



# Ecotoxicologie microbienne des plastiques en mer : colonisation et biodégradation par la plastisphère

Justine Jacquin

## ► To cite this version:

Justine Jacquin. Ecotoxicologie microbienne des plastiques en mer : colonisation et biodégradation par la plastisphère. Ecosystèmes. Sorbonne Université, 2020. Français. NNT: 2020SORUS104 . tel-03381781

**HAL Id: tel-03381781**

<https://theses.hal.science/tel-03381781>

Submitted on 18 Oct 2021

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

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

# Sorbonne Université

Ecole doctorale des Sciences de l'Environnement d'Ile-de-France ED 129

*Laboratoire d'Océanographie Microbienne UMR 7621*

## **Ecotoxicologie microbienne des plastiques en mer : Colonisation et biodégradation par la plastisphère**

---

Par **Justine JACQUIN**

Thèse de doctorat en Microbiologie Marine

Présentée et soutenue publiquement le 16 Octobre 2020

Devant un jury composé de :

Régis GRIMAUD	HDR, IPREM, Pau	Rapporteur
Gaëtan BURGAUD	HDR, LUBEM, Brest	Rapporteur
Pierre GALAND	DR, LECOB, Banyuls-sur-Mer	Président
Stéphane BRUZAUD	Professeur, IRDL, Lorient	Examinateur
Jean-François BRIAND	MCF, MAPIEM, Toulon	Examinateur
Valérie BARBE	CR, CEA, Paris	Co-directrice de thèse
Jean-François GHIGLIONE	HDR, LOMIC, Banyuls-sur-Mer	Directeur de thèse



# Remerciements

Une thèse ça marque une vie et ces remerciements sonnent la fin de ces trois années passées au laboratoire de Banyuls. Ce travail n'aurait pu s'achever sans l'aide de toutes les personnes qui suivent :

En premier lieu j'aimerai remercier le jury de thèse qui a accepté d'évaluer mon travail en y consacrant une partie de leur temps : Pierre Galand, Stéphane Bruzaud, Jean-François Briand. Je remercie en particulier les personnes qui ont accepté d'être rapporteurs de cette thèse : Regis Grimmaud et Gaëtan Burgaud.

Je tiens également à remercier mon directeur de thèse Jean-François Ghiglione et ma co-directrice Valérie Barbe, m'ayant permis de réaliser cette thèse sur un sujet si passionnant. Merci à Jeff pour m'avoir laissé en autonomie tout au long de cette thèse et d'avoir eu une relecture attentive de chacun des chapitres de ce manuscrit. Merci à toi Valérie, d'avoir été là pendant ces deux années, ton aide a été précieuse, tant au laboratoire que dans l'analyse des résultats et l'écriture de cette thèse. Merci pour ces moments de détentes et ses discussions si précieuses pour moi qui m'ont permis d'égayer mes journées au laboratoire.

Mes prochains remerciements sont dédiés à toutes ces personnes m'ayant accompagnées, guidées et aidées pendant cette thèse. En premier lieu j'aimerai remercier Nolwenn Callac, qui m'a tant appris malgré son passage éphémère au laboratoire. Merci Nono pour tout ce que tu as pu m'apporter tant scientifiquement que personnellement. Merci pour ce soutien sans faille même à des milliers de km, pour ces réunions nocturnes et ces quelques mois de colocation inoubliables. J'ai conscience que sans toi cette thèse ne serait pas ce qu'elle est aujourd'hui. J'aimerai également remercier Charlène Odobel, pour son implication et son aide indispensable pour l'expérience « DNA-SIP ». Merci pour tous ces bons moments partagés, pour tes conseils et ton expertise scientifique qui ont été d'un grand support pendant ces trois années.

J'aimerai également remercier toutes ces personnes au laboratoire qui m'ont permis de d'avancer dans mes travaux de recherches dans de bonnes conditions. Merci à Valérie Bayot, Laurent Intertaglia, Nyree West, Philippe Catala, Christophe Salmeron, David Pecqueur, et Olivier Crispi, d'avoir toujours répondu à mes demandes avec gentillesse et rapidité. J'aimerai également remercier Pascal Conan et Mireille Pujo-Pay, pour leur disponibilité, leurs nombreux conseils et leur aide dans les expériences. Un merci tout particulier à Valérie Vergé pour m'avoir toujours sortie de situation de crises avec bonne humeur et enthousiasme, tu as été d'un réel soutien technique et psychologique tout au long de cette thèse. Je remercie également Frédérique, Nathalie, Margaux, Carolanne et Clélia, qui m'ont apporté leur soutien ainsi que de bons moments au laboratoire.

Mes travaux scientifiques ont pu être réalisés aussi grâce à des collaborations. Je remercie Stéphane Bruzaud, pour nous avoir toujours fourni avec réactivité les plastiques demandés. Merci également à Yonko Goarant pour avoir passé des journées entières avec moi au microscope électronique à scruter la surface des polymères.

Je tiens ensuite à remercier mes collègues de travail devenus des amis avec le temps, qui ont apporté tant de bonne humeur et de joie de vivre au sein de ce laboratoire. First, Bouchnini merci à toi pour ce soutien de tous les instants, je ne compte plus le nombre de fois où ma session R n'a pas aborté grâce à toi ! Merci également à toi Angel, pour tous ces précieux conseils sur R et pour ta constante bonne humeur qui aura illuminé mes journées. J'ai conscience d'avoir été dans le bureau des meilleurs ! Je remercie également Pavla, Yann, Ying and Fernanda, ça a été un bonheur de partager tous ces moments avec vous.

Un immense merci à Jana, pour ce second souffle que tu auras apporté à ma thèse et à ma motivation, tes conseils et ta bonne humeur communicative m'auront été d'un soutien essentiel ! Merci pour tout !

Last but not the least important, Jingguang thank you to you, for these three years of shared PhD, you were a real support on a daily basis. Thank you also for this amazing roommate, for all these good times, for these improvised aperitifs and for your good humor.

Puis j'aimerai remercier également ces amis qui m'accompagnent dans chaque étape de ma vie, qui auront été d'un grand soutien et une véritable bouffée d'oxygène à chacune de mes remontées en Bretagne. P'tit âne toujours là après tant d'années, inutile de te dire à quel points nos appels (d'accord...souvent en voiture) ont été indispensables pour me faire relativiser et changer les idées. Juste un grand merci pour ce que tu m'apportes, les fous rires et ce soutien si important durant ces dernières semaines. Bien sûr je n'oublie pas Ashleigh, Léa, Soso (quel bonheur de t'avoir retrouvée !), Camille, Margaux et nos soirées si précieuses. Je pense également à Zoé, qui m'aura permis de trouver cet équilibre qui manquait à ma vie et enrichie mon quotidien de moments de bonheur intenses en cette période si particulière. Comment ne pas remercier Pizz'Best ! Sans qui ces études supérieures, ces nombreuses rando infinies, ces week-ends escapades et ce confinement n'auraient pas eu la même saveur ! Merci d'avoir été là pour moi et d'avoir partagés tant de bons moments les filles.

Une pensée particulière pour Olivier, Laetitia, Armelle et ces rendez-vous immanquables du vendredi midi qui auront été une belle échappatoire à ma thèse, merci à vous de m'avoir nourrie et motivée pendant ces temps de rédaction bretons ! Je remercie également Mylène, Maryse, Annick, Dédé et Hervé pour ces courses à pieds du dimanche. Un immense merci également à Malou, d'avoir tenu à merveille ce rôle d'ambulancière en traversant la France et d'avoir continué à prendre soin de moi lors de cette rédaction.

Enfin mes derniers mots de remerciements iront à ma famille. Merci à Jeremy, Alisson, Maëlys et Léna pour tous ces moments partagés, ces fous rires et ces discussions vidéo qui ont pris une place si importante durant ces trois années. Papa, Mama, un immense merci à vous qui m'avez toujours apporté votre soutien sans faille, toujours été présent, toujours encouragé et ça peu importe la situation et mes choix. Donc simplement merci du fond du cœur pour tous ce que vous avez pu faire pour moi.

# Résumé

De nos jours, les déchets plastiques ont envahi l'ensemble des écosystèmes marins du monde en n'épargnant aucune zone. La demande mondiale de plastique ne cesse de croître d'année en année, malgré l'impact dramatique qu'il provoque sur l'environnement lorsqu'il est laissé dans la nature. On estime que chaque année entre 4.8 et 12.7 millions de tonnes de plastiques finissent dans les océans. Les travaux de cette thèse s'inscrivent dans le cadre de cette urgence environnementale, en permettant de mieux identifier les biofilms bactériens attachés aux différents plastiques (« plastisphère) et de mieux caractériser le phénomène de biodégradation de certains polymères en milieu marin. Dans un premier temps, l'analyse d'échantillons prélevés pendant deux expéditions (l'expédition Tara-Méditerranée et Tara-Pacifique) ont permis de caractériser la biogéographie des biofilms bactériens spécifiques des plastiques. Cette comparaison a permis de mettre en évidence une niche écologique à la surface des plastiques distincte de l'eau environnante, nettement influencé par la géographie, expliqué principalement par la température. L'étude taxonomique a permis de mettre en évidence un « core microbiome », dominé par un genre de cyanobactérie (*Rivularia* sp.) et des familles connues (Rhodobacteraceae et Flavobacteraceae) comme étant colonisateurs de plastique en milieu marin. Dans un second temps, la colonisation bactérienne sur différents polymères a été étudiée grâce à des aquariums en circuit ouvert sur la baie de Banyuls. Le processus de biodégradation a été étudié en milieu artificiel sans source de carbone que le polymère, imitant l'environnement marin et en suivant plusieurs paramètres expérimentaux. Dans notre étude aucune spécificité des communautés microbiennes liées à la nature des polymères a été observée pendant la phase de croissance du biofilm. Le processus de biodégradation a pu être mis en évidence sur certains polymères tels que le PHBV, Bioplast, Mater-Bi et la cellulose grâce notamment à une activité bactérienne maintenue tout au long de l'incubation. Dans un troisième temps, une souche provenant du biofilm mature du PHBV a pu être isolée pour étudier spécifiquement son processus de biodégradation. L'analyse du génome d'*Alteromonas* sp., a révélé la présence de 4 dépolymérases dont 3 externes et 1 interne, expliquant sa capacité à dégrader le PHBV. L'étude du génome a aussi permis de mettre en évidence deux voies de synthèse des PHA l'une permettant la synthèse de PHA<sub>SCL</sub> et l'autre de PHA<sub>MCL</sub>. Enfin, l'étude de la biodégradation du PHBV par un consortium naturel a été approfondi grâce à un marquage isotopique du polymère. Cette nouvelle expérimentation couplée à une analyse métagénomique a permis d'étudier des communautés fonctionnelles pouvant assimiler le carbone du polymère. Les travaux menés durant cette thèse permettent de mieux identifier les biofilms bactériens se développant à la surface de polymères biodégradables et non dégradables, et également d'affiner la caractérisation du processus de biodégradation en milieu marin grâce à l'utilisation de différents paramètres tels que la production bactérienne, la respiration, la perte de poids, le suivi de l'assimilation du carbone marqué ou l'imagerie en microscopie. Ces études sont primordiales pour mieux comprendre le processus de biodégradation des plastiques en mer et ainsi proposer des adaptations aux normes de standardisations régissant l'environnement marin et actuellement peu représentative.

Mots clés : Déchets plastiques, biofilm, colonisation, biodégradation, génomique

# Abstract

Nowadays, plastic waste has invaded all of the world's marine ecosystems, sparing no area. The global demand for plastic continues to grow year after year, despite its dramatic impact on the environment when plastic is left in nature. It is estimated that each year between 4.8 and 12.7 million tonnes of plastics end up in the oceans. This PhD aims and works fall within the framework of this environmental emergency, by making possible to better identify the bacterial biofilms attached to different plastics (the so called "plastisphere") and to better characterize the biodegradation process of certain polymers in the marine environment. The first stage, was to analyse the microbial diversity of samples taken during two expeditions (the Tara-Mediterranean expedition and Tara-Pacific) in order to characterize the biogeography of bacterial biofilms specific to plastics. The comparison between samples from the Pacific and the Mediterranean see allow to highlight an ecological niche on the surface of plastics distinct from the surrounding water. Niche which is clearly influenced by geography, explained mainly by temperature. The taxonomic study revealed a "core microbiome" dominated by a genus affiliated to the cyanobacteria and families (Rhodobacteraceae and flavobacteraceae) known to be colonizers of plastic in the marine environment. Then, the bacterial colonization on different polymers was studied in aquarium using uninterrupted circulation of seawater collected continuously from the Banyuls Bay. The biodegradation process was studied using an artificial environment without any other carbon source than the polymer in order to mimic the marine environment, and by following several experimental parameters (Bacterial production, respiration, loss of mass). In our study we observed during the growth phase of the biofilm no specific microbial communities related to the nature of the polymers. The biodegradation process has been demonstrated on certain polymers such as PHBV, Bioplast, Mater-Bi and cellulose, in particular due to the bacterial activity maintained throughout the incubation. Next, a strain *Alteromonas* sp., isolated from the mature biofilm of the PHBV allow us to explore its biodegradation capabilities. The analysis of the genome of *Alteromonas* sp. revealed the presence of 4 depolymerases, with 3 external and 1 internal, explaining its ability to degrade PHBV. The study of the genome also revealed two pathways for the PHA synthesis, one allowing the synthesis of PHAsCL and the other of PHAMCL. Finally, the study of the biodegradation of PHBV by a natural consortium was done using isotopic labelling of the polymer. This experiment, coupled with metagenomic analysis, allowed the study of functional communities that can assimilate the carbon of the polymer. Thus, this PhD work enhanced the identification of the bacterial communities inhabiting the biofilms developed on the surface of polymers (biodegradable and non-degradable), and also to refine the characterization of the biodegradation process in the marine environment owing the use of various parameters such as the bacterial production, respiration, weight loss, monitoring of labeled carbon and microscopy. These studies are essential for a better understanding of the biodegradation process of plastics at sea and thus to propose adaptations to the standards methods governing the marine environment and currently not very representative.

Keywords: Plastic waste, biofilm, colonization, biodegradation, genomics

# Sommaire

<b>Chapitre 1 Contexte de l'étude</b>	15
1. La pollution plastique en mer	17
1.1. Production de plastique à travers le monde	18
1.2. Cycle de vie du plastique dans les écosystèmes aquatiques	20
1.3. Quantification et focus sur les zones d'études de la thèse	22
1.4. Impacts écologiques de la pollution plastique	28
1.4.1. Impact sur les organismes vivants en milieu marin	28
1.4.2. Cas des Polluants Organiques Persistants (POPs)	31
2. Les différentes classes de polymères	32
2.1. Polymères conventionnels	32
2.2. Polymères Biosourcés	34
2.2.1. Acide Polylactique (PLA)	35
2.2.2. Le poly(butylène succinate) PBS	36
2.2.3. Polibutylene adipate terephthalate (PBAT)	36
2.2.4. Mater-Bi	37
2.2.5. Bioplast	37
2.2.6. Polyhydroxy alcanoate (PHA)	37
3. La plastisphère	38
3.1. La plastisphère en milieu marin	39
3.2. Particularité de la plastisphère par comparaison aux micro-organismes de l'eau environnante	42
4. Biodégradation des plastiques en mer	44
4.1. Dégradation abiotique	45
4.2. Dégradation biotique	45
4.2.1. Les différentes étapes de biodégradation	47
4.2.2. Taux de dégradation plastique	48
4.2.3. Tests et normes de biodégradabilité en milieu marin : encadrement et loi Européenne	49
4.3. Biodégradation en fonction de la composition des polymères	52
4.3.1. Plastiques conventionnels : Cas du Polyéthylène (PE)	53
4.3.2. Plastiques biosourcés : Cas du PHA	55
5. Cas des PHA : Polymères biosourcés, biodégradables, compostables et recyclables	57
5.1 Généralités	57
5.2. Intérêt commercial du PHA	59
5.3. Biosynthèse des PHA	62
5.4 Mécanismes moléculaires impliqués dans la biodégradation des PHA	65
5.5 Limite du succès du PHA	68
6. Objectif de la thèse	69
<b>Chapitre 2 Etude de la biogéographie de la plastisphère en milieu marin</b>	71
1. Préambule	73

2. Article: Global diversity and core microbiome of the plastisphere compared to organic-particle attached and free-living planktonic lifestyles from the Tara Oceans expeditions in the Mediterranean Sea and in the North Pacific gyre.	75
<b>Chapitre 3</b> Colonisation et biodégradation des plastiques conventionnels et de leurs substituts biodégradables pour l'usage de bâtonnets ouatés	105
1. Préambule	107
2. Article : Marine plastisphere activity and diversity during successive colonization and biodegradation phases of various composition of plastic sticks	109
<b>Chapitre 4</b> Isolement d'une nouvelle souche bactérienne marine capable de synthétiser et de biodégrader les PHA en utilisant une voie métabolique originale	143
1. Préambule	145
2. Article : A new strain capable of synthesizing and degrading PHBV using atypical metabolic pathways	147
<b>Chapitre 5</b> Conclusion et perspectives	175
1. Conclusion	177
1.1. Etude de la plastisphère au niveau mondial	177
1.2. Evolution de la plastisphère vers un consortium capable de dégrader les polymères	
179	
1.3. Etude d'une souche appartenant à ce consortium afin d'identifier les gènes clefs impliqués dans la biodégradation du PHA	184
2. Perspectives	187
2.1. Utilisation de la technique DNA-Stable Isotope Probing (DNA-SIP) comme preuve ultime de la biodégradation.	187
2.2. Enjeux pour une application en biotechnologie	197
2.3. Evolution des normes de biodégradation des plastiques en mer : suivi temporel et multifactoriel	198
Références bibliographiques	200
<b>Annexes</b>	221
Annexe 1– Article en premier auteur publié en 2019 dans <i>Frontiers in microbiology</i>	223
Annexe 2– Article en co-auteur en préparation	260
Annexe 3– Article en co-auteur en préparation	262
Annexe 4– Article en co-auteur en préparation	264
Annexe 5– Poster AFEM, Bussang 2019	266

# Table des figures et des tableaux

Figure 1 : Chronologie de l'histoire du plastique	17
Figure 2 : Production mondiale exprimée en millions de tonnes de plastique	19
Figure 3: Schéma d'une pièce de plastique qui arrive dans l'océan.	21
Figure 4 : Carte présentant les différents gyres océaniques	23
Figure 5: Représentation des courants de surfaces régissant la méditerranée	24
Figure 6 : Carte de la mer méditerranée de 2013 à 2017	25
Figure 7 : Représentation du gyre du Pacifique Nord à l'Ouest	26
Figure 8 : Impacts de la pollution plastique sur l'environnement marin	28
Figure 9 : Impacts négatifs sur les principaux organismes terrestres et aquatiques.	29
Figure 10 : Proportion de la production mondiale de plastiques biodégradables	35
Figure 11 : Synthèse de l'acide polylactique (PLA)	35
Figure 12 : Synthèse du Polybutylene succinate (PBS)	36
Figure 13 : Synthèse du Polybutylene adipate terephthalate (PBAT)	36
Figure 14 : Etapes de la formation du biofilm microbien retrouvés sur les polymères	41
Figure 15 : Diagramme de Venn, montrant le nombre d'OTU et le pourcentage des OTU unique expliquant la différence entre les fractions vivantes librement (FL) et Particule attachée (PA) provenant d'une étude menée en méditerranée (Dussud et al. 2018)	43
Figure 16 : Facteurs impliqués dans la dégradation abiotique et biotique des polymères	44
Figure 17 : Différentes étapes de la biodégradation du plastique en mer	47
Figure 18 : Normes actuelles portant sur la biodégradation des plastiques en mer	50
Figure 19 : Réaction radicalaire retrouvée dans le processus de biodégradation du PE	53
Figure 20: Voie de biodégradation du PE et PHB	54
Figure 21: Conformation d'un carbone asymétrique selon l'ordre de priorité donné au 4 substituants suivant la loi de Cahn classé du plus important (a) au moins important (d)	58
Figure 22 : Nomenclature générale des principaux PHA	58
Figure 23 : Molécule de Poly( $\beta$ -hydroxybutyrate)	60
Figure 24 : Schéma bilan des interactions entre les protéines impliquées dans la synthèse des PHA. Figure modifée d'après Pohlmann et al. 2006	62
Figure 25 : Représentation des 4 PhaC identifiées chez les procaryotes	63
Figure 26 : Description des trois voies métaboliques de la synthèse des PHA	65
Figure 27 : Présentation des deux types de PhaZ spécifique des PHAsCL	67

Figure 28 : Vue d'ensemble des études menées pendant cette thèse à différentes échelles	70
Figure 29 : Trajet des expéditions Tara Pacifique (A) et Tara Méditerranée (B)	74
Figure 30 : Présentation de la ligne complète de production de tiges des différents polymères (à gauche) et des tubes à essai ayant servi à l'incubation en milieu minimum (à droite)	108
Figure 31 : Photographies représentant le halo de dégradation de la souche d' <i>Alteromonas</i> sp. lorsqu'elle est placée en milieu minimum agar en présence de PHBV comme seule source de carbone (à gauche)	146
Figure 32 : Dendrogramme (méthode Ward), comparant les communautés microbiennes colonisant les plastiques selon l'endroit géographique	182
Figure 33 : Schéma expérimental de l'expérience DNA-SIP menée sur du $^{13}\text{C}$ PHBV	188
Figure 34 : Consommation de l'oxygène par le consortium bactérien au contact du PHBV $^{12}\text{C}$ (triplicat) pendant 90 jours.	189
Figure 35 : Production bactérienne exprimée en ng C. $\text{dm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ pour les morceaux de PHBV et en ng C. $\text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ pour le milieu d'incubation, et le surnageant du milieu artificiel contenant les pièces de PHBV.	190
Figure 36 : Image prisée au microscope électronique du PHBV $^{12}\text{C}$	191
Figure 37 : Quantité d'ADN obtenue dans le gradient de chlorure de Césium	192
Figure 38 : Résultat de l'alpha diversité sur les trois fractions au cours du temps	193
Figure 39 : Comparaison entre les regroupements hiérarchiques basé sur la similitude de Bray curtis (partie haute) et leurs affiliations taxonomiques comparant les classes en fonction de leurs abondances relatives (partie inférieure).	194
Figure 40 : Bubble plot des genres bactériens retrouvés en abondance relative (pourcentage) sur les différentes fractions en fonction du temps.	195
Figure 41 : Histogramme des 25 gènes différenciant la fraction haute (FH), la fraction légère (FL), et la fraction contrôle ( $^{12}\text{C}$ ).	196

Tableau 1: Comparaison des caractéristiques des deux zones d'études : la méditerranée et le Pacifique	28
Tableau 2 : Les plastiques étudiés lors des expériences menées dans cette thèse.	34
Tableau 3 : Comparaison des différents environnements influençant le taux de biodégradation des plastiques	49
Tableau 4 : Présentation des différentes normes qui existent actuellement pour l'ensemble des milieux aqueux	50
Tableau 5 : PHA commercialisés dans le monde avec leur caractéristique de production.	61
Tableau 6 : Présentation des différentes classes de PhaC et leurs caractéristiques dans l'opéron (Mezzolla et al. 2018)	63

# Liste des publications

1. Dussud, C., Hudec, C., George, M., Fabre, P., Higgs, P., Bruzaud, S., Delort, A.-M., Eyheraguibel, B., Meistertzheim, A.-L., **Jacquin, J.**, Cheng, J., Callac, N., Odobel, C., Rabouille, S., Ghiglione, J.-F., 2018. Colonization of Non-biodegradable and Biodegradable Plastics by Marine Microorganisms. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01571>
2. **Jacquin, J.**, Cheng, J., Odobel, C., Pandin, C., Conan, P., Pujo-Pay, M., Barbe, V., Meistertzheim, A.-L., Ghiglione, J.-F., 2019. Microbial Ecotoxicology of Marine Plastic Debris: A Review on Colonization and Biodegradation by the “Plastisphere.” *Front. Microbiol.* 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00865>
3. **Jacquin J.**, Callac N., Cheng J., Giraud C., Gorand Y., Denoual C., Pujo-Pay M., Conan P., Barbe V., Ter halle A., Meistertzheim A-L., Bruzaud S., Ghiglione J-F. Marine plastisphere activity and diversity during successive colonization and biodegradation phases of various composition of plastic sticks (soon *submitted*)
4. **Jacquin J.**, Cheng J., Conan P., Pujo-Pay M., Bruzaud S., Ghiglione J-F., Barbe V. A new strain capable of synthesizing and degrading PHBV using atypical metabolic pathways (*In preparation*)
5. **Jacquin J.**, Budinich M., Cheng J., Barbe V., Pedrotti M-L., Ghiglione J-F. Global diversity and core microbiome of the plastisphere compared to organic-particle attached and free-living planktonic lifestyles from the Tara Oceans expeditions in the Mediterranean Sea and in the North Pacific gyre (*In preparation*).
6. Cheng J., **Jacquin J.**, Conan P., Pujo-Pay M., Valérie B., Matthieu G., Pascale F., Bruzaud S., Ter Halle A., Meistertzheim A-L and Ghiglione J-F. Relative influence of plastic debris size and shape, chemical composition and phytoplankton-bacteria interactions in driving seawater plastisphere abundance, diversity and activity. *Frontiers in microbiology* (soon *submitted*)
7. Cheng J., Eyheraguibel B., **Jacquin J.**, Pujo-Pay M., Conan P., Barbe V., Hoypierres J., Deligey G., Ter Halle A., Bruzaud S., Ghiglione J-F & Meistertzheim A-L. Biodegradability under marine conditions of bio-based and petroleum-based polymers as substitutes of conventional microbeads. *Environmental pollution* (soon *submitted*)
8. Cheng J, Meistertzheim A-L, **Jacquin J**, Valérie B, Escande M-L 4, Bertrand S, Escriva H. and Ghiglione J-F. Beneficial or detrimental effects of microplastics on the marine filter-feeder amphioxus (*Branchiostoma lanceolatum*)? *Environmental science & technology* (*In preparation*).

# Liste des communications scientifiques

1. **Jacquin J.**, Callac N., Cheng J., Giraud C., Gorand Y., Denoual C., Pujo-Pay M., Conan P., Barbe V., Ter halle A., Meistertzheim A-L., Bruzaud S., Ghiglione J-F. Utilisation des outils “OMICS” pour caractériser la biodégradation des plastiques en mer. Poster au Colloque de l’AFEM. Bussang, Novembre 2019. 1<sup>er</sup> Prix Poster
2. **Jacquin J.**, Cheng J., Meistertzheim A-L, Callac C., Lemaire J., Fromageot D., Higgs P., Eyheraguibel B., Delort A-M., Ghiglione J-F., Nouveau test de biodégradabilité des plastiques oxodégradables en milieu marin. Poster au workshop Polymère et océans. Montpellier, janvier 2018.
3. Cheng J., **Jacquin J.**, Pandin C., Odobel C., Catala P., Pecqueur D., Salmeron C., Pujo-Pay M., Conan P., Eyheraguibel B., Delort A-M., Barbe V., Hoypierres J., Deligey G., Bruzaud S., Fabre P., George M., J-F Ghiglione, A-L Meistertzheim Dégradation des plastiques par les bactéries marines. Poster aux Premières Rencontres du GDR Polymères et Océans. Crêteil, Juillet 2019.



# **Chapitre 1**

## **Contexte de l'étude**



© Warakorn Harnprasop



« Depuis 1950 ce sont 9 milliards de tonnes de plastique qui se sont accumulés sur Terre, soit 14,5 fois le poids de la population humaine mondiale ».

## 1. La pollution plastique en mer

Le premier plastique synthétique a été fabriqué en 1855 après la découverte de la Parkésine (Parkes, 1866) qui visait à mettre un terme à la surexploitation de l'ivoire. Alexander Parkes avait traité de la cellulose avec de l'acide nitrique comme solvant, donnant un polymère thermodurcissable et ressemblant à l'ivoire en y incorporant des pigments.

Les découvertes de polymères synthétiques se sont succédées entre 1860 et 1940 où de nombreux polymères encore utilisés aujourd'hui ont été créés : Polychlorure de vinyle (PVC), polystyrène (PS), Polyéthylène (PE), Polycarbonate (PC), Nylon, etc. (Fig. 1). Le nom commun plastique fait référence en réalité à plusieurs centaines de polymères et d'additifs différents. La majorité des polymères sont formés de chaînes d'atomes de carbone, avec ajout d'oxygène, d'azote ou de soufre. Ces chaînes comprennent de nombreuses unités répétitives, formant des monomères qui s'associent pour former des polymères.

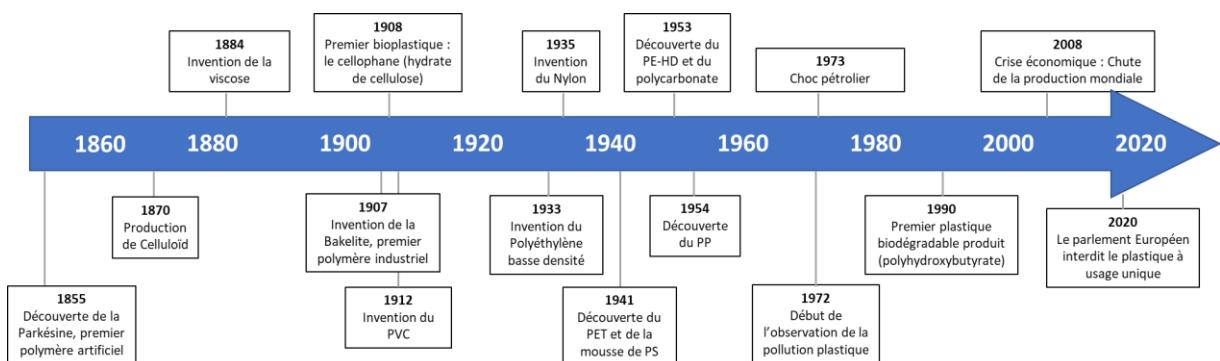


Figure 1 : Chronologie de l'histoire du plastique, de ses découvertes à sa production industrialisée jusqu'aux prises de décisions Européennes afin de mieux contrôler sa fin de vie.

Le faible coût de production et ses propriétés de facilité de moulage, de légèreté et de durabilité a entraîné son utilisation massive jusqu'à ce qu'il devienne un composant aujourd'hui incontournable pour de nombreux usages domestiques et industriels. La plupart du plastique produit actuellement étant d'origine pétro-chimique, on estime qu'à l'heure actuelle que 4 à 8 % du pétrole mondial est utilisé pour la production de plastique et les prévisions annoncent une augmentation jusqu'à 20% en 2050.

De nos jours, un objet du quotidien sur deux est en plastique dans les ménages. On estime aujourd’hui que 40% de la production plastique est utilisée pour l’emballage, mais on retrouve du plastique dans les vêtements, véhicules, smartphones, masques, gants, matériaux de construction, appareils médicaux, etc. L’usage facilité des plastiques a conduit à une surconsommation de produits à faibles coûts considérés comme jetables ou à usage unique alors qu’ils gardent leur propriété de durabilité. Sans considérer la gestion des déchets engendrés par leur usage ni leur potentiel impact sur l’environnement, le plastique est devenu responsable d’une des plus grandes pollutions de l’environnement engendrée par l’homme et il représente un fléau pour les écosystèmes marins.

## 1.1. Production de plastique à travers le monde

En 2018, avec 359 millions de tonnes de plastiques produits, le record de l’année précédente a de nouveau été surpassé (Plastic Europe 2019) (Fig. 2) avec une hausse de 3,2 % (11 millions de tonnes) par rapport à 2017, soit l’équivalent de 11,38 t de plastique produites par seconde. L’Europe a produit moins de plastique en 2018, avec 61,8 millions de tonnes contre 64,4 millions de tonnes en 2017, mais a augmenté sa consommation de 0,4 % (Fig. 2). En 2018, ce sont 51,2 millions de tonnes de plastique qui ont été nécessaire pour répondre à la demande Européenne et 70 % de cette demande est concentrée dans 6 pays d’Europe (Allemagne, Italie, France, Espagne, Royaume Unie et Pologne). L’Europe est responsable de 17 % de la production mondiale de plastique, derrière l’Asie (51%) et l’Amérique du Nord (18%). Dans ce contexte la France a connu en 2018 une baisse de production de plastique de - 5.1 % et de consommation -2.6%, après une année 2017 positive. Ces chiffres provenant de l’étude de Plastic Europe, ne prennent pas en compte le plastique produit pour l’industrie du textile (37.2 millions de tonnes) ou le caoutchouc synthétique utilisé dans les pneus (6.4 millions de tonnes) au niveau mondial (Boucher and Friot 2020). Selon Plastic Europe, près de 4 % de la production mondiale de pétrole sert à la fabrication du plastique (Plastic Europe 2019).

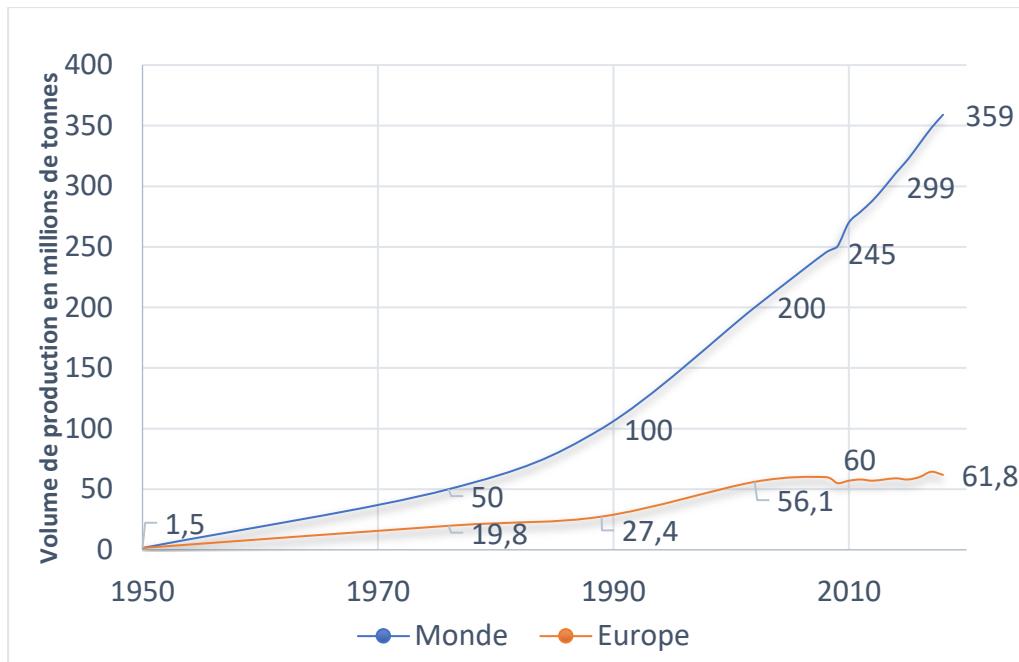


Figure 2 : Production mondiale exprimée en millions de tonnes de plastique, du début de l'industrialisation jusqu'à nos jours (PlasticEurope 2019)

L'emballage représente 40 % de la demande Européenne, suivie par le secteur du bâtiment et travaux publics (BTP; 20%), de l'automobile (10%) et de l'électronique (6%) (Plastic Europe 2019). Cette demande Européenne implique une forte consommation de plastiques conventionnels (Polypropylène (PP), Polyéthylène de basse (PE-LD) et haute densité (PE-HD)). Ce sont les qualités de ces polymères : résistants, facilement moulés, légers et peu coûteux, qui lui assurent son succès sur le marché mondial du plastique.

En 2019, les bio-plastiques (issus de matières premières renouvelables) représentaient 0,59% du marché total du plastique, soit environ 2,11 millions de tonnes (European Bioplastics, 2019). Les biopolymères considérés comme innovants tels que le PP biosourcé ou les polyhydroxyalcanoates (PHA) ont un taux de croissance actuel supérieur aux autres bioplastiques. Dans le marché des plastiques biosourcés, 44 % sont considérés comme non biodégradables (European Bioplastics, 2019). On y trouve du PE (polyéthylène) et du PET (polyéthylène téraphthalate), ainsi que du PA (polyamides). Les plastiques dit « biodégradables » qui comprennent le PLA (acide polylactique) et le PHA, qui représentent 55.5% du marché. Ce taux devrait augmenter, grâce à l'intérêt grandissant pour les PHA. Les principales utilisations de ces plastiques sont les mêmes que pour les plastiques conventionnels, c'est-à-dire principalement de l'emballage (53%) avec une utilisation première pour la fabrication de sacs, d'emballages souples et rigides (European Bioplastics, 2019).

## 1.2. Cycle de vie du plastique dans les écosystèmes aquatiques

Les océans sont la destination finale des déchets plastiques terrestres non traités. On estime qu'entre 4,8 à 12,7 millions de tonnes de cette production est retrouvée en mer chaque année (Jambeck *et al.* 2015). Différentes voies les mènent vers l'océan comme les rivières, les eaux de ruissellement, les eaux usées et parfois par des phénomènes météorologiques extrêmes comme les crues et les tsunamis (Figure3).

Selon leur densité, les plastiques resteront à la surface de l'eau ou couleront dans le fond des océans. On estime aujourd'hui qu'une grande partie des plastiques coulent dans le fond des océans, mais les estimations restent aujourd'hui controversées. La flottabilité peut aussi dépendre de la colonisation du plastique par le biofilm marin. Le biofilm est un ensemble de communautés microbiennes adhérant entre eux et à une surface, et caractérisé par la sécrétion d'une matrice extracellulaire. Ce biofilm peut augmenter la densité du polymère, ce qui aura pour conséquence de transporter des plastiques flottant en surface vers la colonne d'eau ou les sédiments. De nombreux fonds marins et sédiments ont déjà été contaminés par du plastique (Matsuguma *et al.* 2017; Gerigny *et al.* 2019; Harris 2020). L'exemple le plus connu étant la pollution de la fosse océanique la plus profonde connue à ce jour : la fosse des Mariannes. Un sac plastique a été trouvé à près de 11 000 m et plus inquiétant encore : des micro-plastiques ont été détectés dans les intestins d'amphipodes situés entre 7000 et 10890m (Chiba *et al.* 2018; Jamieson *et al.* 2019).

Une fois introduits dans l'environnement marin, les plastiques vont se fragmenter en micro-plastiques (<5mm) puis en nano-plastiques (< 0,3 mm) sous l'effet combiné des ultraviolets (UV), de la température, des vagues ou encore de la dégradation biologique (Arthur *et al.* 2009; ter Halle *et al.* 2016) (Fig.3). On distingue les « micro-plastiques primaires » directement issus de l'industrie (granulés de plastiques, abrasifs industriels, exfoliants, fibres synthétiques...) des « micro-plastiques secondaires » qui sont issus de la fragmentation des produits plastiques de plus grande taille (objets de la vie quotidienne) (Eerkes-Medrano *et al.* 2015). D'après un rapport publié par l'IUCN (Union internationale de la conservation de la nature), 35% des micro-plastiques proviennent des cycles répétés de lavages de vêtements synthétiques et 28 % des micro-plastiques provenant de l'usure des pneus se déposant sur les routes avant d'être lessivés par les pluies (Boucher and Friot 2017). Le transport aérien des particules de plastiques provenant principalement du trafic routier représenterait une pollution similaire à celle provenant des différents cours d'eau (Evangelou *et al.* 2020). Une récente

étude a permis de mettre en évidence que près de 140 000 tonnes de plastiques provenant du trafic routier est déposé dans les océans en provenance de l'atmosphère contre 64 000 tonnes par les fleuves (van Wijnen *et al.* 2019).

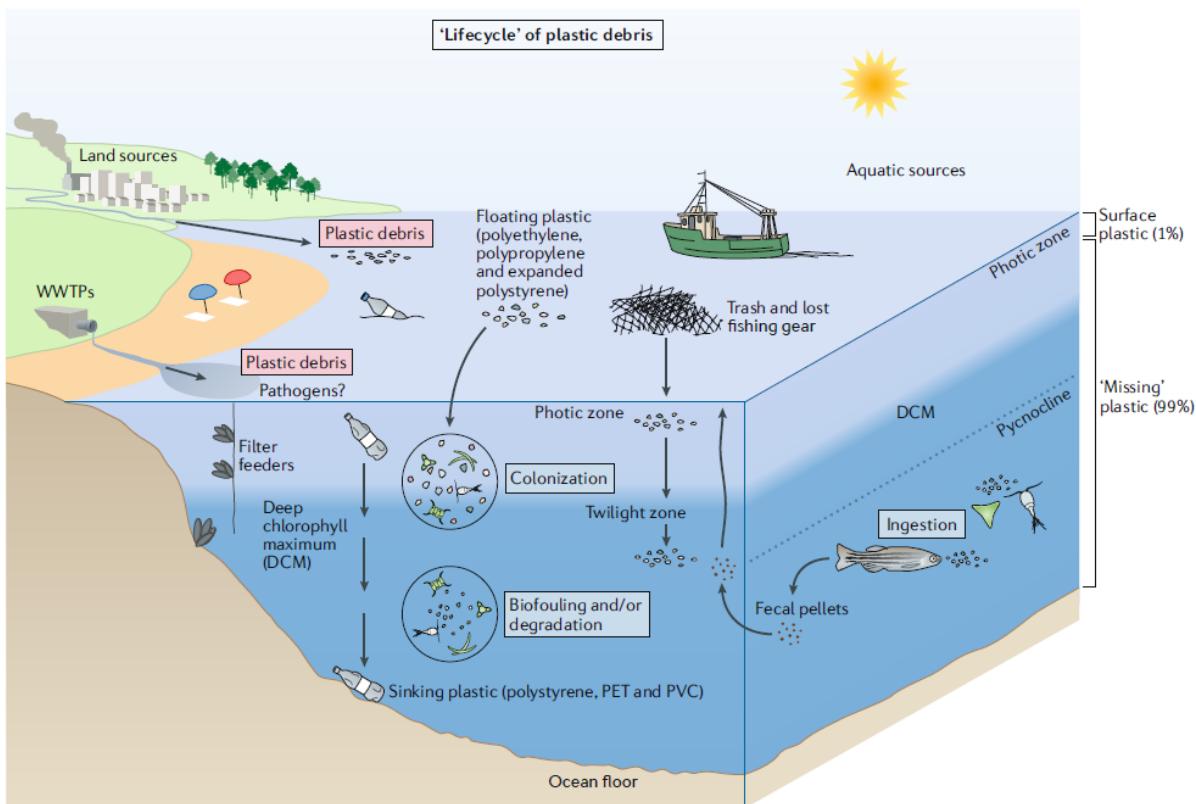


Figure 3: Schéma illustrant les nombreux cycles de vie potentiels d'une pièce de plastique qui arrive dans l'océan. WWTPs : Wastewater Treatment Plant désigne la sortie de traitements d'eaux usées. DCM : maximum de chlorophylle profond (Zettler *et al.*, 2020)

Environ 80 % des déchets plastiques trouvés en milieu marin proviennent des activités du continent (de l'industrie, de l'usage domestique, de l'activité touristique, des rejets des décharges et des fleuves). Les 20 % restant sont directement jetés en mer par le secteur de la pêche majoritairement (Li *et al.* 2016). On estime que 75 % des déchets marins sont du plastique, de nature et de taille variables (mégots, sacs plastiques, coton-tiges, emballages, granulés plastiques).

Différentes expéditions ont été menées, principalement dans les zones d'accumulations (gyres océaniques et méditerranée) et révèlent que la quantité de plastique comptabilisée en surface ne représente qu'1% des estimations de la pollution plastique (Sebille *et al.* 2015). Le plastique manquant (Fig. 3) reste une énigme pour la communauté scientifique. De nombreuses hypothèses sont envisagées pour expliquer cet écart entre les chiffres théoriques et la quantité

réellement retrouvée en mer. La première hypothèse est que le plastique ne s'accumule pas uniquement en surface, mais aussi dans les fonds marins et dans la colonne d'eau (Chiba *et al.* 2018; Choy *et al.* 2019). En 2019, Choy et ses collaborateurs ont notamment montré que la quantité de plastique était plus importante entre deux eaux, étude faite dans la baie de Monterey (US), alors que d'autres études considèrent que la majorité des plastiques serait dans le fond des Océans. La seconde hypothèse est que ces déchets plastiques sont ramenés à Terre en étant largement repoussés vers les côtes, où ils seraient piégés par la végétation (Hardesty and Wilcox 2020). La zone littorale (entre 0 et 8km de distance à la mer) contient 90 % des débris plastiques marins rejetés vers les côtes. La dernière hypothèse est qu'une quantité non négligeable de plastique serait ingérée par la faune marine. Plusieurs études ont montré que les animaux de tous niveaux trophiques avaient une concentration en morceaux de plastique très élevée à l'intérieur de leur appareil digestif (Jamieson *et al.* 2019; Rummel *et al.* 2016; Wilcox *et al.* 2018; Choy *et al.* 2019).

A ce jour, il n'existe plus aucun écosystème aqueux non contaminé par le plastique. Cette pollution est largement trouvée dans l'eau de mer (Barnes *et al.* 2009; Bergmann *et al.* 2017; Sharma and Chatterjee 2017), la fosse des Mariannes (Chiba *et al.* 2018), la mer arctique (Lusher *et al.* 2015; Peeken *et al.* 2018), l'océan Austral (Isobe *et al.* 2017), les eaux côtières du monde (Dussud *et al.* 2018b; Zhao *et al.* 2018), les estuaires (Zhao *et al.* 2014) dans les lacs (Faure *et al.* 2015), les rivières (Morritt *et al.* 2014; Lebreton *et al.* 2017). Le plastique a infiltré tous les écosystèmes aqueux, la chaîne trophique et les produits dérivés de la mer. On le retrouve ainsi dans les produits de consommation courante tel que le sel de table (Yang *et al.* 2015), l'eau potable (Oßmann *et al.* 2018; Pivokonsky *et al.* 2018) et dans les bivalves élevées pour leur consommation (Van Cauwenberghe and Janssen 2014).

### 1.3. Quantification et focus sur les zones d'études de la thèse

Chaque année 1,15 à 2,41 millions de tonnes de plastique se concentrent dans nos océans, mers, rivières au gré des courants (Lebreton *et al.* 2017). Comme plus de la moitié de ces plastiques est moins dense que l'eau douce, ils resteront en surface à leur entrée dans l'écosystème marin. Les rejets mondiaux de micro-plastiques primaires représenteraient quant à eux 1,5 millions de tonnes par an (Boucher and Friot 2017). Une estimation du nombre total de particules de plastique flottant dans tous les océans, basée sur 24 expéditions océanographiques (2007-2013), évalue à 5,25 trillions le nombre de morceaux de plastiques. L'ensemble de tous ces morceaux de plastiques pèserait près de 270 000 tonnes (Eriksen *et al.* 2014).

Comme indiqué précédemment, cette pollution n'est pas homogène selon les régions du monde et selon la profondeur des océans. Les débris plastiques de toutes tailles se concentrent dans la méditerranée et dans les cinq gyres océaniques du monde : Atlantique nord et Sud, Océan Indien, Pacifique Nord et Sud (Law *et al.* 2010; Eriksen *et al.* 2013; Cozar *et al.* 2014; Lebreton *et al.* 2018) (Fig. 4).

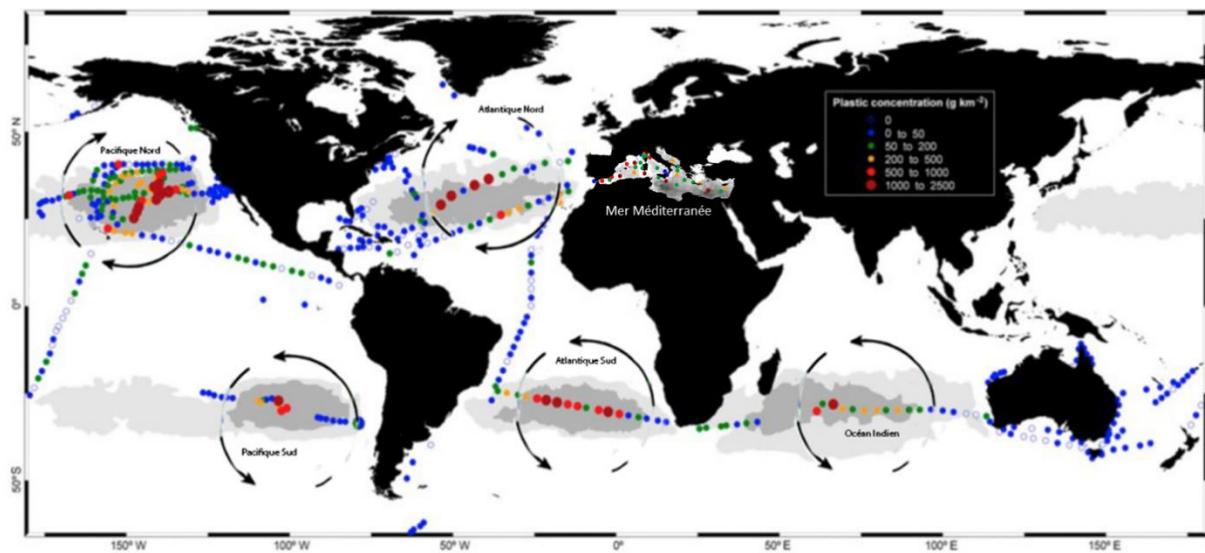


Figure 4 : Carte présentant les différents gyres océaniques, basée sur le prélèvement de 442 sites d'échantillonnages (modifié de Cozar *et al.* 2014 et 2015)

**Ici sont présentés en détails les 2 sites étudiés pendant ma thèse :**

#### **Focus sur la Mer Méditerranée :**

Si les différents gyres océaniques atteignent des concentrations records de plastique, la mer Méditerranée a atteint des concentrations proche de 423 g/km<sup>2</sup> (Cózar *et al.* 2015). La mer Méditerranée est surnommée « le 6<sup>ème</sup> gyre » (Cózar *et al.* 2015). Les concentrations de plastiques trouvées en mer Méditerranée sont de l'ordre de 244 000 pièces de plastique/ km<sup>2</sup> (Cózar *et al.* 2015), avec une estimation de 756 à 3000 tonnes de débris plastiques flottant à la surface (Cózar *et al.* 2015) (Tableau 1).

En mer Méditerranée, les déchets plastiques sont transportés par des courants de surface, en circuits semi-fermés du fait de l'hydrodynamisme particulier de cette mer (Fig. 5). Ce bassin est en effet une mer semi-fermée, avec un courant de surface entrant via le détroit de Gibraltar et un courant profond sortant en direction de l'océan Atlantique, ce qui provoque le piégeage et l'accumulation des déchets plastiques. Toutes ces raisons expliquent que cette mer soit l'une des mers les plus polluées au monde avec des concentrations de plastiques comparables à celles des gyres océaniques (Lebreton *et al.* 2012; Gerigny *et al.* 2019).

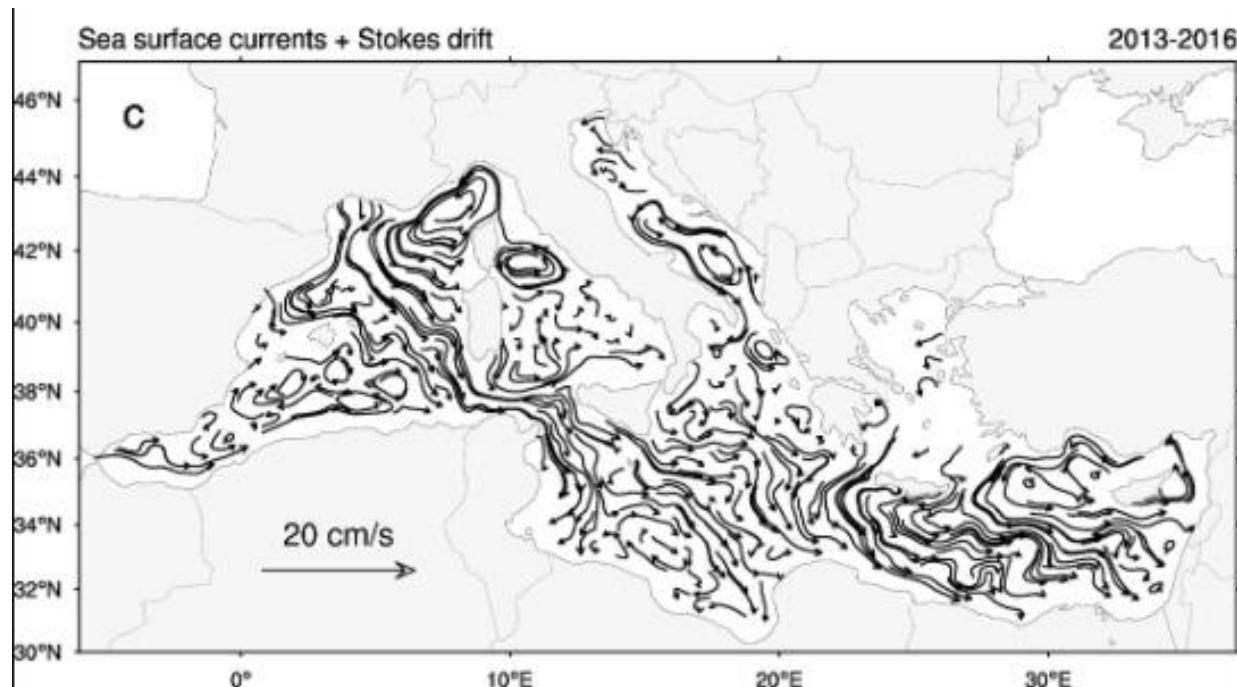


Figure 5: Représentation des courants de surfaces régissant la méditerranée (Liubartseva *et al.*,2018) pouvant expliquer l'accumulation de déchets plastiques dans ce bassin.

Depuis 2009, la quantité de déchets plastiques marins ne cesse d'augmenter en mer Méditerranée pour représenter près de 7 % de la pollution de micro-plastique, alors que cette mer ne représente que 1% des eaux marines mondiales (Sebille *et al.* 2015). L'écoulement limité des eaux de surface, le littoral densément peuplé subissant une forte pression industrielle et touristique et des activités nautiques intenses, favorise l'accumulation des déchets plastiques dans cette mer.

Les villes participant principalement à la pollution plastique en Méditerranée sont Cilicia (Turquie) avec un flux de plastiques de  $31.3 \text{ kg (km. jour}^{-1}\text{)}$ , suivi de Barcelone (Espagne) avec un flux de  $26.1 \text{ kg (km.jour}^{-1}\text{)}$  et Tel-Aviv (Israël) avec un flux de  $21 \text{ kg (km.jour}^{-1}\text{)}$  (Liubartseva *et al.* 2018) (Fig. 5). Selon les dernières études l'Egypte, la Turquie et

l'Italie contribuerait au 2/3 de la pollution plastique de la Méditerranée (Jambeck *et al.* 2015; Geyer *et al.* 2017; Liubartseva *et al.* 2018).

L'étude des polymères a permis d'identifier que 68 % des morceaux de plastiques échantillonnés étaient constitués de polymères conventionnels (PE et PP) (Suaria *et al.* 2016). Les plastiques tels que les bouteilles et les emballages sont quant à eux trouvés en majorité aux abords des côtes (zone littorale). On estime que plus de 75 % des plastiques flottants résident dans les 50 km des eaux côtières (Liubartseva *et al.* 2018) (Fig.5).

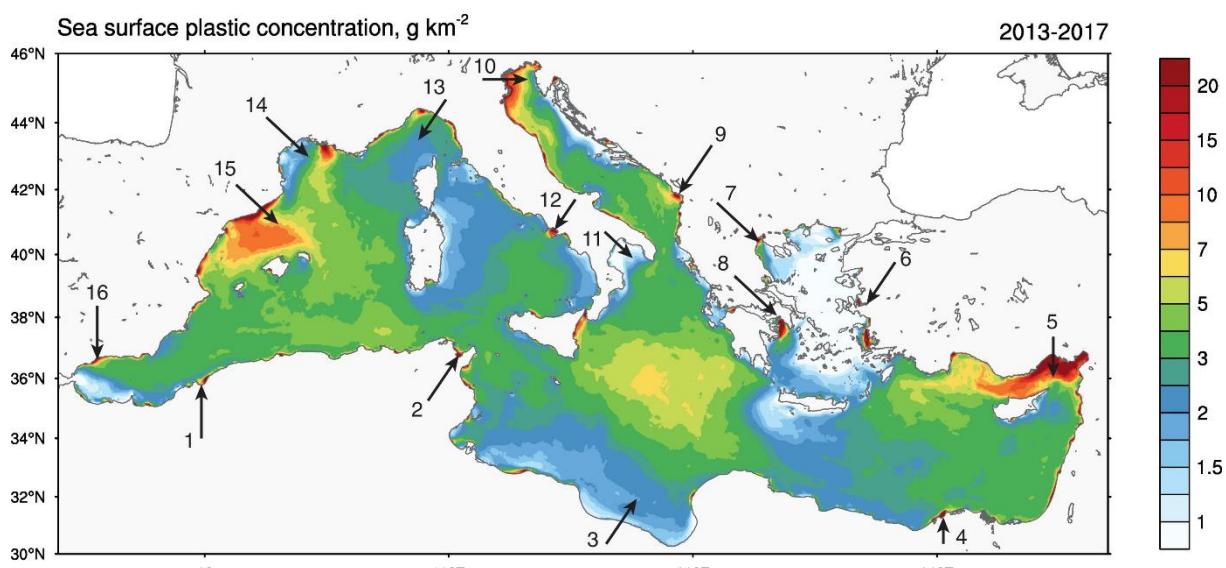


Figure 6 : Carte de la mer méditerranée de 2013 à 2017 représentant la concentration de débris plastiques ( $\text{g} \cdot \text{km}^{-2}$ ) (Liubartseva *et al.* 2018).

Les plastiques benthiques sont aussi largement trouvés en mer Méditerranée (Liubartseva *et al.* 2018; Gerigny *et al.* 2019), concentrés eux aussi dans les zones côtières (30% des plastiques). Sur l'ensemble des plastiques trouvés en milieu marin provenant de la terre, 4 % pourraient atteindre le fond en plongeant directement dans les sédiments, tandis que cette proportion passe à 30 % si ce plastique est issu des activités maritimes (Liubartseva *et al.* 2018). Un pourcentage important de cette pollution provient des activités de pêche, pollution essentiellement trouvée en zone océanique et à des profondeurs entre 150 et 200m (Pham *et al.* 2017; Gerigny *et al.* 2019). Cette pollution est aussi à l'origine des filets fantômes, abandonnés et/ou perdus par les bateaux de pêches provoquant un piège mortel pour de nombreux animaux marins. La mer Méditerranée abrite entre 4 et 18 % des espèces marines (Bianchi and Morri 2000), qui sont fortement touchées par l'ensemble de la pollution plastique. Des centaines d'espèces de tortues (Campani *et al.* 2013), de phoques, de cachalots (de Stephanis *et al.* 2013), d'oiseaux de mer (Codina-García *et al.* 2013), de poissons (Collignon *et al.* 2012), et

d'invertébrés sont tués par ces engins de pêche abandonnés (Green 2020). On estime qu'entre 2 637 et 3 342 tonnes de filets sont perdus chaque année (Golik 1997).

### **Focus : Le gyre du Pacifique Nord ou « septième continent » :**

Le « Great Pacific Garbage Patch » (GPGP) ou le gyre du Pacifique Nord ou encore appelé « septième continent » est une zone d'accumulation de déchets plastiques mise en évidence en 1997 par Charles Moore (Moore *et al.* 2005) (Fig. 7). Ce gyre de plastiques est le plus grand des 5 gyres océaniques (Lebreton *et al.* 2018), situé à mi-chemin entre Hawaii et la Californie. Les variations saisonnières de vents et de courants le font dériver et son emplacement précis est amené à changer constamment. Le déplacement saisonnier est caractérisé d'Ouest en Est principalement avec un déplacement du Nord vers le Sud selon les années (Lebreton *et al.* 2018). Les dernières expéditions montrent qu'il se situe autour de 32 °N et 145 °W dans le Pacifique.

L'accumulation de plastiques flottant dans cette zone du globe s'explique par les courants océaniques. Ce courant est situé entre l'équateur et la latitude 50 °N et occupe une surface approximative de 34 millions de km<sup>2</sup>. Il crée deux zones d'accumulation de plastiques dans le Pacifique le « Patch de déchets de l'Est », autrement dit le GPGP, celui étudié lors de l'expédition menée durant cette thèse et le « Patch de déchets de l'Ouest » .

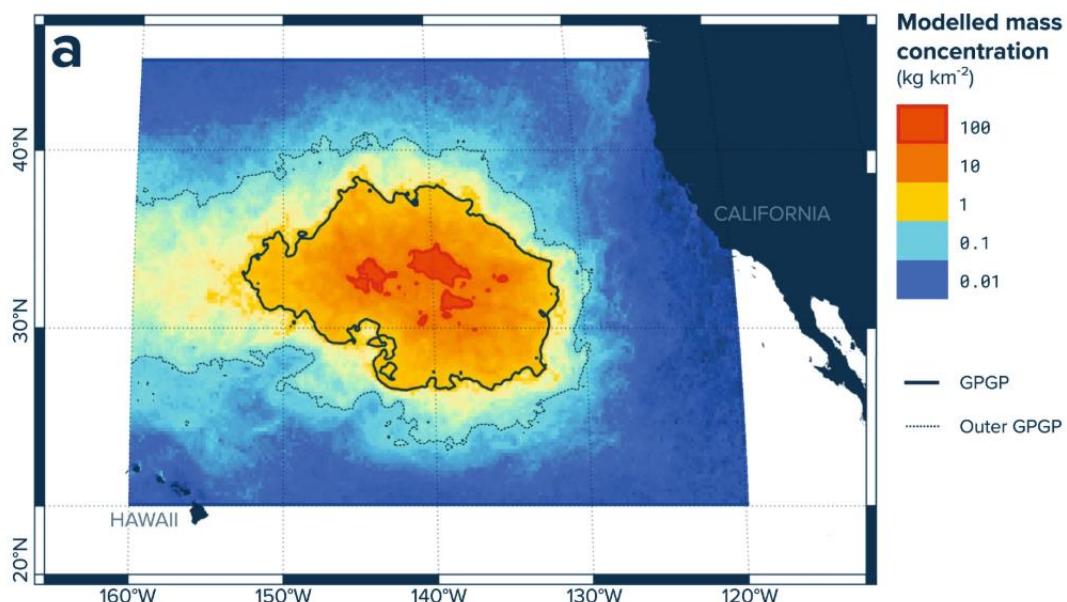


Figure 7 : Représentation du gyre du Pacifique Nord à l'Ouest (Lebreton *et al.* 2016). Ce gyre mesure 1.6 millions de km<sup>2</sup>.

Depuis quelques années, les études du GPGP se sont multipliées jusqu'à la dernière grande étude organisée par l'ONG « ocean cleanup » qui ont permis de caractériser plus précisément ce gyre océanique (Lebreton *et al.* 2018). En 2015, ils ont entrepris une expédition avec plusieurs navires pour caractériser les plastiques à la surface de l'eau. Un an plus tard, ils ont complété ces données avec des images satellite obtenues par avion afin de permettre une caractérisation plus précise de l'étendue du gyre. Ainsi, leur estimation montre que ce gyre a une taille de 1,6 millions de km<sup>2</sup>. Le gyre a pour caractéristique principale de concentrer la masse des plastiques dans les deux premiers mètres sous la surface de l'eau (Reisser *et al.* 2014; Kooi *et al.* 2016). La pollution plastique dans ce gyre est constituée à 94 % de micro-plastiques situés sous la surface, ce qui rend imprécise l'estimation de son étendue (Reisser *et al.* 2014; Kooi *et al.* 2016).

La totalité des déchets plastiques présents dans cette zone est estimée à 100 000 de tonnes (Lebreton *et al.* 2018), avec des concentrations allant jusqu'à 1,3 million de particules par km<sup>2</sup> (Egger *et al.* 2020). Dans cette zone, les déchets plastiques représentent 99,9 % des débris flottants et 46 % d'entre eux sont des filets de pêche (Lebreton *et al.* 2018). La concentration de plastique est estimée à 100 kg.Km<sup>-2</sup> au centre du gyre et à 10 kg. Km<sup>-2</sup> à l'extérieur de ce dernier (Lebreton *et al.* 2018) (Tableau 1).

Les déchets plastiques du gyre du Pacifique Nord proviendraient principalement de 6 pays : la Chine, l'Indonésie, les Philippines, le Vietnam, le Sri-lanka et la Thaïlande (Jambeck *et al.* 2015). Le type de plastique trouvé dans cette zone est similaire à celui de la Méditerranée, principalement du PE et du PP et des déchets de pêche abandonnés (46%) (Lebreton *et al.* 2018).

Le plastique présent à la surface du GPGP est 180 fois plus abondant que toutes formes de vie marine (Gall and Thompson 2015). Cela a pour conséquence que l'alimentation de certains animaux habitant cette région comme les tortues (Clukey *et al.* 2017) et les poussins d'albatros ingèrent en masse ce plastique (Gall and Thompson 2015). Dans cette zone 84 % des plastiques contenaient un produit chimique toxique (Chen *et al.* 2018).

Tableau 1: Comparaison des caractéristiques des deux zones d'études : la méditerranée et le Pacifique

Caractéristiques	Great Pacific Garbage Patch	Mer méditerranée
Taille (millions de km <sup>2</sup> )	1,6	2,5
Quantité (tonnes)	45 à 129 000	756 à 3000
Concentration (/km <sup>2</sup> )	1 300 000	13 615
Proportion en micro-plastique (nombre en %)	94	83
Concentration (kg/km <sup>2</sup> )	10 à 100	0,022 à 1,9
Composition	PE et PP	52 % PE et 16% PP

## 1.4. Impacts écologiques de la pollution plastique

La pollution plastique est une pollution visible qui attire invariablement l'attention du grand public sur ses effets sur l'écosystème marin (Fig. 8).



Figure 8 : Illustration des impacts de la pollution plastique sur l'environnement marin

Crédits photo :John Cancalosi, Justin Hafman,Stefan leijon , Jordi Chias

### 1.4.1. Impact sur les organismes vivants en milieu marin

Les déchets plastiques ont colonisé tous les environnements marins et tous les niveaux trophiques : du zooplancton à la mégafaune. On estime aujourd’hui que 700 espèces marines sont directement impactées et qu’au moins 17 % sont sur liste rouge de l’UICN (union internationale pour la conservation de la nature) et répertoriées comme menacées (Gall and Thompson 2015) (Fig. 9). Les conditions dans lesquelles les animaux sont impactés par la pollution plastique sont multiples, étranglement, blessures, piégeages, ingestion et accumulation de débris plastiques dans le système digestif (Ivar do Sul and Costa 2014). Les autres impacts néfastes du plastique sont moins évidents mais tout aussi sévères, comme l’accumulation de composés lipophiles, tels que les polluants organiques persistants (POPs) (Rios *et al.* 2007), le transport d’espèces invasives et potentiellement pathogènes (Amaral-Zettler *et al.* 2020), l’augmentation d’échange des gènes dans l’écosystème aqueux (Arias-Andres *et al.* 2018) (Fig. 9).

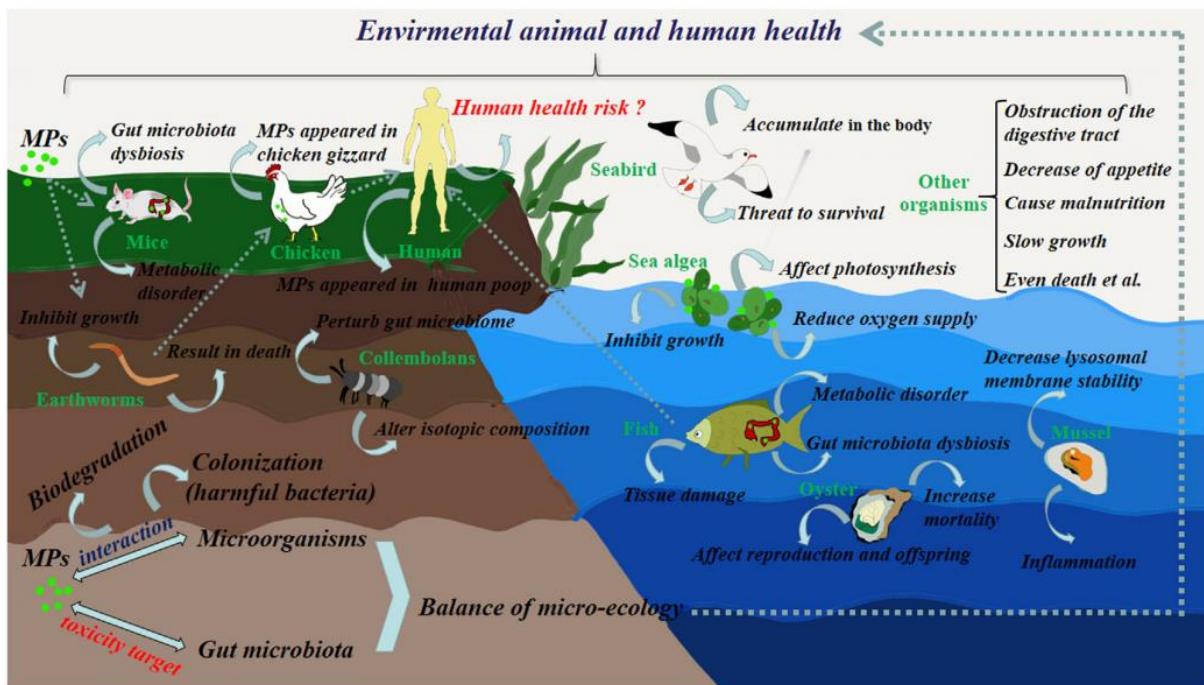


Figure 9 : Impacts négatifs sur les principaux organismes terrestres et aquatiques. Lu et al. 2019

La conséquence la plus médiatisée de la pollution plastique en mer concerne les cas d'ingestions de plastiques, aboutissant à la mort prématuée de plus de 1,5 millions de vertébrés par an (oiseaux, poissons, tortues, mammifères...) (Kühn *et al.* 2015). Du plastique a été trouvé dans le système digestif de 100 % des tortues marines, 40 % des oiseaux de mer et de 50 % des espèces marines (Kühn *et al.* 2015) (Fig. 9). Ce plastique peut amener à un blocage du contenu digestif dans l'estomac pouvant aller jusqu'à la rupture de l'organe, mais aussi perforez des organes internes (Brandão *et al.*) ou bloquer le transit du tube digestif (Colabuono *et al.* 2009; Tourinho *et al.* 2010). Un large éventail de la macrofaune marine ingère des plastiques : des cétacés, des tortues marines, des oiseaux de mer, des poissons côtiers (qu'ils soient pélagiques ou benthiques) ou encore certains invertébrés tels que les éponges et les coraux (Green 2020). Le zooplancton est lui aussi impacté par l'ingestion de ces plastiques, provoquant une malnutrition, cela a pour conséquence de ralentir sa croissance et dans le pire des cas peut le conduire à sa mort (Cole *et al.* 2013; Lee *et al.* 2013; Kaposi *et al.* 2014). Au niveau moléculaire et cellulaire, ces plastiques peuvent perturber les organismes en impactant les réponses générales au stress oxydatif (huitres et bar), en impactant les neurones des bars, en impactant les réponses immunologiques et l'activation des voies de détoxification du corail (Green 2020) (Fig. 9). Des modifications au niveau de processus biologiques comme la respiration, l'appétit, la croissance (Lo and Chan 2018; Mouchi *et al.* 2019), la reproduction (Sussarellu *et al.* 2016)

et le comportement (Chapron *et al.* 2018) ont été mis en évidence chez certains animaux tels que les huîtres, les moules, les copépodes, etc. (Green 2020). Les organismes au sommet de la chaîne trophique ou ayant une grande espérance de vie comme le rorqual ou la baleine sont régulièrement exposés à cette pollution. Certains travaux ont mis en évidence la présence de phtalates (additifs provenant notamment du plastique) dans leurs graisses (Fossi *et al.* 2012).

La pêche fantôme provoquée par les filets de pêches perdus en mer impacte des centaines d'espèces différentes et représente la plus grande menace anthropique pour certaines espèces en voies de disparition tels que les phoques et les tortues (Henderson 2001; Boland and Donohue 2003). Ce piégeage perpétuel entraîne une mort rapide par asphyxie (étranglement) (Cassoff *et al.* 2011) ou une mort plus lente voire des contraintes physiques importantes. Ces contraintes sont des lésions cutanées et des mouvements restreints entraînant une diminution de la capacité à chasser des proies (Kühn *et al.* 2015) ou à se mouvoir. Les filets fantômes seraient responsables de 16 à 80 % de la mortalité des pinnipèdes (Butterworth *et al.* 2012).

Les invertébrés marins sessiles tels que les coraux, les éponges, les bivalves, larves, sont eux aussi impactés par abrasion des tissus ou étouffement (Green 2020). Cela peut aboutir à une perte considérable de la taille des récifs coralliens (Richards and Beger 2011).

La flore sous-marine est tout aussi touchée par cette pollution. Les micro-plastiques peuvent réduire la photosynthèse du phytoplancton, lié à une concentration très élevée des polymères à la surface de l'eau, obstruant ainsi la lumière du soleil. En impactant le phytoplancton, c'est la quantité d'oxygène disponible pour la vie marine qui se retrouve diminuée (Zhao *et al.* 2014).

L'écosystème microbien est quant à lui aussi affecté par des effets toxiques du plastique lié à ses additifs. Ces effets ont été décrits dans la littérature comme affectant les bactéries, les champignons et les levures, provoquant des inhibitions de croissance, l'interruption de la fonction écologique ou encore l'apparition de réaction de stress, et pouvant aller jusqu'à la mort du micro-organisme (Nomura *et al.* 2016; Sun *et al.* 2018).

### 1.4.2 Cas des Polluants Organiques Persistants (POPs)

Les Polluants Organiques Persistants (POP) sont définis selon leur toxicité sur la santé humaine ou animale, leur persistance dans l'environnement, leur bioaccumulation dans les tissus vivants et leur transport sur de longue distance. Ces POPs sont classés en deux catégories : la première regroupe les additifs, les monomères et les oligomères de molécules constitutives au plastique ; la seconde catégorie regroupe les composés organiques souvent hydrophobes qui sont adsorbés par le polymère.

Les plastiques contiennent de nombreux additifs dans le but d'améliorer leurs propriétés mécaniques, esthétiques, la stabilité, et leurs prix de revient. Les phtalates (dérivés de l'acide phtalique), faisant partie de ces additifs, sont facilement libérés dans le milieu car ils ne sont pas liés par de fortes liaisons aux polymères.

D'autre part, les plastiques sont généralement imperméables à l'eau et donc hydrophobes, ce qui attire les POPs qui eux sont lipophiles. Les micro-plastiques ayant un rapport surface/volume élevé, concentrent les POPs jusqu'à 6 fois plus que l'eau (Hirai *et al.* 2011). Quelques études se sont concentrées sur l'étude des POPs associés aux micro-plastiques et ont trouvé qu'un large éventail d'additifs est associé aux particules de plastique (organophosphate esters (OPE), hydrocarbures aromatiques polycycliques (PAH), pesticides organochlorés (OCP), ...) (Zhang *et al.* 2020). Le transfert de ces POPs dans l'environnement ou au sein des organismes, reste peu étudié tant les POPs agglomérés sur le plastique sont nombreux. Cependant il semblerait que le taux de lixiviation des plusieurs additifs serait plus important dans l'environnement marin que dans les voies intestinales des micro-organismes (Koelmans *et al.* 2014).

Les micro-plastiques sont rapidement accumulés à différents niveaux de la chaîne alimentaire (Carbery *et al.* 2018), cependant l'effet combiné causé par les micro-plastiques et les polluants organiques est encore peu documenté et les études se contredisent. Par exemple, des études toxicologiques se basant sur la mortalité, le comportement alimentaire, l'immunité et les biomarqueurs du stress oxydatif au niveau des organismes représentatifs de l'écosystème étudié, ne montrent pas d'effets indésirables des POPs sur les organismes tels que la moule et certains poissons (Ašmonaitė *et al.* 2018; Magara *et al.* 2018). Dans ces études, on ne constatait

pas d'augmentation de mortalité des animaux testés, ni d'effets inhibiteurs des fonctions métaboliques, ni de réponses de type stress oxydatif (Oliveira *et al.* 2013; Magara *et al.* 2018). D'autres études avancent aussi que la synergie des POP et du micro-plastique diminue la toxicité sur certaines micro-algues (Zhu *et al.* 2018). A l'opposé, d'autres études mettent en avant un taux de mortalité plus important, une alimentation et une immunité diminuée lorsque l'organisme marin (arénicole) étudié est mis en contact avec une concentration en micro-plastique élevée (Browne *et al.* 2013).

## 2. Les différentes classes de polymères

Comme précédemment indiqué, le plastique est omniprésent dans nos objets du quotidien. Leurs différentes applications imposent des qualités bien différentes et donc des polymères très diversifiés. Les plastiques sont définis comme un mélange contenant une matière de base (polymère) pouvant être moulé, façonné, à chaud ou sous pression. Ils peuvent être produits à partir de différentes ressources, d'origine fossile (pétrole brut, gaz, etc.) appelés « plastiques conventionnels » ou d'origine renouvelable (végétaux, bactéries, lait, amidon, etc.) appelés « plastiques biosourcés ». Les polymères conventionnels (Polyéthylène-PE, Polypropylène-PP, Polytéréphthalate d'éthylène -PET, ...) constituent la grande majorité des produits utilisés dans notre quotidien. La nature et l'origine du polymère peut être déterminant pour sa durabilité dans l'environnement. Un polymère biodégradable, selon les normes actuellement en vigueur est un polymère dont le carbone organique est capable d'être transformé en CO<sub>2</sub> (au moins 60 % par rapport à la cellulose) ou en biomasse par une communauté microbienne. Les détails des normes est expliqué dans la partie 4.3.

### 2.1. Polymères conventionnels

Les Plastiques conventionnels, d'origine fossiles sont classés en 2 catégories :

- **Les thermoplastiques**, qui peuvent fondre s'ils sont chauffés et durcissent lors du processus de refroidissement. Ces propriétés sont réversibles et le plastique peut être remodelé plusieurs fois. C'est le cas du PE, PP, PET, par exemple.
- **Les thermodurcissables** ne peuvent pas être refondus après avoir été modelés, leur point de fusion élevé empêche le polymère de redevenir souple et son recyclage est impossible. Cela concerne le Polyurethane, le Vinyl ester, le Silicone...

Les thermoplastiques peuvent être retrouvés à l'état physique cristallin, c'est-à-dire que les chaînes de carbones sont linéaires, ordonnées et liées entre elles par de fortes liaisons intermoléculaires donnant une matière rigide (PE haute densité, HDPE), ou sous forme amorphe avec des chaînes ramifiées, désordonnées avec des liaisons faibles (PE basse densité, LDPE) (Tableau 2). Parmi les polymères conventionnels, les plus abondants sont les polyoléfines avec une majorité de polypropylène (PP) et de Polyéthylène à faible ou haute densité (LD-PE et HD-PE) (Tableau 2). Ces polymères sont hydrophobes, inertes à beaucoup de produits chimiques (aux solvants, acides, bases...), ils ont une faible densité, ils sont résistants et modifiables, expliquant le succès mondial qu'ils rencontrent depuis des dizaines d'années.

Le Polyéthylène téréphtalate (PET), thermoplastique, formé d'un alcool, d'un éthylène glycol et de l'acide téréphtalique est un plastique conventionnel qui nécessite presque deux kilos de pétrole brut pour fabriquer un kilo de PET. Le PET est amorphe, transparent, résistant à des pressions élevées (environ 10 bars), donnant des films d'une très grande solidité et stabilité. Ces caractéristiques font de lui le 6<sup>ème</sup> polymère le plus demandé en Europe avec un besoin de près de 4 millions de tonnes en 2018 (Plastic Europe 2019). C'est le polymère le plus abondant dans le monde avec près de 70 millions de tonnes fabriquées chaque année (Tournier *et al.* 2020). On le trouve habituellement dans les bouteilles recyclables (étanches au CO<sub>2</sub>), dans de nombreuses cartes (carte de crédit, fidélité), fibres textiles, emballages, films transparents, etc. Pourtant ces caractéristiques font de lui un polymère qui limite fortement le recyclage. En effet la molécule de poly (téréphtalate d'éthylène) s'hydrolyse à température élevée (240°C), provoquant la chute de son poids moléculaire et le rendant inutilisable pour un usage habituel. Cependant une nouvelle étude parue récemment montre le potentiel recyclable du PET, grâce à une nouvelle enzyme (PET depolymerase) capable de dépolymériser par voie biologique les déchets plastiques en PET (Tournier *et al.* 2020). Cette enzyme permet d'obtenir un PET recyclé biologiquement ayant les mêmes propriétés que le PET issu de la pétrochimie.

Tableau 2 : Les plastiques étudiés lors des expériences menées dans cette thèse. Le Mater-Bi et le Bioplast sont des mélanges de polymère effectuée par une entreprise, leur structure exacte ne sont pas connus, ce sont des marques déposées.

Noms	Abréviation	Structure	Utilisation	Biodégradable
Poly(ethylene)	PE		Emballage plastique, produits rigides (flacons, bouteilles, tupperware) ou souples (sacs, films, sachets, sac poubelles)	Non biodégradable
Poly(propylene)	PP		Pièces moulés, pare-chocs, tableaux de bord, réservoirs d'essence, emballage alimentaire, tissus d'ameublement, vêtements professionnels jetables	Non biodégradable
Poly(lactic acid)	PLA		Emballage alimentaire, chirurgie pour les sutures, stent, matériaux d'imprimantes 3D	En compost
Poly(butylenes Succinate)	PBS		Envisager dans le domaine de l'emballage de l'agriculture, aquaculture, foresterie, génie civil, médical	Eau douce
Polybutylene adipate terephthalate	PBAT		Emballage alimentaire, sac jetable, utilisation agricole	En compost
Mater-Bi	Mater-Bi		Emballage, sac, domaine agricole	En compost
Bioplast 400	Bioplast		extrusion de film soufflé, sac, emballage alimentaire	En compost
Poly(hydroxy alkanoate)	PHA		Emballage alimentaire, domaine médical comme matériaux résorbables	En compost, En mer
Poly(hydroxy butyrate et valérate)	PHBV		Medicaments, implants et réparation médicale, emballages spécialisés, appareils orthopédiques...	En compost, en mer

## 2.2. Polymères Biosourcés

Les polymères conventionnels participent à l'épuisement des ressources pétrolières et à l'augmentation des gaz à effet de serre. En 2015, 4 % de la production mondiale annuelle de pétrole était utilisé pour la plasturgie (Plastics Europe 2015). Il devient donc important de développer une alternative plus respectueuse de l'environnement qui n'utilise pas le pétrole comme matière première. Les polymères d'origine biologique sont fabriqués, en totalité ou en partie, avec des ressources biologiques renouvelables (animales ou végétales), de déchets alimentaires ou encore de sous-produits agricoles et sont appelés bioplastiques. En 2018, les bioplastiques représentaient 2,1 millions de tonnes, soit moins de 1% du marché mondial des plastiques. Tous les bioplastiques ne sont pas biodégradables. Parmi la production mondiale de

plastiques biodégradables, ce sont deux polymères biosourcés qui dominent cette production : ceux à base d'amidon et le PLA (Fig.10).

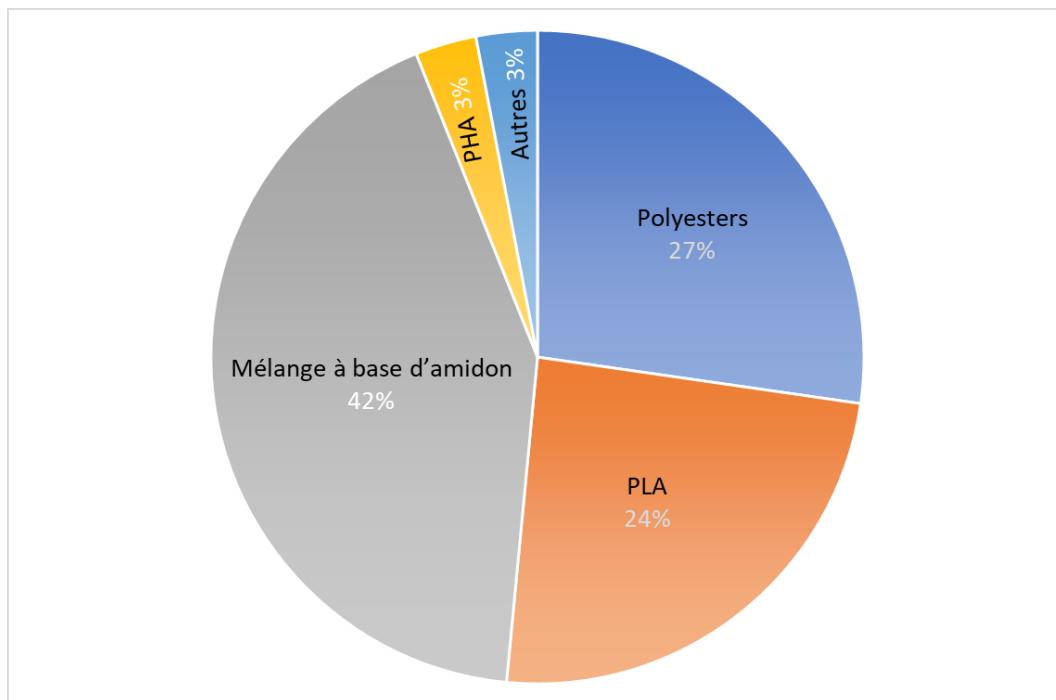


Figure 10 : Proportion de la production mondiale de plastiques biodégradables (PlasticEurope, 2018)

La liste des polymères biosourcés ci-dessous n'est pas une liste exhaustive. Ils ont été sélectionnés parce qu'ils ont été utilisés dans la cadre de la thèse.

### 2.2.1. Acide Polylactique (PLA)

Le PLA est un polymère à 100% d'origine biosourcée (Bogaert , 2000) ayant comme principale source l'amidon de maïs ou de betterave. Il est composé d'enchainement d'homopolymère de  $(C_3H_4O_2)_n$ . Le sucre (tels que l'amidon) est converti en acide lactique par fermentation bactérienne (Fig.11).

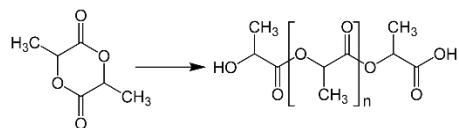


Figure 11 : Synthèse de l'acide polylactique (PLA)

Le PLA est le plastique biosourcé le plus courant sur le marché (European bioplastics, 2018). Ses propriétés mécaniques et optiques en font un bon substitut aux plastiques conventionnels et le rend performant dans le domaine de l'emballage alimentaire. Il est également fortement

utilisé dans le domaine médical (Anderson and Shive 2012). Il est reconnu comme biodégradable en compost industriel où la haute température et l'abondante flore microbienne favorisent le processus de biodégradation (Ghorpade 2001; Leejarkpai *et al.* 2011).

### 2.2.2. Le poly(butylène succinate) PBS

Le PBS, considéré comme biodégradable, fait partie de la famille des polyesters, aliphatiques, ayant un haut poids moléculaire. La formation de ce polymère est obtenue par l'estérification directe de l'acide succinique avec une molécule de butanediol, composé d'un enchainement de  $(C_8H_{12}O_4)_n$  (Fig. 12).

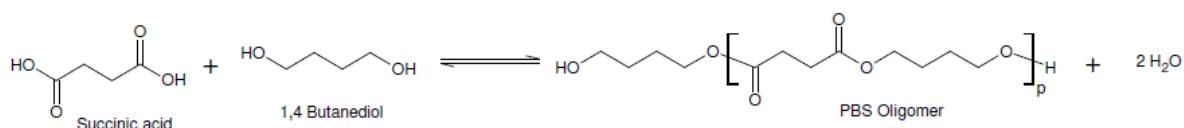


Figure 12 : Synthèse du Polybutylene succinate (PBS)

Le PBS est principalement utilisé dans le domaine de l'emballage pour être transformé en films, sacs ou boîtes. On le retrouve aussi dans le domaine de l'agriculture, qui sert de films de paillage ou de matériaux à libération retardée de pesticides ou d'engrais.

### 2.2.3. Polubutylene adipate terephthalate (PBAT)

Le PBAT est un co-polymère d'acide adipique, de butanediol et d'acide téraphthalique. Il se présente comme une alternative biodégradable au polyéthylène basse densité. Sa flexibilité et sa résilience, lui permettent de s'illustrer dans de nombreuses utilisations comme dans le domaine de l'emballage (particulièrement les sacs).

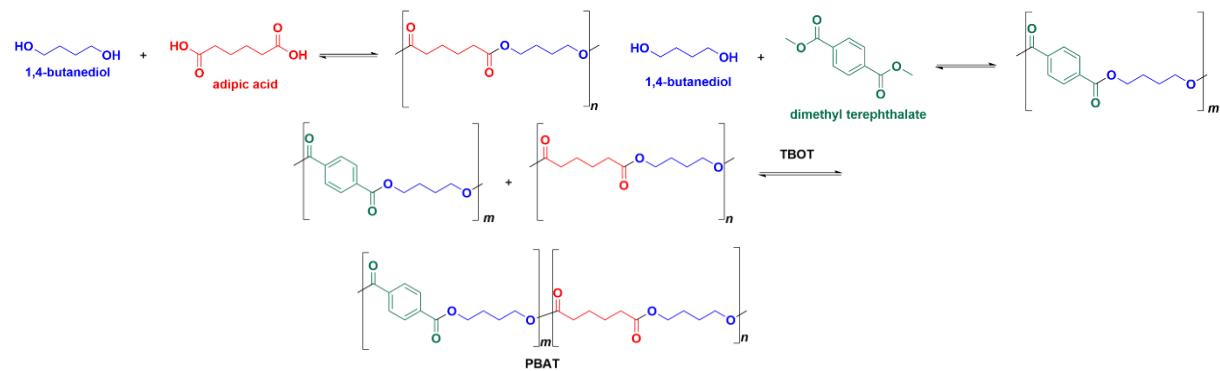


Figure 13 : Synthèse du Polybutylene adipate terephthalate (PBAT)

Ce co-polymère a une structure aléatoire ce qui signifie qu'il ne peut cristalliser qu'à une température significative en raison de son désordre structurel. Cela conduit à un point de fusion large, une rigidité faible, une flexibilité élevée et une élasticité modulable. Ce polymère est considéré comme biodégradable en compost industriel et domestique après 80 jours.

#### **2.2.4. Mater- Bi**

Ce bioplastique crée par l'entreprise NOVAMONT (Italie) est un mélange de PBAT et d'amidon principalement issu de maïs. Ce polymère est breveté et considéré comme biodégradable et compostable (industriel et domestique) car il répond aux normes Européennes en vigueur. Ce polymère est utilisé dans de nombreux secteurs comme l'agriculture, la grande distribution et la restauration rapide.

#### **2.2.5. Bioplast**

Le Bioplast est un polymère breveté, considéré comme compostable dans un compost domestique. Ce polymère contient de la féculle de pomme de terre et d'autres carbones d'origine végétale. La proportion de carbone biosourcé de la formulation dépasse 40 %. Ces propriétés le rendent intéressant pour la fabrication de films fins (environ 10 µm), qui entrent dans le domaine d'application du sac alimentaire.

#### **2.2.6. Polyhydroxy alcanoate (PHA)**

Le polyhydroxy alcanoate (PHA) a été isolé à l'institut Pasteur par Maurice Lemoigne en 1926, à partir d'une bactérie Gram positive : *Bacillus megaterium*. Le PHA est un enchainement d'hydroxyalcanoates. Actuellement, plus de 300 espèces microbiennes sont recensées comme étant capables de produire du PHA (*Bacillus* sp., *Clostridium* sp., *Streptomyces* sp., *Acinetobacter* sp., *Pseudomonas* sp., *Halomonas* sp,...) (Singh *et al.* 2018). Le PHA est contenu dans une granule de réserve qui s'accumule dans le cytoplasme des cellules microbiennes pour leur servir de réserve de carbone et d'énergie. L'accumulation de granules de PHA est déclenchée lorsque ces micro-organismes sont placés dans un milieu avec un excès de carbone et une carence en nutriments (azote et phosphate). Chaque monomère PHA ([CO-CH<sub>2</sub>-CHR-O] n) est constitué d'hydroxyalcanoates (acides gras hydroxylés HA) liés entre eux par des liaisons esters (C-O-R) (Williams and Martin 2005). Le groupe alkyle varie d'un groupe méthyle à un groupe tétradécyle. Les espèces microbiennes recensées sont capables de produire

150 monomères d'hydroxyalcanoate différents, laissant supposer une diversité de propriétés différentes et une multifonctionnalité (Castro-Sowinski *et al.* 2010).

### 3. La plastisphère

Le terme de « plastisphère » est apparu récemment dans la littérature, avec l'étude menée par l'équipe de Zettler *et al.* (2013), grâce à l'apparition des techniques modernes de séquençage. La « plastisphère » décrit la vie microbienne qui se développe sur les plastiques. Leurs travaux ont montré une vie microbienne diversifiée, abondante et distincte des micro-organismes vivant à l'état libre dans l'eau de mer environnante. Depuis lors, plusieurs expéditions ont été menées dans divers environnements marins, tels que le gyre du Pacifique Nord (Debroas *et al.* 2017; Lebreton *et al.* 2018), la mer Méditerranée (Dussud *et al.* 2018b), les régions polaires (Peeken *et al.* 2018), dans des zones éloignées de la civilisation comme des plages (Claessens *et al.* 2011) dont certaines proches de l'équateur (Ivar do Sul *et al.* 2009) et en mer profonde jusqu'à 10 890 m (Jamieson *et al.* 2019).

Les débris plastiques trouvés lors des différentes expéditions sont principalement composés de polyéthylène (PE), suivi de polypropylène (PP) et de polystyrène (PS) (Auta *et al.* 2017; Lebreton *et al.* 2018). L'origine des objets est rarement identifiable de par leur fragmentation importante, cependant lorsque cela est possible, on trouve majoritairement des plastiques à usages uniques ou des plastiques dits ‘jetables’ tels que des bouteilles, des emballages et du matériel de pêche (Lebreton *et al.* 2018).

Dès qu'un plastique est introduit dans l'environnement marin, il subit une colonisation microbienne également appelée ‘biofouling’. Suite à l'adsorption rapide de molécules organiques dissoutes présentent dans la colonne d'eau, on assiste à une succession de phases de croissance du biofilm qui débute par la fixation de cellules bactériennes (phase d'adhésion ou primo-colonisation), la sécrétion d'une matrice extracellulaire et la croissance de cellules dont l'adhésion est plus importante (phase de croissance) et le recrutement d'autres organismes tels que d'autres micro-organismes ou des larves et des spores (phase de maturation) (Dobretsov 2010). Quel que soit le type de polymère, la diversité du biofilm mature est très différente de celle des bactéries libres (Debroas *et al.* 2017) ou des bactéries attachées aux particules organiques qui vivent dans l'eau de mer environnante (Oberbeckmann *et al.* 2018; Dussud *et*

*al.* 2018b). Des observations similaires ont été faites pour les communautés fongiques (Kettner *et al.* 2017).

### 3.1. La plastisphère en milieu marin

L'existence de niches écologiques des communautés bactériennes dans l'environnement marin est souvent attribuée aux facteurs environnementaux tels que la salinité, la température, la profondeur ou l'attachement aux particules organiques (Ghiglione *et al.* 2012). L'originalité du biofilm vivant sur les plastiques, confère au plastique la notion de niche écologique pour les communautés microbiennes au même titre que les micro-organismes vivant dans l'eau de mer environnante (sous forme libres ou attachées aux particules organiques (Dussud *et al.* 2018b)) ou vivant dans les sédiments (Delacuvellerie *et al.* 2019) ou sur des particules de bois ou de verre (Oberbeckmann *et al.* 2018).

Les communautés microbiennes formant la plastisphère vont être influencées par leurs localisations géographiques, les variations saisonnières et éventuellement par le type de polymère (Basili *et al.* 2020). Plusieurs travaux ont démontré que la richesse microbienne sur les plastiques est moins importante que dans le milieu environnant, mais une plus grande équitabilité entre les espèces a été détectée (Delacuvellerie *et al.* 2019; Amaral-Zettler *et al.* 2020).

En mer, certaines bactéries ont une préférence pour un mode de vie attaché plutôt qu'un mode de vie libre, ce qui laisse à penser que nous pouvons retrouver beaucoup de colonisateurs opportunistes sur la plastisphère. Ce phénomène n'est pas spécifique des micro-plastiques ; il a déjà été mis en évidence dans les océans pour les particules en suspension (Witt *et al.* 2011). La famille des Rhodobacteraceae est connue pour sa capacité à coloniser la surface de nombreuses particules (Elifantz *et al.* 2013; Dang and Lovell 2016; Mata *et al.* 2017; Moura *et al.* 2018), et le plastique ne fait pas exception (Dussud *et al.* 2018b; Oberbeckmann and Labrenz 2020). Cependant ce sont les diatomées qui colonisent en abondance la surface des polymères (Amaral-Zettler *et al.* 2020) et leur rôle crucial pendant la formation du biofilm a déjà été démontré (Patil and Anil 2005). Après deux semaines de colonisation, les diatomées se multiplient sur le polymère et peuvent atteindre des concentrations 10 fois plus élevées par comparaison au milieu environnant (Eich *et al.* 2015). Des familles bactériennes ont aussi montré leur importance dans la colonisation primaire du plastique lors de la formation du

biofilm, comme les Rhizobiaceae, Cyanobacteriaceae ou encore les Streptomycetaceae (Fig. 14). Les Gammaproteobacteria dominent donc la phase de primo-colonisation (Harrison *et al.* 2014; De Tender *et al.* 2017; Dussud *et al.* 2018a). L'hydrophobicité et d'autres propriétés du substrat (cristallinité, structure, rugosité, température de fusion et élasticité) peuvent jouer un rôle dans la sélection des communautés bactériennes aux premiers stades de la colonisation (Pompilio *et al.* 2008), mais probablement dans une moindre mesure lorsque le biofilm devient mature (Dussud *et al.* 2018a).

Durant la phase de maturation du biofilm, la part des Gammaproteobacteria tend à diminuer au profit des Alphaproteobacteria et des Bacteroidetes (Lee *et al.* 2008; Zettler *et al.* 2013; Dussud *et al.* 2018a) (Fig. 14). Indépendamment du type de polymère, des espèces appartenant aux genres *Pseudoalteromonas* et *Alteromonas* (Zettler *et al.* 2013; Oberbeckmann *et al.* 2016) sont largement trouvées. Certaines espèces du genre *Pseudoalteromonas* sont mises en cause dans la dégradation des hydrocarbures (Chronopoulou *et al.* 2015). Des espèces capables d'adhérer fermement à la surface du polymère arrivent à prospérer, comme les membres de la famille de Hyphomonadaceae (Zettler *et al.* 2013; Bryant *et al.* 2016; Oberbeckmann *et al.* 2018) ou ceux de la famille des Sphingomonadaceae (Fig. 14). Cette dernière est déjà largement étudiée pour leur capacité à dégrader les hydrocarbures (Rosenberg *et al.* 1980; Kertesz *et al.* 2019).

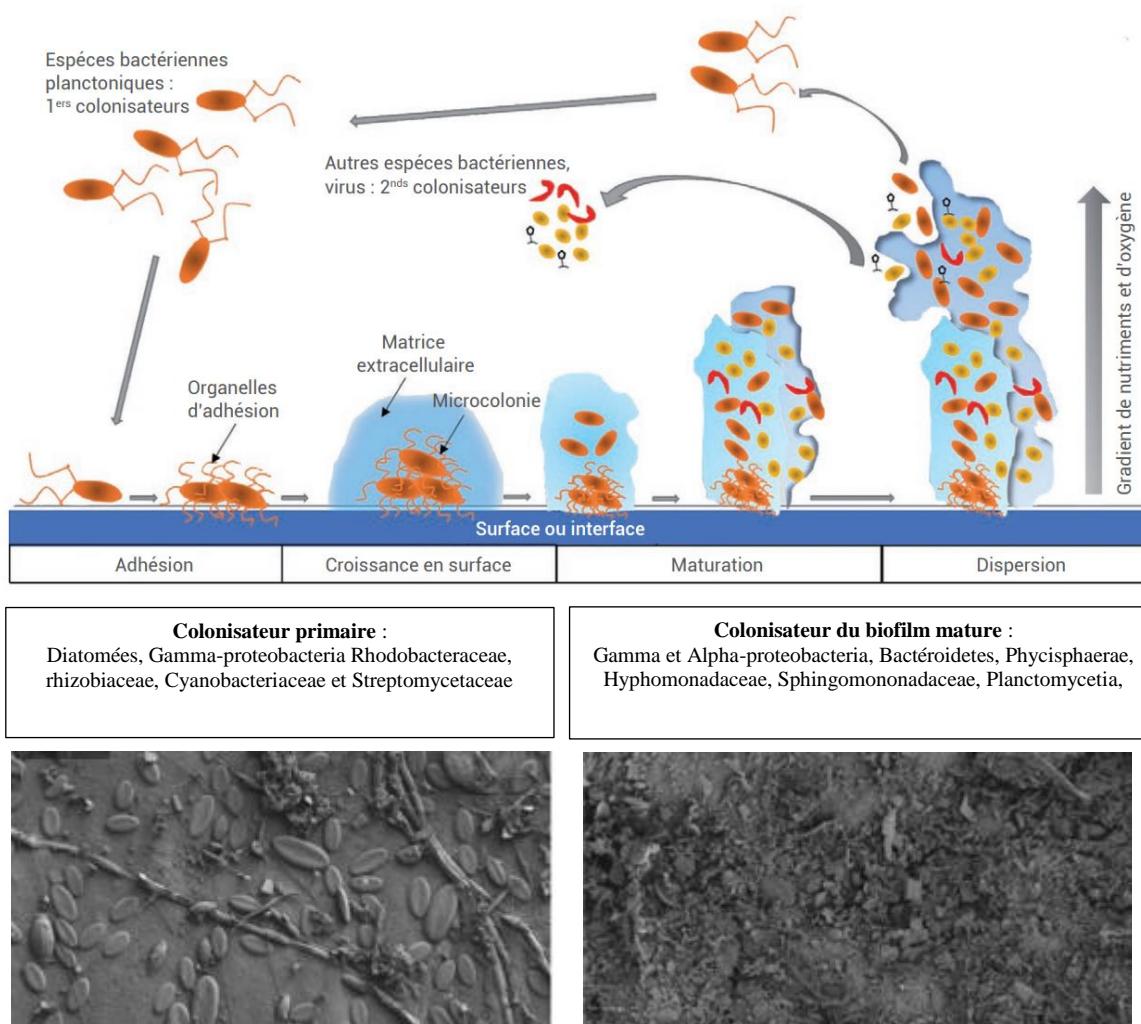


Figure 14 : Différentes étapes de la formation du biofilm microbien retrouvés sur les polymères (modifié de Douarche et al. 2018). Image SEM : Zettler et al. 2020

La plastisphère étudiée lors d'expéditions, ou de prélèvement *in situ*, permet l'étude du biofilm mature uniquement, présent depuis parfois plusieurs années sur le polymère et soumis aux facteurs environnementaux.

### 3.2. Particularité de la plastisphère par comparaison aux micro-organismes de l'eau environnante

Les communautés microbiennes de la plastisphère vont généralement partager plus de similarité avec celles attachées aux particules que celles vivant librement dans l'eau environnante. Les communautés vivantes sur les particules organiques sont dominées par les Alphaproteobacteria (principalement *Erythrobacter* sp., lignée abondante sur les plastiques) et les Gammaproteobacteria (principalement *Alteromonas* sp., lignée abondante également sur les plastiques) (Crespo *et al.* 2013; Mohit *et al.* 2014; Dussud *et al.* 2018b). L'étude des gènes fonctionnels de la plastisphère en utilisant des analyses métagénomiques a permis de distinguer les communautés de la plastisphère de celle de l'environnement marin. Les communautés détectées sur les polymères expriment des gènes impliqués dans les systèmes de sécrétion, dans des activités de biodégradation xénobiotiques (Bryant *et al.* 2016), dans les fonctions de la porphyrine et de la chlorophylle contrairement aux génomes des bactéries vivant librement ou attachées aux particules de l'environnement (Dussud *et al.* 2018b).

Fait intéressant, la plupart des études caractérisant la plastisphère ont démontré que les cyanobactéries étaient surreprésentées (en termes d'abondance relative issue de séquençage haut débit) sur les plastiques par rapport aux fractions environnantes libres et liées aux particules organiques (Zettler *et al.* 2013; Bryant *et al.* 2016; Dussud *et al.* 2018b). On trouve des taxa affiliés aux *Leptolyngbya* sp., *Pleurocapsa* sp., *Calothrix* sp., *Scytonema* sp. et *Rivularia* sp., ce qui explique souvent la différence de communauté entre les différentes parties de l'environnement marin (fraction libre, attachée aux particules ou sur les plastiques marins) (Fig.15) (Zettler *et al.* 2013; Dussud *et al.* 2018b; Basili *et al.* 2020).

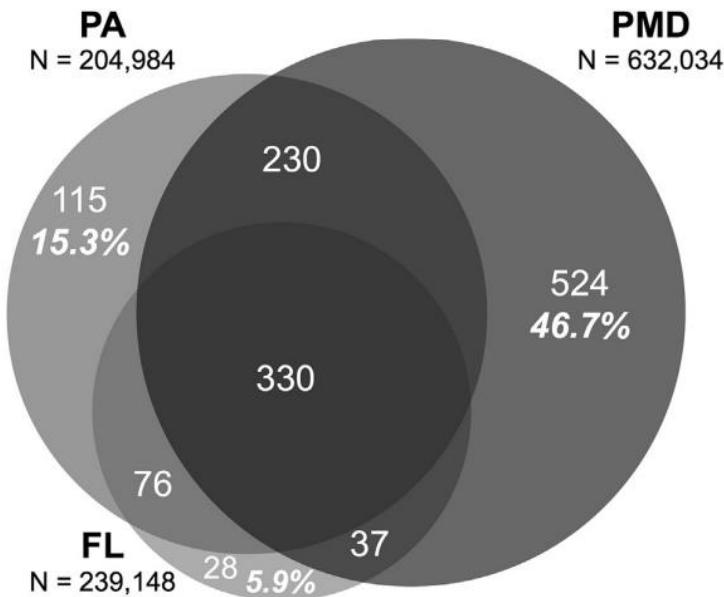


Figure 15 : Diagramme de Venn, montrant le nombre d'OTU et le pourcentage des OTU unique expliquant la différence entre les fractions vivantes librement (FL) et Particule attachée (PA) provenant d'une étude menée en méditerranée (Dussud et al. 2018)

Les taxa microbiens trouvés en abondance sur les particules de plastiques vont parfois être indétectables dans l'eau environnante ou dans les sédiments, suggérant que la surface du polymère offre des conditions plus avantageuses pour la survie et la croissance de certains groupes de procaryotes. A l'inverse des bactéries dominantes dans les eaux marines, comme par exemple *Candidatus Pelagibacter sp.* auront tendance à être très peu représentées/détectées sur les polymères conventionnels (Amaral-Zettler et al. 2020). Il en va de même pour les cyanobactéries, les communautés généralement observées dans les eaux environnantes ne sont pas celles observées en majorité sur le plastique (Bryant et al. 2016). Des genres tels que *Leptolyngbya sp.*, *Pleurocapsa sp.* et *Rivularia sp.* (Bryant et al. 2016; Dussud et al. 2018b) appartenant à la classe des Cyanobacteria sont fréquemment observés sur les polymères.

Le plastique représente donc une nouvelle niche écologique, certains groupes bactériens s'étant rapidement adaptés pour pouvoir y prospérer. Comme ces micro-organismes sont aussi présents dans l'environnement marin, aucune espèce nouvelle ou inconnue n'a été détectée dans la plasisphère (Amaral-Zettler et al. 2020).

## 4. Biodégradation des plastiques en mer

Lorsqu'un plastique arrive en mer, il subit des dégradations chimiques, physiques, thermiques et biologiques. On distingue deux types de dégradation, l'une abiotique en lien avec des facteurs environnementaux (rayons UV, hydrolyse par l'eau, température, pH) et l'autre biotique en lien avec des communautés de micro-organismes (champignons, bactéries) (Fig.16). Distinguer et caractériser cette biodégradation n'est pas aisé, tant le nombre de facteurs et d'étapes est complexe. Ces deux types de biodégradation, biotique et abiotique, interviennent simultanément sur le polymère et aboutiront à la fragmentation de celui-ci. Cependant, seule la biodégradation peut conduire à une minéralisation complète du plastique et à sa transformation complète en biomasse et en CO<sub>2</sub>.

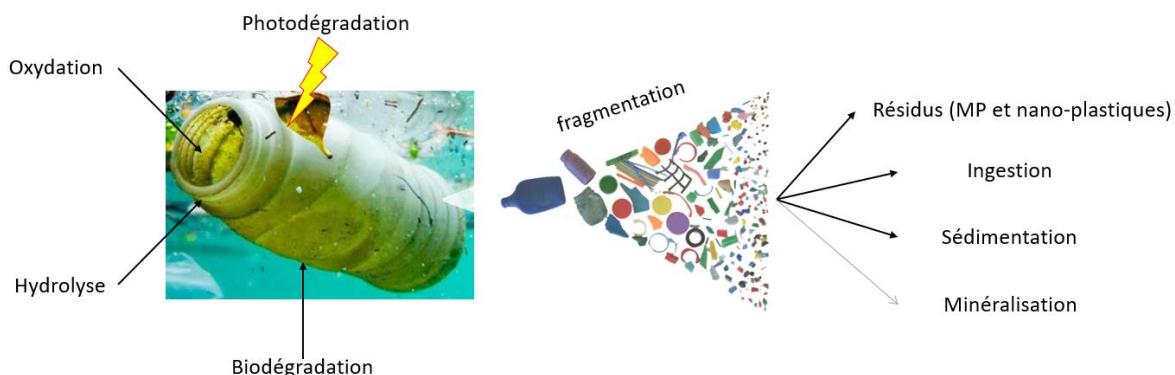


Figure 16 : Facteurs impliqués dans la dégradation abiotique et biotique des polymères en mer

Note : Cette partie est adaptée d'un article publié (Jacquin et al., 2019) dans *Frontiers in Microbiology*

## 4.1. Dégradation abiotique

La dégradation abiotique intervient dès l'entrée du polymère dans le milieu marin et généralement avant la dégradation biotique. Plusieurs formes de dégradation abiotiques sont observées :

- **La dégradation oxydative** : ce facteur est le plus important. En effet, les plastiques se situant dans la zone euphotique de l'environnement marin vont subir l'action des ultraviolets (UV) qui entraînent des modifications chimiques du polymère en oxydant les chaînes carbonées grâce à la réaction de Norrish (Sudhakar *et al.* 2008). Cette réaction permet le clivage photochimique des aldéhydes et des cétones en deux radicaux libres intermédiaires.
- **La dégradation mécanique** : créée par les vagues, les courants, fragilisant le polymère et accélérant son vieillissement au niveau moléculaire (Briassoulis 2007).
- **La dégradation thermique** : le changement de température peut fragiliser la structure du polymère. Cependant ce paramètre a beaucoup moins d'importance que dans d'autres environnements tel que le compost par exemple. En effet, bien que les polymères aient un point de fusion relativement bas, la température des océans reste largement en dessous de cette température de fusion.
- **La dégradation par hydrolyse** : agit principalement sur les liaisons ester (Gu and Gu 2005) grâce à l'eau environnante.

L'altération des propriétés plastiques due à la dégradation abiotique est appelée «vieillissement» et augmente le taux de dégradation en oxydant ou en perturbant la longueur de la chaîne polymère. Cette dégradation abiotique agit dans un second temps en synergie avec la biodégradation.

## 4.2. Dégradation biotique

La biodégradation est un processus complexe, qui même dans sa définition divise au sein de la communauté scientifique et des instituts de normalisation. Toutefois un consensus a été admis, pour définir la biodégradation du plastique en mer comme étant un processus qui se traduit par une conversion (totale ou partielle) du carbone organique en biogaz ( $\text{CO}_2$  ,  $\text{CH}_4$  ,  $\text{H}_2\text{S}$ ,  $\text{NH}_4$  et  $\text{H}_2$ ) (Mohee *et al.* 2008) et en biomasse associés à l'activité d'une communauté de micro-organismes (bactéries, champignons) capables d'utiliser le plastique comme source de carbone (Shah *et al.* 2008). Dans cette définition, il n'y a pas de notion de temps, ni de taux de

biodégradation, ce qui laisse place à de nombreux débats. Dans une revue récente, l'équipe de Zettler a proposé de mettre l'accent sur une biodégradation totale (en CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O et biomasse) et non partielle, dans un délai raisonnable (plus de 90 % de carbone doit être converti en CO<sub>2</sub> en compost et 30% du carbone doit être converti en CO<sub>2</sub> en mer (à 30°C) en 180 jours) (Amaral-Zettler *et al.* 2020). La plastisphère est de plus en plus étudiée pour ses capacités de biodégradation du polymère en milieu marin, et peut être envisagée comme une solution pour endiguer cette pollution.

On considère que la biodégradation intervient dans un second temps. Elle est facilitée par la dégradation abiotique qui fragilise la structure des polymères en révélant la rugosité, les fissures et les changements moléculaires (İpekoglu *et al.* 2007).

La capacité des micro-organismes à dégrader le plastique a été observée pour de nombreuses souches bactériennes (Shah *et al.* 2008; Krueger *et al.* 2015; Jacquin *et al.* 2019). Les champignons ont également la capacité de dégrader les plastiques, mais la plupart des études ont été menées en conditions terrestres (Cosgrove *et al.* 2007; Koitabashi *et al.* 2012; Gajendiran *et al.* 2016; Magnin *et al.* 2018). Très peu d'études existent à ce jour en conditions marines (Gonda *et al.* 2000; R. Pramila 2011; Sánchez 2020).

#### 4.2.1. Les différentes étapes de biodégradation

La biodégradation peut être résumée en quatre étapes essentielles, qui ont été décrites en détail dans une revue de Dussud and Ghiglione (2014) :

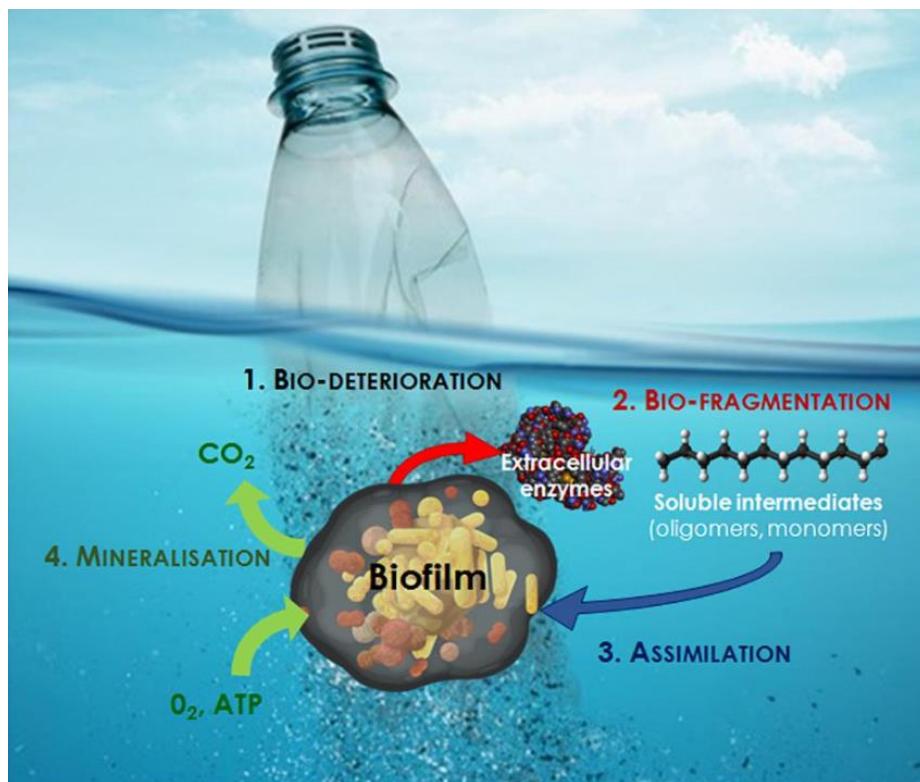


Figure 17 : Différentes étapes de la biodégradation du plastique en mer (Jacquin et al. 2019)

- La **bio-détérioration** : concerne le biofilm croissant à la surface et à l'intérieur du plastique, ce qui augmente la taille des pores et provoque des fissures qui affaiblissent les propriétés physiques du plastique (détérioration physique) ou libèrent des composés acides qui modifient le pH à l'intérieur des pores et les résultats dans les modifications de la microstructure de la matrice plastique (détérioration chimique).
- La **bio-fragmentation** : correspond à l'action des enzymes extracellulaires (oxygénases, lipases, estérasées, dépolymérasées et autres enzymes qui peuvent être aussi diverses que le large spectre des types de polymères) libérées par les bactéries colonisant la surface du polymère. Ces enzymes vont réduire le poids moléculaire des polymères et libérer des oligomères puis des monomères qui peuvent être assimilés par les cellules.

- **L'assimilation :** permet aux oligomères de moins de 600 Daltons d'être intégrés à l'intérieur des cellules pour être utilisés comme source de carbone, augmentant ainsi la biomasse microbienne.
- **La minéralisation :** est l'étape ultime de la biodégradation d'un polymère plastique et entraîne l'excrétion de métabolites complètement oxydés ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{N}_2$ ,  $\text{CH}_4$  et  $\text{H}_2\text{O}$ ).

#### 4.2.2. Taux de dégradation plastique

La biodégradation n'est pas un processus limité dans le temps. Cependant, les polymères continuent de s'accumuler en mer, liés au rythme d'introduction des déchets plastiques dans l'environnement qui est bien plus rapide que celui de la biodégradation (Tableau 2). L'environnement marin n'est pas un milieu agressif et propice à une forte biodégradation comparé au compost (industriel ou domestique) ou à la digestion anaérobiose (Tableau 2). Les taux de dégradation des plastiques conventionnels par les micro-organismes sont extrêmement faibles, même dans des conditions de laboratoire optimisées. La plupart des plastiques conventionnels sont récalcitrants à la biodégradation dans les environnements marins et terrestres, entraînant des durées de vie des polymères de plusieurs dizaines d'années voir plusieurs siècles (Krueger *et al.* 2015).

Les plastiques présentent une faible biodisponibilité car ils sont généralement solides, liés entre eux par des liaisons fortes offrant une faible accessibilité aux micro-organismes et aux enzymes, circonscrits à la couche la plus externe des morceaux de plastiques. Dans l'écosystème pélagique, les plastiques sont biodégradés par le métabolisme aérobie des micro-organismes, c'est-à-dire que le produit final de la réaction sera la biomasse microbienne, le  $\text{CO}_2$  et le  $\text{H}_2\text{O}$ . La voie de biodégradation anaérobiose serait plus fréquemment rencontrée dans les sédiments et devrait être encore plus lente que dans la zone pélagique (Ishigaki *et al.* 2004). Le rapport C / N défavorable est un facteur clé pour la biodégradation d'autres produits à base d'hydrocarbures dans les océans (Sauret *et al.* 2016) et peut potentiellement limiter la biodégradation plastique. Les données actuellement disponibles reposent largement sur des approches culturelles dans des conditions de laboratoire, bien que les bactéries pouvant être cultivées représentent moins de 1% de la diversité totale retrouvée dans l'environnement (Hugenholtz *et al.* 2009). À ce jour, les données sur le taux de minéralisation plastique dans les océans sont encore pratiquement inexistantes.

Tableau 3 : Comparaison des différents environnements influençant le taux de biodégradation des plastiques



Environnement	Conditions
Compost industriel	Haute température ( $>58^{\circ}\text{C}$ ) <i>Champignons et Bactéries</i>
Digestion anaérobie	Température élevée ( $20\text{-}45^{\circ}\text{C}$ ) <i>Bactéries</i>
Compost domestique	Température ambiante ( $20\text{-}30^{\circ}\text{C}$ ) <i>Champignons et Bactéries</i>
Sol	Température ambiante <i>Bactéries seulement</i>
Eau douce	Température ambiante <i>Bactéries seulement</i>
Eau de mer	Température ambiante ( $<5 \text{ à } >20^{\circ}\text{C}$ ) <i>Bactéries et Champignons dilués</i>
Décharge	Température ambiante <i>Bactéries seulement</i>

#### 4.2.3. Tests et normes de biodégradabilité en milieu marin : encadrement et loi Européenne

Tout d'abord, il est important de noter que la quasi-totalité des matériaux sont biodégradables dans l'environnement. Cependant, les polymères issus de la pétrochimie peuvent prendre plusieurs centaines d'années avant de se dégrader, ce qui n'est pas un temps significatif en terme de vie humaine et cela peut causer de nombreux problèmes aux écosystèmes au cours de cette période.

Les normes actuelles pour les environnements marins proposent des tests basés sur des mesures de respirométrie (production de  $\text{CO}_2$  et consommation d'oxygène) (Tableau 4), susceptibles de décrire l'étape de minéralisation de la biodégradation du plastique dans des conditions aérobies. Ils imposent un pourcentage minimum de conversion du plastique au  $\text{CO}_2$  allant de 60 à 70% sur une période de 3 mois (ASTM D6691-09), 6 mois (ASTM D7473-12) ou 24 mois (ISO 18830, ISO 19679, ASTM D7991-15) en conditions aérobies (Fig.18).

Tableau 4 : Présentation des différentes normes qui existent actuellement pour l'ensemble des milieux aquatiques. Modifié de la publication d'Harrison et al. 2018

	Test standard	Environnement	Milieu d'incubation	Présence / absence d'oxygène	Température (°C)	Temps d'incubation	Méthode pour confirmer la biodégradation
Eau de mer	ISO 18830:2016	Interface eau de mer sédiments sableux	Eau de mer naturel ou synthétique	Présence	15–28 ( $\pm 2$ )	24 mois maximum	Demande biologique en oxygène : doit être supérieur à 60 % d'oxygène par rapport au matériau de référence
	ISO 19679:2016	Interface eau de mer sédiments sableux	Eau de mer naturel ou synthétique	Présence	15–25 ( $\pm 2$ )	24 mois maximum	Evolution CO2 : doit être supérieur à 60 % de la dégradation du matériel de référence.
	ISO 22404	Sédiments marins	Eau de mer naturel ou sédiment	Présence	15–25 ( $\pm 2$ )	24 mois maximum	Evolution CO2 : doit être supérieur à 60 % de la dégradation du matériel de référence après 180 jours
	ASTM D6691-09	Souche préélectionnées ou Eau de mer	Milieu artificiel	Présence	30 ( $\pm 1$ )	3 mois maximum	Evolution CO2 : doit être supérieur à 70 % de la dégradation du matériel de référence.
	ASTM D7473-12	Eau de mer ou combinaison d'eau de mer et de sédiment	Exposé à l'inoculum	Présence	dépend des conditions <i>in situ</i>	24 mois maximum	Perte de masse et preuve de dégradation visuelle.
	ASTM D7991-15	Sediment et eau de mer	Exposé à l'inoculum	Présence	15–28 ( $\pm 2$ )	24 mois maximum	Evolution CO2 : doit être supérieur à 60 % de la dégradation du matériel de référence.
Eaux usées et boues d'épuration	BS EN ISO 14851:2004	boues, compost et / ou sol	Artificiel	Présence	20–25 ( $\pm 1$ )	6 mois maximum	Demande biologique en oxygène : doit être supérieur à 60 % d'oxygène par rapport au matériau de référence
	BS EN ISO 14852:2004	boues, compost et / ou sol	Artificiel	Présence	20–25 ( $\pm 1$ )	6 mois maximum	Evolution CO2 : doit être supérieur à 60 % de la dégradation du matériel de référence.
	BS ISO 13975:2012	boues, déjections animales ou autres déchets organiques	Exposé à l'inoculum	Absence	35 ± 3 or 55 ± 5	3 mois maximum	Evolution du CO2 et du CH4 : doit être supérieur à 70 % de la dégradation du matériel de référence après 15 jours.
	BS EN ISO 14853:2016	boues digérées ou préparées en laboratoire	Artificiel	Absence	35 ± 2	3 mois maximum	Evolution du CO2 et du CH4 : doit être supérieur à 70% de la dégradation du matériel de référence.

La biodégradation en anaérobiose est caractérisée par des normes spécifiques (voir par exemple ASTM D5511-18 ou ISO-14853). La biodégradation d'un plastique est caractérisée par le temps nécessaire pour réaliser la minéralisation dans des conditions contrôlées. Ces tests ne peuvent pas être considérés comme une preuve de biodégradabilité immédiate (conversion totale du plastique en biomasse et CO<sub>2</sub>), mais plutôt comme une indication d'un potentiel de biodégradation dans les océans.

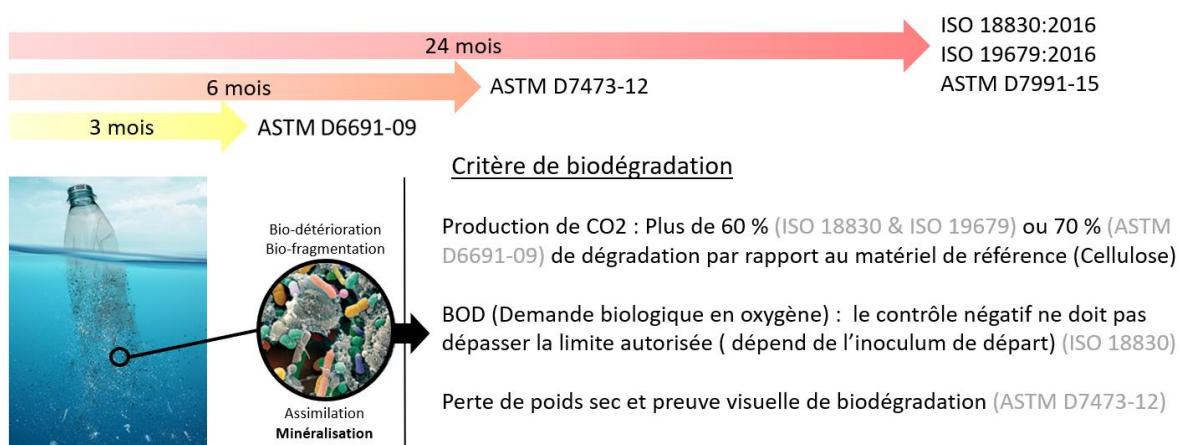


Figure 18 : Normes actuelles portant sur la biodégradation des plastiques en mer

Il est presque impossible de faire une norme qui fonctionne en même temps pour les eaux de surface, les sédiments côtiers et les eaux profondes, tant l'environnement est différent. Récemment, ces normes ont été jugées insuffisantes dans leur capacité à prédire de façon réaliste la biodégradabilité en milieu marin (Harrison *et al.* 2018). Ces tests peuvent considérablement sous-estimer le temps nécessaire à la biodégradation des polymères dans les écosystèmes naturels. Tout d'abord, le fait de préparer un inoculum expérimental (parfois avec des souches de laboratoire sélectionnées) et de simuler une incubation dans un milieu artificiel, riche en nutriment avec des températures ne reflétant pas toujours la réalité, peuvent entraîner des biais dans l'interprétation des résultats. Il est difficile aussi de déterminer les analyses à conduire pour les polymères qui contiennent des additifs, des composites ou des mélanges de polymères biosourcés avec ceux issus de la pétrochimie, pouvant influencer les taux de biodégradation (Harrison *et al.* 2018).

Une autre préoccupation concernant ces normes est le biais associé à la méthode commune pour déterminer la biodégradabilité, c'est-à-dire les mesures de production de CO<sub>2</sub>. Cette méthode peut conduire à une sous-estimation ou à une surestimation de la biodégradation du plastique due à la présence de matière organique, produits chimiques, polluants, qui s'est agglomérée au cours de l'incubation sur le polymère, mais aussi à la libération de matières organiques dissoutes par les débris plastiques (Méthane, Ethane et Ethylène) (Royer *et al.* 2018). Toutes ces molécules peuvent être dégradées par le biofilm de la plastosphère, entraînant ainsi une production de CO<sub>2</sub> qui n'a rien à voir avec la biodégradation du plastique (Lee *et al.* 2014). Il y a donc un risque de surestimer la biodégradation. Inversement, plusieurs articles ont signalé l'importance des micro-organismes photosynthétiques se développant sur les plastiques, et qui consomment du CO<sub>2</sub> quel que soit le taux de biodégradation du plastique (Zettler *et al.* 2013; Dussud *et al.* 2018b; Amaral-Zettler *et al.* 2020), ce qui provoque le risque de sous-estimer la biodégradation. Ce problème pourrait être facilement résolu en effectuant les expériences dans l'obscurité. Cependant d'autres études sont nécessaires pour évaluer le degré relatif de la consommation de CO<sub>2</sub> par photosynthèse, de la production de CO<sub>2</sub> par dégradation de la matière organique par la plastosphère par rapport à la production de CO<sub>2</sub> due à la biodégradation plastique.

Les limites des méthodes respiratoires décrites ci-dessus peuvent être surmontées par d'autres techniques et approches analytiques supplémentaires, pour confirmer les changements dans les propriétés physiques et la structure chimique des polymères pendant la biodégradation. Les altérations de l'aspect visuel et de la masse ou les changements de propriétés mécaniques sont des méthodes relativement faciles et peu coûteuses à effectuer pour évaluer des changements physiques pendant la biodégradation. D'autres méthodes pourraient être combinées comme le marquage isotopique, qui permet d'évaluer l'assimilation microbienne du polymère. En effet, une étude récente a utilisé du poly (butylène adipate-téréphthalate) (PBAT) marqué, associé à de la spectrométrie de masse (Nanosims) pour prouver l'assimilation microbienne du carbone marqué du polymère par les communautés microbiennes (Zumstein *et al.* 2018). Une précédente version de norme ASTM (D6692-01) utilisait cette technique de marquage au  $^{14}\text{C}$  lors de suivi de production de CO<sub>2</sub>. D'autres techniques peuvent confirmer les changements dans la structure moléculaire des polymères comme les mesures d'hydrolyse de surface et d'autres mesures chromatographiques (chromatographie en phase gazeuse, chromatographie liquide, chromatographie de perméation de gel) couplées ou non à des techniques spectrométriques (spectrométrie de masse, spectroscopie de résonance magnétique nucléaire, spectroscopie infrarouge à transformer de Fourier). La microscopie à force atomique et à balayage électronique peuvent également évaluer la biodégradation de la surface du polymère due à l'activité microbienne. Chacune de ces méthodes a ses limites et ses biais (description en détails dans les revues de Koutny *et al.* 2006; Ho *et al.* 2018; Harrison *et al.* 2018). Les normes actuelles proposent parfois d'utiliser de telles techniques pour corroborer le test principal basé sur la mesure de la respirométrie, mais aucune directive claire sur la façon d'utiliser ces tests n'est fournie.

### 4.3. Biodégradation en fonction de la composition des polymères

Il existe actuellement plus de 5300 types de polymères dans le commerce (Wagner and Lambert 2018). Ils sont généralement produits avec une gamme d'additifs chimiques tels que des plastifiants, des ignifugeants, des antioxydants et d'autres stabilisants, des pro-oxydants, des surfactants, des charges inorganiques ou des pigments (Wagner and Lambert 2018). Leurs propriétés physico-chimiques hétérogènes entraîneront probablement des voies métaboliques de biodégradation très diverses, en particulier si l'on considère la grande variété de micro-

organismes pouvant intervenir dans la dégradation d'un morceau de plastique et les facteurs environnementaux dynamiques inhérents aux océans. Un focus sur la biodégradation de deux polymères utilisés lors d'expériences durant cette thèse, l'un ayant servi de témoin négatif (PE) et l'autre est considéré comme biodégradable (PHBV) est présenté ci-dessous. Les voies de biodégradation décrites ne sont pas uniques et représentatives de ce qui se passe dans l'environnement naturel. Les conditions de laboratoire ne peuvent mimer l'ensemble des facteurs et la complexité de la biodégradation de ces polymères.

#### 4.3.1. Plastiques conventionnels : Cas du Polyéthylène (PE)

Le polyéthylène haut et basse densité est une longue chaîne carbonée linéaire ( $\text{CH}_2)_n$  appartenant à la famille des polyoléfines. Le polyéthylène est dérivé de sources pétrochimiques et sa grande utilisation dans notre vie quotidienne en a fait le premier déchet plastique trouvé à la surface de la mer (Bryant *et al.* 2016; Lebreton *et al.* 2018; Dussud *et al.* 2018b; Basili *et al.* 2020). Le PE est considéré comme complexe à biodétruire car ses longues chaînes de carbone sont très stables et contiennent des charges très équilibrées. Les micro-organismes ont généralement besoin d'un déséquilibre de la charge électrique pour effectuer la biodégradation. Pour déstabiliser la charge électrique locale, les bactéries utilisent des oxygénases : des enzymes capables d'ajouter de l'oxygène à une longue chaîne carbonée (Krueger *et al.* 2015). Par exemple, les mono-oxygénases et les di-oxygénases incorporent, respectivement, un et deux atomes d'oxygène, formant des groupes alcool ou peroxylique qui sont moins récalcitrants à la biodégradation. L'oxydation peut également être obtenue par des réactions abiotiques associées aux rayonnements UV ou à la température (pour plus de détails, voir la revue de [Singh and Sharma 2008](#)). L'oxydation du PE entraîne la formation de groupes carboxyliques, d'alcools, de cétones et d'aldéhydes par une réaction radicalaire (Fig. 19) (Vasile 2000; Gewert *et al.* 2015). La réaction radicalaire est une réaction d'addition d'un atome (possédant un électron seul sur sa couche externe) sur un carbone et déséquilibrant ainsi les charges de ce dernier.

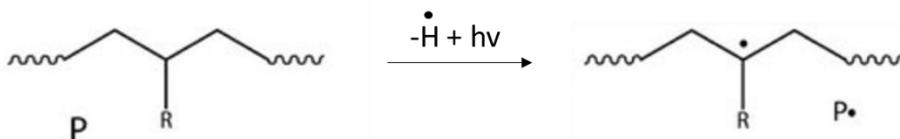


Figure 19 : Réaction radicalaire retrouvée dans le processus de biodégradation du PE. Le point représentant l'électron

L'oxydation et la fragmentation du PE rendent le polymère plus hydrophile et facilitent l'accès à d'autres enzymes extracellulaires, telles que les lipases et les estérases après la formation de groupes carboxyliques, ou les endopeptidases pour les groupes amides (Gewert *et al.* 2015). D'autres enzymes, telles que la laccase produite par *Rhodococcus ruber*, sont excrétées et peuvent faciliter la biodégradation du PE (Santo *et al.* 2013). Le polymère est décomposé en petits oligomères de 600 Da incorporés dans les cellules par des supports appartenant à la Superfamille des Facilitateurs Majeurs (MFS) ou hébergeant des cassettes de liaison ATP (ABC) (Gravouil *et al.* 2017). Fait intéressant, une étude récente portant sur les oligomères oxydés solubles a montré que 95% de ces composés étaient assimilés par la souche *Rhodococcus rhodochrous* après 240 jours d'incubation (Eyheraguibel *et al.* 2017). La  $\beta$ -oxydation (voie métabolique de dégradation d'acide gras) transforme les molécules carboxyliques oxydées en acétyl-coA (si nombre pair de carbone) ou propionyl-coA (si nombre impair de carbone). La carboxylation du propionyl coA en succinyl coA est effectuée par la propionyl-coA carboxylase, enzymes surexprimées lorsque les bactéries trouvent du PE dans le milieu (Gravouil *et al.* 2017). L'acétyl-coA et le succinyl-coA entrent dans le cycle de l'acide tricarboxylique (TCA) (Fig. 20). Ce cycle produit de l'énergie chimique sous la forme de pouvoir réducteur (NADH, H<sup>+</sup> et CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub>) utilisé dans la chaîne respiratoire pour produire de l'ATP, ATP nécessaire pour créer une nouvelle biomasse microbienne *via* le processus de réPLICATION. Elle produit également du CO<sub>2</sub> et de l'H<sub>2</sub>O qui signent la minéralisation complète du PE.

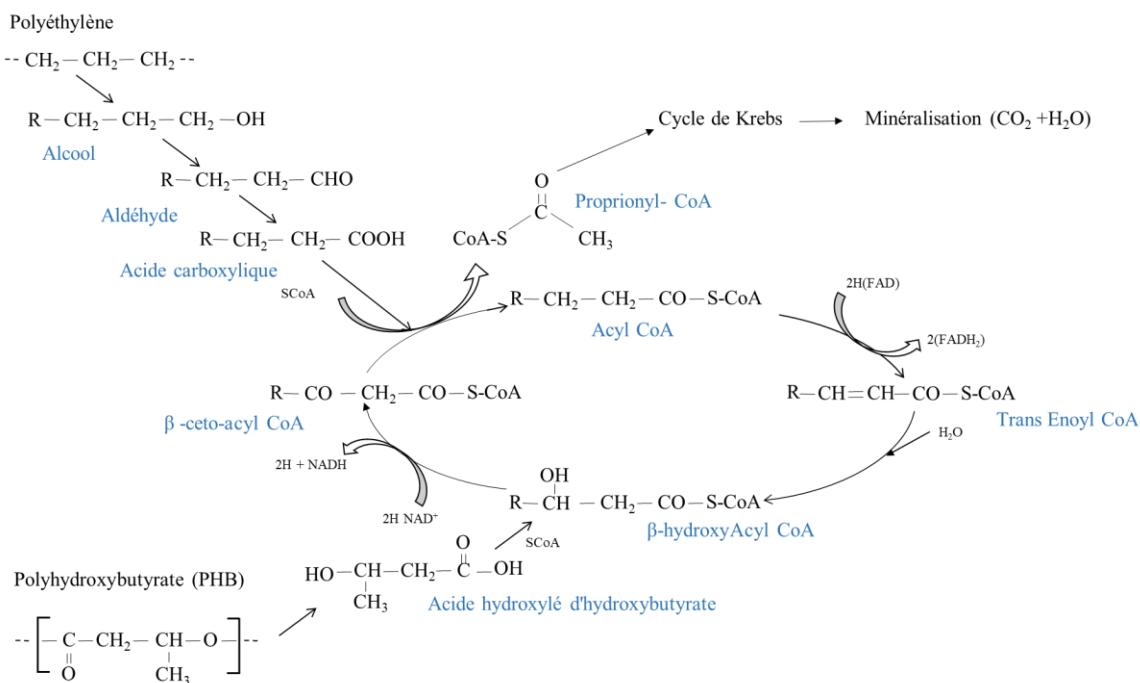


Figure 20: Voie de biodégradation du PE (plastique conventionnel) et PHB (plastique biosourcé et biodégradable).

Depuis 20 ans maintenant, les scientifiques s'intéressent à la biodégradation du PE par les communautés microbiennes. Les souches bactériennes et fongiques présentant des capacités de biodégradation du PE sont répertoriées dans la revue publiée par Jacquin et al. 2019.

Les processus génétiques et métaboliques impliqués dans la biodégradation du PE restent peu décrits dans la littérature. Cependant quelques travaux préliminaires ont mis en évidence des enzymes, des transporteurs ou des gènes pouvant être impliqués dans ce processus (Gravouil *et al.* 2017). Les gènes de l'alcane hydroxylase se sont avérés jouer un rôle central dans la biodégradation du PE. *Pseudomonas* sp. E4 est capable de minéraliser 28,6% du carbone organique du polymère en 80 jours. Le gène alkB a ensuite été introduit dans la souche *Escherichia coli* BL21, qui a ensuite pu minéraliser 19,3% du carbone organique du polymère (Yoon *et al.* 2012). Seules deux autres études ont utilisé l'analyse génétique pour prouver l'importance de la laccase dans la biodégradation du PE par *Rhodococcus ruber* (Sivan 2011; Santo *et al.* 2013; Gravouil *et al.* 2017).

#### 4.3.2. Plastiques biosourcés : Cas du PHA

En raison de leur origine microbienne, les PHA se sont révélés biodégradables dans de nombreux environnements tels que le sol, les écosystèmes marins ou les boues de stations d'épurations (Eubeler *et al.* 2009). La biodégradation du PHB (un des nombreux polymères de type PHA) a été prouvée avec des taux comparables à ceux de la cellulose, avec une dégradation plus rapide trouvée dans des conditions aérobies (85 jours) par rapport à des conditions anaérobies (6 mois) (Wang *et al.* 2018).

Sa biodégradation permet la scission des chaînes de polymères en monomères ou oligomère par rupture des liaisons esters. Ces liaisons sont clivées par une hydrolyse passive ou une réaction enzymatique active (Göpferich 1996). La dégradation abiotique intervient quand l'énergie externe dépasse le seuil de résistance des liaisons esters. Néanmoins, ce phénomène reste rare et s'applique dans des conditions bien précises (rotation ou chaleur excessives) (Göpferich 1996; Hablot *et al.* 2008).

Certains micro-organismes sont capables d'utiliser le PHB comme source d'énergie, grâce à l'action extracellulaire / intracellulaire des PHA dépolymerases (PHAZs.). Cette biodégradation est deux à trois fois plus importante que la dégradation par hydrolyse passive (Jendrossek and Handrick 2002; Jendrossek 2005).

Lorsque la biodégradation n'est pas effectuée à l'intérieur des cellules par des bactéries qui produisent leur propre PHB, d'autres bactéries déclenchent la biodégradation du PHB dans le milieu par hydrolyse externe à l'aide d'ectoenzymes (PhaZ externe) qui convertissent les polymères en monomères d'acide hydroxylés d'hydroxybutyrate (HB) (Peña *et al.* 2014). Cette molécule est soluble dans l'eau et suffisamment petite pour se diffuser passivement à travers la membrane bactérienne et entrer dans le cycle de  $\beta$ -oxydation. L'acétyl-CoA résultant sera oxydé dans le cycle TCA jusqu'à la minéralisation finale (Alshehrei 2017) (Fig. 20). La dégradation du PHA a été prouvée en laboratoire dans des conditions aérobies ou anaérobies. Les bactéries dominantes dans les conditions marines aérobies appartiennent aux Clostriales , Gemmatales , Phycisphaerales et Chlamydiales , tandis que les Cloacamonales et Thermotogales dominent dans les boues anaérobies (Wang *et al.* 2018). De nombreux micro-organismes non producteurs de PHA peuvent donc le dégrader, s'ils possèdent ces enzymes. L'expression des PhaZ externes est généralement réprimée si une autre source de carbone est présente (Jendrossek 2005). L'étude plus approfondie des enzymes impliquées dans la biodégradation du PhaZ est discutée partie 5.3. ci-après.

## 5. Cas des PHA : Polymères biosourcés, biodégradables, compostables et recyclables

Une attention particulière a été portée lors de cette thèse sur les PHA (voir chapitres 3 et 4), qui sont actuellement décrits comme des polymères ayant des propriétés très prometteuses pour se substituer dans certaines applications à des polymères conventionnels. Nous avons choisi d'approfondir à la fois les intérêts commerciaux associés à leurs propriétés remarquables, tout en décrivant l'état des connaissances actuelles sur leur voies de synthèse et de biodégradation.

### 5.1 Généralités

Dans ce contexte actuel de développement de plastique alternatif en limitant les composés issus de la pétrochimie, les PHA semblent s'imposer comme une solution durable. Ce sont des biopolymères considérés comme biodégradable, non toxique et biocompatible. Depuis leur découverte en 1926, de nombreuses études ont montré que le PHA est un polymère synthétisé par de nombreuses bactéries, archées et eucaryotes (Anderson and Dawes 1990).

Les granules de PHA ont été longtemps considérés comme uniquement une molécule de stockage d'énergie pour l'organisme producteur. En effet, cette molécule est produite lorsque le micro-organisme se trouve dans un milieu riche en carbone (glucidique ou lipidique) et subissant un stress environnemental (carence en azote et ou phosphore, oxygène) (Lee and Choi 1999). Le PHA est stocké sous forme de granules de réserve, exerçant une faible pression osmotique sur les parois cellulaires et n'affectant pas le métabolisme du micro-organisme (Jendrossek and Pfeiffer 2014). La synthèse de PHA est régulée et forme un équilibre entre le stockage de sources carbonées et la dégradation en oligomères pour y récupérer les nutriments nécessaires lors d'un stress nutritif de l'environnement (Kadouri *et al.* 2005). Certaines bactéries peuvent accumuler jusqu'à 90% de leur poids total en polymère dans des conditions très spécifiques (Peña *et al.* 2014). Les PHA sous forme de granules ont un diamètre compris entre 0,2 et 0,7 µm et sont constitués à 97,7 % de PHA, 1,8 % de protéines et 0,5 % de lipides (Koller *et al.* 2010). Tous les carbones des monomères du PHA ont une configuration R (Rectus, carbone asymétrique, les atomes prioritaires sont classés dans le sens horaire) (Fig. 21), en raison de la stéréospécificité de la Pha synthase (PhaC) (Verlinden *et al.* 2007; Singh *et al.* 2018), ceci a une grande importance sur la biodégradabilité du polymère (Voir partie 5.3).



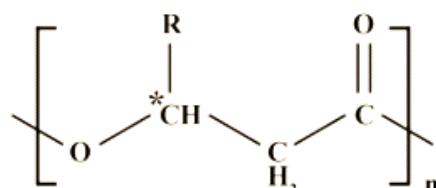
Figure 21: Conformation d'un carbone asymétrique selon l'ordre de priorité donné au 4 substituants suivant la loi de Cahn classé du plus important (a) au moins important (d) (source : lachimie.fr).

Comme précédemment rapporté plus de 300 espèces sont connues pour produire du PHA et plus de 150 monomères de PHA sont recensés dans la littérature (Keshavarz and Roy 2010).

Les PHA peuvent être classés en quatre groupes (Sagong *et al.* 2018) :

- PHA<sub>SCL</sub> : Chaîne latérale courte entre 3 et 5 Carbone
- PHA<sub>MCL</sub> : Chaîne latérale moyenne entre 6 et 14 Carbone
- PHA<sub>LCL</sub> : Chaîne latérale longue plus de 14 Carbone
- PHA<sub>SCL-MCL</sub> : Mixte des PHA court et moyen

La nature du groupe associé à la chaîne latérale est directement reliée aux substrats carbonés (glucose, fructose, cellulose, acides et acides gras...) dans lequel évolue le micro-organisme et à la nature de son enzyme PhaC (Meng *et al.* 2014) (Fig. 22).



Groupement R	Nombre de C	PHA	Catégorie
Methyl	CH <sub>3</sub>	4	Poly-3-Hydroxybutyrate
Ethyl	CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	5	Poly-3-Hydroxyvalerate
Propyl	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	6	Poly-3-Hydroxyhexanoate
butyl	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub>	7	Poly-3-Hydroxyheptanoate
Pentyl	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -CH <sub>3</sub>	8	Poly-3-Hydroxyoctanoate
Hexyl	(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> -CH <sub>3</sub>	9	Poly-3-Hydroxynonanoate
Heptyl	(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> -CH <sub>3</sub>	10	Poly-3-Hydroxydecanoate
Octyl	(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> -CH <sub>3</sub>	11	Poly-3-Hydroxyundecenoate
Nonyl	(CH <sub>2</sub> ) <sub>8</sub> -CH <sub>3</sub>	12	Poly-3-Hydroxydodecenoate
Decyl	(CH <sub>2</sub> ) <sub>9</sub> -CH <sub>3</sub>	13	Poly-3-Hydroxytridecenoate
Undecyl	(CH <sub>2</sub> ) <sub>10</sub> -CH <sub>3</sub>	14	Poly-3-Hydroxytetradecenoate
Dodecyl	(CH <sub>2</sub> ) <sub>11</sub> -CH <sub>3</sub>	15	Poly-3-Hydroxypentadecenoate
Tridecyl	(CH <sub>2</sub> ) <sub>12</sub> -CH <sub>3</sub>	16	Poly-3-Hydroxyhexadecenoate

Figure 22 Nomenclature générale des principaux PHA

Ce stockage de granule de PHA permet :

- d'augmenter la survie du micro-organisme producteur de PHA (Kadouri *et al.* 2005).
- d'augmenter la résistance au stress oxydatif (Goh *et al.* 2014) en surexprimant les gènes codant les protéines de stress, menant à la production de molécules anti-oxydantes (Ruiz *et al.* 2004; Ayub *et al.* 2009).
- d'augmenter sa résistance au choc osmotique chez les micro-organismes marins (Yin *et al.* 2015).
- d'augmenter la résistance aux températures basses ou hautes (Wu *et al.* 2011; Pärnänen *et al.* 2015).
- d'augmenter la résistance au stress salin et thermique en limitant le phénomène d'agrégation de protéines (Soto *et al.* 2012).

## 5.2. Intérêt commercial du PHA

Les propriétés physiques et chimiques du PHA vont principalement dépendre du monomère qui le compose. Le type de monomère est contrôlé par les micro-organismes producteurs, le milieu, les conditions de fermentations et la méthode de récupération des PHA (Keshavarz and Roy 2010; Amirul *et al.* 2015).

Les PHA sont envisagés dans de nombreux domaines tels que l'industrie plastique (produits extrudés, moulés, films d'emballage), l'usage médical (implants, sutures, appareils médicaux corporels), support de biodégradation pour molécules d'intérêts (hormones, médicaments, biocides), domaines agricoles, domaine de la peinture (Scholz 2001).

Les PHA montrent une perméabilité à l'eau et l'oxygène peu importante, ce qui représente un avantage considérable dans le domaine de l'emballage. Généralement considérée comme hydrophobe, cette propriété est variable en fonction des groupements fonctionnels composant le monomère de PHA. En effet, l'hydrophobie peut être modifiée par des groupements hydroxyl, amine ou carboxylique composant le monomère ou par copolymérisation intégrants des composés hydrophiles.

Beaucoup de monomères différents de PHA permettent une spécification des propriétés, par exemple le P(4HB) possède une bonne élasticité, une bonne absorption et biocompatibilité pour l'être humain (Le Meur *et al.* 2013; Amirul *et al.* 2015).

L'un des PHA les plus couramment utilisés pour la production de plastique est le polyhydroxybutyrate (PHB), qui a un méthyle comme groupe alkyle (R) ( $[CO-CH_2-CHCH_3-O]_n$ ) (Fig. 23). C'est le seul PHA autorisé par la Food and Drug administration (FDA) dans le domaine médical (Boesel *et al.* 2014).

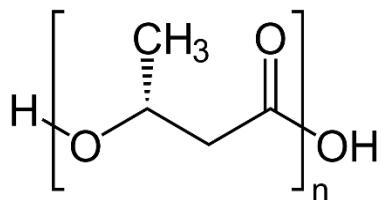


Figure 23 : Molécule de Poly( $\beta$ -hydroxybutyrate)

Le PHB est produit en laboratoire par fermentation bactérienne depuis 1989 (Kunioka *et al.* 1989; Huu Phong *et al.* 2016). Le PHB est considéré comme hydrophobe, ayant une faible perméabilité, peu déformable et considéré comme biodégradable (Mothes *et al.* 2004; Chang *et al.* 2012). Il est peu déformable en raison de sa cristallinité élevée (Gorke *et al.* 2007). Le PHB a un point de fusion élevé proche de sa température de dégradation thermique (Reis *et al.* 2003), c'est pour cette raison qu'un co-polymère, le poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalérate) (PHBV), est couramment utilisé pour réduire le point de fusion du PHB.

Le PHBV est largement utilisé dans le domaine agricole pour permettre une libération contrôlée des pesticides et donc limiter la pollution environnementale (Voinova *et al.* 2009; Grillo *et al.* 2011; Amirul *et al.* 2015).

En raison de cette adaptabilité importante, de ses propriétés physico-chimiques similaires aux polymères synthétiques tels que le PP ou le PE, les PHA ont suscité un intérêt commercial grandissant comme alternative aux polymères conventionnels. Ces dernières années, l'utilisation du PHA dans le domaine médical a fortement augmenté grâce à sa biocompatibilité, sa faible toxicité (Ali and Jamil 2016), son immunotolérance élevée et une biodégradabilité importante. Il est utilisé dans la fabrication de produits cardiovasculaires (valvules cardiaques, stents, greffons vasculaires), dans le système d'administration de médicaments (comprimés

transporteur et libérateur pour les traitements anticancéreux), dans la gestion des plaies (sutures, écouvillons), en orthopédie (plaques osseuses, cages vertebrales) (Li and Loh 2015; Mozejko-Ciesielska and Kiewisz 2016). Les PHA sont utilisés depuis plus de 20 ans comme système de libération thérapeutique contrôlé sur les animaux (Pouton and Akhtar 1996). Ces polymères sont intéressants à utiliser dans le domaine médical, car leurs produits de dégradation sont non toxiques et facilement éliminés de l'organisme.

Actuellement les recherches pour industrialiser la production de PHA ont principalement été effectuées sur le PHB et PHBV. Puis on trouve aussi des études sur le Poly-4-hydroxybutyrate (4HB), le P(3HB-co-4HB), le P(3HHx-co-3HO), et poly(3- hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) (PHBHHx) (Wu 2014; Mozejko-Ciesielska and Kiewisz 2016).

La production industrielle de PHA par des micro-organismes en bioréacteur sous conditions contrôlées est effectuée par plusieurs entreprise dans le monde (Tableau 5). Des entreprises Américaines comme Metabolix, Danimer scientific et Newlight technologies (Foster et yee 2015, Wu 2014, 25,30,34 tobon), Brésilienne (PHB industrial SA), Allemande (Biomer), Anglaise (Goodfellow), Française (NaturePlast), Italienne (Bio-on), Japonaise (Kaneka corporation) et Chinoise avec trois autres entreprises (Tianjin Green Bioscience, Ecomann et Tianan) sont spécialisé dans la production de PHA à grande échelle.

Tableau 5 :PHA commercialisés dans le monde avec leur caractéristique de production, provenant de Mozejko-Ciesielska and Kiewisz 2016.

Fabricant	Marque déposée	Souche	Manipulation génétique	source de carbone	Contenu final de type PHA (% CDW)
Biomer, Allemagne	Biomer	<i>Alcaligenes latus</i>	Non	saccharose	P (3HB), > 75%
PHB Industrial SA, Brésil	Biocycle	<i>Bacillus</i> sp.	Non	canne à sucre	P (3HB), > 90%
Kaneka Corporation, Japon	Kaneka PHBH	<i>Ralstonia eutropha</i>	<i>phaC</i>	Les acides gras	P (3HB-co-HHx), > 80%
Metabolix, États-Unis	Mirel	<i>Ralstonia eutropha</i>	Non	glucose	P (3HB-co-4HB), > 75%
Tianan Biologic Material Co., Ltd. Ningbo, Chine	Enmat	<i>Ralstonia eutropha</i>	Non	glucose + propionate	P(3HB-co-3HV), >75%
Matériaux Tianjin GreenBio, Chine	GreenBio	<i>Escherichia coli</i>	<i>phbCAB</i>	glucose + 1,4-butanediol	P (3HB-co-4HB), > 75%
Jiang Su Nan Tian, Chine	Jiangsu Nantian	<i>Escherichia coli</i>	<i>phbCAB</i> + <i>vgb</i>	glucose	P (3HB), > 80%
ETH, Suisse	PHA	<i>Pseudomonas putida</i>	Non	Les acides gras	PHA-mcl, environ 60%

### 5.3. Biosynthèse des PHA

Des études précédentes ont montré que les enzymes principalement impliquées dans la synthèse du PHA sont l'Acetyl-CoA acetyltransferase (PhaA), l'Acetoacetyl-CoA reductase (PhaB) et la Pha synthase (PhaC, PhaE et ou PhaR) (Liu *et al.* 2019) (Fig. 24). Ces trois gènes sont généralement organisés en opéron *phaCAB* (Sudesh *et al.* 2000; Luengo *et al.* 2003). Cependant, l'organisation des gènes ne fait pas consensus selon les espèces bactériennes étudiées (Rehm and Steinbüchel 1999; Meng *et al.* 2014). D'autres enzymes se trouvent impliquées dans la synthèse du PHA, comme les phasines (PhaP). Ce sont quatre phasines amphiphiles, protéines de petite taille sans site catalytique permettant la formation des granules du PHA en contrôlant la synthèse, la taille et le nombre (Pötter *et al.* 2005; Mezzina and Pettinari 2016) (Fig. 24). Les enzymes impliquées dans la synthèse du PHA peuvent être nombreuses selon la voie de synthèse utilisée (Meng *et al.* 2014). Dans la littérature 5447 bactéries et 287 archées ont une PhaC (Liu *et al.* 2019).

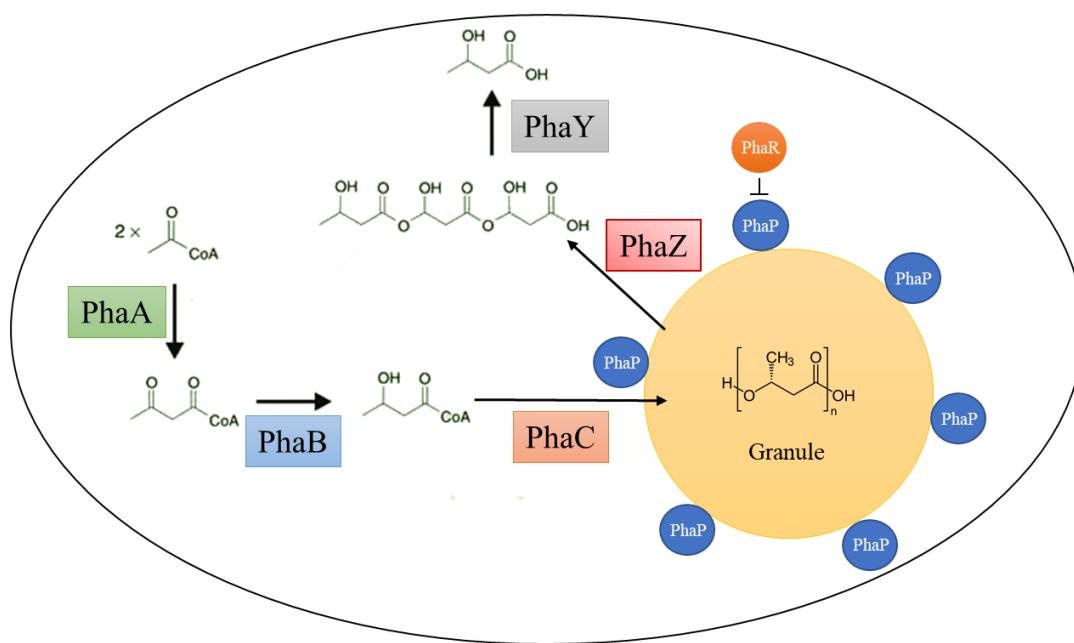


Figure 24 : Schéma bilan des interactions entre les protéines impliquées dans la synthèse des PHA. Figure modifiée d'après Pohlmann *et al.* 2006

La PhaC, catalyse la réaction permettant la conversion d'un substrat monomérique hydrosoluble en un polymère liposoluble de masse molaire élevée (200-3000 kDa) (Witholt and Kessler 1999). A ce jour 4 classes de PhaC ont été décrites dans la littérature (Mezzolla *et al.* 2018), selon leurs séquences primaires, la spécificité du substrat et la composition de la sous unité (Tableau 4). La classe I est un homodimère impliqué dans la synthèse des PHA<sub>SCL</sub> et des

PHAMCL, découverte en 1989 chez *Ralstonia eutropha* (Peoples and Sinskey 1989). La classe I est la seule à pouvoir produire des PHA mixtes en incorporant des PHAscl et des PHAMCL au sein de la même chaîne latérale (Sudesh *et al.* 2000; Chek *et al.* 2017, 2019). La classe II possède un gène *phaC* divisé en deux (*phaC1* et *phaC2*) et se compose de deux homopolymères, principalement retrouvée chez *Pseudomonas* spp. (Liu *et al.* 2019). Les classes III et IV ont deux gènes impliqués dans la formation de la Pha synthase, *phaC* et *phaE* pour la classe III et *phaC* et *phaR* pour la classe IV (Tableau 5 et Fig. 25). Les protéines PhaC de la classe IV sont principalement associées aux Bacilli et Firmicutes (McCool and Cannon 2001).

Tableau 6 : Présentation des différentes classes de PhaC et leurs caractéristiques dans l'opéron (Mezzolla *et al.* 2018)

Classe PhaC	Gène PhaC	Sites actifs	Taille PHA	Spécificité de l'opéron
Classe I	<i>phaC</i>	Homodimère	PHAscl et PHAMCL	-
Classe II	<i>phaC1</i> et <i>phaC2</i>	PhaC1	PHAMCL	<i>phaC1</i> et <i>phaC2</i>
Classe III	<i>phaC</i> et <i>phaE</i>	Hétérodimère	PHAscl	<i>phaE</i>
Classe IV	<i>phaC</i> et <i>phaR</i>	Hétérodimère	PHAscl	<i>phaR</i>

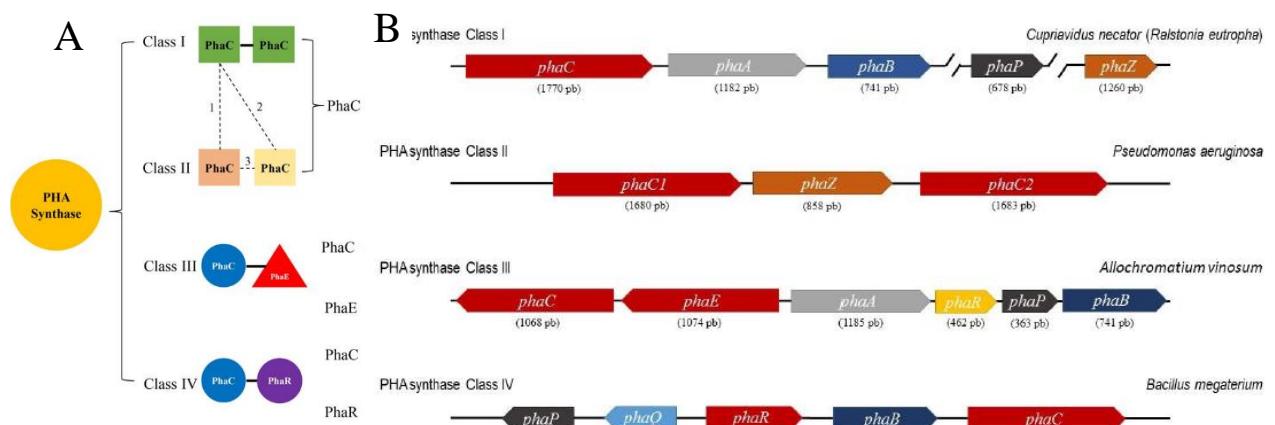


Figure 25 : Représentation des 4 PhaC identifiées chez les procaryotes. Figure provenant de Liu *et al.*, 2019 et de Thomas *et al.*, 2019. A) PhaC classe I : homodimère, classe II : hétérodimère avec deux phaC différentes (combinaisons possibles en pointillés), classe III : deux sous unités (PhaC et PhaE) et classe IV : deux sous unités (PhaC et PhaR) (Lieu *et al.* 2019). B) En fonction de la classe de la PhaC, l'organisation en opéron sera changée (Thomas *et al.*, 2019)

La séquence primaire de la boîte lipase de la PhaC est caractéristique. Elle est composée des acides aminés G-X-S-X-G (Mezzolla *et al.* 2018). Sa structure secondaire est aussi distinguable grâce à son repliement  $\alpha/\beta$  hydrolase conservée (Mezzolla *et al.* 2018). Cette région  $\alpha/\beta$  hydrolase possède une triade d'acides aminés conservée (Cystéine- Aspartate- Histidine) essentielle à l'activité de la PhaC. L'ensemble des PhaC de classe I et II ont généralement une

longueur de 600 acides aminés, alors que les PhaC de class III et IV sont plus courte de moitié (Liu *et al.* 2019).

Il existe en tout 14 voies métaboliques décrites dans la littérature, les voies I à IV (Fig. 26) sont des voies métaboliques originelles et les voies IV à XIV sont des voies obtenues en laboratoire à l'aide d'organismes recombinants (Meng *et al.* 2014). La voie utilisée dépendra du type de PhaC et de la nature de la source de carbone. Cette source de carbone varie d'un organisme à un autre, on trouve le glucose, l'acide oléique, le glycérol et plus étonnant l'huile de coprah, la mélasse ou les co-produits cosmétiques (Lemos *et al.* 1998; Kellerhals *et al.* 2000; Zinn *et al.* 2003; Ashby *et al.* 2005; Simon-Colin *et al.* 2009).

La voie I permet la production de PHA grâce à la condensation de deux acetyl-CoA catalysée par l'Acetyl-CoA acetyltransferase (Pha A), obtenu après le cycle de glycolyse (Fig 26 Pathway I). Ensuite l'Acetoacetyl-CoA reductase (PhaB) réduit l'acetoacetyl-CoA en R-3 hydroxybutyryl-CoA qui est converti en PHB (polyhydroxybutyrate) par la PhaC. La voie II utilise le cycle de  $\beta$ -oxydation et a besoin de produire du 3-hydroxyacyl-CoA à partir 2,3-déshydroacetyl-CoA, 3-hydroxyacyl-CoA ou 3-cétoacyl-CoA, catalysé par l'Enoyl-CoA hydratase, l'hydroxyacyl-CoA épimérase ou la Cétoacyl-CoA réductase respectivement. Ensuite le 3-hydroxycetyl-CoA est transformé en PHA grâce à la PhaC (Fig. 26 : Pathway II). La voie III, débute en convertissant la 3- hydroxyacyl-Acyl (ACP : acyl carrier protein) provenant du cycle de synthèse d'acide gras en 3-hydroxyacyl, catalysé par 3-hydroxyacyl-ACP-CoA transferase (Fig.26 : Pathway III). Ensuite cette molécule est transformée en PHA, grâce à la PhaC (Sudesh *et al.* 2000; Verlinden *et al.* 2007). La voie IV, permet la synthèse de PHA à partir de l'acide butyrique en S-hydroxyacyl-CoA, puis en acetoacetyl-CoA, sans passer par le cycle de  $\beta$ -oxydation (Meng *et al.* 2014) (Fig. 26: Pathway IV).

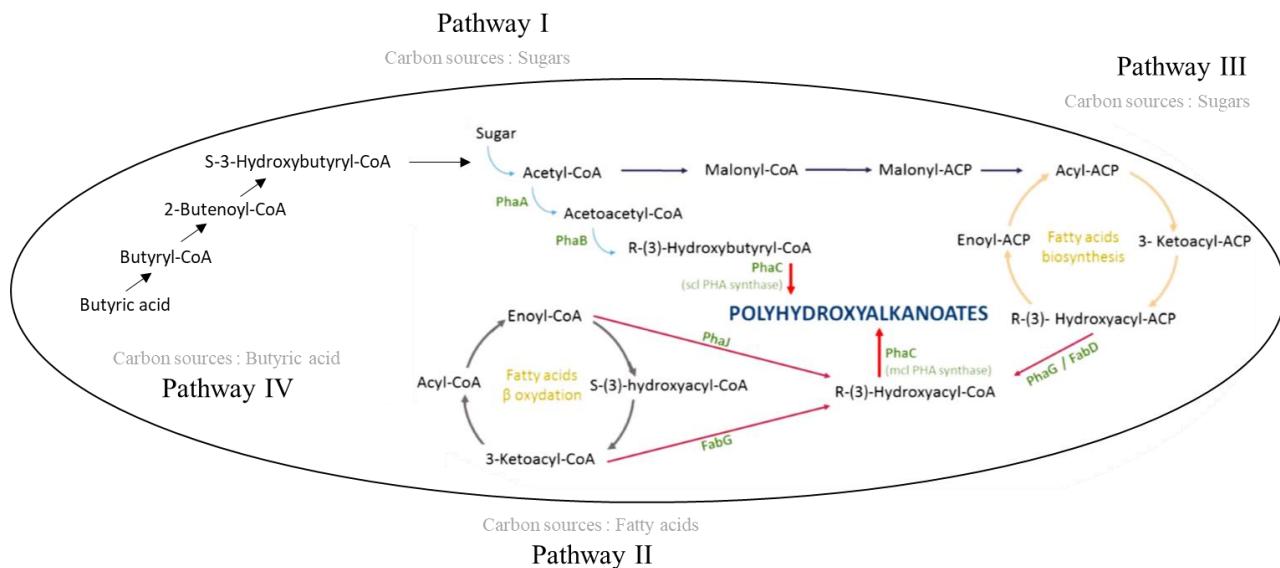


Figure 26 : Description des trois voies métaboliques de la synthèse des PHA (modifié de Thomas et al. 2019). **PhaA** : Acetyl-CoA acetyltransferase, **PhaB** : Acetoacetyl-CoA reductase, **PhaC** : Pha synthase, **PhaJ** : enoyl-coenzyme A hydratase, **FabD** : malonyl-CoA-ACP transacylase, **FabG** : ketoacyl-ACP, **PhaG** : 3-hydroxydecanoyl-ACP-CoA transacylase

Ces 4 voies sont régulées au niveau enzymatique et transcriptionnel, les concentrations en coenzyme A, acétyl-CoA, NADPH et le rapport NADPH / NADP peuvent agir pour réguler la biosynthèse de PHA (Castro-Sowinski et al. 2010). L'étude de la PhaC est essentielle pour optimiser les propriétés du PHA et sa production.

## 5.4 Mécanismes moléculaires impliqués dans la biodégradation des PHA

Certains micro-organismes sont capables d'utiliser le PHA comme source de carbone sous l'action des PHA dépolymérasées (PhaZ) intra- ou extracellulaires (Knoll et al. 2009; Meng et al. 2014; Mezzolla et al. 2018).

### PHA intracellulaire

La PHA intracellulaire (i-PHAZ) permet l'hydrolyse active des granules du PHB accumulées. Cette hydrolyse permet aux micro-organismes de récupérer du carbone et de l'énergie afin de pallier à une carence nutritionnelle de l'environnement (Doi et al. 1990). Les i-PhaZ peuvent dégrader le PHB amorphe natif mais pas semi-cristallin, contrairement aux PhaZ extracellulaire (Sznajder and Jendrossek 2011). En utilisant le PHB comme source de

carbone, certaines bactéries augmentent considérablement leur temps de survie dans un environnement hostile (jusqu'à 600 jours pour *Legionella pneumophila*) (James *et al.* 1999). Certaines bactéries appartenant aux genre *Rhizobium sp.*, *Spirillum sp.* et *Pseudomonas sp.* ont été identifiées comme pouvant synthétiser et dégrader le PHB intracellulaire pendant une culture au laboratoire (Hayward *et al.* 1959). La dégradation des granules de PHB est permise par une protéine activatrice, qui rend le PHB amorphe et disponible pour la i-PHAZ (Merrick and Doudoroff 1964; Griebel and Merrick 1971). Le PHB est hydrolysé en monomères d'hydroxy-butyrate, puis oxydés en acéto-acétate par la 3 hydroxy-butyrate déshydrogénase. Puis l'acétyl co-A est estérifié par la 3-cetoacide-coA transférase ou l'acétoacétyl-coA synthase et la synthèse du PHB recommence (Numata *et al.* 2007).

## **PHA extracellulaire**

La synthèse intracellulaire du PHB n'est pas une condition *sine qua non* à la dégradation du PHB. De nombreux micro-organismes non producteurs de PHB sont capables de l'utiliser comme source de carbone grâce à leur PhaZ extracellulaire (e-PhaZ) (Jendrossek 2007). Les e-PhaZ peuvent hydrolyser le PHB-semi-cristallin, afin de le transformer en monomères solubles dans l'eau et pouvant être incorporés dans une cellule bactérienne (Sudesh and Abe 2010).

Les PhaZ contiennent plusieurs domaines (Fig. 27) : un signal peptidique (SP), un grand domaine catalytique N-terminal (Cat), une courte région de liaison (linker) qui permet de faire la liaison entre le domaine catalytique et le substrat terminal (SBD, substrate binding domain) (Jendrossek and Handrick 2002; Jendrossek 2005). Le signal peptidique est composé de 22 à 58 acides aminés, il permet la sécrétion du PhaZ mature à travers le cytoplasme (Jendrossek and Handrick 2002; Jendrossek 2005). La sécrétion de la PhaZ n'est permise qu'après excision du SP par les peptidases. Le domaine catalytique est constitué d'un site actif avec trois acides aminés strictement conservés, la sérine (S), l'aspartate (D) et l'histidine (H), indispensable à l'activité catalytique (fig). Deux types de domaines peuvent être différenciés par la disposition des acides aminés du site actif au niveau de la séquence primaire d'acides aminés (Jendrossek and Handrick 2002) :

- Type I : Histidine- Serine- Aspartate- Histidine (H S D H)
- Type II : L'histidine est place en C terminale du site actif (S D H H)

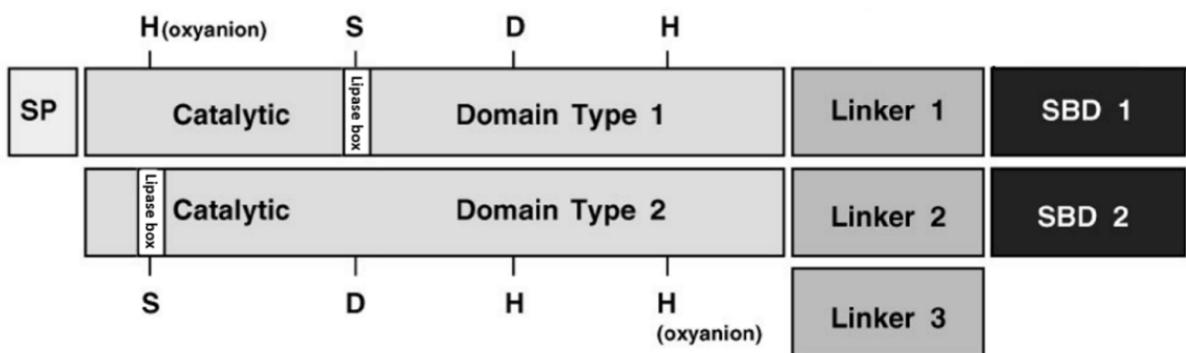


Figure 27 : Présentation des deux types de PhaZ spécifique des PHAsCL. Il y a deux sites actifs dans le domaine catalytique, basé sur la position de l'histidine (N terminal : type 1 ou C terminal : type 2) en respectant la triade catalytique (Serine, Asparagine, Histidine). Figure provenant de Jendrossek et al., 2002.

Le domaine de liaison au substrat (SBD) est composé de 40 à 60 acides aminés, permet de lier le domaine catalytique au domaine C terminal, il en existe deux types. Tous les deux ont des résidus conservés Histidine, Arginine et Cystéine et le SBD de type 1 à une cystine supplémentaire (Jendrossek and Handrick 2002; Jendrossek 2005).

Les PhaZ s'adsorbent à la surface du PHB grâce au SBD, puis clivent le PHB grâce au domaine catalytique (Hiraishi et al., 2000). Le PHB amorphe sera plus facilement dégradé par les PhaZ que le PHB cristallin. Cependant sa biodégradation dans l'environnement dépendra principalement des communautés microbiennes présentes, du niveau d'humidité et d'autre nutriments présents. La stéréochimie peut être un frein dans le processus de biodégradation des PHA. En effet, la totalité des PHA produits sont stéréo-spécifiques avec la totalité des carbones en conformation R. Les PHA synthétiques sont des mélanges racémiques d'énanthiomères R et S (carbone asymétrique, atomes prioritaires classés dans le sens anti-horaire). La configuration S freine le processus de biodégradation car les communautés microbiennes ne reconnaissent pas la configuration S. Ainsi un PHA qui serait sous forme S uniquement, ne peut être dégradé par des activités microbiennes (Bachmann and Seebach 1999). Cette raison fait que la meilleure option pour la production de PHA de masse reste la fermentation bactérienne.

## 5.5 Limite du succès du PHA

L'inconvénient majeur pour la commercialisation des PHA à grande échelle est leur coût final (7 à 10 €/kg), qui est 5 à 15 fois plus élevé que le plastique conventionnel (Singh and Mallick 2009; Rehm 2010) et son ingénierie biologique.

Pour réduire les coûts de production du PHA, des voies de synthèse alternatives utilisant des substrats carbonés moins couteux sont nécessaires, tels que le glycérol (sous-produit de la fabrication du biodiesel) (Ciesielski *et al.* 2015). Les coûts des sources de carbone représenteraient environ 50 % du coût de la production final de PHA. Une étude menée en 2010 a montré que si la source de carbone était issus de déchets, le coût de production de PHA pourrait atteindre 3.51 €/kg alors que le coût de production des polymères conventionnels (PP, PE) coûte entre 1.15 € et 1.47 €/kg (Obruca 2010).

Le coût de production du PHA est fortement impacté par l'extraction du PHA après fermentation bactérienne, il représenterait 30 % du prix global (Sun *et al.* 2007). Actuellement plusieurs stratégies sont mises en œuvre pour l'extraction des PHA, la plus favorisée et celle utilisant comme solvant le chloroforme ou l'acétone, entraînant un cout supplémentaire pour l'élimination des déchets et créant des déchets nocifs pour l'environnement (Lee et Na, 2013). Les méthodes plus respectueuses de l'environnement comme la digestion enzymatique ou chimique par exemple, reste à ce jour trop coûteuse.

Les conditions de croissance bactérienne pour obtenir une production optimale de PHA en utilisant un minimum de carbone tout en évitant l'utilisation de la source carbonée pour la croissance bactérienne est un processus complexe. Le processus d'accumulation de PHA intervient très tôt dans la courbe de croissance du micro-organisme qui affecte de ce fait la productivité de PHA. Car l'accumulation de grande quantité de PHA inhibe la croissance cellulaire et affecte négativement le métabolisme de l'organisme. Il y a donc un équilibre à avoir, entre ne pas le synthétiser trop tôt pour optimiser la quantité de PHA accumulée et ni trop tard car une grande partie de la source carbonée sera gaspillée pour la croissance cellulaire. Ce juste équilibre est à déterminer pour chaque micro-organisme producteur de PHA, dans des conditions bien précises, ce qui demande une étude poussée entraînant un surcoût de production.

Actuellement le devenir des PHA dépend principalement de son coût de production, c'est pour cela qu'il est important de développer les recherches en étudiant les voies métaboliques de production de PHA, les souches capables de produire le PHA à vitesse optimale et les procédés d'exactions simples et respectueux de l'environnement.

## 6. Objectif de la thèse

Depuis la prise de conscience de l'envergure de la pollution plastique dans les océans, les études se sont multipliées au cours de ces dernières années. Comprendre d'où vient cette pollution, comment elle interagit avec son environnement et comment elle peut créer un nouvel habitat propice au développement de certains micro-organismes est un sujet d'actualité. Le fonctionnement des communautés microbiennes et les interactions entre les micro-organismes et les polymères demeurent un enjeu environnemental et économique majeur à ce jour. Les travaux de cette thèse ont été motivés pour répondre aux questions suivantes :

- Peut-on définir des paramètres qui influencent la biogéographie de la plastisphère ? Existe-t-il un microbiome commun à tous les plastiques (« core microbiome ») ? (Chapitre 2)
- Les communautés microbiennes colonisent-elles de la même façon les polymères biodégradables et non biodégradables ? Quelle est la part des micro-organismes de la plastisphère potentiellement impliqués dans la biodégradation ? (Chapitre 3)
- Comment l'analyse des génomes peut-elle nous aider à mieux comprendre la biodégradation des polymères ? (Chapitre 4)

Afin de répondre à ces questions, une approche pluridisciplinaire impliquant les domaines de l'écotoxicologie microbienne, de la physique et de la chimie, de la génétique et de la bioinformatique a été mise en place (Fig. 28). La plastisphère a été abordée à différents niveaux *in situ* et/ou *in vitro* :

- **A l'échelle de l'écosystème** : à partir de plusieurs prélèvements dans les zones les plus polluées en micro-plastiques (gyre du Pacifique Nord et Méditerranée Nord occidentale), pour lesquels la diversité microbienne, le type de polymère et les conditions environnementales ont été analysés.
- **A l'échelle de la communauté microbienne *in situ* et *in vitro***: à partir du suivi de la formation de biofilms microbiens naturels sélectionnés sur différents types de

polymères en milieu naturel (baie de Banyuls sur mer), pour lesquels la diversité microbienne, la production bactérienne et la dynamique de colonisation ont été étudiées. Le biofilm mature a ensuite été placé en conditions *in vitro* en milieu artificiel avec le polymère comme source de carbone et d'énergie. La diversité microbienne, la production bactérienne, la respiration (consommation d'oxygène), la dynamique de biodégradation (microscopie électronique) ont été étudiées.

- **A l'échelle de l'espèce en condition *in vitro*** : une souche pure a été isolée à partir de du biofilm mature cultivé avec le polymère comme seule source de carbone. Son génome et son transcriptome ont été séquencés et analysés pour mieux comprendre les processus génétiques impliqués dans sa biodégradation.

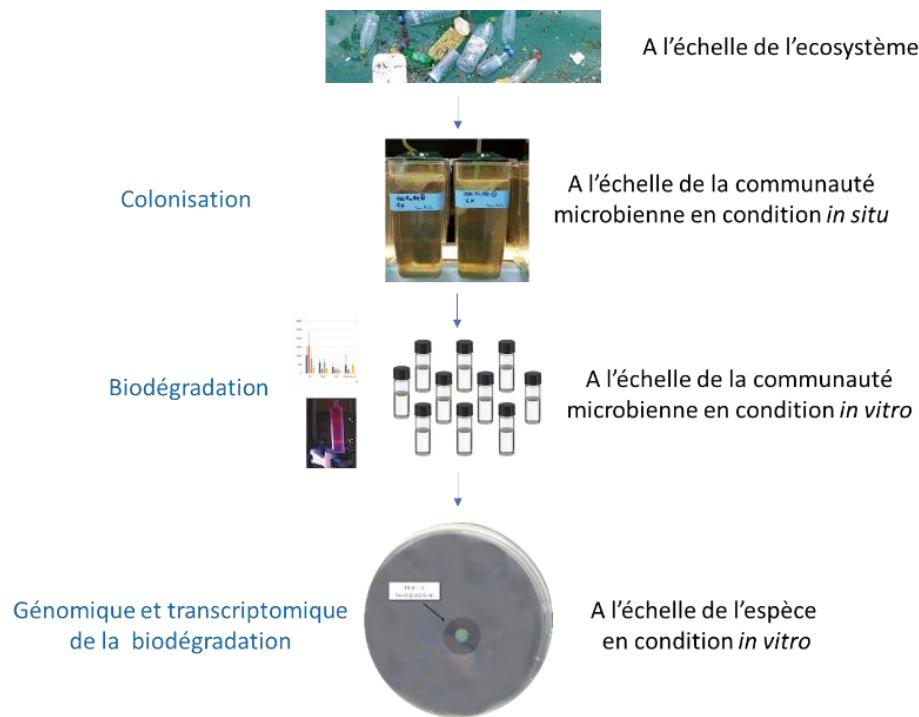
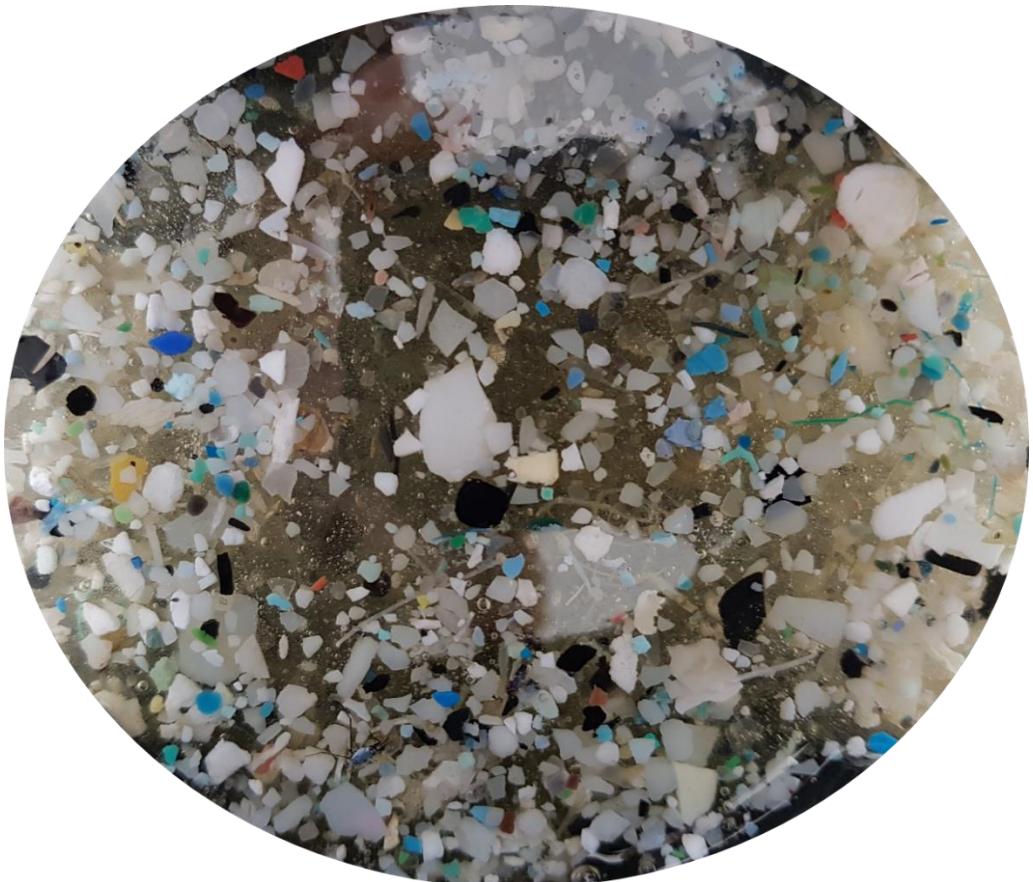


Figure 28 : Vue d'ensemble des études menées pendant cette thèse à différentes échelles

Les différents chapitres de cette thèse ont pour objectif commun d'apporter de nouvelles connaissances sur la plastisphère en général, et sur son potentiel de biodégradation de différents polymères en particulier. Les principaux résultats obtenus sont présentés sous formes de 3 articles en préparation selon une progression allant de l'écosystème océanique, à l'étude de la communauté *in situ*, puis *in vitro* pour terminer à l'échelle de la souche pure.

## Chapitre 2

# Etude de la biogéographie de la plastisphère en milieu marin



©Justine Jacquin, collecteur d'un filet manta  
après 30 minutes dans le vortex du GPGP



## Chapitre 2

*« If you weighed all the living organisms in the ocean, 90 percent of that weight would be from micro-organisms ” Danielle Hall*

### Préambule

#### Les expéditions Tara Pacifique et Tara Méditerranée :

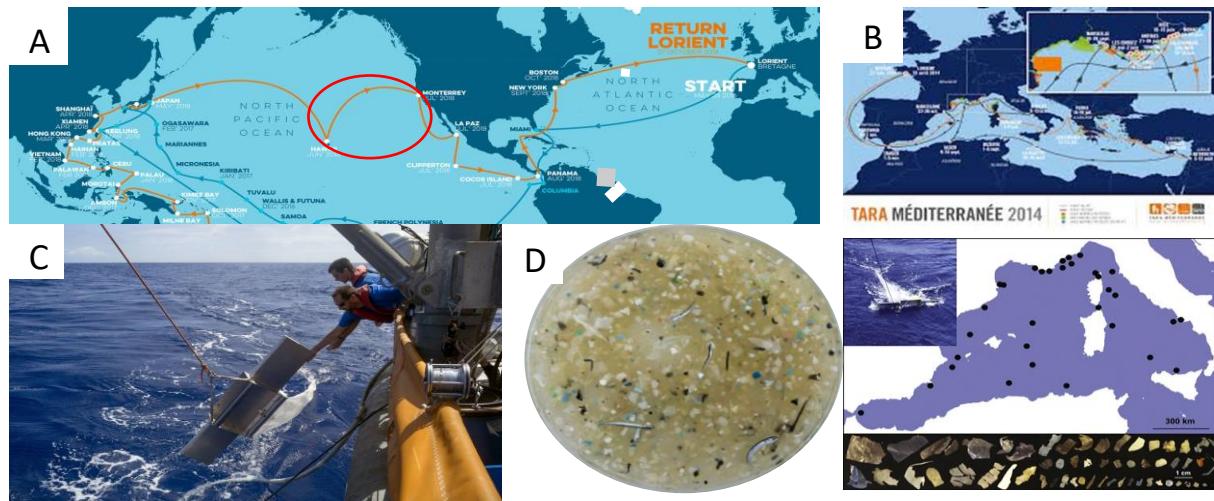
Découvert à la fin des années 1990, la pollution plastique du gyre du Pacifique Nord ou « vortex de déchet du Pacifique Nord » (littéralement traduit de « Great Pacific garbage patch ») a conduit à une médiatisation sans précédent de cette pollution largement rependue à travers les océans du monde. On ne présente plus le « septième continent », cette zone située dans l'océan Pacifique, vortex de plastique situé à mi-chemin entre Hawaï et la Californie.

L'expédition Tara Pacifique (2016-2018) avait pour objectif d'explorer les potentialités de résistance, d'adaptation et de résiliences des récifs coralliens face au changement global. En quittant le port de Lorient le 28 mai 2016, cette goélette a sondé pendant près de 2 ans sur 100 000 km les eaux du Pacifique. Dans son trajet, Tara a traversé le gyre du Pacifique Nord et a pu mesurer cette pollution plastique. J'ai eu la chance de participer à cette traversée entre Honolulu (Hawaii) et Portland (Oregon) qui a duré 17 jours et où 7 stations ont été échantillonnées. En plein milieu du Pacifique, au cœur du vortex de déchets, les micro plastiques ont colmaté le filet Manta habituellement remplis de planctons et d'algues (fig. 29). Les morceaux de plastiques au cœur du gyre Pacifique Nord étaient si nombreux, que l'on avait dû doubler la cadence de prélèvement, 4 filets Manta mis à l'eau par jour, pendant une demi-heure à 3 nœuds. C'est ainsi que le filet a remonté des milliers de morceaux plastiques dont une petite partie (200) ont été analysés au laboratoire.

Notre équipe avait également participé à la mission Tara Méditerranée en 2014, qui navigua sur la mer Méditerranée durant 7 mois d'expédition. Elle a permis de montrer que la mer Méditerranée présentait en moyenne les densités de plastique les plus importantes au monde, avec 250 milliards de microplastiques. Nous avions également réalisé le séquençage de

l'ADN extrait à partir de 74 morceaux de plastiques provenant de 32 filets manta déployés en mer Méditerranée Occidentale (Dussud *et al.* 2018).

Nous avons saisi l'opportunité unique de comparer les échantillons des deux zones les plus polluées du monde par les micro-plastiques pour donner une image de la biogéographie de la plastisphère, par comparaison aux communautés microbiennes de l'eau environnante. Les échantillons ont été prélevés et analysés de manière identique en tout point.



*Figure 29 : Trajet des expéditions Tara Pacifique (A) et Tara Méditerranée (B). Photographie du relevage du filet manta (C) et du « rendu de filet » après 30 minutes d'échantillonage dans le gyre du Pacifique Nord (D)*

## Global diversity and core microbiome of the plastisphere compared to organic-particle attached and free-living planktonic lifestyles from the Tara Oceans expeditions in the Mediterranean Sea and in the North Pacific gyre.

**List of authors :** JACQUIN Justine<sup>1</sup>, Marko Budinich<sup>2,3</sup>, CHENG Jingguang<sup>1</sup>, BARBE Valérie<sup>4</sup>, PEDROTTI Maria-Luiza<sup>5</sup>, GHIGLIONE Jean-François<sup>1\*</sup>.

### Affiliations :

- 1- CNRS, Sorbonne Universités, UMR 7621, Laboratoire d'Océanographie Microbienne, Observatoire Océanologique de Banyuls, France
- 2- Research Federation (FR2022) Tara Océan GO-SEE, Paris, France.
- 3- Sorbonne Université, UPMC Université Paris 06, CNRS, Laboratoire Adaptation et Diversité en Milieu Marin, Station Biologique de Roscoff, 29680 Roscoff, France.
- 4- Génomique Métabolique, Genoscope, Institut François Jacob, CEA, CNRS, Univ Evry, Université Paris-Saclay, Evry, France
- 5- Sorbonne Université, UPMC Paris 06, CNRS UMR 7076, Laboratoire d'Océanographie de Villefranche, Villefranche-sur-mer, France.

### Abstract

The North Pacific and the Mediterranean are two areas known to be heavily polluted by plastic debris. Plastics thus provide a habitat distinct from the surrounding marine environment. A previous study carried out in the Mediterranean showed a clear partitioning between free life (FL), attached organic particles (PA) and plastic marine debris (PMD). This study made it possible to compare the diversity of the plastisphere found on the different fractions (PMD, PA and FL) between the Pacific and the Mediterranean. The plastics communities at the two sites are different from those found in the surrounding seawater (PA and FL). Microbial communities were mainly separated by region and not by polymer, suggesting that environmental factors are more important than polymer type for the composition of the plastisphere. Cyanobacteria are overrepresented in all PMDs. The PMD fractions were not enriched in hydrocarbonoclasts but potentially in pathogenic microorganisms found in abundance. However, the study of the V4-V5 region of microorganisms does not make it possible to conclude on the effective pathogenicity of OTUs, this deserves further study by another molecular method.

## Introduction

The oceans represent the final destination of untreated terrestrial plastic waste, receiving around 8 million tonnes of plastic each year (Jambeck *et al.* 2015). This pollution affects all the aqueous ecosystems of the world, oceans, seas (Barnes *et al.* 2009) and the most remote oceans (Cozar *et al.* 2014; Peeken *et al.* 2018) and rivers (Di and Wang 2018). Once integrated into the marine system, the plastics pieces fragment into microplastics (size <5mm) under the action of abiotic (UV, temperature, oxidation) and or biotic (microorganisms) factors (Shim *et al.* 2016). The microplastics represent the majority of pollution in the accumulation zones (Lebreton *et al.* 2018; Pan *et al.* 2019), such as the Gyre. Plastics will remain on the surface if they have a low density, but can become heavy over time through the accumulation of microorganisms forming a biofilm on its surface (Amaral-Zettler *et al.* 2020). This is how plastics have been identified in the water column (Choy *et al.* 2019), in the depths of the oceans (Chiba *et al.* 2018) and in sediments (Matsuguma *et al.* 2017; Dobaradaran *et al.* 2018).

This pollution is not homogeneous in the marine ecosystem, indeed there are areas of accumulation of plastic waste in the world (Cozar *et al.* 2014). These areas are often defined according to sea currents, because the plastics floating on the surface are trapped and then accumulate in this so called, accumulated areas (Mediterranean sea, off southern Corsica and northern Italy) or gyres (North/South Pacific, North/South Atlantic, Indian ocean) (Cozar *et al.* 2014). In these accumulation zones, we can distinguish the Great Pacific Garbage Patch (GPGP) which alone accumulates between 45 and 129 miles tonnes of plastic, in an area of 1.6 million km<sup>2</sup> (Lebreton *et al.* 2018). This corresponds to a concentration within the GPGP of 10 to 100 kg per km<sup>2</sup>. The Mediterranean is considered to be the most polluted sea in the world, with an estimate between 756 and 3000 tonnes of plastic on (Cózar *et al.* 2015). A recent study has shown a very high plastic concentration compared to other regions of the world, with an average concentration of 0.4 kg / km<sup>2</sup> and up to 1.9 kg / km<sup>2</sup> depending on site studied (Cózar *et al.* 2015; Ruiz-Orejón *et al.* 2016). Areas like northwest Italy, north of Sicily, around the Ionian Islands, have particularly large plastic accumulations (Ruiz-Orejon *et al.* 2016).

This strong accumulation is mainly due to the hydrodynamic characteristics of the Mediterranean Sea as it is a semi-closed basin with a residence time up to 70 years and with currents enhancing the trapping of plastics (Millot and Taupier-Letage 2005; Durrieu de Madron *et al.* 2011).

These microplastics are rapidly colonized and in a very short time the microorganisms are distinguished from the environment (McCormick *et al.* 2016; De Tender *et al.* 2017). Several studies have shown that plastics are a new ecological niche for certain microbial communities (Zettler *et al.* 2013; Bryant *et al.* 2016; Dussud *et al.* 2018b; Pinto *et al.* 2019). Communities on plastics called “plastisphere” are distinguishable from seawater communities living freely or being attached to particles (Zettler *et al.* 2013; De Tender *et al.* 2017; Basili *et al.* 2020). In addition, several studies have shown that this plastisphere was selected based mainly on environmental factors such as spatial and seasonal (Oberbeckmann *et al.* 2014; Amaral-Zettler *et al.* 2015; Basili *et al.* 2020).

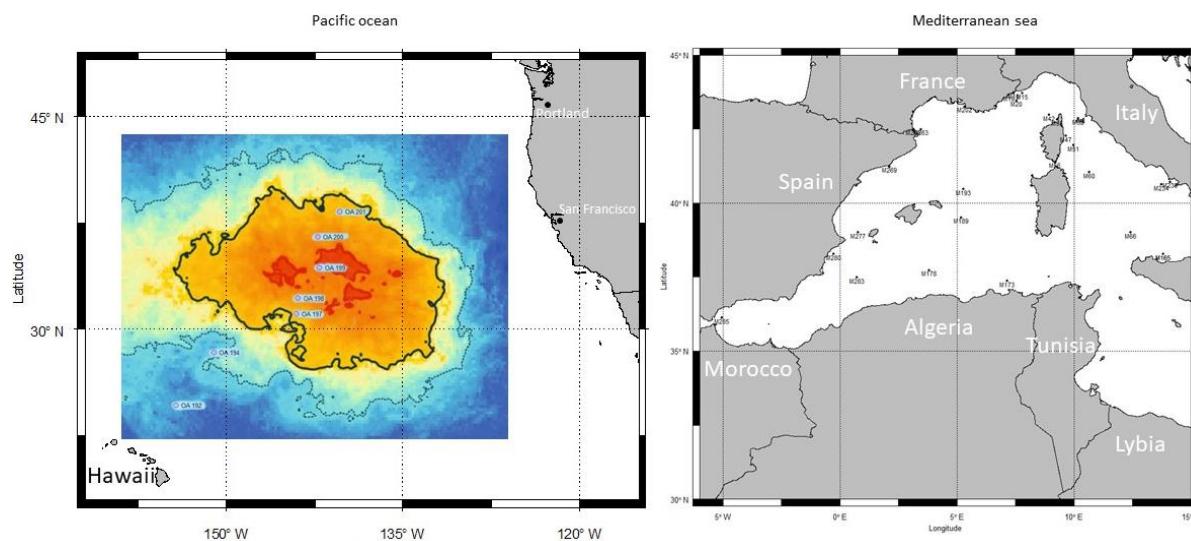
In the GPGP, Bryozoans, Cyanobacteria, Alphaproteobacteria and Bacteroidetes dominate all plastic particles (Bryant *et al.* 2016). In the Mediterranean, cyanobacteria and Alphaproteobacteria also dominate plastic parts. Genera are also common to the two polluted sites, such as those belonging to the class of cyanobacteria, such as *Leptolyngbya* sp., *Pleurocapsa* and *Rivularia* sp (Bryant *et al.* 2016; Dussud *et al.* 2018b).

Plastics are often described in the literature as a potential vector of pathogens (Jacquin *et al.* 2019; Amaral-Zettler *et al.* 2020). Several studies show that members of the genera *Vibrio*, *Campylobacter*, *Salmonella* or *Arcobacter* colonize plastic (Zettler *et al.* 2020). The objective of our study is to compare the microbial communities of the plastisphere of two polluted and geographical distinct sites: the Mediterranean Sea and the Great Pacific Garbage Patch holding in the North Pacific Ocean, to investigate their core microbiome and the specific lineage associated with each region. In this study, we also compare the microbial communities associated with plastics with that of the surrounding environment free living versus attached particles (FL and PA).

## Materials and Methods

### 1. Sampling of plastic and surrounding sea water

Samples were taken during two expeditions: Tara-Mediterranean (Tara-Méditerranée) (April-November 2014) and Tara-Pacific (June-July 2018) aboard the research vessel Tara. The plastic particles, in both sites, were collected using a manta net with a 333mm mesh. The sampling map for the Mediterranean and the Pacific is shown in Fig. 1. The expedition in the North Pacific gyre, was a transect of 7 sampling points all carried out during the day. The expedition in Mediterranean sea contain 27 sampling points all carried out during the day.



## 2. Chemical characterization of the PMD

For Mediterranean samples, the plastic particles were characterized by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and was performed using the individual PMD using Spectrum 100 equipped with an attenuated total reflectance (ATR) (Perkin-Elmer). The spectra were compared to references to identify the nature of the polymer.

## 3. DNA extraction and Next-Generation Sequencing

DNA extraction was performed on each piece of separation plastic, 75 pieces of plastic from the Mediterranean, and 104 pieces from the Pacific. These plastics, taken randomly, represent each sampling point. Regarding the 3 µm and 0.2 µm filters, they were extracted using the same method as plastics, all separately. Prior to the DNA extraction done using the phenol chloroform method (Dussud *et al.* 2018), an ultrasonic bath (3\*1 minutes) step was done in order to help the biofilm breakdown and dispersion of the biofilm. The target area for amplification is the V4-V5 region of 16S rDNA using the Furhman primers the 515-F (5'-GTG YCA GCM GCC GCG GTA A-3' and 926-R (5'-CCG YCA ATT YMT TTR AGT TT-3') (Fuhrman *et al.* 1989), which are particularly adapted to the marine environment (Parada *et al.* 2016). The Mediterranean samples were sequenced at Research and Testing Laboratories (Lubbock, TX), the Pacific plastics at MrDNA (Shallowater, USA) and the surrounding water (PA and FL) at the Genoscope (Paris, France).

The sequences were analysed using FROGS pipeline host in the Galaxy platform (Escudié *et al.* 2018), following the guidelines given in the publication. Briefly, the forward and reverse reads were assembled, sequences were clustered using the SWARM algorithm (Mahé *et al.* 2014) using the aggregation distance of 3 and the chimeras were removed using the FROGS Vsearch tool (Rognes *et al.* 2016). An additional filter step was used to select the OTU clusters with an abundance at  $5.10^{-5}$  threshold to select the most relevant OTUs sequences. The taxonomic affiliation was assigned by BLASTn + (Camacho *et al.* 2009) using the SILVA 138 database 16S (Quast *et al.* 2013).

#### 4. Statistical analysis, diversity assessment and predictive metagenome analysis

All the statistical analyzes were carried out with R software (<https://www.r-project.org/>). The alpha diversity was determined by 3 indices (chao, Shannon and Evenness). The beta diversity is based on a Bray-Curtis distance and allowed to realize the NMDS and the network. The statistical difference was made with the non-parametric Kruskall-Wallis test and the correlations with the spearman test. To identify the OTUs having a major role in the differentiation of bacterial biofilms, we performed SIMPR tests using the Primer 6 software.

## Results

### 1. Chemical characterization of the plastic composition

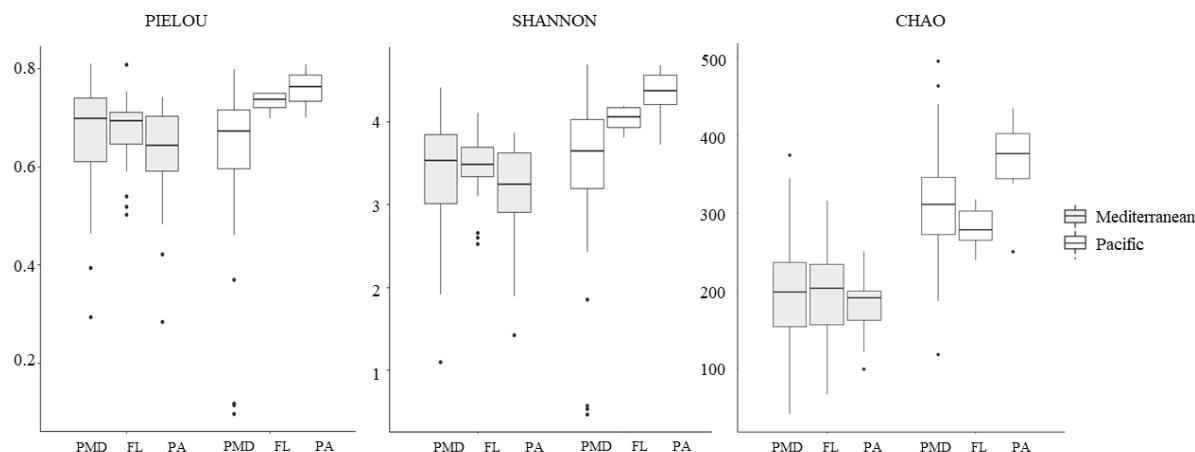
This study was based on the comparison of 75 plastic marine debris (PMD) in the Western Mediterranean Sea and 104 PMD in the North Pacific gyre. Our selection criteria was to get between 3 to 5 PMD of each Manta net after DNA sequencing, whereas only 2 PMD was finally selected for some sampling station after resampling because of not enough sequences (see below). Visually, we covered similar variety of morphological shapes between the samples taken in the Western Mediterranean Sea and in the North Pacific gyre, including filaments, granules, pellets, sometimes transparent, white or coloured PMD. FTIR and ATR analysis showed that polyethylene (PE) dominated the composition of the 75 pieces of plastic, with 73.3% and 71.1% of the PMD found in the Western Mediterranean sea compared to the North Pacific gyre, respectively. In the former, PE was followed by propylene (16%), polystyrene (5.3%) and composite (5.3%), whereas EVOH (ethylene vinyl alcohol) (7.7%), propylene (3.8%), polystyrene (2.9%) and PET (1%) were found in the later.

### 2. Diversity indexes ( $\alpha$ -diversity) of bacteria attached to PMD or attached to organic particles (PA) compared to the free-living planktonic fraction (FL).

At the end of sequencing procedure, a set of 29,353,155 merged sequences was obtained. After a first cleaning (expected length, primer present), chimera checking and abundance filter (0.005%), we obtained 22,545,882 sequences that represented 1,285 OTUs for the analysis with 97.7% of OTUs that could be affiliated. Chloroplastic, mitochondrial and eukaryotic sequences were removed from the analysis. Only the bacterial reads were treated in this study, due to the

small number of archaeal reads. Bacterial sequences were randomly resampled at 9,115 to ensure the number of sequence reads from each sample were equal to the number of reads from the sample with the fewest sequences. This resulted in 2 169 370 sequence reads (1 093 800 from the Mediterranean and 1 0755 570 from the Pacific samples) falling into 1054 OTUs (0.03 distance threshold) for all samples, with 909 from the Mediterranean and 974 from the Pacific datasets. The resampling did not affect the representativeness of the microbial diversity, since the rarefaction curve reached a plateau after 5000 sequences.

The Chao index showed that the bacterial richness was significantly lower in the Mediterranean sea compared to the North Pacific gyre for all fraction (Man-Withney :  $2.2 \cdot 10^{-16}$ ) (Fig.2). Significant differences were also found between the fractions (Mann Whitney  $p < 0.05$ ; respectively), but with different trends depending on the geographic region. PMD fraction (170.1 and 262.36) presented always intermediate richness values compared to FL (174.38 and 251) and PA (153.8 and 323) that showed higher or lower values in the Mediterranean Sea and in the North pacific Gyre, respectively.



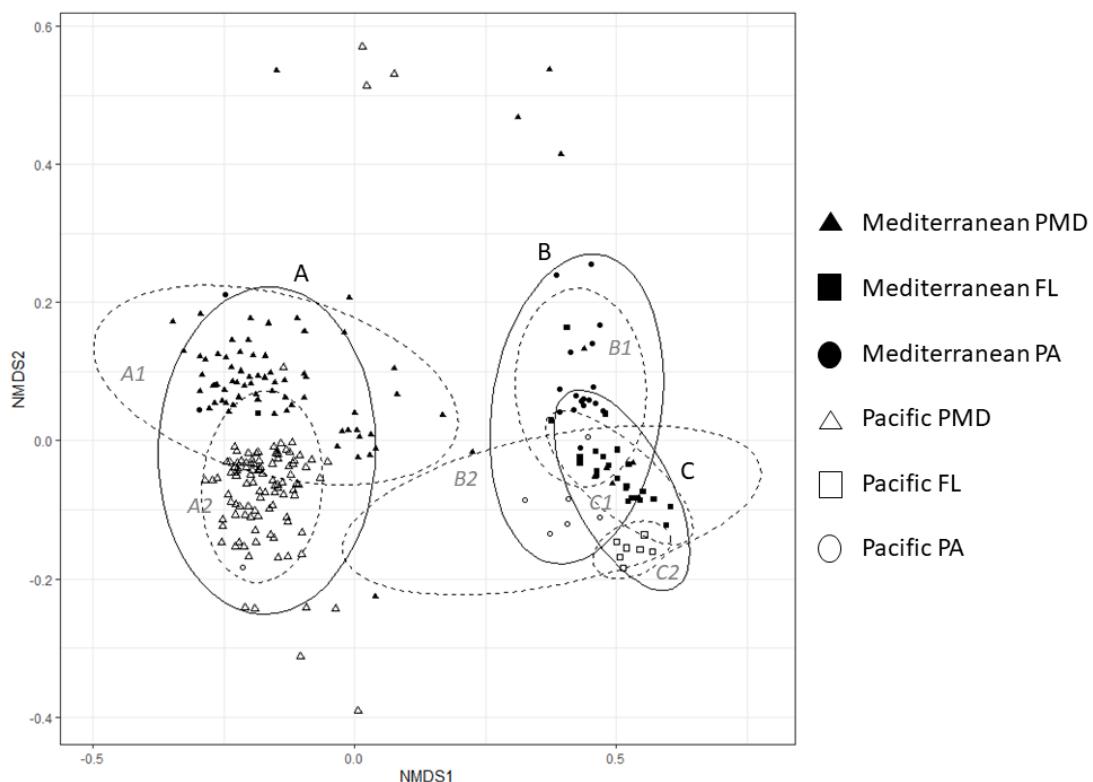
**Figure 2 :** Boxplot presenting the bacterial diversity indices (Pielou evenness, Shannon diversity and Chao1 richness) according to the sampling location (Meditteranean sea and North Pacific Ocean Gyre) for the FL, PA and PMD fractions. The median value is marked with a vertical line, and whiskers represent the minimum and maximum values. Outliers are indicated as filled circles.

The Pielou index does not show a significant difference between the Mediterranean PMD fraction and the Pacific PMD fraction for all the fractions (Man-Withney: 0.4032) (Fig. 2). However, the PA and FL fraction between the two regions observed a significant difference (MannWithney 0.0004 and 0.025 respectively). In the Mediterranean, the equity between the

three fractions is not significantly different (Kruskal and Wallis,  $p = 0.239$ ) with a Pielou index on average of 0.62 for PA, 0.68 for FL and 0.67 for PMD. For the Pacific, equity is different (Kruskal and Wallis,  $p = 7.21 \cdot 10^{-5}$ ), a higher value is found on the PA (0.76), then the FL (0.73) and lastly the PMD (0.64).

The Shannon index confirmed that the FL (4.03 and 3.42) and PA (4.33 and 3.14) fractions presented a higher microbial diversity in the Pacific than in the Mediterranean samples, respectively (Kruskal et Wallis,  $p= 7.56 \cdot 10^{-5}$ ). However, we could not find a significant difference for the PMD diversity between the two regions (Mann-Withney  $p=0.1334$ ).

### 3. Bacterial community structure ( $\beta$ -diversity) of the FL, PA, PMD fractions in the Mediterranean sea and in the North Pacific Gyre.



**Figure 3:** Non-metric multidimensional scaling (NMDS) plot of the bacterial community structure composition as determined from 16S rRNA-based profiles based on Bray–Curtis similarity index for the FL, PA, PMD fractions in the Mediterranean sea and in the North Pacific Gyre. Stress value: 0.08.

The NMDS ordination plot presented in Figure 3 showed a low stress value (0.08), which corresponds to a good ordination with no real prospect of a misleading interpretation. Les groupes (A, B et C) ont été obtenu en en considérant que nos variables avec une distribution de type t (basé sur la distribution t de student unidimensionnelle). NMDS (Non-metric multidimensional scaling) analysis showed clear distinction between the tree fractions, and especially between PMD (group A) compared to FL and PA (ANOSIM R>0.56).

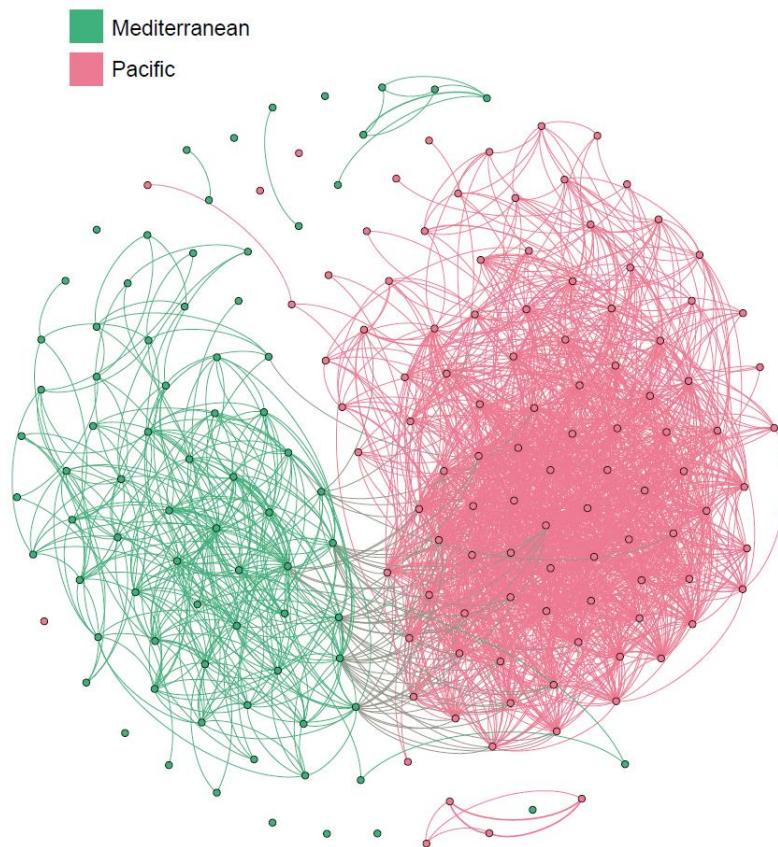
The group mainly representing plastics (group A) can be subdivided into two groups, A1 representing Mediterranean LDCs and A2 representing Pacific LDCs. These two groups have a uniform distribution based on the Bray Curtis distance (ANOSIM R = 0.287)

The group predominantly representing the PA fraction (B) can be divided into two subgroups, one represented mainly by the Mediterranean PA (B1) and the other by the Pacific PA (B2). These two subgroups have similarities with an ANOSIM  $R = 0.32$ . Like the FL fraction (group C), divided into subgroups with a uniform distribution (ANOSIM,  $R = 0.257$ ), C1 is predominantly dominated by the Mediterranean and C2 predominantly dominated by the Pacific.

In the Mediterranean the PMD fraction shows more similarity with the PA fraction (ANOSIM,  $R = 0.567$ ) than with the FL fraction (ANOSIM,  $R = 0.66$ ). The FL and PA fraction shows more similarity according to the bray-Curtis distance, than with the PMD fraction (ANOSIM,  $R = 0.544$ ).

This same pattern is found in the Pacific, the PMD fraction shows slightly more resemblance with the PA fraction (ANOSIM,  $R = 0.8$ ) than with the FL fraction (ANOSIM,  $R = 0.89$ ). The FL and PA fraction does not show as strong a dissimilarity as with the PMD fraction (ANOSIM,  $R = 0.723$ )

The samples from the Pacific, having the most interactions are those from station 199 (Middle of GPGP) and 201 (towards the outside of GPGP) and 199 with those station M60 (NE of Sardinia), M42 (N of Corsica), M66 (Middle of the Mediterranean between Italy and Sardinia) and M173 (near of Algeria) of the Mediterranean. Pacific Station 192 (off Hawaii) appears to be completely isolated from other stations. This particularity is also found in the Mediterranean for the M19 station (Station near the south coast of France).

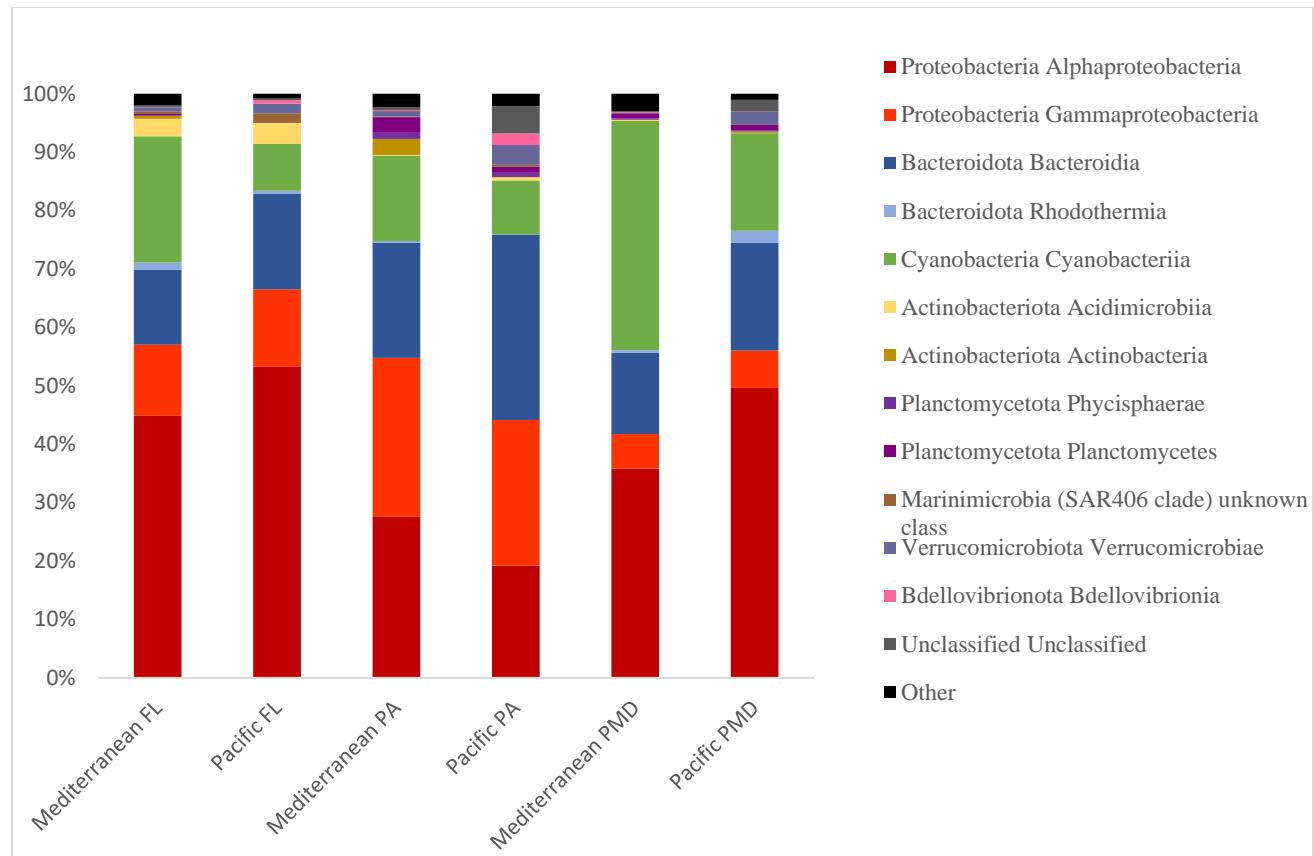


**Figure 4:** Network analysis, based on the Bray-Curtis distance of the OTUs. In this network, the nodes in green represent the plastic samples from the Mediterranean and the nodes in pink are those from the Pacific

#### 4. Taxonomic affiliation of the FL, PA, PMD fractions in the Mediterranean Sea and in the North Pacific Gyre.

The FL fractions from Mediterranean Sea and the North Pacific gyre were dominated by Alphaproteobacteria that represented 45% in the Mediterranean and 53.24% in the Pacific. SAR 11 dominated with 14.63% of the total relative abundance in the Mediterranean and 25.5% in the Pacific. Cyanobacteria represented a higher proportion of the community in the Mediterranean (21.6%) than in the Pacific (8.0%). Inversely, Bacteroidia (mainly the Flavobacteriaceae) and Gammaproteobacteria were more abundant in the Pacific (16.0% and 13.2%, respectively) than in the Mediterranean (12.8% and 12.2%, respectively) (Fig. 5). The bacterial genera allowing the differentiation of the two FL regions are OTUs belonging to the family of Cyanobiaceae, Sphingomonadaceae and Rhodobacteraceae and abundant in the Mediterranean, they explain 20% of the differentiation. OTUs affiliated with the genus

*Prochlorococcus* sp., the family SAR 116, and the order Rhodospirillales are found in abundance in the Pacific and account for 18.1% of the differentiation (Fig. 6).



**Figure 5 :** Histogram representing the abundance of taxonomic class of the different fractions (FL, PA and PMD) found in the two sites studied.

The PA fractions were also dominated by the same 4 taxonomic groups (Alphaproteobacteria, Cyanobacteriia, Bacteroidia and Gammaproteobacteria) but with different proportions between location and compared to the FL fraction. In the Pacific, PA was dominated by Bacteroidia (mainly *Formosa* sp. and *Fluviicola* sp.) which represents 31.7% of the total affiliated reads, while in the Mediterranean this class represented only 20%, and was represented by a OTUs related to *Lewinella* sp. The proportion of Gammaproteobacteria was similar with 25% in the Pacific and 27% in the Mediterranean, both were dominated by the genus *Alteromonas* sp. (Fig. 6). While Alphaproteobacteria represented only 14.35% in the Pacific was the dominant class in the Mediterranean (27.7%), dominated by lineages related the *Erythrobacter* sp. and to the Rhodobacteraceae family. As for Cyanobacteria, they were poorly represented in the PA Pacific (5.7%) dominated by order Oxyphotobacteria and the genus *Prochlorococcus* sp., and more represented in the Mediterranean (14.6%) dominated by other species (*Synechococcus* sp. and *Calothrix* sp.) (Fig. 5). The bacterial genera allowing the differentiation of the two PA regions

are OTUs belonging to the family of Alteromonadaceae, Sphingomonadaceae and the genus *Lewinella* sp., abundant in the Mediterranean and explaining 15.5% of the differentiation (Fig. 6). OTUs affiliated with the genus *Formosa* sp., *Fluviicola* sp. and *Aesturiibacter* sp. are found abundantly in the Pacific and account for 6.2% of the differentiation according to SIMPR analyzes.

The PMD fractions were dominated by 3 taxonomic groups including Cyanobacteria (39.2% and 15%), the Alphaproteobacteria (35.8% and 54.5%) and the Bacteroidetes (13.9% and 15.0%) in the Mediterranean and in the Pacific, respectively (Fig. 5). Within Cyanobacteria, *Rivularia* sp. affiliated with the *Calothrix* sp. lineage dominated PMD fractions in both regions, the Mediterranean (9.3%) and in the Pacific (9%) respectively. Cyanobacteria are also represented by the genus *Phormidesmis* sp. (16.4% and 6.1%) and *Pleurocaspa* sp. representing (6.2% and 0.08%) in the Mediterranean and the Pacific respectively. Alphaproteobacteria are dominated by the Rhodobacteraceae family (19.8 and 30.5%), the genus *Pseudahrensia* sp. (2.9% and 7.3%), *Tateyamaria* sp. (2.34 and 4.1%) and *Erythrobacter* sp. (3.3% and 1.4%) in the Mediterranean and the Pacific respectively. Bacteroidetes are dominated by the family Flavobacteriaceae sp. (9.8% and 8.7%), Saprospiraceae (2.84% and 7.5%) and Rhodothermaceae (0.4%, 1.84%), including the genus *Muricauda* sp. (1.2%, 1.7%), *Lewinella* sp. (1.9%, 5.4%). The OTUs explaining the difference in community between the Mediterranean and the Pacific on PMDs are the genera *Phormidesmis* sp., *Pleurocapsa* sp., *Erythrobacter* sp., *Acrophormium* sp., *Dokdonia* sp. and *Sagittula* sp. present in abundance in the Mediterranean and explaining 20.32% of the differentiation, according to SIMPR analyzes. The genera present in abundance on the PMDs of the Pacific are *Pseudahrensia* sp., *Lewinella* sp., *Psychrobacter* sp., *Tenacibaculum* sp., *Roseovarius* sp. and *Cobetia* sp., explaining 14.3% of the differentiation of the communities (Fig. 6).



**Figure 6 :** Bubble plot characterizing the family and gender of each fraction (FL, PA, PMD) according to its sampling region (Mediterranean or Pacific).

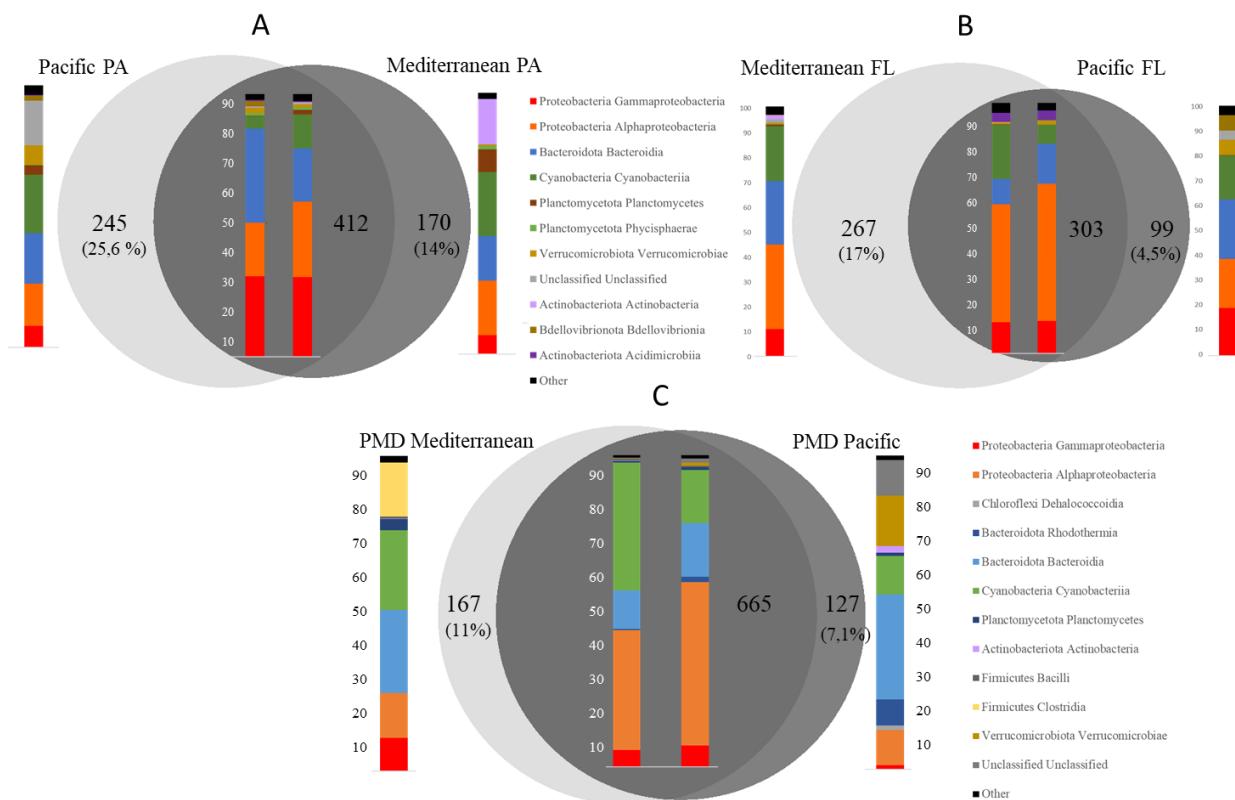
In the Mediterranean, the bacterial community of PMD is distinguished from the surrounding water (PA and FL), mainly thanks to the genus *Phormidesmis* sp., *Rivularia* sp., *Pleurocaspa* sp. and *Erythrobacter* sp. abundant on the PMD, they explain 19.53% and 21.02% of the dissimilarity with the fraction FL and PA respectively.

In the Pacific, the bacterial community of PMD is distinguished from the surrounding water (PA and FL), mainly thanks to the genus *Rivularia* sp., *Pseudahrensia* sp. *Phormidesmis* sp.

and *Lewinella* sp. abundant on the PMD and explaining 15% and 16.1% with the FL and PA fraction of surrounding water.

## 5. Identification of the core microbiome and specificites in each fraction of Mediterranean and Pacific communities

The FL fractions share 303 OTUs common between the two regions (Fig. 6), 99 are specific to the Pacific and 267 are specific to the Mediterranean. The common fraction of FL are dominated by Alphaproteobacteria (51%), followed by Cyanobacteria (15%) and Bacteroidia (14%). The specific FL fraction of the Mediterranean which is not shared with the Pacific is dominated by Alphaproteobacteria (mainly *Fulvimarina* sp.) at 34%, Bacteroidia (mainly the genus *Lewinella* sp.) at 25.5%, Cyanobacteria (mainly *Synechococcus* sp.) at 21.9% and 11% Gammaproteobacteria (mainly the genus *Cobetia* sp.). The Pacific FL specific fraction is dominated by Bacteroidia (mainly Flavobacteriaceae) at 24%, Alphaproteobacteria (mainly *Rickettsiales* sp.), Gammaproteobacteria (mainly SAR 92) at 19.5% and 19% respectively and Cyanobacteria (mainly *Atelocyanobacterium* sp.) at 17.5 %. The FL core microbiome is dominated by mainly Alphaproteobacteria (51%), Cyanobacteria (14.5%) and Bacteroidia (13%) (Fig. 7). The Alphaproteobacteria class is particularly well represented in the core microbiome, thanks to the abundance of SAR 11 and SAR 116 representing 22.1% of the core microbiome. The most abundant OTU is an Alphaproteobacteria, SAR 11 clade 1 representing 15.2% of the core microbiome. In Alphaproteobacteria, the Rhodobacteraceae, SAR 116, and Sphingomonacaeae family represents nearly 13.5% of the core microbiome. The cyanobacteria class is represented mainly by the Cyanobiaceae family (15.6%), and the Bacteroidia are dominated by the Flavobacteriaceae family representing 8.08% of the core microbiome.



**Figure 7 :** Venn diagrams representing OTUs found in Western Mediterranean (WM) and North Pacific Gyre (NPG) bacterial datasets on FL fraction, PA fraction and PMD fraction. Number of OTUs (665 were common, 167 and 127 were specific to Mediterranean and Pacific, respectively) and their relative percentage to the total number of OTU (in brackets) are indicated. Histograms of corresponding taxonomic composition are grouped at the class level for unique and shared OTUs between communities.

The PA fractions share 413 common OTUs between the two regions, 169 are Pacific specific and 244 are Mediterranean specific (Fig. 7). The common fraction of PA is dominated by Gammaproteobacteria (30.6%), followed by Bacteroidia (28%) and Alphaproteobacteria (24.5%). The Gammaproteobacteria are dominated by the Alteromonadaceae family representing 16.4% of the core microbiome of the PA fraction. In the core microbiome, Bacteroidia are mainly represented by the genus *Lewinella* sp. (5%) and the family of Flavobacteriaceae (7.1%). Alphaproteobacteria are dominated by the Sphingomonadaceae (9%) and Rhodobacteraceae (6.9%) families. The specific PA fraction of the Pacific which is not shared with the Mediterranean sea is dominated by Cyanobacteria (mainly Oxyphotobacteria) at 22.2%, Bacteroidia (mainly Flavobacteriaceae) at 19.34%, Alphaproteobacteria (mainly Marinibacterium) at 16.1% and Gammaproteobacteria (mainly the genus Morganellaceae) at 8.2%. The Mediterranean specific PA fraction is dominated by

Cyanobacteria (mainly *Rivularia* sp.) at 24.5%, Alphaproteobacteria (mainly Sphingomonadaceae) at 20.8%, Actinobacteria (mainly *Pseudonocardia* sp.) at 17.4% and Bacteroidia (mainly Flavobacteriaceae) at 17.1%.

The comparison of PMD fraction between OTU compositions in Western Mediterranean or North Pacific Gyre showed that relatively fewer OTUs were specific to the geographical location (167 in the Mediterranean and 127 in the Pacific) compared to the common OTUs that constituted a core microbiome on our samples (665 OTUs). The common OTUs found in both Western Mediterranean Sea and North Pacific Gyre were composed of three phyla, including Alphaproteobacteria (46.8%, Rhodobacteraceae, Rhizobiaceae), Cyanobacteria (26.8%, Phormidesmiaceae and Rivulariaceae) and Bacteroidia (15.4%, Flavobacteriaceae and Saprospiraceae) (Fig.7). Among the PMD core microbiome, the most abundant OTU is *Calothrix parasitica* accounting for nearly 7.3% of the total relative abundance. The most represented family are the Rhodobacteraceae (mainly *Tateyamaria* sp. and *Yoonia-Loktanella* sp.) 25.5%, followed by Phormidesmiaceae (mainly *Phormidesmisis* sp.) 11.3% and Rhizobiaceae (mainly *Pseudahrensia* sp.) 9.4%. Among the PMD core microbiome, the most abundant OTU is *Calothrix parasitica* accounting for nearly 7.3% of the total relative abundance. The most represented family are the Rhodobacteraceae (mainly *Tateyamaria* sp. and *Yoonia-Loktanella* sp.) 25.5%, followed by Phormidesmiaceae (mainly *Phormidesmisis* sp.) 11.3% and Rhizobiaceae (mainly *Pseudahrensia* sp.) 9.4%.

In order to better characterize the core microbiome, we looked at the OTUs shared at 90% by all the plastic parts sampled. In the Western Mediterranean Sea, we identified 832 OTUs on all PMD fraction. None of the 832 OTUs are shared by all the plastic parts making up the PMD fraction, and only 6 OTUs were shared by 90% of PMD. These common OTUs were all belonging to the Alphaproteobacteria, including Rhodobacteraceae (81%, mainly *Litoreibacter* sp., *Yoonia-Loktanella* sp., *Tateyamaria* sp.) and Sphingomonadaceae (19%, mainly *Erythrobacter* sp.). In the North Pacific Gyre, we identified 792 OTUs on all PMD fraction, from which only 6 OTUs were shared by all of the PMD. These common OTUs were all belonging to the Alphaproteobacteria with 3 Rhizobiaceae (*Pseudahrensia* sp.), 2 Rhodobacteraceae (*Roseovarius* sp.) and 1 Hyphomonadaceae undetermined. When looking at common OTUs shared by 90% of all the PMD fractions of the Pacific, the resulting 36 OTUs were mainly represented by the Rhodobacteraceae (41%, mainly *Roseovarius* sp.), Rhizobiaceae (19%, mainly *Pseudahrensia* sp.) and Rivulariaceae (17%, mainly *Calothrix* sp.).

The unique OTUs in PMD found only in the Mediterranean Sea belonged mainly (28%) to *Dokdonia* sp., *Acinetobacter* sp., *Phormidesmis* sp. and unidentified Oscillospiraceae sp. In the Pacific, they belonged mainly (20%) to *Haloferula* sp., *Aureispira* sp. and *Phormidesmis* sp. All unique OTUs from Mediterranean or Pacific were from the so-called “rare biosphere” (<1%).

## 6. Putative hydrocarbonoclastic bacteria in PMD, PA and FL

Putative hydrocarbonoclastic bacteria represented 14.1% of the OTUs in the PMD from the Western Mediterranean Sea. They were dominated by *Erythrobacter* sp., *Lewinella* sp., *Muricauda* sp., *Roseovarius* sp. and *Winogradskyella* sp. that represented 59.6% of putative hydrocarbonoclastic OTUs. They represented up to 20.3% in the Pacific, dominated by *Lewinella* sp., *Psychrobacter* sp., *Muricauda* sp., *Roseovarius* sp., and *Tenacibaculum* sp. that represented 74.3% of the putative hydrocarbonoclastic OTUs.

On the 665 OTUs from the core microbiome commonly found in Mediterranean and Pacific PMD, we observed that 17.7% were putative hydrocarbonoclastic (108 OTU). Most of them (70%) belonged to Bacteroidia (33% represented by *Muricauda* sp. and *Lewinella* sp.) 48 %, Gammaproteobacteria represented 23 % (18.3% is represented by *Psychrobacter* sp. and *Cobetia* sp.) and Alphaproteobacteria represented 28.5 % (23.52 % represented by *Roseovarius* sp. and *Erythrobacter* sp.).

It is noteworthy that putative hydrocarbonoclastic bacteria represented 10% and 26.3% of the compiled Mediterranean and Pacific FL and PA fractions, respectively. In the Western Mediterranean Sea, they belonged to *Balneola* sp. and *Alteromonas* sp. in the FL fraction and to *Alteromonas* sp. and *Sphingobium* sp. in the PA fraction. In the North Pacific Gyre, they belonged to *Winogradskyella* sp., *Muricauda* sp. and *Tenacibaculum* sp. in the FL fraction and to *Aesturribacter* sp., *Oleibacter* sp. and *Marinobacter* sp. in the PA fraction. Interestingly, *Lewinella* sp. and *Erythrobacter* sp. were two genera found in abundance (from 1.16 to 11.8%) in all FL, PA and PMD fractions and in the two sites studied.

## 7. Putative pathogens in PMD, PA and FL

Putative pathogenic OTUs were found on all the different fractions (PMD, PA and FL) in the Pacific and the Mediterranean, but mainly in the PMD of the 2 geographical regions (71% of all putative pathogenic OTU numbers) compared to PA (25%) and FL (4%). *Vibrio* was the

major putative pathogen detected in 158 samples. *Vibrio* sequences were found with high homology (query cover >97%) in Blastn with human (*V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*) or animal pathogens (*V. spendidus*, *V. crassostreae*), but the V4-V5 primers used in this study was not sufficient to give clear assignation at the species level. *Vibrio* were found in 67 and 53 PMD, 16 and 6 PA and in 19 and 6 FL samples from the Mediterranean and Pacific regions, respectively. In the Mediterranean PMD Fraction, *Vibrio* sp. accounts for 0.5% of the total abundance, while they represent only 0.078% in the Pacific. One of the polypropylene sample (from manta M165, 43 km of city Palerme) in the Mediterranean sea hosted 14% of the total sequences affiliated to *Vibrio* sp., but this sample was rather an exception than a rule since this genera generally did not exceed 0.5%. We also found a large proportion (24%) of the putative human pathogen *Acinetobacter* in the 2 geographic. This bacterium was mainly found on PMD (25 PMD in the Mediterranean and 7 in the Pacific). On the PMD fractions of the Mediterranean, this bacterial genus represents on average 0.8% against 0.003% in the Pacific. *Acinetobacter* was also found on the FL fractions in the Mediterranean (16) and rarely in the Pacific (1), but also in PA (7 in the Mediterranean and 1 in the Pacific).

## Discussion

### 1. Niche partitioning between PMD, FL and PA fractions

The results presented here demonstrated niche partitioning in sea surface prokaryotes as reflected in clear differences in the compositions of free-living, organic particle-attached and PMD-attached bacteria.

Bacterioplankton has been generally classified into two types of communities depending on their relationship with the particulate matter, e.g. free-living (FL) and particle-attached (PA) lifestyles (Crump *et al.* 1999). FL and PA marine microbial communities have repeatedly been shown to differ in their diversity (alpha-diversity) and composition (beta-diversity) in different locations worldwide (Ghiglione *et al.* 2005, 2007; Grossart 2010; Ortega-Retuerta *et al.* 2013). More recently, another type of marine bacterial communities living on PMD were shown to differ from the FL fraction (Zettler *et al.* 2013; Debroas *et al.* 2017) and also from the PA fraction (Oberbeckmann *et al.* 2018; Dussud *et al.* 2018b). In this study, we observed that the spatially isolated Western Mediterranean and North Pacific Gyre hosted FL, PA and PMD communities that consistently differed in beta-diversity, with these differences accounting for a considerable proportion of the variance in community composition. This result is in accordance with previous studies which showed that differences between FL and PA fractions exceeded the global-scale geographical variation (Acinas *et al.* 1997, Salazar *et al.* 2015). Here, we show that it is not only the case for FL and PA fractions, but also for the PMD fraction, which confirms the strong niche partitioning already observed in different locations but without exploring their biogeography between different ocean basins (Oberbeckmann *et al.* 2018; Xu *et al.* 2019).

We also observed that the communities within any of the FL, PA and PMD fractions were clearly influenced by their geographical origin. Such biogeographical patterns can result from different ecological processes as a consequence of two main processes (Hanson *et al.* 2012) : (a) the ‘environmental selection’, built on the principle that environmental pressure exert different pressure on each fraction or (b) the ‘dispersal effect’, where dispersal capabilities of microbes from each fraction is considered. We estimated the relative contribution of both processes by relating community composition to a set of environmental variables, and to the geographical distance between sampling locations. The multiple regression on matrices analysis explained a total of 26.7% (FL fraction), 17.6% (PA fraction) and 16.8% (PMD fraction) of the total variance in the Bray–Curtis dissimilarity matrix. The effect of environmental variables on

bacterial community structure was statistically significant ( $p<0.05$ ) for the FL (explaining 14.3% of the variance), PA (explaining 7.6% of the variance) and PMD fractions (explaining 6.5% of the variance). We found that temperature was the main environmental driver of bacterial communities in all fractions, which is in accordance with another study based on Tara expeditions on global planktonic ocean microbiome in the epipelagic zone (Sunagawa *et al.* 2015). On another hand, the effect of geographical distance was significant between the two ocean basins for the three fractions ( $p<0.05$ ), but not within the same basin. Thus, both environmental selection and dispersal effects appear to shape the biogeography of all the FL, PA and PMD fractions, although spurious distance effects may arise as a result of unmeasured environmental variables (Hanson *et al.* 2012).

In the specific case of PMD, we also evaluated the influence of the polymer composition, morphology, size and age in shaping this specific community. As in many other places in the world surface oceans (Erni-Cassola *et al.* 2019), PE was the most abundant polymer (> 70%) in both location, followed by PP, PS together or not with PET in the North Pacific gyre or in western Mediterranean Sea, respectively. By comparing the total of 179 plastic pieces of different polymer composition, we could not find any significant link between the bacterial community structure and the polymer type. The only other study evaluating the biogeography of the plastisphere from North Pacific and North Atlantic gyres showed also a main difference between ocean basins and to a lesser extent between polymer types (Amaral-Zettler *et al.* 2015). Our study gives another proof that the environmental conditions rather than the polymer type are driving the plastisphere composition at both global (Amaral-Zettler *et al.* 2015) and regional scales (Basili *et al.* 2020). This result may appeared in contradiction with other studies showing clear distinction between biofilms growing on different polymer type (Oberbeckmann *et al.* 2018; Dussud *et al.* 2018a; Pinto *et al.* 2019). Such discrepancy may be explained by the fact that these studies were focusing on the formation of the biofilm when pristine new plastic were immerged for several weeks or months in seawater, which is different from our study that sampled microplastics directly in the environment and from unknown origin. As mentioned above, the plastisphere community is mainly driven by the environmental conditions and the dispersion of PMD rather than their composition. PMD are long-lived substrates that can transport microbial communities across ocean basins and our results, together with other global comparison between the North Pacific and North Atlantic gyres (Amaral-Zettler *et al.* 2015) are indicating that the environment selection is even more important in shaping the specific community growing on plastics. However, further studies will be needed to find the other

parameters that may be specifically applied to PMD in order to explain the clear niche partitioning of the plastisphere compared to FL and PA communities.

The alpha diversity indices also make it possible to distinguish the two area of studies. The richness (chao index) is greater on all fractions of the Pacific compared to that of the Mediterranean. The richness is not significantly different between the fractions FL, PA and PMD of the Mediterranean and PMD and FL of the Pacific. These results are correlated by previous studies, which show greater richness in the surrounding water (Zettler *et al.* 2013) or on PMD fractions (De Tender *et al.* 2015; Bryant *et al.* 2016).

In the Mediterranean, the evenness is homogeneous over the three fractions, which is not the case in the Pacific, which sees a lower equity on the PMD fraction (Pielou: 0.64). PMDs promote the emergence of certain species in the Pacific. The diversity found in the FL and PA fractions is greater in the Pacific than in the Mediterranean. Unlike the Mediterranean, the diversity on the PA fraction is greater than the rest of the other fractions, this is correlated with a previous study conducted in the North Pacific area (Suzuki *et al.* 2017).

## **2. Original OTUs in the plastisphere compared to PA and FL in the Western Mediterranean Sea or in the North Pacific gyre and common OTUs found in both locations.**

The Mediterranean and Pacific FL fractions are mainly characterized with the genus SAR 11. This clade has already been identified as abundant in these two regions of the world (Morris *et al.* 2002; Suzuki *et al.* 2017), although its biological role remains poorly known. Cyanobacteria are 2.7 times more important in the Mediterranean than in the Pacific. The Mediterranean Sea is known as one of the most nutrient-poor seas (Siokou-Frangou *et al.* 2010). In the Mediterranean, a phosphate is observed with an N: P ratio of 20: 1 (Ribera d'Alcalà 2003). The north pacific subtropical gyre is also known to have a low phosphate concentration (Moutin *et al.* 2008). Cyanobacteria are influenced by water temperature, excess nitrogen, phosphorus and the N / P ratio (Dolman *et al.* 2012), which may explain this difference between the Pacific and the Mediterranean. FL fractions are characterized also by the genus *Synechococcus* sp. in the Mediterranean and *Prochlorococcus* sp. in the Pacific, two phototrophic bacterial genera most widespread in the oceans (Suzuki *et al.* 2017; Sunagawa *et al.* 2020). SAR 11, *Synechococcus* sp., *Prochlorococcus* sp. are found in abundance in nutrient poor ocean environments.

The PA fractions observed a strong abundance of the genera *Alteromonas* sp. in the two regions, of the genera *Lewinella* sp. and *Muricauda* sp. in the Mediterranean and of the genera

*Marinobacter* sp., *Winogradskyella* sp. in the Pacific. The attachment of bacteria depends on many factors, however the microorganism must be provided with organelles (flagella, pili), with a load and hydrophobicity of the outer membrane conducive to the attachment of a surface (Donlan 2002; Palmer *et al.* 2007). This may explain why bacterial genera living preferentially attached to particles like *Alteromonas* sp. are also found in the biofilm of the plastisphere (Suzuki *et al.* 2017; Pinto *et al.* 2019).

This study allows a more global observation of the communities composing the plastisphere on a global scale. the two oceanographic regions that present the highest sea surface pollution by microplastic worldwide (Cozar *et al.* 2014; Lebreton *et al.* 2018).

PMD fractions in the Pacific are dominated by primary colonizers (Alphaproteobacteria and Cyanobacteria) and secondary colonizers (Bacteroidetes) (Dang and Lovell 2000; Lee *et al.* 2008; Amaral-Zettler *et al.* 2020) allow us to deduce that the biofilms formed on the surface of the plastic are at an advanced stage of maturation. The PMD fraction in the Mediterranean is largely dominated by the primary colonizer (Cyanobacteria and Alphaproteobacteria) and to a lesser extent by the secondary colonizers, possibly suggesting that the bacterial biofilm is more recent in the Mediterranean than in the Pacific. The bacterial genera *Phormidesmis* sp. and *Rivularia* sp. are preferentially associated with the PMD fraction in the Mediterranean and the Pacific. *Rivularia* sp. is an already isolated genus known to colonize and degrade hydrocarbons and identified on the North Atlantic plastisphere (Abed *et al.* 2014; Zettler 2013). Generally speaking, prokaryotic phototrophs like cyanobacteria are strongly represented on plastics floating on the surface of seawater (Zettler *et al.* 2013; Amaral-Zettler *et al.* 2020).

In the Mediterranean, it is the genera *Erythrobacter* sp. and *Pleurocaspa* sp. which preferentially colonized the PMD fraction. The genus *Erythrobacter* sp. has been isolated from plastics in cold water, this genus being known to use polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) (Wang *et al.* 2016). The genus *Erythrobacter* sp. has already been found on microplastics samples that have been incubated for 1 year in the Pacific (Xu *et al.* 2019).

In the Pacific we find the genera *Pseudahrensia* sp. and *Lewinella* sp. on the PMD fraction. *Lewinella* sp. has previously been on floating PET in the North Sea near the United Kingdom shores (Oberbeckmann *et al.* 2016). The genus *Psychrobacter* sp. has also been isolated in deep sediments (5000 m) of Japan colonizing pieces of PCL (Sekiguchi *et al.* 2011). *Muricauda* sp., a *Roseovarius* sp. abundant on genus microplastics abundant in the Pacific near Fujian Bay in China (Lu *et al.* 2019).

On PMDs, we have identified a core microbiome essentially composed of Alphaproteobacteria, cyanobacteria and Bacteroidia. The genus *Rivularia* sp. is the most abundant in this core microbiome, it has already been identified in numerous studies on the plastisphere (Zettler *et al.* 2013; Bryant *et al.* 2016; Rogers *et al.* 2020). The Rhodobacteraceae family is particularly well represented in this biofilm with the genus *Tateyamaria* sp., already isolated in several regions of the world such as the North Atlantic, the North Pacific, the North Sea, in estuaries or in the Baltic Sea (Rogers *et al.* 2020). The Rhodobacteraceae family has a general quorum sensing detection system (Gram *et al.* 2002) and are identified as essential for biofilm formation (Elifantz *et al.* 2013). Quorum sensing allows for inter-bacterial communication through self-inducing molecules released into the environment. This communication allows the regulation of numerous physiological and biochemical reactions, which can give it a consequent advantage in the formation of the biofilm and the colonization of the plastic (McDougald *et al.* 2007)). As a result, it is regularly identified as abundant on the plastisphere of many plastics (Dang and Lovell 2002; Jones *et al.* 2007; Bryant *et al.* 2016; Xu *et al.* 2019; Amaral-Zettler *et al.* 2020). This phenomenon may explain why the Rhodobacteraceae are mainly found on the PMD fraction in our study (25% on average in the two areas) than on the PA and FL fraction (12.21% on average).

Other genera have already been demonstrated as an abundant component of the plastisphere, it is the case for the genus *Erythrobacter* sp., *Roseovarius* sp., *Calothrix* sp. (Rogers *et al.* 2020). More generally, this core microbiome has the families most commonly identified on the plastisphere (Rhodobacteraceae, Rhizobiaceae, Rivulariaceae, Flavobacteriaceae) (Rogers *et al.* 2020; Amaral-Zettler *et al.* 2020). The core microbiome identified during this study is composed of almost 17% hydrocarbonoclasts, mainly dominated by the genus *Lewinella* sp., *Erythrobacter* sp. and *Psychrobacter* sp. representing 47.5% of the hydrocarbonoclasts. The core microbiome is not enriched in hydrocarbonoclast compared to the PA fraction from the environment.

Hydrocarbonoclasts are found in all of the world's oceans and are not restricted to areas contaminated with hydrocarbons (Gutierrez 2019). This is consistent with the level of hydrocarbonoclasts discovered on the FL and PA fractions of the Mediterranean and the Pacific. Hydrocarbonoclasts represent 20.3% of the entire microbial community of PMDs in the Pacific and 14.2% in the Mediterranean. In the identified core microbiome, the hydrocarbonoclasts represent 17.7% of the community. We find mostly hydrocarbonoclasts that can degrade linear

or branched hydrocarbons such as *Alcalinovorax* sp., *Marinobacter* sp. The genus *Alcanivorax* sp. has already been identified as a key genus in the degradation of PE and other hydrocarbons such as petroleum (Delacuvellerie *et al.* 2019; Zadjelovic *et al.* 2020). Other genus like *Roseovarius* sp. have already been identified in the PE plastisphere (Delacuvellerie *et al.* 2019).

In the species identified as potentially pathogenic, the distribution is not homogeneous and is mainly concentrated on the PMD fraction of the Mediterranean and the Pacific (69%), then on the PA fraction (27%). In these OTU we find potential animal or human pathogens, such as *V. parahaemolyticus* which is found in the PA, FL and PMD fractions of the Pacific and the Mediterranean, always belonging to the rare biosphere. This species has also been found on PMD in the North and Baltic Sea (Kirstein *et al.* 2016). OTUs belonging to the genus *Vibrio* are 15.6 times higher on PMD compared to FL fraction of meditereranean and tree times more compare to the PA fraction. In the Pacific vibrio sp. are thirty-two times more abundant on PMD compared to FL and three times more important compared to PA. In all the samples only one plastic, located 43 km from the coast near the city of Palermo with an abundance of *Vibrio* which exceeds that of the rare biosphere. The genus *vibrio*, endemic to the marine environment, has shown strong hydrophobicity in the hydrocarbon adhesion test (BATH) and has shown a strong ability to form a biofilm (Lamari *et al.* 2018). Sampling in the Mediterranean and the Pacific took place during the summer period, corresponding to an increase in seawater temperatures and therefore favoring the development of the genus *Vibrio* (Amaral-Zettler *et al.* 2020). The persistence of plastic in the marine environment, and its movement with the currents, may explain this potentially pathogenic "accumulation" of OTU. All these reasons can explain this potentially pathogenic distribution of OTU mainly on the PMD fraction of the Pacific and the Mediterranean. However, these results do not prove that these OTUs are indeed pathogenic. The sequencing method (illumina 16S V4 -V5) identifies only the bacterial genus and not the species. Further, more in-depth studies are needed to assess the pathogenicity of the OTUs identified in this study.

## References

- Abed EH, Abbas AH, Abed AG, and Haloob AA. Biodegradation of low-density polyethylene by bacteria spp. isolated from oil basins.
- Acinas SG, Rodríguez-Valera F, and Pedrós-Alió C. 1997. Spatial and temporal variation in marine bacterioplankton diversity as shown by RFLP fingerprinting of PCR amplified 16S rDNA. *FEMS Microbiol Ecol* **24**: 27–40.
- Amaral-Zettler LA, Zettler ER, and Mincer TJ. 2020. Ecology of the plastisphere. *Nat Rev Microbiol* **18**: 139–51.
- Amaral-Zettler LA, Zettler ER, Slikas B, et al. 2015. The biogeography of the Plastisphere: implications for policy. *Frontiers in Ecology and the Environment* **13**: 541–6.
- Barnes DKA, Galgani F, Thompson RC, and Barlaz M. 2009. Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **364**: 1985–98.
- Basili M, Quero GM, Giovannelli D, et al. 2020. Major Role of Surrounding Environment in Shaping Biofilm Community Composition on Marine Plastic Debris. *Front Mar Sci* **7**.
- Bryant JA, Clemente TM, Viviani DA, et al. 2016. Diversity and Activity of Communities Inhabiting Plastic Debris in the North Pacific Gyre. *mSystems* **1**.
- Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, et al. 2009. BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics* **10**: 421.
- Chiba S, Saito H, Fletcher R, et al. 2018. Human footprint in the abyss: 30 year records of deep-sea plastic debris. *Marine Policy* **96**: 204–12.
- Choy CA, Robison BH, Gagne TO, et al. 2019. The vertical distribution and biological transport of marine microplastics across the epipelagic and mesopelagic water column. *Scientific Reports* **9**: 7843.
- Cozar A, Echevarria F, Gonzalez-Gordillo JI, et al. 2014. Plastic debris in the open ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**: 10239–44.
- Cózar A, Sanz-Martín M, Martí E, et al. 2015. Plastic Accumulation in the Mediterranean Sea. *PLOS ONE* **10**: e0121762.
- Crump BC, Armbrust EV, and Baross JA. 1999. Phylogenetic Analysis of Particle-Attached and Free-Living Bacterial Communities in the Columbia River, Its Estuary, and the Adjacent Coastal Ocean. *Appl Environ Microbiol* **65**: 3192–204.
- Dang H and Lovell CR. 2000. Bacterial Primary Colonization and Early Succession on Surfaces in Marine Waters as Determined by Amplified rRNA Gene Restriction Analysis and Sequence Analysis of 16S rRNA Genes. *Appl Environ Microbiol* **66**: 467–75.
- Dang H and Lovell CR. 2002. Numerical dominance and phylotype diversity of marine Rhodobacter species during early colonization of submerged surfaces in coastal marine waters as determined by 16S ribosomal DNA sequence analysis and fluorescence in situ hybridization. *Appl Environ Microbiol* **68**: 496–504.

- De Tender CA, Devriese LI, Haegeman A, *et al.* 2015. Bacterial Community Profiling of Plastic Litter in the Belgian Part of the North Sea. *Environ Sci Technol* **49**: 9629–38.
- De Tender C, Devriese LI, Haegeman A, *et al.* 2017. Temporal Dynamics of Bacterial and Fungal Colonization on Plastic Debris in the North Sea. *Environ Sci Technol* **51**: 7350–60.
- Debroas D, Mone A, and Ter Halle A. 2017. Plastics in the North Atlantic garbage patch: A boat-microbe for hitchhikers and plastic degraders. *Sci Total Environ* **599–600**: 1222–32.
- Delacuvellerie A, Cyriaque V, Gobert S, *et al.* 2019. The plastisphere in marine ecosystem hosts potential specific microbial degraders including Alcanivorax borkumensis as a key player for the low-density polyethylene degradation. *Journal of Hazardous Materials* **380**: 120899.
- Di M and Wang J. 2018. Microplastics in surface waters and sediments of the Three Gorges Reservoir, China. *Science of The Total Environment* **616–617**: 1620–7.
- Dobaradaran S, Schmidt TC, Nabipour I, *et al.* 2018. Characterization of plastic debris and association of metals with microplastics in coastline sediment along the Persian Gulf. *Waste Management* **78**: 649–58.
- Dolman A, Rücker J, Pick F, *et al.* 2012. Cyanobacteria and Cyanotoxins: The Influence of Nitrogen versus Phosphorus. *PLoS one* **7**: e38757.
- Donlan RM. 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infect Dis* **8**: 881–90.
- Durrieu de Madron X, Guieu C, Sempéré R, *et al.* 2011. Marine ecosystems' responses to climatic and anthropogenic forcings in the Mediterranean. *Progress in Oceanography* **91**: 97–166.
- Dussud C, Hudec C, George M, *et al.* 2018a. Colonization of Non-biodegradable and Biodegradable Plastics by Marine Microorganisms. *Front Microbiol* **9**.
- Dussud C, Meistertzheim AL, Conan P, *et al.* 2018b. Evidence of niche partitioning among bacteria living on plastics, organic particles and surrounding seawaters. *Environmental Pollution* **236**: 807–16.
- Elifantz H, Horn G, Ayon M, *et al.* 2013. Rhodobacteraceae are the key members of the microbial community of the initial biofilm formed in Eastern Mediterranean coastal seawater. *FEMS Microbiol Ecol* **85**: 348–57.
- Erni-Cassola G, Zadjelovic V, Gibson MI, and Christie-Oleza JA. 2019. Distribution of plastic polymer types in the marine environment; A meta-analysis. *Journal of Hazardous Materials* **369**: 691–8.
- Escudié F, Auer L, Bernard M, *et al.* 2018. FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution. *Bioinformatics* **34**: 1287–94.
- Fuhrman JA, Sleeter TD, Carlson CA, and Proctor LM. 1989. Dominance of bacterial biomass in the Sargasso Sea and its ecological implications. *Marine Ecology Progress Series* **57**: 207–17.
- Ghiglione J-F, Larcher M, and Lebaron P. 2005. Spatial and temporal scales of variation in bacterioplankton community structure in the NW Mediterranean Sea. *Aquatic Microbial Ecology* **40**: 229–40.
- Ghiglione JF, Mevel G, Pujo-Pay M, *et al.* 2007. Diel and Seasonal Variations in Abundance, Activity, and Community Structure of Particle-Attached and Free-Living Bacteria in NW Mediterranean Sea. *Microb Ecol* **54**: 217–31.

- Gram L, Grossart H-P, Schlingloff A, and Kiørboe T. 2002. Possible Quorum Sensing in Marine Snow Bacteria: Production of Acylated Homoserine Lactones by Roseobacter Strains Isolated from Marine Snow. *Appl Environ Microbiol* **68**: 4111–6.
- Grossart H-P. 2010. Ecological consequences of bacterioplankton lifestyles: changes in concepts are needed. *Environmental Microbiology Reports* **2**: 706–14.
- Gutierrez T. 2019. Occurrence and Roles of the Obligate Hydrocarbonoclastic Bacteria in the Ocean When There Is No Obvious Hydrocarbon Contamination. In: McGenity TJ (Ed). *Taxonomy, Genomics and Ecophysiology of Hydrocarbon-Degrading Microbes*. Cham: Springer International Publishing.
- Hanson CA, Fuhrman JA, Horner-Devine MC, and Martiny JBH. 2012. Beyond biogeographic patterns: processes shaping the microbial landscape. *Nature Reviews Microbiology* **10**: 497–506.
- Jacquin J, Cheng J, Odobel C, et al. 2019. Microbial Ecotoxicology of Marine Plastic Debris: A Review on Colonization and Biodegradation by the “Plastisphere.” *Front Microbiol* **10**.
- Jambeck JR, Geyer R, Wilcox C, et al. 2015. Marine pollution. Plastic waste inputs from land into the ocean. *Science* **347**: 768–71.
- Jones PR, Cottrell MT, Kirchman DL, and Dexter SC. 2007. Bacterial community structure of biofilms on artificial surfaces in an estuary. *Microb Ecol* **53**: 153–62.
- Kirstein IV, Kirmizi S, Wichels A, et al. 2016. Dangerous hitchhikers? Evidence for potentially pathogenic *Vibrio* spp. on microplastic particles. *Marine Environmental Research* **120**: 1–8.
- Lamari F, Khouadja S, and Rtimi S. 2018. Interaction of *Vibrio* to Biotic and Abiotic Surfaces: Relationship between Hydrophobicity, Cell Adherence, Biofilm Production and Cytotoxic Activity. *Surfaces* **1**.
- Lamontagne M and Holden P. 2003. Comparison of free-living and particle-associated bacterial communities in a coastal Lagoon. *Microbial ecology* **46**: 228–37.
- Lebreton L, Slat B, Ferrari F, et al. 2018. Evidence that the Great Pacific Garbage Patch is rapidly accumulating plastic. *Scientific Reports* **8**: 4666.
- Lee J-W, Nam J-H, Kim Y-H, et al. 2008. Bacterial communities in the initial stage of marine biofilm formation on artificial surfaces. *J Microbiol* **46**: 174–82.
- Lu L, Luo T, Zhao Y, et al. 2019. Interaction between microplastics and microorganism as well as gut microbiota: A consideration on environmental animal and human health. *Science of The Total Environment* **667**: 94–100.
- Mahé F, Rogues T, Quince C, et al. 2014. Swarm: robust and fast clustering method for amplicon-based studies. *PeerJ* **2**: e593.
- Matsuguma Y, Takada H, Kumata H, et al. 2017. Microplastics in Sediment Cores from Asia and Africa as Indicators of Temporal Trends in Plastic Pollution. *Arch Environ Contam Toxicol* **73**: 230–9.
- McCormick AR, Hoellein TJ, London MG, et al. 2016. Microplastic in surface waters of urban rivers: concentration, sources, and associated bacterial assemblages. *Ecosphere* **7**: e01556.

- McDougald D, Rice SA, and Kjelleberg S. 2007. Bacterial quorum sensing and interference by naturally occurring biomimics. *Anal Bioanal Chem* **387**: 445–53.
- Millot C and Taupier-Letage I. 2005. Circulation in the Mediterranean Sea. In: Saliot A (Ed). *The Mediterranean Sea*. Springer.
- Morris RM, Rappé MS, Connon SA, et al. 2002. SAR11 clade dominates ocean surface bacterioplankton communities. *Nature* **420**: 806–10.
- Moutin T, Karl DM, Duhamel S, et al. 2008. Phosphate availability and the ultimate control of new nitrogen input by nitrogen fixation in the tropical Pacific Ocean. *Biogeosciences* **5**: 95–109.
- Oberbeckmann S, Kreikemeyer B, and Labrenz M. 2018. Environmental Factors Support the Formation of Specific Bacterial Assemblages on Microplastics. *Front Microbiol* **8**.
- Oberbeckmann S, Loeder MGJ, Gerdts G, and Osborn AM. 2014. Spatial and seasonal variation in diversity and structure of microbial biofilms on marine plastics in Northern European waters. *FEMS Microbiol Ecol* **90**: 478–92.
- Oberbeckmann S, Osborn AM, and Duhaime MB. 2016. Microbes on a Bottle: Substrate, Season and Geography Influence Community Composition of Microbes Colonizing Marine Plastic Debris. *PLoS One* **11**.
- Ortega-Retuerta E, Joux F, Jeffrey WH, and Ghiglione JF. 2013. Spatial variability of particle-attached and free-living bacterial diversity in surface waters from the Mackenzie River to the Beaufort Sea (Canadian Arctic).
- Palmer J, Flint S, and Brooks J. 2007. Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. *J Ind Microbiol Biotechnol* **34**: 577–88.
- Pan Z, Guo H, Chen H, et al. 2019. Microplastics in the Northwestern Pacific: Abundance, distribution, and characteristics. *Science of The Total Environment* **650**: 1913–22.
- Parada AE, Needham DM, and Fuhrman JA. 2016. Every base matters: assessing small subunit rRNA primers for marine microbiomes with mock communities, time series and global field samples. *Environmental Microbiology* **18**: 1403–14.
- Peeken I, Primpke S, Beyer B, et al. 2018. Arctic sea ice is an important temporal sink and means of transport for microplastic. *Nat Commun* **9**: 1505.
- Pinto M, Langer TM, Hüffer T, et al. 2019. The composition of bacterial communities associated with plastic biofilms differs between different polymers and stages of biofilm succession. *PLOS ONE* **14**: e0217165.
- Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, et al. 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res* **41**: D590–6.
- Ribera d'Alcalà M. 2003. Nutrient ratios and fluxes hint at overlooked processes in the Mediterranean Sea. *J Geophys Res* **108**: 8106.
- Rogers K, Carreres-Calabuig JA, Gorokhova E, and Posth N. 2020. Micro-by-micro interactions: How microorganisms influence the fate of marine microplastics. *Limnology and Oceanography Letters* **5**.
- Rognes T, Flouri T, Nichols B, et al. 2016. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ* **4**: e2584.

- Ruiz-Orejón LF, Sardá R, and Ramis-Pujol J. 2016. Floating plastic debris in the Central and Western Mediterranean Sea. *Marine Environmental Research* **120**: 136–44.
- Sekiguchi T, Sato T, Enoki M, et al. 2011. Isolation and characterization of biodegradable plastic degrading bacteria from deep-sea environments. *JAMSTEC Report of Research and Development* **11**: 33–41.
- Shim W, Hong S, and Eo S. 2016. Identification methods in microplastic analysis: A review. *Anal Methods* **9**.
- Siokou-Frangou I, Christaki U, Mazzocchi MG, et al. 2010. Plankton in the open Mediterranean Sea: a review. *Biogeosciences* **7**: 1543–86.
- Sunagawa S, Acinas SG, Bork P, et al. 2020. Tara Oceans: towards global ocean ecosystems biology. *Nat Rev Microbiol* **18**: 428–45.
- Sunagawa S, Coelho LP, Chaffron S, et al. 2015. Structure and function of the global ocean microbiome. *Science* **348**.
- Suzuki S, Kaneko R, Kodama T, et al. 2017. Comparison of community structures between particle-associated and free-living prokaryotes in tropical and subtropical Pacific Ocean surface waters. *J Oceanogr* **73**: 383–95.
- Wang H, Wang B, Dong W, and Hu X. 2016. Co-acclimation of bacterial communities under stresses of hydrocarbons with different structures. *Sci Rep* **6**: 34588.
- Xu X, Wang S, Gao F, et al. 2019. Marine microplastic-associated bacterial community succession in response to geography, exposure time, and plastic type in China's coastal seawaters. *Marine Pollution Bulletin* **145**: 278–86.
- Zadjelovic V, Chhun A, Quareshy M, et al. 2020. Beyond oil degradation: enzymatic potential of Alcanivorax to degrade natural and synthetic polyesters. *Environmental Microbiology* **22**: 1356–69.
- Zettler ER, Mincer TJ, and Amaral-Zettler LA. 2013. Life in the “Plastisphere”: Microbial Communities on Plastic Marine Debris. *Environmental Science & Technology* **47**: 7137–46.

## **Chapitre 3**

# **Colonisation et biodégradation des plastiques conventionnels et de leurs substituts biodégradables pour l'usage de bâtonnets ouatés**





## Chapitre 3

*« 60 millions d'années est le temps moyen de formation des hydrocarbures. Environ 15 m<sup>3</sup> de pétrole continuent à se former chaque jour, mais nous en utilisons quotidiennement 15 millions de m<sup>3</sup>“*

### Préambule

Le 10 février 2020 le gouvernement a promulgué une loi (loi 2020-105) afin de lutter contre le gaspillage et favoriser l'économie circulaire. La loi englobe plusieurs thématiques dont la réduction des déchets plastiques. L'article 7 de cette loi prévoit une réduction de l'utilisation du plastique à usage unique d'ici 2040. La mesure prévoit des objectifs chiffrés et planifiés de réduction, de réutilisation et de recyclage du plastique fixés par décret pour la période de 2021 à 2025, puis une réactualisation tous les 5 ans. Les coton-tiges généralement composés de polypropylène (PP) seront au même titre que les pailles, gobelets, verres, couverts, etc. interdit dans le courant de l'année 2020.

Le projet BIOTIGES a été financé par le ministère de la transition écologique et solidaire afin de l'accompagner sur la recherche d'alternatives aux plastiques conventionnels utilisés dans la tige des coton-tiges. Ce projet de recherche a été menée dans notre unité du Laboratoire d'Océanographie Microbienne de Banyuls sur mer (LOMIC, UMR7621) et en collaboration avec l'Institut de Recherche Dupuy de Lôme (IRDL). Cette collaboration a permis la synthèse de tiges de polymères biosourcés de 4 compositions différentes (PHBV, PLA, PBS et PBAT). Les polymères ont été incubé 40 jours dans des aquariums en circuit ouvert sur la mer (Baie de Banyuls) pour ensuite être transférés dans des tubes de 4 mL pendant 94 jours (Fig. 30). Ce projet a nécessité 2 700 fragments de polymères d'une taille de 0.5 cm et 1595 tubes à essai de 4 mL. L'incubation a débutée le 7 mars 2018 pour se terminer le 8 août 2018.

Cette étude permet d'apporter des connaissances supplémentaires sur la colonisation bactérienne en mer de l'ensemble des polymères testés et d'étudier leurs caractéristiques de biodégradation en milieu minimum imitant les conditions marines.



*Figure 30 : Présentation de la ligne complète de production de tiges des différents polymères (à gauche) et des tubes à essai ayant servi à l'incubation en milieu minimum (à droite). Les morceaux de tiges de 0,5 cm et de différentes compositions chimiques sont illustrées avant et après 2 mois d'incubation (en bas).*

Les résultats de cette étude sont présentés sous forme d'un article qui sera soumis très prochainement dans le journal *Frontiers in Microbiology* (*Impact Factor : 4.06*). Ces résultats ont également permis de contribuer à l'écriture d'un décret modificatif du décret d'application n°2017-291 du 6 mars 2017 pris pour application de l'article 24 de la loi n° 2016-1087 du 8 août 2016 pour la reconquête de la biodiversité, de la nature et des paysages modifiant l'article L. 541-10-5 du code de l'environnement.

**Title: Marine plastisphere activity and diversity during successive colonization and biodegradation phases of various composition of plastic sticks**

**List of authors :** JACQUIN Justine<sup>1</sup>, CALLAC Nolwenn<sup>1,2</sup>, CHENG Jingguang<sup>1</sup>, GIRAUD Carolane<sup>1,2</sup>, GORAND Yonko<sup>3</sup>, DENOUAL Clément<sup>4</sup>, PUJO-PAY Mireille<sup>1</sup>, CONAN Pascal<sup>1</sup>, BARBE Valérie<sup>5</sup>, TER HALLE Alexandra<sup>6</sup>, MEISTERTZHEIM Anne-Leila<sup>7</sup>, BRUZAUD Stéphane<sup>4</sup>, GHIGLIONE Jean-François<sup>1\*</sup>.

**Affiliations :**

1. CNRS, Sorbonne Universités, UMR 7621, Laboratoire d'Océanographie Microbienne, Observatoire Océanologique de Banyuls, France
2. IFREMER Unité de Recherche Lagons, Ecosystèmes et Aquaculture Durable (LEAD-NC), Nouvelle Calédonie
3. Plateforme EnRMAT, Laboratoire PROMES, Rambla de la Thermodynamique, tecnosud, Perpignan
4. Institut de Recherche Dupuy de Lôme (IRD), Université de Bretagne-Sud, UMR CNRS 6027, Rue Saint Maudé, Lorient, France
5. Génomique Métabolique, Genoscope, Institut François Jacob, CEA, CNRS, Univ Evry, Université Paris-Saclay, Evry, France
6. Laboratoire IMRCP, Université de Toulouse, CNRS UMR 5623, Université Paul Sabatier, Toulouse, France
7. MEISTERTZHEIM Anne-Leila<sup>7</sup>SAS Plastic@Sea, Observatoire Océanologique de Banyuls, France

**\* Correspondence:**

Jean-François Ghiglione  
ghiglione@obs-banyuls.fr

## Abstract

The European parliament recently approved a new law banning single-use plastic items in 2021 such as plates, cutlery, straws, cotton buds sticks and plastic balloon sticks. Transition to bioeconomy include the substitution of these banned products by biodegradable polymers. Several polymers such as PLA, PBAT, PBS, PHBV, Bioplast, mater-Bi could be good candidates to substitute for conventional plastics sticks. However, the biodegradability of this polymers need to be tested in marine condition. Here, we describe first the 40 days colonisation of sticks made of the 6 putative biodegradable polymer types compared to controls made of non-biodegradable PP or biodegradable cellulose. Clear changes in bacterial diversity (16S rRNA Illumina sequencing) and heterotrophic activity ( $^{3}\text{H}$ -Leucine incorporation) accompanied a classical succession of primo-colonisation, growth and maturation phases of the biofilm. Second, biodegradability of the polymers was tested by transferring the sticks along with their mature biofilm for another 94 days in strict diet condition with the polymers as sole carbon source. The drastic decrease of bacterial activity on PP, PLA and PBS suggested no bacterial attack of these polymers under our experimental conditions, whereas bacterial activity in PBAT, Bioplast, mater-Bi and PHBV presented similar response as the cellulose positive control. Different trends were also observed in term of bacterial diversity for biodegradable *versus* non-biodegradable polymers. For example, rapid changes were found for the biodegradable PHA, with *Marinobacter* sp., *Lewinella* sp. and *Alteromonas* sp. becoming abundant and remaining stable during the three months of incubation in minimum medium with this polymer as sole carbon source, whereas the diversity of the mature biofilm on PP remained stable during the same period. This original study underlined the importance of microbial ecotoxicology when evaluating the relevance of biodegradable substitutes for conventional plastic products.

## 1. Introduction

The growing use of plastic worldwide together with waste mismanagement resulted in an estimated of more than 5 trillion plastic particles weighing over 250,000 tons afloat in the global oceans, with dramatic toxicological effects along the marine trophic chain (Eriksen *et al.* 2014; Wang *et al.* 2019). A large majority of plastic items found at sea were made of polyolefins, mainly polyethylene (PE) and polypropylene (PP) widely used in the single-use disposable products rapidly ending up in waste and litter stream (Poulain *et al.* 2019).

Government regulations have been recently installed to restrict the usage of single-use plastics and promote the biodegradable plastic industry. At least 127 countries have made regulations against plastic bags since 2018 (UNEP, 2018). The European Parliament voted to ban many other single-use plastics by 2021, including plates, cutlery, straws, food containers, expanded polystyrene cups and sticks used for cotton bud and plastic balloon (Europarl, 2019). Biodegradable plastics have become the focus of recent research to replace conventional polymers made of polyethylene (PE), polypropylene (PP), polystyrene (PS), polyvinyl chloride (PVC) and other high molecular compounds. Today, commercially available biodegradable polymers are of petrochemical origin, such as poly (butylene succinate) (PBS) and polybutylene adipate terephthalate (PBAT, brand name Ecoflex®), or bio-based origin such as polylactic acid (PLA) and polyhydroxybutyrate-valerate (PHBV). Natural starch is also frequently proposed, coupled or not with petrochemical-based (mainly potato starch for Bioplast©) or bio-based polymers (corn starch with PBAT for Mater Bi©). Biodegradable polymers are supposed to be biodegraded without any harmful effects caused by their persistence (Haider *et al.* 2018). The biodegradability of a polymer is defined according to several standards reflecting disposal condition in soil, compost or aquatic environments. Tests are generally based on respirometry (biological oxygen demand and CO<sub>2</sub> production) attributed to the biodegradation of the polymer by the community of microorganisms, without any other source of carbon in artificial medium, in comparison with cellulose which serves as a reference control (standards ISO 18830:2016, ISO 19679:2016, ASTM D6691-09). Several drawbacks were pointed out by a recent paper on the ability of current standard protocols to realistically predict the biodegradability in marine environment (Harrison *et al.*, 2018). For example, the large diversity of microorganisms colonizing plastics in natural conditions also known as the “plastisphere”(Zettler *et al.*, 2013) was generally not taken into consideration in these biodegradability tests.

When accidentally released in seawater, plastics are rapidly colonized by bacteria. This process has been extensively studied, showing successive phases of biofilm formation (Dang and Lovell

2000; Lobelle and Cunliffe 2011; Eich *et al.* 2015; Erni-Cassola *et al.* 2019). During the first days at sea, a “conditioning film” made of inorganic and organic matter support the first colonizers, which are mainly composed of Gammaproteobacteria and Alphaproteobacteria regardless of the polymer type (Oberbeckmann *et al.* 2015). A second phase of rapidly growing bacteria is generally characterized by a succession of Bacteroidetes, Acidobacteria, Actinobacteria, Cyanobacteria, Firmicutes and Planctomytes (Salta *et al.* 2013). The last phase corresponds to the formation of a mature biofilm that generally appear after 15 to 30 days at sea and remained stable afterward for several months, where clear differences in bacterial abundance, diversity and activity were found between non-biodegradable and biodegradable plastics (Eich *et al.* 2015; Dussud *et al.* 2018a). Hydrocarbonoclastic bacteria (HCB) such as *Alcanivorax* *sp.*, *Aestuariicella hydrocarbonica*, *Marinobacter* *sp.* became abundant in the mature biofilm, and they were proposed to be potentially involved in the degradation of the petroleum-based polymers. However, no study has prolonged the experience by incubating the mature biofilm in a minimal medium with the polymer as the sole carbon source in order to prove its biodegradation capabilities.

Here, we used plastic sticks made of different conventional (PP) and ‘biodegradable’ polymers as potential candidates for substitutes to conventional single-use plastics sticks (PLA, PBS, PBAT, Mater-Bi, Bioplast, PHBV and cellulose). We hypothesized that the properties of the distinct polymers would select different marine bacterial communities with specific biodegradation capabilities. We elaborated an original two-steps experimental design based on a first colonization step in natural condition (40 days) followed by a second step of incubation in minimum medium with each polymer types as sole source of carbon and energy (94 days). Temporal dynamics of the biofilm was followed by measuring bacterial activity ( $^{3}\text{H}$ -leucine incorporation), morphology (scanning electron microscopy) and diversity (Illumina sequencing of 16S rRNA genes) during the successive colonization and biodegradation phases of the various composition of plastic sticks.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Elaboration of plastic sticks

The different plastics used were supplied in pellets. The following list respectively mentions the plastic, its trade name and the supplier: PP (ISPLEN PP 030 G1E, REPSOL), PBAT (Ecoflex C1200, BASF), PLA (Ingeo 7001D, Natureworks), Bioplast (Bioplast 400, Biotec), PHA (PHBV ENMAT Y1000P, TianAn Biopolymer), Mater-Bi (Mater Bi EF04P, Novamont), PBS (bioPBS FZ91PB, PTT MCC Biochem), Cellulose (U Bio).

The machine used to make the sticks except the cellulose sticks, was a spinning line composed of a SCAMEX single screw extruder with a diameter of 20 mm and a ratio L / D = 20, equipped with a vertical tube shaping die, a cooling tray under the die, a drawing bench, an online dimensional controller (tolerances +/- 0.01 mm) and a winding element. In order to conform the plastic material to the desired form as sticks, the extruder has been equipped with a suitable tube die tailor-made by the extruder manufacturer.

The extrusion conditions were adapted according to the plastics used and their physical and chemical characteristics (Table 1). Finally, the sticks were cut to obtain sticks with dimensions equivalent to commercial sticks, i.e. length of 72 mm, outer diameter of 2.5 mm and inner diameter of 1.6 mm.

Table 1: Extrusion conditions for the different plastic types

Plastic	Temperature Zone 1	Temperature Zone 2	Temperature Zone 3	Temperature die	Screw speed	Pulling speed
	°C	°C	°C	°C	tr/min	m/min
PP	220	220	220	220	20	3.50
PLA 7001D	170	180	190	180	25	3.90
PHA Y1000P	180	180	180	180	25	4.00
PBAT C1200	140	160	160	160	15	2.90
PBS FZ91PB	140	140	140	140	20	3.50
Mater-Bi EF04P	140	160	160	160	15	3.15
BioPlast 400	160	160	160	160	15	3.00

## 2.2. Incubation under natural marine conditions (40 days).

Each polymer type was incubated in aquariums with direct circulation to the sea, as previously described (Dussud *et al.* 2018a). Briefly, we used 9 identical aquariums consisting in trays with a 1.8 L capacity (Sodispan, Spain), in which 1.5 L of 200-microns filtered seawater was continually renewed by direct pumping at 14 m depth in the Banyuls bay, close to the SOLA marine observatory station (42°29'300 N – 03°08'700 E, France). A flow rate of 50 mL min<sup>-1</sup> was chosen to ensure a sufficient renewal of natural bacteria (every 30 min) and a homogeneous distribution of the plastic pieces in the aquariums during the entire experiment.

Each aquarium contained 0.5 cm polymer pieces of a single polymer (PP, PLA, PBS, PBAT, Bioplast, Mater-Bi, PHBV or cellulose), with the exception of the “control aquarium” that only contained the circulating seawater. On the 7<sup>th</sup> March 2018, pieces of each polymer incubated in the aquariums were sampled after 7 (D7), 15 (D15), 30 (D30) and 40 days (D40). Aquariums were kept in the dark to avoid UV-driven degradation of the polymers. Throughout the incubation, seawater temperature (between 12.5 and 13.5°C) and salinity (38.5) were monitored in the aquariums and they were similar to the data found at the SOLA observatory in the Banyuls bay during this period (<https://www.somlit.fr/>).

## 2.3. Incubation in minimum medium with polymer sticks as sole carbon source (94 days).

After 40 days under natural marine conditions, the remaining individual pieces of each of the 8 polymer types were carefully collected with sterilized tweezers and placed in 4 ml flasks (ref. 294330, Interchim) containing 2 ml of minimum medium with no other carbon source than the polymer. The composition of the minimum medium was modified from Fegatella *et al.*, 1998 (Fegatella *et al.* 1998): NaCl, 420 mM ; Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 28.8 mM; KCl, 9.39 mM ; NaBr, 0.84 mM ; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0.485 mM ; MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, 0.546 mM ; CaCl<sub>2</sub>, 0.105 mM ; NH<sub>4</sub>Cl 9.35 mM ; SrCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, 0.0638 mM ; NaF, 0.0714 mM ; NaNO<sub>3</sub>, 0.88 mM ; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, 0.036 mM ; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.106 mM ; CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, 0.04 µM ; ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0.08 µM ; CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, 0.04 µM; MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O, 0.9 µM ; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, 0.03 µM ; FeCl<sub>3</sub> 1.85 µM ; thiamine, 0.3 µM ; biotin, 2.1 nM ; and B12 vitamin, 0.317 nM. Pieces of each polymer type were sampled after 3 (D40+3), 7 (D40+7), 15 (D40+15) and 94 days (D40+94).

## 2.4. Scanning electron microscopy

Three pieces of each of the 8 polymer types were fixed at the beginning (D0) and at the end of the experiment (D40+94) with the addition of 3% (v/v) glutaraldehyde (final concentration) and

stored for at least one night at 4°C. Samples were then washed three times during 15 min in the following solution: sodium cacodylate buffer, 0.4 M diluted to 0.2 M in minimum medium. Then, fixation with osmium tetroxide (OsO<sub>4</sub>) at 1% was carried out for one hour at room temperature.

Progressive dehydration in successive ethanol baths (70%, 95% and 100%) was applied during 30 minutes before analysis by scanning electron microscope. Samples were immersed in 100% ethanol in a critical point desiccator tank (Balzers), and liquid CO<sub>2</sub> was then gradually introduced to replace ethanol. Samples were then heated and pressurized to allow the CO<sub>2</sub> to pass into the gaseous state bypassing its critical point (Temperature = 31.1 °C; P = 73.8 bars) and to avoid surface tensions and deformation. The CO<sub>2</sub> gas was then removed, and dry samples were collected. After dehydration, a thin conductive layer of Au-Pd (about 10nm thick) was deposited by sputtering on the surface of the samples to allow electron microscope observation (Hitachi SEM FEG S-4500 high vacuum).

## 2.5. Heterotrophic Bacterial Production

Bacterial production (BP) was measured on each type of polymer at each sampling time during the colonization and biodegradation phases, using a modified protocol from van Wambeke *et al.* (2009). Briefly, a cell detachment pre-treatment was applied using 3 cycles of 3 min sonication bath (Deltasonic, France) followed by 3 min vortex at maximum speed (Skyline, Elmi Ltd, Russia) as previously described (Dussud *et al.* 2018a). Immediately after cell-detachment, <sup>3</sup>H-leucine (specific activity 123.8 Ci mmol<sup>-1</sup>; Perkin Elmer) was added for each sample, which consisted of 1.5 mL of sterilized seawater containing the plastic piece and it's the detached cells. Final leucine concentrations were 36 nmol L<sup>-1</sup> (<sup>3</sup>H-leucine at 4 nmol L<sup>-1</sup>) during the colonization phase and 150 nmol L<sup>-1</sup> after the transfer to the minimum medium (<sup>3</sup>H-leucine at 1 nmol L<sup>-1</sup>). Higher final leucine concentration was required to adapt to the increase of BP in the minimum medium for some of the polymers, according to preliminary results (data not shown). Final <sup>3</sup>H-leucine concentration was 4.3 nmol.L<sup>-1</sup> for seawater samples from the control aquarium. All samples were treated in triplicate and incubated in the dark at *in situ* temperature for 3 hours. We used the empirical conversion factor of 1.55 ng C.pmol<sup>-1</sup> of incorporated leucine to calculate BP (Simon and Azam 1989). Because exact surface of plastic sticks was difficult to measure, each piece was weighted with precision balance of sensitivity 0,1 mg (Precisa 125A, Swiss Quality) and results were expressed in ng C.g<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>.

## 2.6. DNA Extraction, PCR and Sequencing

For each polymer type, individual pieces were taken at all sampling times and stored at -80°C until DNA extraction. In parallel, 1 L seawater was sampled in the control aquarium and successively filtered onto 3 and 0.2 µm pore size polycarbonate filters (47 mm diameter, Nucleopore) and stored at -80°C until analysis. DNA extractions were performed on polymers or filters using a classical phenol-chloroform method (Sauret *et al.* 2016) with slight modifications of the method for polymer samples (Debeljak *et al.* 2016). Briefly, the same cell detachment pre-treatment was used as for BP (see above) before enzymatic and chemical cell lysis (incubation with 1 mg.mL<sup>-1</sup> lysozyme at 37°C for 45 min followed by 1 h at 50°C with 0.2 mg.mL<sup>-1</sup> proteinase K and 1% SDS). DNA was quantified by spectrophotometry (Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay Kit, Invitrogen).

PCR amplification of the V4-V5 region was performed using the primers 515-F (5'-GTG YCA GCM GCC GCG GTA A-3') and 926-R (5'-CCG YCA ATT YMT TTR AGT TT-3') (Fuhrman *et al.* 1989), which are particularly well suited for marine samples (Parada *et al.* 2016). Sequencing was performed on Illumina MiSeq by MrDNA (Molecular Research LP) (Shallowater, TX, USA) and Integrated Microbiome Resource (IMR) (Dalhousie University, Canada). The sequences were analysed using FROGS pipeline hosted in the Galaxy platform (Escudié *et al.* 2018), following the guidelines given in the publication. Briefly, the forward and reverse reads were assembled and sequences were clustered using the SWARM algorithm (Mahé *et al.* 2014) using the aggregation distance of 3. Then, the chimeras were removed using the FROGS Vsearch tool (Rognes *et al.* 2016). An additional filter step was used on the abundance at 5.10<sup>-5</sup> threshold to select the most relevant OTUs sequences. The taxonomic affiliation was assigned by standard nucleotide BLAST (Camacho *et al.* 2009) using the SILVA 132 database 16S (Quast *et al.* 2013). Chloroplast, mitochondrial and eukaryotic sequences were removed. All the 16S rRNA data are available in the NCBI SRA repository (accession number PRJNA649857).

## 2.7. Statistical Analysis

The bacterial sequences of each sample were randomly resampled in the OTU file to allow comparison and normalization based on the sample with the fewest sequences (n = 9,698). These data sets were used to realize all the analyses performed using Rstudio software (<https://www.r-project.org/>). The alpha-diversity indices (Chao1, Shannon, Evenness, Simpson) and the Beta-diversity analysis (Bray-Curtis similarity) were calculated with the phyloseq package (McMurdie and Holmes 2013).

Differences between polymer types were tested using Anova test and confirmed by a *post hoc* Tukey test. The test was interpreted as significant if the p value was less than 0.05. Dendrogram was obtained based on the dissimilarity matrix of Bray-Curtis and applying the Ward algorithm (Ward 1963).

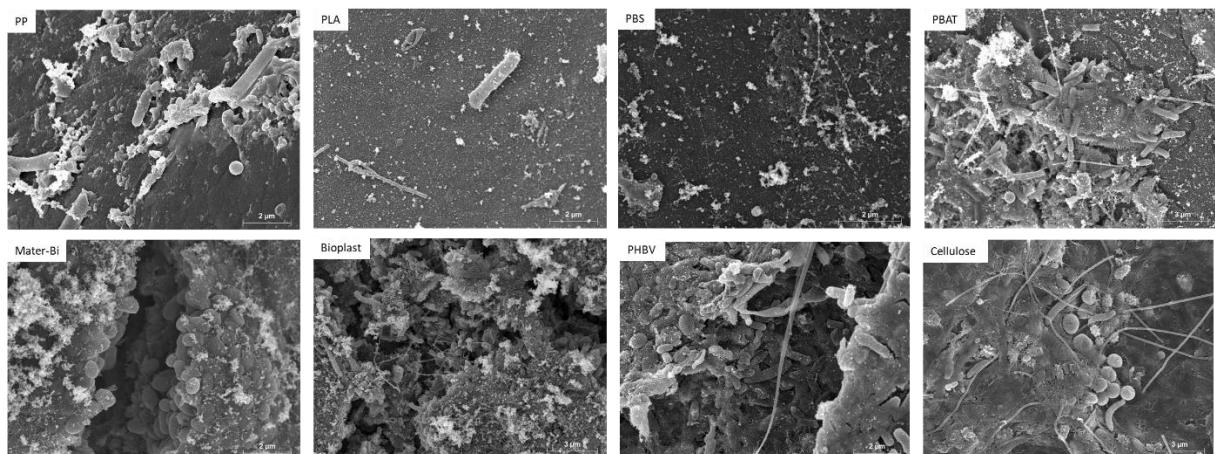
OTUs responsible for dissimilarities between pairs of clusters from the start and the end of incubation in minimum medium were identified using similarity percentage (SIMPER, PRIMER 6).

## 3. Results

### 3.1. Scanning electron microscopy on the different polymer types

The surface of PP, PLA and PBS showed no signs of weakening of the polymer surface. In addition, bacteria on these polymers were scarce and dispersed on the surface after 40 days in natural seawater followed by 94 days in minimum medium (D40 + 94). Abundant microbial colonization was observed on the surface of the other polymers (PHBV, Mater-Bi, Cellulose, Bioplast), which is typical of a mature biofilm (Fig. 1).

Several layers of biofilm structures were visible on the more colonized polymers, where cell like structure have colonized not only the surface layers but also the inner part of the visible cracks. A large diversity of morphological forms including spherical, rod-shaped or spiral-shape bacterial like structure were observed in the surface of most of the polymers. Extensive exopolysaccharide matrix was found except for PP, PLA and PBS.

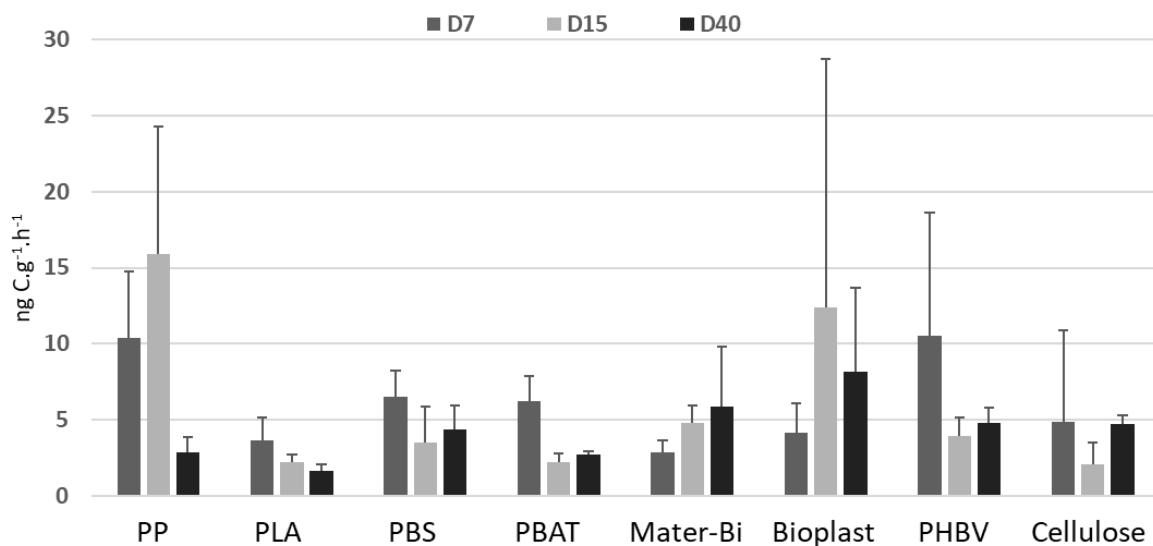
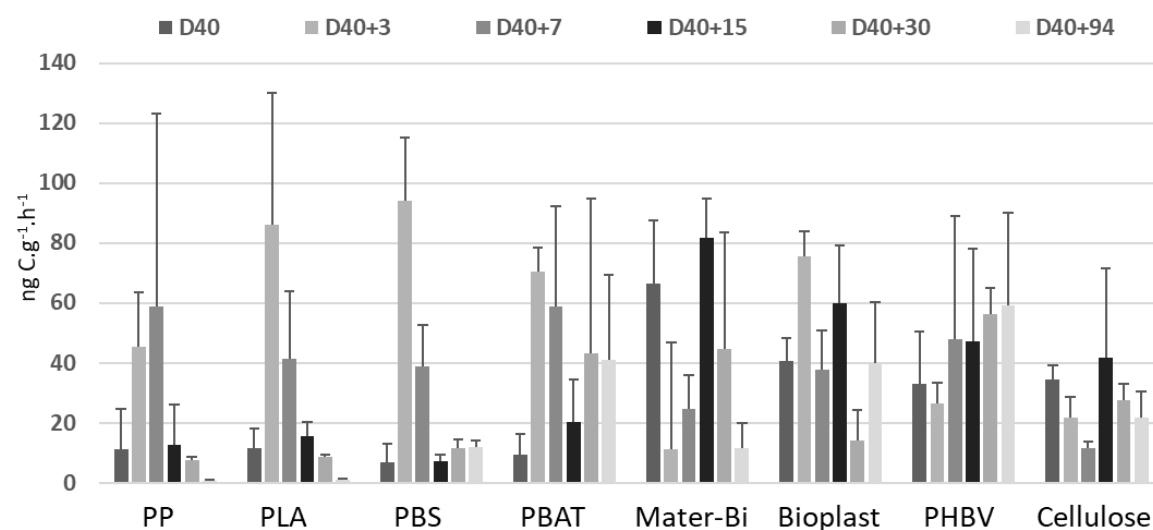


**Figure 1 :** Scanning electron microscopy of the 8 polymer types (PP, PLA, PBS, PBAT, Bioplast, Mater-Bi, PHBV and Cellulose) showing the diversity of morphologies and abundance of bacteria cell like structures after 40 days in natural seawater followed by 94 days in minimum medium (D40 + 94).

### 3.2. Bacterial production (BP) during the successive phases of colonisation and transfer to the minimum medium

During the colonization phase in natural seawater, bacterial production (BP) was generally higher during the growing phase of the biofilm between 7 to 15 days. Highest BP values were found for PP, Bioplast and PHBV (15.9, 12.4 and 10.5 ng C. g<sup>-1</sup>. h<sup>-1</sup>, respectively), whereas others (PLA, PBS, PBAT and cellulose) ranged from 2.2 to 6.5 ng C. g<sup>-1</sup>. h<sup>-1</sup> during this growing phase (Fig. 2A). At the end of the colonization phase in natural seawater (D40), BP were even more homogeneous between the polymer types, ranging from 1.6 to 4.0 ng C. g<sup>-1</sup>. h<sup>-1</sup> for PP, PLA, PBS, PBAT, and from 4.7 to 8.1 ng C. g<sup>-1</sup>. h<sup>-1</sup> for Mater-Bi, Bioplast, PHBV and cellulose. Bacteria living in the control seawater showed stable BP during the 40 days, ranging from 12.4 to 22.3 ng C. L<sup>-1</sup>. h<sup>-1</sup> (Sup Table). No comparison was made between the BP values recorded between the seawater and the polymers because of different units of measure.

A change in the dilution factor of <sup>3</sup>H-leucine added in samples resulted in an increase of BP values by a factor of  $5.8 \pm 2.9$  (n=8) for all polymer types when transferred together with their mature biofilm in minimum medium at day 40, accordingly to preliminary results (see material and methods section). This transfer from natural seawater to the minimum medium resulted in different response scenario according to the polymer types (Fig. 2.B). A first scenario was found for PP, PLA and PBS where the bacterial production increased during the first week of incubation in the minimum medium (with maxima of 58.8, 85.9 and 94.2 ng C. g<sup>-1</sup>. H<sup>-1</sup> at D40+3 or D40+7, respectively) and dramatically decreased thereafter (7.3, 8.7 and 11. ng C. g<sup>-1</sup>. H<sup>-1</sup> at D40+94, respectively). A second scenario was observed for PBAT, Mater-Bi, Bioplast, PHBV and cellulose, where the BP remained relatively stable after the transfer into the minimum medium (41.0, 18.6, 39.8, 59.2, 21.9 ng C. g<sup>-1</sup>. H<sup>-1</sup> at D40+94, respectively).

**A- Colonization****B- Transfer to minimum medium**

**Figure 2 :** Bacterial production (in ng C. g<sup>-1</sup>. H<sup>-1</sup>) (A) during the colonization phase in natural seawater at days 7 (D7), 15 (D15) and 40 (D40) and (B) after the transfer to minimum medium during 3 (D40+3), 7 (D40+7), 15 (D40+15), 30 (D40+30) and 94 days (D40+94). The vertical bars represent the average of the bacterial production for each polymer (n=3) ± standard deviation. Changes in BP values at D40 between A and B correspond to changes on dilution factor of the <sup>3</sup>H-leucine added (see material and methods section).

### **3.3. Bacterial community structure, diversity indexes and taxonomy during the successive phases of colonisation and transfer to the minimum medium**

A total of 5,427,894 paired reads were acquired after sequencing all of the samples. After normalisation based on the sample with the fewest merged sequences ( $n = 9,698$ ), 3,772,255 sequence tags were selected belonging to 978 OTUs (0.03 distance threshold). Several distinct sequencing of the seawater control at D40 failed for unknown reasons.

#### **3.3.1. Changes in $\alpha$ -diversity indices**

$\alpha$ -diversity was studied using Chao1 richness, Pielou evenness and Shannon diversity indexes. Regardless the polymer types, the richness rapidly increased during the first days of colonization until 15 days to reach between 120 and 384 estimated OTUs after 40 days (Table S1). The transfer to the minimum medium did not influence the richness (+/- 50 estimated species) for some polymer types including PP, PLA, PBS, Bioplast, but resulted in a decrease for PBAT, Mater-Bi, PHBV and cellulose when comparing D40 and D40+94. We observed that the Chao1 index was statistically linked to the polymer type after the transfer into the minimum medium (Anova, pvalue = 0.0147).

Pielou evenness index showed relatively homogeneous diversity during the colonization phase, with evenness > 0.5 for all polymers after 40 days (Table S1). A slight increase was found after the transfer in the minimum medium for the PP, Bioplast, PHBV and cellulose, as correlated with the Chao1 index ( $p < 0.05$ ), whereas it slightly decreased for PLA, PBS, PBAT and Mater-Bi at the end of the incubation.

The resulting Shannon diversity was consistent with the Pielou and Chao1 indices. During the colonization phase, a decrease in Shannon diversity index was found for the PP (2.4) due to its decrease in evenness (Table 1) and an increase in diversity for all the other polymers at D40 (between 2.64 and 4.40). The transfer to the minimum medium resulted in an increase in diversity until the end of the experiment (between 3.67 and 3.9 at D40+94) for PP, PHBV and Cellulose according to the increase in evenness. Conversely, a decrease of Shannon diversity (between 2.1 and 3.64) was caused by a decrease in richness for PBS, PBAT and Mater-Bi or by a decrease in evenness for PLA and Bioplast.

### 3.3.2 Microbial communities on polymers during the colonization phase in seawater.

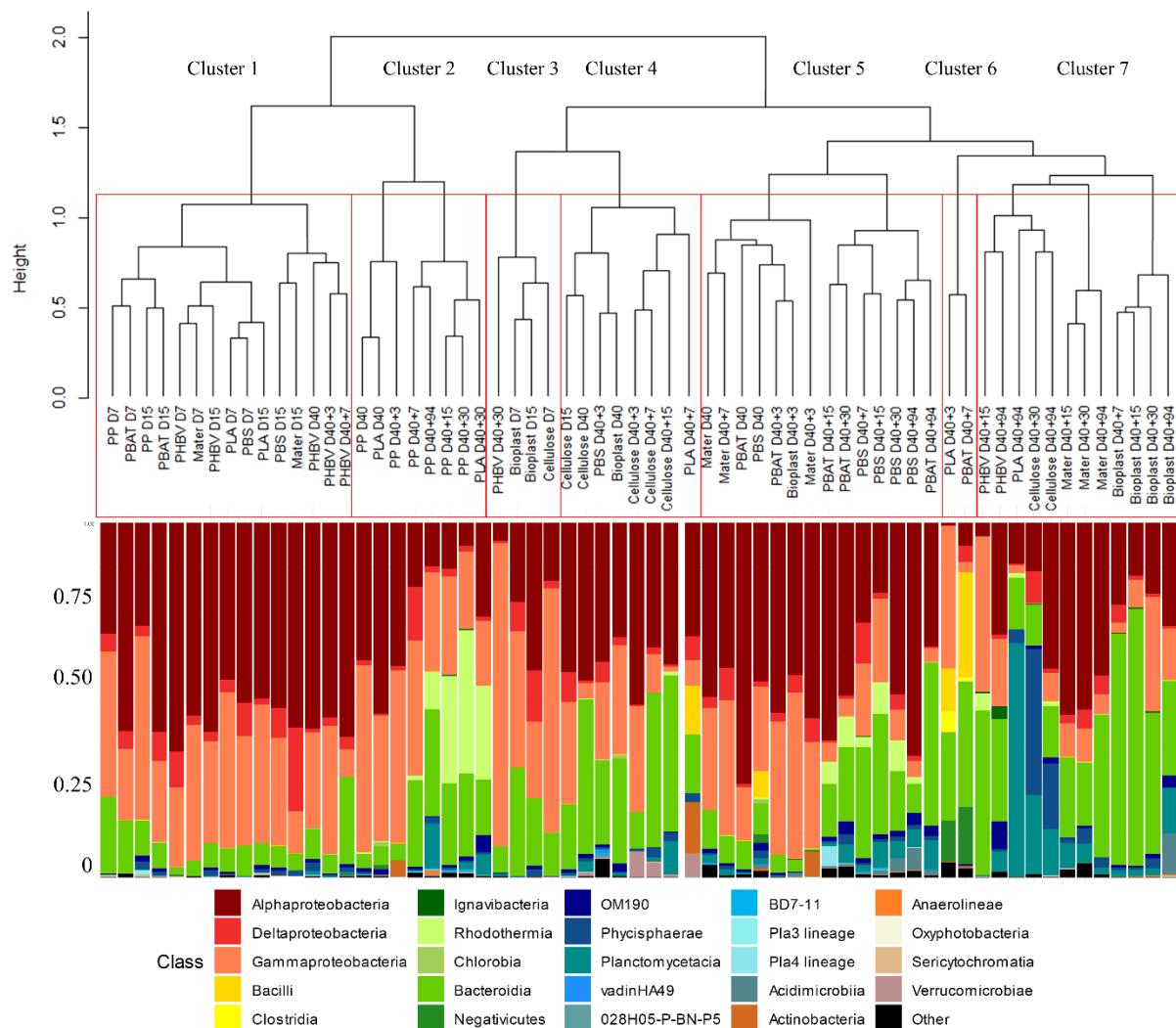


Figure 3 : Comparison between hierarchical clustering based on Bray-Curtis similarity between the temporal dynamic of bacterial communities growing on the 8 polymer types (upper part) and their taxonomic affiliation by cumulative charts comparing relative class of abundances (lower part).

The first colonizers growing on 5 of the 7 polymer types immersed in seawater (PP, PLA, PBS, PBAT, Mater-Bi) presented very similar communities (D7 and D15 of all polymer types grouped in Cluster 1) (Anova, p value = 0.221 and 0.121 for D7 and D15, respectively). Alphaproteobacteria represented 52% of the total OTU abundance in each sample, followed by Gammaproteobacteria (30%) and Bacteroidia (9%). The two most represented families were affiliated to the Alphaproteobacteria, with the Rhodobacteraceae (24%) (mainly *Sulfitobacte* sp.r and *Pseudopelagicola* sp.) and the Metylolibellaceae (21%). Flavobacteriaceae (6.7%)

(mainly *Croceibacter* sp. and *Aquibacter* sp.) and Nitrinocolaceae (mainly *Neptunibacter* sp.) (5.5%) were also abundant during this stage. Bacteria growing on Bioplast and cellulose grouped in a separated cluster (Cluster 3, Fig. 3), with a lower dominance of Alphaproteobacteria (32%) and higher presence of Bacteroidia (25%), together with similar dominance of Gammaproteobacteria (30%) as compared to the other polymer types (see above). Alteromonadaceae family dominated (24.5%), represented mainly by the *Alteromonas* sp. and *Marinobacter* sp. Flavobacteriaceae family represents 22% of the biofilm community, mainly represented by the *Wenyingzhuangia* sp. Finally, like the other polymers, the Rhodobacteraceae family was very abundant (21%), mainly represented by the genus *Sulfitobacter* sp.

Bacterial community structure generally diverged after the growing phase of the biofilm, were distinct mature biofilm appeared between polymer types after 40 days in seawater (D40). PP and PLA biofilm (cluster 2) were dominated by Alphaproteobacteria (Rhodobacteraceae) and Bacteroidia (Flavobacteriaceae). PBS and PBAT (Cluster 5) were dominated by Alphaproteobacteria (mainly Rhodobacteraceae) and Gammaproteobacteria (mainly Solimonadaceae). Bioplast and cellulose (Cluster 4) were dominated by Alphaproteobacteria (mainly Hyphomonadaceae) and Gammaproteobacteria (mainly Alteromonadaceae).

PHBV was dominated by Alphaproteobacteria (Rhodobacteraceae) followed by Gammaproteobacteria (Cellvibrionaceae) and finally Bacteroidia (Flavobacteriaceae). As for Mater-Bi, its mature biofilm was dominated by Alphaproteobacteria (Rhodobacteraceae), followed by Gammaproteobacteria (Spongiibacteraceae) and bacteroidia (Flavobacteriaceae).

### 3.3.3. *Biofilm specialization after transfer to minimum medium*

The transfer from natural seawater to the minimum medium resulted in bacterial community changes following three different scenarii according to the polymer types. First, bacterial community structure of PP (cluster 2), PBAT and PBS (cluster 5) remained stable and distinct during the 94 days of incubation. The second scenario was shared between most of the polymers, where the initial biofilm established during the colonization phase remained stable for one week after the transfer in minimal medium (Day 40+7) and then change to another community that remained stable until the end of the experiment (Day 40+94). This was the case for Bioplast, MaterBi, PHBV and Cellulose that (from clusters 1, 4, 5 to cluster 7), even if each of them grouped in distinct sub-clusters. A third scenario was found for PLA which presented a chaotic dispersion of the bacterial communities among all other clusters, even if the community at the end of the experiment clustered together in the cluster 7, with three sub-

clusters composed of (i) Mater-Bi, (ii) Bioplast and (iii) PLA, PHBV and cellulose. A drastic increase of Bacteroidetes and a decrease of Alpha- and Gamma-proteobacteria was observed at the end of the experiment (D40+94) in cluster 7.

The evolution of the major OTUs found on each polymer type at the beginning (D40) and at the end (D40+94) of the incubation in minimum medium was detailed in Figure 4.

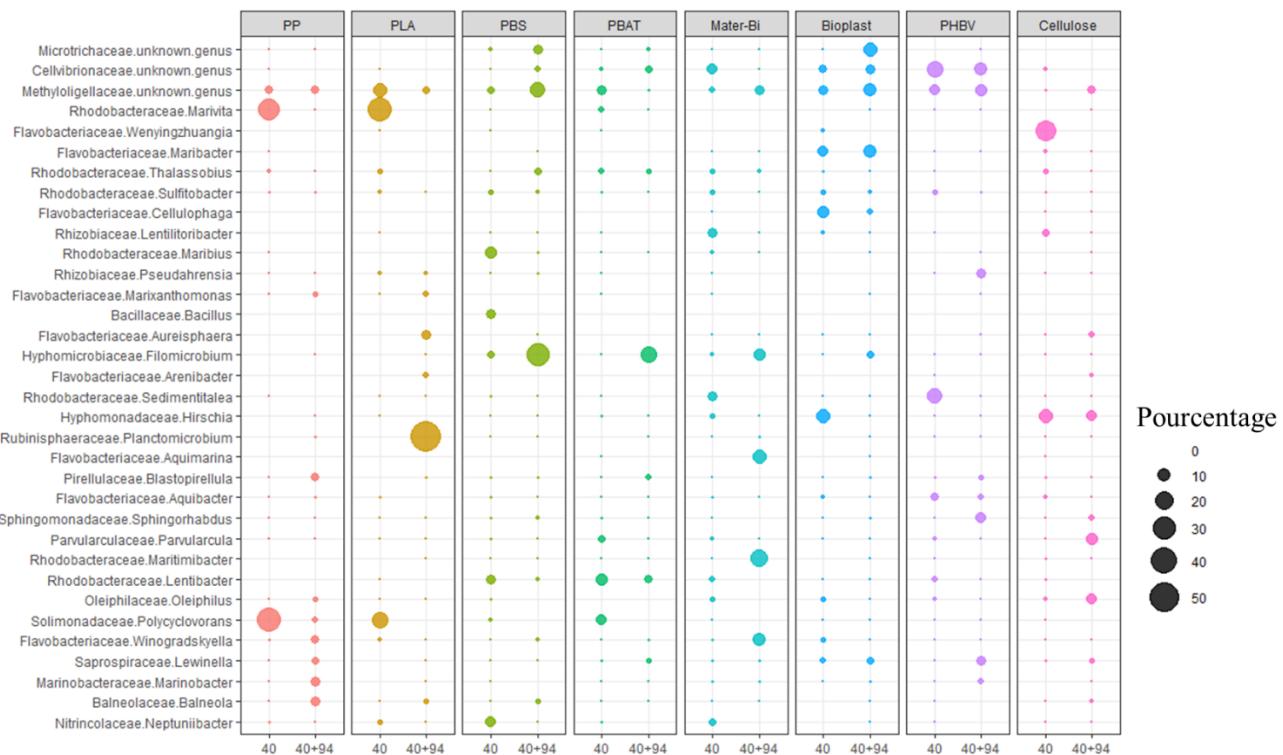


Figure 4: Evolution of the major OTUs on the different polymers according to the date of incubation in seawater for 40 days (D40) and in minimum medium for 94 days (D40+94).

The mature biofilm that developed in seawater on the non-biodegradable PP and PLA (D40) were largely dominated by *Polycyclovorans* sp. and *Marivita* sp. (more than 62% and 49% for PP and PLA, respectively), these two OTUs becoming scarce at the end of the incubation in minimum medium (<2.3% at D40+94). Bacterial lineages present after 94 days under this drastic condition were the hydrocarbonclasts *Balneola* sp., *Marinobacter* sp., *Winogradskyella* sp., *Lewinella* sp. for PP, explaining 13.15% of the difference between D40 and D40+94 and representing 20% (SIMPER analysis) of the relative abundance of the biofilm of the specialization phase. The major OTUs at D40+94 on PLA was *Planctomicrobium* sp. (56.7% of the community) that contributed to 32.31% of the difference with D40 (SIMPER analysis), where it was not detected. Other genera have emerged at D40+94 on this polymer

such as *Arenibacter* sp., *Aureisphaera* sp. and *Marixanthomonas* sp. representing almost 11% of the relative abundance at the end of incubation.

The mature biofilm on PBS (D40) was dominated by *Maribius* sp., *Neptuniibacter* sp. and *Bacillus* sp. representing nearly 21% of the total OTUs and these 3 genera represented only 0.64% at D40+94. At the end of the experiment (D40+94), the biofilm was dominated by *Filomicrombium* sp. (31%), *Thalassobius* sp. (3%) and *Bythopirellula* sp. (2%) explaining about 23% of the disparity with the J40. These three bacterial genera were scarce until the transfer into the minimum medium (3%).

The dominant OTUs found in the mature biofilm (D40) on PBAT were Rhodobacteraceae at 20.37% (*Marivita* sp., *Lentibacter* sp.), Solimonadaceae at 7.1 % (*Lewinella* sp.) and Methylologellaceae at 5.6 % and then moved to Saprospiraceae (42.5%) and *Filomicrombium* sp. (15.8%) at D40+94. These two OTUs alone explained 34.6% of the difference between the 2 dates. As already found for PP and PLA, *Polycyclovorans* sp. was very abundant at D40 (7.1%) and were no longer detected at D40+94.

Incubation in minimum medium with Mater-Bi as sole carbon source resulted in the selection of *Aquimarina* sp., *Winogradskyella* sp., *Maritimibacter* sp. and *Filomicrombium* sp. that represented nearly 48% of the total OTUs at D40+94, but less than 2% at D40. These four genera explained 27.8% of the difference between the 2 dates based on SIMPER analysis. The OTUs selected at D40+94 for Bioplast were dominated by Microtrichaceae (12%), while it belonged to the rare biosphere at D40 (<0.05%). Other genera emerged (>9%) including *Aliigaciecola* sp., *Filomicrombium* sp., *Flexitrhrix* sp., while representing low abundance at D40 (<0.4%). In the opposite, *Alteromonas* sp. and *Oleibacter* sp. were abundant (8.8%) at D40 and became rare at D40+94 (<0.05%). Selection on minimum medium with PHBV as sole carbon source showed the emergence of *Sphingorhabdus* sp., *Lewinella* sp., *Pseudahrensia* sp. and *Marinobacter* sp. (>21% after D40+94 and <0.6% at D40), which explained 17.26% of the difference between D40 and D40+94 according to SIMPER analysis (Fig.4), whereas the dominant *Sedimentitalea* sp., *Thalassotalea* sp. and *Lentibacter* sp. at D40 (20% of the total OTUs) represented less than 0.1% at D40+94.

Cellulose selected *Parvularcula* sp., *Oleiphilus* sp., *Pirellula* sp. and *Phycisphaera* sp. at D40+94 (21.5 % of the total OTUs at D40+94 compared to <1.5% at D40), which explained

16% of the difference between the 2 sampling dates. *Hirschia* sp. remained relatively stable between D40 (11.4%) and D40+94 (7.32%).

We finally focused on 35 different genera present on all the polymers that may be considered as potentially hydrocarbonoclastic bacteria (HCB). In this functional group, Gammaproteobacteria were overrepresented (40% of putative hydrocarbon degraders) followed by Bacteroidia (31%) and Alphaproteobacteria (23%). The most abundant genera potentially involved in hydrocarbon degradation were *Neptuniibacter* sp., *Sulfitobacter* sp., *Balneola* sp., *Lentibacter* sp. and *Marinobacter* sp., which represented 52% of the total OTUs. Overall, putative HCB were abundant during the growing and maturation phases of the biofilms in seawater (between 8.4 and 38.0% of the total communities), with higher abundance generally found during the growing phase for all polymers (Table 2). Interestingly, the putative HCB decreased drastically until the end of the incubation in minimum medium with the polymers as sole carbon source (D40+94). One exception was found for PP that showed the highest percentage of putative HCB on the mature biofilm (38%), with even highest percentage found after 30 days in minimum medium (63.6%) mainly composed of *Balneola* sp., *Winogradkylle* sp. and *Marinobacter* sp. Other putative HCBs found during the colonization phase in seawater in most of the polymers did not succeed in staying on the polymer in minimum medium, such as *Polycylovorans* sp., *Neptuniibacter* sp., *Croceibacter* sp. and *Colweillia* sp. (Fig. 4). We did not find any specificity for the other petroleum-based polymers, where putative HCB at D40+94 were found with low percentage (8.6%) for PBS and PBAT.

Days	Natural seawater			Minimum medium				
	7	15	40	40+3	40+7	40+15	40+30	40+94
Bioplast	21.1	21.6	12.1	55.1	7.1	9.6	5.8	6.6
Mater-Bi	23.0	14.5	13.3	37.3	19.5	6.2	10.7	13.4
PBAT	31.9	21.3	21.0	54.7	4.8	26.3	19.9	8.6
PBS	21.7	20.7	19.8	12.4	32.7	27.7	22.9	8.6
PHBV	16.0	18.5	8.4	33.4	15.8	8.3	46.1	11.1
PLA	35.1	22.3	22.7	1.4	20.1	NA	35.5	4.9
PP	32.5	26.6	38.0	21.3	37.8	60.2	63.6	26.6
Cellulose	17.4	16.3	11.2	14.1	13.9	3.3	0.9	12.3

Table 1 : Percentage of OTU selected as putative HCB on each polymer (PP, PLA, PBS, PBAT, MaterBi, Bioplast, PHBV, cellulose) according to the date of incubation in seawater during 7,

15 and 40 days (D40) followed by the transfer in minimum medium during 3 (40+3), 7 (40+7), 15 (40+15), 30 (40+30) and 94 days (40+94).

## 4.Discussion

### 4.1. Formation of mature biofilms on all polymer types in seawater

#### 4.1.1. Aquarium with direct circulation to the sea mimics the natural conditions of the North Western Mediterranean Sea.

The colonization of the different polymer types was feasible thanks to distinct incubation in aquarium with every 30 min renewal of seawater, which presented similar hydrological conditions found at the SOLA observatory in the Banyuls Bay (NW Mediterranean Sea, France). During the first 40 days of incubation in seawater, temperature ( $13^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ ), chlorophyll *a* and nutrients (data not shown) were classical to generally observed at the long-term SOLA observatory station (Ghiglione *et al.* 2005; Lambert *et al.* 2019). Bacterial heterotrophic activity in the seawater, measured by  ${}^3\text{H}$ -leucine incorporation reached  $22.3 \text{ ng.C.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ , which was similar to what was generally reported *in situ* in the NW Mediterranean Sea (Pulido-Villena *et al.* 2012). These results showed that the incubation in our aquarium with direct circulation to the sea allowed to reproduce the natural conditions during our incubation, thus making extrapolation of our results to natural seawater possible.

#### 4.1.2 Growing and maturation phases of the biofilms on all the polymer types in seawater

In agreement with patterns observed in other study (Salta *et al.* 2013), we found a succession of growing and maturation phases of the biofilms for all the polymer types during the 40 days of incubation in natural seawater. Each phase was linked with specific bacterial communities that were similar during the growing phase but became specific to the polymer types when the mature biofilm formed. This result is in agreement with previous studies conducted in the same region (Dussud *et al.* 2018).

Bacterial heterotrophic activity peaked during the growing phase of the biofilm in all polymer types (either after 7 or 15 days). The growing bacterial communities were very similar regardless polymer types, except for Bioplast and Cellulose that clustered in another group. This result was surprising considering the distinct chemical polymer compositions and surface

properties of the plastics used in our study. Early stages of biofilm formation have been depicted as strongly dependent on substrate properties of polymers, including hydrophobicity/hydrophilicity, structure and roughness (Lorite *et al.* 2011). This was not obvious for immersed plastics in seawater, since our results were similar with other studies which did not find distinct communities during the first weeks of biofilm formation on different plastic types (Harrison *et al.* 2014; De Tender *et al.* 2017; Dussud *et al.* 2018a). This growing phase was mainly dominated by Proteobacteria (84% of the total abundance on all polymer), followed by Bacteroidetes (12.5%). The dominance of Proteobacteria during the first stage of colonization has already been described for the first stage of colonization on the plastisphere (Jacquin *et al.* 2019). The main contributors of the Proteobacteria were Alphaproteobacteria (47.14%, mainly Methyloligellaceae and Rhodobacteraceae) and Gammaproteobacteria (31.46%). The Methyloligellaceae has already been isolated on other types of plastic such as polyamide, polycarbonate or PP (Feng *et al.* 2020). Polymers were mainly colonized by members of the Rhodobacteraceae during this colonization phase and specialization phase of incubation. This family has been depicted as a key taxonomic group in marine biofilm formation (Elifantz *et al.* 2013; Kviatkovski and Minz 2015; Roager and Sonnenschein 2019), which explained its abundant presence on the tested polymers. During the colonization phase, the family of Flavobacteriaceae and particularly the genus *Neptuniibacter* sp., generally able to degrade hydrocarbons, was found in abundance on PLA, PBS and Mater-Bi (Gutierrez 2019). This result is consistent with a previous study which showed its presence only during the phase of primary colonization of polymers in similar conditions (Dussud *et al.* 2018a).

In all polymer types, the mature biofilm formed after 40 days of incubation in seawater showed lower values of bacterial heterotrophic activity compared to the growing phase. This is consistent with observations made in the unique study measuring the bacterial heterotrophic activities on plastisphere (Dussud *et al.* 2018a). It can be explained by decreasing availability of labile inorganic and organic matter when the biofilm become mature, and also by the selection of new communities developing over slower-growing metabolic strategies (Lorite *et al.* 2011). Diversity in mature biofilms became specific for each polymer, which is consistent with observations made in the natural environment (Webb *et al.* 2012; De Tender *et al.* 2017; Pinto *et al.* 2019). The evenness at the microbial community level increased for 40 days for all polymers except PP and PBAT. This decline in evenness is mainly explained by a decrease in diversity (Shannon) and to a lesser extent by the decrease in wealth (Chao1).

#### 4.2. Convergent signs of biodegradability for some polymers

As recommended in several standard tests, the biodegradability of the polymers was tested after transferring each polymer type into a minimum medium with no other source of carbon and energy than the polymer (ISO 18830:2016, ISO 19679:2016, ASTM D6691-09). As suggested in these tests, we used the cellulose as positive control and we considered PP as negative control since its biodegradation was previously depicted to take years or decades in nature (Barnes *et al.* 2009).

When standards authorized various types of bacterial inoculum from unique or multiple environmental sources (Harrison *et al.* 2018; Jacquin *et al.* 2019), we used the mature biofilm that developed in each polymer types during 40 days incubation in natural seawater in order to be as close as possible to the natural conditions. After 94 days in minimum medium, SEM observation showed no surface modifications for PP, PLA and PBS, whereas PBAT, Bioplast, Mater-Bi, PHBV and cellulose exhibited observable morphological alterations, with clear evidences of swelling and erosion. Visible alterations of the plastic surfaces are considered to be suitable signs of biodegradation, even if they are not sufficient by themselves (Zettler 2013). Plastics, such as PHBV, are known to undergo erosion mechanism by numerous exo-enzymatic actions (amylases, proteases, nucleases), leading to weakening of the external structure of polymers (Deroiné *et al.* 2014, 2015). In a previous study, it has been shown that PHAs degrade faster in seawater than other polymers such as PBS, PBAT or PLA (Sashiwa *et al.* 2018).

In parallel, SEM observations at the end of the experiment showed dispersed and isolated bacteria for PP, PLA and PBS, whereas dense biofilms with several layers and important extracellular matrix were found for all the other polymers. This is another sign of biofilm capability to use polymers as sole carbon source for growth. PLA was found to degrade very slowly in seawater and remained stable at room temperature (Deroiné *et al.* 2014). PBS degradation was found to increase with temperature, whereas high salinity slowed down its degradation (da Silva Dutra *et al.* 2019).

The same conclusions were also found when using radio-labelled leucine incorporation as a proxy of bacterial biodegradability in our conditions. This technique has been used for decades as the most sensitive methodology to measure microbial heterotrophic activity and growth in seawaters (Kirchman *et al.* 1985). It has been successfully used to prove the biodegradability of several substrates, such as antifouling biocides (Maraldo and Dahllöf 2004), hydrocarbons (Peng *et al.* 2020), plasticizers and flame retardants (Vila-Costa *et al.* 2019). This technique has never been used so far to prove polymer biodegradability in seawater, probably because of the

lack of studies in marine environments. It is noteworthy that respirometry analysis generally made by titrimetric methods for O<sub>2</sub> (Montgomery *et al.* 1964) or CO<sub>2</sub> measurements (Bartha and Praemer 1965) generally limit the number of samples analyzed since they are particularly time consuming compared to measurement of bacterial production by <sup>3</sup>H-leucine incorporation. (Kirchman 2001). Following the kinetics of microbial activity is also an important aspect that is not necessarily taken into consideration in standard tests and can result in misinterpretation. We showed here that bacteria living in the biofilm can continue to be active for several days after transfer under minimum medium with no other carbon source, as it is the case for PP, PLA and PBS that showed bacterial heterotrophic activities during one or two weeks before falling-off. Such activity could be misinterpreted as polymer biodegradation if integrative measurements would be taken only at the end of the experiment, as it is authorized in current standard tests. For PBAT, Bioplast, Mater-Bi, PHBV and cellulose, the kinetics of bacterial heterotrophic activity remained rather stable after 15 days in minimum medium and until the end of the experiment (94 days). Taken together with congruent results from SEM observations, we consider that these latter polymers were exposed to microbial attack that participated to their biodegradation. It has already been shown on PBAT (Weng *et al.* 2013; Saadi *et al.* 2013), Mater-Bi (Kim *et al.* 2000), Bioplast (<https://fr.biotec.de/>), PHBV (Weng *et al.* 2010; Arcos-Hernandez *et al.* 2015) and Cellulose (Salehpour *et al.* 2018), which were all found to be biodegradable in soil or compost environments, but this is the first study to give indication of their biodegradability by natural complex communities in seawater. It is interesting to note that PLA, a polymer considered to be compostable and biodegradable in soil and compost (Ren *et al.* 2007), did not show sign of biodegradation under our marine experimental conditions.

#### **4.3. Identification of putative biodegraders of the set of polymers.**

According to the SEM and heterotrophic bacterial activity measurements, we focused on the OTUs selected at the end of the incubation in minimum medium on the polymers that showed clear signs of biodegradability under our experimental conditions (PBAT, Bioplast, Mater-Bi, PHBV and cellulose). The presence of complex communities living on such strict conditions strongly suggest that they were member of putative biodegraders that may interact to each other to perform all or some part of the degradation until the ultimate mineralization in CO<sub>2</sub> (Dussud and Ghiglione 2014). We are aware that part of the identified OTUs may not be involved in the polymer degradation but rather opportunists that may survive in the biofilm (Sauret *et al.* 2014). Our original procedure allowed to present here a list of putative OTUs selected from a mature

biofilm grown under natural seawater conditions, which may be involved in biodegradability of the polymers.

On the PBAT, we found *Thalassobius* sp. as dominant OTUs after 94 days in minimum medium with the mature biofilm and its polymer as sole carbon source. This genus has been already shown as potentially capable of degrading the aromatic hydrocarbons in seawater (Rodrigo-Torres *et al.* 2017) and found in the oil polluted waters of the Gulf of Mexico (Liu *et al.* 2017). *Filomicrombium* sp. were also dominant at the end of the experiment, already observed in other marine environment (Wu *et al.* 2009), as well as *Prevotella* sp. and *Streptococcus* sp. known as potential pathogenic genera (Fittipaldi *et al.* 2012; Larsen *et al.* 2017). None of them were previously identified as potential PBAT degraders.

The bacteria growing with Mater-Bi as sole carbon source was dominated by *Filomicrombium* sp., already identified on the plastiisphere of PE and PET (Muthukrishnan *et al.* 2018). Other groups were *Winogradskyella* sp., *Maritimibacter* sp., *Aquimarina* sp. and *Halomonas* sp., which were previously described as putative HCB (Liu *et al.* 2017, Mnif *et al.* 2009). None of them were previously identified as potential Mater-Bi degraders.

Bacteria selected on Bioplast at the end of the experiment included *Lewinella* sp., already identified on the plastiisphere of petroleum-based PP, PE and PET, as well as on biobased PHBH films (Morohoshi *et al.* 2018; Roager and Sonnenschein 2019). Other OTUs belonging to putative HCB were *Croceitalea* sp., *Hirschia* sp., *Maribacter* sp. and *Cellulophaga* sp. None of them were previously identified as potential Bioplast degraders.

Microbial communities selected after 94 days on PHBV as sole carbon source such as *Marinobacter* sp. and *Alteromonas* sp. were already shown for their ability to degrade the PHBV (Mergaert *et al.* 1995; Martinez Tobon 2019). It is noteworthy that *Marinobacter* sp. genera contains well-known HCB capable of degrading Benzene, Toluene, Ethylbenzene and Xylene (BTEX) (Li *et al.* 2012), long-chain alkans (Grimaud *et al.* 2012; Grimaud *et al.* 2012), polycyclic aromatic hydrocarbons (Gao *et al.* 2013; Cui *et al.* 2016), chlorinated solvents (Inoue *et al.* 2020), phenol (Zhou *et al.* 2020) and PHA (Kasuya *et al.* 2000; Martinez Tobon 2019). Finally, it is noteworthy that putative HCB were very abundant during the formation of the biofilm in seawater (from 8 to 35% of the total OTUs) and diminished after the selection in minimum medium with the polymer as sole carbon source (from 6 to 12% of the total OTUs). One exception was found for the PP that always present high percentage of putative HCB (38% during the biofilm formation and 27% at the end of the experiment). We could have expected an increase in this functional group during the selection under minimum medium, since several authors proposed that the HCB are certainly involved in plastic biodegradation (Bryant *et al.*

2016; Pollet *et al.* 2018; Amaral-Zettler *et al.* 2020). Here we showed that some of HCB may be effectively involved in biodegradation, but they were not a majority for polymer that showed biodegradation under our experimental conditions. If the HCB were dominant on PP, it was not the case on PBS and PBAT, thus suggesting that the presence of HCB on the plasticsphere is not particularly linked to petroleum-based polymers. HCB generally present a high capability to attach to particles and to live in a biofilm (Grimaud *et al.* 2012), two factors that may be more important than their ability to degrade either the hydrocarbon than can attach to plastics or the plastic itself.

### Concluding remarks

Decisions taken by the government to reduce the use of single-use plastics and promote biodegradable polymers lead to finding substitutes for conventional plastics. Here we present that polymers such as PHBV, Mater-BI, Bioplast, PBAT and cellulose are good candidates for alternatives to non-biodegradable plastics. It is noteworthy that the bio-based polymer PLA showed no signs of biodegradation under our marine conditions, whereas the petroleum-based polymer PBAT showed significant evidence of biodegradation. The current biodegradation standards to prove biodegradability of plastics in the marine environment are mainly based on respirometry methods, considered to be insufficient by the scientific community for a good characterization of this complex process (Harrison *et al.* 2018). Here, we propose an innovative experimental design using a natural inoculum for biodegradation tests, which takes into account the formation of a natural mature biofilm on plastics as inoculum that is crucial to mimic natural conditions. We also recommend the use of the  $^{3}\text{H}$ -Leucine incorporation method that is classically used in marine microbial ecology (Kirchman *et al.* 1985) as a powerful tool to supplement the material- and time-consuming respirometry tests ( $\text{O}_2$  and  $\text{CO}_2$ ). We are aware that this study only takes into account the polymer and not include the additives that are classically part of the composition of the plastic items found in the environment. Further studies are needed to evaluate the toxicity of the polymers and their degradation products, as well as the release of additives generally supplemented by manufacturers in the microplastic composition.

## Reference

- Amaral-Zettler LA, Zettler ER, and Mincer TJ. 2020. Ecology of the plastisphere. *Nat Rev Microbiol* **18**: 139–51.
- Arcos-Hernandez M, Montano-Herrera L, Janarthanan OM, et al. 2015. Value-added bioplastics from services of wastewater treatment. *Water Practice & Technology* **10**: 546.
- Barnes DKA, Galgani F, Thompson RC, and Barlaz M. 2009. Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **364**: 1985–98.
- Bartha R and Pramer D. 1965. Features of a Flask and Method for Measuring the Persistence and Biological Effects of Pesticides in Soil. *Soil Science* **100**: 68–70.
- Bryant JA, Clemente TM, Viviani DA, et al. 2016. Diversity and Activity of Communities Inhabiting Plastic Debris in the North Pacific Gyre. *mSystems* **1**.
- Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, et al. 2009. BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics* **10**: 421.
- Cui Z, Gao W, Xu G, et al. 2016. Marinobacter aromaticivorans sp. nov., a polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium isolated from sea sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **66**: 353–9.
- Dang H and Lovell CR. 2000. Bacterial Primary Colonization and Early Succession on Surfaces in Marine Waters as Determined by Amplified rRNA Gene Restriction Analysis and Sequence Analysis of 16S rRNA Genes. *Appl Environ Microbiol* **66**: 467–75.
- De Tender C, Devriese LI, Haegeman A, et al. 2017. Temporal Dynamics of Bacterial and Fungal Colonization on Plastic Debris in the North Sea. *Environ Sci Technol* **51**: 7350–60.
- Debeljak P, Pinto M, Proietti M, et al. 2016. Extracting DNA from ocean microplastics: A method comparison study. *Analytical methods* **9**.
- Deroine M, César G, Le Duigou A, et al. 2015. Natural Degradation and Biodegradation of Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate) in Liquid and Solid Marine Environments. *J Polym Environ* **23**: 493–505.
- Deroine M, Le Duigou A, Corre Y-M, et al. 2014a. Accelerated ageing and lifetime prediction of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in distilled water. *Polymer Testing* **39**: 70–8.
- Deroine M, Le Duigou A, Corre Y-M, et al. 2014b. Accelerated ageing of polylactide in aqueous environments: Comparative study between distilled water and seawater. *Polymer Degradation and Stability* **108**: 319–29.

- Dussud C, Hudec C, George M, *et al.* 2018a. Colonization of Non-biodegradable and Biodegradable Plastics by Marine Microorganisms. *Front Microbiol* **9**.
- Dussud C, Meistertzheim AL, Conan P, *et al.* 2018b. Evidence of niche partitioning among bacteria living on plastics, organic particles and surrounding seawaters. *Environmental Pollution* **236**: 807–16.
- Eich A, Mildnerger T, Laforsch C, and Weber M. 2015. Biofilm and Diatom Succession on Polyethylene (PE) and Biodegradable Plastic Bags in Two Marine Habitats: Early Signs of Degradation in the Pelagic and Benthic Zone? *PLoS One* **10**.
- Elifantz H, Horn G, Ayon M, *et al.* 2013. Rhodobacteraceae are the key members of the microbial community of the initial biofilm formed in Eastern Mediterranean coastal seawater. *FEMS Microbiol Ecol* **85**: 348–57.
- Eriksen M, Lebreton LCM, Carson HS, *et al.* 2014. Plastic Pollution in the World's Oceans: More than 5 Trillion Plastic Pieces Weighing over 250,000 Tons Afloat at Sea. *PLOS ONE* **9**: e111913.
- Erni-Cassola G, Wright RJ, Gibson MI, and Christie-Oleza JA. 2019. Early Colonization of Weathered Polyethylene by Distinct Bacteria in Marine Coastal Seawater. *Microb Ecol*.
- Escudié F, Auer L, Bernard M, *et al.* 2018. FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution. *Bioinformatics* **34**: 1287–94.
- Fegatella F, Lim J, Kjelleberg S, and Cavicchioli R. 1998. Implications of rRNA operon copy number and ribosome content in the marine oligotrophic ultramicrobacterium *Sphingomonas* sp. strain RB2256. *Appl Environ Microbiol* **64**: 4433–8.
- Feng L, He L, Jiang S, *et al.* 2020. Investigating the composition and distribution of microplastics surface biofilms in coral areas. *Chemosphere* **252**: 126565.
- Fittipaldi N, Segura M, Grenier D, and Gottschalk M. 2012. Virulence factors involved in the pathogenesis of the infection caused by the swine pathogen and zoonotic agent *Streptococcus suis*. *Future Microbiology* **7**: 259–79.
- Fuhrman JA, Sleeter TD, Carlson CA, and Proctor LM. 1989. Dominance of bacterial biomass in the Sargasso Sea and its ecological implications. *Marine Ecology Progress Series* **57**: 207–17.
- Gao W, Cui Z, Li Q, *et al.* 2013. *Marinobacter nankaiticus* sp. nov., polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium isolated from the sediment of the South China Sea. *Antonie van Leeuwenhoek* **103**: 485–91.
- Ghiglione J-F, Larcher M, and Lebaron P. 2005. Spatial and temporal scales of variation in bacterioplankton community structure in the NW Mediterranean Sea. *Aquatic Microbial Ecology* **40**: 229–40.
- Grimaud R, Ghiglione J-F, Cagnon C, *et al.* 2012. Genome sequence of the marine bacterium *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SP17, which forms biofilms on hydrophobic organic compounds. *Journal of Bacteriology* **194**: 3539–40.

- Gutierrez T. 2019. Occurrence and Roles of the Obligate Hydrocarbonoclastic Bacteria in the Ocean When There Is No Obvious Hydrocarbon Contamination. In: McGenity TJ (Ed). *Taxonomy, Genomics and Ecophysiology of Hydrocarbon-Degrading Microbes*. Cham: Springer International Publishing.
- Haider T, Völker C, Kramm J, et al. 2018. Plastics of the Future? The Impact of Biodegradable Polymers on the Environment and on Society. *Angewandte Chemie International Edition* **58**.
- Harrison JP, Boardman C, O'Callaghan K, et al. 2018. Biodegradability standards for carrier bags and plastic films in aquatic environments: a critical review. *Royal Society Open Science* **5**: 171792.
- Harrison JP, Schratzberger M, Sapp M, and Osborn AM. 2014. Rapid bacterial colonization of low-density polyethylene microplastics in coastal sediment microcosms. *BMC Microbiology* **14**: 232.
- Inoue Y, Fukunaga Y, Katsumata H, et al. 2020. Aerobic degradation of *cis*-dichloroethene by the marine bacterium *Marinobacter salsuginis* strain 5N-3. *The Journal of General and Applied Microbiology* **advpub**.
- Jacquin J, Cheng J, Odobel C, et al. 2019. Microbial Ecotoxicology of Marine Plastic Debris: A Review on Colonization and Biodegradation by the “Plastisphere.” *Front Microbiol* **10**.
- Kang H, Kim H, Joung Y, and Joh K. 2017. *Winogradskyella maritima* sp. nov., isolated from seawater. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **67**: 3840–5.
- Kasuya K, Mitomo H, Nakahara M, et al. 2000. Identification of a marine benthic P(3HB)-degrading bacterium isolate and characterization of its P(3HB) depolymerase. *Biomacromolecules* **1**: 194–201.
- Kim M-N, Lee A-R, Yoon J-S, and Chin I-J. 2000. Biodegradation of poly(3-hydroxybutyrate), Sky-Green® and Mater-Bi® by fungi isolated from soils. *European Polymer Journal* **36**: 1677–85.
- Kirchman D. 2001. Measuring bacterial biomass production and growth rates from leucine incorporation in natural aquatic environments. In: *Methods in Microbiology*. Academic Press.
- Kirchman D, K’nees E, and Hodson R. 1985. Leucine incorporation and its potential as a measure of protein synthesis by bacteria in natural aquatic systems. *Appl Environ Microbiol* **49**: 599–607.
- Kviatkovski I and Minz D. 2015. A member of the Rhodobacteraceae promotes initial biofilm formation via the secretion of extracellular factor(s). *Aquatic Microbial Ecology* **75**: 155–67.
- Lambert S, Tragin M, Lozano J-C, et al. 2019. Rhythmicity of coastal marine picoeukaryotes, bacteria and archaea despite irregular environmental perturbations. *ISME J* **13**: 388–401.

- Larsen JM. 2017. The immune response to *Prevotella* bacteria in chronic inflammatory disease. *Immunology* **151**: 363–74.
- Lebaron P, Ghiglione J-F, Fajon C, et al. 1998. Phenotypic and genetic diversity within a colony morphotype. *FEMS Microbiol Lett* **160**: 137–43.
- Li H, Zhang Q, Wang X-L, et al. 2012. Biodegradation of benzene homologues in contaminated sediment of the East China Sea. *Bioresource Technology* **124**: 129–36.
- Liu J, Bacosa HP, and Liu Z. 2017. Potential Environmental Factors Affecting Oil-Degrading Bacterial Populations in Deep and Surface Waters of the Northern Gulf of Mexico. *Front Microbiol* **7**.
- Lobelle D and Cunliffe M. 2011. Early microbial biofilm formation on marine plastic debris. *Marine Pollution Bulletin* **62**: 197–200.
- Lorite GS, Rodrigues CM, Souza AA de, et al. 2011. The role of conditioning film formation and surface chemical changes on *Xylella fastidiosa* adhesion and biofilm evolution. *J Colloid Interface Sci* **359**: 289–95.
- Mahé F, Rognes T, Quince C, et al. 2014. Swarm: robust and fast clustering method for amplicon-based studies. *PeerJ* **2**: e593.
- Maraldo K and Dahllöf I. 2004. Indirect estimation of degradation time for zinc pyrithione and copper pyrithione in seawater. *Mar Pollut Bull* **48**: 894–901.
- Martinez Tobon DI. 2019. Biodegradation of Polyhydroxybutyrate by Bacterial Strains, Native Extracellular PHB Depolymerases, and Structural Variants.
- McMurdie PJ and Holmes S. 2013. phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLOS ONE* **8**: e61217.
- Mergaert J, Wouters A, Swings J, and Anderson C. 1995. In situ biodegradation of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in natural waters. *Can J Microbiol* **41**: 154–9.
- Mnif S, Chamkha M, and Sayadi S. 2009. Isolation and characterization of *Halomonas* sp. strain C2SS100, a hydrocarbon-degrading bacterium under hypersaline conditions. *Journal of Applied Microbiology* **107**: 785–94.
- Montgomery H a. C, Thom NS, and Cockburn A. 1964. Determination of dissolved oxygen by the winkler method and the solubility of oxygen in pure water and sea water. *Journal of Applied Chemistry* **14**: 280–96.
- Morohoshi T, Ogata K, Okura T, and Sato S. 2018. Molecular Characterization of the Bacterial Community in Biofilms for Degradation of Poly(3-Hydroxybutyrate-*co*-3-Hydroxyhexanoate) Films in Seawater. *Microbes and environments* **33**: 19–25.
- Muthukrishnan T, Al Khaburi M, and Abed RMM. 2018. Fouling Microbial Communities on Plastics Compared with Wood and Steel: Are They Substrate- or Location-Specific? *Microbial Ecology*.

- Oberbeckmann S, Löder MGJ, and Labrenz M. 2015. Marine microplastic-associated biofilms – a review. *Environ Chem* **12**: 551–62.
- Parada AE, Needham DM, and Fuhrman JA. 2016. Every base matters: assessing small subunit rRNA primers for marine microbiomes with mock communities, time series and global field samples. *Environmental Microbiology* **18**: 1403–14.
- Peng C, Tang Y, Yang H, et al. 2020. Time- and compound-dependent microbial community compositions and oil hydrocarbon degrading activities in seawater near the Chinese Zhoushan Archipelago. *Marine Pollution Bulletin* **152**: 110907.
- Pinto M, Langer TM, Hüffer T, et al. 2019. The composition of bacterial communities associated with plastic biofilms differs between different polymers and stages of biofilm succession. *PLOS ONE* **14**: e0217165.
- Pollet T, Berdje L, Garnier C, et al. 2018. Prokaryotic community successions and interactions in marine biofilms: the key role of Flavobacteriia. *FEMS Microbiol Ecol* **94**.
- Poulain M, Mercier MJ, Brach L, et al. 2019. Small Microplastics As a Main Contributor to Plastic Mass Balance in the North Atlantic Subtropical Gyre. *Environ Sci Technol* **53**: 1157–64.
- Pulido-Villena E, Ghiglione J-F, Ortega-Retuerta E, et al. 2012. Heterotrophic Bacteria in the Pelagic Realm of the Mediterranean Sea. *Life in the Mediterranean Sea: A Look at Habitat Changes*.
- Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, et al. 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res* **41**: D590–6.
- Ren J, Liu Z, and Ren T. 2007. Mechanical and Thermal Properties of Poly(Lactic Acid)/Starch/Montmorillonite Biodegradable Blends. *Polymers and Polymer Composites* **15**: 633–8.
- Roager L and Sonnenschein EC. 2019. Bacterial Candidates for Colonization and Degradation of Marine Plastic Debris. *Environ Sci Technol* **53**: 11636–43.
- Rodrigo-Torres L, Pujalte MJ, and Arahal DR. 2017. Draft genome sequence of *Thalassobius gelatinovorus* CECT 4357T, a roseobacter with the potential ability to degrade polycyclic aromatic hydrocarbons. *Gene Reports* **9**: 32–6.
- Rognes T, Flouri T, Nichols B, et al. 2016. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ* **4**: e2584.
- Saadi Z, Cesar G, Bewa H, and Benguigui L. 2013. Fungal Degradation of Poly(Butylene Adipate-Co-Terephthalate) in Soil and in Compost. *J Polym Environ* **21**: 893–901.
- Salehpour S, Jonoobi M, Ahmadzadeh M, et al. 2018. Biodegradation and ecotoxicological impact of cellulose nanocomposites in municipal solid waste composting. *International Journal of Biological Macromolecules* **111**: 264–70.

- Salta M, Wharton JA, Blache Y, *et al.* 2013. Marine biofilms on artificial surfaces: structure and dynamics: Marine biofilms: structure and dynamics. *Environ Microbiol*: n/a-n/a.
- Sashiwa H, Fukuda R, Okura T, *et al.* 2018. Microbial Degradation Behavior in Seawater of Polyester Blends Containing Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) (PHBHHx). *Marine Drugs* **16**: 34.
- Silva Dutra L da, Souza Belan Costa T de, Lobo VTV, *et al.* 2019. Preparation of Polymer Microparticles Through Non-aqueous Suspension Polycondensations: Part III—Degradation of PBS Microparticles in Different Aqueous Environments. *J Polym Environ* **27**: 176–88.
- Simon M and Azam F. 1989. Protein content and protein synthesis rates of planktonic marine bacteria. *Marine Ecology Progress Series* **51**: 201–13.
- Vila-Costa M, Sebastián M, Pizarro M, *et al.* 2019. Microbial consumption of organophosphate esters in seawater under phosphorus limited conditions. *Scientific Reports* **9**: 233.
- Wambeke FV, Ghiglione J-F, Nedoma J, *et al.* 2009. Bottom up effects on bacterioplankton growth and composition during summer-autumn transition in the open NW Mediterranean Sea. *Biogeosciences* **6**: 705–20.
- Wang W, Gao H, Jin S, *et al.* 2019. The ecotoxicological effects of microplastics on aquatic food web, from primary producer to human: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **173**: 110–7.
- Ward JH. 1963. Hierarchical Grouping to Optimize an Objective Function. *Journal of the American Statistical Association* **58**: 236–44.
- Webb H, Arnott J, Crawford R, and Ivanova E. 2012. Plastic Degradation and Its Environmental Implications with Special Reference to Poly(ethylene terephthalate). *Polymers* **5**: 1–18.
- Weng Y-X, Jin Y-J, Meng Q-Y, *et al.* 2013. Biodegradation behavior of poly(butylene adipate-co-terephthalate) (PBAT), poly(lactic acid) (PLA), and their blend under soil conditions. *Polymer Testing* **32**: 918–26.
- Weng Y-X, Wang Y, Wang X-L, and Wang Y-Z. 2010. Biodegradation behavior of PHBV films in a pilot-scale composting condition. *Polymer Testing* **29**: 579–87.
- Wu X-L, Yu S-L, Gu J, *et al.* 2009. Filomicobium insigne sp. nov., isolated from an oil-polluted saline soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **59**: 300–5.
- Zettler ER. 2013. Life in the “Plastisphere”: Microbial Communities on Plastic Marine Debris. *Environmental Science & Technology* **47**: 7137–46.
- Zhou M, Dong B, and Shao Z. 2020. Complete genome sequence of Marinobacter sp. LQ44, a haloalkaliphilic phenol-degrading bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Marine Genomics* **50**: 100697.

Table S1 : Chao1 richness, Pielou evenness and Shannon diversity indexes for each polymer during a first incubation in seawater during 7, 15 and 40 days followed by the transfer to minimum medium for 3 (40+3), 7 (40+7), 15 (40+15), 30 (40+30) and 94 days (40+94).

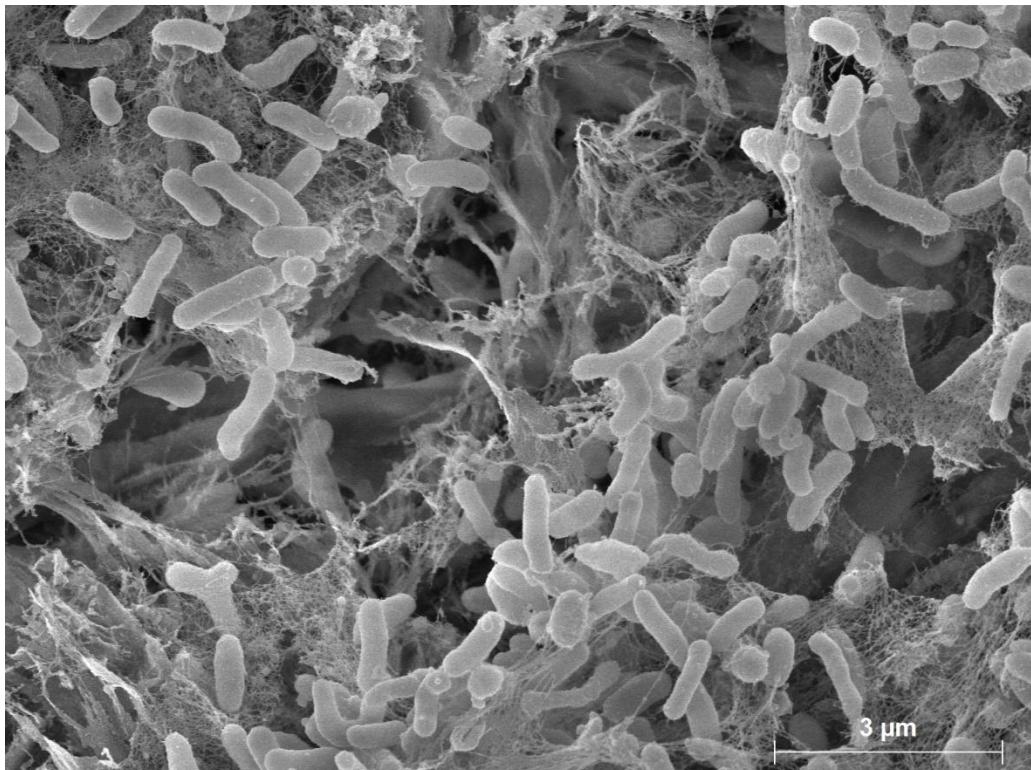
Polymer type	Days	OTUs number	Chao1 richness	Pielou evenness	Shannon diversity
PP	7	166	233.57	0.61	3.13
	15	244	294.57	0.69	3.82
	40	204	236.76	0.47	2.47
	40+3	108	168.00	0.70	3.29
	40+7	201	222.67	0.67	3.55
	40+15	186	243.95	0.58	3.03
	40+30	208	244.75	0.53	2.85
	40+94	212	251.38	0.73	3.90
PLA	7	144	196.00	0.52	2.59
	15	181	211.37	0.50	2.60
	40	113	120.33	0.56	2.64
	40+3	62	67.00	0.61	2.50
	40+7	105	144.18	0.72	3.35
	40+30	185	214.33	0.64	3.34
	40+94	105	120.81	0.45	2.10
PBS	7	159	195.67	0.60	3.05
	15	126	143.55	0.72	3.49
	40	233	256.40	0.77	4.22
	40+3	263	326.03	0.70	3.91
	40+7	276	310.50	0.75	4.21
	40+15	282	324.38	0.70	3.93
	40+30	239	292.10	0.69	3.79
	40+94	176	211.00	0.63	3.26
PBAT	7	149	194.05	0.58	2.91
	15	231	299.14	0.65	3.55
	40	207	234.77	0.56	2.97
	40+3	196	227.36	0.65	3.41
	40+7	147	184.00	0.52	2.59
	40+15	217	263.41	0.67	3.59
	40+30	221	284.75	0.72	3.86
	40+94	147	160.64	0.53	2.64
Mater-Bi	7	191	238.12	0.57	3.01
	15	116	133.50	0.70	3.33
	40	338	384.50	0.76	4.40
	40+3	81	97.71	0.57	2.50
	40+7	277	313.88	0.59	3.33

	40+15	273	333.06	0.65	3.66
	40+30	215	236.58	0.71	3.84
	40+94	109	117.50	0.65	3.05
Bioplast	7	138	232.60	0.53	2.61
	15	173	194.25	0.62	3.22
	40	206	220.88	0.75	3.98
	40+3	206	255.00	0.55	2.92
	40+7	228	262.14	0.61	3.31
	40+15	179	202.33	0.57	2.97
	40+30	205	233.50	0.67	3.57
	40+94	188	241.04	0.69	3.64
	7	157	200.13	0.52	2.61
PHBV	15	191	210.03	0.60	3.14
	40	266	303.12	0.60	3.37
	40+3	170	201.95	0.58	2.97
	40+7	215	239.70	0.66	3.56
	40+15	98	117.12	0.36	1.66
	40+30	107	127.65	0.39	1.83
	40+94	159	174.54	0.72	3.67
	7	155	178.16	0.44	2.24
Cellulose	15	266	349.42	0.71	3.98
	40	275	311.69	0.69	3.87
	40+3	192	243.13	0.65	3.40
	40+7	236	289.00	0.73	3.99
	40+15	195	226.54	0.61	3.20
	40+30	171	188.40	0.55	2.82
	40+94	199	223.85	0.74	3.93



# Chapitre 4

**Isolement d'une nouvelle souche  
bactérienne marine capable de  
synthétiser et de biodégrader les PHA en  
utilisant une voie métabolique originale**



© Justine Jacquin, *Alteromonas sp.* sur du PHBV



# Chapitre 4

"Anything found to be true of *E. coli* must also be true of elephants." Jacques Monod

## Préambule

Suite aux résultats de biodégradation observés sur les tiges de PHBV (voir chapitre 3), nous avons étudié les bactéries encore actives après 154 jours d'incubation. Le but de cette expérience était d'isoler une nouvelle souche capable de dégrader ce polymère et d'en étudier le génome pour mieux comprendre le processus de biodégradation du PHBV.

Ce travail a mené à l'isolement de 15 souches différentes, dont une souche identifiée comme appartenant au genre *Alteromonas* sp. qui formait un halo de dégradation sur boîte de Pétri en condition de milieu minimum + PHBV) (Fig. 31). Nous avons retenu cette souche d'*Alteromonas* sp. pour sa vitesse de croissance en milieu minimum et pour son taux de dégradation plus rapide que les autres souches. L'incubation s'est déroulée sur 40 jours, dans des tubes de 20 mL comportant 10 mL de milieu artificiel d'eau de mer. Avant l'incubation, *Alteromonas* sp. a été mis pendant 14 h en milieu minimum pour s'assurer que le PHBV était bien l'unique source de carbone durant l'incubation. La biodégradation a été caractérisée par de multiples paramètres tels que la mesure d'oxygène, la perte de poids, la production bactérienne et l'observation de la surface du polymère par des images en microscopie électronique. Ces différents paramètres, tous convergents, ont montré qu'*Alteromonas* sp. était capable d'utiliser le PHBV comme seule source de carbone et d'énergie. L'analyse de son génome nous a ensuite permis de poser de nouvelles hypothèses sur les gènes impliqués dans la biodégradation du PHBV. L'étude de son unique chromosome a permis de mettre en évidence une voie de biodégradation originale par rapport aux connaissances de la littérature.

Afin de confirmer ces premiers résultats, des incubations de la souche ont été effectuées dans du milieu minimum (imitant l'environnement marin) et ayant comme unique source de carbone du glucose ou du PHBV, afin d'en extraire l'ARN. L'analyse transcriptomique permettra de valider ou d'infirmer les hypothèses émises. Le séquençage des ARN est actuellement en cours au Génoscope (Evry, France).

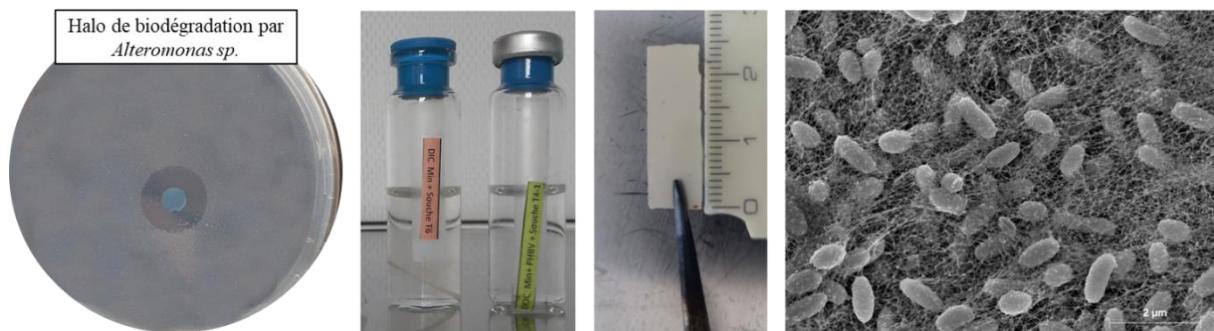


Figure 31 : Photographies représentant le halo de dégradation de la souche d'*Alteromonas* sp. lorsqu'elle est placée en milieu minimum + agar NOBRE en présence de PHBV comme seule source de carbone (à gauche), les tubes ayant permis de vérifier ses capacités de biodégradation de morceaux de PHBV (milieu gauche) d'une taille  $2 \text{ cm}^2$  (milieu droite) et de l'observation du biofilm formé par la souche d'*Alteromonas* sp. à la surface du PHBV en microscopie électronique à balayage (à droite).

# A new strain capable of synthesizing and degrading PHBV using atypical metabolic pathways

**List of authors :** Justine Jacquin<sup>1</sup>, Jingguang Cheng<sup>1</sup>, Pascal Conan<sup>1</sup>, Mireille Pujo-Pay<sup>1</sup>, Meistertzheim Anne-Leila<sup>2</sup>, Stéphane Bruzaud<sup>3</sup>, Jean-François Ghiglione<sup>1\*</sup>, Barbe Valérie<sup>4</sup>.

## Affiliations :

1. CNRS, Sorbonne Université, UMR 7621, Laboratoire d'Océanographie Microbienne, Observatoire Océanologique de Banyuls, France
2. SAS Plastic@Sea, Observatoire Océanologique de Banyuls, France
3. Institut de Recherche Dupuy de Lôme (IRDL), Université de Bretagne-Sud, UMR CNRS 6027, Rue Saint Maudé, Lorient, France
4. Génomique Métabolique, Genoscope, Institut François Jacob, CEA, CNRS, Univ Evry, Université Paris-Saclay, Evry, France

## Abstract

Plastics from petrochemicals represent a major problem, due to their low biodegradability and their accumulation in many environments. PHAs presented as biodegradable seems to be a good alternative for this issue environmental. PHBV is a PHA with strong commercial appeal for its good ability to replace conventional plastic with conventional plastic in many areas. In this study we have identified a strain belonging to *Alteromonas* sp. capable of synthesizing and degrading. This strain was isolated from a consortium of bacteria that developed on PHBV as only carbon source. Different parameters such as degradation halo on an agar plate, oxygen consumption, bacterial production, weight loss and scanning electron microscopy were performed to confirm the ability of this strain to degrade PHBV. Analysis of the complete genome of the strain revealed three external depolymerases explaining this ability to degrade PHBV. In addition, genome analysis revealed two pathways of PHA synthesis, allowing this genome to synthetize PHAsCL and PHAsMCL. Contrary to what is usually observed, here the genes involved in the biosynthesis of PHAsCL are not organized in operon. Experimental validations have to be carried out to confirm that *Alteromonas* sp. possess atypical pathways of degradation and synthesis of PHAs.

## Introduction

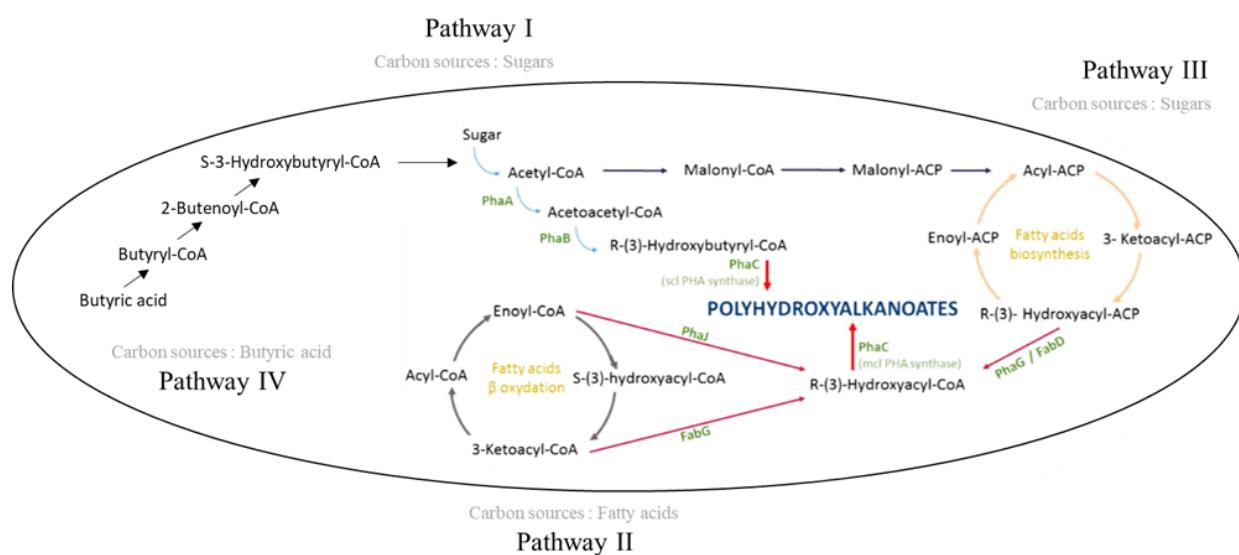
Plastic pollution has become a global problem since its impacts on the environment is causing irreversible damage to fauna and flora all over the world (Jambeck *et al.* 2015). Once introduced in the marine environment, the plastics are rapidly colonized by microorganisms in marine microorganisms (Oberbeckmann *et al.* 2015). Bacterial colonizers form a biofilm which will modify and weaken the surface of the polymer (Donlan 2002). This bacterial biofilm is often dominated by Proteobacteria and more particularly by Alphaproteobacteria (such as Rhodobacteraceae) and Gammaproteobacteria (such as the Alteromonadaceae) (Amaral-Zettler *et al.* 2020).

Conventional plastics derived from petrochemicals are generally categorized as non-biodegradable and accumulate in the oceans. Some bio-based plastics have been developed for their ability to degrade under the action of microorganisms, such as polyhydroxyalkanoates (PHA) (Eubeler *et al.* 2009). PHAs have been shown to be biodegradable in many ecosystems like soils, marine, compost and sewage sludge (Eubeler *et al.* 2009).

PHAs are polyesters synthesized by a wide range of microorganisms (bacteria and fungi) from various renewable carbon sources (sugar, acids, vegetable oils)(Peña *et al.* 2014; Ali and Jamil 2016; Tebaldi *et al.* 2019). PHAs are stored into the cytoplasm in granules proposed to be called “carbonosomes” by Mezzolla *et al.* (Mezzolla *et al.* 2018). The polymers are a form of reserve molecules allowing microorganisms to grow in environment with limited essential nutrients (including nitrogen, magnesium, phosphorus or oxygen) but with a surplus of carbon supply (Martinez Tobon 2019).

PHA can be classified into four groups (Sagong *et al.*, 2018): PHA-SCL having a short side chain (between 3 and 5 carbons), PHA-MCL medium side chain (between 6 and 14 carbons), PHA-LCL long side chain (more than 14 Carbon) and PHAscl-mcl having a mixed length of PHA chains (short and medium). The nature of the group associated with the side chain is directly linked to carbon substrates (glucose, fructose, cellulose, acids and fatty acids, etc.) in which the microorganism evolves and to the nature of the enzyme(s) involved in the last step of the PHA synthesis: the PHA synthase(s) (Meng *et al.* 2014).

A total of 14 metabolic pathways have been described in the literature, pathways I to IV (Path I to Path IV) being original metabolic pathways and the others obtained in the laboratory using recombinant organisms (Path V to Path XIV) (Meng *et al.* 2014). The pathway used depends on the type of the last enzyme in the reaction, the PHA synthase (PhaC), and the nature of the carbon source. Path I allows the production of PHA through the condensation of two acetyl-CoA obtained after the glycolysis cycle, catalyzed by Acetyl-CoA acetyltransferase (PhaA)(Fig1). Then Acetoacetyl-CoA reductase (PhaB) reduces the Acetoacetyl-CoA to R-3 hydroxybutyryl-CoA which is converted to PHB (polyhydroxybutyrate) by PhaC. Path II uses the  $\beta$ -oxidation cycle and needs to produce 3-hydroxyacyl-CoA from 2,3-dehydroacyl-CoA, 3-hydroxyacyl-CoA or 3-ketoacyl-CoA, catalyzed by Enoyl-CoA hydratase, hydroxyacyl-CoA epimerase or Ketoacyl-CoA reductase respectively. Then the 3-hydroxyacyl-CoA is transformed into PHA thanks to the PhaC. Pathway III begins by converting 3-hydroxyacyl-Acyl (ACP: acyl carrier protein) from the fatty acid synthesis cycle into 3-hydroxyacyl, catalyzed by 3-hydroxyacyl-ACP-CoA transferase. Then this molecule is converted into PHA, thanks to PhaC (Sudesh *et al.* 2000; Tsuyoshi and Tetsuya 2006; Verlinden *et al.* 2007). The IV pathway allows the synthesis of PHA from butyric acid to S-hydroxyacyl-CoA, then to acetoacetyl-CoA, without going through the  $\beta$ -oxidation cycle (Meng *et al.* 2014).



**Figure 1 :** Description of the three metabolic pathways of the PHA synthase (modified from Tatiana et al., 2019). PhaA: Acetyl-CoA acetyltransferase, PhaB: Acetoacetyl-CoA reductase, PhaC: Pha synthase, PhaJ: enoyl-coenzyme A hydratase, FabD: malonyl-CoA-ACP transacylase, FabG: ketoacyl-ACP, PhaG: 3-hydroxydecanoyl-ACP- CoA transacylase

In recent years, PHA has developed and presents an increasing commercial and industrial interest as a biodegradable substitute for conventional plastics derived from petrochemicals. One of the most commonly used PHAs for plastic production is polyhydroxybutyrate (PHB, which has methyl as the alkyl group (R) ( $[CO-CH_2-CHCH_3-O]$  n)). PHB is considered to be hydrophobic, having low permeability, little deformability and considered to be biodegradable (Mothes *et al.* 2004; Chang *et al.* 2012). Unfortunately, this polymer is not very deformable due to its high crystallinity (Gorke *et al.* 2007). PHB has a high melting point close to its thermal degradation temperature (Reis *et al.* 2003), it is for this reason that a co-polymer, poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV), is commonly used to reduce the melting point of PHB. The PHBV is a mix of short and medium side chain (PHA-scl-MCL) and can be synthetized by many species of microorganisms (Wang *et al.* 2013; Tebaldi *et al.* 2019).

The PHAs are degraded by many microorganisms in the marine environment (Jacquin *et al.* 2019). This degradation is enabled by a key enzyme called depolymerase, PhaZ (Jendrossek and Handrick 2002; Jendrossek 2005). Two principal types of PhaZ (intracellular (i-PhaZ) and extracellular (e-PhaZ) were identified in different microorganisms (Jendrossek 2007). The i-PhaZ is able to degrade the native PHA granules (nPHA), composed by scl and/or mcl chains. These PHAs are generally amorphous polymers which are higher elasticity and flexibility as compared to crystalline PHA polymers. In contrast, the excreted depolymerase (e-PhaZ) degrades the extracellular amorphous or crystallin PHAs (called denatured (dPHA)) (Jendrossek and Handrick 2002). A peculiarity was highlighted for *Rhodospirillum rubrum* in which a periplasmic depolymerase has been identified (Handrick *et al.* 2004).

The PHA depolymerases are carboxylesterases belonging to the  $\alpha / \beta$  hydrolase family members (Jendrossek and Handrick 2002). The comparison between several depolymerase reveals a catalytic triad (serine - histidine - aspartic acid) present in the vast majority of PHA depolymerases. The catalytic serine site belongs to a lipase box (GxSxG sequence) (Jendrossek and Handrick 2002). The catalytic domain can be divided into two groups depending on the location of the lipase box, relative to the oxyanion hole also belonging to the catalytic domain. If the oxyanion hole is located at the N-terminal of the lipase box, then the catalytic domain is type 1, if it is located at C-ter of the lipase box then the type 2 catalytic domain. the catalytic triad is not found in all intracellular PHA depolymerases. In this case, these native

depolymerase SCL have a catalytic triad consisting of cysteine, histidine and aspartic acid (Handrick *et al.* 2000).

This study aims to characterize the biodegradation of PHBV by the selected strain and to better understand the biodegradation process by studying its genome. The study of its complete genome makes it possible to identify the genes involved in the metabolism of PHA (synthesis and degradation). These results may allow a better understanding of the use of PHBV by the strain and of its industrial potential.

## Materials and Methods

### 1. Selection and identification of the bacterial strain

The bacterial strain was isolated in this study during experiments showing the biodegradation of PHBV by marine microbial communities (Jacquin *et al.*, *submitted*). Briefly, after leaving pieces of PHBV for 40 days in an open circuit aquarium with direct circulation to seawater from the bay of Banyuls-sur-mer (42°29'300 N – 03°08'700 E, NW Mediterranean sea), the fragments of PHBV together with mature biofilm were transferred into an artificial medium for 94 days. Biodegradation being observed at the end of the experiment, the consortium resulting from the biofilm formed on the pieces of PHBV was detached. Cell detachment was using 3 cycles of sonication bath during 3 min (deltasonic, France) followed by 3 min of vortexing at maximum speed (Skyline, Elmi Ltd, Russia). To isolate the bacterial clones, successive dilutions were carried out ( $10^7$  to  $10^2$  cells/mL) and 100 µL of each dilution was spread on Marine Agar. The dishes were stored at 18°C for 3 days. The resulting colonies were picked and resuspended into 10 mL of Marine Broth. A part of culture strain (100µL) was loaded onto an artificial seawater medium with noble agar and molten PHBV as sole carbon source. The plates were incubated 10 days at 18 °C. The clones having the ability to use PHBV as carbon source, characterized by the presence of degradation halo, were all isolated as previously described (Rodriguez *et al.* 2010). The strain with the largest halo was selected for this study (Fig S1). This strain, named “strain of interest” was cultured in Marine Broth for 24 h at 18 °C and stored at -80 °C in glycerol (30%).

## 2. Culture of the strain

A preculture of the strain of interest in 15 mL of Marine Broth was transferred to 200 mL of fresh artificial seawater medium (ASM) supplemented with 10 mM glucose. The composition of this artificial medium was modified from Fegatella (Fegatella *et al.* 1998) : NaCl, 420 mM ; Tris, 50 mM ; Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 28.8 mM; KCl, 9.39 mM ; NaBr, 0.84 mM ; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0.485 mM ; MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.546 mM ; CaCl<sub>2</sub>, 0.105 mM ; NH<sub>4</sub>Cl 9.35 mM ; SrCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.0638 mM ; NaF, 0.0714 mM ; NaNO<sub>3</sub>, 0.88 mM ; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 0.036 mM ; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.106 mM ; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0.04 µM ; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.08 µM ; CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.04 µM; MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0.9 µM ; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.03 µM ; FeCl<sub>3</sub> 1.85 µM ; thiamine, 0.3 µM ; biotin, 2.1 nM ; and B12 vitamin, 0.317 nM (Fegatella *et al.*, 1998).

After 72 h culture in this artificial sea water medium at 18 °C with 2 mM of glucose, cells were centrifuged during 10 min at a relative force of 7500 rpm and resuspended in 1 000mL of artificial seawater minimum medium for 14 hours without any source of carbon. The inoculum was then diluted in ASM until a concentration of 10<sup>7</sup> bacteria. mL<sup>-1</sup>. Four culture conditions were carried out for this study containing 10 mL of artificial medium supplemented or not with a fragment of PHBV, and in presence or not of the strain (at a final concentration of 10<sup>7</sup> cell.mL<sup>-1</sup>). The PHBV fragments of around 1cm<sup>2</sup> were previously washed using ethanol 70% over 48 hours then sterilized by UV during 15 minutes. Tubes containing only artificial seawater medium with or without glucose, PHBV or strain only were used as negative controls. The culture of all the samples was performed in 20 mL tubes (Serum flask, Dutscher) closed with a Butyl stopper and a capsule (Dutscher). Six times (D0, D5, D11, D16, D32 and D40 ) were chosen for the experiment corresponding to the start, 5, 11, 16, 32 and 40 days of incubation respectively.. During the entire incubation period the nutrients (PO<sub>4</sub>, NO<sub>2</sub> and NO<sub>3</sub>) were measured to ensure that they were not in limiting conditions (Table S1).

### 3. Oxygen measurements

Throughout the experiment, oxygen monitoring was carried out on 4 samples. There were 2 negative controls, one containing the artificial medium alone, and the other the artificial medium with the PHBV, and two samples, one containing the artificial medium with the strain and the other containing the artificial medium, with the PHBV and the strain.

The 4 tubes were fitted with an oxygen sensor (Presens, SP-PSt3-YAU) and a luminescent optical fiber. The measurement was carried out by a Fiber Optic Oxygen Meter box (Fibox 4, Presens). Oxygen was recorded every hour during the 40 days of incubation in an artificial environment. To avoid having anoxic incubation conditions, the tubes containing the PHBV with the strain were flushed with air filtered at 0.2 µm under a laminar flow hood on days 5,11,16 and 24. The concentration in oxygen has always been maintained above 50 µM. Bacterial oxygen demand (BOD) was calculated by taking oxygen consumption as a function of time.

### 4. Bacterial production

Bacterial production (BP) was measured in triplicate at each sampling time for all sample (PHBV, supernantant of PHBV, PHBV + strain, Supernatant of PHBV+strain and the negative control artificial sea water). H-leucine incorporation into proteins was measured, using a modified protocol from Van Wambeke *et al.* (Wambeke *et al.* 2009). Briefly, the cell detachment pre-treatment was applied for PHBV+strain, using 3 cycles of sonication bath during 3 min (deltasonic, France) followed by vortexing at maximum speed for 3 min (Skyline, Elmi Ltd, Russia) in order to improve the BP signal (Dussud *et al.* 2018). Immediately after cell-detachment,  $^{3}\text{H}$ -leucine (specific activity 123.8 Ci mmol $^{-1}$ ; Perkin Elmer) was added for each sample, which consisted of 1.5 mL of sterilized seawater containing the piece of plastic together with the detached cells. Final leucine concentrations were 150 nmol L $^{-1}$  ( $^{3}\text{H}$ -leucine at 1 nmol L $^{-1}$ ). The samples containing a piece of PHBV with or without strain, the supernatant of both conditions and the negative control were treated in triplicate and incubated in the dark at *in situ* temperature for 3 h. We used the empirical conversion factor of 1.55 ng C pmol $^{-1}$  of incorporated leucine to calculate BP (Simon and Azam 1989).. The exact surface area of the plastic was calculated with image J software (Abràmoff *et al.* 2004) and the results are reported in ng C.m $^{-2}$ . h $^{-1}$ .

## 5. Scanning electron microscopy

At each point of the experiment, one sample containing PHBV with the strain or not (control) were fixed in solution A (0.4M Na Cacodylate buffer; 3% of Glutaraldehyde; Qsp artificial medium) and stored at 4°C until analysis under an electron microscope. Before analysis, the samples were washed three times for 15 minutes with solution B (Sodium Cacodylate buffer, 0.4 M diluted to 0.2 M in artificial medium) in order to remove all traces of glutaraldehyde. Then the samples were fixed with osmium tetroxide (OsO<sub>4</sub>) at 1%, for one hour at room temperature. Progressive dehydration in ethanol baths (70%, 95% and 100%) was applied during 30 minutes for each bath. Samples were immersed in 100% ethanol in a critical point desiccator tank (Balzers), and liquid CO<sub>2</sub> was then gradually introduced to replace ethanol. Samples were then heated and pressurized to allow the CO<sub>2</sub> to pass to the gaseous state bypassing its critical point (Temperature = 31.1 °C; P = 73.8 bars) and to avoid surface tensions and deformation. The CO<sub>2</sub> gas was then removed, and dry samples were collected. After dehydration, a thin conductive layer of Au-Pd (about 10nm thick) was deposited by sputtering on the surface of the samples to allow electron microscope observation (Hitachi SEM FEG S-4500 high vacuum).

## 6. Weight lost

A total of 8 plastics were sterile weighed on the precision balance (Precisa 125 A, Swiss quality) prior to incubation. Four of them were incubated in artificial seawater medium containing the strain of interest and the rest without the strain. The incubations were maintained until the end of the experiment (T40). At the final stage, the 8 plastics were rinsed with distilled water and stored at -20 °C for 48 hours. In order to remove any presence of the artificial medium, a step of drying in a freeze-dryer was performed. Finally, the plastics were weighed using the same precision balance. The results are expressed in mg and the weight loss is expressed as a percentage.

## 7. DNA extraction, sequencing, assembly and annotation of the genome of the strain of interest

Genomic DNA was obtained after a pure culture of the strain of interest incubated in marine broth at 18 ° C for 48 hours. The culture was centrifuged at 7000 rpm for 10 minutes. DNA extraction was performed using a classical phenol-chloroform method for seawater samples (Sauret *et al.* 2016) with slight modification. Briefly, we used the enzymatic and chemical cell lysis (incubation with 1 mg.mL<sup>-1</sup> lysozyme at 37°C for 45 min followed by 1 h at 50°C with 0.2 mg.mL<sup>-1</sup> proteinase K and 1% SDS) before the DNA extraction with phenol and purification with chloroform. All the steps were carried out carefully, without vortexing, with very gentle shaking by inverting the tube to reduce DNA fragmentation. DNA was quantified by spectrophotometry (Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay Kit, Invitrogen).

The sequencing strategy to obtain the complete sequence of the interest strain was based on the complementarity of two methods mixing short (Illumina, [www.illumina.com](http://www.illumina.com)) and long reads (Oxford Nanopore Technologies, <https://nanoporetech.com/>). Short reads allow obtaining quality consensus generated after assembly while long reads provide scaffold on which short reads are anchored.

To prepare Illumina library, 100 ng of genomic DNA was fragmented to an average size of 500-600 bp using a Covaris E220. The ends of the DNA fragments were repaired, dATP was added and the adapters (NEXTflex HT Barcodes) were ligated using the NEBNext DNA modules. After being purified twice consecutively with AMPure XP (1 volume), the DNA fragments were amplified by PCR (12 cycles) with the Kapa Hifi Hotstart NGS library amplification kit, and then purified again with AMPure XP (0.7 volume). After being quantified by qPCR, the library was sequenced on a MiSeq device in “paired end” (2x250bp). A total of 1,551,185 (466 Mb) read pairs were obtained and used for assembly.

To complete this data set, a first Nanopore library was prepared from 825ng of genomic DNA according to the “Genomic DNA by Ligation” protocol (SQK-LSK109) recommended by Oxford Nanopore. This library was loaded on a Flongle R9.4.1 flowcell leading to 76,547 sequences (126 Mb) with an N50 of 10,801bp. To improve these data, a second library was prepared according to the same protocol from 700ng of genomic DNA and loaded on a MinION R9.4.1 flowcell, leading to 641,816 sequences (1.130Gb) with an N50 of 14,665bp.

Unicycler software v.0.4.6 (Wick *et al.* 2017) was run using default options with all 3 datasets. The final hybrid assembly resulted in a circular molecule of 5.33 Mb length and with an average

GC content of 48.79%. The automatic annotation was performed via the MicroScope platform (<https://mage.genoscope.cns.fr/microscope/home/index.php>).

## 8. Phylogenetic study and classification

Before establishing the phylogenetic tree, all the 16S rDNA sequences obtained after assembly were compared with each other to verify that there were completely identical. Then this sequence was used to perform a nucleotide blast to NCBI with the nt database (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). All the results with percentage identity greater 97% were kept and the sequences of the selected matches were extracted to create a database. In addition, the 16S rDNA sequence of *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* ATCC 49840 has been added to the database due to this genus has been identified already on PHBV and hydrophobic organic compounds (Grimaud *et al.* 2012; Kong *et al.* 2018). Finally, a total of 17 strains (all belonging to Alteromonadaceae family) composed the database and the neighbor-joining method with the MEGA7 software (Kumar *et al.* 2008) was used to produce a phylogenetic tree.

## 9. Genome analysis

Genome of the strain of interest has been studied using the MicroScope annotation and analysis platform (<https://mage.genoscope.cns.fr/microscope/home/index.php>). To identify the coding sequences (CDS) possibly having depolymerase function, the protein sequences of all the CDS were extracted. A protein comparison using blastp (with parameters: evalue 1.0, word\_size 5 and threshold 10 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279684/>)) was performed comparing the MicroScope data and the DED database (Knoll *et al.* 2009, <http://www.ded.uni-stuttgart.de/>). Knoll and its collaborators built a PHA depolymerase database using the DWARF system (an automated retrieval tool that extracts various sequence information, such as structure or function). First, this database was constructed from 28 seed sequences, with laboratory-validated depolymerase activity. In addition to this 28 protein sequences, other sequences annotated as PHA depolymerase in GenBank came to complete the database. Currently the DED database contains 587 sequences of 8 super families of PHA depolymerases and 38 homologous families. Sequences with more than 98% identity from the

same source organism have been assigned to a single protein. A summarize of this database is presented in Sup Table 1 (Table S2).

## Results and discussion

### Criteria for assessing biodegradation

The strain of this study was selected by its capacity to degrade PHBV. Indeed, after culture of this strain on Marine Broth and deposited on an artificial seawater medium with noble agar and molten PHBV as carbon source, a degradation halo was observed (Fig S1). Different parameters were monitoring to validate or invalidate this degradation.

#### 1. Oxygen consumption

A total of 4 tubes containing artificial seawater medium only (ASM), complemented with strain (ASM-str) or PHBV (ASM-PHBV), or with the both (ASM-str-PHBV), are monitored throughout the experiment (Fig 2). The evolution of the dissolved oxygen concentration in the ASM tube is considered as an experiment blank and the small drift measured was subtracted from the other 3 tubes. Indeed, the oxygen consumption is estimated as the difference between oxygen concentration in the sample and this blank :

$$\Delta O_2 (\mu\text{molO}_2 \cdot L^{-1} \cdot d^{-1}) = \text{Conc } O_2 \text{ ech} - \text{Conc } O_2 \text{ ASM}$$

Throughout the experiment, oxygen consumption in the ASM-PHBV tube was negligible, with the slope of  $-0.09 \mu\text{molO}_2 \cdot L^{-1} \cdot d^{-1}$  not significantly different from 0 ( $p < 0.05$ ). For the tube ASM-str, a weak but significant oxygen consumption is observed ( $-0.22 \mu\text{molO}_2 \cdot L^{-1} \cdot d^{-1}$ ) probably due to the use of remaining carbon source from the inoculum or reserves of the microorganism.

On the other hand, the tube containing the strain and the PHBV (Fig 2) showed very rapid and strong daily oxygen consumption. At the beginning of the experiment, the consumption was close to  $-40 \mu\text{molO}_2 \cdot L^{-1} \cdot d^{-1}$ . To prevent the environment from becoming anoxic, oxygen was added in the form of sterile filtered air on days 5, 10 and 18. Between each of these additions, daily oxygen consumption was relatively constant and high and varies between 13.21 and  $38.54 \mu\text{molO}_2 \cdot L^{-1} \cdot d^{-1}$ . A slowing of this consumption was observed from day 25, and then remained stable until the end of the experiment ( $\sim -13.21 \mu\text{molO}_2 \cdot L^{-1} \cdot d^{-1}$ ).

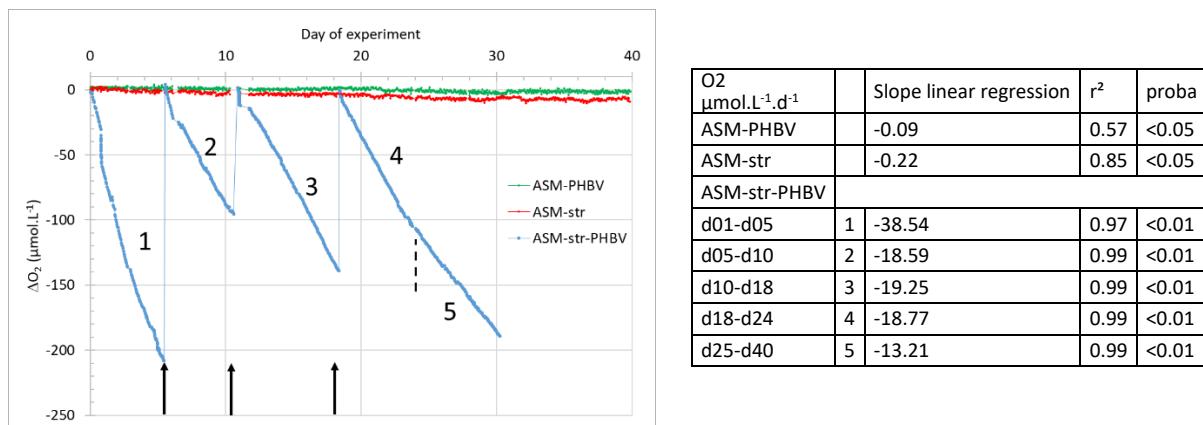


Figure 2: Evolution of dissolved oxygen concentration during incubation time (in day) expressed as  $\mu\text{mol O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$ . The black arrows on the x-axis indicate when the tubes were flushed with sterile filtered air to prevent anoxia. This flushing allows distinguishing 5 different period to estimate an oxygen consumption (1 to 5 on the graph). The table indicated the slope, the regression coefficient and the probability of the linear regressions

## 2. Strain bacterial activity

The initial inoculum which made it possible to inoculate all the conditions of the experiment had a heterotrophic bacterial activity (BP) of 3686.26 ngC / L / h (SD: 243) (Fig. 3 A, ASM-str).

The strain which was incubated without the PHBV, had an activity after 5 days in minimum medium of 753.46 ng C / L / h, which drops to 109.24 ng C / L / h after 40 days (Fig. 3 A). This result is consistent with the oxygen observation, which does not show significant activity of the strain without a source of PHBV.

The activity of the strain attached to the piece of PHBV increase of 66% during the first 11 days of incubation, reaching the peak of activity at 171843 ng C / m<sup>2</sup> / h (Fig. 3B). Then the activity decreased during the last 29 days of incubation to reach 28738 ngC / m<sup>2</sup> / h (SD: 507) after 40 days (Fig. 3 B). The negative control (ASM-PHBV) remained at an activity of 0 ngC / m<sup>2</sup> / hr (Fig. 3B, ASM- PHBV).

The bacterial heterotrophic activity in the supernatant of the tube containing the PHBV with the strain (ASM-str-supernatant-PHBV) was also monitored throughout the incubation period, this revealed that the activity was also important in the supernatant (up to 48,829 ng C / L / h) (Fig. 3 A). This activity decreased after 5 days of incubation but remained above 11012 ng C / L / h throughout the incubation.

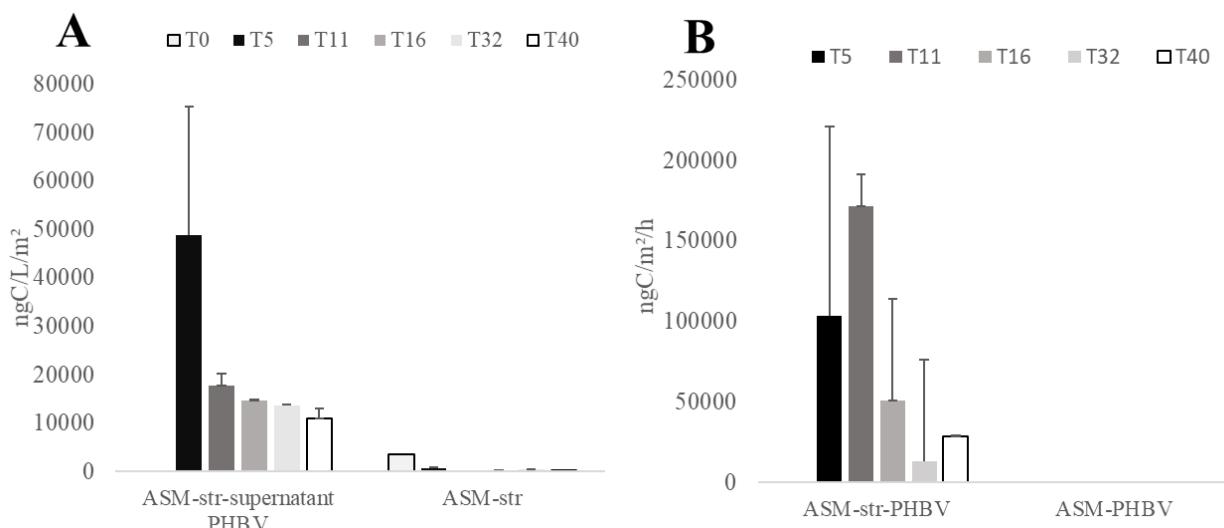


Figure 3: Bacterial production of the strain during the incubation in artificial sea water (ASM) for : **A)** the negative control ASM-str and the supernatant of sample ASM-str-PHBV expressed in  $\text{ng C. L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ . **B)** the sample ASM-str-PHBV and negative control ASM-PHBV expressed in  $\text{ng C. m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ . The sampling point were the start of incubation D0, after 5 days (D5), after 11 days (D11), after 16 days (D16), after 32 days (D32) and after 40 days (D40).

### 3. Weight loss

To evaluate the quantity of polymer consumed during the experiment, 8 fragments of PHBV were weighed on a precision balance at the start (D0) and at the end of the experiment (D40). Four of these fragments were incubated in artificial seawater medium with the strain (ASM-str-PHBV), the rest only in artificial seawater medium (ASM-PHBV). The polymers of the samples ASM-PHBV had an average increase in weight of 0.5% (0.32 mg (SD 0.83)). In contrast, we observed a significant weight loss of ~14.6% (9.17 mg on average (SD 2.01)) after 40 days of incubation for the PHBV fragments in presence of the strain (ASM-str-PHBV samples).

#### 4. Scanning electron microscopy image

The strain colonized rapidly and homogeneously the polymer and covered the entire surface after 5 days of incubation (Fig. 4). SEM image at D5 and D40 show the formation of a biofilm with the appearance of structures such as extracellular matrix or exopolysaccharides (EPS). At D5 and D40, the structure of the PHBV fragments reveals cracks and a surface modified compared to the D0. The structures of the polymer surface observed at D40 are called Spherulite. This crystal structure in a sphere form is distributed over the entire surface of the polymer and can be associated with its biodegradation. The vision of the spherulitis indicates that the amorphous part of the PHBV is no longer present and has therefore been degraded by the bacterial strain. The PHBV fragment having spent 40 days in an artificial medium without the strain, had no visible change under the microscope compared to the D0 (data not shown).

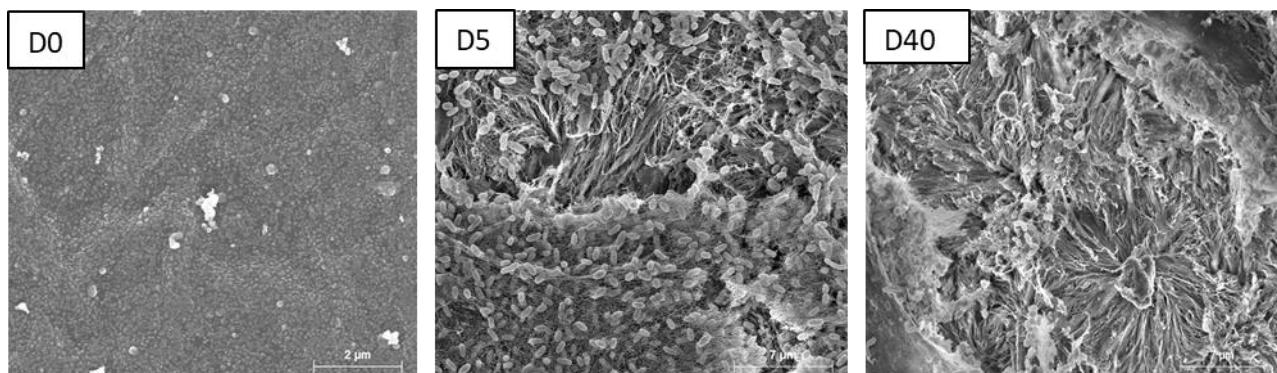


Figure 4 : Scanning microscopy images of PHBV at the start of the experiment (D0) and after 5 days (D5) or 40 days (D40) of culture with the strain in the artificial medium. Spherulitis is observed on the PHBV after 40 days of incubation.

#### 5. Genomic study of the strain of interest

After genomic DNA sequencing of the strain of interest and data assembly, an automatic annotation of the genome was carried out using the Microscope platform. The ribosomal RNA sequence was then used to establish the affiliation of this strain.

### Classification of the strain of interest

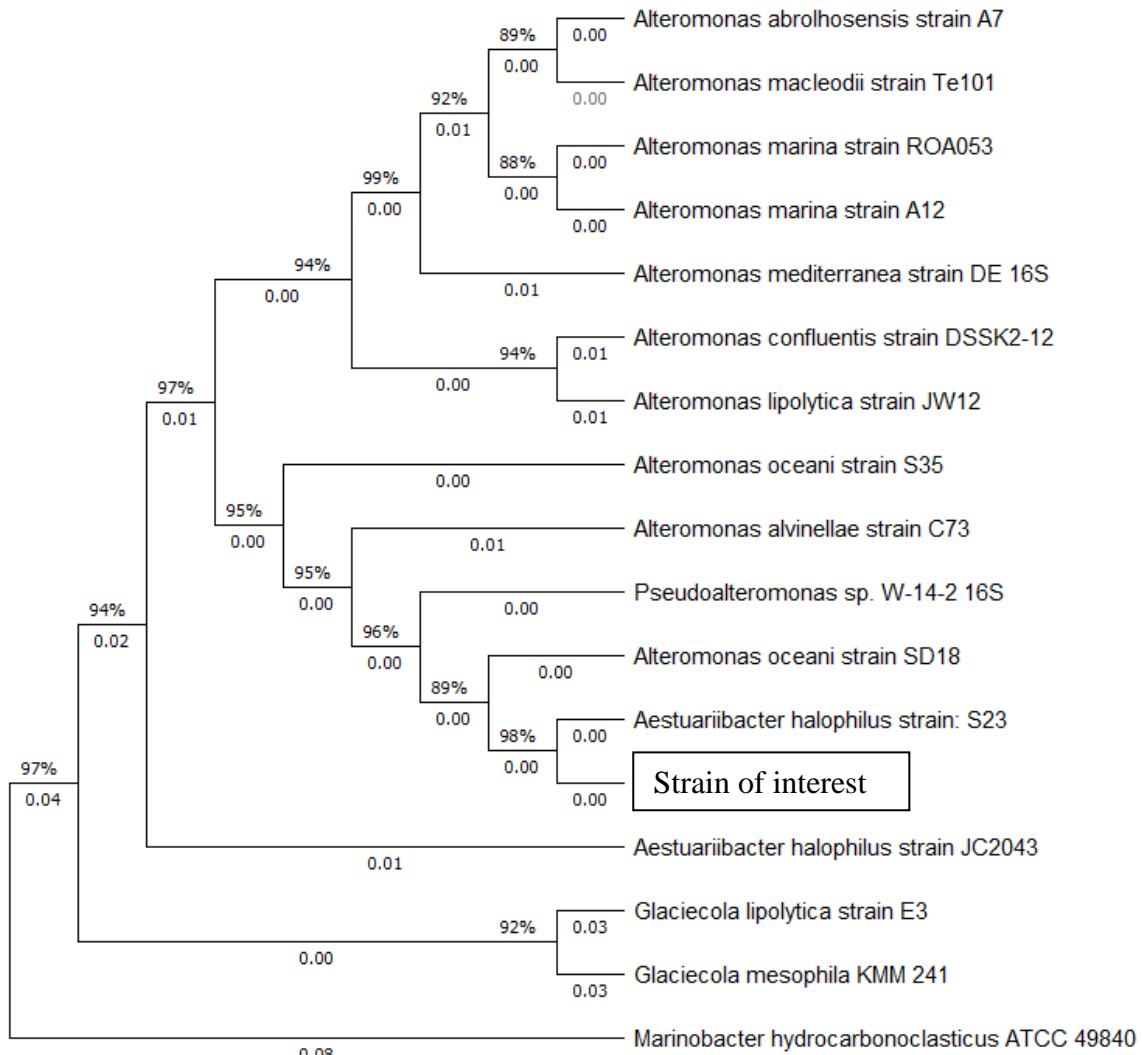


Figure 5: 16S rRNA phylogenetic tree comparing different taxa to our strain of interest. The phylogenetic tree was built by the neighbor-joining method with the MEGA7 software.

As shown in Fig. 5, the strain of interest appeared to be close related to the *Aestuariibacter halophilus* S23, strain isolated from sediments originating in Korea (Yi et al., 2004). S23 was identified as a halophilic and aerobic strain belonging to the Alteromonadaceae family. Other strains isolated on PHBH (Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyhexanoate) films after incubation for 1 month in the port of Takasago in Japan, were also found to be close to *Aestuariibacter halophilus* S23 (Moroshi et al., 2018). On the phylogenetic tree, *Aestuariibacter halophilus* strain JC2043 formed a distinct monophyletic clade within the family Alteromonadaceae and clustered distantly with the genera *Alteromonas* and *Glaciecola*. In contrast, *Aestuariibacter halophilus* S23 is clustered with several strains of *Alteromonas* sp. genus, suggesting a probable affiliation error for *A. halophilus* S23. Therefore, based on this

tree, it might be conceivable that the strain of interest is an *Alteromonas*. This strain will be named here after: *Alteromonas* sp.

### 5.1. General features

The genome of *Alteromonas* sp. consisted in a circular chromosome of 5,332,999bp with a GC content of 48.8%. All the information is summarized in Fig 6, Table 1 and Supplementary Table 4.

Table 1: General features of the *Alteromonas* sp. genome

Attribute	Values
Genome size (bp)	5,332,999
DNA G+C (%)	48.8
Plasmid	0
DNA scaffolds	1
rRNA genes	12
tRNA genes	58
tmRNA	1
misc_RNA	34
Protein	4810
Predicted genes	4805
Pseudo genes	8

Automatic annotation revealed that the chromosome contains 4805 coding sequences (CDS) (including 8 pseudogenes) with an average size of 994 bp. The coding density was 89.34% and the repetition rate estimated at nearly 3%. This strain had a larger genome and a higher GC percent compared to the majority of the sequences of other *Alteromonas* and *Pseudoalteromonas* species available in the Microscope platform (Table S3). Only *Alteromonas* sp. 190 had comparable genome size and a GC percent. *Alteromonas* sp. shared 3802 CDSs in synteny with *Alteromonas* sp. 190 have (data not shown). Fifty-eight tRNAs, representing 21 amino acids including 20 standards, have been identified in the genome (Table 1). It can be noted that there was a bias in coding usage since the tRNAs Alanine, Arginine, Leucine, Methionine, and Serine that were on average more present in the genome compared

to those carrying the amino acids Tryptophan, Tyrosine, Aspartate, Cysteine, Phenylalanine Threonine and Histidine (Table S4). Four ribosomal RNA clusters have been identified with the same order: 16S, 23S and 5S. However, three of them had an Ala tRNA and an Ile tRNA between 16S and 23S. Two of the clusters were on the forward strand and two on the reverse strand. The automatic annotation also revealed the presence of 34 micRNAs and one tmRNA.

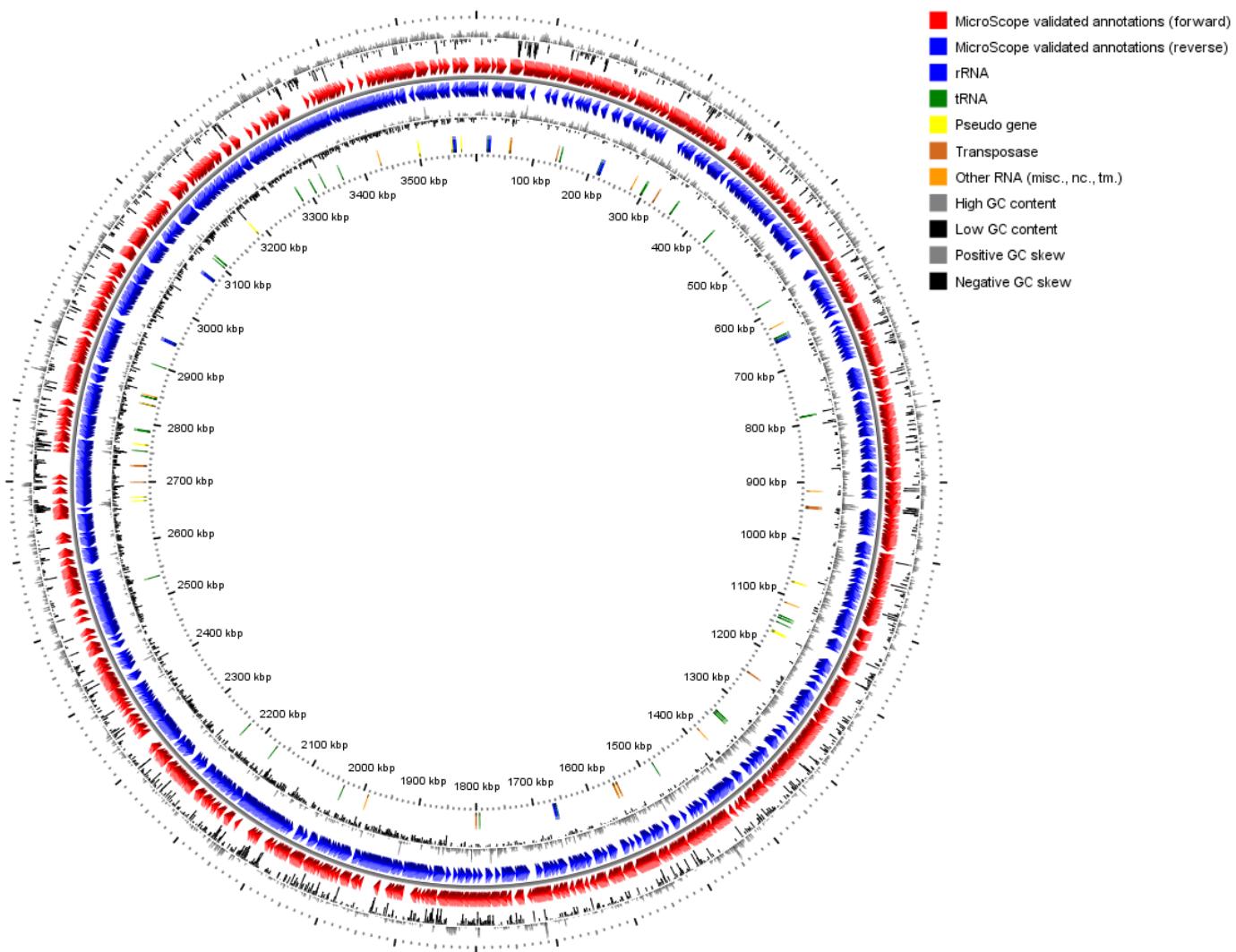


Figure 6: Circular map of *Alteromonas* sp. genome.

## 5.2. PHBV degradation

*Alteromonas* sp. was selected in a culture in minimum medium containing only PHBV as a carbon source. Thereby the expert annotation was focused on the research of genes involved in the PHBV degradation. To do this, the protein sequences of the 4805 CDS present in the genome were downloaded from the annotation platform and compared with all the protein sequences from the DED database.

After protein comparison, analyzes revealed a significant match with items from the DED database for 4 CDSs (ALSP\_3471, ALSP\_2202, ALSP\_2657 and ALSP\_0697) with an e-value from 4e-34 to 0.0 and a percentage identity / positivity ranging from 34% / 47% to 77% / 89% for ALSP\_0697 and ALSP\_3471 respectively (Table 2). Among these proteins, 3 of them (ALSP\_2202, ALSP\_2657 and ALSP\_0697) were identified as external depolymerase and one (ALSP\_3471) as internal.

	Prot lenght	Match length	ID	POS	Gap	eval	Type	Ref (database)	Organism
ALSP_3471	408	403	77%	89%	0	0.0	i-nPHAscl (no lipase box)	gi 14770856	Glaciecola sp. HTCC2999
ALSP_2202	353	332	54%	71%	1%	e-110	e-dPHAscl (catalytic domain type 2)	gi 88774001	Alteromonas mediterranea
ALSP_2657	635	628	62%	75%	1%	0.0	e-dPHAscl (catalytic domain type 1)	gi 1777951	Alcaligenes faecalis
ALSP_0697	339	287	34%	47%	8%	4e-34	e-dPHAscl (catalytic domain type 1)	gi 115367245	Stigmatella aurantiaca DW4/3-1

Table 2 : Results of the best matches between all proteins of *Alteromonas* sp. versus DED database. (Knoll et al. 2009)

The automatic annotations of these CDSs were, Poly (3-hydroxybutyrate) depolymerase (ALSP\_3471), Polyhydroxybutyrate depolymerase (ALSP\_2202), Esterase (ALSP\_2657) and putative Feruloyl esterase (ALSP\_0697). The presence in the genome of *Alteromonas* sp. of the CDSs ALSP\_2202, ALSP\_2657 and ALSP\_0697, identified as extracellular denatured depolymerases (e-dPhaZ) specific for short chains (SCL), allowed confirming that this strain can use PHBV as only carbon source.

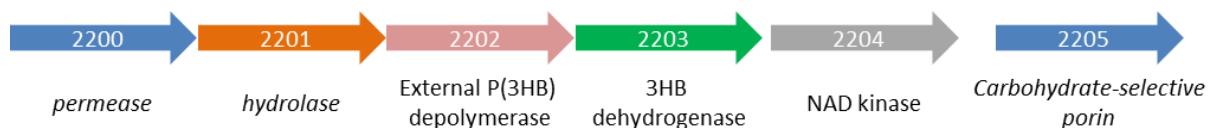


Figure 7 : Schematic representation of gene cluster involved in PHA extracellular degradation

The analysis of the CDSs ALSP\_2657 and ALSP\_0697, identified as e-dPhaZ with a type 1 catalytic domain, revealed a signal peptide for both proteins confirming that they are surely excreted. In addition, the dbSCAN method indicates for the two CDS that they belong to the CE1 CAZy family, a family containing many esterases such as PHB depolymerase. In view of all these elements, the annotation of ALSP\_2657 and ALSP\_0697 has been modified to "extracellular Poly (3-hydroxybutyrate) depolymerase", in the Microscope platform. The genomic context analysis of these proteins did not reveal any other CDSs potentially involved in the degradation process. In contrast, the external depolymerase ALSP\_2002 with a type 2 catalytic site is located in a region of the genome grouping several genes (from ALSP\_2200 to ALSP\_2205) may be involved in the external degradation of PHBV (Fig. 7). First of all, the analysis of ALSP\_2201 indicated that this CDS is addressed to the membrane (presence of a peptide signal). Based on the TMhmm results, this secreted protein anchors to the membrane with most of the molecule located outside (from aa 28 to the CT). The presence of  $\alpha$  /  $\beta$  hydrolase domain on this part suggests that the hydrolase activity of this CDS acts outside of the cell. This protein has also potentially an acyltransferase activity. In this region, two permeases (ALSP\_2200 and ALSP\_2205) including a porin potentially selective for carbohydrates (ALSP\_2205) were pinpointed. Finally, the presence of a 3-Hydroxybutyrate dehydrogenase (which works with NAD<sup>+</sup>) and NAD<sup>+</sup> kinase (involved in the regeneration of NAD<sup>+</sup>) (ALSP\_2203 and ALSP\_2204 respectively) complete this region. Although ALSP\_2202 was identified by comparison with the depolymerase database as an e-dPhaZscl, no peptide signal was detected in this protein, suggesting that it is not excreted. Note that the CDSs ALSP\_2200 through ALSP\_2203 are probably in operon with a phase change for the last protein (data not shown). The scenario that we can therefore propose is that the hydrolase (ALSP\_2201) is involved in the first stage of degradation of PHBV. This enzyme being secreted acts in the extracellular matrix. The oligomers thus generated are then internalized via the permeases (ALSP\_2200 and ALSP\_2205) and degraded *via* the PHB depolymerase (ALSP\_2202) into monomers. These monomers then enter the  $\beta$ -oxidation cycle via PHB dehydrogenase (ALSP\_2203)(Mezzolla *et al.* 2018) (Fig. 8).

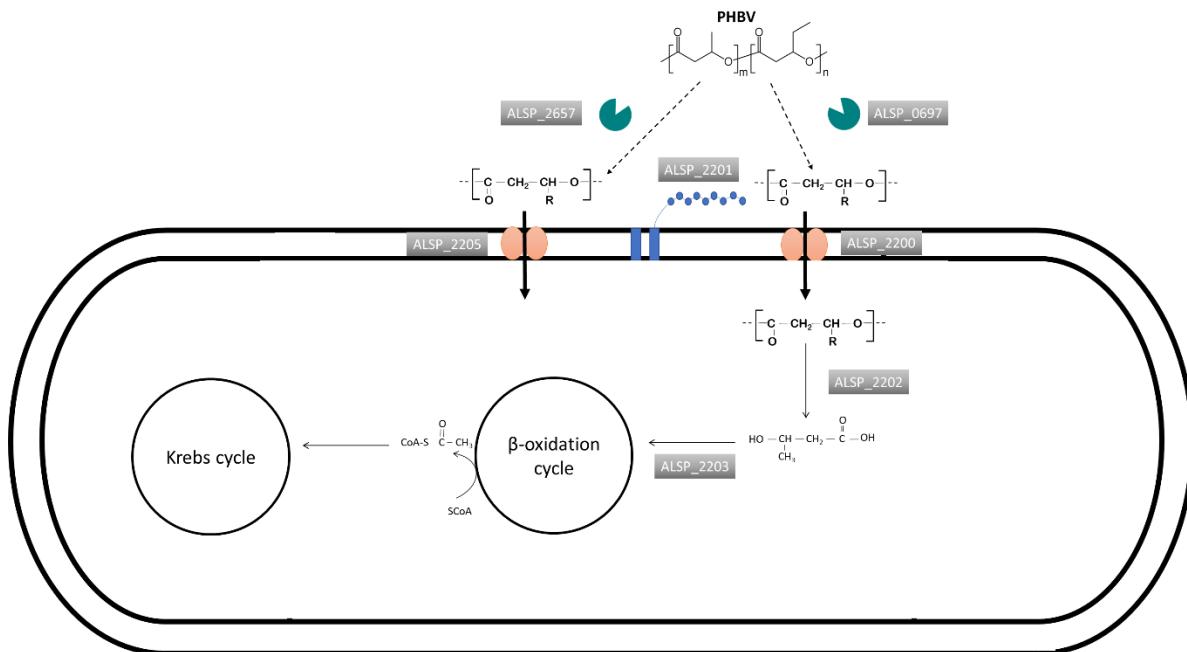


Figure 8 : Catabolism of PHBV in the strain of interest *Alteromonas* sp.

### 5.3. PHA synthesis

The presence of a native intracellular depolymerase (i-nPhaZ) short chain (ALSP\_3471) suggests that *Alteromonas* sp. is able to produce PHAscl.



Figure 9: Schematic representation of PHA synthesis/storage/degradation gene cluster

The analysis of the genomic region surrounding the native internal depolymerase ALSP\_3471 highlighted the presence of several genes (from ALSP\_3465 to ALSP\_3473) probably involved in the synthesis and storage of the polyhydroxyalkanoates (Fig 9). The synthesis part is represented by the presence of Acetoacetyl-CoA reductase (PhaB, ALSP\_3473) and of PHA synthase (PhaC, ALSP\_3467). No gene encoding an acetyl-CoA acetyltransferase (PhaA) was found in this area of the genome. It may be thought that the synthesis of acetoacetyl-CoA (PhaB substrate) is synthesized by another enzyme present in the genome. After further analysis, a CDS was annotated as a putative Acetyl-CoA acetyl transferase (ALSP\_4534) which could catalyze the missing reaction. An in-depth analysis of the PHA synthase (PhaC, ALSP\_3467) pointed out the presence of a PhaC\_N domain followed

by an A / B hydrolase domain involved in the secondary structure of the PHA synthase. These two domains are signatures of a Type 3 PHA synthase (Liu et al. 2019). As a single CDS appears to encode a PHA synthase in this region, the activity is probably linked to a dimerization of ALSP\_3467 leading to a PhaC of Class I (Mezzolla *et al.* 2018). Close to PhaC, a transcriptional regulator of phasin synthesis (PhaR, ALSP\_3468) was identified. The Phasins are the major components of PHA granules (Maestro and Sanz 2017). These proteins have an essential contribution in the physical stabilization of granules (also called carbonosomes) in the cell, and they ensure the proper distribution of polyester during cell division and assist other proteins (synthases and depolymerases) in the metabolism of PHA. Two phasins (ALSP\_3469 and ALSP\_3470) are located in this gene cluster. These two CDS have a signature in the Pfam database (PF09361) which is one of the 4 phasin Pfam families (Maestro and Sanz 2017). To complete this genomic region, the proteins ALSP\_3465 and ALSP\_3472, coding for a membrane component and for a peptidoglycan transglycosylase respectively, are potentially components of the granules. Finally, although no information is available to assign an annotation to it, CDS ALSP\_3466, preserved in a large number of *Alteromonas* and in operon with ALSP\_3467, must certainly have a role in the metabolism of PHA (data not shown).

Further analysis of the genome revealed a region containing another PHA synthase (ALSP\_3115). Like ALSP\_3467, this PHA synthase has a PhaC\_N domain followed by an A / B hydrolase domain, defining it as a Type 3 PHA synthase. This PhaC is colocalized with a bifunctional protein including an (R) -specific enoyl-CoA hydratase (PhaJ) and a phosphate acetyltransferase (Pta) (ALSP\_3116) followed by an acetate kinase (AckA) (ALSP\_3117). We can hypothesize that AckA and Pta leads the synthesis of acetyl-CoA from acetate which then enter into cell metabolism, while PhaJ and PhaC have a role in the synthesis of medium chain of PHA from Enoyl-CoA ( $\beta$ -oxidation of fatty acids). As observed for ALSP\_3467, the presence of a unique PhaC in the area suggests that this PHA synthase belongs to a Class I. As mentioned by Liu *et al.*, there are some rare cases of Class I PHA synthase that can produce mixed PHAs composed of mixtures of SCL and MCL hydroxyalkanoates (Liu *et al.* 2019) PHBV is a copolymer mixing short and medium carbon chains. Based on the annotation analysis, we can assume that *Alteromonas* sp. is probably capable of producing PHBV.

## Conclusion

Here, we report a novel marine strain isolated from a microbial consortium degrading Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV). This strain was affiliate to the *Alteromonas* genus and was named *Alteromonas* sp. Different parameters such as degradation halo on an agar plate, oxygen consumption, bacterial production, weight loss and scanning electron microscopy were performed to confirm the ability of this strain to degrade PHBV. In addition, the genome sequencing of this strain reveals three proteins potentially involved in the external depolymerisation, two of which are isolated in the genome (ALSP\_2657 and ALSP\_0697). These two depolymerases have all the characteristics to be excreted and involved in catabolism of the carbohydrates. Regarding the third external depolymerase (ALSP\_2202), no signal peptide was detected. This last protein is located in a cluster of genes potentially involved in PHA degradation (Fig 7). A hypothetical pathway is shown Fig 8. The genomic overview also revealed an internal depolymerase (ALSP\_3471) located in a cluster of nine genes (ALSP\_3465 to ALSP\_3473) possibly involved in the synthesis, storage and degradation of short carbon chain PHA (Fig 9). Although genes coding for the key enzymes of the pathway I of the PHA biosynthesis (PhaA, PhaB and PhaC) are frequently organized in one operon, such as *Cupriavidus nectarator* (Sudesh et al., 2000), no PHA operon was identified in this genome. To complete the PHA synthesis analysis, an enoyl-CoA hydratase (PhaJ, ALSP\_3116) and a PHA synthase (PhaC, ALSP\_3115) were identified which suggests that *Alteromonas* sp. can also synthesize medium carbon chain PHA. Experimental validations have to be carried out to confirm that *Alteromonas* sp. possesses, to the best of our knowledge, atypical pathways of degradation and synthesis of PHAs.

## References

- Abràmoff M, Magalhães P, and Ram S. 2004. Image processing with ImageJ. *biophotonics international* **11**: 36–42.
- Ali I and Jamil N. 2016. Polyhydroxyalkanoates: Current applications in the medical field. *Front Biol* **11**: 19–27.
- Amaral-Zettler LA, Zettler ER, and Mincer TJ. 2020. Ecology of the plastisphere. *Nat Rev Microbiol* **18**: 139–51.
- Chang H-F, Chang W-C, and Tsai C-Y. 2012. Synthesis of poly(3-hydroxybutyrate/3-hydroxyvalerate) from propionate-fed activated sludge under various carbon sources. *Bioresour Technol* **113**: 51–7.
- Donlan RM. 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infect Dis* **8**: 881–90.
- Dussud C, Hudec C, George M, et al. 2018. Colonization of Non-biodegradable and Biodegradable Plastics by Marine Microorganisms. *Front Microbiol* **9**.
- Eubeler JP, Zok S, Bernhard M, and Knepper TP. 2009. Environmental biodegradation of synthetic polymers I. Test methodologies and procedures. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **28**: 1057–72.
- Fegatella F, Lim J, Kjelleberg S, and Cavicchioli R. 1998. Implications of rRNA operon copy number and ribosome content in the marine oligotrophic ultramicrobacterium *Sphingomonas* sp. strain RB2256. *Appl Environ Microbiol* **64**: 4433–8.
- Gorke JT, Okrasa K, Louwagie A, et al. 2007. Enzymatic synthesis of poly(hydroxyalkanoates) in ionic liquids. *Journal of Biotechnology* **132**: 306–13.
- Grimaud R, Ghiglione J-F, Cagnon C, et al. 2012. Genome sequence of the marine bacterium *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SP17, which forms biofilms on hydrophobic organic compounds. *Journal of Bacteriology* **194**: 3539–40.
- Handrick R, Reinhardt S, and Jendrossek D. 2000. Mobilization of poly(3-hydroxybutyrate) in *Ralstonia eutropha*. *J Bacteriol* **182**: 5916–8.
- Handrick R, Reinhardt S, Kimmig P, and Jendrossek D. 2004. The “intracellular” poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) depolymerase of *Rhodospirillum rubrum* is a periplasm-located protein with specificity for native PHB and with structural similarity to extracellular PHB depolymerases. *J Bacteriol* **186**: 7243–53.
- Jacquin J, Cheng J, Odobel C, et al. 2019. Microbial Ecotoxicology of Marine Plastic Debris: A Review on Colonization and Biodegradation by the “Plastisphere.” *Front Microbiol* **10**.
- Jambeck JR, Geyer R, Wilcox C, et al. 2015. Marine pollution. Plastic waste inputs from land into the ocean. *Science* **347**: 768–71.
- Jendrossek D. 2005. Extracellular Polyhydroxyalkanoate (PHA) Depolymerases: The Key Enzymes of PHA Degradation. In: *Biopolymers Online*. American Cancer Society.

- Jendrossek D. 2007. Peculiarities of PHA granules preparation and PHA depolymerase activity determination. *Appl Microbiol Biotechnol* **74**: 1186–96.
- Jendrossek D and Handrick R. 2002. Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates. *Annu Rev Microbiol* **56**: 403–32.
- Knoll M, Hamm TM, Wagner F, et al. 2009. The PHA Depolymerase Engineering Database: A systematic analysis tool for the diverse family of polyhydroxyalkanoate (PHA) depolymerases. *BMC Bioinformatics* **10**: 89.
- Kong D, Li W, Deng Y, et al. 2018. Denitrification-Potential Evaluation and Nitrate-Removal-Pathway Analysis of Aerobic Denitrifier Strain Marinobacter hydrocarbonoclasticus RAD-2. *Water* **10**: 1298.
- Kumar S, Nei M, Dudley J, and Tamura K. 2008. MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Brief Bioinform* **9**: 299–306.
- Lebaron P, Ghiglione J-F, Fajon C, et al. 1998. Phenotypic and genetic diversity within a colony morphotype. *FEMS Microbiol Lett* **160**: 137–43.
- Liu Z, Zhu Z, Yang J, et al. 2019. Domain-centric dissection and classification of prokaryotic poly(3-hydroxyalkanoate) synthases. *bioRxiv*: 693432.
- Maestro B and Sanz JM. 2017. Polyhydroxyalkanoate-associated phasins as phylogenetically heterogeneous, multipurpose proteins. *Microbial Biotechnology* **10**: 1323–37.
- Martinez Tobon DI. 2019. Biodegradation of Polyhydroxybutyrate by Bacterial Strains, Native Extracellular PHB Depolymerases, and Structural Variants.
- Meng D-C, Shen R, Yao H, et al. 2014. Engineering the diversity of polyesters. *Curr Opin Biotechnol* **29**: 24–33.
- Mezzolla V, D'Urso OF, and Poltronieri P. 2018. Role of PhaC Type I and Type II Enzymes during PHA Biosynthesis. *Polymers (Basel)* **10**.
- Mothes G, Ackermann J-U, and Babel W. 2004. Mole Fraction Control of Poly([R]-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHB/HV) Synthesized by Paracoccus denitrificans. *Engineering in Life Sciences* **4**: 247–51.
- Oberbeckmann S, Löder MGJ, and Labrenz M. 2015. Marine microplastic-associated biofilms – a review. *Environ Chem* **12**: 551–62.
- Ong SY, Chee JY, School of Biological Sciences Universiti Sains Malaysia, et al. 2017. Degradation of Polyhydroxyalkanoate (PHA): a Review. *J Sib Fed Univ, Biol* **10**: 21–225.
- Peña C, López S, García A, et al. 2014. Biosynthesis of poly-β-hydroxybutyrate (PHB) with a high molecular mass by a mutant strain of Azotobacter vinelandii (OPN). *Ann Microbiol* **64**: 39–47.
- Reis MAM, Serafim LS, Lemos PC, et al. 2003. Production of polyhydroxyalkanoates by mixed microbial cultures. *Bioprocess Biosyst Eng* **25**: 377–85.
- Simon M and Azam F. 1989. Protein content and protein synthesis rates of planktonic marine bacteria. *Marine Ecology Progress Series* **51**: 201–13.
- Sudesh K, Abe H, and Doi Y. 2000. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in Polymer Science* **25**: 1503–55.

- Tebaldi ML, Maia ALC, Poletto F, *et al.* 2019. Poly(-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV): Current advances in synthesis methodologies, antitumor applications and biocompatibility. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* **51**: 115–26.
- Tsuyoshi N and Tetsuya Y. 2006. Acetyl-CoA acyltransferase gene disrupted bacterium for producing polyhydroxyalkanoate and method for producing polyhydroxyalkanoate using the same.
- Verlinden R a. J, Hill DJ, Kenward MA, *et al.* 2007. Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. *J Appl Microbiol* **102**: 1437–49.
- Wambeke FV, Ghiglione J-F, Nedoma J, *et al.* 2009. Bottom up effects on bacterioplankton growth and composition during summer-autumn transition in the open NW Mediterranean Sea. *Biogeosciences* **6**: 705–20.
- Wang Y, Chen R, Cai J, *et al.* 2013. Biosynthesis and Thermal Properties of PHBV Produced from Levulinic Acid by *Ralstonia eutropha*. *PLOS ONE* **8**: e60318.

Table S1 : Temporal monitoring of nutrients in the artificial seawater environment.

ASM-str PHBV	PO4	NO2	NO3+NO2
D0	107	0.0488	1711
D52	90.6	0.0968	1727
D11	47.5	1.2828	1701
D16	43.75	0.9888	1605
D32	53.6	3.0868	1651
D40	26.8	2.1428	1659

Table S2: Different types of depolymerase discovered during the analysis of the *Alteromonas* sp. genome

	Depolymerase types	Protein number	Sequence number
Intracellular	nPHAscl: no lipase box	224	278
	nPHAscl : lipase box	20	29
	nPHAmcl	46	53
Extracellular	dPHAscl: catalytic domain type 1	234	292
	dPHAscl: catalytic domain type 2	53	72
	nPHAscl	3	4
	dPHAmcl	6	6
Periplasmatic	nPHAscl	1	1
<b>TOTAL</b>		<b>587</b>	<b>735</b>

Table S3: Comparison of genome statistics of different *Alteromonas* sp. and *Pseudoalteromonas* species.

Species	Genome size	GC content	Gene count	Strain reference
Alteromonas abrolhosensis PEL67E WGS	4.44	44.55	4069	Nobrega et al., Antonie Van Leeuwenhoek. 2018;111(7):1131
Alteromonas australica DE170	4.45	44.87	4511	Lopez-Pérez et al. BMC Genomics. 2014; 15(1): 483
Alteromonas australica H 17	4.31	44.93	3903	Ivanova et al. Antonie Van Leeuwenhoek. 2013;103(4):877
Alteromonas confluentis KCTC 42603 WGS	4.87	48.02	4235	Park S et al. Int J Syst Evol Microbiol 2015;65:3603
Alteromonas macleodii Deep ecotype	4.48	44.87	4439	Lopez-Pérez et al. Genome Biol Evol. 2013;5(6):1220
Alteromonas macleodii Te101 (Chr)	4.63	44.68	4207	Hou et al. ISMEJ. 2018 Apr;12(4):981
Alteromonas macleodii Te101 (Plas)	0.24	41.66	293	Hou et al. ISMEJ. 2018 Apr;12(4):981
Alteromonas marina AD001 WGS	4.32	44.48	3958	Adrian,T.G.S. and Chan,K.G. Unpublished
Alteromonas mediterranea DE	4.48	44.87	4421	Ivars-Martinez et al. ISMEJ. 2008;2(12):1194
Alteromonas sp. RKMC-009 (Chr)	4.93	48.81	4383	MacIntyre et al. Microbiology Ressour Announc. 2019; 25 (8): 508
Alteromonas sp 190 WGS	5.18	48.67	4942	Sun et al., Int J Syst Evol Microbiol 2019;69:278
Alteromonas sp. RKMC-009 (Plas)	0.1	43.26	147	MacIntyre et al. Microbiology Ressour Announc. 2019; 25(8): e00508
Alteromonas stellipolaris LMG 21856	4.67	43.63	4297	Chen et al. Genome Announc. 2016; 4(2): e00137-16.
Pseudoalteromonas sp. OCN003 (Chr1)	3.2	40.18	2950	Beurmann et al. Genome Announc. 2015 Jan-Feb; 3(1): e01396
Pseudoalteromonas sp. OCN003 (Chr2)	1.61	39.53	1529	Beurmann et al. Genome Announc. 2015 Jan-Feb; 3(1): e01396

Table S4: Number of the different types of tRNA found in the *Alteromonas* sp. genome.

Ala tRNA	4	Lys tRNA	3
Arg tRNA	5	Met tRNA	4
Asn tRNA	2	Phe tRNA	1
Asp tRNA	3	Pro tRNA	3
Cys tRNA	1	Pseudo tRNA	1
Gln tRNA	3	Ser tRNA	4
Glu tRNA	3	Thr tRNA	2
Gly tRNA	3	Trp tRNA	2
His tRNA	1	Tyr tRNA	1
Ile tRNA	3	Val tRNA	3
Leu tRNA	6		

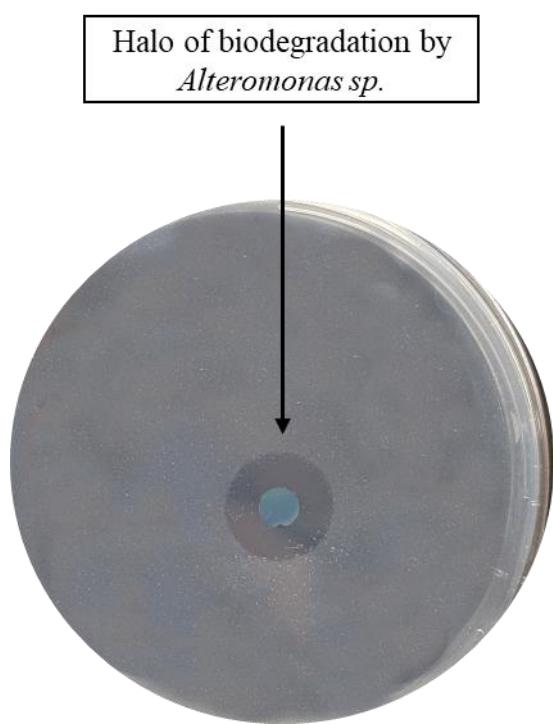


Fig S1 : Halo of biodegradation by *Alteromonas* sp., after 72 hours on Minimum medium with melt PHBV



# Chapitre 5

## Conclusions et Perspectives



© Hedenberg Frej



*“Insanity is doing the same thing over and over again and expecting different results”*  
Einstein

## 1. Conclusion

Une des originalités de cette thèse a été de travailler à différents niveaux d'intégrations, allant de la comparaison d'écosystèmes à l'échelle planétaire (expéditions Tara-Méditerranée 2014 et Tara-Pacifique 2018), de travaux menés à l'échelle locale (aquariums en circulation ouverte sur la Baie de Banyuls sur mer) jusqu'à l'échelle de l'individu et de son génome (isolement d'une souche bactérienne en laboratoire). Ces différents niveaux d'intégrations m'ont permis d'aborder différentes facettes de l'écotoxicologie microbienne marine, en étudiant l'impact de la pollution plastique sur les bactéries marines (la plastisphère) et inversement, le rôle des bactéries sur le devenir des plastiques en mer (la biodégradation).

### 1.1. Etude de la plastisphère au niveau mondial

L'étude de la plastisphère mondiale a été permise grâce à deux expéditions menées par la fondation Tara Océan. La première a été menée en 2014 en mer Méditerranée et la seconde à laquelle j'ai eu l'opportunité de participer en 2018 dans le gyre du Pacifique Nord. Ces deux expéditions d'une envergure exceptionnelle ont permis l'étude de plusieurs centaines d'échantillons à travers deux régions du monde fortement touchées par cette pollution. Le plastique est devenu en quelques années un paramètre traduisant la santé des océans, au même titre que d'autres sources tels que le changement climatique, l'acidification des océans, la surpêche ou la destruction de l'habitat.

Jusqu'à présent, la biogéographie de la plastisphère restait peu étudiée et les facteurs influençant les communautés microbiennes à travers les océans étaient encore un sujet de débat. Quelques études s'étaient attachées à comparer la plastisphère dans différents bassins océaniques à différentes échelles, comme celle de Amaral-Zettler et al. (2015) entre le Pacifique et l'Atlantique, de Basili et al. (2020) dans le bassin méditerranéen à deux endroits distincts, de Xu et al. (2019) entre la mer jaune et la mer de Chine méridionale ou de Oberbeckmann et al. (2016) entre deux zones de la mer du Nord à deux endroits distincts également. Dans le monde scientifique, deux hypothèses s'affrontent, la première étant que les communautés retrouvées sur les plastiques devraient être homogènes car fortement dépendant de la composition chimique de ce dernier et la seconde étant que les communautés microbiennes sont fortement

liées aux facteurs environnementaux et dans une moindre mesure à la composition chimique du polymère. Si les communautés varient effectivement en fonction des paramètres environnementaux et donc de leur géographie, alors il y aura une variation régionale importante dans le transport d'espèces invasives, nuisibles ou pathogènes à travers les différents bassins océaniques (Zettler 2013; Amaral-Zettler *et al.* 2015).

Une partie des travaux de cette thèse ont été concentrés sur les communautés microbiennes des plastiques trouvés à la surface de l'eau de mer de deux régions distinctes du globe. La première conclusion a été que les communautés microbiennes vivant sur les plastiques (PMD) sont très différentes par rapport au milieu environnant à l'état libre (FL) ou attachées aux particules organiques (PA) dans le Pacifique, comme en Méditerranée. Ce résultat vient conforter de nombreuses études qui font état de cette distinction (Oberbeckmann *et al.* 2014; De Tender *et al.* 2015; Bryant *et al.* 2016; Basili *et al.* 2020). Dans cette étude, nous avons aussi observé un cloisonnement net dû à la géographie sur les fractions PMD, FL et PA entre le Pacifique et la Méditerranée. Ces résultats semblent converger avec les premières observations faites à travers différents endroits du globe (Amaral-Zettler *et al.* 2015; Oberbeckmann *et al.* 2016; Xu *et al.* 2019; Basili *et al.* 2020). Le principal facteur favorisant le cloisonnement géographique dans notre étude est la température.

Lorsque nous avons étudié les différents types des polymères de la fraction PMD, nous n'avons constaté aucun lien entre la nature du polymère et la communauté bactérienne de la plastosphère. Cela contredit différentes études menées sur des plastiques vierges incubés en eau de mer (Oberbeckmann *et al.* 2018; Dussud *et al.* 2018; Pinto *et al.* 2019). Cela peut s'expliquer par le temps de résidence des différents plastiques prélevés. En effet, la composition du polymère et surtout ses propriétés de surface (cristallinité, hydrophobicité, rugosité, ...), peuvent influencer l'attachement de certains genres bactériens à court terme. Cependant l'effet à long terme des facteurs environnementaux semble prédominer sur les plastiques retrouvés dans l'environnement et provoquera une convergence des communautés microbiennes sur le biofilm mature, expliquant cette différence avec les études précédemment citées.

Les deux zones géographiques ne sont pas reliées entre elles directement, mais pourtant un microbiome commun (ou « core microbiome ») a pu être identifié sur la fraction PMD. Ce core microbiome est principalement composé d'Alphaproteobacteries, de Cyanobacteries et de Bacteroidia. Ces classes sont également retrouvées dans l'eau environnante, ce qui suggère un échange avec les fractions libres et/ou attachées aux particules organiques. Nous avons révélé

que la cyanobactéries *Rivularia sp.* appartenant à la famille des Rivulariaceae (connue également sous *Calothrix sp.*) était le genre le plus abondant du « core microbiome ». D'autres taxons ont été identifiés comme composants principaux du core microbiome, comme *Tateyamaria sp.* (Rhodobacteraceae), *Muricauda sp.* (Flavobacteriaceae), ou encore *Pseudahrensia sp.* (Rhizobiaceae). Ces genres sont connus dans la littérature pour se développer sur des polymères et être impliqués dans des biofilms marins (Lu *et al.* 2019; Rogers *et al.* 2020). La présence de ce « core microbiome » est explicable par des facteurs abiotiques, principalement température, salinité, nutriments, et dans une moindre mesure par des facteurs biotiques (Amaral-Zettler *et al.* 2020). Les bactéries sessiles, ayant des membranes hydrophobes, pouvant produire des EPS et favorisant un mode de vie attaché vont être avantageées dans l'adhésion à la surface des plastiques.

La colonisation des plastiques par ces genres bactériens n'est pas le signe d'une biodégradation du polymère par cette communauté. L'analyse de la capacité des microorganismes à biodégrader les plastiques requiert généralement une étude en laboratoire. Dans la partie suivante, nous nous sommes attachés à conserver un consortium bactérien naturel pour en évaluer la capacité à biodégrader différents polymères en milieu marin.

## 1.2. Evolution de la plastisphère vers un consortium capable de dégrader les polymères

Le laboratoire d'océanographie microbienne (LOMIC UMR7621) a développé depuis quelques années des incubations en milieu ouvert sur la baie de Banyuls pour mimer le milieu naturel en conditions contrôlées. Ces aquariums permettent de suivre la colonisation des plastiques conventionnels et/ou biodégradables. Les premières expériences menées dans ces microcosmes ont montré une bonne représentativité des communautés microbiennes vivant sur les plastiques dans ces aquariums par rapport à celle de l'environnement (Dussud *et al.* 2018).

Cet avantage a été mis au service du projet BIOTIGES financé par le ministère de la transition écologique et solidaire qui avait pour objectif d'accompagner le gouvernement français sur la recherche d'alternatives aux plastiques conventionnels utilisés dans la tige des coton-tiges. Cette étude nous a permis de participer à l'écriture d'un décret modificatif du décret d'application n°2017-291 du 6 mars 2017 pris pour application de l'article 24 de la loi n° 2016-

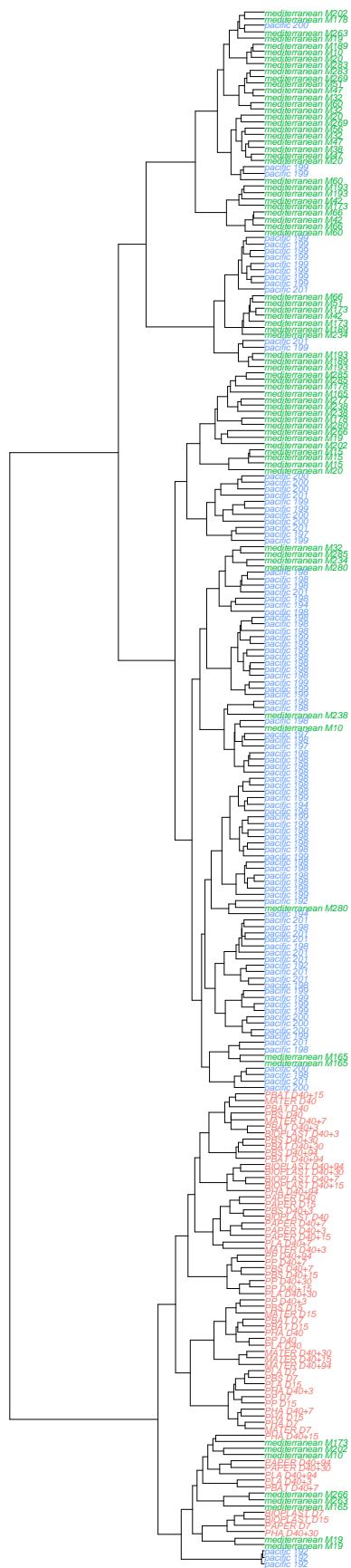
1087 du 8 août 2016 pour la reconquête de la biodiversité, de la nature et des paysages modifiant l'article L. 541-10-5 du code de l'environnement. Ce texte réglementaire est relatif aux conditions de mise en œuvre de l'interdiction de mise sur le marché des produits cosmétiques rincés à usage d'exfoliation ou de nettoyage comportant des particules plastiques solides et des bâtonnets ouatés à usage domestique dont la tige est en plastique. La loi du 10 février 2020 (loi 2020-105) a été promulguée pour lutter contre le gaspillage, favoriser l'économie circulaire afin de réduire les déchets et préserver les ressources naturelles. La loi s'articule autour de plusieurs thématiques dont la réduction des déchets plastiques (Article 7). Cet Article prévoit la fin de la mise sur le marché de plastique à usage unique d'ici à 2040. Des objectifs de réduction d'usage de plastique sont fixés par décret pour la période 2021-2025, puis tous les 5 ans jusqu'en 2040. L'interdiction des cotons-tiges en plastique est également soumise à la loi biodiversité du 8 aout 2016 et interviendra dès l'année 2020. Notre rôle a été d'étudier les solutions alternatives aux plastiques conventionnels classiquement utilisés pour les tiges de coton-tiges (généralement fabriqués en polypropylène, PP).

Actuellement de nombreux polymères considérés comme biodégradables sont mis sur le marché. Certains issus de la pétrochimie (PBS and PBAT), d'autre d'origine biosourcés (PLA et PHBV) et d'autres provenant d'amidon (Bioplast et Matert-Bi). Cependant, la colonisation de ces polymères par les communautés microbiennes et l'impact sur la biodégradabilité de ces polymères en milieu marin étaient jusqu'alors inconnus dans la littérature.

Nous avons mis en évidence que quel que soit le type de polymère, la colonisation microbienne suivait une succession de phases de croissance puis de maturation. Ces résultats corroborent les précédentes études réalisées par notre équipe sur d'autres plastiques sous forme de films composés de polymères oxo-dégradables et de PHBV (Dussud *et al.* 2018). La phase de croissance était caractérisée par une activité bactérienne maximale entre 7 et 15 jours pour l'ensemble des polymères. La phase de maturation du biofilm a été caractérisée par une baisse de la production bactérienne, comme l'avait déjà démontré la précédente étude faite dans les mêmes conditions (Dussud *et al.* 2018).

Aucune spécificité des communautés microbiennes liée à la nature des polymères n'a été observée pendant la phase de croissance du biofilm. Bien que surprenant au premier abord compte tenu de la diversité des polymères testés dans cette étude, ces résultats sont concordants avec d'autres études menées sur la formation de biofilm sur des plastiques vierges (Harrison *et al.* 2014; De Tender *et al.* 2017). Fait intéressant, lorsque l'on compare les communautés

microbiennes identifiées sur nos plastiques vierges incubés avec celles des plastiques *in situ* trouvés en Méditerranée ou dans le Pacifique, il s'avère que les premières étapes de colonisation du papier et du Bioplast présentent des similitudes avec les plastiques échantillonnés en Méditerranée, au large de Nice (Fig. 32). Cela confirme la représentativité de notre procédé expérimental qui mime les conditions naturelles en conditions contrôlées. Cela montre également que le biofilm constitué sur les polymères au bout de 40 jours correspondent bien à un biofilm mature qui peut être retrouvé dans l'environnement.



*Figure 32 : Dendrogramme (méthode Ward), comparant les communautés microbiennes colonisant les plastiques selon l'endroit géographique, le Pacifique (bleu), la méditerranée (vert) et les aquariums du laboratoire alimentés par la baie de Banyuls sur mer (rouge).*

L'étude de la biodégradation a impliqué le transfert de ces polymères et de leur biofilm mature dans un milieu artificiel d'eau de mer sans aucune autre source de carbone. L'étude de la biodégradation des plastiques en milieu minimum imitant les conditions marines n'avait encore jamais été réalisée en laboratoire, ce qui dénote d'une autre originalité de ce travail de thèse en terme cette fois de procédé expérimental pour mettre en évidence la biodégradabilité des polymères en milieu marin. Une enveloppe SOLEAU a été déposée en Décembre 2017 (*DSO2017012612 : Protocole pour l'évaluation de la biodégradabilité des plastiques en milieu marin*) par JF Ghiglione pour protéger ce procédé expérimental original.

La caractérisation de la biodégradation a été réalisée de manière originale par le suivi dynamique de la production bactérienne tout au long de l'incubation et par une confirmation visuelle de changement de morphologie du polymère par microscopie électronique, qui sont des paramètres non pris en compte dans les normes actuelles. L'étude de la dynamique de l'activité bactérienne a permis de montrer que les communautés continuaient d'avoir une activité plusieurs jours après le transfert en milieu minimum comme sur le PP, témoin négatif de l'expérience. Cette activité est certainement liée à la matière organique déposée sur le polymère lors de la colonisation par le biofilm en milieu naturel et non à une biodégradation du polymère lui-même. L'activité bactérienne n'a pas été maintenue au-delà des 15 jours sur des polymères non-biodégradables tels que le PP, le PLA et le PBS. Les observations en microscopie électronique ont montré des bactéries isolées et une surface des polymères inchangée. Tous ces signaux convergent pour indiquer que ces polymères n'ont pas été dégradés dans nos conditions expérimentales. Il est à souligner que le PLA est pourtant considéré comme biodégradable en sol et en compost (Ren *et al.* 2007), mais nos travaux n'ont pu montrer sa biodégradabilité en milieu marin dans nos conditions expérimentales. Les communautés microbiennes sur les polymères PHBV, Bioplast, Mater-bi, et la cellulose ont continué à être actives et leur impact sur la surface du polymère a pu être caractérisé au microscope électronique, suggérant que ces polymères sont biodégradables en milieu marin.

L'incubation en milieu minimum a eu pour effet de faire évoluer les communautés microbiennes qui sont devenues spécifiques de chaque polymère. Une attention particulière a été portée sur les communautés microbiennes qui étaient encore actives après 3 mois avec le polymère comme seule source de carbone, que l'on considère comme capable de biodégradation du polymère. Les genres devenus majoritaires en fin d'incubation (D40+94)

appartenaient tous à la biosphère rare (<1% de la communauté totale) du biofilm mature naturel (D40). Nos résultats suggèrent que nous avons découvert des activités de biodégradation des polymères insoupçonnés pour ces genres bactériens. En effet la majorité des genres sélectionnés ne sont pas connus dans la littérature pour dégrader ces polymères, même s'ils ont en général déjà été identifiés comme capables de dégrader des hydrocarbures ou comme faisant partie de la plastisphère en milieu naturel. Etonnamment, les genres sélectionnés ne sont pas majoritairement des hydrocarbonoclastes, bien que plusieurs études ont fait un lien entre les hydrocarbonoclastes et leurs activités potentielles de biodégradation (Bryant *et al.* 2016; Pollet *et al.* 2018; Amaral-Zettler *et al.* 2020).

Les normes actuelles se contentent généralement de mesurer la respiration des communautés microbiennes (inoculum pouvant être artificiel et non représentatif du milieu d'étude) et impose un pourcentage de conversion en CO<sub>2</sub> du carbone organique du polymère (entre 60 et 70 %) entre 3 et 24 mois d'incubation. Cependant, notre étude a révélé deux points faibles à ces normes. La première est que la matière organique provenant de l'environnement marin est suffisante pour permettre une activité bactérienne mesurable et non négligeable sur le PP (polymère non biodégradable) et la seconde est que les communautés microbiennes sont composées de cyanobactéries (autotrophe) pouvant interférer sur les résultats de respirométrie analysés par les normes. Ces résultats suggèrent que les protocoles utilisés actuellement dans les normes peuvent conduire à des faux-positifs. Ils soulignent que les tests de respirométrie ne sont pas suffisants et montrent l'importance d'approches pluridisciplinaires qui permettent de tenir compte des différentes étapes de la biodégradation.

### **1.3. Etude d'une souche appartenant à ce consortium afin d'identifier les gènes clefs impliqués dans la biodégradation du PHA**

La souche *Alteromonas* sp. a été isolée à partir d'un fragment de PHBV ayant séjourné dans un aquarium ouvert sur la baie de Banyuls sur Mer pendant 40 jours puis transféré 94 jours en milieu minimum (Expérience : chapitre 3).

Le genre *Alteromonas* sp. est déjà connu dans la littérature pour dégrader le PHB en eau de mer (Mergaert *et al.* 1995). *Alteromonas* sp. est aussi connu comme étant hydrocarbonoclaste pouvant dégrader le naphtalène, le phénantrène, l'anthracène et le pyrène (Jin *et al.* 2012) et ayant un rôle clef dans la biodégradation de ces hydrocarbures. Le genre *Alteromonas* sp. est

présent en abondance en Méditerranée occidentale en surface ou en profondeur jusqu'à 400m (Acinas *et al.* 1999). Ce genre bactérien était abondant pendant la phase de colonisation en aquarium sur le Bioplast, le Mater, le PHBV et la cellulose (entre 0.21 % et 57% d'abondance relative). Ensuite son abondance relative a fortement chuté lorsque l'incubation a été transférée en milieu minimum (moyenne de 0.25 %) à l'exception du PHBV qui a vu le genre *Alteromonas* sp. devenir fortement abondant (30%) après 30 jours en milieu minimum. Ce genre n'est que très peu abondant sur les plastiques issus de la pétrochimie (PP, PBAT et PBS) dans les conditions de nos aquariums en circulation ouverte sur la baie de Banyuls sur mer (en moyenne 0.8%) ou sur les plastiques *in situ* prélevés en Méditerranée (en moyenne 0.4% de l'abondance relative) et dans le Pacifique (en moyenne 0.07% de l'abondance relative) . Notons d'ailleurs que la composition des échantillons issus des missions sont essentiellement composés de PE (Polyéthylène) et PP.

Le genre *Alteromonas* sp. a montré des signes de biodégradation du PHBV très significatifs en laboratoire, avec une forte consommation d'oxygène pendant 40 jours (22.45 µmol/jour), une activité bactérienne maintenue tout au long de l'incubation ( 28738 ng C/m<sup>2</sup>/h après 40 jours) et une fragilisation de la surface du PHBV (fissures, trous et apparition de structures caractéristiques de la biodégradation).

Après séquençage de l'ADN génomique de cette souche l'étude de son unique chromosome a permis d'identifier des gènes impliqués dans la biodégradation du PHBV ainsi que ceux intervenants dans la synthèse des PHA. L'exploration du génome d'*Alteromonas* sp. a révélé la présence de 4 gènes identifiés comme étant des dépolymérases, dont 3 externes et 1 interne. L'analyse plus approfondie de l'annotation de ces gènes a permis d'identifier que les CDSs codant deux des dépolymérases externes (ALSP\_2657 et ALSP\_0697) possédaient un signal peptide laissant suggérer une excrétion de ces protéines. Une autre dépolymérase externe (ALSP\_2202) semble être maintenue dans le cytoplasme. En revanche, une hydrolase (ALSP\_2201), non identifiée comme dépolymérase, possède tous les domaines nécessaires pour être adressée à la membrane. Cette hydrolase agit certainement dans le milieu extracellulaire. Les deux gènes codant ces protéines font partie d'un cluster de gènes probablement impliqués dans la biodégradation du PHBV. En effet, l'hypothèse qui est émise est que le PHBV est internalisé après hydrolyse grâce aux perméases présentes dans le cluster. Ensuite, les oligomères sont dégradés en monomère grâce à la dépolymérase. Pour finir, ces monomères sont intégrés au cycle de β-oxydation afin d'être assimilés par la bactérie (Mezzolla

*et al.* 2018). La présence de l'ensemble de ces dépolymérases dans le génome d'*Alteromonas sp.* explique la capacité de la souche à dégrader le PHBV externe (Jendrossek and Handrick 2002; Knoll *et al.* 2009), ce qui est cohérent avec les premiers résultats de métagénomique effectué sur du PHA (Pinnell and Turner 2019). Ces résultats faisaient état d'un enrichissement de gènes codant des dépolymérases (multiplié par 20 par rapport aux autres polymères) dans une communauté microbienne attachée aux PHA. De plus cette étude rapporte également qu'il existe dans le métagénome un grand nombre de gènes codant des dépolymérases différentes, signifiant une distribution hétérogène à travers le consortium microbien mixte.

L'étude du génome d'*Alteromonas sp.* a permis d'identifier également deux voies de biosynthèse de PHA, l'une permettant la synthèse de PHA<sub>SCL</sub> et l'autre de PHA<sub>MCL</sub>. L'activité de synthèse du PHA a été mise en évidence grâce à la présence de deux régions du génome dont une regroupant entre autres une dépolymérase interne (i-nPhaZ) une Acetoacetyl-CoA reductase (PhaB), une PHA synthase (PhaC) et des phasines. Dans l'autre région, une autre PHA synthase et une (R)-specific enoyl-CoA hydratase (*phaJ*) ont été mise en évidence.

Ces analyses sont basées sur l'étude du génome complet d'*Alteromonas sp.* Afin de confirmer ces hypothèses, une seconde expérience a été réalisée pour observer l'expression des gènes lorsqu'*Alteromonas sp.* n'utilise que du PHBV comme source de carbone (analyse transcriptomique). Pour se faire, *Alteromonas sp.* a été cultivée dans un milieu minimum contenant du glucose (2mM) (pendant 48h), ou du PHBV (pendant 11 jours) comme source de carbone. L'extraction des ARNs a été réalisée et les échantillons sont en cours de séquençage au Génoscope (Evry, France). Cette expérience aura pour but de confirmer ou d'infirmer nos observations sur l'implications des gènes dans le processus de dépolymérisation du PHBV.

## 2. Perspectives

Toutes nos conclusions ont permis d'identifier des genres bactériens impliqués dans la biodégradation en nous apportant des preuves de biodégradation indirectes (respiration, production bactérienne, analyse de la surface au microscope électronique) et directe (perte de poids). Après cette étude de diversité bactérienne, l'étude des communautés fonctionnelles a été envisagée avec la méthode du marquage des ADN par des isotopes stables (DNA-stable isotope probing ou DNA-SIP) comme preuve ultime d'assimilation du carbone organique par le consortium naturellement formé sur le polymère. A ce jour, les communautés fonctionnelles restent très peu étudiées en écologie microbienne et sur la plastosphère (Bryant *et al.* 2016; Pinnell and Turner 2019). Pourtant, l'étude fonctionnelle représente un enjeu majeur pour comprendre le processus de biodégradation et ainsi identifier les enzymes clefs.

### 2.1. Utilisation de la technique DNA-Stable Isotope Probing (DNA-SIP) comme preuve ultime de la biodégradation.

La méthode DNA-SIP a été initiée au cours de cette thèse sur le PHBV, puisque nous avons montré que ce polymère présentait des signaux clairs de biodégradation avec une communauté naturelle complexe en milieu marin et avec une souche pure. Le marquage de l'ADN à l'aide d'un isotope stable est une technique puissante afin d'identifier les micro-organismes actifs pouvant assimiler le substrat carboné marqué par un isotope stable ( $^{13}\text{C}$ ). Cette méthode couplée à une analyse métagénomique de la communauté, permettrait de révéler les liens entre la diversité microbienne et la fonction des populations microbiennes non cultivables. Nous présentons ici des premiers résultats très prometteurs qui ont été obtenus en fin de thèse et que nous n'avons pas présenté sous forme d'article par contrainte de temps.

Pour cette expérience, du PHBV a été marqué au  $^{13}\text{C}$  grâce à une collaboration avec l'université de Bretagne Sud (S. Bruzaud, IRDL), puis incubé avec une communauté microbienne provenant d'un biofilm mature sélectionné sur du PHBV. L'incubation s'est déroulée dans du milieu minimum d'eau de mer sans source de carbone, sous agitation (130 rpm) à 18 °C pendant 90 jours. La communauté microbienne a été obtenue en incubant du PHBV non marqué ( $^{12}\text{C}$ ) pendant 30 jours dans des aquariums en circuit ouvert sur la baie de banyuls et en les détachant du PHBV pour les inoculer en milieu minimum. Pour des raisons d'approvisionnement en PHBV  $^{13}\text{C}$ , l'ensemble des paramètres (production bactérienne, suivi

d'oxygène, masse, nutriments) ont été suivis sur du PHBV  $^{12}\text{C}$ . Le PHBV  $^{13}\text{C}$  a été utilisé uniquement pour mesurer l'incorporation de l'ADN marqué au  $^{13}\text{C}$  (DNA-SIP).

Après 90 jours d'incubation du PHBV  $^{13}\text{C}$  en contact avec la communauté microbienne, l'ADN des cellules attachées au polymère a été extrait. L'ADN extrait a été quantifié, calibré (2 ng) et soumis à une ultracentrifugation à gradient de densité de Chlorure de césum qui permet le fractionnement de l'ADN suivant sa densité et suivant la méthode détaillée de Dunford (Dunford and Neufeld 2010). L'ADN est alors séparé en deux fractions, la fraction haute contient l'ADN marqué au  $^{13}\text{C}$  qui permettra d'identifier les OTUs ayant assimilés du PHBV et la fraction légère de l'ADN  $^{12}\text{C}$ . Cette fraction n'ayant pas assimilé du carbone marqué, permettra d'identifier les OTUs opportunistes qui ne sont pas forcément impliqués dans la biodégradation du PHBV (Fig. 33).

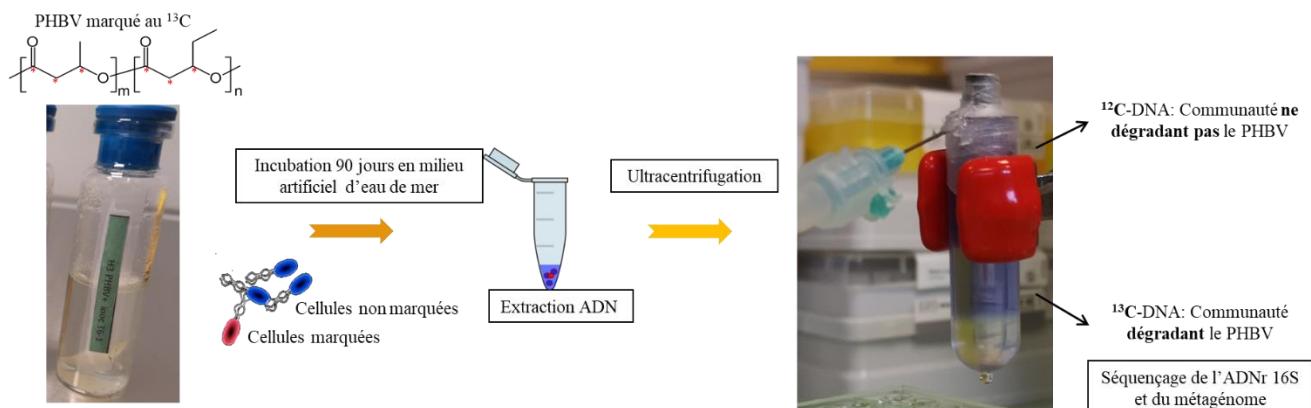


Figure 33 : Schéma expérimental de l'expérience DNA-SIP menée sur du  $^{13}\text{C}$  PHBV comme seule source de carbone permettant la distinction entre les bactéries ayant assimilées du PHBV marqué (Fraction haute) et celles n'ayant pas intégrées du PHBV marqué (Fraction légère).

Les premiers résultats de cette expérience montrent des signaux de biodégradation du PHBV encourageant. La consommation d'oxygène du consortium sur le PHBV a été régulière pendant toute la durée de l'incubation (90 jours). Les tubes ont dû être ouverts aux jours 7, 14, 24, 35, 47, 59 et 66 pour assurer que l'expérience restait en condition d'anoxie. Le consortium au contact du PHBV a consommé en moyenne  $1474 \mu\text{mol.L}^{-1}$  d'oxygène sur toute la durée d'incubation (Fig. 34).

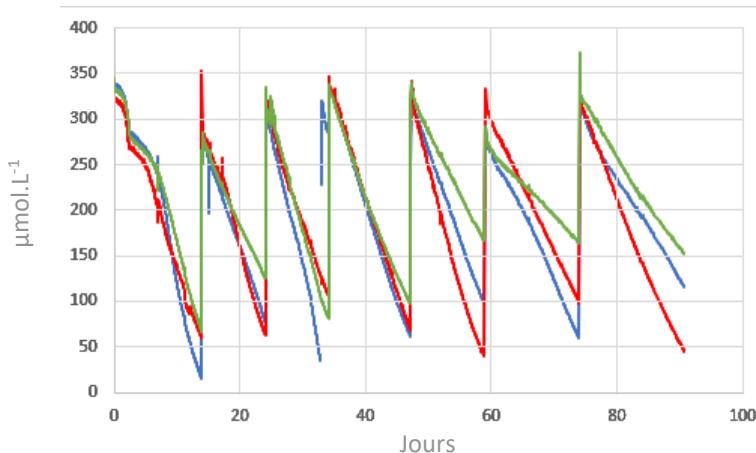


Figure 34 : Consommation de l'oxygène par le consortium bactérien au contact du PHBV  $^{12}\text{C}$  (triplicat) pendant 90 jours. Les tubes ont été ouverts aux jours 7, 14, 24, 35, 47, 59 et 66 pour assurer des conditions aérobies.

Des résultats congruents ont été trouvés également par la mesure de la production hétérotrophe bactérienne tout au long de l'incubation (aux jours 0, 7, 13, 31, 52, 74 et 90). L'activité hétérotrophe bactérienne sur le PHBV a augmenté au cours du temps, avec une activité de 560 ng C.  $\text{dm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$  après 5 jours d'incubation pour atteindre les 1351.27 ng C.  $\text{dm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$  après 90 jours d'incubation (Fig. 35). Le témoin négatif contenant du PHBV sans le consortium et le milieu minimum est resté négatif tout au long de l'expérience. Seul le surnageant du PHBV abiotique a montré une activité faible en fin d'incubation ( $74.3 \text{ ng C. L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ) contre une activité bien plus importante du surnageant du PHBV avec le consortium ( $3\,958.4 \text{ ng C. L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ). Cette activité traduit une utilisation de carbone organique par le consortium et par conséquent une potentielle biodégradation du polymère.

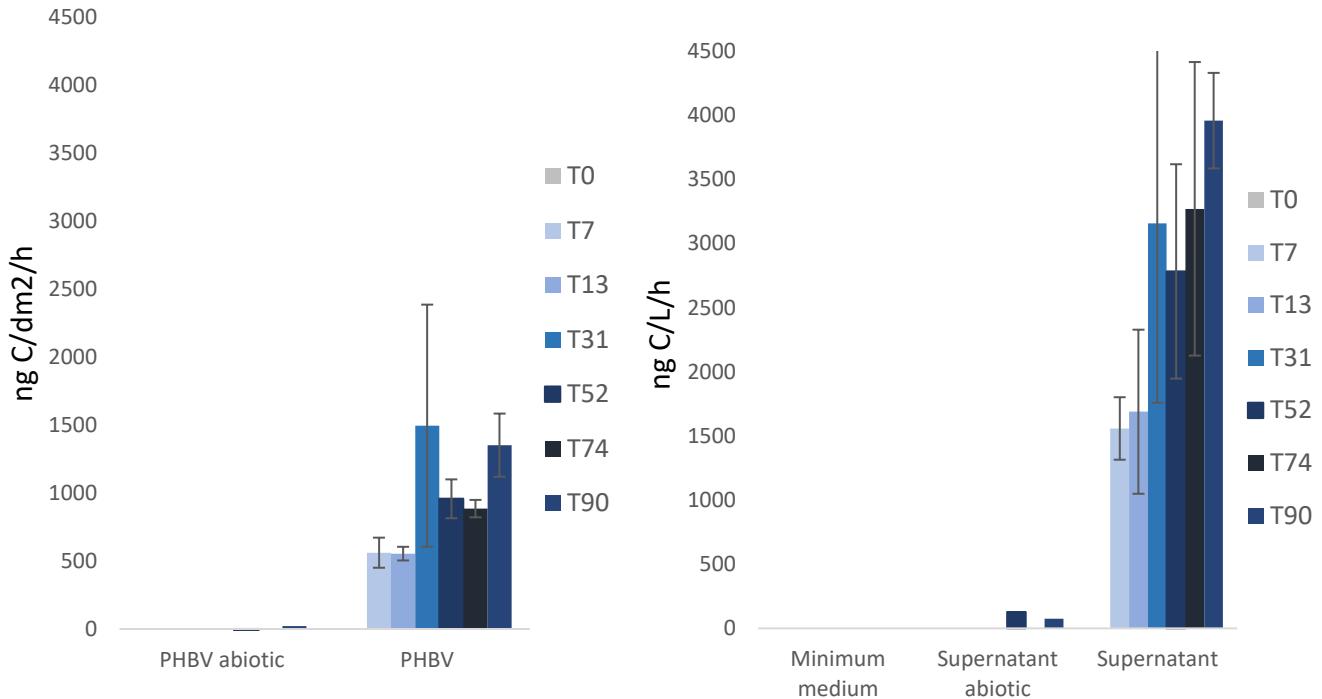


Figure 35 : Production bactérienne exprimée en  $\text{ng C. dm}^{-2}.\text{h}^{-1}$  pour les morceaux de PHBV et en  $\text{ng C. L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  pour le milieu d'incubation, et le surnageant du milieu artificiel contenant les pièces de PHBV.

Cette activité de biodégradation a été confirmée par la mesure de la masse de deux morceaux de polymères qui ont perdu en moyenne 16 % de la masse initiale après avoir passé 94 jours en milieu minimum en contact avec le consortium bactérien. Dans ce même laps de temps, le PHBV contenu dans du milieu minimum sans le consortium a un poids identique à celui du début d'incubation.

Les images au microscope électronique ont permis de caractériser l'impact du consortium sur la surface du polymère (Fig. 6). Après 5 jours, les bactéries sont attachées aux polymères et commencent à coloniser de façon homogène la surface. Des éléments typiques d'EPS ont été détectés. Après 90 jours, le biofilm a adopté une structure en 3 dimensions, recouvrant la totalité du polymère. On a pu constater sous la surface du biofilm des fissures et des trous de la taille d'une bactérie, fragilisant sa structure.

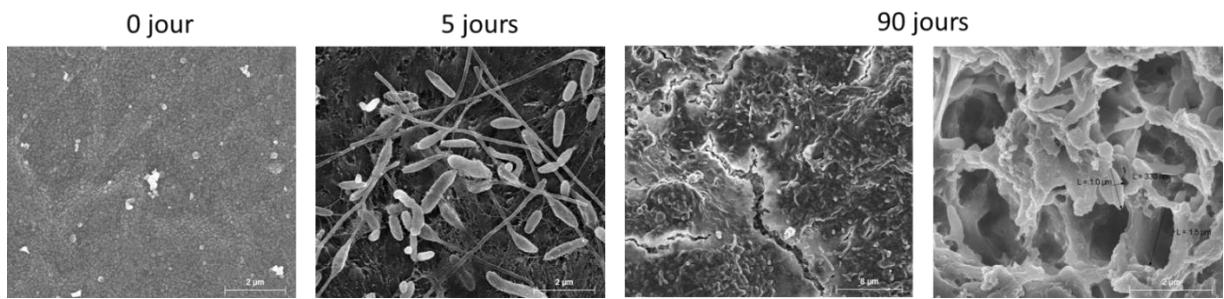


Figure 36 : Images prises au microscope électronique (grossissement de 3 000 à 15 000) du PHBV  $^{12}\text{C}$  prises en début d'expérience (0 jour), après 5 jours, 52 jours et 90 jours.

Ensuite nous avons fractionné l'ADN de l'ensemble des échantillons ( $^{12}\text{C}$  PHBV et  $^{13}\text{C}$  PHBV) pris tout au long de l'incubation (du 15 ème jour au 90 ème jour) grâce au gradient de chlorure de Césium ( $\text{CsCl}$ ) par ultracentrifugation (55 000 rpm, 42 h à 20 °C). Nous avons donc séparé nos échantillons en trois catégories (Fig. 37) :

- La fraction contrôle : Contenant les communautés microbiennes s'étant développées sur le PHBV  $^{12}\text{C}$  (Densité de fraction inférieur à 1.72)
- La fraction légère (FL) : Contenant les communautés microbiennes s'étant développées sur le PHBV  $^{13}\text{C}$ , mais n'ayant pas incorporées du carbone marqué (densité de fraction inférieur à 1.72).
- La fraction haute (FH) : Contenant les communautés microbiennes s'étant développées sur le PHBV  $^{13}\text{C}$  et ayant incorporées du carbone marqué (densité de fraction supérieure à 1.73).

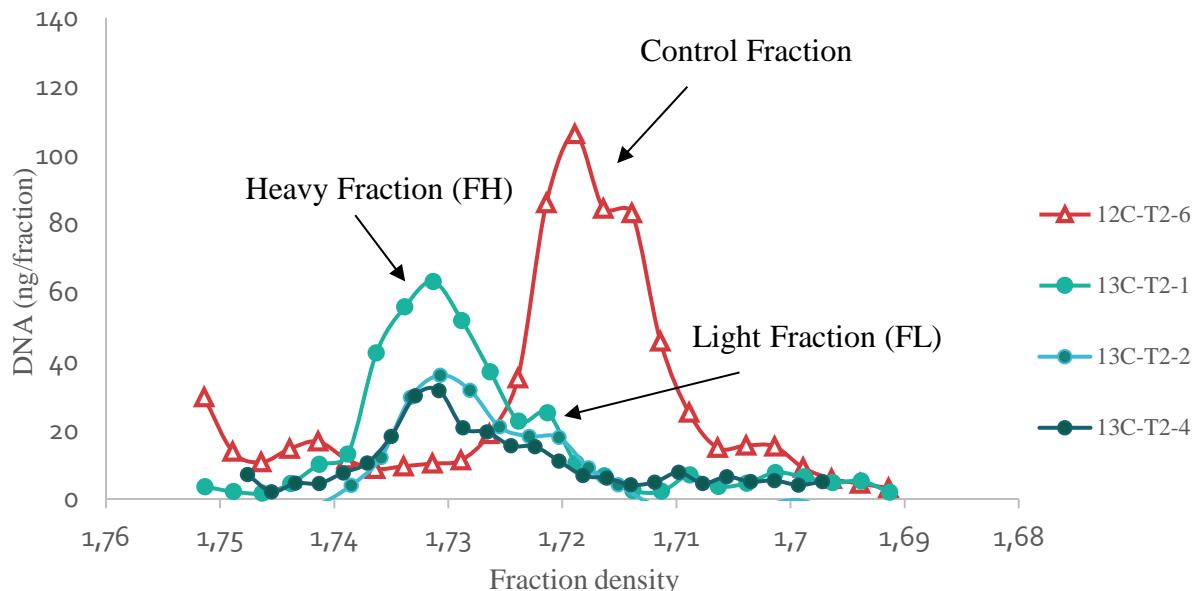


Figure 37 : Quantité d'ADN obtenue dans le gradient de chlorure de Césium après fractionnement en fonction de la densité de la fraction pour les échantillons du 13ème jour d'incubation.

Suite à cela, nous avons étudié la diversité microbienne du <sup>13</sup>C PHBV après fractionnement et du PHBV <sup>12</sup>C. Pour réaliser cette analyse nous avons séquencé la région V4-V5 de l'ADNr 16S (515-F (5'-GTG YCA GCM GCC GCG GTA A-3') et 926-R (5'-CCG YCA ATT YMT TTR AGT TT-3')) au Génoscope (CEA, Paris) et réalisé l'analyse avec le pipeline de FROGS. Les séquences ont été clustérées grâce à l'algorithme de SWARM avec une distance de 3 et les chimères ont été enlevées grâce à l'outil Vtool. Une étape de filtrage supplémentaire a été utilisée basée sur l'abondance  $5 \cdot 10^{-5}$  OTU pour ne garder que les OTU pertinents et sur plusieurs clusters non désirés (Mitochondrie, Chloroplaste et les Enterobacterales). Sur les 47 échantillons analysés, nous avons obtenus 458 OTU pour un total de 6271 séquences par échantillon.

L'alpha diversité permet de se rendre compte du phénomène de sélection qu'il y a eu cours du temps entre les fractions. La richesse, la diversité et l'équitabilité sont les plus élevés lors de l'ensemencement de l'inoculum (D0) avec des indices de 243, 4.03 et 0.76 respectivement. La fraction contrôle a vu sa richesse (De 210 à 176) et sa diversité (18 à 16) diminuées au cours du temps et par conséquent son équité aussi (0.94 à 0.54). La dynamique d'évolution sur la fraction FL et FH sur le <sup>13</sup>C PHBV est légèrement différente, la richesse et la diversité chute jusqu'au 5ème jour d'incubation (jusqu'à 154 et 2.97 respectivement) puis se stabilise tout le reste de l'expérience (Fig. 38). Ce qui laisse penser que la sélection du consortium se fait dans les 13 premiers jours d'incubation.

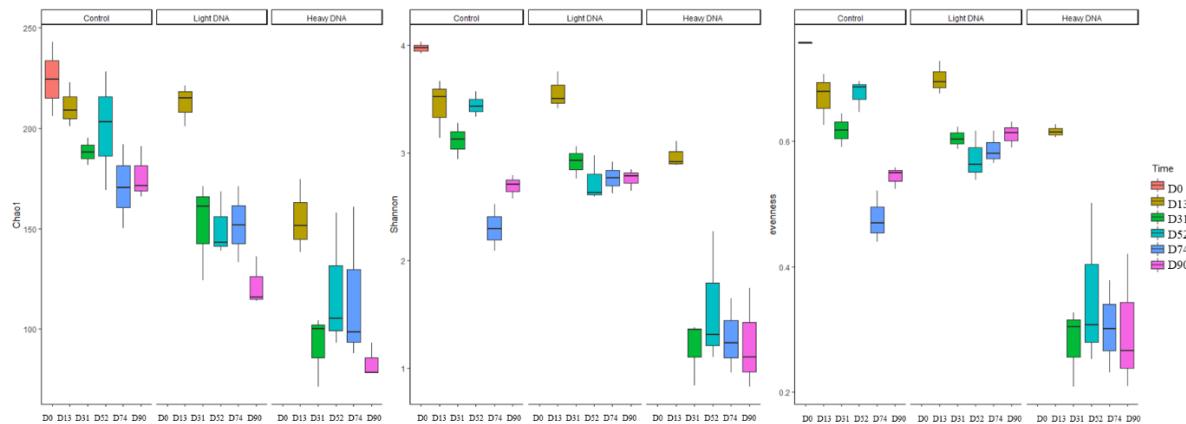


Figure 38 : Résultat de l'alpha diversité sur les trois fractions analysées au cours du temps La richesse est représentée par l'indice de Chao1, la diversité par l'indice de Shannon et l'équité par l'indice de Pielou.

Le regroupement hiérarchique révèle une évolution de la communauté bactérienne en fonction du temps et de la fraction observée (Fig. 39). Lorsque le consortium a été inoculé, il était dominé par 91 % de Proteobacteria (dont 79 % d'Alphaproteobacteria). Pendant les 13 premiers jours, les trois fractions sont restées proches selon la distance Bray Curtis (de 0,2 à 0,75), étant dominées par les Gammaproteobacteria (52 %) et les Alphaproteobacteria (29%) et les Bacteroidia (16%). Les Bactéroidia se sont développées uniquement sur la fraction contrôle et la fraction FL du PHBV <sup>13</sup>C représentant entre 4.73 et 43.48% de l'abondance au cours de l'incubation et ne représentant au maximum que 9.5% sur la fraction FH du PHBV <sup>13</sup>C.

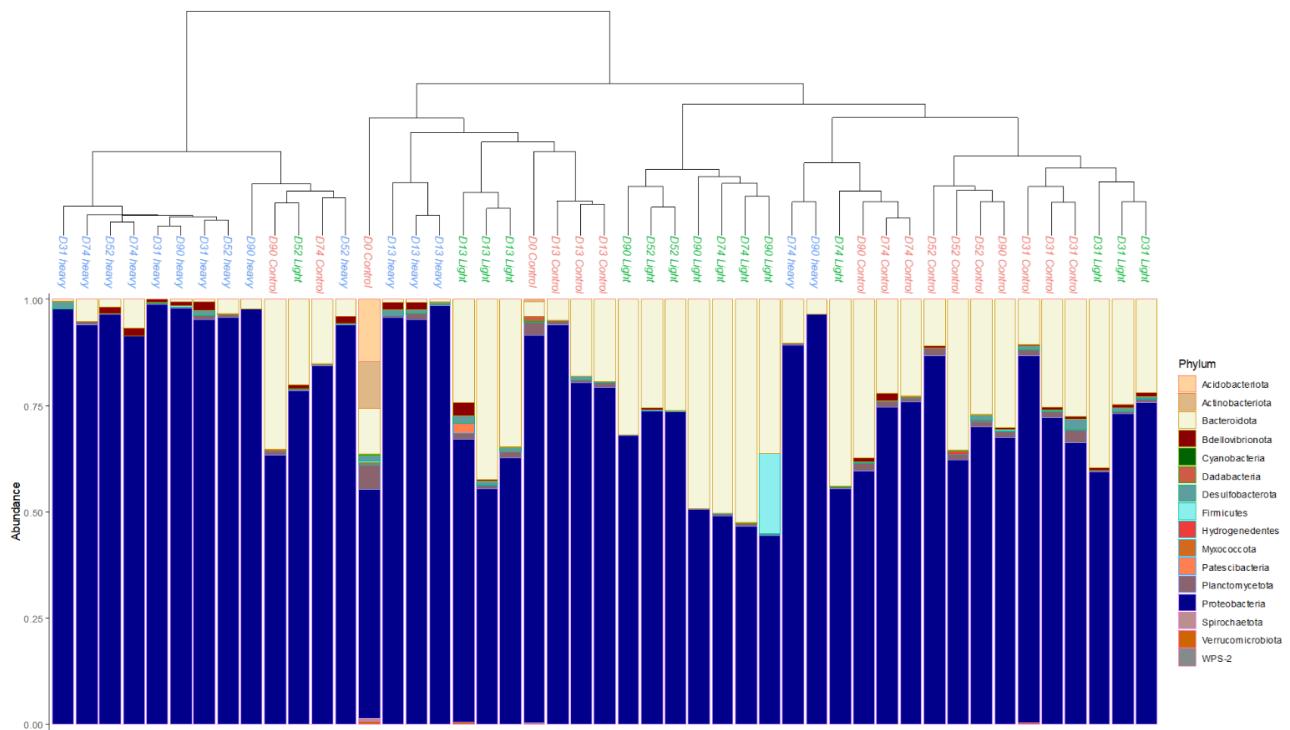


Figure 39 : Comparaison entre les regroupements hiérarchiques basé sur la similitude de Bray curtis (partie haute) et leurs affiliations taxonomiques comparant les classes en fonction de leurs abondances relatives (partie inférieure).

Sur la fraction lourde (FL), les Protéobacteria sont restés dominant tout au long de l’incubation, et principalement dominés par le genre *Marinobacter* sp. représentant près de 18 % de l’abondance totale après 13 jours d’incubation et 81 % après 90 jours. Les premières analyses au niveau du genre montrent une prédominance du genre *Marinobacter* sp. sur l’ensemble des fractions.

L’analyse taxonomique au niveau du genre bactérien a permis une identification plus précise des genres bactériens impliqués dans la dégradation effective du PHBV. On s’aperçoit notamment que des genres présents sur le PHBV n’ont pas assimilé du carbone marqué comme *Muricauda* sp., *Marixanthomonas* sp., *Lentibacter* sp., *Alcanivorax* sp. (Fig. 40) et peuvent être associés à des genres opportunistes.

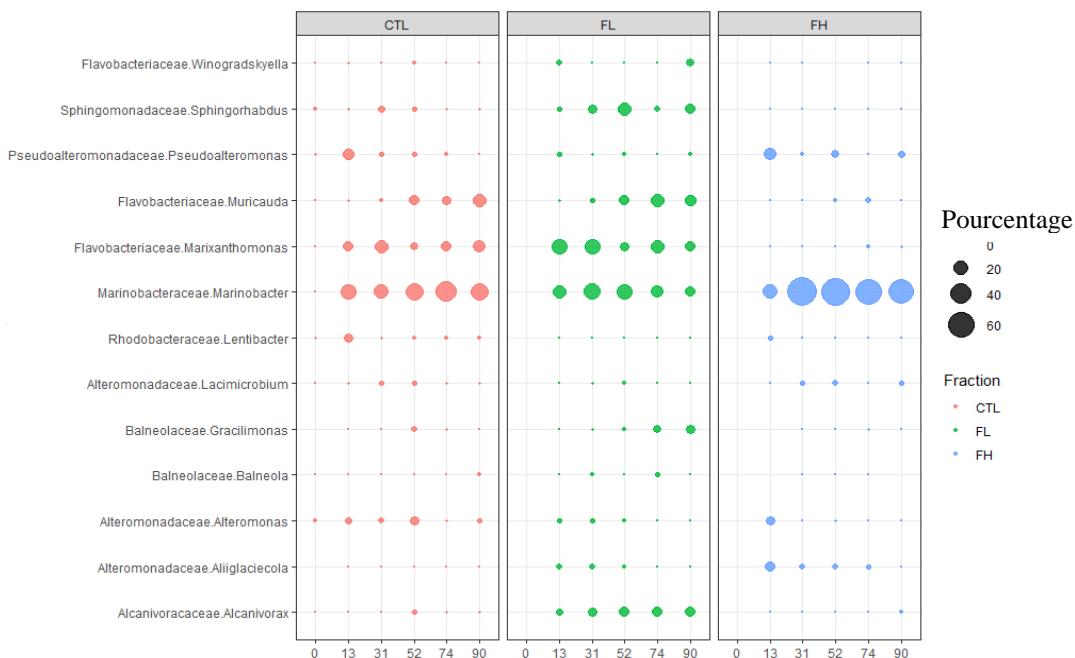


Figure 40 : Bubble plot des genres bactériens retrouvés en abondance relative (pourcentage) sur les différentes fractions en fonction du temps.

Une analyse de métagénomique a été réalisée sur les PHBV au 13<sup>ème</sup> jour d'incubation. Ce jour a été sélectionné pour sa ressemblance avec l'inoculum de départ. Le but étant d'identifier la fonction des bactéries au sein d'un consortium complexe le plus représentatif possible des communautés présentes en milieu marin. Ces premières analyses confirment la diversité trouvée avec le séquençage 16S.

Les premières analyses des résultats obtenus à la fin de cette thèse montrent une divergence claire entre les gènes trouvés dans la fraction FH et ceux trouvés dans la fraction FL. Les premières analyses semblent montrer une dominance de gènes impliqués dans le métabolisme du pyruvate, du glyoxylate et du dicarboxylate, du butanoate, qui partagent tous le cycle de  $\beta$ -oxydation et le cycle de Krebs. Il s'avère que les gènes de transporteurs sont dominants dans la fraction FH par rapport à la fraction FL, pouvant être un indicateur des gènes pouvant limiter la biodégradation du PHBV. Etonnamment, aucun gène se rapportant à des dépolymérasées n'a été abondant dans la fraction FH, lors de cette première analyse. Une enzyme impliquée dans la biosynthèse des acides gras en impliquant l'acetyl-coA a été mise en évidence sur la fraction FH, pouvant confirmer l'implication du cycle de Krebs dans la dégradation du PHBV (Fig. 41).

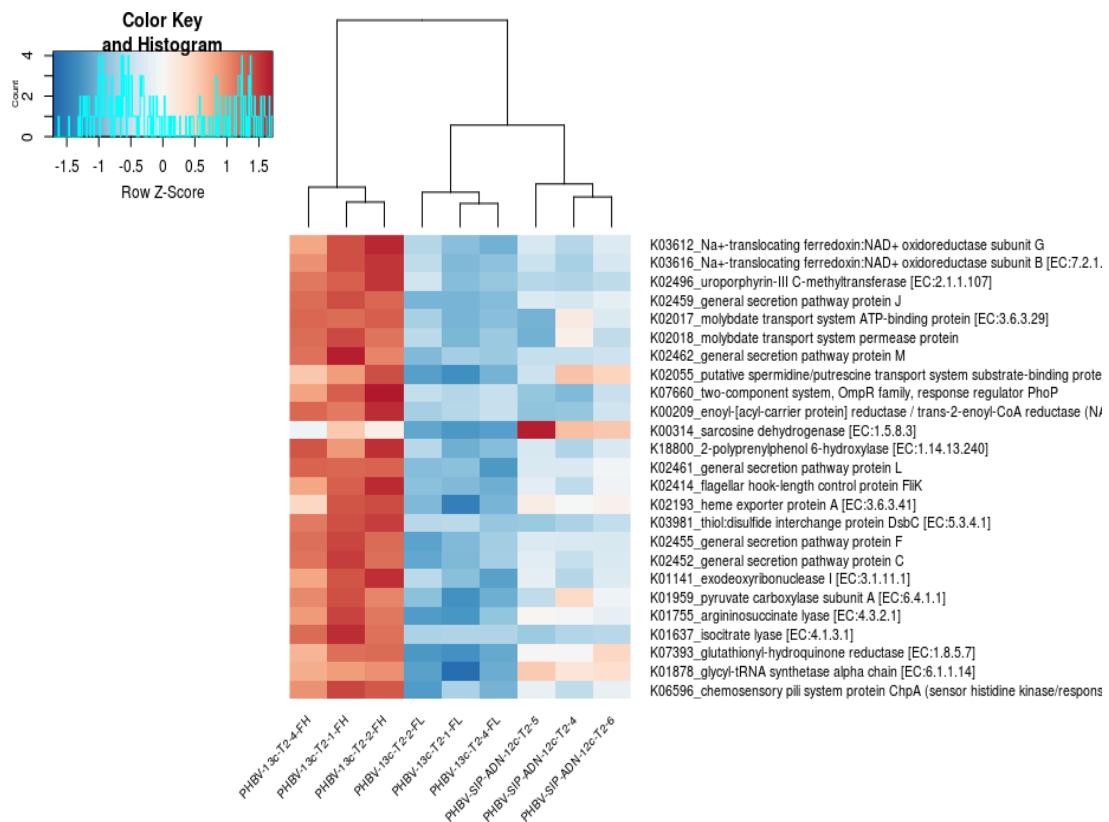


Figure 41 : Histogramme des 25 gènes différenciant la fraction haute (FH), la fraction légère (FL), et la fraction contrôle (<sup>12</sup>C).

L’analyse de ces résultats reste encore incomplète et une analyse plus poussée sera nécessaire pour établir les liens entre le génome des bactéries impliquées dans la dégradation du PHBV (Fraction FH) et celles n’étant pas impliquées dans la biodégradation (FL).

Dans la littérature les analyses métagénomiques sur la plastisphère restent rares, seuls Bryant *et al.* (2016) et Pinnell and Turner (2019) ont utilisé cette approche sur des communautés de la plastisphère. Ces études ont permis de mettre en évidence que les communautés de la plastisphère étaient enrichis en enzyme spécifique (tels que la dépolymérase sur les PHA ou système de sécrétion sur les plastiques conventionnels).

Bien que coûteuse, ce type d’analyse associant une approche taxonomique et fonctionnelle des communautés microbiennes se révèle essentielle pour comprendre le processus de biodégradation des plastiques et identifier les enzymes clefs impliqués dans ce phénomène.

L’analyse fonctionnelle permet de s’affranchir des biais de laboratoire, et peut permettre l’étude de communautés viables non cultivables et permettrait de prédire le potentiel de

biodégradation d'un polymère *in situ*. Elle permet un cadre puissant d'étude des communautés fonctionnelles qui devraient permettre d'ouvrir de nouvelles directions d'études dans le domaine des biotechnologies.

## 2.2. Enjeux pour une application en biotechnologie

Les microorganismes sont les principales sources de biocatalyseurs qui sont essentiels pour des applications industrielles. L'augmentation des connaissances dans le domaine de la métagénomique est une aubaine pour des futures solutions biotechnologiques.

Cette thèse a exploré le potentiel génétique de la souche *Alteromonas* sp. sur sa biodégradation du PHBV (grâce à la présence de PhaZ) et sa potentielle activité de biosynthèse (grâce à la présence de la PhaC). Cela a permis de générer de nouvelles connaissances sur cette souche et ses voies métaboliques impliquées le métabolisme du PHBV. A présent, il faudrait envisager une validation expérimentale en laboratoire des prédictions menées sur la base de l'étude du génome. Cela implique de caractériser l'expression génétique de *phaZ*, l'activité de la PhaZ, son substrat et son produit de réaction.

L'ingénierie des protéines pourrait permettre une modification des protéines en augmentant l'activité, en modifiant sa spécificité au substrat ou en augmentant la stabilité de l'enzyme dans des conditions bien définies (température, pH, solvants). Cependant, la modification génétique d'enzymes, la purification et la production à grande échelle demandent un développement de méthode pouvant être fastidieux. Un bel exemple de cette ingénierie de protéine concerne la PET- dépolymérase présente naturellement chez *Ideonella sakaiensis*. L'étude menée en 2020, a transformé génétiquement l'enzyme en modifiant le site de liaison de l'enzyme au substrat afin d'augmenter sa stabilité thermique et a permis d'obtenir une dépolymérisation du PET de 90 % au lieu de 31 % naturellement (Tournier *et al.* 2020). Cela ouvre donc de nouvelles perspectives de recyclage à l'infini pour le PET, plastique jusqu'alors limité dans les cycles de recyclage.

## 2.3. Evolution des normes de biodégradation des plastiques en mer : suivi temporel et multifactoriel

Actuellement, les normes de biodégradation en vigueur ne permettent actuellement pas de caractériser la biodégradation des plastiques en mer. Nos résultats ont montré qu'en se basant uniquement sur la respirométrie, il y a un risque d'une mauvaise interprétation des résultats. Comme nous l'avons observé lors de nos expériences, les différents consortia continuent à avoir une activité bactérienne après 10 jours après transfert en milieu minimum sans autre source de carbone que le polymère, même lorsqu'il ne présente pas d'activité de biodégradation (cas du PP). Cette activité a été attribuée à l'utilisation de la matière organique par le biofilm et non au carbone du polymère. De plus, nos analyses de diversité microbienne ont mis en évidence une dominance des cyanobactéries sur les plastiques conventionnels *in situ*. Ces deux observations remettent en question les normes actuelles qui se basent uniquement que les paramètres de respirométrie. Plusieurs revues scientifiques ont déjà fait état de cette faiblesse dans les normes actuelles (Harrison *et al.* 2018; Jacquin *et al.* 2019).

Les travaux de cette thèse s'appuient sur plusieurs paramètres pour caractériser la biodégradation des polymères étudiés. Tout d'abord, l'incubation en milieu contrôlé sans autre source de carbone sur une période d'incubation longue a permis de s'affranchir de l'utilisation de la matière organique par le consortium (Expérience : chapitre 3). Après avoir constaté une consommation de la matière organique pendant près de 15 jours, nous avons fait le choix d'inoculer un consortium bactérien (provenant du biofilm mature détaché sur polymère) sur des plastiques vierges et stériles n'ayant pas séjournés en milieu ouvert auparavant (Expérience : perspective). Ensuite, nous avons multiplié les paramètres permettant de suivre le processus de biodégradation : tout d'abord nous avons suivi l'activité bactérienne grâce à l'incorporation de leucine tritiée et à sa consommation d'oxygène au cours du temps. Puis dans un second temps en fin d'incubation nous avons observé l'impact de l'activité bactérienne sur le polymère grâce à une mesure de perte de poids (en mg) et une observation de sa surface en microscopie électronique. Enfin la méthode du marquage isotopique ( $^{13}\text{C}$  PHBV) semble être une preuve ultime pour observer l'assimilation du carbone du polymère par les microorganismes.

Nous avons aussi testé en laboratoire d'autres suivis de paramètres tels que la mesure de l'ATP contenu dans le cytoplasme bactérien tout au long de nos incubations en milieu minimum, comme cela a été utilisé dans la norme AFNOR AC T 51-808 (Fontanella *et al.*

2010). Cette mesure s'est révélée peu fiable et non concordante avec les autres paramètres de suivi (production bactérienne et oxygène) tout au long de notre incubation en milieu minimum. Les tentatives d'amélioration de protocole n'ont pas permis d'utiliser cette méthode comme un indicatrice de la biodégradation.

Il serait donc intéressant de faire évoluer les normes actuelles régissant l'environnement marin pour prendre en compte tous les paramètres de l'environnement pouvant influencer la biodégradation des plastiques en mer. L'utilisation d'un consortium marin et non artificiel de laboratoire, d'un milieu contrôlé sans source de carbone et la multiplication de suivi de paramètres pluridisciplinaires sont des pistes de réflexion à mener.

## Références

### -A-

- Acinas SG, Antón J, and Rodríguez-Valera F. 1999. Diversity of Free-Living and Attached Bacteria in Offshore Western Mediterranean Waters as Depicted by Analysis of Genes Encoding 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* **65**: 514–22.
- Ali I and Jamil N. 2016. Polyhydroxyalkanoates: Current applications in the medical field. *Front Biol* **11**: 19–27.
- Alshehrei F. 2017. Biodegradation of Synthetic and Natural Plastic by Microorganisms. *Journal of Applied & Environmental Microbiology, Journal of Applied & Environmental Microbiology* **5**: 8–19.
- Amaral-Zettler LA, Zettler ER, and Mincer TJ. 2020. Ecology of the plastisphere. *Nat Rev Microbiol* **18**: 139–51.
- Amaral-Zettler LA, Zettler ER, Slikas B, et al. 2015. The biogeography of the Plastisphere: implications for policy. *Frontiers in Ecology and the Environment* **13**: 541–6.
- Amirul AA, Ramachandran H, Huong K-H, and Kannusamy S. 2015. Microbial-based polyhydroxyalkanoates: upstream and downstream processing.
- Anderson AJ and Dawes EA. 1990. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol Rev* **54**: 450–72.
- Anderson JM and Shive MS. 2012. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Advanced Drug Delivery Reviews* **64**: 72–82.
- Arias-Andres M, Klümper U, Rojas-Jimenez K, and Grossart H-P. 2018. Microplastic pollution increases gene exchange in aquatic ecosystems. *Environ Pollut* **237**: 253–61.
- Arthur C, baker J, and Bamford H. 2009. Proceedings of the International Research Workshop on the Occurrence, Effects, and Fate of Microplastic Marine Debris.
- Ashby RD, Solaiman DKY, and Foglia TA. 2005. Synthesis of short-/medium-chain-length poly(hydroxyalkanoate) blends by mixed culture fermentation of glycerol. *Biomacromolecules* **6**: 2106–12.
- Ašmonaitė G, Larsson K, Undeland I, et al. 2018. Size Matters: Ingestion of Relatively Large Microplastics Contaminated with Environmental Pollutants Posed Little Risk for Fish Health and Fillet Quality. *Environ Sci Technol* **52**: 14381–91.
- Auta H, Emenike C, and Fauziah SH. 2017. Distribution and importance of microplastics in the marine environment: A review of the sources, fate, effects, and potential solutions. *Environment international* **102**.

Ayub ND, Tribelli PM, and López NI. 2009. Polyhydroxyalkanoates are essential for maintenance of redox state in the Antarctic bacterium *Pseudomonas* sp. 14-3 during low temperature adaptation. *Extremophiles* **13**: 59–66.

## -B-

Bachmann BM and Seebach D. 1999. Investigation of the Enzymatic Cleavage of Diastereomeric Oligo(3-hydroxybutanoates) Containing Two to Eight HB Units. A Model for the Stereoselectivity of PHB Depolymerase from *Alcaligenes faecalis* T1. *Macromolecules* **32**: 1777–84.

Barnes DKA, Galgani F, Thompson RC, and Barlaz M. 2009. Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **364**: 1985–98.

Basili M, Quero GM, Giovannelli D, et al. 2020. Major Role of Surrounding Environment in Shaping Biofilm Community Composition on Marine Plastic Debris. *Front Mar Sci* **7**.

Bergmann M, Tekman MB, and Gutow L. 2017. Sea change for plastic pollution. *Nature* **544**: 297–297.

Bianchi CN and Morri C. 2000. Marine Biodiversity of the Mediterranean Sea: Situation, Problems and Prospects for Future Research. *Marine Pollution Bulletin* **40**: 367–76.

Boesel LF, Meur SL, Thöny-Meyer L, and Ren Q. 2014. The effect of molecular weight on the material properties of biosynthesized poly(4-hydroxybutyrate). *International Journal of Biological Macromolecules* **71**: 124–30.

Bogaert JC CP. 2000. Poly(lactic acids): A potential solution to plastic waste dilemma. *153*: 287–303.

Boland RC and Donohue MJ. 2003. Marine debris accumulation in the nearshore marine habitat of the endangered Hawaiian monk seal, *Monachus schauinslandi* 1999-2001. *Mar Pollut Bull* **46**: 1385–94.

Boucher J and Friot D. 2017. Primary microplastics in the oceans: A global evaluation of sources. IUCN International Union for Conservation of Nature.

Boucher J and Friot D. 2020. Microplastiques primaires dans les océans. IUCN, International Union for Conservation of Nature.

Brandão ML, Braga KM, and Luque JL. Marine debris ingestion by Magellanic penguins, *Spheniscus magellanicus* (Aves: Sphenisciformes), from the Brazilian coastal zone. *Marine Pollution Bulletin* **62**: 2246–9.

Briassoulis D. 2007. Analysis of the mechanical and degradation performances of optimised agricultural biodegradable films. *Polymer Degradation and Stability* **92**: 1115–32.

- Browne MA, Niven SJ, Galloway TS, *et al.* 2013. Microplastic Moves Pollutants and Additives to Worms, Reducing Functions Linked to Health and Biodiversity. *Current Biology* **23**: 2388–92.
- Bryant JA, Clemente TM, Viviani DA, *et al.* 2016. Diversity and Activity of Communities Inhabiting Plastic Debris in the North Pacific Gyre. *mSystems* **1**.
- Buchholz O. New market data 2019: Bioplastics industry shows dynamic growth. *European Bioplastics eV*.
- Butterworth A, C B, and Clegg I. 2012. Marine debris: a global picture of the impact on animal welfare and of animal-focused solutions.

## -C-

- Campani T, Baini M, Giannetti M, *et al.* 2013. Presence of plastic debris in loggerhead turtle stranded along the Tuscany coasts of the Pelagos Sanctuary for Mediterranean Marine Mammals (Italy). *Marine Pollution Bulletin* **74**: 225–30.
- Carbery M, O'Connor W, and Palanisami T. 2018. Trophic transfer of microplastics and mixed contaminants in the marine food web and implications for human health. *Environ Int* **115**: 400–9.
- Cassoff R, Moore K, McLellan W, *et al.* 2011. Lethal entanglement in baleen whales. *Diseases of aquatic organisms* **96**: 175–85.
- Castro-Sowinski S, Burdman S, Matan O, and Okon Y. 2010. Natural Functions of Bacterial Polyhydroxyalkanoates. In: Chen GG-Q (Ed). *Plastics from Bacteria*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Chang H-F, Chang W-C, and Tsai C-Y. 2012. Synthesis of poly(3-hydroxybutyrate/3-hydroxyvalerate) from propionate-fed activated sludge under various carbon sources. *Bioresour Technol* **113**: 51–7.
- Chapron L, Peru E, Engler A, *et al.* 2018. Macro- and microplastics affect cold-water corals growth, feeding and behaviour. *Scientific Reports* **8**: 1–8.
- Chek MF, Hiroe A, Hakoshima T, *et al.* 2019. PHA synthase (PhaC): interpreting the functions of bioplastic-producing enzyme from a structural perspective. *Applied Microbiology and Biotechnology* **103**.
- Chek MF, Kim S-Y, Mori T, *et al.* 2017. Structure of polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase PhaC from Chromobacterium sp. USM2, producing biodegradable plastics. *Sci Rep* **7**.
- Chen Q, Reisser J, Cunsolo S, *et al.* 2018. Pollutants in Plastics within the North Pacific Subtropical Gyre. *Environ Sci Technol* **52**: 446–56.
- Chiba S, Saito H, Fletcher R, *et al.* 2018. Human footprint in the abyss: 30 year records of deep-sea plastic debris. *Marine Policy* **96**: 204–12.

- Choy CA, Robison BH, Gagne TO, *et al.* 2019. The vertical distribution and biological transport of marine microplastics across the epipelagic and mesopelagic water column. *Scientific Reports* **9**: 7843.
- Chronopoulou P-M, Sanni GO, Silas-Olu DI, *et al.* 2015. Generalist hydrocarbon-degrading bacterial communities in the oil-polluted water column of the North Sea. *Microbial Biotechnology* **8**: 434–47.
- Ciesielski S, Możejko J, and Pisutpaisal N. 2015. Plant oils as promising substrates for polyhydroxyalkanoates production. *Journal of Cleaner Production* **106**: 408–21.
- Claessens M, De Meester S, Van Landuyt L, *et al.* 2011. Occurrence and distribution of microplastics in marine sediments along the Belgian coast. *Mar Pollut Bull* **62**: 2199–204.
- Clukey KE, Lepczyk CA, Balazs GH, *et al.* 2017. Investigation of plastic debris ingestion by four species of sea turtles collected as bycatch in pelagic Pacific longline fisheries. *Marine Pollution Bulletin* **120**: 117–25.
- Codina-García M, Militão T, Moreno J, and González-Solís J. 2013. Plastic debris in Mediterranean seabirds. *Marine Pollution Bulletin* **77**: 220–6.
- Colabuono FI, Barquete V, Domingues BS, and Montone RC. 2009. Plastic ingestion by Procellariiformes in Southern Brazil. *Marine Pollution Bulletin* **58**: 93–6.
- Cole M, Lindeque P, Fileman E, *et al.* 2013. Microplastic Ingestion by Zooplankton. *Environ Sci Technol* **47**: 6646–55.
- Collignon A, Hecq J-H, Glagani F, *et al.* 2012. Neustonic microplastic and zooplankton in the North Western Mediterranean Sea. *Mar Pollut Bull* **64**: 861–4.
- Cosgrove L, McGeechan PL, Robson GD, and Handley PS. 2007. Fungal Communities Associated with Degradation of Polyester Polyurethane in Soil. *Applied and Environmental Microbiology* **73**: 5817–24.
- Cozar A, Echevarria F, Gonzalez-Gordillo JI, *et al.* 2014. Plastic debris in the open ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**: 10239–44.
- Cózar A, Sanz-Martín M, Martí E, *et al.* 2015. Plastic Accumulation in the Mediterranean Sea. *PLOS ONE* **10**: e0121762.
- Crespo BG, Pommier T, Fernández-Gómez B, and Pedrós-Alió C. 2013. Taxonomic composition of the particle-attached and free-living bacterial assemblages in the Northwest Mediterranean Sea analyzed by pyrosequencing of the 16S rRNA. *Microbiologyopen* **2**: 541–52.

- Dang H and Lovell CR. 2016. Microbial Surface Colonization and Biofilm Development in Marine Environments. *Microbiol Mol Biol Rev* **80**: 91–138.
- De Tender CA, Devriese LI, Haegeman A, *et al.* 2015. Bacterial Community Profiling of Plastic Litter in the Belgian Part of the North Sea. *Environ Sci Technol* **49**: 9629–38.
- De Tender C, Devriese LI, Haegeman A, *et al.* 2017. Temporal Dynamics of Bacterial and Fungal Colonization on Plastic Debris in the North Sea. *Environ Sci Technol* **51**: 7350–60.
- Debroas D, Mone A, and Ter Halle A. 2017. Plastics in the North Atlantic garbage patch: A boat-microbe for hitchhikers and plastic degraders. *Sci Total Environ* **599–600**: 1222–32.
- Delacuvellerie A, Cyriaque V, Gobert S, *et al.* 2019. The plastisphere in marine ecosystem hosts potential specific microbial degraders including Alcanivorax borkumensis as a key player for the low-density polyethylene degradation. *Journal of Hazardous Materials* **380**: 120899.
- Dobretsov S. 2010. Marine Biofilms. In: Biofouling.
- Doi Y, Kanesawa Y, Kunioka M, and Saito T. 1990. Biodegradation of microbial copolymers: poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate). *Macromolecules* **23**: 26–31.
- Douarche C, Bailleux V, Even C, *et al.* 2018. La mécanique des biofilms à la surface de liquides. *Reflets phys*: 20–4.
- Dunford EA and Neufeld JD. 2010. DNA Stable-Isotope Probing (DNA-SIP). *J Vis Exp*.
- Dussud C and Ghiglione J-F. 2014. Bacterial degradation of synthetic plastics. *Marine litter in the Mediterranean and Black Seas CIESM workshop Monographs*: 43–8.
- Dussud C, Hudec C, George M, *et al.* 2018a. Colonization of Non-biodegradable and Biodegradable Plastics by Marine Microorganisms. *Front Microbiol* **9**.
- Dussud C, Meistertzheim AL, Conan P, *et al.* 2018b. Evidence of niche partitioning among bacteria living on plastics, organic particles and surrounding seawaters. *Environmental Pollution* **236**: 807–16.
- Eerkes-Medrano D, Thompson RC, and Aldridge DC. 2015. Microplastics in freshwater systems: A review of the emerging threats, identification of knowledge gaps and prioritisation of research needs. *Water Research* **75**: 63–82.
- Egger M, Sulu-Gambari F, and Lebreton L. 2020. First evidence of plastic fallout from the North Pacific Garbage Patch. *Scientific Reports* **10**: 7495.

-E-

- Eich A, Mildnerger T, Laforsch C, and Weber M. 2015. Biofilm and Diatom Succession on Polyethylene (PE) and Biodegradable Plastic Bags in Two Marine Habitats: Early Signs of Degradation in the Pelagic and Benthic Zone? *PLoS One* **10**.
- Elifantz H, Horn G, Ayon M, et al. 2013. Rhodobacteraceae are the key members of the microbial community of the initial biofilm formed in Eastern Mediterranean coastal seawater. *FEMS Microbiol Ecol* **85**: 348–57.
- Eriksen M, Lebreton LCM, Carson HS, et al. 2014. Plastic Pollution in the World's Oceans: More than 5 Trillion Plastic Pieces Weighing over 250,000 Tons Afloat at Sea. *PLOS ONE* **9**: e111913.
- Eriksen M, Maximenko N, Thiel M, et al. 2013. Plastic pollution in the South Pacific subtropical gyre. *Marine Pollution Bulletin* **68**: 71–6.
- Eubeler JP, Zok S, Bernhard M, and Knepper TP. 2009. Environmental biodegradation of synthetic polymers I. Test methodologies and procedures. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **28**: 1057–72.
- Evangelou N, Grythe H, Klimont Z, et al. 2020. Atmospheric transport is a major pathway of microplastics to remote regions. *Nature Communications* **11**: 3381.
- Eyheraguibel B, Traikia M, Fontanella S, et al. 2017. Characterization of oxidized oligomers from polyethylene films by mass spectrometry and NMR spectroscopy before and after biodegradation by a *Rhodococcus rhodochrous* strain. *Chemosphere* **184**: 366–74.

## -F-

- Faure F, Demars C, Wieser O, et al. 2015. Plastic pollution in Swiss surface waters: Nature and concentrations, interaction with pollutants. *Environmental Chemistry* **12**.
- Fontanella S, Bonhomme S, Koutny M, et al. 2010. Comparison of the biodegradability of various polyethylene films containing pro-oxidant additives. *Polymer Degradation and Stability* **95**: 1011–21.

- Fossi MC, Panti C, Guerranti C, et al. 2012. Are baleen whales exposed to the threat of microplastics? A case study of the Mediterranean fin whale (*Balaenoptera physalus*). *Mar Pollut Bull* **64**: 2374–9.

## -G-

- Gajendiran A, Krishnamoorthy S, and Abraham J. 2016. Microbial degradation of low-density polyethylene (LDPE) by *Aspergillus clavatus* strain JASK1 isolated from landfill soil. *3 Biotech* **6**.
- Gall SC and Thompson RC. 2015. The impact of debris on marine life. *Marine Pollution Bulletin* **92**: 170–9.

- Gerigny O, Brun M, Fabri MC, *et al.* 2019. Seafloor litter from the continental shelf and canyons in French Mediterranean Water: Distribution, typologies and trends. *Marine Pollution Bulletin* **146**: 653–66.
- Gewert B, M. Plassmann M, and MacLeod M. 2015. Pathways for degradation of plastic polymers floating in the marine environment. *Environmental Science: Processes & Impacts* **17**: 1513–21.
- Geyer R, Jambeck JR, and Law KL. 2017. Production, use, and fate of all plastics ever made. *Science Advances* **3**: e1700782.
- Ghiglione J-F, Galand PE, Pommier T, *et al.* 2012. Pole-to-pole biogeography of surface and deep marine bacterial communities. *PNAS* **109**: 17633–8.
- Ghorpade VM. 2001. Laboratory composting of extruded poly(lactic acid) sheets. *Bioresour Technol* **76**: 57–61.
- Goh L-K, Purama RK, and Sudesh K. 2014. Enhancement of stress tolerance in the polyhydroxyalkanoate producers without mobilization of the accumulated granules. *Appl Biochem Biotechnol* **172**: 1585–98.
- Golik A. 1997. Debris in The Mediterranean Sea: Types, Quantities, and Behavior. In: Coe JM, Rogers DB (Eds). *Marine Debris*. New York, NY: Springer New York.
- Gonda KE, Jendrossek D, and Molitoris HP. 2000. Fungal degradation of the thermoplastic polymer poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid (PHB) under simulated deep sea pressure. In: Liebezeit G, Dittmann S, Kröncke I (Eds). *Life at Interfaces and Under Extreme Conditions*. Dordrecht: Springer Netherlands.
- Göpferich A. 1996. Mechanisms of polymer degradation and erosion. *Biomaterials* **17**: 103–14.
- Gorke JT, Okrasa K, Louwagie A, *et al.* 2007. Enzymatic synthesis of poly(hydroxyalkanoates) in ionic liquids. *Journal of Biotechnology* **132**: 306–13.
- Gravouil K, Ferru-Clément R, Colas S, *et al.* 2017. Transcriptomics and Lipidomics of the Environmental Strain *Rhodococcus ruber* Point out Consumption Pathways and Potential Metabolic Bottlenecks for Polyethylene Degradation. *Environ Sci Technol* **51**: 5172–81.
- Green DS. 2020. Biological and Ecological Impacts of Plastic Debris in Aquatic Ecosystems. In: Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Griebel RJ and Merrick JM. 1971. Metabolism of Poly- $\beta$ -Hydroxybutyrate: Effect of Mild Alkaline Extraction on Native Poly- $\beta$ -Hydroxybutyrate Granules1. *J Bacteriol* **108**: 782–9.
- Grillo R, Pereira A do ES, Melo NFS de, *et al.* 2011. Controlled release system for ametryn using polymer microspheres: Preparation, characterization and release kinetics in water. *Journal of Hazardous Materials* **186**: 1645–51.

Gu J-G and Gu J-D. 2005. Methods Currently Used in Testing Microbiological Degradation and Deterioration of a Wide Range of Polymeric Materials with Various Degree of Degradability: A Review. *J Polym Environ* **13**: 65–74.

## -H-

Hablot E, Bordes P, Pollet E, and Avérous L. 2008. Thermal and thermo-mechanical degradation of poly(3-hydroxybutyrate)-based multiphase systems. *Polymer Degradation and Stability* **93**: 413–21.

Halle A ter, Ladirat L, Gendre X, et al. 2016. Understanding the Fragmentation Pattern of Marine Plastic Debris. *Environ Sci Technol* **50**: 5668–75.

Hardesty BD and Wilcox C. 2020. For decades, scientists puzzled over the plastic ‘missing’ from our oceans – but now it’s been found.

Harris PT. 2020. The fate of microplastic in marine sedimentary environments: A review and synthesis. *Marine Pollution Bulletin* **158**: 111398.

Harrison JP, Boardman C, O’Callaghan K, et al. 2018. Biodegradability standards for carrier bags and plastic films in aquatic environments: a critical review. *Royal Society Open Science* **5**: 171792.

Harrison JP, Schratzberger M, Sapp M, and Osborn AM. 2014. Rapid bacterial colonization of low-density polyethylene microplastics in coastal sediment microcosms. *BMC Microbiology* **14**: 232.

Hayward AC, Forsyth WGC and Roberts JB. 1959. Synthesis and Breakdown of Poly- $\beta$ -Hydroxybutyric Acid by Bacteria. *Microbiology*, **20**: 510–8.

Henderson JR. 2001. A Pre- and Post-MARPOL Annex V Summary of Hawaiian Monk Seal Entanglements and Marine Debris Accumulation in the Northwestern Hawaiian Islands, 1982–1998. *Marine Pollution Bulletin* **42**: 584–9.

Hirai H, Takada H, Ogata Y, et al. 2011. Organic micropollutants in marine plastics debris from the open ocean and remote and urban beaches. *Mar Pollut Bull* **62**: 1683–92.

Ho BT, Roberts TK, and Lucas S. 2018. An overview on biodegradation of polystyrene and modified polystyrene: the microbial approach. *Critical Reviews in Biotechnology* **38**: 308–20.

Hugenholtz P, Hooper SD, and Kyrpides NC. 2009. Focus: Synergistetes. *Environ Microbiol* **11**: 1327–9.

Huu Phong T, Van Thuoc D, and Sudesh K. 2016. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate) and its copolymers by Yangia sp. ND199 from different carbon sources. *International Journal of Biological Macromolecules* **84**: 361–6.

**-I-**

İpekoglu B, Böke H, and Çizer Ö. 2007. Assessment of material use in relation to climate in historical buildings. *Building and Environment* **42**: 970–8.

Ishigaki T, Sugano W, Nakanishi A, et al. 2004. The degradability of biodegradable plastics in aerobic and anaerobic waste landfill model reactors. *Chemosphere* **54**: 225–33.

Isobe A, Uchiyama-Matsumoto K, Uchida K, and Tokai T. 2017. Microplastics in the Southern Ocean. *Marine Pollution Bulletin* **114**: 623–6.

Ivar do Sul JA and Costa MF. 2014. The present and future of microplastic pollution in the marine environment. *Environmental Pollution* **185**: 352–64.

Ivar do Sul JA, Spengler Å, and Costa MF. 2009. Here, there and everywhere. Small plastic fragments and pellets on beaches of Fernando de Noronha (Equatorial Western Atlantic). *Mar Pollut Bull* **58**: 1236–8.

**-J-**

Jacquin J, Cheng J, Odobel C, et al. 2019. Microbial Ecotoxicology of Marine Plastic Debris: A Review on Colonization and Biodegradation by the “Plastisphere.” *Front Microbiol* **10**.

Jambeck JR, Geyer R, Wilcox C, et al. 2015. Marine pollution. Plastic waste inputs from land into the ocean. *Science* **347**: 768–71.

James BW, Mauchline WS, Dennis PJ, et al. 1999. Poly-3-Hydroxybutyrate in *Legionella pneumophila*, an Energy Source for Survival in Low-Nutrient Environments. *Appl Environ Microbiol* **65**: 822–7.

Jamieson AJ, Brooks LSR, Reid WDK, et al. 2019. Microplastics and synthetic particles ingested by deep-sea amphipods in six of the deepest marine ecosystems on Earth. *R Soc open sci* **6**: 180667.

Jamieson AJ, Brooks LSR, Reid WDK, et al. Microplastics and synthetic particles ingested by deep-sea amphipods in six of the deepest marine ecosystems on Earth. *Royal Society Open Science* **6**: 180667.

Jendrossek D. 2005. Extracellular Polyhydroxyalkanoate (PHA) Depolymerases: The Key Enzymes of PHA Degradation. In: *Biopolymers Online*. American Cancer Society.

Jendrossek D. 2007. Peculiarities of PHA granules preparation and PHA depolymerase activity determination. *Appl Microbiol Biotechnol* **74**: 1186–96.

Jendrossek D and Handrick R. 2002. Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates. *Annu Rev Microbiol* **56**: 403–32.

Jendrossek D and Pfeiffer D. 2014. New insights in the formation of polyhydroxyalkanoate granules (carbonosomes) and novel functions of poly(3-hydroxybutyrate). *Environ Microbiol* **16**: 2357–73.

Jin HM, Kim JM, Lee HJ, et al. 2012. Alteromonas As a Key Agent of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Biodegradation in Crude Oil-Contaminated Coastal Sediment. *Environ Sci Technol* **46**: 7731–40.

## -K-

Kadouri D, Jurkevitch E, Okon Y, and Castro-Sowinski S. 2005. Ecological and Agricultural Significance of Bacterial Polyhydroxyalkanoates. *Critical reviews in microbiology* **31**: 55–67.

Kaposi KL, Mos B, Kelaher BP, and Dworjanyn SA. 2014. Ingestion of Microplastic Has Limited Impact on a Marine Larva. *Environ Sci Technol* **48**: 1638–45.

Kellerhals MB, Kessler B, Witholt B, et al. 2000. Renewable Long-Chain Fatty Acids for Production of Biodegradable Medium-Chain-Length Polyhydroxyalkanoates (mcl-PHAs) at Laboratory and Pilot Plant Scales. *Macromolecules* **33**: 4690–8.

Kertesz MA, Kawasaki A, and Stolz A. 2019. Aerobic Hydrocarbon-Degrading Alphaproteobacteria: Sphingomonadales. In: McGenity TJ (Ed). *Taxonomy, Genomics and Ecophysiology of Hydrocarbon-Degrading Microbes*. Cham: Springer International Publishing.

Keshavarz T and Roy I. 2010. Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda. *Current Opinion in Microbiology* **13**: 321–6.

Kettner MT, Rojas-Jimenez K, Oberbeckmann S, et al. 2017. Microplastics alter composition of fungal communities in aquatic ecosystems. *Environmental Microbiology* **19**: 4447–59.

Knoll M, Hamm TM, Wagner F, et al. 2009. The PHA Depolymerase Engineering Database: A systematic analysis tool for the diverse family of polyhydroxyalkanoate (PHA) depolymerases. *BMC Bioinformatics* **10**: 89.

Koelmans AA, Besseling E, and Foekema EM. 2014. Leaching of plastic additives to marine organisms. *Environmental Pollution* **187**: 49–54.

Koitabashi M, Noguchi MT, Sameshima-Yamashita Y, et al. 2012. Degradation of biodegradable plastic mulch films in soil environment by phylloplane fungi isolated from gramineous plants. *AMB Express* **2**: 40.

Koller M, Atlić A, Dias M, et al. 2010. Microbial PHA Production from Waste Raw Materials. In: Chen GG-Q (Ed). *Plastics from Bacteria: Natural Functions and Applications*. Berlin, Heidelberg: Springer.

- Kooi M, Reisser J, Slat B, *et al.* 2016. The effect of particle properties on the depth profile of buoyant plastics in the ocean. *Scientific Reports* **6**: 33882.
- Koutny M, Lemaire J, and Delort A-M. 2006. Biodegradation of polyethylene films with prooxidant additives. *Chemosphere* **64**: 1243–52.
- Krueger MC, Harms H, and Schlosser D. 2015. Prospects for microbiological solutions to environmental pollution with plastics. *Appl Microbiol Biotechnol* **99**: 8857–74.
- Kühn S, Bravo Rebollo EL, and Franeker JA van. 2015. Deleterious Effects of Litter on Marine Life. In: Bergmann M, Gutow L, Klages M (Eds). *Marine Anthropogenic Litter*. Cham: Springer International Publishing.
- Kunioka M, Kawaguchi Y, and Doi Y. 1989. Production of biodegradable copolymers of 3-hydroxybutyrate and 4-hydroxybutyrate by *Alcaligenes eutrophus*. *Appl Microbiol Biotechnol* **30**: 569–73.

-L-

- Law KL, Morét-Ferguson S, Maximenko NA, *et al.* 2010. Plastic Accumulation in the North Atlantic Subtropical Gyre. *Science* **329**: 1185–8.
- Le Meur S, Zinn M, Egli T, *et al.* 2013. Poly(4-hydroxybutyrate) (P4HB) production in recombinant *Escherichia coli*: P4HB synthesis is uncoupled with cell growth. *Microbial Cell Factories* **12**: 123.
- Lebreton LC-M, Greer SD, and Borrero JC. 2012. Numerical modelling of floating debris in the world's oceans. *Mar Pollut Bull* **64**: 653–61.
- Lebreton L, Slat B, Ferrari F, *et al.* 2018. Evidence that the Great Pacific Garbage Patch is rapidly accumulating plastic. *Scientific Reports* **8**: 4666.
- Lebreton LCM, Zwet J van der, Damsteeg J-W, *et al.* 2017. River plastic emissions to the world's oceans. *Nature Communications* **8**: 1–10.
- Lee SY and Choi J. 1999. Production and degradation of polyhydroxyalkanoates in waste environment. *Waste Management* **19**: 133–9.
- Lee J-W, Nam J-H, Kim Y-H, *et al.* 2008. Bacterial communities in the initial stage of marine biofilm formation on artificial surfaces. *J Microbiol* **46**: 174–82.
- Lee H, Shim WJ, and Kwon J-H. 2014. Sorption capacity of plastic debris for hydrophobic organic chemicals. *Science of The Total Environment* **470–471**: 1545–52.
- Lee K-W, Shim WJ, Kwon OY, and Kang J-H. 2013. Size-Dependent Effects of Micro Polystyrene Particles in the Marine Copepod *Tigriopus japonicus*. *Environ Sci Technol* **47**: 11278–83.
- Leejkarpai T, Suwanmanee U, Rudeekit Y, and Mungcharoen T. 2011. Biodegradable kinetics of plastics under controlled composting conditions. *Waste Management* **31**: 1153–61.

- Lemos PC, Viana C, Salgueiro EN, *et al.* 1998. Effect of carbon source on the formation of polyhydroxyalkanoates (PHA) by a phosphate-accumulating mixed culture. *Enzyme and Microbial Technology* **22**: 662–71.
- Li Z and Loh XJ. 2015. Water soluble polyhydroxyalkanoates: future materials for therapeutic applications. *Chem Soc Rev* **44**: 2865–79.
- Li WC, Tse HF, and Fok L. 2016. Plastic waste in the marine environment: A review of sources, occurrence and effects. *Science of The Total Environment* **566–567**: 333–49.
- Liu Z, Zhu Z, Yang J, *et al.* 2019. Domain-centric dissection and classification of prokaryotic poly(3-hydroxyalkanoate) synthases. *bioRxiv*: 693432.
- Liubartseva S, Coppini G, Lecci R, and Clementi E. 2018. Tracking plastics in the Mediterranean: 2D Lagrangian model. *Marine Pollution Bulletin* **129**: 151–62.
- Lo HKA and Chan KYK. 2018. Negative effects of microplastic exposure on growth and development of *Crepidula onyx*. *Environmental Pollution* **233**: 588–95.
- Lu L, Luo T, Zhao Y, *et al.* 2019. Interaction between microplastics and microorganism as well as gut microbiota: A consideration on environmental animal and human health. *Science of The Total Environment* **667**: 94–100.
- Luengo JM, García B, Sandoval A, *et al.* 2003. Bioplastics from microorganisms. *Current Opinion in Microbiology* **6**: 251–60.
- Lusher AL, Tirelli V, O'Connor I, and Officer R. 2015. Microplastics in Arctic polar waters: the first reported values of particles in surface and sub-surface samples. *Scientific Reports* **5**: 1–9.

## -M-

- Magara G, Elia AC, Syberg K, and Khan FR. 2018. Single contaminant and combined exposures of polyethylene microplastics and fluoranthene: accumulation and oxidative stress response in the blue mussel, *Mytilus edulis*. *J Toxicol Environ Health Part A* **81**: 761–73.
- Magnin A, Hoornaert L, Pollet E, *et al.* 2018. Isolation and characterization of different promising fungi for biological waste management of polyurethanes. *Microbial Biotechnology*.
- Mata MT, Luza MF, and Riquelme CE. 2017. Production of diatom–bacteria biofilm isolated from *Seriola lalandi* cultures for aquaculture application. *Aquaculture Research* **48**: 4308–20.
- Matsuguma Y, Takada H, Kumata H, *et al.* 2017. Microplastics in Sediment Cores from Asia and Africa as Indicators of Temporal Trends in Plastic Pollution. *Arch Environ Contam Toxicol* **73**: 230–9.
- McCool GJ and Cannon MC. 2001. PhaC and PhaR Are Required for Polyhydroxyalkanoic Acid Synthase Activity in *Bacillus megaterium*. *Journal of Bacteriology* **183**: 4235–43.

- Meng D-C, Shen R, Yao H, *et al.* 2014. Engineering the diversity of polyesters. *Curr Opin Biotechnol* **29**: 24–33.
- Mergaert J, Wouters A, Anderson C, and Swings J. 1995. In situ biodegradation of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in natural waters. *Can J Microbiol* **41 Suppl 1**: 154–9.
- Merrick JM and Doudoroff M. 1964. Depolymerization of poly  $\beta$ -hydroxybutyrate by an intracellular enzyme system. *J Bacteriol* **88**: 60–71.
- Mezzina MP and Pettinari MJ. 2016. Phasins, Multifaceted Polyhydroxyalkanoate Granule-Associated Proteins. *Appl Environ Microbiol* **82**: 5060–7.
- Mezzolla V, D'Urso OF, and Poltronieri P. 2018. Role of PhaC Type I and Type II Enzymes during PHA Biosynthesis. *Polymers (Basel)* **10**.
- Mohee R, Unmar GD, Mudhoo A, and Khadoo P. 2008. Biodegradability of biodegradable/degradable plastic materials under aerobic and anaerobic conditions. *Waste Manag* **28**: 1624–9.
- Mohit V, Archambault P, Toupoint N, and Lovejoy C. 2014. Phylogenetic Differences in Attached and Free-Living Bacterial Communities in a Temperate Coastal Lagoon during Summer, Revealed via High-Throughput 16S rRNA Gene Sequencing. *Appl Environ Microbiol* **80**: 2071–83.
- Moore C, Lattin G, and Zellers A. 2005. Density of Plastic Particles found in zooplankton trawls from Coastal Waters of California to the North Pacific Central Gyre.
- Morritt D, Stefanoudis PV, Pearce D, *et al.* 2014. Plastic in the Thames: A river runs through it. *Marine Pollution Bulletin* **78**: 196–200.
- Mothes G, Ackermann J-U, and Babel W. 2004. Mole Fraction Control of Poly([R]-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHB/HV) Synthesized by Paracoccus denitrificans. *Engineering in Life Sciences* **4**: 247–51.
- Mouchi V, Chapron L, Peru E, *et al.* 2019. Long-term aquaria study suggests species-specific responses of two cold-water corals to macro-and microplastics exposure. *Environmental Pollution* **253**: 322–9.
- Moura V, Ribeiro I, Moriggi P, *et al.* 2018. The influence of surface microbial diversity and succession on microbiologically influenced corrosion of steel in a simulated marine environment. *Arch Microbiol* **200**: 1447–56.
- Możejko-Ciesielska J and Kiewisz R. 2016. Bacterial polyhydroxyalkanoates: Still fabulous? *Microbiological Research* **192**: 271–82.

**-N-**

Nomura T, Tani S, Yamamoto M, et al. 2016. Cytotoxicity and colloidal behavior of polystyrene latex nanoparticles toward filamentous fungi in isotonic solutions. *Chemosphere* **149**: 84–90.

Numata K, Yamashita K, Fujita M, et al. 2007. Adsorption and hydrolysis reactions of poly(hydroxybutyric acid) depolymerases secreted from Ralstonia pickettii T1 and *Penicillium funiculosum* onto poly[(R)-3-hydroxybutyric acid]. *Biomacromolecules* **8**: 2276–81.

**-O-**

Oberbeckmann S, Kreikemeyer B, and Labrenz M. 2018. Environmental Factors Support the Formation of Specific Bacterial Assemblages on Microplastics. *Front Microbiol* **8**.

Oberbeckmann S and Labrenz M. 2020. Marine Microbial Assemblages on Microplastics: Diversity, Adaptation, and Role in Degradation. *Annual Review of Marine Science* **12**: 209–32.

Oberbeckmann S, Osborn AM, and Duhaime MB. 2016. Microbes on a Bottle: Substrate, Season and Geography Influence Community Composition of Microbes Colonizing Marine Plastic Debris. *PLoS One* **11**.

Oberbeckmann S, Loeder MGJ, Gerdts G, and Osborn AM. 2014. Spatial and seasonal variation in diversity and structure of microbial biofilms on marine plastics in Northern European waters. *FEMS Microbiol Ecol* **90**: 478–92.

Obreca IS. 2010. controlled production and degradation of selected biomaterials. *PhD*: 42.

Oliveira M, Ribeiro A, Hylland K, and Guilhermino L. 2013. Single and combined effects of microplastics and pyrene on juveniles (0+ group) of the common goby *Pomatoschistus microps* (Teleostei, Gobiidae). *Ecological Indicators* **34**: 641–7.

Oßmann BE, Sarau G, Holtmannspötter H, et al. 2018. Small-sized microplastics and pigmented particles in bottled mineral water. *Water Research* **141**: 307–16.

**-P-**

Parkes Alex. 1866. On the properties of parkesine and its application to the arts and manufactures. *Journal of the Franklin Institute* **81**: 384–8.

Pärnänen K, Karkman A, Virta M, et al. 2015. Discovery of bacterial polyhydroxyalkanoate synthase (PhaC)-encoding genes from seasonal Baltic Sea ice and cold estuarine waters. *Extremophiles* **19**: 197–206.

Patil J and Anil A. 2005. Biofilm diatom community structure: Influence of temporal and substratum variability. *Biofouling* **21**: 189–206.

- Peeken I, Primpke S, Beyer B, *et al.* 2018. Arctic sea ice is an important temporal sink and means of transport for microplastic. *Nat Commun* **9**: 1505.
- Peña C, López S, García A, *et al.* 2014. Biosynthesis of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) with a high molecular mass by a mutant strain of Azotobacter vinelandii (OPN). *Ann Microbiol* **64**: 39–47.
- Peoples OP and Sinskey AJ. 1989. Poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) biosynthesis in Alcaligenes eutrophus H16. Identification and characterization of the PHB polymerase gene (phbC). *J Biol Chem* **264**: 15298–303.
- Pham CK, Rodríguez Y, Dauphin A, *et al.* 2017. Plastic ingestion in oceanic-stage loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) off the North Atlantic subtropical gyre. *Marine Pollution Bulletin* **121**: 222–9.
- Pinnell LJ and Turner JW. 2019. Shotgun Metagenomics Reveals the Benthic Microbial Community Response to Plastic and Bioplastic in a Coastal Marine Environment. *Front Microbiol* **10**.
- Pinto M, Langer TM, Hüffer T, *et al.* 2019. The composition of bacterial communities associated with plastic biofilms differs between different polymers and stages of biofilm succession. *PLOS ONE* **14**: e0217165.
- Pivokonsky M, Cermakova L, Novotna K, *et al.* 2018. Occurrence of microplastics in raw and treated drinking water. *Science of The Total Environment* **643**: 1644–51.
- Plastic Europe. 2019. Données du marché : PlasticsEurope <https://www.plasticseurope.org/fr/resources/market-data>. Viewed 17 Aug 2020.
- PlasticsEurope. 2015. An analysis of European plastics, demand and waste data.
- Pollet T, Berdjeeb L, Garnier C, *et al.* 2018. Prokaryotic community successions and interactions in marine biofilms: the key role of Flavobacteriia. *FEMS Microbiol Ecol* **94**.
- Pompilio A, Piccolomini R, Picciani C, *et al.* 2008. Factors associated with adherence to and biofilm formation on polystyrene by *Stenotrophomonas maltophilia*: the role of cell surface hydrophobicity and motility. *FEMS Microbiol Lett* **287**: 41–7.
- Pötter M, Müller H, and Steinbüchel A. 2005. Influence of homologous phasins (PhaP) on PHA accumulation and regulation of their expression by the transcriptional repressor PhaR in *Ralstonia eutropha* H16. *Microbiology (Reading, Engl)* **151**: 825–33.
- Pouton CW and Akhtar S. 1996. Biosynthetic polyhydroxyalkanoates and their potential in drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* **18**: 133–62.
- Pramila. 2011. Biodegradation of low density polyethylene (LDPE) by fungi isolated from marine water– a SEM analysis. *African Journal of Microbiology Research* **5**.

**-R-**

- Rehm BHA. 2010. Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications. *Nature Reviews Microbiology* **8**: 578–92.
- Rehm BHA and Steinbüchel A. 1999. Biochemical and genetic analysis of PHA synthases and other proteins required for PHA synthesis. *International Journal of Biological Macromolecules* **25**: 3–19.
- Reis MAM, Serafim LS, Lemos PC, et al. 2003. Production of polyhydroxyalkanoates by mixed microbial cultures. *Bioprocess Biosyst Eng* **25**: 377–85.
- Reisser J, Slat B, Noble K, et al. 2014. The vertical distribution of buoyant plastics at sea. *Biogeosciences Discussions* **11**.
- Ren J, Liu Z, and Ren T. 2007. Mechanical and Thermal Properties of Poly(Lactic Acid)/Starch/Montmorillonite Biodegradable Blends. *Polymers and Polymer Composites* **15**: 633–8.
- Richards ZT and Beger M. 2011. A quantification of the standing stock of macro-debris in Majuro lagoon and its effect on hard coral communities. *Marine Pollution Bulletin* **62**: 1693–701.
- Rios LM, Moore C, and Jones PR. 2007. Persistent organic pollutants carried by synthetic polymers in the ocean environment. *Mar Pollut Bull* **54**: 1230–7.
- Rogers K, Carreres-Calabuig JA, Gorokhova E, and Posth N. 2020. Micro-by-micro interactions: How microorganisms influence the fate of marine microplastics. *Limnology and Oceanography Letters* **5**.
- Rosenberg M, Gutnick D, and Rosenberg E. 1980. Adherence of bacteria to hydrocarbons: A simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiology Letters* **9**: 29–33.
- Royer S-J, Ferrón S, Wilson ST, and Karl DM. 2018. Production of methane and ethylene from plastic in the environment. *PLOS ONE* **13**: e0200574.
- Ruiz JA, López NI, and Méndez BS. 2004. rpoS gene expression in carbon-starved cultures of the Polyhydroxyalkanoate-accumulating species *Pseudomonas oleovorans*. *Curr Microbiol* **48**: 396–400.
- Rummel CD, Löder MGJ, Fricke NF, et al. 2016. Plastic ingestion by pelagic and demersal fish from the North Sea and Baltic Sea. *Marine Pollution Bulletin* **102**: 134–41.

**-S-**

- Sagong H-Y, Son HF, Choi SY, et al. 2018. Structural Insights into Polyhydroxyalkanoates Biosynthesis. *Trends in Biochemical Sciences* **43**: 790–805.
- Sánchez C. 2020. Fungal potential for the degradation of petroleum-based polymers: An overview of macro- and microplastics biodegradation. *Biotechnology Advances* **40**: 107501.
- Santo M, Weitsman R, and Sivan A. 2013. The role of the copper-binding enzyme – laccase – in the biodegradation of polyethylene by the actinomycete *Rhodococcus ruber*. *International Biodeterioration & Biodegradation* **84**: 204–10.
- Sauret C, TEDETTI M, GUIGUE C, et al. 2016. Influence of PAHs among other coastal environmental variables on total and PAH-degrading bacterial communities. *Environmental Science and Pollution Research* **23**: 4242–56.
- Scholz C. 2001. Poly( $\beta$ -hydroxyalkanoates) as Potential Biomedical Materials: An Overview. In: Polymers from Renewable Resources. American Chemical Society.
- Sebille E van, Wilcox C, Lebreton L, et al. 2015. A global inventory of small floating plastic debris. *Environ Res Lett* **10**: 124006.
- Shah AA, Hasan F, Hameed A, and Ahmed S. 2008. Biological degradation of plastics: A comprehensive review. *Biotechnology Advances* **26**: 246–65.
- Sharma S and Chatterjee S. 2017. Microplastic pollution, a threat to marine ecosystem and human health: a short review. *Environ Sci Pollut Res* **24**: 21530–47.
- Simon-Colin C, Alain K, Raguénès G, et al. 2009. Biosynthesis of medium chain length poly(3-hydroxyalkanoates) (mcl PHAs) from cosmetic co-products by *Pseudomonas raguénèsii* sp. nov., isolated from Tetiaroa, French Polynesia. *Bioresource Technology* **100**: 6033–9.
- Singh AK and Mallick N. 2009. Exploitation of inexpensive substrates for production of a novel SCL–LCL-PHA co-polymer by *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 7925. *J Ind Microbiol Biotechnol* **36**: 347–54.
- Singh B and Sharma N. 2008. Mechanistic implications of plastic degradation. *Polymer Degradation and Stability* **93**: 561–84.
- Singh AK, Sharma L, Srivastava JK, et al. 2018. Microbially Originated Polyhydroxyalkanoate (PHA) Biopolymers: An Insight into the Molecular Mechanism and Biogenesis of PHA Granules. In: Singh OV, Chandel AK (Eds). Sustainable Biotechnology- Enzymatic Resources of Renewable Energy. Cham: Springer International Publishing.
- Sivan A. 2011. New perspectives in plastic biodegradation. *Current Opinion in Biotechnology* **22**: 422–6.

- Soto G, Setten L, Lisi C, *et al.* 2012. Hydroxybutyrate prevents protein aggregation in the halotolerant bacterium *Pseudomonas* sp. CT13 under abiotic stress. *Extremophiles* **16**: 455–62.
- Stephanis R de, Giménez J, Carpinelli E, *et al.* 2013. As main meal for sperm whales: Plastics debris. *Marine Pollution Bulletin* **69**: 206–14.
- Suaria G, Avio CG, Mineo A, *et al.* 2016. The Mediterranean Plastic Soup: synthetic polymers in Mediterranean surface waters. *Scientific Reports* **6**: 37551.
- Sudesh K and Abe H. 2010. Practical Guide to Microbial Polyhydroxyalkanoates.
- Sudesh K, Abe H, and Doi Y. 2000. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in Polymer Science* **25**: 1503–55.
- Sudhakar M, Doble M, Murthy PS, and Venkatesan R. 2008. Marine microbe-mediated biodegradation of low- and high-density polyethylenes. *International Biodeterioration & Biodegradation* **61**: 203–13.
- Sun X, Chen B, Li Q, *et al.* 2018. Toxicities of polystyrene nano- and microplastics toward marine bacterium *Halomonas alkaliphila*. *Science of The Total Environment* **642**: 1378–85.
- Sunagawa S, Acinas SG, Bork P, *et al.* 2020. Tara Oceans: towards global ocean ecosystems biology. *Nat Rev Microbiol* **18**: 428–45.
- Sussarellu R, Suquet M, Thomas Y, *et al.* 2016. Oyster reproduction is affected by exposure to polystyrene microplastics. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **113**: 201519019.
- Sznajder A and Jendrossek D. 2011. Biochemical characterization of a new type of intracellular PHB depolymerase from *Rhodospirillum rubrum* with high hydrolytic activity on native PHB granules. *Appl Microbiol Biotechnol* **89**: 1487–95.

## -T-

- Thomas T, Bazire A, Anne E, and Bruzaud S. 2019. Complete genome sequence of the halophilic PHA-producing bacterium *Halomonas* sp. SF2003: insights into its biotechnological potential. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **35**.
- Tourinho PS, Ivar do Sul JA, and Fillmann G. 2010. Is marine debris ingestion still a problem for the coastal marine biota of southern Brazil? *Mar Pollut Bull* **60**: 396–401.
- Tournier V, Topham CM, Gilles A, *et al.* 2020. An engineered PET depolymerase to break down and recycle plastic bottles. *Nature* **580**: 216–9.

**-V-**

- Van Cauwenbergh L and Janssen CR. 2014. Microplastics in bivalves cultured for human consumption. *Environmental Pollution* **193**: 65–70.
- Vasile C. 2000. Handbook of polyolefins. New York.
- Verlinden R a. J, Hill DJ, Kenward MA, et al. 2007. Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. *J Appl Microbiol* **102**: 1437–49.
- Voinova ON, Kalacheva GS, Grodnitskaya ID, and Volova TG. 2009. Microbial polymers as a degradable carrier for pesticide delivery. *Appl Biochem Microbiol* **45**: 384–8.

**-W-**

- Wagner M and Lambert S (Eds). 2018. Freshwater Microplastics : Emerging Environmental Contaminants? Springer International Publishing.
- Wang S, Lydon KA, White EM, et al. 2018. Biodegradation of Poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyhexanoate) Plastic under Anaerobic Sludge and Aerobic Seawater Conditions: Gas Evolution and Microbial Diversity. *Environ Sci Technol* **52**: 5700–9.
- Wijnen J van, Ragas AMJ, and Kroeze C. 2019. Modelling global river export of microplastics to the marine environment: Sources and future trends. *Science of The Total Environment* **673**: 392–401.
- Wilcox C, Puckridge M, Schuyler QA, et al. 2018. A quantitative analysis linking sea turtle mortality and plastic debris ingestion. *Scientific Reports* **8**: 1–11.
- Williams S and Martin D. 2005. Applications of Polyhydroxyalkanoates (PHA) in Medicine and Pharmacy. In: Biopolymers Online.
- Witholt and Kessler . 1999. Perspectives of medium chain length poly(hydroxyalkanoates), a versatile set of bacterial bioplastics. *Curr Opin Biotechnol* **10**: 279–85.
- Witt V, Wild C, Anthony K, et al. 2011. Witt V, Wild C, Anthony KRN, Diaz-Pulido G, Uthicke S.. Effects of ocean acidification on microbial community composition of, and oxygen fluxes through, biofilms from the Great Barrier Reef. *Environ Microbiol* **13**: 2976-2989. *Environmental microbiology* **13**: 2976–89.
- Wu L-P. 2014. Polyhydroxyalkanoates (PHAs): Biosynthesis, Industrial Production and Applications in Medicine. *Nova Science Publishers*.
- Wu D, He J, Gong Y, et al. 2011. Proteomic analysis reveals the strategies of *Bacillus thuringiensis* YBT-1520 for survival under long-term heat stress. *Proteomics* **11**: 2580–91.

**-X-**

Xu X, Wang S, Gao F, et al. 2019. Marine microplastic-associated bacterial community succession in response to geography, exposure time, and plastic type in China's coastal seawaters. *Marine Pollution Bulletin* **145**: 278–86.

## -Y-

Yang D, Shi H, Li L, et al. 2015. Microplastic Pollution in Table Salts from China. *Environ Sci Technol* **49**: 13622–7.

Yin J, Chen J-C, Wu Q, and Chen G-Q. 2015. Halophiles, coming stars for industrial biotechnology. *Biotechnol Adv* **33**: 1433–42.

Yoon MG, Jeon HJ, and Kim MN. 2012. Biodegradation of Polyethylene by a Soil Bacterium and AlkB Cloned Recombinant Cell. *Journal of Bioremediation & Biodegradation* **3**: 1–8.

## -Z-

Zettler ER, Mincer TJ, and Amaral-Zettler LA. 2013. Life in the “Plastisphere”: Microbial Communities on Plastic Marine Debris. *Environmental Science & Technology* **47**: 7137–46.

Zhang H, Fei Y, Wang H, et al. 2020. Interaction of Microplastics and Organic Pollutants: Quantification, Environmental Fates, and Ecological Consequences. : 1–24.

Zhao J, Ran W, Teng J, et al. 2018. Microplastic pollution in sediments from the Bohai Sea and the Yellow Sea, China. *Science of The Total Environment* **640–641**: 637–45.

Zhao S, Zhu L, Wang T, and Li D. 2014. Suspended microplastics in the surface water of the Yangtze Estuary System, China: First observations on occurrence, distribution. *Marine Pollution Bulletin* **86**: 562–8.

Zhu Z, Wang S, Zhao F, et al. 2018. Joint toxicity of microplastics with triclosan to marine microalgae *Skeletonema costatum*. *Environmental Pollution* **246**: 509–17.

Zinn M, Weilenmann H-U, Hany R, et al. 2003. Tailored Synthesis of Poly([R]-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHB/HV) in *Ralstonia eutropha* DSM 428. *Acta Biotechnologica* **23**: 309–16.

Zumstein MT, Schintlmeister A, Nelson TF, et al. 2018. Biodegradation of synthetic polymers in soils: Tracking carbon into CO<sub>2</sub> and microbial biomass. *Science Advances* **4**: eaas9024.



# Annexes



© Jacquin Justine, photographie d'une peinture murale prise à El Port de la Selva, Gerona (Espagne).



**Annexe 1– Article en premier auteur publié en 2019 dans Frontiers in microbiology**

**Title:** Microbial ecotoxicology of marine plastic debris: a review on colonization and biodegradation by the ‘plastisphere’

**Authors:** Jacquin J<sup>1</sup>, Cheng J<sup>1</sup>, Odobel C<sup>1</sup>, Pandin C<sup>1</sup>, Conan P<sup>1</sup>, Pujo-Pay M<sup>1</sup>, Barbe V<sup>1,2</sup>, Meistertzheim AL<sup>1</sup> and Ghiglione JF<sup>1\*</sup>

**Affiliations :**

1. CNRS, Sorbonne Université, Laboratoire d’Océanographie Microbienne LOMIC, UMR 7621, Observatoire Océanologique de Banyuls, 66650 Banyuls sur mer, France.
2. Commissariat à l’Energie Atomique et aux Energies Alternatives, Genoscope, Institut de biologie François-Jacob, 2 Rue Gaston Crémieux, 91000 Evry, France

**\*Corresponding author:**

JF Ghiglione, CNRS, Sorbonne Université, Laboratoire d’Océanographie Microbienne LOMIC, UMR 7621, Observatoire Océanologique de Banyuls, 66650 Banyuls sur mer, France.  
Tel.: + 33 (0) 4 68 88 73 16. E-mail: ghiglione@obs-banyuls.fr

**Keywords:** Bacteria; marine plastics debris; colonization; biodegradation; metabolic pathways

## ABSTRACT

Over the last decades, it has become clear that plastic pollution presents a global societal and environmental challenge given its increasing presence in the oceans. A growing literature has focused on the microbial life growing on the surfaces of these pollutants, called the ‘plastisphere’, but the general concepts of microbial ecotoxicology have only rarely been integrated. Microbial ecotoxicology deals with (i) the impact of pollutants on microbial communities and inversely (ii) how much microbes can influence their biodegradation. The goal of this review is to enlighten the growing literature of the last 15 years on microbial ecotoxicology related to plastic pollution in the oceans. First, we focus on the impact of plastic on marine microbial life and on the various functions it ensures in the ecosystems. In this part, we also discuss the driving factors influencing biofilm development on plastic surfaces and the potential role of plastic debris as vector for dispersal of harmful pathogen species. Second, we give a critical view of the extent to which marine microorganisms can participate in the decomposition of plastic in the oceans and of the relevance of current standard tests for plastic biodegradability at sea. We highlight some examples of metabolic pathways of polymer biodegradation. We conclude with several questions regarding gaps in current knowledge of plastic biodegradation by marine microorganisms and the identification of possible directions for future research.

## 1. Introduction

The amount of land-based plastic debris entering the ocean is estimated at 4.8 to 12.7 million tons per years (Jambeck et al., 2015). It is so important that plastic is regarded as a marker of the Anthropocene (Duis and Coors, 2016; Zalasiewicz et al., 2016). A growing body of research has investigated plastic distribution (Willis et al., 2017; Worm et al., 2017) and toxicity for marine fauna (Bakir et al., 2014; Gewert et al., 2015). A comparatively smaller but growing literature has been devoted to the microbial ecotoxicology of marine plastic debris, i.e. (1) the impact of plastic on marine microbial life together with the various ecosystem services that marine microbial life ensures and inversely, (2) the role of microorganisms in the degradation of ocean plastic (Ghiglione et al., 2014, 2016). Both aspects will be successively explored by this review, which covers the last 15 years of literature.

The investigation of microorganisms colonizing plastic surfaces using modern techniques of massive DNA sequencing (Zettler et al., 2013) was introduced only recently. The authors introduced the world ‘plastisphere’ to describe the microbial life growing on these surfaces. They also detected members of the potentially pathogenic genus *Vibrio*, which may be dispersed over long distances by floating persistent plastics. Since then, several studies investigated various marine environments, such as the North Pacific gyre (Debroas et al., 2017) or the Mediterranean sea (Dussud et al., 2018a). In parallel, a growing literature described the first steps of colonization of new plastic until the formation of a mature biofilm (Dussud et al., 2018a; Lobelle and Cunliffe, 2011; Oberbeckmann et al., 2015) .

Such knowledge is of great interest to better understand the impact of plastic on marine microbial life and ecosystem functions. Only one study so far used shotgun metagenomics, showing that plastic-inhabiting microbes present an enriched gene repertoire compared to microbes living in the surrounding waters (Bryant et al., 2016). In this review, we argue that current knowledge is insufficient to draw a clear picture of the impact of plastic on marine

microbial life and ecosystem functions, and we propose several directions for further studies in this field (see section 2: microorganisms colonizing plastic at sea).

The role of microbes on plastic degradation in the ocean is a second subject of concern. Very recently, an excellent comprehensive review concluded that “current international standards and regional test methods are insufficient in their ability to realistically predict the biodegradability of carrier bags in marine environment, due to several shortcomings in experimental procedures and a paucity of information in the scientific literature” (Harrison et al., 2018). The capability of microorganisms to biodegrade plastic was reported for numerous bacterial strains (Krueger et al., 2015). Fungi also have the capability to biodegrade plastics, but most of the studies were conducted in terrestrial conditions (Magnin et al., 2018, Gajendiran et al., 2016, Koitabashi et al., 2012, Cosgrove et al., 2007) whereas very few studies so far exist in marine conditions (Gonda et al., 2000; Pramila et al., 2011). Moreover, most of these studies were based on the selection and testing of single strains in laboratory conditions, which is very far from environmental conditions. In this review, we underscore the knowledge gaps on plastic biodegradation by marine microorganisms and we attempt to identify possible directions for future research in this area (see section 3: how much can microorganisms participate in plastic degradation at sea?).

## **2. Microorganisms colonizing plastic at sea**

### 2.1. A new niche for marine microorganisms. I

It was not until recently that the first work using modern techniques of massive DNA sequencing provided a detailed picture of the microbial life on plastic and introduced the term ‘plastisphere’ (Zettler et al., 2013). Bacteria, Archaea, Fungi and microbial Eukaryotes were detected in several studies, starting from plastics sampled at sea or from new plastics

experimentally incubated in marine conditions (Table 1). Plastic debris are mainly composed of polyethylene (PE) at sea surface, followed by polypropylene (PP) and polystyrene (PS) (Auta et al., 2017). Whatever the polymer type, recent studies emphasized the difference between the bacteria living on plastics and the bacteria living in free-living state (Debroas et al., 2017) or on organic particles in the surrounding seawater (Dussud et al., 2018a; Oberbeckmann et al., 2018). Similar observations have been made for fungal communities (Kettner et al., 2017)

Another aspect that received much less attention is the plastisphere living in the water column other than the surface layer. Because of methodological constrains, most of the studies so far have been limited to sampling surface seawater using manta trawls, which represents less than 1% of the global load of plastic in the open ocean (Cózar et al., 2014). Only certain types of plastics made of PE and PP with high surface-to-volume ratios, such as rigid plastics and bundled fishing nets and ropes, have the capability to remain for a very long time at the surface of the oceans (Lebreton et al., 2018). Most other buoyant plastic such as films or smaller pieces, tend to sink to the sediment owing to biofouling (Fazey and Ryan, 2016, Kalogerakis et al., 2017). Very limited information is available concerning the composition of microbial communities on plastic items sampled from the seafloor (De Tender et al., 2015). If photoautotrophic bacteria such as the cyanobacteria *Phormidium* and *Rivularia* dominate the sub-surface plastisphere communities (Zettler et al. 2013; Bryant et al. 2016; Dussud et al. 2018a), the core microbiome of the seafloor and sub-surface plastisphere seems to share some taxa: Bacteroidetes (*Flavobacteriaceae*) and Proteobacteria (*Rhodobacteraceae* and *Alcanivoracaceae*) (Zettler et al. 2013; Bryant et al. 2016; De Tender et al. 2017; Dussud et al. 2018a).

***2.2. Successive colonization stages of new plastics incubated in marine conditions.*** In parallel to studies on plastic directly sampled at sea, other studies focused on the successive colonization steps of new plastics incubated in marine conditions (Table 1). At sea, plastics are rapidly covered by the ‘conditioning film’ made of inorganic and organic matter, which is then rapidly colonized by bacteria (mainly *Gammaproteobacteria* and *Alphaproteobacteria*) (Oberbeckmann et al., 2015). With time, members of Bacteroidetes become increasingly abundant (Lee et al., 2008). Hydrophobicity and other substratum properties (crystallinity and crystal structure, roughness, glass transition temperature, melting temperature, modulus of elasticity) may play a role in the selection of bacterial community in the early stages of colonization (Pompilio et al., 2008), but probably do so to a lesser extent when the biofilm becomes mature (Dussud et al., 2018a). The successive growing and maturation phases of biofilm formation, already described for other surfaces such as glass, acryl, steel or rocks and algae (Salta et al., 2013), were also observed for plastics of different compositions (Oberbeckmann et al., 2015). Biofilm developments were followed during several weeks in seawater on PE-based plastic bags (Lobelle and Cunliffe, 2011), polyethylene terephthalate (PET)-based plastic bottles (Oberbeckmann et al., 2014), polyvinyl chloride (PVC) (Dang et al. 2008) or polystyrene (PS) coupons (Briand et al., 2012). PE-based plastics were also rapidly colonized by microorganisms in marine sediments (Harrison et al., 2014). Clear differences in bacterial abundance, diversity and activity were found between non-biodegradable and biodegradable plastics (Dussud et al. 2018b, Eich et al. 2015). Higher colonization by active and specific bacteria were found after 6 weeks on poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) and pre-oxidized PE-based oxodegradable polymers (OXO) in comparison to non-biodegradable PE polymers (Dussud et al. 2018b, Eich et al. 2015). Longer-term studies carried out over a 6-month to 1 year period also showed differences in biofilm formation and maturation according to the polymer type, i.e. PE, PP, PET, or polycarbonate

(PC) (De Tender et al., 2017; Webb et al., 2009). Not only bacteria but also fungi were shown to form biofilms on plastic surfaces (Pramila et al., 2011), mainly dominated by Chytridiomycota, Cryptomycota (Kettner et al., 2018) and Ascomycota (De Tender et al., 2017; Kettner et al., 2018; Oberbeckmann et al., 2016).

### 2.3. Potential impact of plastic on the microbial role in regulation of biogeochemical cycles.

The quantity of plastic in the oceans can no longer be considered a limited ecological problem, since small pieces of plastic called “microplastics” (<5mm) found at sea could cover 4,2 million km<sup>2</sup> of the sea surface (Charette and Smith, 2010; Eriksen et al., 2014; Hidalgo-Ruz et al., 2012). Marine microorganisms that compose the plastisphere are known to play a key role in the biogeochemical cycles in the oceans (Pomeroy et al., 2007). One-half of oceanic primary production on average is channelled via heterotrophic bacterioplankton into the microbial loop, thus contributing significantly to food web structure and carbon biogeochemical cycling in the ocean (Fenchel, 2008) (Figure 1). Only one recent study compared the heterotrophic production of bacteria living on plastic and in seawater. Heterotrophic bacteria living on plastics were particularly active, the cell-specific activity measured by <sup>3</sup>H-leucine incorporation into proteins being 43- to 88-fold higher than that of the free-living fraction (Dussud et al., 2018a). Unfortunately, these results were obtained in the frame of a study on colonization of new plastics incubated at sea for a relatively short period (45 days). Similar methodologies applied to plastics that had spent several years at sea would be necessary to evaluate how much the large amount of plastic and the accompanying plastisphere influence the biogeochemical carbon cycle in the oceans.

Interestingly, most of the studies aiming to characterize the plastisphere mentioned that Cyanobacteria were overrepresented on plastics compared to the surrounding free-living and organic particle-attached fractions. The relative importance of photosynthetic activities that Cyanobacteria living on plastic have on global pelagic primary production is still unknown.

Coupling primary production and heterotrophic production measurements over large temporal and spatial scales will be necessary to obtain a better view of the role of the plastisphere on carbon cycling in the oceans. Microorganisms are not only involved in the carbon cycle, but basically in all other biogeochemical cycles including nitrogen, sulfur, iron, manganese, chromium, phosphorus, calcium and silicate cycles, which may also be impacted by the presence of plastic at sea (Hutchins and Fu, 2017).

#### 2.4 Potential dispersion of pathogen species

Interest has been raised about opportunist pathogen dispersal on plastics, such as animal or human pathogenic *Vibrio* sp. (Zettler et al., 2013). Marine plastic debris as vector of harmful species was first suggested by Masó et al. (2003), who identified potential harmful dinoflagellates such as *Ostreopsis* sp. and *Coolia* sp. Putative pathogen of fish (*Tenacibaculum* sp.) and of invertebrates (*Phormidium* sp. and *Leptolyngbya* sp.) were found to be more common on plastic compared to surrounding seawater (Dussud et al. 2018a). Some bacterial taxa considered as putative pathogens for human, coral and fish were also found in the intertidal zone of the Yangtze Estuary, at relatively low abundance (<1.6%) (Jiang et al., 2018). A putative pathogen for coral *Halofolliculina* spp. was found to be abundant on some western Pacific plastic debris (Goldstein et al., 2014). Some toxic eukaryotic species were also mentioned by Debroas et al. (2017) at low abundance (<0.04%), but might be regarded as hitchhiker organisms. Nevertheless, caution should be taken since the 16S rRNA metabarcoding approach used in all these studies was not an appropriate method for describing bacterial virulence. The recent coupling of the 16S rRNA metabarcoding technique with the detection of virulence-associated genes may be an interesting option to address this question (Kirstein et al., 2016). Pathogenicity evidence on marine animals in relation to the plastisphere has never been proven, and further research will be required before publicizing alarmist conclusions on the possible responsibility of plastic debris as vector for the spread of disease-

causing organisms. Apart from those results, microplastics colonized by pathogens may also pose threats to humans who are exposed to contaminated beach and bathing environments (Keswani et al., 2016). Evidence is still missing to determine whether plastic debris could lead to the spread and prolonged persistence of pathogenic species in the oceans.

### 2.5. Factors driving the plastisphere composition and activities.

Factors driving the plastisphere composition are complex, mainly spatial and seasonal, but are also influenced by the polymer type, surface properties and size. Plastisphere communities studied in different polymer types floating in the North Pacific and North Atlantic reflected first their biogeographic origins, and to a lesser extent the plastic type (Amaral-Zettler et al., 2015). Similar conclusions were found for bacterial communities colonizing plastics along an environmental gradient. These communities are shaped firstly by the freshwater to marine environmental conditions and secondarily by the plastic type (PS and PE) (Oberbeckmann et al., 2018). Inversely, another study based on a large number of microplastics sampled in the western Mediterranean sea showed no effect of geographical location (including coastal and open ocean samples) or plastic type (mainly PE, PP and PS) on the bacterial community composition. The growing number of studies on the plastisphere are giving a better view of the microbial biofilm community on plastics in the oceans, but the complex network of influences is still the subject of ongoing debate. A clearer picture will hopefully emerge from more extensive investigations with widespread and numerous samples, together with better descriptions of the physical and chemical properties of the polymers.

The physical properties of plastic offer a unique habitat that contribute to the long-distance transport of diverse microbial hitchhikers attached to its surface (Harrison et al., 2011; Zettler et al., 2013). A vast range of other phyla, including Arthropoda, Annelida, Mollusca,

Bryozoa and Cnidaria have conferred on plastics the role of vector for the transfer of organisms, some of them being catalogued as invasive alien species (Oberbeckmann et al., 2015). For instance, plastic debris with tropical biota including corals was detected in the Netherlands (Hoeksema, 2012), and southern ocean bryozoans were observed in Antarctica (Barnes and Fraser, 2003). Interactions between micro- and macro-organisms, their substratum and their surroundings are needed to better predict the ecological consequences of microplastics transported through the global oceans.

### **3. How much can microorganisms participate in plastic degradation at sea?**

#### *3.1. Definition and main processes involved in plastic biodegradation.*

Biodegradation of plastic is a process that results in total or partial conversion of organic carbon into biogas and biomass associated with the activity of a community of microorganisms (bacteria, fungi and actinomycetes) capable of using plastic as a carbon source (Shah et al., 2008). Depending on the respiratory conditions (aerobic / anaerobic) and the microorganisms involved, the biogas will be different ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{CH}_4$ ,  $\text{H}_2\text{S}$ ,  $\text{NH}_4$ ,  $\text{H}_2$ ) (Mohee et al., 2008).

Microorganisms, including bacteria and fungi, present the capabilities to degrade or deteriorate plastics and several review papers updated the list of plastic-degraders (Bhardwaj et al., 2013; Kale et al., 2015; Pathak, 2017; Shah et al., 2008). *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus* and *Streptomyces* were the prominent microbial taxa able to use plastic as sole carbon source and energy in laboratory conditions. Table 2 proposes an update of the current list of microorganisms proven to present biodegradation capabilities under laboratory conditions.

Biodegradation is considered to occur after or concomitant with physical and chemical degradation (abiotic degradation), which weakens the structure of polymers as revealed by

roughness, cracks and molecular changes (İpekoglu et al., 2007). Alteration of plastic properties due to abiotic degradation is called ‘aging’ and in nature depends on several factors such as temperature, solar light and chemicals that enhance the rate of degradation by oxidizing or disrupting the length of the polymer chain.

Biodegradation can be summarized in 4 essential steps, which have been described in detail in a review by Dussud and Ghiglione (2014):

- Bio-deterioration relates to the biofilm growing on the surface and inside the plastic, which increases the pore size and provokes cracks that weaken the physical properties of the plastic (physical deterioration) or releases acid compounds that modify the pH inside the pores and results in changes in the microstructure of the plastic matrix (chemical deterioration).
- Bio-fragmentation corresponds to the action of extracellular enzymes (oxygenases, lipases, esterases, depolymerases and other enzymes that may be as diverse as the large spectrum of polymer types) released by bacteria colonizing the polymer surface. These enzymes will reduce the molecular weight of polymers and release oligomers and then monomers that can be assimilated by cells.
- Assimilation allows oligomers of less than 600 Daltons to be integrated inside the cells to be used as a carbon source, thus increasing the microbial biomass.
- Mineralization is the ultimate step in the biodegradation of a plastic polymer and results in the excretion of completely oxidized metabolites ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{N}_2$ ,  $\text{CH}_4$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ).

### 3.2. Rates of plastic degradation.

Rates of degradation of conventional plastics by microorganisms are extremely low, even in optimized laboratory conditions (Krueger et al., 2015). Most of the conventional plastics are recalcitrant to biodegradation in marine and terrestrial environments, resulting in lifetimes of decades or even centuries (Krueger et al. 2015). Plastics present low bioavailability since they

are generally solid and made of densely cross-linked polymers that provide low accessibility for microbes and enzymes circumscribed to the outermost layer of the items. In the pelagic ecosystem, plastics are biodegraded by the aerobic route of microorganisms, i.e. the end product of the reaction will be microbial biomass, CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O. The anaerobic biodegradation pathway would be more frequently encountered in sediment and is supposed to be even slower than in the pelagic zone (Ishigaki et al., 2004). Unfavorable C/N ratio is a key factor for biodegradation of other hydrocarbon-based products in the oceans (Sauret et al., 2016) and may potentially also limit plastic biodegradation.

Data currently available rely heavily on culture-based approaches in laboratory conditions, although bacteria that can be cultured represent less than 1% of the number of bacteria in nature (the so-called ‘great plate count anomaly’) and a very small proportion of its very large diversity (Hugenholtz et al., 2009). To date, data on the rate of plastic mineralization in the oceans are still virtually non-existent. Congruent descriptions of the plastisphere that forms an abundant biofilm characterized by very diverse and active plastic-specific characteristics are available (Debroas et al. 2017; Dussud et al. 2018b). Evidence of pits visualized in the plastic debris that conform to bacterial shapes directly found in the marine environment (Zettler et al., 2013) together with a number of putative xenobiotic degradation genes likely involved in plastic degradation that were found to be significantly more abundant in the plastic-specific communities (Bryant et al. 2016; Debroas et al. 2017; Dussud et al. 2018b) are thus of great interest. A recent study underlined the need of cometabolic pathways on PE biodegradation, thus confirming that complex microbial communities rather than single species are necessary to degrade recalcitrant plastic (Syranidou et al., 2017). So far, the timescales of degradation and the characterization and the fate of the degradation products, are fundamental, yet still unanswered questions.

### 3.3. Standard tests for plastic biodegradability at sea.

The current standards for marine environments propose tests based on respirometry measurements, susceptible to describe the mineralization step of plastic biodegradation in aerobic conditions (see Figure 2). They impose a minimum percentage of conversion from plastic to CO<sub>2</sub> ranging from 60% to 70% over a period of 3 months (ASTM D6691-09), 6 months (ASTM D7473-12) or 24 months (ISO 18830, ISO 19679, ASTM D7991-15) under aerobic conditions (see Figure 3). Anaerobic biodegradation is characterized by specific standards (see for example ASTM D5511-18), but to our knowledge none of these standards applies to the marine environment. Biodegradation of a plastic is characterized by the time required to achieve mineralization under controlled conditions. These tests cannot be considered as a proof of ready biodegradability (total conversion of plastic into biomass and CO<sub>2</sub>), but rather an indication about a potential for biodegradation in the oceans.

Recently, these standards were considered insufficient in their ability to realistically predict the biodegradability in marine environment (Harrison et al., 2018). These tests can significantly underestimate the time required for polymer biodegradation within natural ecosystems. First, the authors underlined “biases associated with the preparation of experimental inocula and the test conditions themselves, including the use of preselected and/or pre-conditioned strains, artificially modified inocula, powdered test materials, nutrient-rich synthetic media and test temperatures that are frequently higher than those encountered within the environment”. The authors also pointed out “the lack of clear guidelines for the analysis of different polymer types, including composite materials and plastics that contain additives”, which can considerably influence the rates of biodegradation. “There is also a paucity of guidelines for materials of varying shapes and sizes and, in certain cases, the test procedures lack a sufficient level of statistical replication”. Another concern, not raised by Harrison et al. (2018), is the biases associated with the common method for determining biodegradability, i.e. measurements of CO<sub>2</sub> evolution. This method may lead to either underestimation or overestimation of the plastic

biodegradation due to other processes. It is noteworthy that plastic generally presents high sorption capability of organic matter (especially hydrophobic organic chemicals including pollutants) that can be biodegraded by the plastisphere biofilm, thus resulting in a CO<sub>2</sub> production that has nothing to do with plastic biodegradation (Lee et al., 2014). Inversely, several papers reported the importance of photosynthetic microorganisms growing on plastics, which consume CO<sub>2</sub> regardless of plastic biodegradation (Zettler et al. 2013; Bryant et al. 2016; Dussud et al. 2018b). Further studies are needed to evaluate the relative degree of CO<sub>2</sub> consumption by photosynthesis, CO<sub>2</sub> production by organic matter degradation by the plastisphere as compared to CO<sub>2</sub> production due to plastic biodegradation.

The limitations of the respiratory methods described above can be overcome by other additional analytical techniques and approaches to confirm changes in the physical properties and the chemical structure of polymers during biodegradation. Alterations in the visual appearance and in the mass or changes in mechanical properties are relatively easy and low-cost methods for the evaluation of physical changes during biodegradation. Other methods could be combined to confirm changes in the molecular structure of polymers, such as measurements of surface hydrolysis and other chromatographic (gas chromatography with or without flame ionization detection, liquid chromatography, gel-permeation chromatography) measurements coupled or not with spectrometric techniques (mass spectrometry, nuclear magnetic resonance spectroscopy, Fourier-transform infrared spectroscopy). Optical, atomic force and scanning electron microscopy can also be used to assess the biodeterioration of the surface due to microbial activity or biofilm formation. Any of these techniques are enough to prove biodegradation by its own, and each of them has limitations that have been previously detailed for example in the excellent reviews of (Harrison et al., 2018; Ho et al., 2018; Koutny et al., 2006). The current standards sometimes propose to use such techniques to corroborate

the main test based on respirometry measurement, but no clear guidelines on how to use these tests is provided.

### 3.4. Examples of metabolic pathways of polymer biodegradation.

There are currently more than 5,300 grades of synthetic polymers for plastics in commerce (Wagner and Lambert (eds) 2018). They are generally produced with a range of chemical additives such as plasticizers, flame retardants, antioxidants and other stabilizers, pro-oxidants, surfactants, inorganic fillers or pigments (Wagner and Lambert (eds) 2018). Their heterogeneous physical-chemical properties will likely result in very heterogeneous metabolic pathways of biodegradation, especially when considering the large variety of microorganisms that may interact for the degradation of a single piece of plastic, together with the environmental factors of very dynamic oceanic conditions. We are aware that treating plastic as a single compound does not make sense and providing details on the metabolic pathways of plastic biodegradation would necessarily be unrepresentative of the complexity of the various processes that occur in the environment. We have chosen to focus on the metabolic pathways associated with the biodegradation of model compounds used in the formulation of conventional (PE, PET, PS) and so called “biodegradable” plastics (PHA) that are the most popular and the most extensively studied in the literature. Moreover, it should be noted that because of the difficulty of dealing with long-term experiments and complex communities under natural conditions, all the following studies describing the metabolic pathways of plastic biodegradation were done using a culture-based approach.

**3.4.1. Metabolic pathways of polyethylene (PE) biodegradation.** High- and low-density polyethylene is a long linear carbon chain ( $\text{CH}_2$ ) belonging to the family of polyolefins. Polyethylene is derived from petroleum sources and its large use in our daily life made it the first plastic waste found at sea surface. PE is considered difficult to biodegrade because the

long chains of carbons and hydrogens are very stable and contain very balanced charges. Microorganisms generally need imbalance of electric charge to perform biodegradation. To destabilize the local electric charge, bacteria use oxygenases: enzymes able to add oxygen to a long carbon chain (Krueger et al., 2015). For instance, mono-oxygenases and di-oxygenases incorporate, respectively, one and two oxygen atoms, forming alcohol or peroxy groups that are less recalcitrant for biodegradation. Oxidation may also be processed by abiotic reactions associated with UV radiation or temperature (for more details, see the review by Singh and Sharma (2008). Oxidation of PE results in the formation of carboxylic groups, alcohols, ketones and aldehydes by a radical reaction (Gewert et al. 2015; Vasile, 2000). The oxidation and fragmentation of PE make the polymer more hydrophilic and facilitates access to other extracellular enzymes, such as lipases and esterases after the formation of carboxylic groups, or endopeptidases for amide groups (Gewert et al., 2015). Other enzymes such as laccase in *Rhodococcus ruber* are excreted and can facilitate the biodegradation of PE (Santo et al., 2013). Interestingly, a recent study focused on soluble oxidized oligomers showed that 95% of these compounds were assimilated by a strain of *Rhodococcus rhodochrous* after 240 days of incubation (Eyheraguibel et al., 2017). The polymer is broken down into small oligomers of 600 Da incorporated in the cells by carriers belonging to the Major Facilitor Superfamily (MFS) or harboring ATP binding cassettes (ABC) (Gravouil et al., 2017).  $\beta$ -oxidation transforms oxidized carboxylic molecules (having an even number of carbon atoms) into acetyl coA or propionyl coA (if odd number of carbons). Carboxylation of propionyl coA into succinyl coA is performed by propionyl-coA carboxylase. Gravouil and al (2017), propose identification of an overexpressed enzyme, when the bacteria find PE in the medium (Gravouil et al., 2017). Acetyl coA and succinyl coA enter the tricarboxylic acid (TCA) cycle (Figure 4). This cycle produces chemical energy in the form of a reducing power (NADH, H<sup>+</sup> and CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub>) used in the respiratory chain to produce ATP, which is necessary to create new microbial biomass via

replication processes. It also produces CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O that sign the complete mineralisation of PE.

For twenty years now, scientists have been interested in the biodegradation of polyethylene by the microbial community. Bacterial and fungal strains presenting biodegradation capabilities of PE are listed in Table 2 and Supplemental Table 1.

Genetic evidence of PE biodegradation remains scarce in the literature, but preliminary work highlighted enzymes, transporters or genes that may be involved in this process (Gravouil et al., 2017). Alkane hydroxylase genes were found to play a central role in PE biodegradation for *Pseudomonas sp.* E4 strain, which was capable of mineralizing 28.6% of the organic carbon of the polymer in 80 days. The alkB gene was then introduced in *Escherichia coli* BL21 strain, which was then able to mineralize 19.3% of the organic carbon of the polymer (Yoon et al., 2012). Only two other studies used genetic analysis to provide evidence for the importance of laccase in PE biodegradation by *Rhodococcus ruber* (Gravouil et al., 2017; Santo et al., 2013; Sivan, 2011).

**3.4.2. Metabolic pathways of polyethylene terephthalate (PET) biodegradation.** PET is part of the polyester family and it is widely used in the design of bottles and synthetic fibres. It is considered as persistent plastic in the environment because of its long carbon chains containing aromatic rings that are difficult to biodegrade (Marten et al., 2005). In recent years, studies have shown that some bacterial strains were able to degrade PET as sole carbon source and energy, such as *Idonella sakaiensis* (Yoshida et al., 2016), *Nocardia* sp. (Sharon and Sharon, 2017) *Pseudomonas mendocina* (Ronkvist et al., 2009), *Thermobifida fusca* (Müller et al., 2005). Some fungal communities are also known to biodegrade PET, such as *Humicola insolens*, several *Fusarium* species, and *Penicillium citrinum* (Liebminger et al., 2007; Nimchua et al., 2007; Ronkvist et al., 2009; Silva et al., 2005). Cutinases or hydrolases play key roles in PET biodegradation (Danso et al., 2018). For example, *Ideonella sakaiensis* 201-F6 adhered to the

PET surface and first secreted two enzymes involved in the biodegradation process of PET: PETase (hydrolase) and MHETase. PETase is an extracellular enzyme capable of hydrolysing PET to mono-(2-hydroxyethyl) terephthalate (MHET), terephthalic acid (TPA) and bis (2-hydroxyethyl) terephthalate (BHET). Fungi seem to have the same biodegradation strategy and are able to degrade PET into BHET and MHET (Liebminger et al., 2007). The MHETase hydrolyzes MHET to TPA and ethylene glycol (EG). The terephthalic acid molecule is then internalized in the bacterial cells by the TPA transporter (Hosaka et al., 2013) and then catabolized by TPA 1,2-dioxygenase (TPADO) and 1,2-dihydroxy-3,5-cyclohexadiene-1,4-dicarboxylate dehydrogenase (DCDDH) to give protocatechuic acid (PCA) as the final molecule (Yoshida et al., 2016). This PCA is cleaved by PCA 3,4 dioxygenase (PCA34) to give the hemiacetal form of 4-carboxy-2-hydroxymuconic. The latter becomes the substrate of a dehydrogenase to form 2-pyrone-4-6-dicarboxylic acid that enters the TCA cycle and initially transformed into pyruvate and oxaloacetate, then assimilated as CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O (Figure 4).

#### 3.4.3. Metabolic pathways of polystyrene (PS) biodegradation.

Polystyrene is a polymer composed of styrene monomer (CH<sub>2</sub> = CH<sub>2</sub>-Ph). The polymer is highly hydrophobic and presents a high molecular weight. Like other conventional plastics, partial biodegradation in the laboratory has been observed while it continues to accumulate in the oceans (Auta et al., 2017) thus inciting increasing interest in PS biodegradation (see Supplemental Table 1 and Asmita et al., 2015; Atiq et al., 2010; Mor and Sivan, 2008; Oikawa et al., 2003; Yang et al., 2015; Tang et al., 2017).

Several biodegradation pathways may be considered, depending on the microorganism involved. The predominant pathway is the oxidation pathway of the styrene side chain presented in Figure 4. The styrene is directly oxidized with a styrene monooxygenase to form a styrene epoxide which will then be oxidized to phenylacetaldehyde by styrene oxide. This

molecule is then catabolized into phenylacetic acid. This conversion of styrene to phenylacetic acid is called the upper pathway of styrene metabolism. Phenylacetic acid is converted to phenylacetyl-CoA (acetyl coenzyme A) by the so-called lower pathway (Luu et al., 2013) then subjected to several enzymatic reactions (Figure 4) to finally enter the tricarboxylic acid (TCA) cycle. The biodegradation products enter the TCA cycle through the final formation of acetyl-Co A and succinyl-CoA (succinyl-CoenzymeA) (Luu et al., 2013).

Interestingly, *Pseudomonas putida* CA-3 can accumulate polyhydroxyalkanoates (PHA at medium chain length) when growing on styrene, thus using an original biodegradation pathway. A catabolic operon has been identified as responsible for this bioconversion; this path is called the PACoA (Phenylacetyl-CoA) catabolon. It involves oxidation of the aromatic ring, followed by entry into the  $\beta$ -oxidation cycle and the conversion to acetyl-CoA (O'Leary et al., 2005). This acetyl-CoA can follow different metabolic pathways, either entering the TCA cycle or following the *de novo* fatty acid biosynthesis path which will give as final product medium-chain-length polyhydroxyalkanoates (mcl-PHAs) (O'Leary et al., 2005). This study shows the complexity of studying the biodegradation pathways of these polymers and indicates the great range of possibilities when considering the large diversity of microorganisms found in the plastiisphere.

**3.4.4. Metabolic pathways of polyhydroxyalkanoate (PHA) biodegradation.** The current global production of PHA is increasing, reaching 49,200 tons per year that represents 2.4% of the production of bioplastics (<https://www.european-bioplastics.org>). PHAs are biopolymers of hydroxylated fatty acids produced within a bacteria in granular form. Each PHA monomer ( $[CO-CH_2-CHR-O]_n$ ) consists of hydroxyalkanoates linked together by ester bonds. The alkyl group (R) varies from a methyl group to a tetradecyl group. When bacteria are placed in a medium with an excess carbon source and low nutrient content, they accumulate storage granules. Over 300 bacterial species are capable of producing 80 different hydroxyalkanoate

monomers, and some bacteria can accumulate up to 90% of their total weight of polymer in very specific conditions (Pena et al., 2014). One of the most commonly used PHA for plastic production is polyhydroxybutyrate (PHB), which has a methyl as an alkyl group (R) ( $[CO-CH_2-CHCH_3-O]_n$ ). PHB is one of the homopolymers with high commercial power because it has thermoplastic, hydrophobic, low oxygen permeability and is considered biodegradable (Chang et al., 2012; Mothes et al., 2004). It is not very deformable, because of its high crystallinity (Gorke et al., 2007) and it has a high melting point close to its thermal degradation temperature (Reis et al., 2003). A copolymer made of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) that reduces the melting point of PHB is seen to emerge in PHA production. The advantage of using PHA is that it is stable over time, as long as the conditions governing its biodegradation are not met (Jaffredo et al., 2013)

Due to their microbial origin, PHAs were found to be biodegradable in many environments such as soil, marine ecosystems or sewage sludge (Eubeler et al., 2010). Biodegradation of Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) has been proven with comparable rates to that of cellulose, with faster degradation found under aerobic (85 days) compared to anaerobic (6 months) conditions (Wang et al., 2018). The biodegradation scheme in Figure 4 shows the different steps of PHB biodegradation. When the biodegradation is not carried out inside the cells by bacteria that produce their own PHB, other bacteria initiate the biodegradation of PHB in the medium by external hydrolysis using ectoenzymes that convert the polymers into hydroxylated acid monomers of hydroxybutyrate (HB) (Pena et al., 2014). This molecule is water soluble and small enough to passively diffuse across the bacterial membrane and enter the  $\beta$ -oxidation cycle. The resulting acetyl-CoA will be oxidized in the TCA cycle until final mineralisation (Alshehrei, 2017). PHA-degradation has been proven in the laboratory under aerobic or anaerobic conditions (see a non-exhaustive list in Supplemental Table 1). The dominant bacteria in aerobic marine conditions belong to *Clostriales*, *Gemmatales*,

*Phycisphaerales* and *Chlamydiales*, whereas *Cloacamonales* and *Thermotogales* dominate in anaerobic sludge (Wang et al., 2018).

#### **4. Concluding remarks:**

In this review, we have presented both aspects of microbial ecotoxicology on marine plastic debris, namely the impact of plastic on marine microbial life and inversely how microbes can play a role in plastic biodegradation. An increasing number of studies either describe the different steps of biofilm formation under marine conditions, or give new insights on bacteria colonizing the aged plastics directly sampled at sea. The very diverse and active bacteria living on plastics as compared to the surrounding waters suggest a potential impact on the global biogeochemical cycles associated with the relatively recent introduction of plastic in the oceans, impact that remains to be determined. Plastic released in the oceans is also accused to be a raft for invasive species including pathogenic bacteria, but no proof of pathogenicity on marine animals or humans in relation to plastic ingestion has emerged so far.

A better knowledge of the plastisphere is also a critical issue in understanding the role played by bacteria in plastic biodegradation. Several studies have underlined that current standards are failing to prove biodegradability at sea for several reasons that have been highlighted in this review. Biodegradation of a polymer at sea depends on many factors related to its own composition, but also on the various ecosystems and environmental conditions encountered during its very long lifetime. It is for these reasons that plastic polymers continue to accumulate at sea and that biodegradation rates reported in the laboratory are never reached in the environment. Thus, a complete study of the biodegradation of a polymer at sea must combine several monitoring parameters, and especially be confirmed in the field with experiments *in situ*. Given the complexity of the plastic problem, research network initiatives such as ‘Polymers & Oceans’ (<https://po2018.wixsite.com/po2018>) that bring together

physicists, chemists and biologists are required to answer the wishes and needs of many scientists to face this environmental problem and its resonance in the society.

## 5. Acknowledgments

The work was made possible thanks to support granted to ANR by the Programme OXOMAR (funded by the French Ministry for Education and Research, [http://lomic.obs-banyuls.fr/fr/axe\\_4\\_ecotoxicologie\\_et\\_ingenierie\\_metabolique\\_microbienne/oxomar.html](http://lomic.obs-banyuls.fr/fr/axe_4_ecotoxicologie_et_ingenierie_metabolique_microbienne/oxomar.html)) and the company Plastic@Sea (<http://plasticatsea.com>). We wish to thank V. Domien, L. Hesse, L. Intertaglia, R. Gendron/ E-marinlab, Fondation TaraExpeditions and Soixante seize for their help in figure design, as well as Guigui PA and VJPJS for their insightful comments on the manuscript. We are also grateful to our colleagues of the office of the international research network ‘Ecotoxicomic’ on Microbial Ecotoxicology (<https://ecotoxicomic.org>) and of the French research network ‘Polymers & Oceans’ (<https://po2018.wixsite.com/po2018>) supported by CNRS.

All of the reported work is original, and authors have seen and approved the final version submitted. The material has not been submitted for publication elsewhere while under consideration for Frontiers in Microbiology. The authors declare that there are no conflicts of interest. Likewise, consent is given for publication in Frontiers in Microbiology, if accepted.

## 6. References

- Abou-Zeid, D., Müller, R., and Deckwer, W. (2001). Anaerobic biodegradation of natural and synthetic polyesters. Germany.
- Alshehrei, F. (2017). Biodegradation of synthetic and natural plastic by microorganisms. *J. Appl. Environ. Microbiol. J. Appl. Environ. Microbiol.* 5, 8–19. doi:10.12691/jaem-5-1-2.
- Amaral-Zettler, L. A., Zettler, E. R., Slikas, B., Boyd, G. D., Melvin, D. W., Morrall, C. E., et al. (2015). The biogeography of the plastisphere: implications for policy. *Front. Ecol. Environ.* 13, 541–546. doi:10.1890/150017.
- Ansari, S., and Fatma, T. (2016). Cyanobacterial polyhydroxybutyrate (PHB): screening, optimization and characterization. *PLoS One* 11, e0158168. doi:10.1371/journal.pone.0158168.
- Asmita, K., Shubhamsingh, T., and Tejashree, S. (2015). Isolation of plastic degrading micro-organisms from soil samples collected at various locations in Mumbai, India. 4, 9.
- Atiq, N., Ahmed, S., Ali, M. I., Saadia, leeb, Ahmad, B., et al. (2010). Isolation and identification of polystyrene biodegrading bacteria from soil. *African J. Microbiol. Res.* 4, 1537–1541.
- Auta, H. S., Emenike, C. U., and Fauziah, S. H. (2017). Distribution and importance of microplastics in the marine environment: A review of the sources, fate, effects, and potential solutions. *Environ. Int.* 102, 165–176. doi:10.1016/j.envint.2017.02.013.
- Bakir, A., Rowland, S. J., and Thompson, R. C. (2014). Enhanced desorption of persistent organic pollutants from microplastics under simulated physiological conditions. *Environ. Pollut.* 185, 16–23. doi:10.1016/j.envpol.2013.10.007.
- Barnes, D. K. A., and Fraser, K. P. P. (2003). Rafting by five phyla on man-made flotsam in the Southern Ocean. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 262, 289–291. doi:10.3354/meps262289.
- Bhardwaj, H., Gupta, R., and Tiwari, A. (2013). Communities of microbial enzymes associated with biodegradation of plastics. *J. Polym. Environ.* 21, 575–579. doi:10.1007/s10924-012-0456-z.
- Briand, J.-F., Djeridi, I., Jamet, D., Coupé, S., Bressy, C., Molmeret, M., et al. (2012). Pioneer marine biofilms on artificial surfaces including antifouling coatings immersed in two contrasting French Mediterranean coast sites. *Biofouling* 28, 453–463. doi:10.1080/08927014.2012.688957.
- Brunner, I., Fischer, M., Rüthi, J., Stierli, B., and Frey, B. (2018). Ability of fungi isolated from plastic debris floating in the shoreline of a lake to degrade plastics. *PLOS ONE* 13, e0202047. doi:10.1371/journal.pone.0202047.
- Bryant, J. A., Clemente, T. M., Viviani, D. A., Fong, A. A., Thomas, K. A., Kemp, P., et al. (2016). Diversity and activity of aommunities inhabiting plastic debris in the North Pacific gyre. *mSystems* 1. doi:10.1128/mSystems.00024-16.
- Carlton, J. T., Chapman, J. W., Geller, J. B., Miller, J. A., Carlton, D. A., McCuller, M. I., et al. (2017). Tsunami-driven rafting: Transoceanic species dispersal and implications for marine biogeography. *Science* 357, 1402–1406. doi:10.1126/science.aao1498.
- Chang, H.-F., Chang, W.-C., and Tsai, C.-Y. (2012). Synthesis of poly(3-hydroxybutyrate/3-hydroxyvalerate) from propionate-fed activated sludge under various carbon sources. *Bioresour. Technol.* 113, 51–57. doi:10.1016/j.biortech.2011.12.138.
- Charette, M., and Smith, W. (2010). The volume of Earth's Ocean. *Oceanogr. (washington, D.C.)* 23. doi:10.5670/oceanog.2010.51.
- Cosgrove, L., McGeechan, P. L., Robson, G. D., and Handley, P. S. (2007). Fungal Communities Associated with Degradation of Polyester Polyurethane in Soil. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 5817–5824. doi:10.1128/AEM.01083-07.
- Cózar, A., Echevarria, F., Gonzalez-Gordillo, J. I., Irigoien, X., Ubeda, B., Hernandez-Leon, S., et al. (2014). Plastic debris in the open ocean. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 10239–10244. doi:10.1073/pnas.1314705111.
- Dang, H., Li, T., Chen, M., Huang, G. (2008) Cross-ocean distribution of Rhodobacterales bacteria as primary surface colonizers in temperate coastal marine waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:52–60.
- Danso, D., Schmeisser, C., Chow, J., Zimmermann, W., Wei, R., Leggewie, C., et al. (2018). New insights into

- the function and global distribution of polyethylene terephthalate (PET)- degrading bacteria and enzymes in marine and terrestrial metagenomes. *Appl. Environ. Microbiol.* 84, doi:10.1128/AEM.02773-17.
- Das, M. P., and Kumar, S. (2015). An approach to low-density polyethylene biodegradation by *Bacillus amyloliquefaciens*. *3 Biotech* 5, 81–86. doi:10.1007/s13205-014-0205-1.
- De Tender, C. A., Devriese, L. I., Haegeman, A., Maes, S., Ruttink, T., and Dawyndt, P. (2015). Bacterial community profiling of plastic litter in the Belgian part of the North sea. *Environ. Sci. Technol.* doi:10.1021/acs.est.5b01093.
- De Tender, C., Devriese, L. I., Haegeman, A., Maes, S., Vangeste, J., Cattrijssse, A., et al. (2017). Temporal dynamics of bacterial and fungal colonization on plastic debris in the North sea. *Environ. Sci. Technol.* 51, 7350–7360. doi:10.1021/acs.est.7b00697.
- Debroas, D., Mone, A., and Ter Halle, A. (2017). Plastics in the North Atlantic garbage patch: a boat-microbe for hitchhikers and plastic degraders. *Sci. Total Environ.* 599, 1222–1232. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.05.059.
- Duis, K., and Coors, A. (2016). Microplastics in the aquatic and terrestrial environment: sources (with a specific focus on personal care products), fate and effects. *Environ. Sci. Eur.* 28, 2. doi:10.1186/s12302-015-0069-y.
- Dussud, C., and Ghiglione, J.-F. (2014). “Bacterial degradation of synthetic plastics,” in *Marine litter in the Mediterranean and Black Seas*, ed. F. Briand (CIESM Publisher), 180.
- Dussud, C., Hudec, C., George, M., Fabre, P., Higgs, P., Bruzaud, S., et al. (2018a). Colonization of Non-biodegradable and Biodegradable plastics by marine microorganisms. *Front. Microbiol.* 9, 1571.
- Dussud, C., Meistertzheim, A.-L., Conan, P., Pujo-Pay, M., George, M., Fabre, P., et al. (2018b). Evidence of niche partitioning among bacteria living on plastics, organic particles and surrounding seawaters. *Environ. Pollut.* 236, 807–816.
- Eich, A., Mildnerberger, T., Laforsch, C., and Weber, M. (2015). Biofilm and diatom succession on polyethylene (PE) and biodegradable plastic bags in two marine habitats: Early signs of degradation in the pelagic and benthic zone? *PLoS One* 10, 1–16. doi:10.1371/journal.pone.0137201.
- Eriksen, M., Lebreton, L. C. M., Carson, H. S., Thiel, M., Moore, C. J., Borerro, J. C., et al. (2014). Plastic pollution in the world’s Oceans: More than 5 trillion plastic pieces weighing over 250,000 Tons Afloat at Sea. *PLoS One* 9, 1–15. doi:10.1371/journal.pone.0111913.
- Esmaeili, A., Pourbabae, A. A., Alikhani, H. A., Shabani, F., and Esmaeili, E. (2013). Biodegradation of Low-Density Polyethylene (LDPE) by Mixed Culture of *Lysinibacillus xylanilyticus* and *Aspergillus niger* in Soil. *PLoS One* 8, e71720. doi:10.1371/journal.pone.0071720.
- Eubeler, J. P., Bernhard, M., Knepper, T.P. (2010). Environmental biodegradation of synthetic polymers II. Biodegradation of different polymer groups. *Trends Anal. Chem.* 29, 84–100.
- Eyheragibel, B., Traikia, M., Fontanella, S., Sancelme, M., Bonhomme, S., Fromageot, D., et al. (2017). Characterization of oxidized oligomers from polyethylene films by mass spectrometry and NMR spectroscopy before and after biodegradation by a *Rhodococcus rhodochrous* strain. *Chemosphere* 184, 366–374. doi:10.1016/j.chemosphere.2017.05.137.
- Fazey, F. M. C., and Ryan, P. G. (2016). Biofouling on buoyant marine plastics: An experimental study into the effect of size on surface longevity. *Environ. Pollut.* 210, 354–360. doi:<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.01.026>.
- Fenchel, T. (2008) The microbial loop – 25 years later. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 366, 99–103.
- Gajendiran, A., Krishnamoorthy, S., and Abraham, J. (2016). Microbial degradation of low-density polyethylene (LDPE) by *Aspergillus clavatus* strain JASK1 isolated from landfill soil. *3 Biotech* 6. doi:10.1007/s13205-016-0394-x.
- Gwertz, B., Plassmann, M. M., and Macleod, M. (2015). Pathways for degradation of plastic polymers floating in the marine environment. *Environ. Sci. Process. Impacts* 17, 1513–1521. doi:10.1039/c5em00207a.
- Ghiglione, J.-F., Martin-Laurent, F., and Pesce, S. (2016). Microbial ecotoxicology: an emerging discipline facing contemporary environmental threats. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 3981–3983. doi:10.1007/s11356-015-5763-1.
- Ghiglione, J. F., Martin-Laurent, F., Stachowski-Haberkorn, S., Pesce, S., and Vuilleumier, S. (2014). The coming of age of microbial ecotoxicology: report on the first two meetings in France. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*

- 21, 14241–14245. doi:10.1007/s11356-014-3390-x.
- Gilan, I., and Sivan, A. (2013). Effect of proteases on biofilm formation of the plastic-degrading actinomycete *Rhodococcus ruber* C208. *FEMS Microbiol. Lett.* 342, 18–23. doi:10.1111/1574-6968.12114.
- Goldstein, M. C., Carson, H. S., and Eriksen, M. (2014). Relationship of diversity and habitat area in North Pacific plastic-associated rafting communities. *Mar. Biol.* 161, 1441–1453. doi:10.1007/s00227-014-2432-8.
- Gonda, K. E., Jendrossek, D., and Molitoris, H. P. (2000). Fungal degradation of the thermoplastic polymer poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid (PHB) under simulated deep sea pressure BT - Life at Interfaces and Under Extreme Conditions. in, eds. G. Liebezeit, S. Dittmann, and I. Kröncke (Dordrecht: Springer Netherlands), 173–183.
- Gorke, J. T., Okrasa, K., Louwagie, A., Kazlauskas, R. J., and Srienc, F. (2007). Enzymatic synthesis of poly(hydroxyalkanoates) in ionic liquids. *J. Biotechnol.* 132, 306–313. doi:10.1016/j.biote.2007.04.001.
- Gravouil, K., Ferru-Clément, R., Colas, S., Helye, R., Kadri, L., Bourdeau, L., et al. (2017). Transcriptomics and lipidomics of the environmental strain *Rhodococcus ruber* point out consumption pathways and potential metabolic bottlenecks for polyethylene degradation. *Environ. Sci. Technol.* 51, 5172–5181. doi:10.1021/acs.est.7b00846.
- Hadad, D., Geresh, S., and Sivan, A. (2005). Biodegradation of polyethylene by the thermophilic bacterium *Brevibacillus borstelensis*. *J. Appl. Microbiol.* 98, 1093–1100. doi:10.1111/j.1365-2672.2005.02553.x.
- Harrison, J. P., Boardman, C., O'Callaghan, K., Delort, A.-M., and Song, J. (2018). Biodegradability standards for carrier bags and plastic films in aquatic environments: a critical review. *R. Soc. Open Sci.* 5. Available at: <http://rsos.royalsocietypublishing.org/content/5/5/171792.abstract>.
- Harrison, J. P., Sapp, M., Schratzberger, M., and Osborn, A. M. (2011). Interactions between Microorganisms and marine microplastics: A Call for Research. *Mar. Technol. Soc. J.* 45, 12–20. doi:10.4031/MTSJ.45.2.2.
- Harrison, J. P., Schratzberger, M., Sapp, M., and Osborn, A. M. (2014). Rapid bacterial colonization of low-density polyethylene microplastics in coastal sediment microcosms. *BMC Microbiol.* 14. doi:10.1186/s12866-014-0232-4.
- Harshvardhan, K., and Jha, B. (2013). Biodegradation of low-density polyethylene by marine bacteria from pelagic waters, Arabian Sea, India. *Mar. Pollut. Bull.* 77, 100–106. doi:10.1016/j.marpolbul.2013.10.025.
- Hidalgo-Ruz, V., Gutow, L., Thompson, R. C., and Thiel, M. (2012). Microplastics in the marine environment: A Review of the methods used for identification and quantification. *Environ. Sci. Technol.* 46, 3060–3075. doi:10.1021/es2031505.
- Ho, B. T., Roberts, T. K., and Lucas, S. (2018). An overview on biodegradation of polystyrene and modified polystyrene: the microbial approach. *Crit. Rev. Biotechnol.* 38, 308–320. doi:10.1080/07388551.2017.1355293.
- Hoeksema, B. W. (2012). Evolutionary trends in onshore-offshore distribution patterns of mushroom coral species (Scleractinia: Fungiidae). *Contrib Zool* 81.
- Hosaka, M., Kamimura, N., Toribami, S., Mori, K., Kasai, D., Fukuda, M., et al. (2013). Novel tripartite aromatic acid transporter essential for terephthalate uptake in *Comamonas* sp. strain E6. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 6148–6155. doi:10.1128/AEM.01600-13.
- Hugenholtz, P., Hooper, S. D., and Kyrpides, N. C. (2009). Focus: Synergistetes. *Environ. Microbiol.* 11, 1327–1329. doi:10.1111/j.1462-2920.2009.01949.x.
- Hutchins, D. A., and Fu, F. (2017). Microorganisms and ocean global change. *Nat. Microbiol.* 2, 17058. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.58>.
- Ibiene, A. A., Stanley, H. O., and Immanuel, O. M. (2013). Biodegradation of polyethylene by *Bacillus* sp. indigenous to the Niger delta mangrove swamp. *Niger. J. Biotechnol.* 26, 68–78. Available at: <https://www.ajol.info/index.php/njb/article/view/103387>.
- İpekoglu, B., Böke, H., and Çizer, Ö. (2007). Assessment of material use in relation to climate in historical buildings. *Build. Environ.* 42, 970–978.
- Ingavale, R. ., and Raut, P. D. (2018). Comparative biodegradation studies of LDPE and HDPE using *Bacillus weihenstephanensis* isolated from garbage soil. *Nat. Environ. Pollut. Technol.* 17, 649–655.
- Ishigaki, T., Sugano, W., Nakanishi, A., Tateda, M., Ike, M., and Fujita, M. (2004). The degradability of biodegradable plastics in aerobic and anaerobic waste landfill model reactors. *Chemosphere* 54, 225–233.

- doi:10.1016/S0045-6535(03)00750-1.
- Jaffredo, C. G., Carpentier, J.-F., and Guillaume, S. M. (2013). Organocatalyzed controlled ROP of  $\beta$ -lactones towards poly(hydroxyalkanoate)s: from  $\beta$ -butyrolactone to benzyl  $\beta$ -malolactone polymers. *Polym. Chem.* 4, 3837–3850. doi:10.1039/C3PY00401E.
- Jambeck, J. R., Geyer, R., Wilcox, C., Siegler, T. R., Perryman, M., Andrade, A., et al. (2015). Plastic waste inputs from land into the ocean. *Science (80-. ).* 347, 768–771. doi:10.1126/science.1260352.
- Jendrossek, D., Knoke, I., Habibian, R. B., Steinbüchel, A., and Schlegel, H. G. (1993). Degradation of poly(3-hydroxybutyrate), PHB, by bacteria and purification of a novel PHB depolymerase from *Comamonas* sp. *J. Environ. Polym. Degrad.* 1, 53–63. doi:10.1007/BF01457653.
- Jiang, P., Zhao, S., Zhu, L., and Li, D. (2018). Microplastic-associated bacterial assemblages in the intertidal zone of the Yangtze Estuary. *Sci. Total Environ.* 624, 48–54. doi:<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.12.105>.
- Kale, S. K., Deshmukh, A. G., Dudhare, M. S., and Patil, V. B. (2015). Microbial degradation of plastic: a review. *J. Biochem. Technol.* 6, 952–961.
- Kalogerakis, N., Karkanorachaki, K., Kalogerakis, G. C., Triantafyllidi, E. I., Gotsis, A. D., Partsinevelos, P., et al. (2017). Microplastics generation: onset of fragmentation of polyethylene Films in Marine Environment Mesocosms. *Front. Mar. Sci.* 4, 84. Available at: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmars.2017.00084>.
- Kaplan, D. L., Hartenstein, R., and Sutter, J. (1979). Biodegradation of polystyrene, poly(methyl methacrylate), and phenol formaldehyde. *Appl. Environ. Microbiol.* 38, 551–553. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC243531/>.
- Kasuya, K., Inoue, Y., Tanaka, T., Akehata, T., Iwata, T., Fukui, T., et al. (1997). Biochemical and molecular characterization of the polyhydroxybutyrate depolymerase of *Comamonas acidovorans* YM1609, isolated from freshwater. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 4844–4852. Available at: <https://aem.asm.org/content/63/12/4844>.
- Kathiresan, K. (2003). Polythene and plastic-degrading microbes in an Indian mangrove soil. *Rev. Biol. Trop.* 51, 629–633.
- Keswani, A., Oliver, D. M., Gutierrez, T., and Quilliam, R. S. (2016). Microbial hitchhikers on marine plastic debris: Human exposure risks at bathing waters and beach environments. *Mar. Environ. Res.* 118, 10–19. doi:<https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2016.04.006>.
- Kettner, M. T., Rojas-Jimenez, K., Oberbeckmann, S., Labrenz, M., and Grossart, H.-P. (2017). Microplastics alter composition of fungal communities in aquatic ecosystems. *Environ. Microbiol.* 19, 4447–4459. doi:10.1111/1462-2920.13891.
- Kirstein, I. V., Kirmizi, S., Wichels, A., Garin-Fernandez, A., Erler, R., Löder, M., et al. (2016). Dangerous hitchhikers? Evidence for potentially pathogenic *Vibrio* spp. on microplastic particles. *Mar. Environ. Res.* 120, 1–8. doi:<https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2016.07.004>.
- Kita, K., Ishimaru, K., Teraoka, M., Yanase, H., and Kato, N. (1995). Properties of poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase from a marine bacterium, *Alcaligenes faecalis* AE122. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1727–1730. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC167434/>.
- Kobayashi, T., Sugiyama, A., Kawase, Y., Saito, T., Mergaert, J., and Swings, J. (1999). Biochemical and Genetic Characterization of an Extracellular Poly(3-Hydroxybutyrate) Depolymerase from *Acidovorax* sp. Strain TP4. *J. Polym. Environ.* 7, 9–18. doi:10.1023/A:1021885901119.
- Koitabashi, M., Noguchi, M. T., Sameshima-Yamashita, Y., Hiradate, S., Suzuki, K., Yoshida, S., et al. (2012). Degradation of biodegradable plastic mulch films in soil environment by phylloplane fungi isolated from gramineous plants. *AMB Express* 2, 40. doi:10.1186/2191-0855-2-40.
- Koutny, M., Lemaire, J., and Delort, A.-M. (2006). Biodegradation of polyethylene films with prooxidant additives. *Chemosphere* 64, 1243–1252. doi:10.1016/j.chemosphere.2005.12.060.
- Kowalczyk, A., Chyc, M., Ryszka, P., and Latowski, D. (2016). *Achromobacter xylosoxidans* as a new microorganism strain colonizing high-density polyethylene as a key step to its biodegradation. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 11349–11356. doi:10.1007/s11356-016-6563-y.
- Krueger, M. C., Harms, H., and Schlosser, D. (2015). Prospects for microbiological solutions to environmental pollution with plastics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 8857–8874. doi:10.1007/s00253-015-6879-4.

- Klindworth, A.; Pruesse, E.; Schweer, T.; Peplies, J.; Quast, C.; Horn, M.; Glöckner, F.O. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res.* 2013, 41, 1–11.
- Kubanek, J., Jensen, P. R., Keifer, P. A., Sullards, M. C., Collins, D. O., and Fenical, W. (2003). Seaweed resistance to microbial attack: A targeted chemical defense against marine fungi. *PNAS* 100, 6916–6921. doi:10.1073/pnas.1131855100.
- Kyaw, B. M., Champakalakshmi, R., Sakharkar, M. K., Lim, C. S., and Sakharkar, K. R. (2012). Biodegradation of Low Density Polythene (LDPE) by *Pseudomonas* Species. *Indian J. Microbiol.* 52, 411–419. doi:10.1007/s12088-012-0250-6.
- Lebreton, L., Slat, B., Ferrari, F., Sainte-Rose, B., Aitken, J., Marthouse, R., et al. (2018). Evidence that the Great Pacific Garbage Patch is rapidly accumulating plastic. *Sci. Rep.* 8, 4666. doi:10.1038/s41598-018-22939-w.
- Lee, H., Shim, W. J., and Kwon, J.-H. (2014). Sorption capacity of plastic debris for hydrophobic organic chemicals. *Sci. Total Environ.* 470–471, 1545–1552. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.08.023.
- Lee, J.-W., Nam, J.-H., Kim, Y.-H., Lee, K.-H., and Lee, D.-H. (2008). Bacterial communities in the initial stage of marine biofilm formation on artificial surfaces. *J. Microbiol.* 46, 174–182. doi:10.1007/s12275-008-0032-3.
- Liebminger, S., Eberl, A., Sousa, F., Heumann, S., Fischer-Colbrie, G., Cavaco-Paulo, A., et al. (2007). Hydrolysis of PET and bis-(benzoyloxyethyl) terephthalate with a new polyesterase from *Penicillium citrinum*. *Biocatal. Biotransformation* 25, 171–177. doi:10.1080/10242420701379734.
- Lobelle, D., and Cunliffe, M. (2011). Early microbial biofilm formation on marine plastic debris. *Mar. Pollut. Bull.* 62, 197–200. doi:<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2010.10.013>.
- Luu, R. A., Schneider, B. J., Ho, C. C., Nesteryuk, V., Ngwesse, S. E., Liu, X., et al. (2013). Taxis of *Pseudomonas putida* F1 toward phenylacetic acid is mediated by the energy taxis receptor Aer2. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 2416–2423. doi:10.1128/AEM.03895-12.
- Luzier, W. D. (1992). Materials derived from biomass/biodegradable materials. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 839–842.
- Mabrouk, M. M., and Sabry, S. A. (2001). Degradation of poly (3-hydroxybutyrate) and its copolymer poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by a marine *Streptomyces* sp. SNG9. *Microbiol. Res.* 156, 323–335. doi:10.1078/0944-5013-00115
- Magnin, A., Hoornaert, L., Pollet, E., Laurichesse, S., Phalip, V., and Avérous, L. (2018). Isolation and characterization of different promising fungi for biological waste management of polyurethanes. *Microbial Biotechnology*. doi:10.1111/1751-7915.13346.
- Manzur, A., Limón-González, M., and Favela-Torres. (2004). Biodegradation of physicochemically treated LDPE by a consortium of filamentous fungi. *Journal of Applied Polymer Science* 92, 265–271. doi:10.1002/app.13644.
- Marten, E., Müller, R.-J., and Deckwer, W.-D. (2005). Studies on the enzymatic hydrolysis of polyesters. II. Aliphatic–aromatic copolymers. *Polym. Degrad. Stab.* 88, 371–381. doi:<https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2004.12.001>.
- Martínez-Tobón, D. I., Gul, M., Elias, A. L., and Sauvageau, D. (2018). Polyhydroxybutyrate (PHB) biodegradation using bacterial strains with demonstrated and predicted PHB depolymerase activity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102, 8049–8067. doi:10.1007/s00253-018-9153-8.
- Masó, M., Garcés, E., Pagès, F., and Camp, J. (2003). Drifting plastic debris as a potential vector for dispersing Harmful Algal Bloom (HAB) species. *Sci. Mar.* 67, 107–111.
- Mohanrasu, K., Premnath, N., Siva Prakash, G., Sudhakar, M., Boobalan, T., and Arun, A. (2018). Exploring multi potential uses of marine bacteria; an integrated approach for PHB production, PAHs and polyethylene biodegradation. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 185, 55–65. doi:10.1016/j.jphotobiol.2018.05.014.
- Mohee R, Unmar GD, Mudhoo A, and Khadoo P. 2008. Biodegradability of biodegradable/degradable plastic materials under aerobic and anaerobic conditions. *Waste Manag* 28: 1624–9.
- Mor, R., and Sivan, A. (2008). Biofilm formation and partial biodegradation of polystyrene by the actinomycete *Rhodococcus ruber*. *Biodegradation* 19, 851–858. doi:10.1007/s10532-008-9188-0.
- Mothes, G., Ackermann, J.-U., and Babel, W. (2004). Mole Fraction Control of Poly([R]-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHB/HV) Synthesized by Paracoccus denitrificans. *Eng. Life Sci.* 4, 247–251.

doi:10.1002/elsc.200320029.

- Mukai, K., Yamada, K., and Doi, Y. (1994). Efficient hydrolysis of polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas stutzeri* YM1414 isolated from lake water. *Polym. Degrad. Stab.* 43, 319–327. doi:10.1016/0141-3910(94)90002-7.
- Müller, R.-J., Schrader, H., Profe, J., Dresler, K., and Deckwer, W.-D. (2005). Enzymatic degradation of Poly(ethylene terephthalate): rapid hydrolyse using a hydrolase from *T. fusca*. *Macromol. Rapid Commun.* 26, 1400–1405. doi:10.1002/marc.200500410.
- Muthukrishnan, T., Al Khaburi, M., and Abed, R. M. M. (2018). Fouling microbial communities on plastics compared with wood and steel: Are they substrate- or location-specific? *Microbial Ecology*. doi:10.1007/s00248-018-1303-0.
- Nimchua, T., Punnappayak, H., and Zimmermann, W. (2007). Comparison of the hydrolysis of polyethylene terephthalate fibers by a hydrolase from *Fusarium oxysporum* LCH I and *Fusarium solani* f. sp. pisi. *Biotechnol. J.* 2, 361–364. doi:10.1002/biot.200600095.
- Novotný, Č., Malachová, K., Adamus, G., Kwiecień, M., Lotti, N., Soccio, M., et al. (2018). Deterioration of irradiation/high-temperature pretreated, linear low-density polyethylene (LLDPE) by *Bacillus amyloliquefaciens*. *Int. Biodegrad. Biodegradation*. doi:10.1016/j.ibiod.2018.04.014.
- O'Leary, N. D., O'Connor, K. E., Ward, P., Goff, M., and Dobson, A. D. W. (2005). Genetic characterization of accumulation of polyhydroxyalkanoate from styrene in *Pseudomonas putida* CA-3. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 4380–4387. doi:10.1128/AEM.71.8.4380-4387.2005.
- Oberbeckmann, S., Kreikemeyer, B., and Labrenz, M. (2018). Environmental Factors Support the formation of specific bacterial assemblages on microplastics. *Front. Microbiol.* 8, 2709. Available at: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2017.02709>.
- Oberbeckmann, S., Loeder, M. G. J., Gerdts, G., and Mark Osborn, A. (2014). Spatial and seasonal variation in diversity and structure of microbial biofilms on marine plastics in Northern European waters. *FEMS Microbiol. Ecol.* 94, 478–492. doi:10.1111/1574-6941.12409.
- Oberbeckmann, S., Loeder, M. G. J., and Labrenz, M. (2015). Marine microplastic- associated biofilms - a review. *Environ. Chem.* 12, 551–562. doi:10.1071/EN15069.
- Oikawa, E., Linn, K. T., Endo, T., Oikawa, T., and Ishibashi, Y. (2003). Isolation and characterization of polystyrene degrading microorganisms for zero emission treatment of expanded polystyrene. *Environ. Eng. Res.* 40, 373–379. doi:10.11532/proes1992.40.373.
- Pathak, V. M. (2017). Review on the current status of polymer degradation: a microbial approach. *Bioresour. Bioprocess.* 4, 15. doi:10.1186/s40643-017-0145-9.
- Peixoto, J., Silva, L. P., and Krüger, R. H. (2017). Brazilian Cerrado soil reveals an untapped microbial potential for unpretreated polyethylene biodegradation. *J. Hazard. Mater.* 324, 634–644. doi:10.1016/j.jhazmat.2016.11.037.
- Peña, C., Castillo, T., García, A., Millán, M., Segura, D. (2014) Biotechnological strategies to improve production of microbial poly-(3-hydroxybutyrate): a review of recent research work. *Microb. Biotech.* 7, 278-293.
- Pomeroy, L. R., LeB. Williams, P. J., Azam, F., and Hobbie, J. E. (2007). The microbial loop. *Oceanography* 20, 28–33. Available at: <http://www.jstor.org/stable/24860040>.
- Pompilio, A., Piccolomini, R., Picciani, C., D'Antonio, D., Savini, V., and Di Bonaventura, G. (2008). Factors associated with adherence to and biofilm formation on polystyrene by *Stenotrophomonas maltophilia*: The role of cell surface hydrophobicity and motility. *FEMS Microbiol. Lett.* 287, 41–47. doi:10.1111/j.1574-6968.2008.01292.x.
- Pramila, R. (2012). *Brevibacillus parabrevis*, *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas citronellolis* - Potential candidates for biodegradation of low density polyethylene (LDPE). *J. Bacteriol. Res.* 4. doi:10.5897/JBR12.003.
- Pramila, R., and Ramesh, K. V. (2011). Biodegradation of low density polyethylene (LDPE) by fungi isolated from marine water a SEM analysis. *AJMR* 5, 5013–5018. doi:10.5897/AJMR11.670.
- Reis, M. A. M., Serafim, L. S., Lemos, P. C., Ramos, A. M., Aguiar, F. R., and Van Loosdrecht, M. C. M. (2003). Production of polyhydroxyalkanoates by mixed microbial cultures. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 25, 377–385. doi:10.1007/s00449-003-0322-4.
- Romen, F., Reinhardt, S., and Jendrossek, D. (2004). Thermotolerant poly(3-hydroxybutyrate)-degrading bacteria

- from hot compost and characterization of the PHB depolymerase of *Schlegelella* sp. KB1a. *Arch. Microbiol.* 182, 157–164. doi:10.1007/s00203-004-0684-2.
- Ronkvist, Å. M., Xie, W., Lu, W., and Gross, R. A. (2009). Cutinase-catalyzed hydrolysis of poly(ethylene terephthalate). *Macromolecules* 42, 5128–5138. doi:10.1021/ma9005318.
- Salta, M., Wharton, J. A., Blache, Y., Stokes, K. R., and Briand, J. F. (2013). Marine biofilms on artificial surfaces: Structure and dynamics. *Environ. Microbiol.* 15, 2879–2893. doi:10.1111/1462-2920.12186.
- Santo, M., Weitsman, R., and Sivan, A. (2013). The role of the copper-binding enzyme – laccase – in the biodegradation of polyethylene by the actinomycete *Rhodococcus ruber*. *Int. Biodegrad. Biodegradation* 84, 204–210. doi:10.1016/j.ibiod.2012.03.001.
- Sauret, C., Tedetti, M., Guigue, C., Dumas, C., Lami, R., Pujo-Pay, M., et al. (2016). Influence of PAHs among other coastal environmental variables on total and PAH-degrading bacterial communities. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 4242–4256. doi:10.1007/s11356-015-4768-0.
- Shah, A. A., Hasan, F., Hameed, A., and Ahmed, S. (2008). Biological degradation of plastics: A comprehensive review. *Biotechnol. Adv.* 26, 246–265. doi:10.1016/j.biotechadv.2007.12.005.
- Sharon, C., and Sharon, M. (2017). Studies on biodegradation of polyethylene terephthalate: A synthetic polymer. *J. Microbiol. Biotechnol. Res.* 2, 248–257.
- Sielicki, M., Focht, D. D., and Martin, J. P. (1978). Microbial degradation of [C14C]polystyrene and 1,3-diphenylbutane. *Can. J. Microbiol.* 24, 798–803. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/98222>.
- Silva, C. M., Carneiro, F., O'Neill, A., Fonseca, L. P., Cabral, J. S. M., Guebitz, G., et al. (2005). Cutinase? A new tool for biomodification of synthetic fibers. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* 43, 2448–2450. doi:10.1002/pola.20684.
- Singh, B., and Sharma, N. (2008). Mechanistic implications of plastic degradation. *Polym. Degrad. Stab.* 93, 561–584. doi:10.1016/j.polymdegradstab.2007.11.008.
- Sivan, A. (2011). New perspectives in plastic biodegradation. *Curr. Opin. Biotechnol.* 22, 422–426. doi:10.1016/j.copbio.2011.01.013.
- Syranidou, E., Karkanorachaki, K., Amorotti, F., Franchini, M., Repouskou, E., Kaliva, M., et al. (2017). Biodegradation of weathered polystyrene films in seawater microcosms. *Sci. Rep.* 7, 17991. doi:10.1038/s41598-017-18366-y.
- Takeda, M., Koizumi, J.-I., Yabe, K., and Adachi, K. (1998). Thermostable poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase of a thermophilic strain of *Leptothrix* sp. isolated from a hot spring. *J. Ferment. Bioeng.* 85, 375–380. doi:10.1016/S0922-338X(98)80080-9.
- Tang, Z.-L., Kuo, T.-A., and Liu, H.-H. (2017). The study of the microbes degraded polystyrene. *Adv. Technol. Innov.* 2, 13–17. Available at: <http://ojs.imeti.org/index.php/AITI/article/view/204>.
- Tanio, T., Fukui, T., Shirakura, Y., Saito, T., Tomita, K., Kaiho, T., et al. (1982). An extracellular poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase from *Alcaligenes faecalis*. *Eur. J. Biochem.* 124, 71–77. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7084231>.
- Uefuji, M., Kasuya, K., and Doi, Y. (1997). Enzymatic degradation of poly[(R)-3-hydroxybutyrate]: secretion and properties of PHB depolymerase from *Pseudomonas stutzeri*. *Polym. Degrad. Stab.* 58, 275–281. doi:10.1016/S0141-3910(97)00058-X.
- Volke-Sepúlveda, T., Saucedo-Castañeda, G., Gutiérrez-Rojas, M., Manzur, A., and Favela-Torres, E. (2002). Thermally treated low density polyethylene biodegradation by *Penicillium pinophilum* and *Aspergillus niger*. *J. Appl. Polym. Sci.* 83, 305–314. doi:10.1002/app.2245.
- Wagner, M., Lambert, S., and Eds (2018). Freshwater microplastics : emerging environmental contaminants ? *Handb. Environ. Chem.* 58.
- Wang S, Lydon KA, White EM, et al. 2018. Biodegradation of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) Plastic under Anaerobic Sludge and Aerobic Seawater Conditions: Gas Evolution and Microbial Diversity. *Environ Sci Technol* **52**: 5700–9.
- Ward, P. G., Goff, M., Donner, M., Kaminsky, W., and O'Connor, K. E. (2006). A two step chemo-biotechnological conversion of polystyrene to a biodegradable thermoplastic. *Environ. Sci. Technol.* 40, 2433–2437. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16649270>.

- Webb, H. K., Crawford, R. J., Sawabe, T., and Ivanova, E. P. (2009). Poly(ethylene terephthalate) polymer surfaces as a substrate for bacterial attachment and biofilm formation. *Microbes Environ.* 24, 39–42. doi:10.1264/jsme2.ME08538.
- Willis, K., Denise Hardesty, B., Kriwoken, L., and Wilcox, C. (2017). Differentiating littering, urban runoff and marine transport as sources of marine debris in coastal and estuarine environments. *Sci. Rep.* 7, 44479. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/srep44479>.
- Wommack, K. E., and Colwell, R. R. (2000). Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 69–114. doi:10.1128/MMBR.64.1.69-114.2000.
- Worm, B., Lotze, H. K., Jubinville, I., Wilcox, C., and Jambeck, J. (2017). Plastic as a persistent marine pollutant. *Annu. Rev. Environ. Resour.* 42, 1–26. doi:10.1146/annurev-environ-102016-060700.
- Yamada, K., Mukai, K., and Doi, Y. (1993). Enzymatic degradation of poly(hydroxyalkanoates) by *Pseudomonas picketti*. *Int. J. Biol. Macromol.* 15, 215–220. doi:10.1016/0141-8130(93)90040-S.
- Yang, J., Yang, Y., Wu, W.-M., Zhao, J., and Jiang, L. (2014). Evidence of Polyethylene Biodegradation by Bacterial Strains from the Guts of Plastic-Eating Waxworms. *Environ. Sci. Technol.* 48, 13776–13784. doi:10.1021/es504038a.
- Yang, Y., Yang, J., Wu, W.-M., Zhao, J., Song, Y., Gao, L., et al. (2015). Biodegradation and mineralization of polystyrene by plastic-eating mealworms: Part 1. Chemical and Physical Characterization and Isotopic Tests. *Environ. Sci. Technol.* 49, 12080–12086. doi:10.1021/acs.est.5b02661.
- Yoon, M. G., Jeon, H. J., and Kim, M. N. (2012). Biodegradation of polyethylene by a soil bacterium and AlkB cloned recombinant cell. *J. Bioremediation Biodegrad.* 3, 1–8. doi:10.4172/2155-6199.1000145.
- Yoshida, S., Hiraga, K., Takehana, T., Taniguchi, I., Yamaji, H., Maeda, Y., et al. (2016). A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate). *Science* 351, 1196–1199. doi:10.1126/science.aad6359.
- Zalasiewicz, J., Waters, C. N., do Sul, J. A. I., Corcoran, P. L., Barnosky, A. D., Cearreta, A., et al. (2016). The geological cycle of plastics and their use as a stratigraphic indicator of the Anthropocene. *Anthropocene* 13, 4–17. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ancene.2016.01.002>.
- Zettler, E. R., Mincer, T. J., and Amaral-Zettler, L. A. (2013). Life in the “Plastisphere”: Microbial communities on plastic marine debris. *Environ. Sci. Technol.* 47, 7137–7146. doi:10.1021/es401288x.
- Zumstein, M. T., Schintlmeister, A., Nelson, T. F., Baumgartner, R., Woebken, D., Wagner, M., et al. (2018). Biodegradation of synthetic polymers in soils: Tracking carbon into CO<sub>2</sub> and microbial biomass. *Sci. Adv.* 4. doi:10.1126/sciadv.aas9024.

## 7. Figure legends

**Figure 1:** Illustration of the potential impact of plastic in the regulatory role of carbon and nutrient cycles played by bacteria via the microbial loop. Dissolve (DOM) and particulate (POM) organic matter originated from the linear trophic chain is returned to higher trophic levels *via* its incorporation in bacterial biomass.

**Figure 2:** The different steps of plastic biodegradation at sea (modified from Dussud and Ghiglione, 2014).

**Figure 3:** Current standards on biodegradability of plastics at sea. ISO 18830: Plastics—determination of aerobic biodegradation of non-floating plastic materials in a seawater/ sandy sediment interface — Method by measuring the oxygen demand in closed. ISO 19679: Determination of aerobic biodegradation of non-floating plastic materials in a seawater/sediment interface — method by analysis of evolved carbon dioxide respirometer. ASTMD7991: Determining aerobic biodegradation of plastics buried in sandy marine sediment under controlled laboratory conditions. ASTM D7473: Standard test method for weight attrition of plastic materials in the marine environment by open system aquarium incubations. ASTM: Standard test method for determining aerobic biodegradation of plastic materials in the marine environment by a defined microbial consortium or natural sea water inoculum.

**Figure 4:** Biodegradation pathways under aerobic conditions of three conventional plastic (polyethylene, polyethylene terephthalate and polystyrene) and one biodegradable plastic (polyhydroxybutyrate). See explanation in the text indicating that degradation rates may be very different between polymer types. Complete mineralisation into CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O occurred after several steps of transformation of the initial molecule involving several microbial enzymes. The common stage of transformation through the TCA cycle produce also ATP, which is a key component for bacterial growth and biomass production. Enzyme commission numbers (EC numbers) were given for each enzyme-catalyzed reactions. EC 3.1.1.76: poly(3-hydroxyoctanoate) depolymerase; EC 2.3.1.16: acetyl-CoA C-acyltransferase; EC 1.1.1.35 : 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase; EC 1.3.8.7 : medium-chain acyl-CoA dehydrogenase; EC 4.2.1.17 : enoyl-CoA hydratase ; EC 3.1.1.101 : poly(ethylene terephthalate)

hydrolase; EC 3.1.1.102 : Mono(2-hydroxyethyl) terephthalate hydrolase; EC 1.14.12.15 : terephthalate 1,2-dioxygenase ; EC 1.3.1.53 3,4-dihydroxycyclohexa-1,5-diene-1,4-dicarboxylate dehydrogenase ; EC 1.13.11.8 : protocatechuate 4,5-dioxygenase ; EC 1 : Oxidoreductase ; EC 3 : Hydrolase; EC 1.14.14. 11 styrene monooxygenase ; EC 5.3.99.7 : styrene-oxide isomerase; EC 1.2.1.39 : phenylacetaldehyde dehydrogenase; EC 6.2.1.30 : phenylacetylCoA ligase ; EC 1.14.13.149 : phenylacetyl-CoA 1,2-epoxidase ; EC 1.14.13.- : ring 1,2-epoxyphenylacetyl-CoA isomerase ; EC 1.2.1.91 : 3-oxo-5,6-dehydrosuberyl-CoA semialdehyde dehydrogenase ; EC 2.3.1.174 : 3-oxoadipyl-CoA/3-oxo-5,6-dehydrosuberyl-CoA thiolase ; EC 4.2.1.17 : 2,3-dehydroadipyl-CoA hydratase ; EC 1.1.1.35 : 3-hydroxyadipyl-CoA dehydrogenase.

**Supplemental Table 1:** Detailed information on the origin and methodology used to prove the biodegradation of various polymer types (PE, PET, PHB, PHBV, PS) by microorganisms cited in Table 1.

Table 1 : List of recent studies using molecular techniques to evaluate the biodiversity of the plastisphere in different geographic regions, for plastic samples taken at sea or incubated in seawater conditions for the purpose of the studies. The PCR-amplified regions and the corresponding targeted organisms are indicated. ND: Non-described in the publication.

Studied area	Sample type	Method	Gene target	Target	References
North Pacific subtropical Gyre	Sampling at sea surface	Metagenomic sequencing		Bacteria and Eucaryote	Bryant et al., 2016
Baltic Sea	Incubation in seawater	V4 18S rRNA sequencing	565-981	Microbial Eucaryotes, Fungi	Kettner et al., 2017
Estuary, Baltic Sea	Incubation in seawater	V4 16S rRNA sequencing	515-806	Bacteria and Archaea	Oberbeckmann et al., 2018
North Sea	Incubation in seawater	V4 16S rRNA sequencing V9 18S rRNA sequencing	515-806 1391-1795	Bacteria and Archaea Microbial Eucaryotes, Fungi	Oberbeckmann et al., 2016
North Sea	Sampling at sea surface- Incubation in seawater	DGGE 16S rRNA and sequencing	341-534	Bacteria and Archaea	Oberbeckmann et al., 2014
North Sea	Incubation in seawater and sediment	V3-V4 16S rRNA sequencing rDNA-ITS2 sequencing	341-785	Bacteria and Archaea Fungi	De Tender et al., 2017
North Atlantic subtropical gyre	Sampling at sea surface	V4 16S rRNA sequencing V7 18S rRNA sequencing	515-806 960-1438	Bacteria and Archaea Eucaryotes	Debroas et al., 2017
North Atlantic	Sampling at sea surface	V4-V6 16S rRNA sequencing V9 16S rRNA sequencing	518-1046 1380-1510	Bacteria Microbial Eucaryotes	Zettler et al., 2013
Mediterranean Sea	Sampling at sea surface	V3-V5 16S rRNA sequencing	515-926	Bacteria and Archaea	Dussud et al., 2018a
Mediterranean Sea	Incubation in seawater	V3-V5 16S rRNA sequencing	515-926	Bacteria and Archaea	Dussud et al., 2018b
Mediterranean Sea	Incubation in seawater	V3-V5 16S rRNA sequencing	515-926	Bacteria and Archaea	Briand et al., 2013
Arabian Sea	Incubation in seawater	V4 16S rRNA sequencing	ND	Bacteria	Muthukrishnan et al., 2018
Estuary, North Sea	Incubation in marine sediment	16S rRNA cloning and sequencing	27-1492	Bacteria	Harisson et al., 2014
Estuary, East China Sea	Sampling at sediment surface	V3-V4 16S rRNA sequencing	319-806	Bacteria	Jiang et al., 2018

Table 2 : List of microbial strains able to biodegrade various types of polymers: polyethylene (PE), polyethylene terephthalate (PET), polyhydroxybutyrate (PHB) and Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) and polystyrene (PS). Detailed information on the origin of the strains and the methods used to prove biodegradation are available in the Supplemental Table 1.

Type of polymer	Strains	Reference
PE	<i>Brevibacillus borstelensis</i>	(Hadad et al., 2005; Mohanrasu et al., 2018)
	<i>Bacillus Weihenstephanensis</i>	(Ingavale and Raut, 2018)
	<i>Comamonas</i> sp.	(Peixoto et al., 2017)
	<i>Delftia</i> sp.	(Peixoto et al., 2017)
	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	(Peixoto et al., 2017)
	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	(Kowalczyk et al., 2016)
	<i>Bacillus</i> sp <i>YP1</i>	(Yang et al., 2014)
	<i>Entobacter asburiae</i> <i>YT1</i>	(Yang et al., 2014)
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	(Das and Kumar, 2015)
	<i>Bacillus pumilus</i> <i>M27</i>	(Harshvardhan and Jha, 2013)
	<i>Kocuria palustris</i> <i>M16</i>	(Harshvardhan and Jha, 2013)
	<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i>	(Esmaeili et al., 2013)
	<i>Bacillus mycoides</i>	(Ibiene et al., 2013)
	<i>Bacillus subtilis</i>	(Ibiene et al., 2013)
	<i>Pseudomonas aeruginosa PAO1</i> (ATCC 15729)	(Kyaw et al., 2012)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 15692)	(Kyaw et al., 2012)
	<i>Pseudomonas putida</i> (KT2440 ATCC 47054)	(Kyaw et al., 2012)
	<i>Pseudomonas syringae</i> (DC3000 ATCC 10862)	(Kyaw et al., 2012)
	<i>Brevibacillus parabrevis</i>	(Pramila, 2012)
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	(Pramila, 2012)
	<i>Pseudomonas citronellolis</i>	(Pramila, 2012)
	<i>Bacillus sphaericus</i>	(Sudhakar et al., 2008)
	<i>Rhodococcus rubber</i>	(Gilan and Sivan, 2013)
	<i>Aspergillus versicolor</i>	(Pramila et al., 2011)

	<i>Aspergillus sp.</i>	(Pramila et al., 2011 and sheik et al., 2015)
	<i>Chaetomium sp.</i>	(Sowmya et al., 2012)
	<i>Aspergillus flavus</i>	(Sowmya et al., 2012)
	<i>Penicillium simplicissimum</i>	(Yamada et al., 2000 and Sowmya et al., 2014)
	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	(Sheik et al., 2015)
	<i>Paecilomyces lilacinus,</i>	(Sheik et al., 2015)
	<i>P. pinophilum, A niger, Gliocladium virens &amp; P. chrysosporium</i>	(Manzur et al., 2004)
	<i>Aspergillus glaucus et A. niger</i>	(Kathiresan et al., 2003)
PET	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	(Novotný et al., 2018)
	<i>Nocardia sp.</i>	(Sharon and Sharon, 2017)
	<i>ideonella sakaiensis</i>	(Yoshida et al., 2016)
	<i>Humilicas insolens</i>	(Ronkvist et al., 2009)
	<i>Pseudomonas mendocina</i>	(Ronkvist et al., 2009)
	<i>Thermobifida fusca DSM 43793</i>	(Müller et al., 2005)
	<i>Penicillium citrinum</i>	Liebminger et al., 2007
	<i>Thermomonospora fusca</i>	Alisch et al., 2004
	<i>Fusarium oxysporum</i>	Nimchua et al., 2007
	<i>Fusarium solani</i>	Alisch et al., 2004 et Nimchua et al., 2007
PHB	<i>Crupriavidus sp.</i>	(Martínez-Tobón et al., 2018)
	<i>Marinobacter algicola</i>	(Martínez-Tobón et al., 2018)
	Mix cultures	(Ansari and Fatma, 2016)
	<i>Schlegella thermodepolymerans</i>	(Romen et al., 2004)
	<i>Caenibacterium thermophilum</i>	(Romen et al., 2004)
	<i>Acidovorax Sp. Strain TP4</i>	(Kobayashi et al., 1999)
	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	(Martínez-Tobón et al., 2018; Uefuji et al., 1997)
	<i>Leptothrix discophora</i>	(Takeda et al., 1998)
	<i>Alcaligenes faecalis</i>	(Kita et al., 1995; Tanio et al., 1982)

	<i>Comamonas acidovorans</i> YM1609	(Kasuya et al., 1997)
	<i>Comamonas tetsteroni</i>	(Kasuya et al., 1997; Martínez-Tobón et al., 2018)
	<i>Pseudomonas lemoignei</i>	(Martínez-Tobón et al., 2018; Uefuji et al., 1997)
	<i>Ralstonia pickettii</i>	(Martínez-Tobón et al., 2018; Yamada et al., 1993)
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (YM1415) and 9 Gram-	(Mukai et al., 1994)
	<i>Aspergillus niger</i>	Kumaravel et al., 2010
PHBV	<i>Clostridium botulinum</i>	(Abou-Zeid et al., 2001)
	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	(Abou-Zeid et al., 2001)
	<i>Streptomyces</i> sp. SNG9	(Mabrouk and Sabry, 2001)
	<i>Pseudomonas lemoignei</i>	(Jendrossek et al., 1993)
	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	(Sang et al., 2001)
PS	Strain TM1 and ZM1	(Tang et al., 2017)
	<i>Bacillus subtilis</i>	(Asmita et al., 2015)
	<i>Staphylococcus aureus</i>	(Asmita et al., 2015)
	<i>Streptococcus pyogenes</i>	(Asmita et al., 2015)
	<i>Exiguobacterium</i> sp.	(Yang et al., 2015)
	<i>Bacillus</i> sp NB6, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> NB26, <i>Exiguobacterium</i> sp., <i>Microbacterium</i> sp. NA23, <i>Paenibacillus urinalis</i> NA26	(Atiq et al., 2010)
	<i>Rhodococcus ruber</i>	(Mor and Sivan, 2008)
	<i>Pseudomonas putida</i> CA-3 (NCIMB 41162)	(Ward et al., 2006)
	<i>Bacillus</i> sp. STR-Y-O	(Oikawa et al., 2003)
	Mixed microbial communities	(Kaplan et al., 1979)
	Mixed microbial communities ( <i>Bacillus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Micrococcus</i> and <i>Nocordia</i> )	(Sielicki et al., 1978)



**Annexe 2– Article en co-auteur en préparation****Title: Biodegradability under marine conditions of bio-based and petroleum-based polymers as substitutes of conventional microbeads**

**Authors:** Cheng Jingguang<sup>1#</sup>, Eyheraguibel Boris<sup>2#</sup>, Jacquin Justine<sup>1</sup>, Pujo-Pay Mireille<sup>1</sup>, Conan Pascal<sup>1</sup>, Barbe Valérie<sup>3</sup>, Hoypierres Julia<sup>4</sup>, Deligey Gaëlle<sup>4</sup>, Alexandra Ter Halle<sup>5</sup>, Bruzaud Stéphane<sup>4</sup>, Ghiglione Jean-François<sup>1</sup> & Meistertzheim Anne-Leila<sup>6\*</sup>

**Affiliations :**

<sup>1</sup> CNRS, Sorbonne Universités, UMR 7621, Laboratoire d’Océanographie Microbienne, Observatoire Océanologique de Banyuls, France

<sup>2</sup> CNRS, Univ. Clermont Auvergne, UMR 6296, Institut de Chimie de Clermont-Ferrand, France

<sup>3</sup> Génomique Métabolique, Genoscope, Institut François Jacob, CEA, CNRS, Univ Evry, Université Paris-Saclay, 91057 Evry, France

<sup>4</sup> UMR CNRS 6027, Institut de Recherche Dupuy de Lôme (IRD), Univ. Bretagne Sud, Lorient-Pontivy, France

<sup>5</sup> Laboratoire des IMRCP, Université de Toulouse, CNRS UMR 5623, Université Paul Sabatier, 118 route de Narbonne 31062 Toulouse Cedex 9, France

<sup>6</sup> SAS Plastic@Sea, Observatoire Océanologique de Banyuls, France

(#) *Jingguang Cheng and Boris Eyheraguibel shared co-first authorship*

(\*) *Corresponding author:*

Anne-Leila Meistertzheim, SAS Plastic@Sea, Observatoire Océanologique de Banyuls Email : Leila.Meistertzheim@plasticatsea.com

Running title: Microplastics biodegradation at sea

Keywords: microbeads, cosmetics, biosourced and biodegradable polymer, microbial ecotoxicology

**Abstract:**

Plastic microbeads have been produced at very large scales since several decades for cosmetics and personal care products, a large amount of which being directly transported in the oceans as ‘primary microplastics’ and emerging pollutants. To better understand their biodegradability in marine environment and evaluate their possible replacement by biodegradable polymers, seven polymer types were studied including three conventional petroleum-based polymers (PE, PMMA and PCL), two bio-based polymers (PLA and PHBV) and two natural products (rice seeds and apricot kernel). We used several innovative approaches by both the experimental design and the set of multidisciplinary techniques that allowed us to follow the successive steps of biodegradation together with abiotic degradation under seawater conditions. We found that microbeads made of PHBV or rice and in a lesser extent PCL and apricot are good candidates for substitution of conventional microplastics, classically made of PE or PMMA that were not biodegraded under our conditions. Congruent signs of biodegradability were first observed by oxygen measurement and weight loss. Mass spectrometry and <sup>1</sup>H NMR confirmed the biodegradation by identifying ester bound cleavage for PHBV, with 3-hydroxybutyric acid, 3-hydroxyvaleric acid and its dimer and heterotrimer as degradation products. Similarly,  $\epsilon$ -caprolactone and glucose were identified as the corresponding oligomers of PCL and rice. This study provides the first time arguments for the use of some bio-based polymers, but not all, as substitutes of conventional microbeads to support the recent legislative rules aiming to reduce the pollution by primary microplastics in the oceans.

L'article complet est présenté dans la thèse de Jingguang Cheng : « Microplastics in the marine environment: An ecotoxicological perspective »

**Annexe 3– Article en co-auteur en préparation**

**Title:** Relative influence of plastic debris size and shape, chemical composition and phytoplankton-bacteria interactions in driving seawater plastisphere abundance, diversity and activity

**Authors:** Cheng Jingguang<sup>1</sup>, Jacquin Justine<sup>1</sup>, Conan Pascal<sup>1</sup>, Pujo-Pay Mireille<sup>1</sup>, Valérie Barbe<sup>2</sup>, Matthieu George<sup>3</sup>, Pascale Fabre<sup>3</sup>, Bruzaud Stéphane<sup>4</sup>, Alexandra Ter Halle<sup>5</sup>, Meistertzheim Anne-Leila<sup>6</sup> and Ghiglione Jean-François<sup>1\*</sup>

**Affiliations :**

<sup>1</sup> CNRS, Sorbonne Universités, UMR 7621, Laboratoire d'Océanographie Microbienne, Observatoire Océanologique de Banyuls, 66650 Banyuls sur mer, France

<sup>2</sup> Génomique Métabolique, Genoscope, Institut François Jacob, CEA, CNRS, Univ Evry, Université Paris-Saclay, 91057 Evry, France

<sup>3</sup> Laboratoire Charles Coulomb (L2C), UMR 5221 CNRS/UM, Place Eugène Bataillon, 34095, Montpellier, France

<sup>4</sup> Institut de Recherche Dupuy de Lôme (IRD), Université de Bretagne-Sud, UMR CNRS 6027, Rue Saint Maudé, 56321 Lorient

<sup>5</sup> IMRCP, Univ. Toulouse, CNRS, Toulouse, France

<sup>6</sup> SAS Plastic@Sea, Observatoire Océanologique de Banyuls, France

*(\*) Corresponding author:*

*Jean-François Ghiglione, CNRS, Sorbonne Universités, UMR 7621, Laboratoire d'Océanographie Microbienne, Observatoire Océanologique de Banyuls, France Email : ghiglione@obs-banyuls.fr*

**Keywords:** plastic litters, plastisphere, biofilm, biofouling, microbial ecotoxicology

**Abstract:**

The thin film of life that inhabits all plastics in the oceans, so-called “plastisphere”, has multiple effects on the fate and impacts of plastic in the marine environment. Its composition was shown to be influenced by plastic type, geographical distance and environmental changes between seasons. Here, we hypothesized that the large spectrum of plastic sizes encountered in the environment may be also a critical driver of the plastisphere. Polyethylene (PE) and polylactide acid (PLA) together with glass controls in the forms of meso-debris (18mm diameter) and large-microplastics (LMP; 3mm diameter), as well as small-microplastics (SMP) of 100 µm diameter with spherical or irregular shapes were immersed during 2 months in seawater. Results of bacterial abundance (confocal microscopy), diversity (16S rRNA Illumina sequencing) indicated that the three classical colonization phases, including primo-colonization (after 3 days), growing phase (after 10 days) and maturation phase of the biofilm (after 30 days), were not influenced by the size and the shape of the materials, even when a diatom bloom (*Pseudonitzschia* sp.) occurred after the first month of incubation. Influence of plastic size and shape was only visible on bacterial activity ( $^3\text{H}$  leucine incorporation), where SML showed higher activity than the rest material sizes, irregular 100µm particles showed higher activity than the regular one. A mature biofilm was visible after 30 days for all material types, with significantly higher abundance in the plastics (PE and PLA) compared to glass, with distinct bacterial assemblages found on each material type. The diatom bloom event had a great impact on the plastisphere of all materials, resulting in a drastic change in diversity and activity. Our research reveals that the plastic chemical composition, the successive phases of biofilm formation and the phytoplankton-bacteria interactions are more important factors than the material size and shape in shaping the abundance, diversity and activity of the plastisphere.

L'article complet est présenté dans la thèse de Jingguang Cheng : « Microplastics in the marine environment: An ecotoxicological perspective »

**Annexe 4— Article en co-auteur en préparation**

**Title:** Beneficial or detrimental effects of microplastics on the marine filter-feeder amphioxus (*Branchiostoma lanceolatum*)

**Authors:** Cheng Jingguang<sup>1</sup>, Meistertzheim Anne-Leila<sup>1,2</sup>, Jacquin Justine<sup>1</sup>, Valérie Barbe<sup>3</sup>, Escande Marie-Line<sup>4</sup>, Bertrand Stephanie<sup>4</sup>, Escriva Hector<sup>4</sup> and Ghiglione Jean-François<sup>1\*</sup>

**Affiliations:**

<sup>1</sup> CNRS, Sorbonne Universités, UMR 7621, Laboratoire d'Océanographie Microbienne, Observatoire Océanologique de Banyuls, France

<sup>2</sup> SAS Plastic@Sea, Observatoire Océanologique de Banyuls, France

<sup>3</sup> Génomique Métabolique, Genoscope, Institut François Jacob, CEA, CNRS, Univ Evry, Université Paris-Saclay, 91057 Evry, France

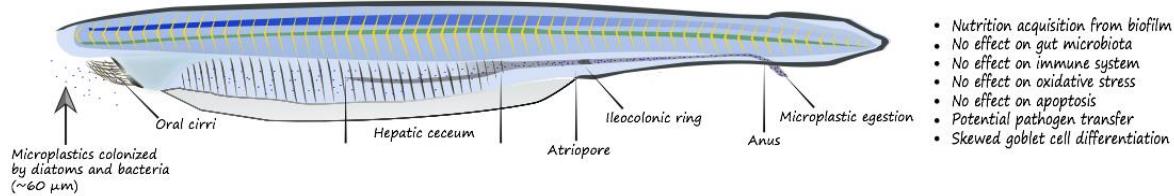
<sup>4</sup> CNRS, Sorbonne Universités, UMR 7232, Biologie Intégrative des Organismes Marins, Observatoire Océanologique de Banyuls, France

(\*) Corresponding author:

Jean-François Ghiglione, CNRS, Sorbonne Universités, UMR 7621, Laboratoire d'Océanographie Microbienne, Observatoire Océanologique de Banyuls, France Email : ghiglione@obs-banyuls.fr

**Keywords:** microplastics, toxicity, gut microbiome, plastisphere, oxidative stress, amphioxus

## Abstract:



Microplastics are ubiquitous in the marine environment and accumulate in the coastal regions, which especially pose the health threats to marine wildlife living in the microplastic accumulation hotspots. Here, we evaluate the effect of microplastics on amphioxus (*Branchiostoma lanceolatum*), a marine invertebrate with filter-feeding lifestyle living in shallow water sediments. First, gut microbiome from different treatments (with or without starvation) were tested and selected to obtain the most homogenous group prior microplastic exposure. Second, polystyrene microplastics were immersed in natural circulating seawater to mimic its natural presence. Third, the microplastic exposure on amphioxus were carried out for 16 days with three different concentration (50, 500 and 5000 particles. L<sup>-1</sup>). The results showed that microplastics did not modify the gene expression on oxidative stress, immune system and apoptosis (Nanostring technology). No impact on the gut microbiota was observed (16S rRNA sequencing), even if transfer of potential harmful algae and pathogen could be possible for the highest and rather unrealistic concentration of microplastics. Within microplastic exposure treatments, we observed skewed cell differentiation into more goblet cells by transmission electron microscopy. A rather positive impact of microplastics was found by transfer the nutrition (mainly diatoms) from microplastics to amphioxus. This study provides a multidisciplinary approach to prove the low toxicity of microplastic and its biofilm on a marine filter-feeder.

L'article complet est présenté dans la thèse de Jingguang Cheng : « Microplastics in the marine environment: An ecotoxicological perspective »

## Annexe 5 – Poster AFEM, Bussan

**UTILISATION DES OUTILS « OMICS » POUR CARACTERISER LA BIODEGRADATION DES PLASTIQUES EN MER**

JACQUIN Justine<sup>1</sup>, CALLAC Nolwenn<sup>1,2</sup>, ODOBEL Charlène<sup>3</sup>, CHENG Jingguang<sup>1</sup>, BARBE Valérie<sup>4</sup>, MEISTERTZHEIM Anne-Léa<sup>1,4</sup>, PUO-PAY Mireille<sup>1</sup>, CONAN Pascal<sup>1</sup>, BRUZAUD Stéphane<sup>5</sup>, DENOUAL Clément<sup>5</sup>, GHIGLIONE Jean-François<sup>1</sup>

1. CNRS, Sorbonne Universités, UMR 7621, Laboratoire d'Océanographie Microbienne, Observatoire Océanologique de Banyuls, France  
 2. IFREMER Unité de Recherche Lagons, Ecosystèmes et Aquaculture Durable (LEAD-NC) Nouvelle Calédonie  
 3. Génomique Métabolique, Genoscope, Institut François Jacob, CEA, CNRS, Univ Evry, Université Paris-Saclay, 91057 Evry, France  
 4. SAS Plastic@Sea, CNRS, Sorbonne Universités, UMR 7621, Laboratoire d'Océanographie Microbienne, Observatoire Océanologique de Banyuls, France  
 5. Institut de Recherche Dupuy de Lôme (IRD), Université de Bretagne-Sud, UMR CNRS 6027, Rue Sainte Maude, 56321 Lorient

**Contexte**

Le projet BIOTIGES a été mandaté par le Ministère de la Transition Ecologique pour trouver des substituts aux bâtonnets ouatés à usage domestique qui seront interdits en 2020, identifiés comme omniprésents sous forme de déchets. Nous avons couplé des mesures d'abondance et d'activités bactériennes à des outils OMICS pour caractériser la colonisation et la biodegradation de différents polymères en milieu marin : polypropylène (PP), acide polylactique (PLA), polyhydroxyalcanoate (PHA) et le bois sous forme de bâtonnet. Dans cette étude, une attention particulière a été portée sur le PHBV (Polyhydroxybutyrate et valérate) produit naturellement par fermentation bactérienne de sucres ou de lipides.

**Matériel et méthodes**

**Des conditions *in situ* jusqu'aux approches en laboratoire *in vitro***

Incubation 2 mois en aquarium en circuit ouvert sur la mer → Transfert des polymères en milieu minimum (94 jours) → Recherche de nouvelles voies métaboliques à partir de l'isolement de souches capables de dégrader le PHBV

**Colonisation**

Timeline: J0, J7, J15, J30, J60, J63, J67, J75, J90, J154

**Biodégradation**

**Isolements et OMICS**

**Suivi de différents paramètres :**

- Activité bactérienne (Incorporation de leucine tritiée)
- Respiration (suivi de la consommation de l'oxygène dissous)
- Métabarcoding et métagénomique
- Poids moléculaire
- Microscopie
- Abondance
- Isolément de souche bactérienne
- Génomique et transcriptomique

**Résultats**

**Une communauté active sur les polymères biodégradables...**

MDS effectué avec une matrice de distance de Bray-Curtis pendant l'incubation en milieu minimum de nos polymères

Lors de la phase de colonisation, les communautés microbiennes évoluent pour former un biofilm stable après 30 jours, quelque soit le type de polymère. Après transfert en milieu minimum avec chaque polymère comme seule source de carbone, les communautés bactériennes deviennent très différentes en fonction du type de polymère.

Production bactérienne sur différents polymères considérés comme non biodégradables, le trait noir correspond au minimum d'activité pour évaluer la biodégradation.

Après 15 jours en milieu minimum, les communautés microbiennes ont une activité fortement réduite pour les polymères non biodégradables (PP et PLA), alors que les communautés restent actives après 154 jours sur les polymères biodégradables (PHA, Bois).

**... avec un changement de diversité pendant la phase de biodégradation**

Pendant la phase de biodégradation, il y a une forte augmentation des Bactéroidétés au détriment des Protéobactéries.

**Isollement de souches qui dégradent le PHBV**

A la fin des 154 jours en milieu minimum, nous avons isolé deux souches formant un halo de biodégradation en présence de PHBV.

Souches qui dégradent potentiellement le PHBV	%16S
<i>Reichenbachia agariciformans</i>	100,00
<i>Altermomonas lipolytica</i>	98,53

Souches isolées sur milieu minimum +PHBV avec un halo de dégradation

**Perspectives**

Ce travail nous a permis de mettre en évidence la biodégradabilité potentielle du PHBV en conditions naturelles. Pour aller plus loin dans la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la dégradation, nous focalisons actuellement notre attention sur :

- Etudier le génome et le transcriptome des souches isolées pour identifier les gènes impliqués dans la voie de biodégradation du PHBV.
- Reproduire l'expérience en utilisant du PHBV marqué par des isotopes stables du carbone (DNA Stable Isotope Probing) pour identifier les communautés impliquées dans leur biodégradation.
- Poursuivre les analyses en étudiant les gènes présents lors de la biodégradation du PHBV par analyse métagénomique et métatranscriptomique.