biotiques ou abiotiques. Ces résultats démontrent que pour mieux appréhender la réponse des communautés bactériennes marines face aux déversements d'hydrocarbures, il est essentiel de considérer les différents facteurs biotiques environnementaux susceptibles d'influencer sur la dynamique de ces communautés.

Bien que nos résultats aient clairement démontré l'augmentation de la biomasse nette des bactéries attachées en réponse aux contaminations au diesel, nos données ne nous permettent pas de caractériser plus en détails les effets des hydrocarbures sur le métabolisme de la communauté bactérienne. Au regard des résultats d'abondance, il aurait été intéressant de pouvoir caractériser distinctivement la production des populations de bactéries libres et attachées, afin de pouvoir conclure sur les effets des hydrocarbures sur ces deux populations. Notons que différentes études environnementales, ayant comparé le métabolisme ainsi que la diversité taxonomique des bactéries libres et attachées en absence d'hydrocarbures, ont suggéré que ces populations devraient être considérées comme deux communautés distinctes (Judd et al., 2006; Traving et al., 2017). Néanmoins, ce sujet reste controversé au sein de la communauté scientifique, car les bactéries peuvent être successivement libres dans la colonne d'eau puis fixées à différents substrats, les limites entre les deux populations n'étant pas absolues (Riemann and Winding, 2001).

Les résultats de cette étude ont également permis de mettre en évidence les effets des contaminations au diesel sur l'évolution de la richesse de la communauté bactérienne de l'ESL. Dans les mésocosmes contaminés, l'apparition de nouvelles OTUs a démontré le développement de nouvelles populations spécifiques en présence de diesel (Figure 11). Cette modification de la richesse bactérienne semble résulter de la sélection et à la croissance d'espèces capables de s'adapter rapidement à la présence de diesel, au détriment d'espèces plus sensibles présentant de plus faibles capacités d'adaptation à ce contaminant. Ces résultats sont en accord avec les données présentes dans la littérature, et valident l'hypothèse 1 de ce travail, selon laquelle la présence d'hydrocarbures entraîne une modification de la structure des communautés bactériennes indigènes. Ces résultats permettent de supposer que ces nouvelles espèces, présentes uniquement dans les mésocosmes contaminés au diesel, sont des espèces hydrocarbonoclastes. Pour valider cette hypothèse, les échantillons d'ADN bactérien utilisés pour l'analyse des communautés par PCR- DGGE sera analysée par nos partenaires mexicains en vue d'identifier les espèces présence par séquençage Illumina du gène d'ADNr 16S. Ces données complémentaires permettront d'identifier précisément les différentes espèces bactériennes présentes dans les mésocosmes au cours du temps et contribueront à enrichir les connaissances sur la composition de la communauté bactérienne indigène de l'ESL. De plus, ces analyses permettront de confirmer ou d'infirmer le développement de bactéries hydrocarbonoclastes dans les mésocosmes contaminés au diesel. Il nous sera donc possible d'avoir un premier aperçu de la composition du consortium de dégradation, se développant au sein de la communauté indigène de l'ESL en présence de diesel lors de contaminations aiguës et/ou chroniques.

### **Perspectives de recherche**

L'ensemble des données biologiques et chimiques obtenues au cours de ces expériences en mésocosmes, combinées aux données de l'hydrodynamisme de l'ESL, seront utilisées pour

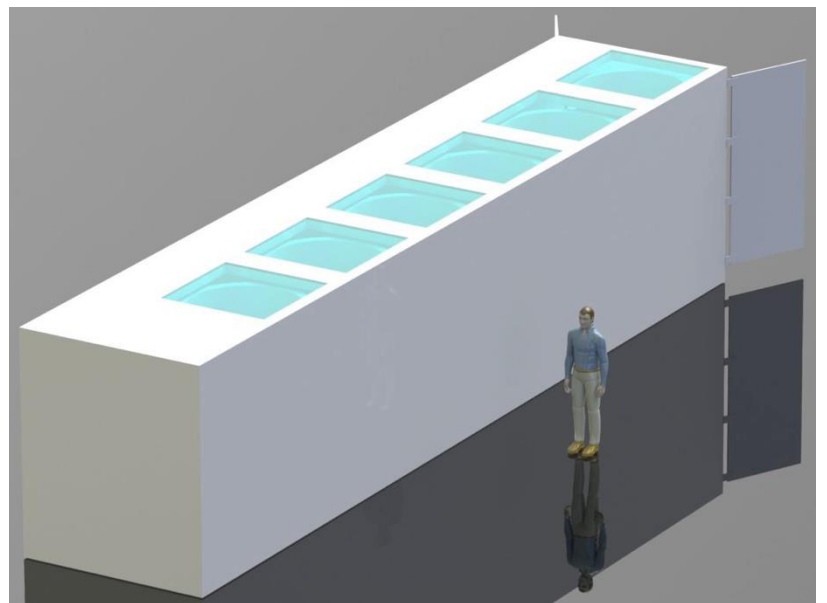
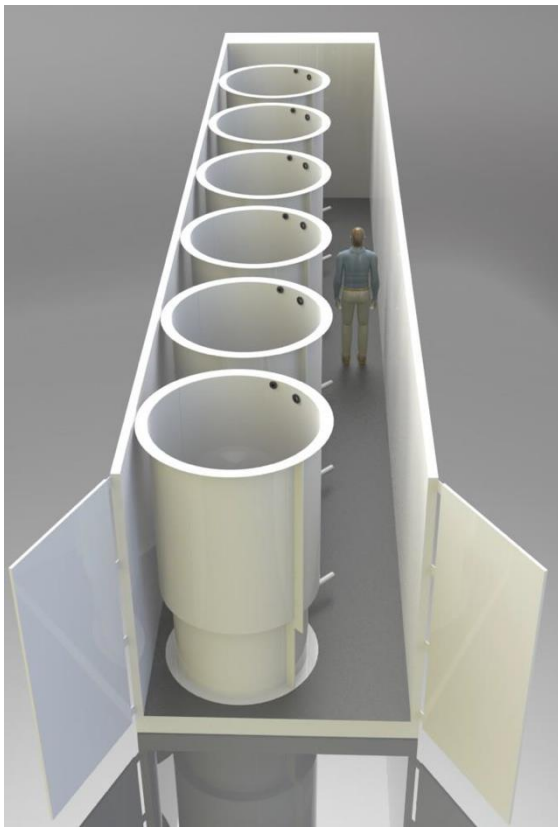
construire un modèle, permettant d'évaluer à plus grande échelle, les conséquences d'un déversement d'hydrocarbures dans l'ESL.

Si l'ensemble des résultats de cette étude ont permis de visualiser de façon globale les effets du diesel sur la structure et le métabolisme de la communauté bactérienne de l'ESL, de nombreuses questions demeurent encore en suspens.

Afin de mieux appréhender les conséquences de déversements d'hydrocarbures dans l'ESL, il est essentiel d'estimer la capacité de biodégradation de la communauté bactérienne indigène. Pour analyser l'avancement de la biodégradation, il faudrait maintenir les mésocosmes pendant plus de 15 jours, en circuit ouvert pour ne pas limiter la croissance. Différentes études, dont celles de Siron et al. (1993,1995) dans l'ESL, ont utilisé des systèmes de recirculation de l'eau dans les mésocosmes, pour suivre l'évolution d'une communauté pendant plusieurs semaines. Plusieurs études utilisant des mésocosmes ont utilisé une supplémentation en nutriments au cours du temps afin de limiter les effets d'une limitation en nutriments sur le développement de la communauté planctonique. Afin d'observer les effets des hydrocarbures à plus long terme et d'obtenir plus de données sur la capacité de biodégradation de la communauté bactérienne indigène, il serait intéressant de pouvoir suivre l'évolution de l'ensemble de la communauté bactérienne jusqu'à la biodégradation complète des hydrocarbures. Considérant l'importance des variabilités saisonnières dans l'écosystème du Saint-Laurent et face aux importants risques de déversements, il serait essentiel de caractériser l'évolution de l'ensemble de la communauté bactérienne en présence d'hydrocarbures dans des conditions expérimentales proches des caractéristiques saisonnières de l'ESL. Ces données sont aujourd'hui essentielles pour pleinement évaluer les capacités de résilience de l'ESL, en période estivale comme hivernale.

Bien que les résultats de cette étude ont permis de démontrer l'influence des facteurs biotiques environnementaux sur la réponse de la communauté bactérienne face aux contaminations de diesel, d'autres paramètres biotiques tels que les abondances virales et les

taux de broutage n'ont pas pu être considérés. En milieu marin, les processus de régulation top-down (lyse virale et broutage) ont des conséquences importantes sur la dynamique des communautés bactériennes. Quelques études ont démontré que ces facteurs biotiques sont également susceptibles d'influencer la réponse des communautés bactériennes en présence d'hydrocarbures. En fonction des types de déversements (nature et concentration des composés pétroliers, type de contaminations), ainsi que des communautés bactériennes des milieux contaminés (composition, adaptation face aux hydrocarbures), ces processus biologiques pourraient favoriser ou non la biodégradation des hydrocarbures en régulant les populations de bactéries hydrocarbonoclastes. Il est donc essentiel de mieux appréhender les effets de ces processus sur l'évolution des consortia de biodégradation, afin de mieux estimer les capacités de résilience de l'ESL et de développer des modèles prédictifs adaptés aux réalités de cet écosystème.

**ANNEXES**

Annex 1: Schematic representation of the mesocosms set-up (provided by G. Ferreyra).

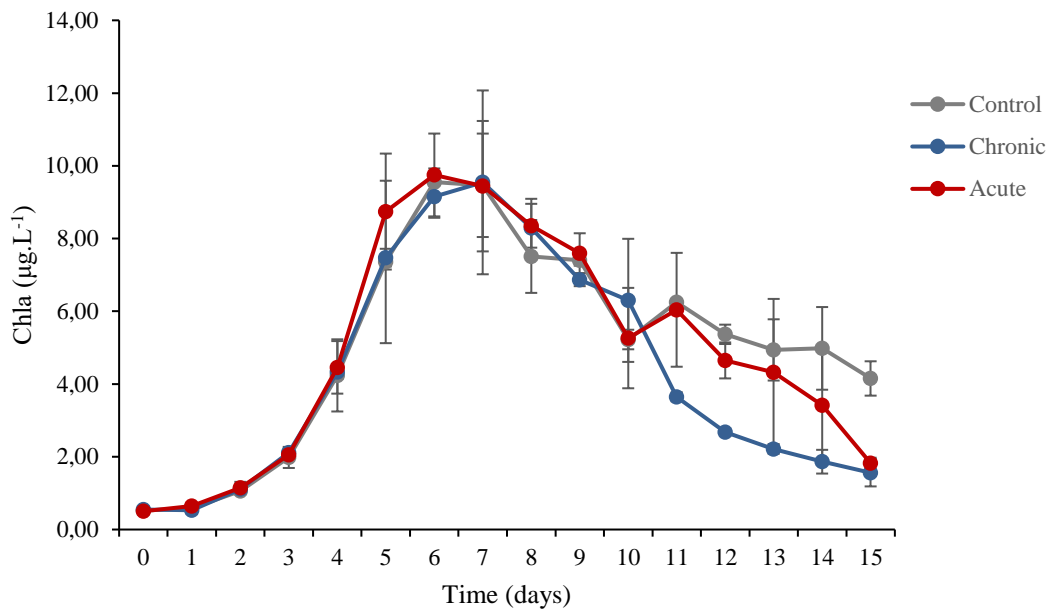


Annex 2: Mean abundance ( $10^6$  cells.mL<sup>-1</sup>  $\pm$  SD) of total free-living bacteria (TFB) and of HNA free-living bacteria (HNA-F), in Control, Chronic and Acute treatments.

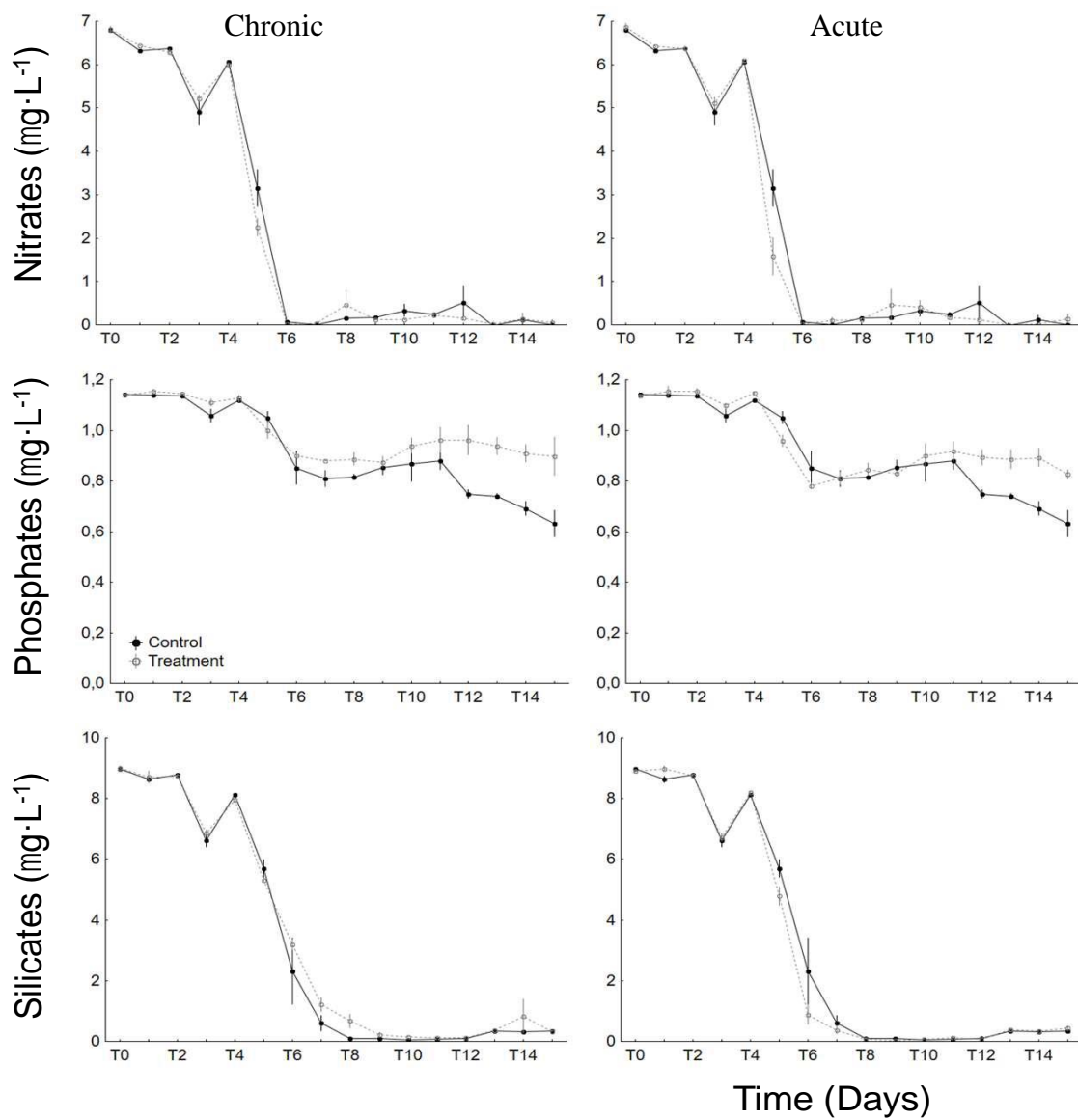
Day	Control		Chronic		Acute	
	TFB	HNA-F	TFB	HNA-F	TFB	HNA-F
0	1.94 $\pm$ 0.05	1.28 $\pm$ 0.02	1.87 $\pm$ 0.03	1.26 $\pm$ 0.04	2 $\pm$ 0.07	1.35 $\pm$ 0.06
1	3.18 $\pm$ 0.18	2.49 $\pm$ 0.18	3.27 $\pm$ 0.09	2.56 $\pm$ 0.04	3.33 $\pm$ 0.15	2.62 $\pm$ 0.13
2	4.47 $\pm$ 0.23	3.63 $\pm$ 0.22	4.52 $\pm$ 0.1	3.58 $\pm$ 0.06	4.61 $\pm$ 0.13	3.77 $\pm$ 0.15
3	4.74 $\pm$ 0.38	3.84 $\pm$ 0.31	4.92 $\pm$ 0.19	3.96 $\pm$ 0.16	4.81 $\pm$ 0.09	3.92 $\pm$ 0.09
4	4.85 $\pm$ 0.3	3.9 $\pm$ 0.3	5.01 $\pm$ 0.19	4.03 $\pm$ 0.21	5.38 $\pm$ 0.11	4.28 $\pm$ 0.05
5	4.07 $\pm$ 0.31	3.17 $\pm$ 0.32	4.28 $\pm$ 0.23	3.34 $\pm$ 0.2	4.61 $\pm$ 0.42	3.6 $\pm$ 0.34
6	2.76 $\pm$ 0.5	2.04 $\pm$ 0.42	3.49 $\pm$ 0.11	2.63 $\pm$ 0.12	3.36 $\pm$ 0.56	2.49 $\pm$ 0.42
7	1.62 $\pm$ 0.57	1.06 $\pm$ 0.46	2.14 $\pm$ 0.57	1.51 $\pm$ 0.46	1.88 $\pm$ 0.65	1.3 $\pm$ 0.47
8	0.98 $\pm$ 0.21	0.58 $\pm$ 0.16	1.36 $\pm$ 0.57	0.93 $\pm$ 0.42	1.11 $\pm$ 0.36	0.68 $\pm$ 0.25
9	0.71 $\pm$ 0.17	0.38 $\pm$ 0.16	1.04 $\pm$ 0.32	0.65 $\pm$ 0.17	0.69 $\pm$ 0.16	0.38 $\pm$ 0.09
10	0.49 $\pm$ 0.11	0.31 $\pm$ 0.12	0.76 $\pm$ 0.07	0.49 $\pm$ 0.02	0.52 $\pm$ 0.07	0.29 $\pm$ 0.02
11	0.59 $\pm$ 0.16	0.36 $\pm$ 0.12	0.92 $\pm$ 0.15	0.63 $\pm$ 0.21	0.61 $\pm$ 0.03	0.33 $\pm$ 0.04
12	0.54 $\pm$ 0.14	0.36 $\pm$ 0.11	0.83 $\pm$ 0.29	0.64 $\pm$ 0.28	0.68 $\pm$ 0.07	0.47 $\pm$ 0.04
13	0.59 $\pm$ 0.35	0.32 $\pm$ 0.21	0.73 $\pm$ 0.16	0.53 $\pm$ 0.12	0.74 $\pm$ 0.27	0.51 $\pm$ 0.2
14	0.73 $\pm$ 0.1	0.38 $\pm$ 0.09	0.83 $\pm$ 0.13	0.45 $\pm$ 0.03	1.14 $\pm$ 0.26	0.8 $\pm$ 0.16

Annex 3: Mean abundance ( $10^4$ cells.mL<sup>-1</sup> ± SD) of total particle-attached bacteria (TAB) and of HNA particle-attached bacteria (HNA-A) in Control, Chronic and Acute treatments.

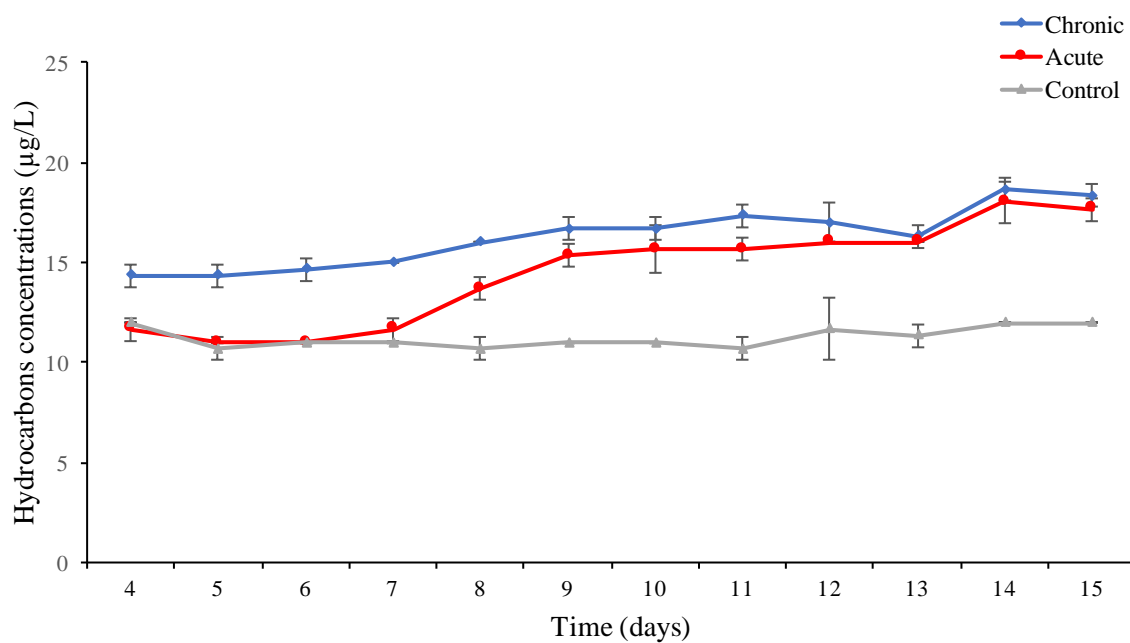
Day	Control		Chronic		Acute	
	TAB	HNA-A	TAB	HNA-A	TAB	HNA-A
0	1.48 ± 0.13	0.38 ± 0.06	1.78 ± 0.17	0.9 ± 0.09	2.21 ± 0.57	1 ± 0.16
1	3.14 ± 0.6	1.43 ± 0.13	5.55 ± 0.59	1.77 ± 0.49	4.11 ± 0.65	1,32 ± 0.47
2	2.73 ± 0.22	1.56 ± 0.03	5.82 ± 1.79	1.86 ± 0.31	7.49 ± 1.08	2,25 ± 0.57
3	4.85 ± 1.29	1.83 ± 0.23	4.16 ± 0.4	2.22 ± 0.12	4.49 ± 0.58	2,18 ± 0.42
4	9.5 ± 4.45	2.15 ± 0.82	6.05 ± 2.51	1.98 ± 0.22	10.43 ± 3.27	3,11 ± 1.6
5	8.93 ± 2.26	3.45 ± 0.47	7.61 ± 1.39	2.01 ± 0.3	7.86 ± 1.14	1,94 ± 0.15
6	9.9 ± 2	3.24 ± 0.25	15.96 ± 3.51	4.96 ± 0.7	12.65 ± 3.55	3,84 ± 0.59
7	7.95 ± 2.06	2.47 ± 0.42	7.09 ± 1.55	2.49 ± 0.23	5.58 ± 0.8	1,75 ± 0.07
8	8.13 ± 0.82	2.15 ± 0.32	5.8 ± 0.67	2.27 ± 0.09	10.46 ± 0.46	2,59 ± 0.27
9	8.28 ± 1.28	2.42 ± 0.41	9.19 ± 1.52	2.79 ± 0.39	5.37 ± 0.83	1,82 ± 0.6
10	8.58 ± 0.25	4.16 ± 1.51	8.07 ± 0.53	3.47 ± 1.04	4.04 ± 0.45	1,86 ± 0.37
11	7.07 ± 1.87	3.87 ± 1.15	14.48 ± 2.36	10.81 ± 1.79	6.35 ± 1.75	3,4 ± 0.32
12	5.09 ± 0.78	3.16 ± 0.69	11.21 ± 0.59	9.28 ± 0.61	9.38 ± 0.79	6,57 ± 0.45
13	13.08 ± 2.19	5.25 ± 0.68	16.1 ± 3.89	12.41 ± 4.05	16.5 ± 4.9	10,52 ± 2.6
14	9.42 ± 1.12	4.8 ± 0.98	16.3 ± 2.89	9.9 ± 2.86	14.17 ± 3.65	9,01 ± 2.32



Annex 4 : Evolution of the mean chlorophyll *a* concentration ( $\mu\text{g.L}^{-1} \pm \text{SD}$ ) in the three treatments.



Annex 5 : Evolution of the nutrients concentration ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\pm \text{SD}$ ) in the Chronic and Acute treatment compared with the Control.



Annex 6 : Evolution of diesel concentrations ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1} \pm \text{SD}$ ) in the Chronic and Acute treatments compared with the Control.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- American Academy of Microbiology. 2011. "FAQ: Microbes & oil spills." AAM colloquium reports, 16 p (URL : [https://www.asm.org/index.php/colloquium-reports/item/4480-faq-microbes-and-oil-spills.](https://www.asm.org/index.php/colloquium-reports/item/4480-faq-microbes-and-oil-spills))
- Allard, L. (2015). "Navigation commerciale sur le Saint-Laurent : entre perspectives économiques et développement durable." Essai de Maitrise en environnement, Université de Sherbrooke, Québec, Canada 153 p.
- Annane, S., St-Amand, L., Starr, M., Pelletier, E., and Ferreyra, G. (2015). " Contribution of transparent exopolymeric particles (TEP) to estuarine particulate organic carbon pool. " *Marine Ecology Progress Series*, 529, 17–34.
- Atlas, R.M. (1981). "Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective". *Microbiological Reviews*, 45(1), 180–209.
- Atlas, R.M. (1995). "Petroleum biodegradation and oil spill bioremediation." *Marine Pollution Bulletin*, 31(4), 178–182.
- Atlas, R. M., and A.R. Bartha (1972). "Biodegradation of petroleum in seawater at low temperatures." *Canadian Journal of Microbiology*, 18(12), 1851–1855.
- Azam, F., Fenchel, T., Field, J. G., Gray, J. S., Meyer-Reil, L. A., and Thingstad, F. (1983). "The ecological role of water-column microbes in the sea. " *Marine ecology progress series*, 257-263.
- Azam, F., and Smith, D. C. (1991). "Bacterial influence on the variability in the ocean's biogeochemical state: a mechanistic view." *Particle analysis in oceanography*, Springer Berlin Heidelberg, 213-236.
- Balestra, C., Alonso-Sáez, L., Gasol, J.M., and Casotti, R. (2011). "Group-specific effects on coastal bacterioplankton of polyunsaturated aldehydes produced by diatoms." *Aquatic Microbial Ecology*, 63(2), 123–131.

- Bargiela, R., Mapelli, F., Rojo, D., Chouaia, B., Tornés, J., Gertler, C., Genovese M., Denaro R., Martínez-Martínez M., Fodelianakis S., Amer R.A., Bigazzi D., Han X., Chen J., Chernikova T.N., Golyshina O.V., Mahjoubi M., Jaouanil A., Benzha F., Magagnini M., Hussein E., Al-Horani F., Cherif A., Blaghen M., Abdel-Fattah Y.R., Kalogerakis N., Barbas C., Malkawi H.I., Golyshin P.N., Yakimov M.M., Daffonchio D., Ferrer M. (2015). "Bacterial population and biodegradation potential in chronically crude oil-contaminated marine sediments are strongly linked to temperature." *Scientific reports*, 5,11651.
- Bell, R.T. (1993). "Estimating production of heterotrophic bacterioplankton via incorporation of tritiated thymidine." In *Handbook of methods in aquatic microbial ecology*, 495–503.
- Belzile, C., Brugel, S., Nozais, C., Gratton, Y., & Demers, S. (2008). "Variations of the abundance and nucleic acid content of heterotrophic bacteria in Beaufort Shelf waters during winter and spring." *Journal of Marine Systems*, 74(3), 946-956.
- Beyer, J., Trannum, H.C., Bakke, T., Hodson, P.V, and Collier, T.K. (2016). "Environmental effects of the Deepwater Horizon oil spill : a review." *Marine pollution bulletin*, 110(1), 28–51.
- Bodkin, J.L., Esler, D., Rice, S.D., Matkin, C.O., and Ballacher, B.E. (2014). "The effects of spilled oil on coastal ecosystems: lessons from the Exxon Valdez spill." *Coastal Conservation*, 19, 311.
- Boust, C. and Lebreton, R. (2006). "Combustibles et carburants pétroliers." Aide-Mémoire Technique ED 989, Institut National de Recherche et de Sécurité, France, 12 p.
- Brussaard, C.P.D., Peperzak, L., Beggah, S., Wick, L.Y., Wuerz, B., Weber, J., Aray J.S., Van der Burg, B., Arjen, J., Huisman, J., and Van der Meer, J. R. (2016). "Immediate ecotoxicological effects of short-lived oil spills on marine biota." *Nature communication*, 7, 11206.
- Buchan, A., Leclair, G.R., Gulvik, C.A., and González, J.M. (2014). "Master recyclers : features and functions of bacteria associated with phytoplankton blooms." *Nature Reviews Microbiology*, 12(10), 686–698.
- Byrne, N. (2008). "Étude de la diversité métabolique des microorganismes des sources hydrothermales." Thèse de doctorat Université de Bretagne Occidentale. France. 206 p.

- Canul-Chan, M., Sanchez-Gonzalez, M., Gonzalez-Burgos, A., Zepeda, A., and Rojas-Herrera, R. (2017). "Population structures shift during the biodegradation of crude and fuel oil by an indigenous consortium." *International Journal of Environmental Science and Technology*, 1–16.
- Cho, B. C., and Azam, F. (1988). "Major role of bacteria in biogeochemical fluxes in the ocean's interior." *Nature*, 332(6163), 441-443.
- Coulon, F., Pelletier, E., and Dellile, D. (2004). "Effects of nutrient and temperature on degradation of petroleum hydrocarbons in contaminated sub-Antarctic soil. " *Chemosphere*, 58(10), 1439–1448.
- Coulon, F., Mckew, B.A., Osborn, A.M., McGenity, T.J., and Timmis, K.N. (2007). "Effects of temperature and biostimulation on oil-degrading microbial communities in temperate estuarine waters." *Environmental Microbiology*, 9(1), 177–186.
- Crump, B.C., Armbrust, E.V., and Baross, J.A. (1999). "Phylogenetic analysis of particle-attached and free-living bacterial communities in the Columbia River, its estuary, and the adjacent coastal ocean." *Applied and environmental microbiology*, 65(7), 3192–3204.
- Dash, H.R., and Mangwani, N. (2013). "Marine bacteria : potential candidates for enhanced bioremediation." *Applied microbiology and biotechnology*, 97(2), 561–571.
- Delille, D., and Siron, R., (1993). "Effect of dispersed oil on heterotrophic bacterial communities in cold marine waters." *Microbial ecology*, 25(3), 263–273.
- Delille, D., Pelletier, E., and Ghiglione, A.R.J. (2009). "Effects of nutrient and temperature on degradation of petroleum hydrocarbons in sub-Antarctic coastal seawater." *Polar Biology*, 32(10), 1521–1528.
- Dubinsky, E.A., Conrad, M.E., Chakraborty, R., Bill, M., Borglin, S.E., Hollibaugh, J.T., Mason, O.U., Piceno, Y.M., Reid, F.C., Stringfellow, W.T., Tom, L.M., Hazen, T.C., and Gary L. Andersen, G.L. (2013). "Succession of hydrocarbon-degrading bacteria in the aftermath of the Deepwater Horizon oil spill in the Gulf of Mexico." *Environmental science and technology*, 47(19), 10860–10867.



- Dyksterhouse, S.E., Gray, J.P., Herwig, R.P., Lara, J.C.A.N., and Staley, J.T. (1995). "*Cycloclasticus pugetii* gen. nov., sp. nov., an aromatic hydrocarbon-degrading bacterium from marine sediments." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 45(1), 116–123.
- Ferreira, G.A., Mostajir, B., Schloss, I.R., Chatila, K., Ferrario, M.E., Sargian, P., Roy, S., Prod'homme, J., and Demers, S. (2006). "Ultraviolet-B radiation effects on the structure and function of lower trophic levels of the marine planktonic food web." Symposium-in-Print: UV Effects on Aquatic and Coastal Ecosystems. *Photochemistry and Photobiology*, 82(4), 887–897.
- Fuhrman, J.A., and Azam, F. (1982). "Thymidine incorporation as a measure of heterotrophic bacterioplankton production in marine surface waters : evaluation and field results." *Marine biology*, 66(2), 109-120.
- Fuhrman, J. A., and Azam, F. (1980). "Bacterioplankton secondary production estimates for coastal waters of British Columbia, Antarctica, and California." *Applied and environmental microbiology*, 39(6), 1085-1095.
- GENIVAR (2013). "Évaluation environnementale stratégique sur la mise en valeur des hydrocarbures dans les bassins d'Anticosti, de Madeleine et de la baie des Chaleurs (EES2)." Rapport d'étude de GENIVAR Inc. au Ministère des Ressources naturelles et de la Faune du Québec. 660p. et annexes.
- Gerdes, B., Brinkmeyer, R., Dieckmann, G., and Helmke, E. (2005). "Influence of crude oil on changes of bacterial communities in Arctic sea-ice." *FEMS Microbial Ecology*, 53(1), 129–139.
- Gertler, C., Näther, D.J., Cappello, S., Gerds, G., Quilliam, R.S., Yakimov, M.M., and Golyshin, P.N. (2012). "Composition and dynamics of biostimulated indigenous oil-degrading microbial consortia from the Irish, North and Mediterranean Seas: a mesocosm study." *FEMS Microbiology Ecology*, 81(3), 520–536.
- Grossart, H., and Simon, M. (2007). "Interactions of planktonic algae and bacteria : effects on algal growth and organic matter dynamics". *Aquatic Microbial Ecology*, 47(2), 163–176.
- Gilbert, D., and Pettigrew, B. (1997). "Interannual variability (1948 1994) of the CIL core temperature in the Gulf of St. Lawrence. " *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 54(S1), 57-67.

- Haritash, A.K., and Kaushik, C.P. (2009). "Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) : a review." *Journal of hazardous materials*, 169(1), 1–15.
- Hazen, T.C., Dubinsky, E.A., DeSantis, T.Z., Andersen, G.L., Piceno, Y.M., Singh, N., Jansson, J.K., Probst, A., Borglin, S.E., Fortney, J.L., Stringfellow, W.T., Bill, M., Conrad, M.E., Tom, L.M., Chavarria, K.L., Alusi, T.R., Lamendella, R., Joyner, D.C., Spier, C., Baelum, J., Auer, M., Zemla, M.L., Chakraborty, R., Sonnenthal, E.L., D'haeseleer, P., Holman, H.Y.N., Osman, S., Lu, Z., Van Nostrand, J.D., Deng, Y., Zhou, J., Mason, O.U. (2010). "Deep-sea oil plume enriches indigenous oil-degrading bacteria." *Science*, 330(6001), 204–208.
- Hazen, T.C., Prince, R.C., and Mahmoudi, N. (2016). "Marine oil biodegradation." *Environmental Science and Technology*, 50, 2121–2129.
- Head, I.M., Jones, D.M., and Röling, W.F.M. (2006). "Marine microorganisms make a meal of oil." *Nature Reviews Microbiology*, 4(3), 173–182.
- Howarth, R.W. (1988). "Nutrient limitation of net primary production in marine ecosystems." *Annual review of ecology and systematics*, 19(1), 89–110.
- Innovation Maritime. (2014). "Transport maritime des hydrocarbures - Bilan des connaissances."  
URL : <https://mern.gouv.qc.ca/wp-content/uploads/Chantier-transport-maritime.pdf>  
Page consultée le 15 octobre 2017.
- Judd, K.E., Crump, B.C., and Kling, G.W. (2006). "Variation in dissolved organic matter controls bacterial production and community composition." *Ecology*, 87(8), 2068–2079.
- Kennicutt II, M.C., Brooks, J.M., and Denoux, G.J. (1988). "Leakage of deep, reservoired petroleum to the near surface on the Gulf of Mexico continental slope." *Marine Chemistry*, 24(1), 39-59.
- Kirchman, D. (2001). "Measuring bacterial biomass production and growth rates from leucine incorporation in natural aquatic environments." *Methods in microbiology*, 30, 227-237.
- Landa, M., Cottrell, M.T., Kirchman, D.L., Blain, S., and Obernosterer, I. (2013). "Changes in bacterial diversity in response to dissolved organic matter supply in a continuous culture experiment." *Aquatic Microbial Ecology*, 69(2), 157–168.

- Lapoussière, A., Michel, C., Starr, M., Gosselin, M., and Poulin, M. (2011). "Role of free-living and particle-attached bacteria in the recycling and export of organic material in the Hudson Bay system." *Journal of Marine Systems*, 88(3), 434-445.
- Leahy, J.G., and Colwell, R.R. (1990). "Microbial degradation of hydrocarbons in the environment." *Microbiological reviews*, 54(3), 305–315.
- Lebaron, P., Servais, P., Agogué, H., Courties, C., and Joux, F. (2001). "Does the high nucleic acid content of individual bacterial cells allow us to discriminate between active cells and inactive cells in aquatic systems?" *Applied and Environmental Microbiology*, 67(4), 1775–1782.
- Legendre, L., and Rassoulzadegan, F. (1995). "Plankton and nutrient dynamics in marine waters". *Ophelia*, 41(1), 153–172.
- Lemarchand, K., Berthiaume, F., Maynard, C., Harel, J., Payment, P., Bayardelle, P., Masson, L., and Brousseau, R. (2005). "Optimization of microbial DNA extraction and purification from raw wastewater samples for downstream pathogen detection by microarrays." *Journal of Microbiological Methods*, 63(2), 115–126.
- Lemarchand, K., and Desbiens, I. (2015). "Revue des connaissances sur les capacités potentielles de dégradation des hydrocarbures dans l'Estuaire maritime et le Golfe de Saint-Laurent par les communautés bactériennes indigènes." Ministère du Développement durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques du Québec, Rapport GENV32, Québec, 31.p.
- Macnaughton, S.J., Stephen, J.R., Venosa, A.D., Davis, G.A., Chang, Y., and White, D.C. (1999). "Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill." *Applied and environmental microbiology*, 65(8), 3566–3574.
- Marie, D., Partensky, F., Jacquet, S., and Vaultot, D. (1997). "Enumeration and cell cycle analysis of natural populations of marine picoplankton by flow cytometry using the nucleic acid stain SYBR Green I." *Applied and environmental microbiology*, 63(1), 186–193.
- Marie, D., Brussaard, C.P.D., Thyraug, R., Bratbak, G., and Vaultot, D., (1999). "Enumeration of marine viruses in culture and natural samples by flow cytometry enumeration." *Applied and environmental microbiology*, 65(1), 45-52.

- Mason, O.U., Hazen, T.C., Borglin, S., Chain, P.S.G., Dubinsky, E.A., Fortney, J.L., Han, J., Holman, H.Y.N., Hultman, J., Lamendella, R., Mackelprang, R., Malfatti, S., Tom, L.M., Tringe, S.G., Woyke, T., Zhou, J., Rubin, E.M., and Jansson, J.K. (2012). "Metagenome, metatranscriptome and single-cell sequencing reveal microbial response to Deepwater Horizon oil spill." *The ISME Journal*, 6(9), 1715–1727.
- McDonald, K.S., Turk, V., Mozetič, P., Tinta, T., Malfatti, F., Hannah, D.M., and Krause, S. (2017). "Integrated network models for predicting ecological thresholds: Microbial–carbon interactions in coastal marine systems." *Environmental Modelling & Software*, 91, 156–167.
- Nedwell, D.D. (1999). "Effect of low temperature on microbial growth: lowered affinity for substrates limits growth at low temperature." *FEMS Microbiology Ecology*, 30(2), 101–111.
- Ortmann, A., and Lu, Y. (2015). "Initial community and environment determine the response of bacterial communities to dispersant and oil contamination." *Marine pollution bulletin*, 90(1), 106–114.
- Padros, J., Pelletier, E., Siron, R., and Dellile, D. (1999). "Fate of a new silicone-based oil-treating agent and its effects on marine microbial communities." *Environmental toxicology and chemistry*, 18(5), 819–827.
- Paepe, M. De, Leclerc, M., Tinsley, C.R., Petit, M., and Maurin, M. (2014). "Bacteriophages : an underestimated role in human and animal health ?" *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 4(3), 1–11.
- Passow, U., De La Rocha, C.L., Fairfield, C., and Schmidt, K. (2014). "Aggregation as a function of PCO<sub>2</sub> and mineral particles," *Limnology and Oceanography*, 59(2), 532–547.
- Passow, U., Ziervogel, K., Asper, V., and Diercks, A. (2012). "Marine snow formation in the aftermath of the Deepwater Horizon oil spill in the Gulf of Mexico." *Environmental Research Letters*, 7(3), 035301.
- Pêches et Océans Canada (2012). "Perspectives maritimes : faits saillants de l'industrie du transport maritime. Portail régional d'information maritime (MarInfo)." Bulletin 31. 14 p. (URL : <http://www.marinfo.gc.ca/documents/PerspectivesMaritimesseptembre2012-F.pdf>)

- Perhar, G., and Arhonditsis, G.B. (2014). "Aquatic ecosystem dynamics following petroleum hydrocarbon perturbations : a review of the current state of knowledge." *Journal of Great Lakes Research*, 40, 56–72.
- Perreault, N.N., Andersen, D.T., Pollard, W.H., Greer, C.W., and Whyte, L.G. (2007). "Characterization of the prokaryotic diversity in cold saline perennial springs of the Canadian high arctic." *Applied and environmental microbiology*, 73(5), 1532–1543.
- Planken, K.L., Koenderink, G.H., Roozendaal, R., and Philipse, A.P. (2005). "Monodisperse DNA restriction fragments : I. Synthesis and characterization." *Journal of colloid and interface science*, 291(1), 120–125.
- Plan d'action Saint-Laurent (2014) "Le Portrait global de l'état du Saint-Laurent."  
URL : [http://planstlaurent.qc.ca/fr/suivi\\_de\\_letat/portrait\\_global\\_de\\_letat\\_du\\_saint\\_laurent\\_2014.html](http://planstlaurent.qc.ca/fr/suivi_de_letat/portrait_global_de_letat_du_saint_laurent_2014.html)  
Page consultée le 9 avril 2018.
- Port de Québec (2013). "Rapport annuel 2013."  
URL : <http://www.portquebec.ca/a-propos-du-port/administration-portuaire/rapport-annuel>  
Page consultée le 8 octobre 2017
- Riemann, L., Steward, G.F., and Azam, F. (2000). "Dynamics of bacterial community composition and activity during a mesocosm diatom bloom dynamics of bacterial community composition and activity during a mesocosm diatom bloom." *Applied and Environmental Microbiology*, 66(2), 578–587.
- Riemann, L., and Winding, A. (2001). "Community dynamics of free-living and particle-associated bacterial assemblages during freshwater phytoplankton bloom." *Microbial Ecology*, 42(3), 274–285.
- Röling, W.F.M., Milner, M.G., Jones, D.M., Lee, K., Daniel, F., Swannell, R.J.P., and Head, I.M. (2002). "Robust hydrocarbon degradation and dynamics of bacterial communities during nutrient-enhanced oil spill bioremediation." *Applied and environmental microbiology*, 68(11), 5537–5548.
- Sargian, P., Mostajir, B., Chatila, K., Ferreyra, G.A., Pelletier, E., and Demers, S. (2005). "Non-synergistic effects of water-soluble crude oil and enhanced ultraviolet-B radiation on a natural plankton assemblage." *Marine Ecology Progress Series*, 294, 63–77.

- Sauret, C., Böttjer, D., Talarmin, A., Guigue, C., Conan, P., Pujo-Pay, M., and Ghiglione, J. (2015). "Top-down control of diesel-degrading prokaryotic communities." *Microbial ecology*, 70(2), 445–458.
- Schäfer, H., and Muyzer, G. (2001). "Denaturing gradient gel electrophoresis in marine microbial ecology." *Methods in microbiology*, 30, 425–468.
- Servais, P. (2010). "Mesure de la production bactérienne par incorporation de thymidine tritiée." *Revue des sciences de l'eau/Journal of Water Science*, 1(3), 217–237.
- Sherr, E.B., Sherr, B.F., and Longnecker, K. (2006). "Distribution of bacterial abundance and cell-specific nucleic acid content in the Northeast Pacific Ocean." *Deep-Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 53(4), 713–725.
- Siron, R., Pelletier, E., and Brochu, C. (1991). "Suivi d'une contamination pétrolière accidentelle dans l'estuaire moyen du Saint-Laurent : le cas de l'Île-aux-Grues." *Water Pollution Research Reports Canada*, 26, 61–86.
- Siron, R., Pelletier, E., Dellile, D., and Roy, S. (1993). "Fate and effects of dispersed crude oil under in conditions simulated in mesocosms." *Marine Environmental Research*, 35(3), 273–302.
- Siron, R., Pelletier, E., and Brochu, C. (1995). "Environmental factors influencing the biodegradation of petroleum hydrocarbons in cold seawater." *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 28(4), 406–416.
- Siron, R., Pelletier, E., and Roy, S. (1996). "Effects of dispersed and absorbed crude oil on microalgal and bacterial communities of cold seawater." *Ecotoxicology*, 5(4), 229–251.
- Smith, D.C., Simon, M., Alldredge, A.L., and Azam, F. (1992). "Intense hydrolytic enzyme activity on marine aggregates and implications for rapid particle dissolution." *Nature*, 359(6391), 139-142.
- Smith, D.C., Steward, G.F., Long, R.A., and Azam, F. (1995). "Bacterial utilization of carbon fluxes during a diatom bloom in a mesocosm." *Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 42(1), 75–97.

- SODES. (2012). "Étude de l'impact économique de l'industrie maritime au Québec".  
<http://www.st-laurent.org/bim/connaitre-lindustrie-maritime/economie/retombees-economiques/>  
Page consultée le 5 octobre 2017.
- Thyssen, M., Ferreyra, G., Moreau, S., Schloss, I., Denis, M., and Demers, S. (2011). "The combined effect of ultraviolet B radiation and temperature increase on phytoplankton dynamics and cell cycle using pulse shape recording flow cytometry." *Journal of experimental marine biology and ecology*, 406(1), 95-107.
- Traving, S.J., Rowe, O., Jakobsen, N.M., Sørensen, H., Dinasquet, J., Stedmon, C. A., Andersson, A., and Riemann, L. (2017). "The effect of increased loads of dissolved organic matter on estuarine microbial community composition and function." *Frontiers in Microbiology*, 8, 1–15.
- Troussellier, M., Courties, C., Lebaron, P., and Servais, P. (1999). "Flow cytometric discrimination of bacterial populations in seawater based on SYTO 13 staining of nucleic acids." *FEMS Microbiology Ecology*, 29(4), 319–330.
- Viggor, S., Juhanson, J., Jõesaar, M., Mitt, M., Truu, J., Vedler, E., and Heinaru, A. (2013). "Dynamic changes in the structure of microbial communities in Baltic Sea coastal seawater microcosms modified by crude oil, shale oil or diesel fuel." *Microbiological research*, 168(7), 415–427.
- Yakimov, M.M., Golyshin, P.N., Lang, S., Moore, E.R.B., Abraham, W., Lunsdorf, H., and Timmis, K.N. (1998). "*Alcanivorax borkumensis* gen. nov., sp. nov., a new, hydrocarbon-degrading and surfactant-producing marine bacterium." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 48(2), 339–348.
- Yakimov, M.M., Giuliano, L., Denaro, R., Crisafi, E., Chernikova, T.N., Abraham, W.R., Luensdorf, H., Timmis, K.N., and Golyshin, P. N. (2004). "*Thalassolituus oleivorans* gen. nov., sp. nov., a novel marine bacterium that obligately utilizes hydrocarbons." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(1), 141–148.
- Yang, S.Z., Jin, H.J., Wei, Z., He, R.X., Ji, Y.J., Li, X.M., and Yu, S.P. (2009). "Bioremediation of oil spills in cold environment : a review." *Pedosphere*, 19(3), 371–381.

Li, Y., Luo, L., Makler-Pick, V., Read, E.K., and Hipse, M.R. (2014). "Modelling the impact of microbial loop on aquatic food webs." Proceedings of the 7<sup>th</sup> International Congress on Environmental Modelling and Software, San Diego, CA, USA

Zahn, L.M. (2017). "Photosynthesis evolution in Cyanobacteria." *Science*, 355, 1386–1388.