



Caractérisation des communautés microbiennes associées à la colonisation des déchets plastiques en mer

Claire Dussud

► To cite this version:

Claire Dussud. Caractérisation des communautés microbiennes associées à la colonisation des déchets plastiques en mer. Océanographie. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2017. Français. NNT : 2017PA066254 . tel-01692701v2

HAL Id: tel-01692701

<https://theses.hal.science/tel-01692701v2>

Submitted on 8 Mar 2018

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

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

Université Pierre et Marie Curie

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

Laboratoire d'Océanographie Microbienne UMR 7621

Caractérisation des communautés microbiennes associées à la colonisation des déchets plastiques en mer



Par **Claire DUSSUD**

Thèse de doctorat en Microbiologie Marine

Présentée et soutenue publiquement le 2 Octobre 2017

Devant un jury composé de :

Anne-Marie DELORT	HDR, Inst. de Chimie Clermont-Ferrand	Rapporteur
Jérôme HAMELIN	HDR, INRA, Narbonne	Rapporteur
Stéphane BLAIN	Professeur, LOMIC, Banyuls-sur-Mer	Président
Pascale FABRE	HDR, L2C, Montpellier	Examineur
Jean-François BRIAND	MCF, MAPIEM, Toulon	Examineur
Jean-François GHIGLIONE	HDR, LOMIC, Banyuls-sur-Mer	Directeur de thèse

Remerciements

Premiers mots du manuscrit, mais derniers rédigés. C'est en général comme ça que ça se passe ! Ce moment là où tu te dis, visage cerné devant ton ordinateur, « Ok, il ne me reste plus que les remerciements à écrire. ». Difficile de décrire l'état d'esprit dans lequel on se trouve à cette étape de la thèse, partagée entre la fatigue, le stress accumulé et l'euphorie d'un travail de trois ans qui s'achève.

L'importance de cette partie réside dans le fait de ne faire aucun oubli puisque ce travail ne serait pas ce qu'il est sans toutes les personnes qui suivent :

J'adresse mes remerciements au jury de thèse qui a accepté d'évaluer mon travail. Merci à Anne-Marie Delort et Jérôme Hamelin pour l'examen du manuscrit. Merci à Stéphane Blain de présider le jury. Merci beaucoup à Jean-François Briand d'avoir suivi avec intérêt mes travaux et de venir assister à ma soutenance. Je remercie également Jean Coudane pour m'avoir éclairé sur les secrets de la chimie des polymères et pour sa participation aux comités de thèse. Merci Pascale Fabre pour m'avoir ouvert à plusieurs reprises les portes du laboratoire de chimie de Montpellier. Notre collaboration, ton soutien et ton suivi au cours de mes comités de thèse m'ont beaucoup apporté et m'ont permis de sortir des sentiers battus de la microbiologie !

Je tiens à remercier Jean-François Ghiglione, qui m'a permis de réaliser cette thèse sur un sujet si passionnant et de m'avoir embarqué avec lui dans l'aventure Tara. Merci à toi Jeff, de m'avoir donné l'occasion de participer à un grand nombre de conférences aux quatre coins de la planète. Merci également de m'avoir appris l'art de l'écriture et de la communication scientifique. Merci de m'avoir fait confiance dans l'encadrement des nombreux stagiaires, cela m'a permis d'acquérir une grande autonomie et le sens des responsabilités et de l'organisation.

Mes prochains remerciements vont vers vous, mes petites stagiaires avec qui j'ai eu un grand plaisir à travailler, Romie Perrier, Cindy Hudec, Morgane Noyer, Mélissandre Ménart, Albane Jacquet et Marion Lorin. Je vous souhaite à toutes, bon vent dans la recherche !

Aux techniciens et ingénieurs du laboratoire, un immense merci pour votre aide et votre pédagogie. Merci à Olivier Crispi pour m'avoir supportée dans la salle de radioac' et pour m'avoir rendu de nombreux services à la paillasse. Merci Aurore Gueux pour l'initiation au marquage à leucine tritiée. Un grand merci à Christophe Salmeron et David Pecqueur pour leur formation et leur aide précieuse sur le FacsCanto ! Merci à Philippe Catala pour les manip de microscopie. Merci beaucoup à Michael Fuentes pour le prêt (plus long que prévu...!) des microcosmes. Un grand merci à Marion Lauters pour avoir mis au point les mesures de production d'ecto-enzymes. Merci également à Frédérique Sanz qui a géré tout le côté administratif avec réactivité et gentillesse.

Mes travaux scientifiques se sont enrichis grâce à de multiples collaborations. Je tiens à remercier chaleureusement Mathieu George du laboratoire Charles Coulomb de Montpellier qui m'a appris à apprivoiser l'AFM et à dompter les gouttes d'eau sur les polymères ! Merci à toi et Pascale pour vos conseils, vos remarques et vos questionnements toujours utiles. Un

merci à Stéphane Bruzard pour nous avoir fourni le PHBV. Merci beaucoup à l'entreprise Symphony Env. et particulièrement à Perry Higgs pour nous avoir permis de travailler sur les films OXO et pour les analyses chimiques des polymères. Je souhaite remercier Boris Eyheraguibel pour les précieuses analyses en FTIR, merci pour ta réactivité et ton efficacité. Merci à l'équipe de l'Observatoire de Villefranche-sur-Mer, Amanda Elineau, Gaby Gorsky et Maria-Luiza Pedrotti pour leur participation à travers les différents articles et pour m'avoir permis d'utiliser leur Zooscan. Amanda, merci aussi pour ton immense gentillesse et pour les supers moments passés ensemble ! Merci à Leila Meistertzheim, pour ses conseils, son expérience et son soutien.

Mes remerciements vont également vers les *Taranautes* avec qui j'ai vécu des moments inoubliables : Nico, Louis, Amanda, Pascaline, Nils, Sharif, Do', Martin et tous les autres.

Je remercie chaleureusement les personnes que j'ai côtoyées de près ou de loin au laboratoire et qui ont mis du soleil dans ma vie pendant ces trois ans. Merci à mes amis et collègues, Stefan « Cacahuète », Laetitia « Dada », Matthieu, Marc (Fttttt.. !), Sandrine, Margot, Elsa, Hugo, Mariana, Olivier, Amandine, Pavla, Laurie, Elo, Natacha, Pauline, Coco, Yan, Leila, Gaëlle et bien d'autres, pour les très bons souvenirs que vous me laissez. Merci à l'équipe FYB pour votre bonne humeur et pour les pauses café/croissants. Merci à mes compagnons de course à pied pour ces moments défouloirs : Serge, Pascal, Jeff, Céline, Elisa, Rémi.

Un paragraphe que pour toi mon bichon ! Ta constante bonne humeur a été une bouffée d'oxygène chaque jour passé au labo. Ton humour légendaire, décalé, parfois mal placé va me manquer ! Merci pour tous ces bons moments passés ensembles, les temps de midi à la plage avec plouf et poissons, les footings sous un soleil de plomb, les virées à Carrouf pour acheter tes chips et tes bonbons qui ont une place de choix dans ton bureau, les pauses café et les fous-rires mémorables, les retours du taf avec la radio à fond, DES-PA-CITOOO!!! Bref, tu as été d'un soutien primordial.

Un très grand merci à mes amis extérieurs au labo qui ont été d'un grand soutien et qui m'ont permis d'avoir une vie à côté de la thèse ! Je pense particulièrement à Sarah, Julia, Noémie, Annab (mes raloufs !), Justine, Chloé, Marine. Mais aussi à Angel mon ange gardien, tu es d'une bienveillance rare et tu es apparue dans ma vie au meilleur moment... Une pensée à mes copines de danse de la troupe Ségazal ! Julie, Sarah, Charline, Alex, Pauline. Avec qui j'ai pu exercer ma passion et trouver une belle échappatoire.

Je ne pourrais clore ces remerciements sans remercier du fond du cœur ma famille. Papa, Maman, je l'ai fait !!! Vous n'en avez jamais douté, je le sais. Merci pour votre soutien infaillible. Merci mon Rem's et mon Yannou, simplement parce que j'aurai pas rêvé mieux comme ptits frères, je suis fière des hommes que vous êtes devenus. Une pensée pour mon Papou, Mamie Suz, Mamie Biquette, mon parrain Pierrot qui m'ont également accompagnés avec amour pendant ces trois ans. Merci aussi à mes oncles et tantes, cousins, cousines, qui se sont toujours intéressés à ce que je faisais.

Je fini par toi, Nico, ma moitié. Je ne te remercierai jamais assez pour tout ce que tu m'apportes, merci d'être là, à chaque instant et quoi qu'il arrive. Je t'aime.

Bon ! Fini les paroles émouvantes, on passe aux choses sérieuses... ! ;)

Résumé

La pollution par les déchets plastiques touche tous les océans du monde et aucune zone n'est épargnée. Ce matériau qui était révolutionnaire il y a 50 ans se retrouve aujourd'hui accusé de mettre en danger les écosystèmes lorsqu'il est abandonné dans la nature. La prise de conscience récente de la menace qui pèse sur les océans, réceptacle final de cette pollution, a donné lieu à une effervescence dans le domaine scientifique. Depuis à peine 10 ans, les recherches se multiplient pour quantifier les déchets plastiques et évaluer leur devenir en mer. On estime que plus de 5,25 milliards de particules plastiques flottent dans les océans, représentant plus de 260 mille tonnes de déchets. Ces travaux de thèse s'inscrivent dans le cadre de cette préoccupation environnementale de premier ordre, en apportant de nouvelles connaissances sur le compartiment bactérien qui se développe sur les débris plastiques en mer, communément appelé la « plastisphère ». Dans un premier temps, l'analyse des prélèvements effectués pendant l'expédition *Tara-Méditerranée* dans le bassin Ouest Méditerranéen a permis de caractériser, pour la première fois dans cette zone, un biofilm abondant et spécifique des plastiques par comparaison aux communautés bactériennes attachées aux particules organiques ou libres dans l'eau de mer environnante. L'analyse taxonomique des communautés bactériennes a mis en évidence une forte dominance des Cyanobactéries sur les échantillons de plastiques. Dans un second temps, la cinétique de colonisation bactérienne sur différents polymères a été étudiée grâce à la mise en place de microcosmes d'eau de mer en circulation ouverte sur le milieu naturel. Le couplage original de données biologiques avec des mesures physico-chimiques des surfaces des plastiques ont permis de constater un développement plus important des populations bactériennes sur des plastiques « biodégradables » par rapport aux polymères conventionnels. Nous avons montré que la composition du polymère et ses caractéristiques d'hydrophobicité et de rugosité influencent la diversité des communautés bactériennes, en particulier lors des premières phases de colonisation. Ici, la dominance de différentes espèces bactériennes hydrocarbonoclastes a été observée sur différents types de plastique. Enfin, une attention particulière a été portée sur l'activité des biofilms bactériens à la surface des plastiques. Après avoir mis au point des protocoles pour mesurer la production bactérienne hétérotrophe totale et leurs activités ecto-enzymatiques, une forte activité a été constatée sur les polymères par rapport à l'eau de mer. Encore une fois, des différences en fonction des types de plastiques, mais aussi du stade de formation du biofilm ont été observées. Les travaux menés pendant cette thèse mettent en lumière l'existence d'une nouvelle niche écologique sur les plastiques, distincte de celle de l'eau de mer environnante.

Mots clés : écotoxicologie microbienne, déchets plastique marins, biofilm bactériens

Abstract

Plastic pollution affects the world ocean and no area is spared. This material, which was revolutionary 50 years ago, is today accused of endangering ecosystems when it is discarded in natural environments. The increasing awareness of environmental impacts on ocean, the ultimate repository of this pollution, has stimulated scientific works. Since 10 years, researches are increasing to quantify plastic waste and assess its fate at sea. It is estimated that more than 5.25 billion plastic particles float in the oceans, representing more than 260,000 tons of debris. This PhD work is part of this major environmental concern, bringing new knowledge about the bacterial community that develops on plastic debris at sea, commonly known as the "plastisphere". First, the analysis of the samples taken during the *Tara-Mediterranean* expedition in the western Mediterranean basin, allowed characterizing, for the first time in this zone, an abundant and specific plastic biofilm compared to the bacterial communities attached to the organic matter in the surrounding seawater. Taxonomic analysis of bacterial communities revealed a strong dominance of Cyanobacteria on plastic samples. Secondly, the evolution of bacterial colonization on different polymers was studied by a setting up of microcosms experiment with seawater open circulation. The unusual coupling of biological data with physicochemical measurements of the surfaces of plastics revealed a greater development of bacterial populations on "biodegradable" compared to conventional polymers. We showed that the composition of the polymer and its hydrophobicity and roughness characteristics influence the diversity of bacterial communities, especially during the early colonization steps. The dominance of various bacterial hydrocarbonoclast species was observed on different types of plastic. Finally, special attention was paid to the bacterial biofilm activity on plastic surfaces. After developing protocols for total heterotrophic bacterial production and ecto-enzymatic activities measurements, a high activity was observed on polymers compared to seawater. Once again, differences in plastic types, but also in biofilm formation stages have been observed. This present work highlights the existence of a new ecological niche on plastics, distinct from the surrounding seawater.

Key words: microbial ecotoxicology, plastic litter, bacterial biofilm

Sommaire

CHAPITRE 1 ETAT DE L'ART _____ 1

1. DIVERSITE ET FONCTION DES PROCARYOTES DANS L'ENVIRONNEMENT MARIN	1
1.1 Abondance, diversité	1
1.2 Rôle biologique, boucle microbienne, reminéralisation	1
1.3 Préférence d'un mode vie attaché, le biofilm	5
1.4 Les biofilms sur les surfaces artificielles en mer	7
2. CONSTAT: L'ERE DU PLASTIQUE	10
2.1 Production mondiale et européenne	10
2.2 Les compositions chimiques	12
2.2.1 Les plastiques conventionnels	12
2.2.2 Les polymères biodégradables	14
3. LA POLLUTION PAR LES PLASTIQUES DANS LES OCEANS	17
3.1 Abondance et distribution des plastiques en mer	18
3.2 Le devenir d'un plastique en mer	22
3.2.1 Dégradation abiotique	23
3.2.2 Dégradation biotique	24
3.3 Impacts écologiques	27
3.3.1 A l'échelle de l'organisme	28
3.3.2 A l'échelle de l'écosystème	30
4. LES BACTERIES ET LE PLASTIQUE	31
4.1 L'observation du biofilm	31
4.2 Les étapes de colonisation des plastiques en mer	35
5. LES OBJECTIFS DE LA THESE ET ORGANISATION DU MANUSCRIT	38

CHAPITRE 2 DES COMMUNAUTES BACTERIENNES SPECIFIQUES SUR LES DECHETS PLASTIQUES EN MER MEDITERRANEE _____ 41

1. PREAMBULE	41
2. ARTICLE N°1 : EVIDENCE OF NICHE PARTITIONING AMONG BACTERIA LIVING ON PLASTICS, ORGANIC PARTICLES AND SURROUNDING SEAWATERS	43

CHAPITRE 3 SUCCESSIONS DE POPULATIONS BACTERIENNES SUR DIFFERENTS POLYMERES DANS LES PREMIERS STADES DE COLONISATION EN MILIEU MARIN _____ 75

1. PREAMBULE	75
2. ARTICLE N°2 : COLONIZATION OF CONVENTIONAL AND (BIO)DEGRADABLE POLYMERS BY MARINE MICROORGANISMS.	76

CHAPITRE 4 ACTIVITE DU BIOFILM BACTERIEN COLONISANT DES POLYMERES CONVENTIONNELS ET (BIO)DEGRADABLES EN MILIEU MARIN

	111
1. PREAMBULE	111
2. ARTICLE N°3: MARINE BACTERIAL BIOFILM ABUNDANCE AND ACTIVITIES ON CONVENTIONAL AND BIODEGRADABLE POLYMERS	112

CHAPITRE 5 CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

1. CONCLUSIONS GENERALES, SYNTHESE DES PRINCIPAUX RESULTATS	133
1.1 Un biofilm abondant sur les surfaces plastiques	134
1.2 Des communautés bactériennes distinctes sur les plastiques	137
1.3 Forte activité bactérienne de la plastisphère en milieu marin	143
1.4 Description des étapes de formation du biofilm sur les plastiques en mer	148
1.5 Les changements de surface des polymères en milieu marin	149
2 PERSPECTIVES	151
2.1 Caractériser une biodégradation bactérienne des plastiques en mer	151
2.1.1 Article n°4 Dussud C, Ghiglione JF (2014). « Marine litter in the Mediterranean and Black Seas », 180 p., CIESM Publisher, Monaco	152
2.1.2 Expériences de transfert de la norme AFNOR AC T 51-808 au milieu marin	159
2.1 Utilisation de la technique de DNA-Stable Isotope Probing (DNA-SIP)	160
2.2 Prise en compte de la boucle microbienne dans l'étude de la plastisphère en mer	161
2.3 L'impact des microplastiques en mer à l'échelle de l'écosystème	162

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXES

Table des figures et des tableaux

FIGURE 1: SCHEMA SIMPLIFIE DU CYCLE DU CARBONE INTEGRANT LA BOUCLE MICROBIENNE _____	2
FIGURE 2: ARBRE PHYLOGENETIQUE DU VIVANT MONTRANT LES RELATIONS ENTRE LES ESPECES POUR LESQUELLES LES GENOMES ONT ETE SEQUENCES. _____	4
FIGURE 3: ETAPES DE FORMATION D'UN BIOFILM. _____	6
FIGURE 4: DIFFERENTES PROPRIETES INDUITES PAR LA FORMATION DU BIOFILM. _____	7
FIGURE 5: BIOFOULING A LA SURFACE DIFFERENTES STRUCTURES OU SURFACES. _____	9
FIGURE 6: PRODUCTION MONDIALE DES DIFFERENTS POLYMERES UTILISES PENDANT CETTE THESE, EN MILLION DE TONNES PAR AN. _____	10
FIGURE 7: PRINCIPE D'ACTION DE L'ADDITIF PRO-OXYDANT D2W INCORPORE A UN POLYETHYLENE. _____	16
FIGURE 8: ORIGINES DES MACRO-DECHETS DECHETS PLASTIQUES RETROUVES EN MER MEDITERRANEE. _____	17
FIGURE 9: NOMBRE D'ARTICLES SCIENTIFIQUES PAR ANNEE DE PUBLICATION CONTENANT LES MOTS CLES : "MARINE PLASTIC POLLUTION". _____	18
FIGURE 10: (A) REPARTITION, ABONDANCE ET SOURCES DES DECHETS PLASTIQUES DANS LES OCEANS (EUNOMIA REPORTS). _____	20
FIGURE 11: CONCENTRATIONS DE DEBRIS PLASTIQUES EN SURFACE DE LA MER MEDITERRANEE COMPAREES A CELLES RAPPORTEES POUR L'OCEAN MONDIAL _____	21
FIGURE 12: SCHEMA SYNTHETIQUE DU DEVENIR DES DECHETS PLASTIQUES EN MER. _____	22
FIGURE 13: REACTION CHIMIQUE DE NORRISH I SUITE A L'ACTION DES UV. _____	23
FIGURE 14: REACTIONS DE PHOTO-OXYDATION D'UN POLYMERE. _____	24
FIGURE 15: CARACTERISATION CHIMIQUE DES OLIGOMERES EXTRAITS DE L'EAU A PARTIR D'UN FILM HDPE AVANT ET APRES BIODEGRADATION _____	25

FIGURE 16: ÉTAPES DE BIODEGRADATION DES PLASTIQUES EN MER PAR LES MICROORGANISMES. _____	26
FIGURE 17: SCHEMA REGROUPANT LES DIFFERENTS RESERVOIRS DE DEBRIS PLASTIQUES. _____	27
FIGURE 18: DISTRIBUTION DU ZOOPLANKTON (POIDS SEC) ET DE LA MASSE DE MICROPLASTIQUES (MG/M2) PRESENTS DANS LES ECHANTILLONS DE SURFACE DANS LA ZONE NORD-OUEST MEDITERRANEENNE. __	29
FIGURE 19: PHOTOGRAPHIES D'UN BIOFILM SUR DU PE OBSERVE EN MICROSCOPIE A BALAYAGE. _____	32
FIGURE 20: NOMBRE D'ARTICLES SCIENTIFIQUES PAR ANNEE DE PUBLICATION CONTENANT LES MOTS CLES "PLASTISPHERE" ET "BACTERIA". _____	33
FIGURE 21: DIAGRAMME DE VENN REPRESENTANT LE NOMBRE D'OTUS PARTAGES OU NON PAR LE PP, LE PE ET L'EAU DE MER. _____	34
FIGURE 22 : CARTE DE L'EXPEDITION TARA MEDITERRANEE, PHOTOGRAPHIE DU FILET MANTA TIRE PAR LE VOILIER ET PHOTOGRAPHIE D'UN TRI DE DECHETS PLASTIQUES A BORD. _____	42
FIGURE 23 : INSTALLATION DE L'EXPERIENCE MICROCOSMES N°1. _____	75
FIGURE 24 : INSTALLATION DE L'EXPERIENCE EN MICROCOSMES N°2. _____	111
FIGURE 25 : DENDROGRAMME COMPILANT LES POURCENTAGES DE SIMILARITES DES STRUCTURES DES COMMUNAUTES BACTERIENNES DES ECHANTILLONS. _____	140
FIGURE 26 : CONSOMMATION D'OXYGENE PAR LE BIOFILM DES DIFFERENTS POLYMERES EN FONCTION DES JOURS DE PRELEVEMENT. _____	147
FIGURE 27 : SCHEMA SIMPLIFIE DE LA TECHNIQUE DE DNA-STABLE ISOTOPE PROBING. _____	161
FIGURE 28 : SCHEMA SIMPLIFIE DES IMPACTS POTENTIELS CAUSES PAR L'EXPOSITION AUX MICROPLASTIQUES A TRAVERS LES DIFFERENTS NIVEAUX D'ORGANISATION BIOLOGIQUE. _____	162

TABLEAU 1: CARACTERISTIQUES CHIMIQUES, PHYSIQUES ET MECANIQUES DES PRINCIPAUX POLYMERES CONVENTIONNELS.	14
TABLEAU 2: CARACTERISTIQUES CHIMIQUE, PHYSIQUE ET MECANIQUES DES POLYMERES BIODEGRADABLES UTILISES PENDANT CETTE THESE.	16
TABLEAU 3: RECAPITULATIF DES TRAVAUX SCIENTIFIQUES RELATIFS A L'OBSERVATION ET A LA CARACTERISATION DU BIOFILM SUR LES DECHETS PLASTIQUES EN MER EN FONCTION DU TYPE DE PLASTIQUE ET DE LA LOCALISATION.	35
TABLEAU 4 : RESULTATS DES DIFFERENTS ESSAIS DE MISE AU POINT DE LA TECHNIQUE DE DETACHEMENT DES CELLULES DU SUPPORT PLASTIQUE, POUR UNE MESURE DE PRODUCTION BACTERIENNE HETEROTROPHE (PRODBACT) ET UN COMPTAGE EN CYTOMETRIE EN FLUX (CYTOMETRIE).	135
TABLEAU 5 : TABLEAU COMPARATIF DES ABONDANCES CELLULAIRES OBSERVEES SUR DES MORCEAUX DE PLASTIQUE ECHANTILLONNE PENDANT LA MISSION TARA MEDITERRANEE OU LORS DES EXPERIENCES EN MICROCOSMES.	136
TABLEAU 6 : ABONDANCES RELATIVES (%) DES OTU HYDROCARBONOCLASTES MAJORITAIREMENT RETROUVEES SUR LES POLYMERES DES DIFFERENTES ETUDES.	143
TABLEAU 7 : COMPARAISON DES MOYENNES DE PRODUCTION BACTERIENNE HETEROTROPHE EN FONCTION DES TYPES DE SUBSTRAT A L'AIDE DU TEST STATISTIQUE DE STUDENT ($\alpha = 0.05$).	145
TABLEAU 8 : RECAPITULATIF DES DIFFERENTES ETUDES BASEES SUR LES ETAPES DE FORMATION DU BIOFILM A LA SURFACE DE MATIERES PLASTIQUES.	149

Liste des publications

1. **Dussud C and Ghiglione JF (2014).** Bacterial degradation of synthetic plastics. *CIESM Monograph n°46 on Marine Litters* pp. 43 - 48 [F. Briand, ed.] *In Marine litter in the Mediterranean and Black Seas*, 180 p., CIESM Publisher, Monaco.
2. **Dussud C and Ghiglione JF (2014).** La dégradation des plastiques en mer. *Regards sur la biodiversité*, Société Française d'Ecologie.
3. **P Conan, M Pujo-Pay, M Agab, L Calva-Benitez, S Chifflet, P Douillet, C Dussud, R Fichez, C Grenz, F Gutierrez Mendieta, M Origel-Moreno, A Rodríguez-Blanco, C Sauret, T Severin, M Tedetti, R Torres Alvarado, and JF Ghiglione (2016).** Biogeochemical cycling and phyto- and bacterio-plankton communities in a large and shallow tropical lagoon (Terminos Lagoon, Mexico) under 2009–2010 El Niño Modoki drought conditions. *Biogeosciences*, DOI: 10.5194/bg-2016-288.
4. **Dussud C, Meistertzheim AL, Conan P, Pujo-Pay M, George M, Fabre P, Coudane J, Higgs P, Elineau A, Pedrotti ML, Gorski G, Ghiglione JF.** Evidence of niche partitioning among bacteria living on plastics, organic particles and surrounding seawaters, *Environmental Pollution* (submitted 25/05/17, in review).
5. **Dussud C, Hudec C, George M, Fabre P, Higgs P, Eyheraguibel B, Ghiglione JF.** Colonization of conventional and (bio)degradable polymers by marine microorganisms. *Frontiers of Science* (submission on the 30/08/17).
6. **Dussud C, Meistertzheim AL, Hudec C, Lauters M, Pujo-Pay M, Conan P, Higgs P, Eyheraguibel B, Georges M, Fabre P, Ghiglione JF.** Marine bacterial biofilm abundance and activities on conventional and (bio)degradable polymers. (In preparation, to be submitted to *Science of the total environment*).

Liste des communications scientifiques

1. **Dussud C**, Crispi O, Conan P, Pujo-Pay M, Lemaire J, Fromageot D, Pedrotti ML, Ghiglione JF: Microbial biofilms on marine plastic debris. Poster au Colloque de l'AFEM. Anglet, Novembre 2015.
2. **Dussud C**, Crispi O, Conan P, Pujo-Pay M, Lemaire J, Fromageot D, Pedrotti ML, Ghiglione JF: Plastic marine debris: a new ecological niche for marine microbial biofilms. Poster au colloque Réseau National Biofilms. Toulouse, Décembre 2015.
3. **Dussud C**, Hudec C, Crispi O, Petit S, Elineau A, Gorski G, Pedrotti ML, Coudane J, George M, Fabre P, Ghiglione JF: Characterization of the microbial biofilms living on marine plastic litters. Présentation orale au colloque CEFRACOR "Biodétérioration des matériaux". Toulouse, Mars 2016.
4. **Dussud C**, O Crispi, A Elineau, S Petit, ML Pedrotti, G Gorsky, P Fabre, M Georges, JF Ghiglione: Plastic litters: a new habitat for marine microbial communities. Présentation orale à l'International meeting MICRO16. Lanzarote, Mai 2016.
5. **Dussud C**, Hudec C, Crispi O, Pujo-Pay M, Conan P, Petit S, Elineau A, Gorski G, Pedrotti ML, Coudane J, George M, Fabre P, Ghiglione JF: Characterization of the microbial biofilms living on marine plastic litters. Présentation orale au colloque de l'ARET, « Plastiques, quels enjeux pour demain? ». Alixan, Juin 2016.
6. **Dussud C**, Hudec C, Crispi O, Elineau A, Pedrotti ML, Coudane J, Ghiglione JF: Microbes living on marine plastic debris: the Tara Mediterranean expedition. Présentation orale au meeting International SFE16. Marseille, Octobre 2016.
7. **Dussud C**, Hudec C, Elineau A, George M, Fabre P, Coudane J, Ghiglione JF: Bacterial communities living on plastic litters in the mediterranean sea. Présentation orale à l'ASLO « Mountain to the Sea ». Honolulu, Février 2017.
8. **Dussud C**, Hudec C, Elineau A, George M, Fabre P, Coudane J, Ghiglione JF : Déchets plastiques en mer : une nouvelle niche écologique pour les communautés bactériennes. Présentation orale au Colloque Biofouling, Toulon, Avril 2017.

Liste des étudiants encadrés

1. **Romie PERRIER:** Stage Master 2 (Université de Lyon)

Janvier - Juillet 2015 (7 mois)

2. **Cindy HUDEC:** Stage Master 2 (Université Paris VI)

Janvier - Juin 2016 (6 mois)

3. **Mégane NOYER:** Stage Master 1 (Université Angers)

Février - Avril 2016 (3 mois)

4. **Mélessandre MENART:** Stage Master 1 (Sup'Biotech, Villejuif)

Juin - Juillet 2016 (2 mois)

5. **Albane JACQUET:** Stage école ingénieur (INSA Toulouse)

Septembre - Novembre 2016 (3 mois)

6. **Marion LORIN:** Stage Master 2 (Université de Toulon)

Janvier - Juin 2017 (6 mois)

Chapitre 1

Etat de l'art



Affiche conférence Micro16, Lanzarote

Chapitre 1 Etat de l'art

1. Diversité et fonction des procaryotes dans l'environnement marin

« *Microbial cells in the oceans' water column number roughly a nonillion (10^{30}), or 1,000 x 1 billion x 1 billion x 1 billion, and collectively weigh the equivalent of 240 billion African elephants.* » John Baross, Microbe Census, 2010.

1.1 Abondance, diversité

Une goutte d'eau de mer renferme environ 2 million d'organismes unicellulaires. Ce monde microscopique marin encore inconnu il y a 150 ans éveille la curiosité des chercheurs depuis les premières observations à la fin du 19^{ème} siècle avec les travaux pionniers de Certes (1884), Fischer (1886), Russel (1891) puis Waksman (1934). Les techniques culturales utilisées avaient déjà permis de se rendre compte de l'ubiquité des bactéries, y compris dans les environnements extrêmes de notre planète. Il faudra attendre 30 ans et l'arrivée des techniques de microscopie à épifluorescence (Zimmermann, 1974) pour que soit révélée l'impressionnante abondance microbienne alors largement sous-estimée (Hobbie *et al.*, 1977). On réalise alors que les procaryotes dominent toutes les biosphères de la planète et plus particulièrement le milieu marin où ils représentent jusqu'à 90% de la biomasse (Fuhrman *et al.*, 1989), avec une abondance moyenne de 10^6 cellules.ml⁻¹ (Whitman *et al.*, 1998). Avec ce constat en mains, les microbiologistes soupçonnent alors le rôle majeur joué par les procaryotes dans les cycles biogéochimiques marins.

1.2 Rôle biologique, boucle microbienne, reminéralisation

On sait aujourd'hui que les bactéries sont responsables à 95% de la respiration dans les océans (del Giorgio and Duarte, 2002) et sont indispensables au maintien du cycle du carbone, de l'azote et d'autres éléments comme le fer, le manganèse ou le phosphore. En 1983, Azam *et al.* développe le concept de boucle microbienne qui bouscule le schéma classique du réseau trophique linéaire et met les bactéries au centre des flux de matière (Fig.1). Par l'activité des microorganismes hétérotrophes, jusqu'à 50% de la matière organique produite par la production primaire est reminéralisée (Cole *et al.*, 1988). Les prédateurs exercés sur les bactéries par les nanoflagellés et ciliés referment la boucle microbienne. Le concept de boucle microbienne ne cesse de se complexifier en ajoutant de

nombreuses interactions entre les organismes, une grande variabilité de stratégies métaboliques (comme la photo-hétérotrophie par exemple, Kolber *et al.*, (2001)) ainsi que la prise en compte de la boucle virale (ou « viral shunt » comme « court-circuit » de la boucle microbienne) (Bratbak *et al.*, 1994).

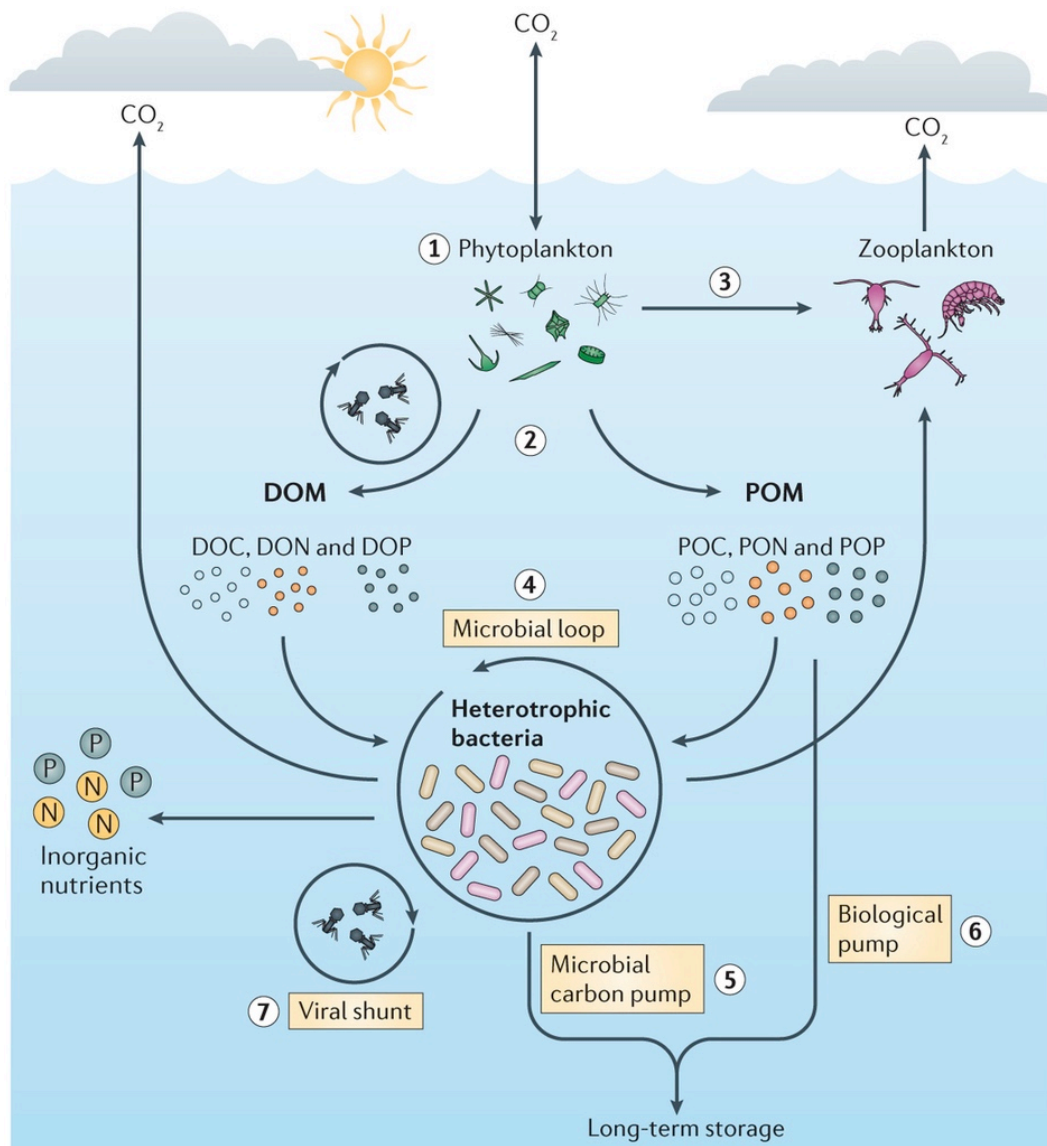


Figure 1: Schéma simplifié du cycle du carbone intégrant la boucle microbienne qui contribue à la reminéralisation des nutriments organiques sous forme inorganique disponible alors pour le phytoplancton (**Buchan *et al.*, 2014**).

Pour une meilleure compréhension de la structuration de cette communauté bactérienne, il a fallu connaître sa diversité. Les premières études basées sur la culture des bactéries avaient permis de décrire environ 10 000 espèces de bactéries et d'archées. Mais un écart entre le dénombrement cellulaire par microscopie et celui via les cultures a été mis en

évidence par Staley en 1985 appelé la notion de « plate count anomaly » (Staley and Konopka, 1985). On estime aujourd'hui que seulement 0,1% des bactéries marines sont cultivables. Les nouvelles méthodes moléculaires de séquençage de l'ARN 16S ribosomal ont permis de recenser 100 fois plus d'espèces (Pace, 1997) que par les méthodes culture-dépendantes. Le gène de l'ARNr 16S est le gène le plus couramment utilisé pour la classification taxonomique d'échantillons environnementaux d'ADN. Caractérisé comme le « chronomètre moléculaire ultime » (Woese, 1987), c'est un gène ubiquiste impliqué dans la synthèses de protéines, il ne subit pas de transferts génétiques latéraux, il a une taille suffisante pour contenir des informations phylogénétiques (environ 1500 paires de bases) et il a un niveau suffisant de convergence et de divergence. Il existe aujourd'hui des banques de données du gène 16S très développées (par exemple Genbank) permettant alors d'identifier une espèce à un seuil généralement fixé à 97% de similarité d'une séquence de l'échantillon avec une séquence de la base de données.

La première étude visant à évaluer la diversité bactérienne marine en utilisant des outils moléculaires a été menée par l'équipe de Giovannoni *et al.* (1990) dans la mer des Sargasses et a révélé une diversité méconnue de groupes bactériens dominants. Par la suite, plusieurs clades non cultivables ont été identifiés comme les SAR par exemple (nom conventionnel donné à des bactéries non cultivables, trouvées pour la première fois en Mer des Sargasses) (Giovannoni, 2000).

L'arrivée du séquençage à très haut débit dans les années 2000 a augmenté fortement la précision et l'efficacité de la lecture des gènes marqueurs. On peut ainsi obtenir classiquement plus de 10 000 séquences pour un échantillon avec le séquençage de nouvelle génération (NGS pour « next generation sequencing »), contre 200 avec un séquençage ancienne génération de type Sanger. L'arbre phylogénétique bactérien regroupe de nos jours une vingtaine de phyla de variabilité génétique et métabolique très importante s'étoffant avec la constante découverte de nouvelles espèces ou fonctionnalités, laissant entrevoir le rôle capital de la diversité bactérienne dans la structure et le fonctionnement des écosystèmes marins (Fig. 2).

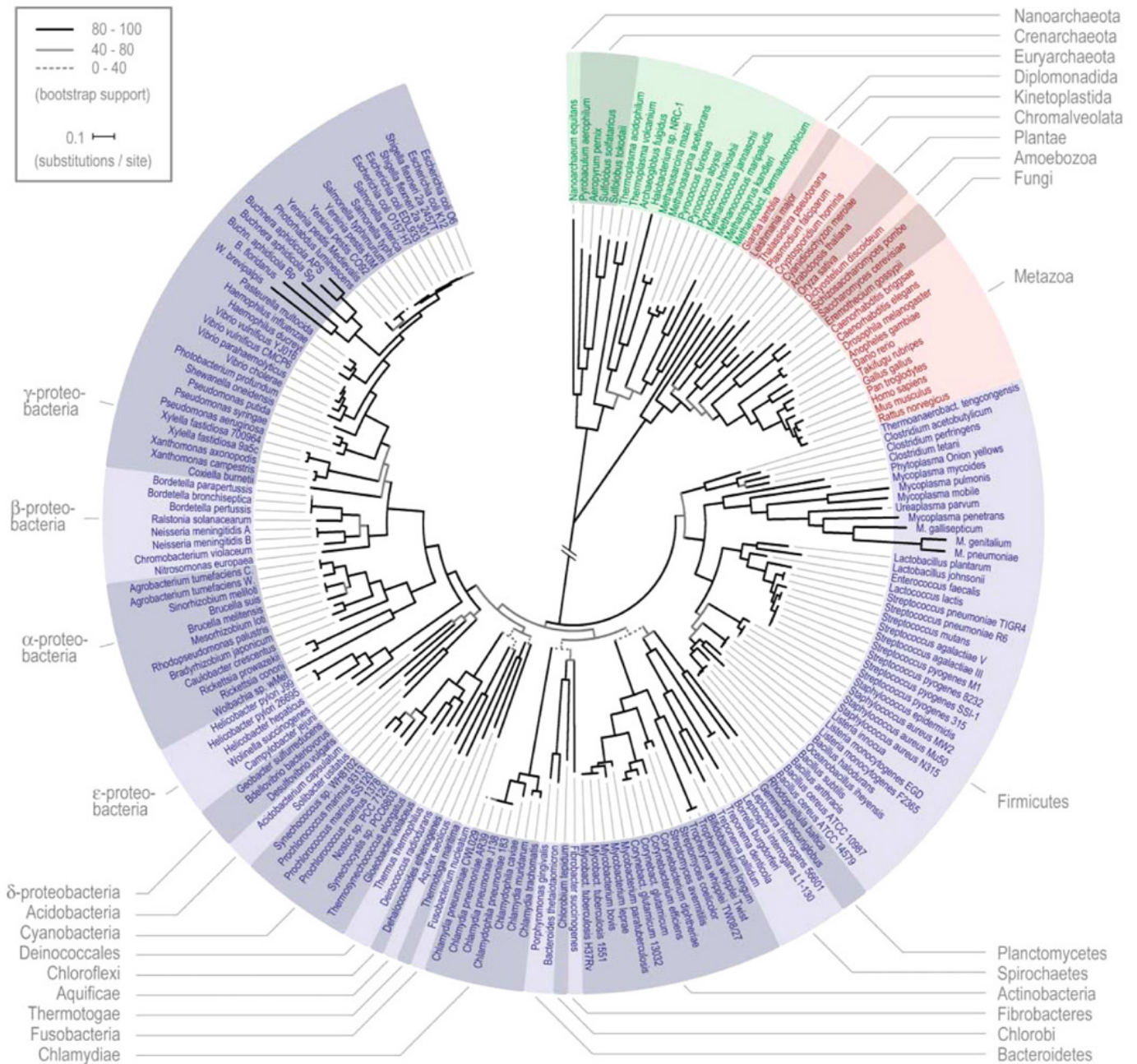


Figure 2: Arbre phylogénétique du vivant montrant les relations entre les espèces pour lesquelles les génomes ont été séquencés. Le centre représente l'ancêtre commun à tout organisme vivant sur Terre. Les couleurs identifient les 3 domaines du vivant : le vert pour les archées, le rouge pour les eucaryotes et le bleu pour les bactéries. Issu de Letunic and Bork (2007)

1.3 Préférence d'un mode vie attaché, le biofilm

En milieu marin et plus généralement dans tous les environnements naturels, les bactéries sont fréquemment associées en agrégats. En effet, les biofilms sont l'un des modes de vie les plus répandus sur Terre. On trouve des biofilms sur toutes surfaces qu'elles soient biologiques ou non (rochers, carapaces, végétaux, peau, verre, métal, plastique, peinture, etc.). C'est en 1943 que Claude E. Zobell constate à la surface d'une bouteille en verre immergée en milieu marin que la quantité de bactéries fixées est supérieure à la quantité de cellules libres dans l'eau de mer (Zobell, 1943). Des découvertes suivantes vont mettre en évidence la présence d'une matrice saccharidique (Jones *et al.*, 1969) procurant aux cellules une résistance aux agressions extérieures (par exemple aux désinfectants, Characklis, (1973)). La notion de biofilm est proposée 5 ans plus tard par Costerton *et al.* (1978) qui définit les populations bactériennes prises dans une matrice extracellulaire qui adhèrent entre elles et à une surface, le tout formant une structure en 3 dimensions. Depuis, l'essor des études sur les biofilms a été considérable dans le domaine médical, industriel et environnemental et différents stades de formation du biofilm ont été caractérisés.

➤ Avant l'arrivée des bactéries, la toute première phase correspond à l'adsorption de matière organique sur la surface qui va initier l'attachement réversible de cellules planctoniques (1 – Fig. 3). Le changement de phénotype bactérien - du mode de vie planctonique à celui attaché - serait entraîné par une densité-dépendance communément appelée « quorum sensing » exprimé ici à faible densité cellulaire lors de la première étape de la colonisation d'une surface (Waters and Bassler, 2005). Le quorum sensing régule de nombreux processus de communication chez les bactéries via la sécrétion et la reconnaissance de molécules signal de faible poids moléculaire, ce mécanisme entraîne aussi l'expression de certains phénotypes en réponse aux changements environnementaux (Reading and Sperandio, 2006). Le quorum sensing joue un rôle capital dans la régulation d'un biofilm.

➤ L'adhésion dite irréversible des bactéries (2 – Fig. 3) est permise par la sécrétion de substances adhérentes aux propriétés collantes constituées de polysaccharides, lipopolysaccharides, protéines et acides nucléiques appelés substances exopolymériques (EPS) (Flemming and Wingender, 2010). L'attachement des cellules dépend de l'énergie de surface et des propriétés du substrat (rugosité, hydrophobicité) mais aussi des conditions hydrodynamiques de l'environnement (Costerton *et al.*, 1995).

➤ Une fois la première couche cellulaire installée, la phase de croissance du biofilm débute (3 et 4 – Fig. 3). Les cellules utilisent la matière organique disponible, se divisent et elles vont former une architecture tridimensionnelle traversée par des pores permettant le transport de l'eau et des nutriments. La structure du biofilm varie en fonction des communautés présentes, de leur mobilité, de la communication intercellulaire, de la disponibilité de la ressource, de la qualité de la matrice et des contraintes de cisaillement (Flemming & Wingender, 2010).

➤ La dernière étape dans la vie d'un biofilm consiste en un recrutement de colonisateurs secondaires (autres espèces bactériennes, micro-algues puis larves, bivalves sessiles, etc.) et une dispersion de bactéries vers de nouveaux sites d'adhésion (5 – Fig. 3). Les biofilms matures sont très dynamiques et subissent des changements en terme de composition, densité, productivité, à chaque modification biotique (compétition, prédation, coopération entre espèces) ou abiotique (lumière, température, profondeur, disponibilité des ressources, caractéristiques du substrat)

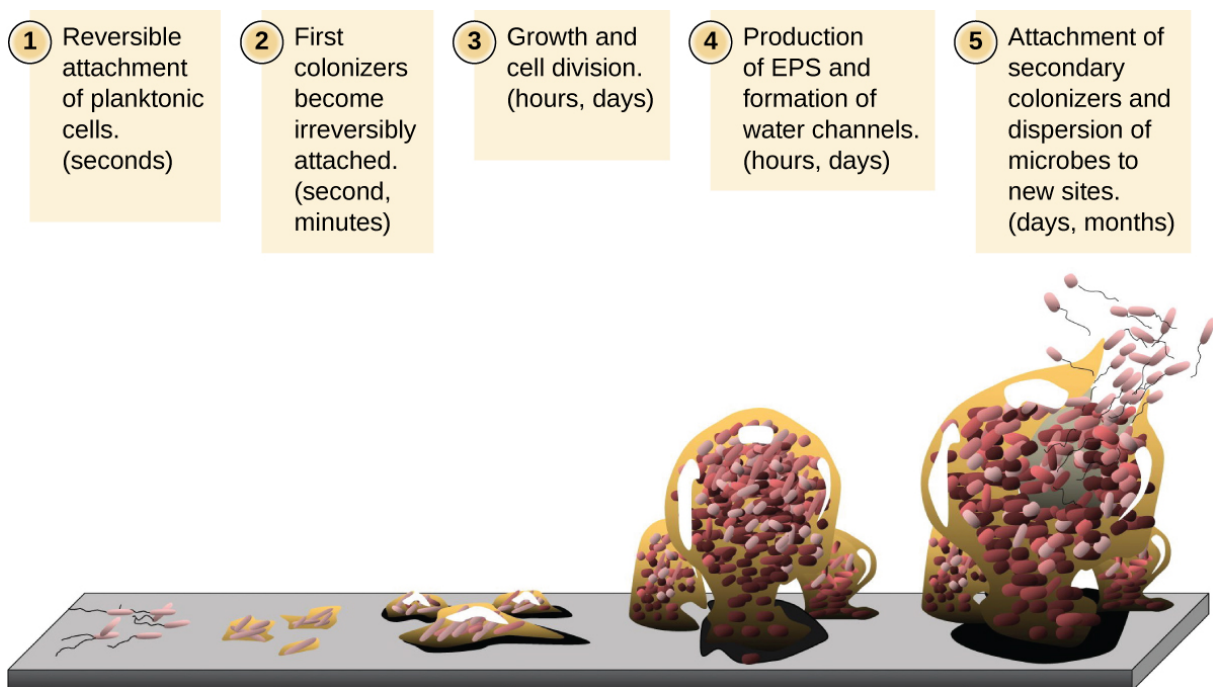


Figure 3: Etapes de formation d'un biofilm (modification de l'illustration tirée de Public Library of Science and American Society for Microbiology) (Dobretsov, 2010).

Le mode de vie en biofilm fourni aux bactéries des avantages indéniables : 1) un accès favorisé aux nutriments et à la matière organique, 2) une protection face aux stress extérieurs (prédation, toxines, antibiotiques...), 3) un maintien des activités extracellulaires et 4) une possibilité d'échange de métabolites, de composés de défense et de matériel génétique (Fig. 4).

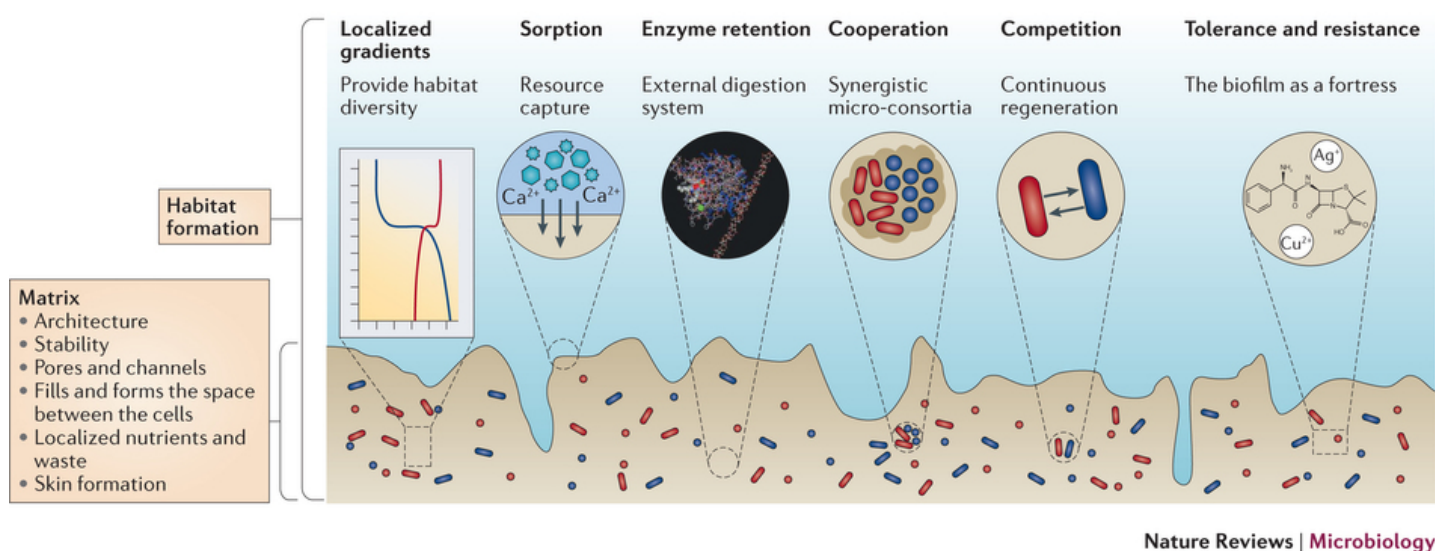


Figure 4: Différentes propriétés induites par la formation du biofilm. Ces propriétés comprennent des gradients localisés qui permettent une diversité de l'habitat, la capture des ressources par sorption, la rétention d'enzymes qui fournit des capacités digestives, des interactions sociales et la capacité, par tolérance et/ou résistance, à survivre à l'exposition aux antibiotiques (Flemming *et al.*, 2016).

1.4 Les biofilms sur les surfaces artificielles en mer

En mer, même les structures anthropiques les plus inertes (plateformes pétrolières, pipelines, constructions côtières, coques de bateaux, filets d'aquaculture, etc.) sont affectées par le développement de biofilms, aussi appelé « biofouling » (Fig. 5). De nombreuses études ont démontré les impacts négatifs du biofouling par la perte d'hydrodynamisme pour les bateaux et donc une surconsommation de carburant (Schultz *et al.*, 2011) et par la biocorrosion qui fragilise les structures métalliques (Melchers, 2016).

Des études récentes pour contrôler le biofouling à l'aide de surfaces texturées et biomimétiques ont souligné les nombreux défis du développement de technologies antisalissures (antifouling, AF) (Salta *et al.*, 2010). Il est important de noter que ces

technologies visent généralement des groupes taxonomiques spécifiques, par exemple les revêtements qui inhibent la colonisation des macroorganismes, mais ne sont généralement pas actifs contre les biofilms bactériens. Si le biofouling par les macroorganismes modifie les propriétés de surface du substrat, la colonisation microbienne modifie également les propriétés physico-chimiques et/ou masque la topographie de la surface (Scardino and de Nys, 2011). L'étude du biofouling passe donc par la description et la compréhension de la colonisation microbienne avant celle des macroorganismes (Salta *et al.*, 2013). La composition des communautés du biofilm est directement dépendante des paramètres l'écosystème dans lequel il se trouve. Plusieurs variables sont notamment décrites pour affecter la structure des biofilms : la température, les nutriments, l'intensité lumineuse, le pH, l'oxygène dissout (Lau *et al.*, 2005; Chiu *et al.*, 2008; Briand *et al.*, 2012) mais aussi la l'hydrodynamisme (Tsai, 2005), la topographie (Kerr and Cowling, 2003), la rugosité (Verran and Boyd, 2001), l'énergie de surface (Genin *et al.*, 2014) et l'hydrophobicité (Pompilio *et al.*, 2008) et la composition chimique du substrat (Palmer *et al.*, 2007). Les rôles précis de ces derniers paramètres physiques sont controversés à cause de la variabilité des substrats et des souches bactériennes étudiées dans des conditions elles aussi très variées. Certains travaux démontrent un attachement des bactéries plus important sur des surfaces rugueuses comparées à des surfaces lisses (Arnold and Bailey, 2000; Lakshmi *et al.*, 2012), alors que d'autres ne trouvent pas de corrélations entre la formation du biofilm et rugosité (Medilanski *et al.*, 2002). De la même manière, des études observent des résultats opposés concernant l'effet de l'hydrophobicité de surface dans l'attachement cellulaire, mais plus de travaux s'accordent à dire que les substrats plus hydrophobes attirent plus de bactéries (Fletcher and Loeb, 1979). Plusieurs auteurs s'accordent néanmoins sur le fait que les caractéristiques de surface des substrats jouent un rôle prédominant dans les premiers instants qui suivent l'immersion et vont de ce fait plus influencer la composition du « film conditionnant » que celle de la communauté bactérienne qui vient ensuite se développer (Palmer *et al.*, 2007; Tang *et al.*, 2011).

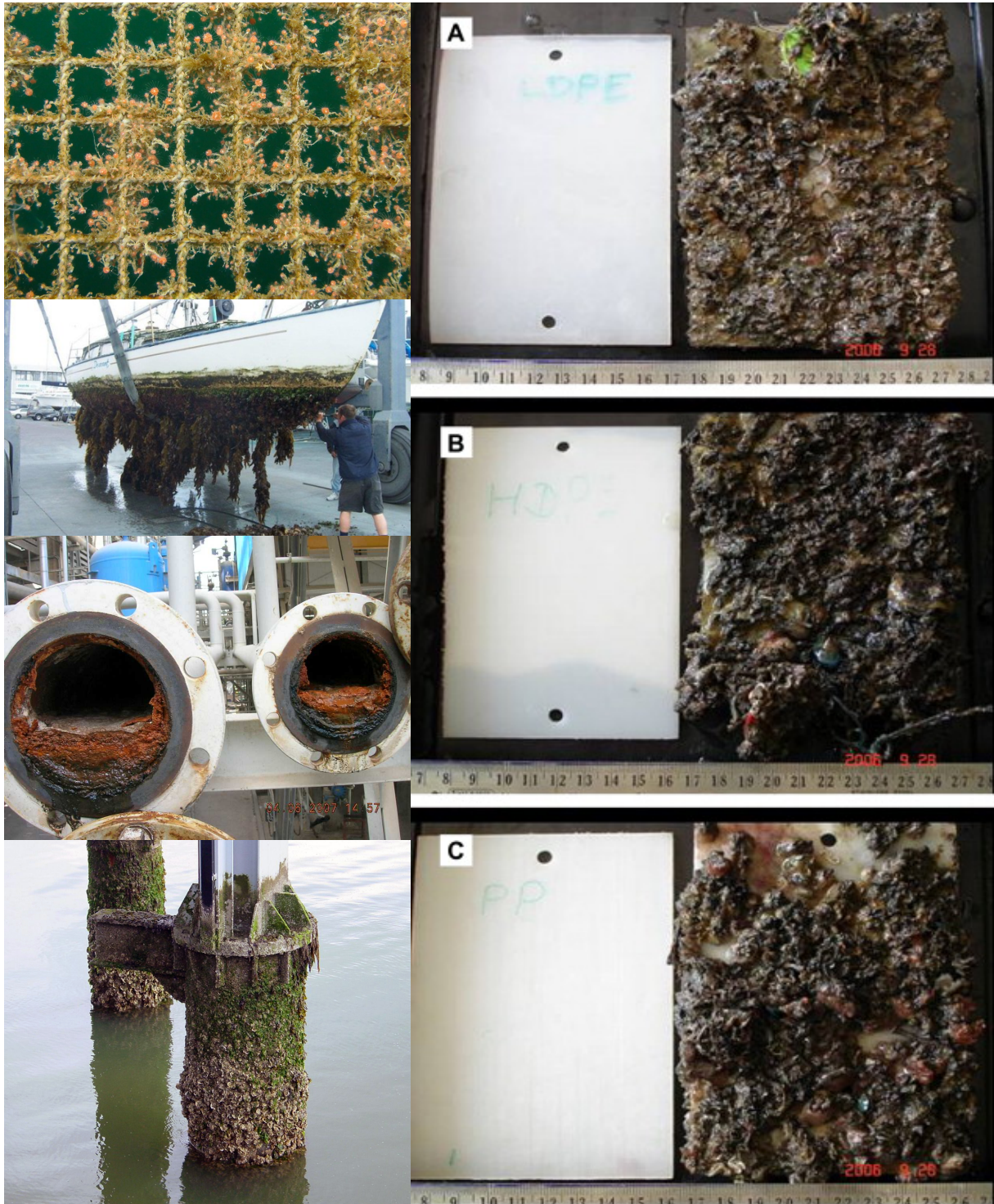


Figure 5: Biofouling à la surface différentes structures ou surfaces. Partie gauche de l'image et de haut en bas : biofouling sur un filet, sur une coque de bateau, dans des installations type pipeline, sur des pontons (source : google image). Partie droite : biofouling après 6 mois d'immersion en Baie du Bengal sur du LDPE (A), HDPE (B) et PP (C) (Sudhakar *et al.*, 2007).

2. Constat : l'ère du plastique

« Le plastique est fabriqué à partir du pétrole, qui est fait à partir des dinosaures. Les dinosaures en plastique sont donc de vrais dinosaures. »

« Environmental pollution is an incurable disease. It can only be prevented ». Barry Commoner

Résistant, léger, économique, dans les années 1950 on ne jure que par cette nouvelle matière : le plastique. En effet, la qualité de vie des hommes a été largement augmentée grâce aux matériaux plastiques utilisés pour de multiples applications : emballages, bâtiment et construction, transports, électricité et électronique, agriculture, médecine et sports (PlasticsEurope). Depuis le milieu du 20^{ème} siècle, la production globale de plastique a connu une impressionnante croissance exponentielle qui n'a pas été sans conséquences sur l'environnement naturel. Mais aujourd'hui, nous imaginons mal comment vivre sans...

2.1 Production mondiale et européenne

La production mondiale de plastique est passée de 1,7 million de tonnes (MT) dans les années 1950 à 340 MT aujourd'hui, ce qui correspond approximativement à la biomasse humaine sur terre (Walpole *et al.*, 2012) (Fig. 6). L'Europe est responsable de 18,5% de la production globale (derrière la Chine et l'Amérique du nord) ce qui représente 58 MT de plastique annuel. La demande au niveau de l'UE s'élève à 49 MT et 70% de cette demande sont concentrés dans 6 pays (Allemagne, Italie, France, Espagne, Royaume-Unis, Pologne).

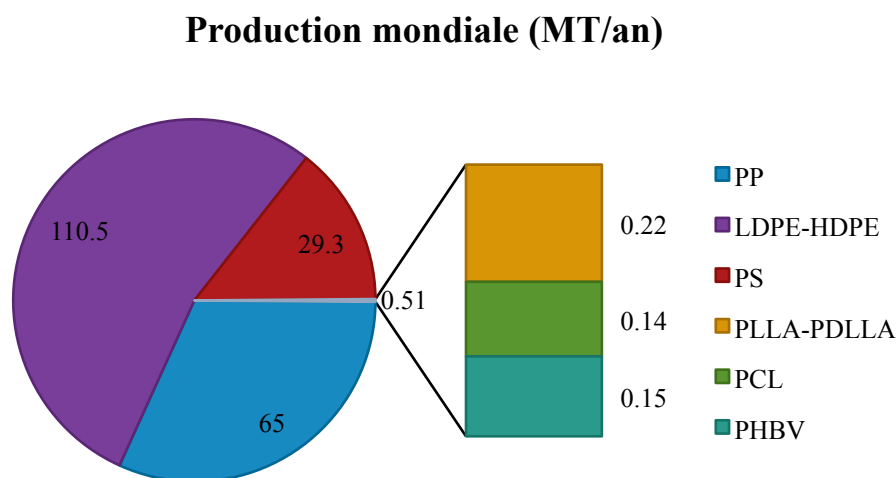


Figure 6: Production mondiale des différents polymères utilisés pendant cette thèse, en million de tonnes par an (rapport PlasticEurope 2015)

Le secteur d'activité avec les plus fortes demandes est celui de l'alimentation pour produire les emballages qui correspond à presque 40% de la demande. Les matières plastiques les plus couramment utilisées sont les polyoléfinés comme le polyéthylène (PE) et le polypropylène (PP). Pour faire face à l'épuisement des ressources pétrolières et aux problèmes environnementaux posés par les plastiques classiques, les bioplastiques représentent depuis les années 2000 une alternative aux produits de la pétrochimie. Le terme de bioplastique regroupe trois grandes familles qui se différencient par leurs aspects d'origine (ressource utilisée) et de fin de vie (devenir dans l'environnement) :

- les polymères biosourcés et biodégradables (PHBV, PLLA/PDLLA)
- les polymères biosourcés non dégradables (plastiques classiques recyclés)
- les non biosourcés mais biodégradables (PE-OXO, PCL).

La production de ces bioplastiques ne représente aujourd'hui que 0,5% de la production globale de plastiques dans le monde, mais elle est en pleine croissance.

La notion de plastique biosourcé s'applique aux polymères fabriqués à partir de ressources renouvelables, c'est à dire se régénérant sur une période suffisamment courte (< 100 ans) une fois qu'elles ont été consommées. Ils sont appliqués majoritairement aux secteurs des emballages et agricole (films de paillage). Mais plastique « biosourcé » ou « bioplastique » ne veut pas dire « biodégradable ».

Selon la norme NF EN 13432, un plastique biodégradable est caractérisé par une capacité intrinsèque à être dégradé par une attaque microbienne qui va simplifier progressivement sa structure pour finir par être converti en eau, dioxyde de carbone et/ou méthane et en une nouvelle biomasse. La biodégradabilité d'un polymère dépend en grande partie de sa structure chimique, mais aussi des paramètres du milieu dans lequel il va se retrouver. On sépare les plastiques biodégradables en deux familles :

- les hydro-biodégradables, conformes à la norme de compostage en milieu naturel (EN 13432), sont dégradés par hydrolyse des chaînes dans un environnement microbiologique actif

- les oxo-biodégradables se fragmentent par oxydation des chaînes (en milieu aérobie) sous l'action de paramètres abiotiques (UV, température). Les oligomères relargués seraient ensuite clivés par des enzymes bactériennes et/ou assimilés à l'intérieur des cellules après avoir atteint une taille suffisamment petite (<600 Da).

2.2 Les compositions chimiques

Note : Le terme « plastique » est couramment utilisé pour désigner un matériau polymère. Par simplification, il sera employé dans ce manuscrit au même titre que le terme « polymère ». Nous passerons en revue dans cette partie majoritairement les polymères étudiés dans le cadre de cette thèse.

Les plastiques sont des matériaux synthétiques majoritairement issus de matière pétrochimiques et dans une moindre mesure de matières renouvelables. Ils possèdent une masse molaire très élevée supérieure à $2\,500\text{ g.mol}^{-1}$ et jusqu'à 10^6 g.mol^{-1} . Leur structure moléculaire est composée de longues chaînes aliphatiques appelées polymères constituées elles-mêmes d'une succession de motifs unitaires : les monomères. Le nombre de motifs unitaires est appelé « degré de polymérisation » et les polymères peuvent être constitués d'un seul type de monomères (homo-polymères), ou de plusieurs types de monomères (co-polymères). On distingue les polymères selon leur structure alpha (chaînes carbonées : linéaires ou ramifiées (branchées ou réticulées)) et leur structure bêta (stéréochimie sélective ou non).

2.2.1 Les plastiques conventionnels

Note : Tableau récapitulatif des caractéristiques des polymères conventionnels : Tableau 1.

Les plastiques conventionnels sont issus de ressources fossiles et ils sont en général non-biodégradables. Ils sont généralement répartis en deux catégories : les thermoplastiques (les plus répandus) et les thermodurcissables qui durcissent avec une augmentation de la température (polyester, résines).

Les thermoplastiques se ramollissent avec la température et ils peuvent être moulés et garder leur forme après refroidissement. On trouve ces polymères soit (1) à l'état physique cristallin : chaînes linéaires ordonnées liées entre elles par de fortes liaisons intermoléculaires donnant une matière rigide (par exemple le PE haute densité, HDPE), soit (2) à l'état

amorphe : chaînes ramifiées désordonnées faiblement liées entre elles qui donne une matière étirable (par exemple le PE basse densité, LDPE).

Les polyoléfines regroupent le HDPE, le LDPE et le PP. Ensemble, ils constituent plus de 47% d la production en Europe de l'Ouest. Ils sont produits à partir de monomères polymérisés (éthylène ou propylène) en présence d'un catalyseur (dioxygène ou organométalliques). Grâce à leur légèreté, leur résistance et leur adaptabilité, les polyoléfines sont les polymères les plus utilisés dans nos sociétés actuelles.

Le polyéthylène téréphthalate (PET) est un plastique de type polyester saturé. Malgré sa dénomination, il n'a aucune similitude chimique avec le PE. Il est formé d'un alcool, l'éthylène glycol (EG), et d'un acide, l'acide téréphthalique (TPA). Etant une matière facile à traiter lorsqu'il est fondu, le PET peut répondre à presque tous les besoins de l'industrie de l'emballage.

Le polychlorure de vinyle (PVC) est un dérivé de sel produit par réaction de l'éthylène avec le chlore (électrolyse). Le chlorure de vinyl monomère, gaz obtenu suite à plusieurs étapes, est ensuite polymérisé pour donner une poudre de PVC et mélangée avec divers additifs pour obtenir les propriétés désirées en fonction des applications. La poudre est finalement chauffée et fondue puis transformée selon différentes techniques (extrusion, injection, thermoformage, etc.). Ce matériau est durable, léger, solide et résistant au feu, avec d'excellentes propriétés d'isolation et une faible perméabilité. Avec le PE et le PP, il correspond donc au matériau parfait dans divers domaines.

Le PS fait partie des polymères styréniques, issus de monomères de styrène. Lorsqu'il est expansé, il devient un produit très léger avec une très bonne isolation thermique. Les polymères styréniques sont déclinés sur une large gamme de produits.

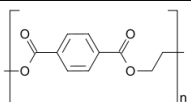
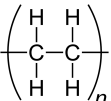
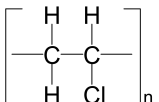
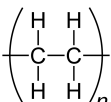
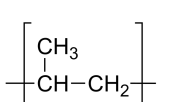
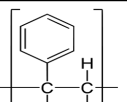
Sigle	Nom	Structure	Masse volumique	T° de transition vitreuse	T° de fusion	Contrainte à la rupture (MPa)	Elongation à la rupture (%)	Utilisation
 PET	Polyéthylène Terephthalate		1.38 g/cm ³	70°C	255°C	57	300	Bouteilles (transparentes) eau/jus de fruits/huiles..., emballages jetables, barquettes, emballages cosmétiques.
 HDPE	Polyéthylène haute densité ou High density		0.95 g/cm ³	-110°C	130 à 138°C	22	20 à 80	Bouteilles (opaques) détergents/lait, bouchons vissés, flacons cosmétiques, gels douche.
 PVC	Polychlorure de vinyle		1.38 g/cm ³	80°C	125°C	60	Rigide: 5 à 80 Souple: 150 à 450	Jouets, tuyaux, rideaux de douche, produits de construction (chassis fenêtres), baches, câbles, garnitures intérieures automobile.
 LDPE	Polyéthylène basse densité ou Low density		0.92 g/cm ³	-110°C	85 à 100°C	10	200 à 600	Sacs congélation, sacs poubelle, sacs zippés alimentaires, films alimentaires, barquettes.
 PP	Polypropylène		0.90 g/cm ³	-10°C	163°C	38	250 à 600	Gourdes souples réutilisables, récipients alimentaires, pots de yaourt/margarine/beurre, planche à découper, mobilier de jardin, emballages et appareils médicaux.
 PS	Polystyrène		1.04 g/cm ³	100°C	160°C	45	5 à 75	Barquettes alimentaires, gobelets, couverts et verres jetables, pots de yaourt. Sous forme expansée : emballage et isolation.

Tableau 1: Caractéristiques chimiques, physiques et mécaniques des principaux polymères conventionnels.
Sources : PlasticsEurope (PEMRG), Consultic, myCeppi

2.2.2 Les polymères biodégradables

Note : Tableau récapitulatif des caractéristiques des polymères biodégradables : Tableau 2.

Les biosourcés « hydrodégradables »

Le polyhydroxyalcanoates ou PHA sont d'origine microbienne, ils sont produits sous forme de micro-granules dans le cytoplasme des bactéries (comme *Ralstonia* sp., *Pseudomonas* sp.) (Chodak, 2008). Accumulés en réponse à un stress et après fermentation d'une source de carbone, ils servent de réserves énergétiques à la cellule. Les granules sont extraits en déclenchant la lyse cellulaire le plus souvent avec des solvants organiques puis purifiés (Gumel *et al.*, 2013). On recense aujourd'hui 300 espèces bactériennes capables de produire 80 monomères (hydroxyalcanoates, HA) différents. Parmi ces monomères, l'hydroxy butyrate (HB) et l'hydroxy valérate (HV) sont fréquemment associés pour obtenir le copolymère

poly[3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate] (PHBV) dont les propriétés physiques permettent une large gamme d'applications. Dans cette thèse le PHBV possédait un pourcentage de HV égal à 8% (composition la plus courante).

L'acide polylactique (PLA) est fabriqué à partir d'amidon de maïs ou de betterave transformé en sucres via une hydrolyse enzymatique. Les sucres vont être ensuite convertis en acide lactique par fermentation bactérienne. La polymérisation des monomères obtenus se fait généralement par ouverture du cycle en présence d'un catalyseur à base d'étain (Garlotta, 2001). L'acide lactique étant une molécule chirale, il existe deux énantiomères : l'acide L-lactique et l'acide D-lactique. Dans le cadre de cette thèse, deux types de monomères polymérisés ont été utilisés : le L-lactide et le D,L-lactide pour donner respectivement du PLLA et du PDLLA avec des propriétés mécaniques différentes. L'intérêt pour les polyesters aliphatiques tels que le PLA est apparu dans les années 1930 avec les travaux de Carothers. Des applications médicales sont apparues dans les années 1970 en raison de la capacité du corps humain à dégrader ces matériaux. Il représente aussi une alternative aux polymères conventionnels de par sa biodégradabilité en conditions de compostage industriel.

Les pétroplastiques « biodégradables »

Le polycaprolactone (PCL) est un polyester d'origine pétrochimique biodégradable. La polymérisation du monomère de ϵ -caprolactone se fait par ouverture du cycle en présence d'alcool. La vitesse de dégradation est plus faible que les autres polymères biodégradables, du fait de sa forte cristallinité (Pitt *et al.*, 1981). Ces polymères sont de plus en plus utilisés en chirurgie médicale.

Les plastiques oxo-dégradables (OXO) regroupent des polymères conventionnels (généralement du PE) auxquels a été ajouté un additif pro-oxydant. Les OXO possèdent les propriétés mécaniques des plastiques conventionnels avec une durée de vie pré-déterminée pour permettre une dégradation facilitée en milieu naturel. Cette fragmentation contrôlée est permise par l'ajout d'un stabilisant à durée de vie adaptable (composé phénolique) et de molécules thermo- et photo-oxidantes de manganèse (Mn), de fer (Fe) ou de cobalt (Co), par exemple (Koutny *et al.*, 2006). Par l'action de l'oxygène, de la chaleur ou des UV, le film OXO s'oxyde et se fragmente plus ou moins rapidement en fonction des additifs incorporés (Fig. 7). Ainsi, le poids moléculaire diminue exponentiellement avec le temps jusqu'à ce que

les molécules atteignent une taille suffisamment petite pour être assimilées et biodégradées par les microorganismes. En milieu naturel terrestre, la biodégradation de PE oxydé serait observée au bout d'un an selon Chiellini *et al.* (2007). Les travaux de cette thèse ont été réalisés avec un film OXO additionnés de fer (0,04%) et manganèse (0,06%) ou de cobalt (0,04%) et manganèse (0,06%).

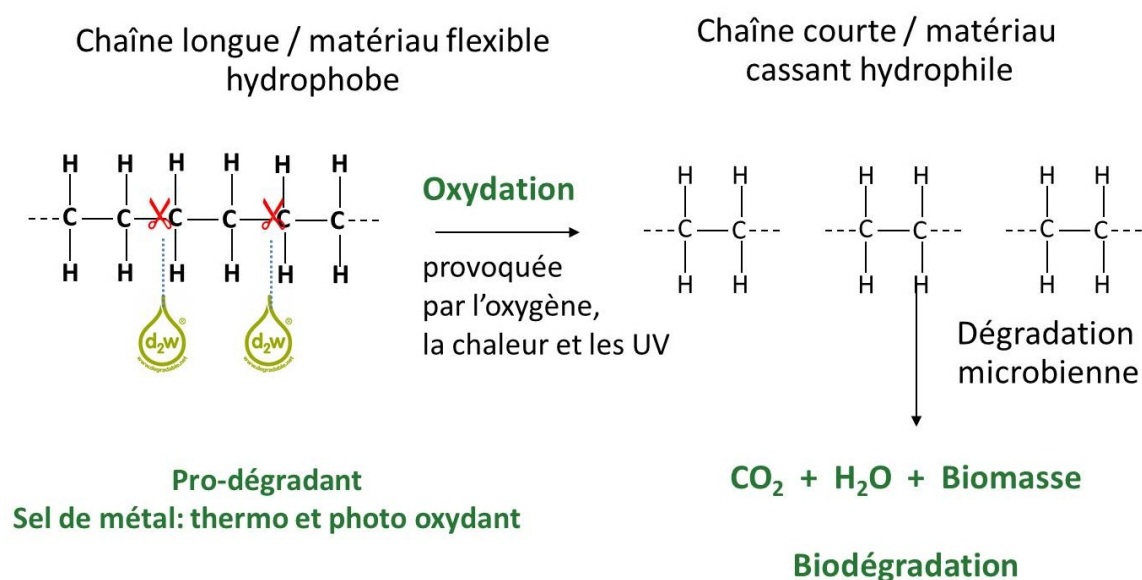


Figure 7: Principe d'action de l'additif pro-oxydant « d2w » incorporé à un polyéthylène.

Source : Symphony Environmental, www.degradable.fr

Nom	Structure	Masse molaire	T° de transition vitreuse	T° de fusion	Contrainte à la rupture	Elongation à la rupture	Masse volumique	Utilisation
Polycaprolactone (PCL)		4 000 g/mol	-60°C	60°C	10	300	1.11 g/cm ³	Impression 3D, chirurgie médicale (implants).
Acide (L) lactique (PLLA)		75 000 g/mol (moyenne)	55 à 60°C	150 à 180°C	59	4	1.25 g/cm ³	Films, récipients thermoformés, bouteilles, fibres textiles.
Acide (DL) lactique (PDLA)								
Polyhydroxy butyrate et valérate (PHBV)		340 000 g/mol	Variable en fonction de la longueur de groupe R	Variable en fonction de la longueur de groupe R (105 à 175°C)	20	50	1.25 g/cm ³	Emballages, applications médicales.

Tableau 2: Caractéristiques chimique, physique et mécaniques des polymères biodégradables utilisés pendant cette thèse. Source : Déroiné, 2014.

3. La pollution par les plastiques dans les océans

« *L'eau et l'air, les deux fluides essentiels dont dépend toute la vie, sont devenus des poubelles géantes.* » - Jacques-Yves Cousteau, 1987.

La production de plastique ne cesse d'augmenter et dépasse aujourd'hui les 340 millions de tonnes par an au niveau mondial. Les océans représentent le réceptacle final de la pollution plastique terrestre, puisqu'on estime que 10 % environ de cette production est retrouvée en mer (Hammer *et al.*, 2012). 80% de ces déchets sont amenés par les rivières, les eaux de ruissellement, les stations de traitement des eaux usées et parfois par des phénomènes météorologiques extrêmes comme les crues. La majorité de la pollution plastique terrestre est engendrée par les ménages et les activités touristiques (Fig. 8). Les 20% restants concernent

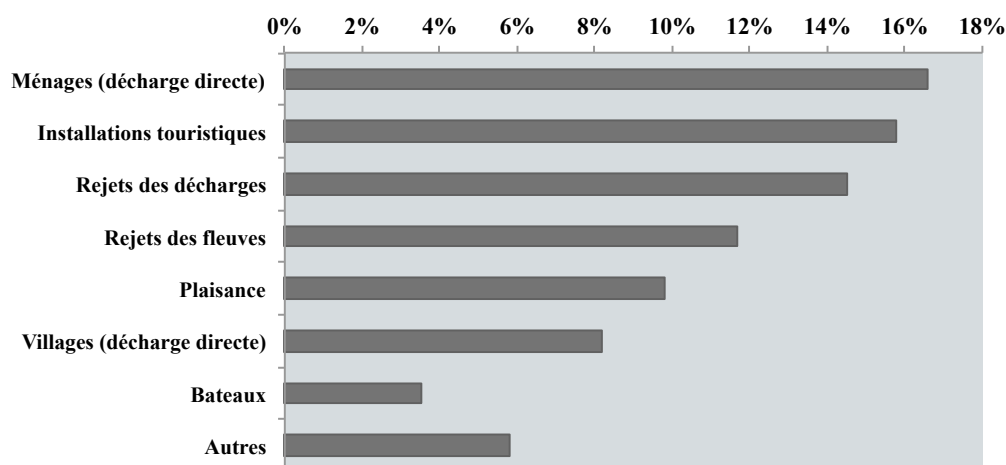


Figure 8: Origines des macro-déchets déchets plastiques retrouvés en mer Méditerranée. **Source : MEDPOL**

les déchets directement produits en mer par le secteur de la pêche majoritairement (Li *et al.*, 2016). Les caractéristiques principales des polymères (résistance, légèreté) qui étaient un atout commercial ont pour conséquence une persistance à long terme et une capacité de dispersion inégalée en mer. Aujourd'hui, même les eaux les plus reculées de la civilisation (Ocean austral, par exemple) sont polluées par le plastique. En 2017 on compte plus de 360 publications scientifiques contenant les mots clés « marine plastic pollution » et une augmentation significative est observée à partir de 2010 (Fig. 9).

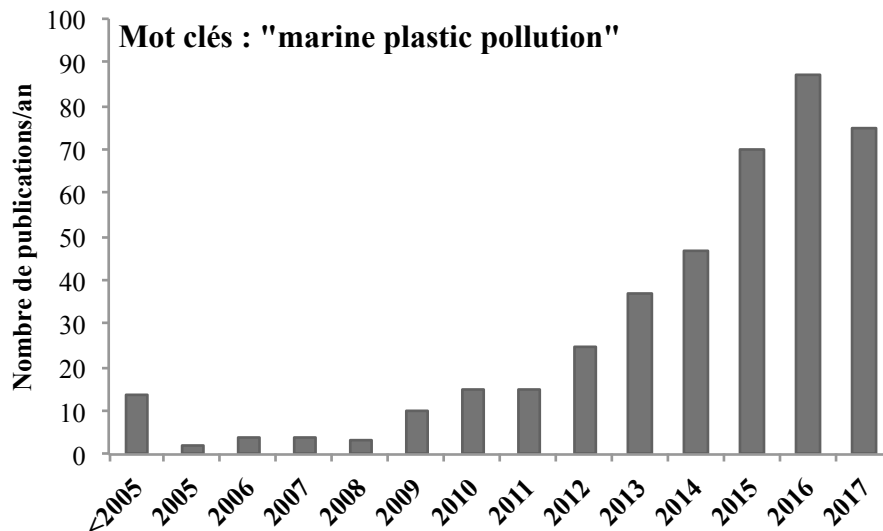


Figure 9: Nombre d'articles scientifiques par année de publication contenant les mots clés : "marine plastic pollution".

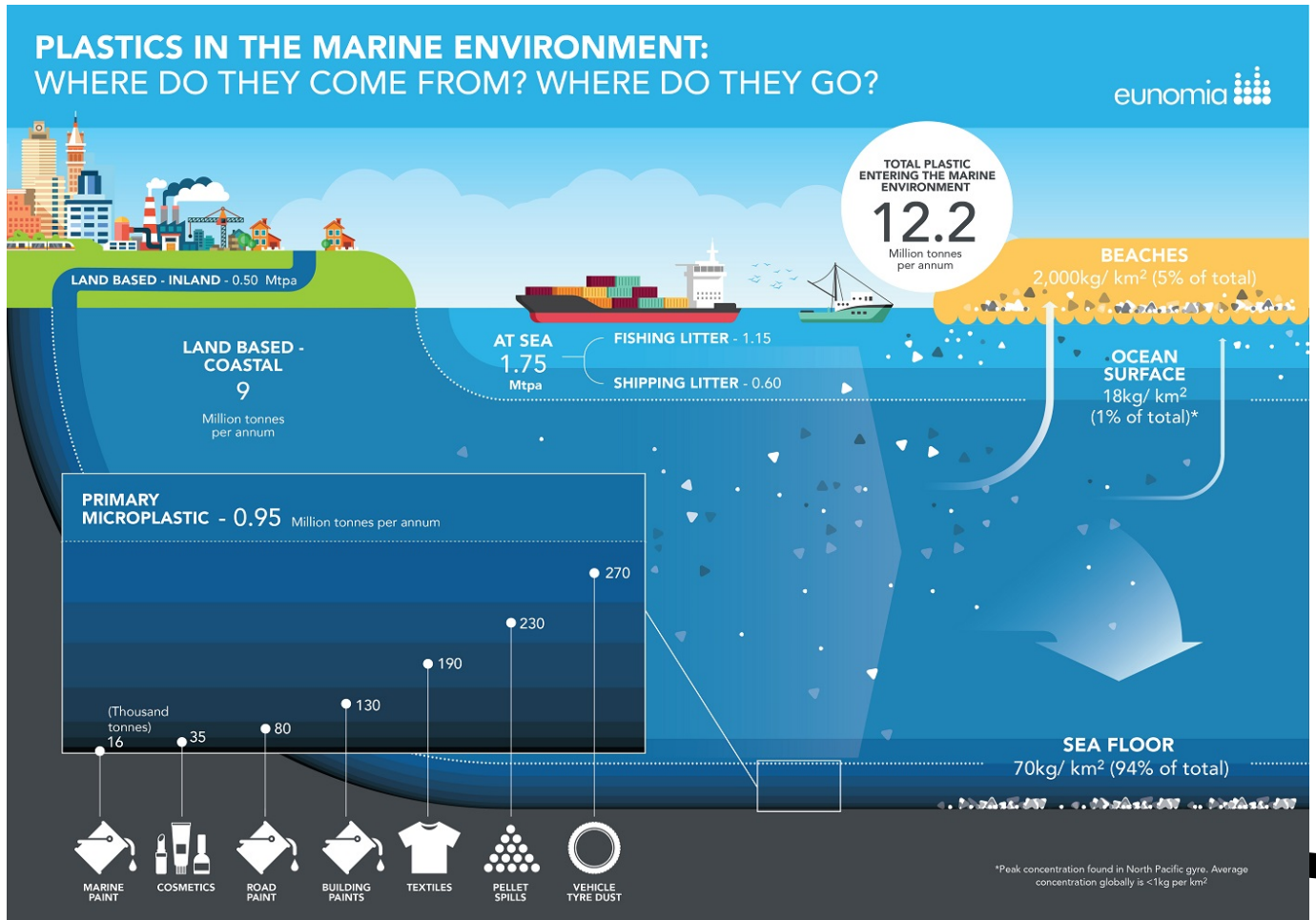
3.1 Abondance et distribution des plastiques en mer

12,2 Millions de tonnes de plastiques arrivent en mer chaque année. Aux grés des courants et selon leur densité, les macro- et micro-déchets plastiques vont être transportés horizontalement et verticalement à travers les océans. L'impressionnante quantité de fragments récemment évaluée en surface n'est en fait que « la partie émergée de l'iceberg », puisque 94 % du poids total de déchets plastiques se trouvent sur le fond des océans. On estime à 70 kg/km² le poids de plastique détritique et à 18 kg/km² celui de plastique pélagique (Fig. 10).

Ces quatre dernières années de nombreuses campagnes océanographiques ont été organisées pour évaluer l'abondance et le poids des déchets plastiques en surface (Cózar *et al.*, 2014; Eriksen *et al.*, 2014; Reisser *et al.*, 2014) et dans les sédiments (Van Cauwenberghe *et al.*, 2015). Les quantités annoncées sont très variables et souvent difficiles à comparer. En effet, les méthodes d'échantillonnage et les unités ne sont pas standardisées et il y a souvent des confusions dans les termes employés (la définition du terme « microplastique » par exemple reste un sujet de débat récurrent) (Ryan *et al.*, 2009). La dernière estimation réalisée en 2014 à l'échelle mondiale évalue à $5,25 \cdot 10^{12}$ le nombre de fragments plastiques à la surface

des océans (Eriksen *et al.*, 2014). Les plus grosses concentrations seraient retrouvées au niveau des gyres océaniques où les courants circulaires concentrent les déchets flottant dans ces zones spécifiques. Cinq gyres sont décrites : Océan Atlantique Nord et Atlantique Sud, Océan Indien, Océan Pacifique Sud et Pacifique Nord (la plus polluée). La zone d'accumulation du gyre du Pacifique Nord, découverte en 1997 par le capitaine Charles Moore, est appelée le « 7^{ème} continent » à cause de l'étendue qu'elle représente (3,5 millions de km², soit 1/3 de la surface de l'Europe ou 6 fois celle de la France) et non du fait que l'homme puisse marcher dessus comme l'imaginent beaucoup de personnes. Ce « 7^{ème} continent » ressemble plus à un bouillon de plastiques piégés en d'énormes tourbillons (50 à 2500 g plastique/km² (Eriksen *et al.*, 2014)).

A



B



Figure 10: (A) Répartition, abondance et sources des déchets plastiques dans les océans (Eunomia Reports).

(B) Photographies montrant l'accumulation de déchets plastiques dans un canyon de Méditerranée à 1000m de profondeur (Barnes *et al.*, 2009).

La mer Méditerranée rivalise malheureusement en terme de pollution avec les gyres océaniques puisque la concentration en plastiques retrouvée avoisine les 423 g/km^2 en moyenne (Cozar *et al.*, 2015) (Fig. 11). L'accumulation de déchets plastiques dans cette zone est expliquée par plusieurs paramètres. Premièrement, la Méditerranée est une zone avec une forte densité de population (plus de 100 million d'habitants sur une bande littorale de 10km, source CIESIN) et d'activités commerciales et touristiques. La pollution plastique engendrée par cette zone est donc conséquente et estimée à 23 150 tonnes de plastique en surface (Eriksen *et al.*, 2014). Deuxièmement, c'est une mer semi-fermée avec un hydrodynamisme particulier : les courants de surface entrent dans le bassin Méditerranéen via le détroit de Gibraltar et les courants profonds (plus salés donc plus denses) sortent en direction de l'océan Atlantique. De plus, le taux de renouvellement des eaux de 70 ans est relativement court par rapport à ceux des océans (200 à 1000 ans) (Durrieu de Madron *et al.*, 2011). Les déchets plastiques flottants sont piégés dans le bassin et sont transportés via les courants à travers la Méditerranée en circuit fermé. Ces différentes raisons expliquent une concentration de débris plastiques comparable à celle des gyres les plus pollués (Lebreton *et al.*, 2012; Pedrotti *et al.*, 2016).

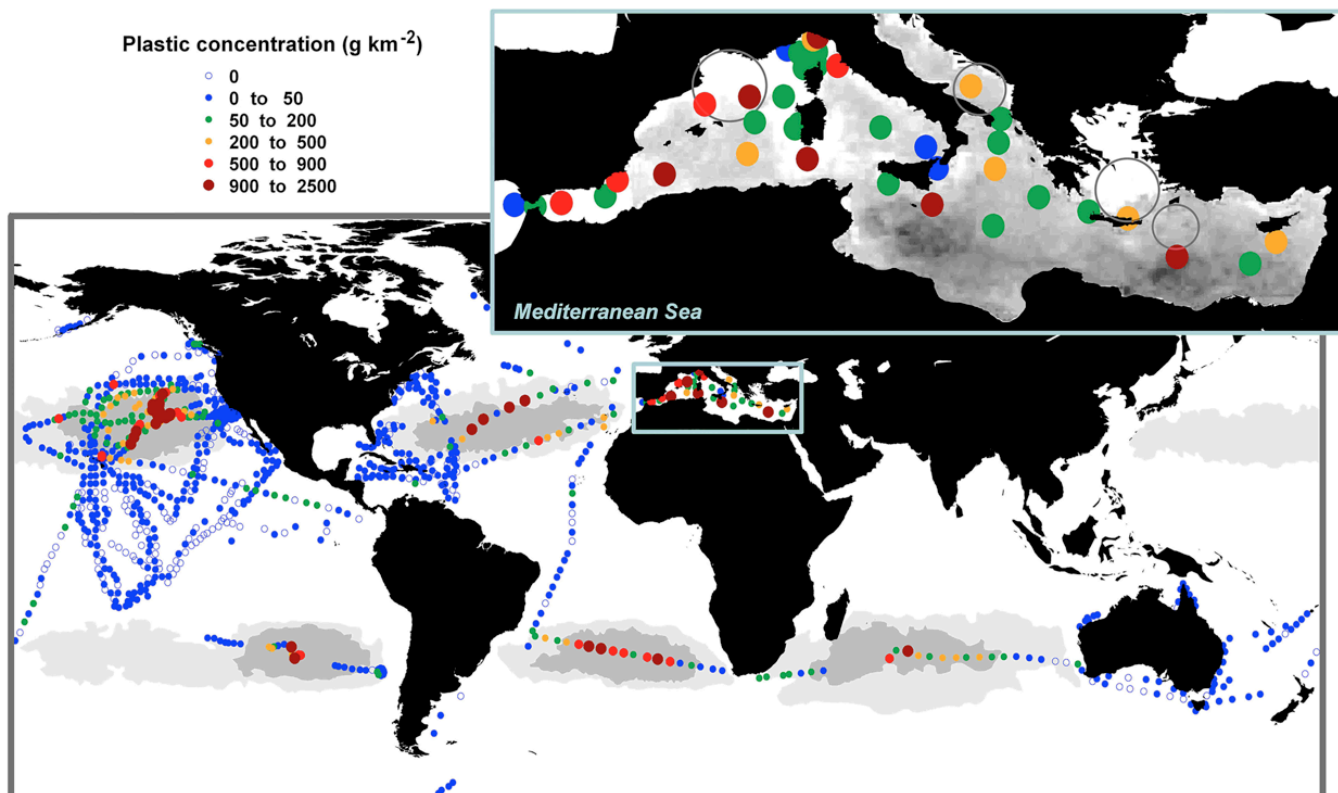


Figure 11: Concentrations de débris plastiques en surface de la mer Méditerranée (carte dans le coin supérieur droit) comparées à celles rapportées pour l'océan mondial suite à différentes missions océanographiques (Eriksen *et al.*, 2014). Les nuances de gris montrent les concentrations plastiques superficielles prévues par le modèle, avec les zones les plus sombres correspondant aux zones les plus concentrées. Les zones océaniques blanches représentent des zones sans accumulation (Cózar *et al.*, 2015).

3.2 Le devenir d'un plastique en mer

Tout plastique abandonné en milieu marin subit des dégradations par des processus physiques, chimiques et biologiques (Fig. 12). Il est plus ou moins vite fragmenté en fonction de sa composition. En utilisant des modèles océanographiques de dispersion de débris flottants étalonnés par des données de terrain, de récentes études estiment que 92% des fragments retrouvés dans les océans sont de taille inférieure à 5mm qu'on appelle microplastiques (MP) (Eriksen *et al.*, 2014). On distingue deux types de MP : les MP primaires qui sont des petites particules produites pour des applications industrielles (matière première sous forme de granulés) ou domestiques (microbilles dans les cosmétiques, fibres textiles) et qui passent à travers les systèmes de traitement des eaux usées ; et les MP secondaires issus de la fragmentation d'un macroplastique en milieu naturel.

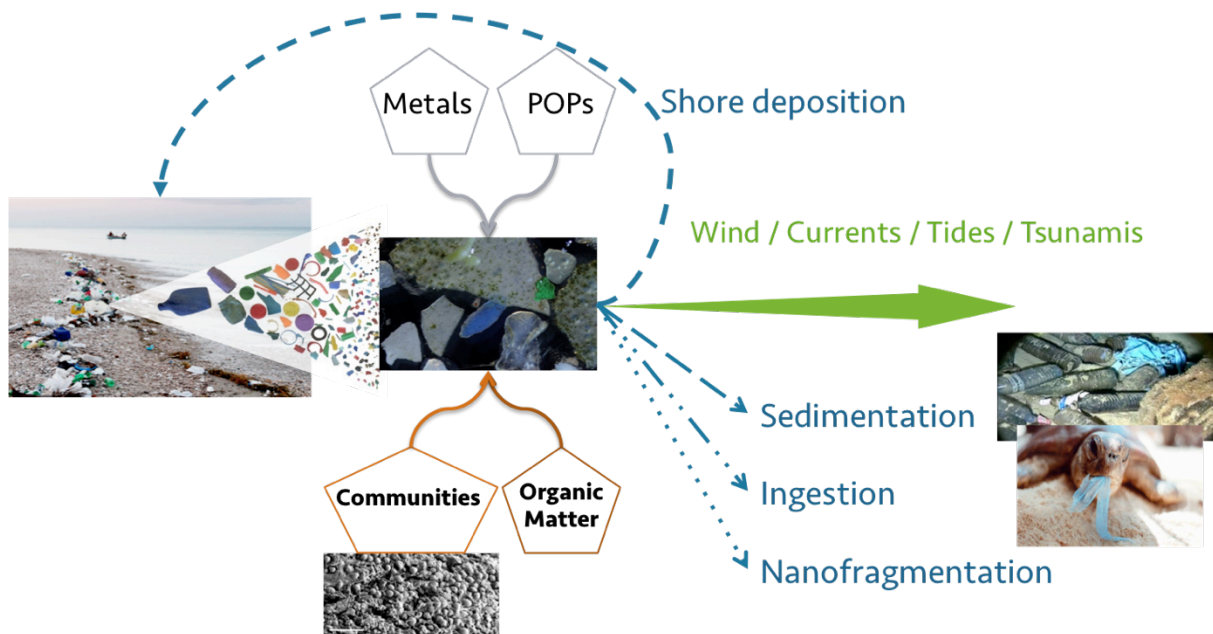


Figure 12: Schéma synthétique du devenir des déchets plastiques en mer. POPs : Polluants Organiques Persistants.

3.2.1 Dégradation abiotique

Les premiers mécanismes de dégradation concernent des processus mécaniques, physiques et chimiques. La dégradation mécanique est exercée par l'hydrodynamisme créé par les vagues, les courants qui vont fragiliser la matière. Au niveau macroscopique, l'impact de ce processus sur le plastique n'est pas visible, mais au niveau moléculaire ces processus activent ou accélèrent la dégradation (Briassoulis, 2007).

Les matières plastiques sont photosensibles et l'action des UV va entraîner des modifications chimiques des polymères en oxydant ou en coupant les chaînes carbonées (réactions de Norrish, Fig. 13) (Lucas *et al.*, 2008). La photodégradation est le paramètre le plus important dans la dégradation abiotique des déchets plastiques se trouvant dans la zone photique de l'océan.

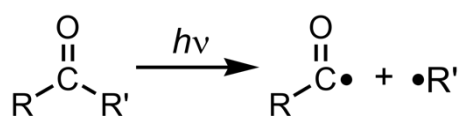


Figure 13: Réaction chimique de Norrish I suite à l'action des UV.

Bien que les polymères possèdent en général des températures de fusion basses, la température des océans reste largement en-dessous de cette limite et explique une plus lente dégradation des plastiques en milieu marin comparé au milieu terrestre où les températures peuvent être très élevées. Ce paramètre n'est donc pas le plus impactant dans les océans et permet même d'augmenter la stabilité de fragments plastiques dans les environnements océaniques froids.

Les mécanismes chimiques par contre jouent un rôle majeur dans la dégradation abiotique. Parmi les molécules les plus efficaces, on trouve l'oxygène qui va attaquer les doubles liaisons pour créer des radicaux libres dans les chaînes aliphatiques (Singh and Sharma, 2008). Le plus souvent le processus chimique est couplé et agit en synergie avec l'action des UV, on appelle ce mécanisme la photo-oxydation (Fig. 14). L'hydrolyse est un autre mécanisme important de dégradation chimique (Li, 1999), où les molécules d'eau agissent sur la rupture des liaisons covalentes hydrolysables (esters, amides, etc.). Plus le

polymère présentera une structure cristalline et moins il sera chimiquement sensible. Les matières plastiques plus amorphes (chaines désordonnées) sont plus vulnérables à ce type de dégradation.

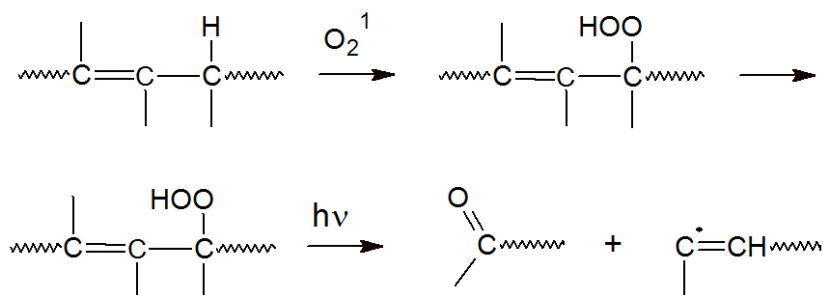


Figure 14: Réactions de photo-oxydation d'un polymère.

Source : polymerdatabase.com

3.2.2 Dégradation biotique

*Note: Cette partie est adaptée d'un article publié (Dussud & Ghiglione, 2014) dans Marine litter in the Mediterranean and Black Sea, CIESM Workshop Monograph n°46: **Bacterial degradation of synthetic plastics** (Chapitre 5, partie 2.1.1).*

La dégradation biologique est en majeure partie réalisée par les microorganismes (essentiellement les bactéries) qui ont des capacités métaboliques extrêmement variées. Dans leur milieu naturel, les bactéries jouent un rôle « d'éboueur des océans » (organismes saprophytes) puisqu'elles reminéralisent la moitié du carbone organique qui provient des déchets de la chaîne alimentaire. En milieu marin, de nombreuses bactéries sont également spécialisées dans la dégradation des hydrocarbures (bactéries hydrocarbonoclastes), qui sont les composants majeurs des plastiques conventionnels. La capacité de dégradation de différents types de plastiques par les bactéries en condition de laboratoire est de plus en plus décrite dans la littérature, montrant une vaste diversité de bactéries capables de les dégrader (voir par exemple la revue de Shah *et al.* (2008)). On aperçoit ici l'enjeu environnemental des recherches actuelles visant à mieux étudier et caractériser la biodégradation des plastiques par les communautés bactériennes en milieu naturel. La dégradation biologique intervient après les différents processus abiotiques exposés en partie 3.1.1 Elle est composée de 4 étapes successives (Fig. 16).

1. La bio-détérioration est engendrée par l'action mécanique du biofilm bactérien qui se forme à la surface du plastique et qui va pouvoir agrandir les fissures déjà présentes (Bonhomme *et al.*, 2003). Une dégradation chimique peut également être orchestrée par la grande diversité des espèces présentes dans le biofilm, telle que la production de composés acides par les bactéries chimiolithotrophes et chimioorganotrophes.

2. La bio-fragmentation est l'action d'enzymes bactériennes libérées à l'extérieur de leurs cellules pour cliver les polymères plastiques en oligomères et monomères. Les oxygénases, par exemple, rendent les polymères de plastique plus hydrosolubles et donc plus facilement dégradables par les bactéries. Les lipases et les estérases attaquent spécifiquement les groupes carboxyliques et les endopeptidases les groupements amines. Différentes espèces bactériennes sont impliquées dans ce processus (Ghosh *et al.*, 2013). Très récemment, une étude a mis en évidence le rôle prédominant de cette étape en démontrant la disparition des grosses molécules oxydées de PE (à 10 ou 11 atomes d'oxygène) après 240 jours d'incubation avec la souche *Rhodococcus rhodochrous* (Eyheraguibel *et al.*, 2017) (Fig. 15).

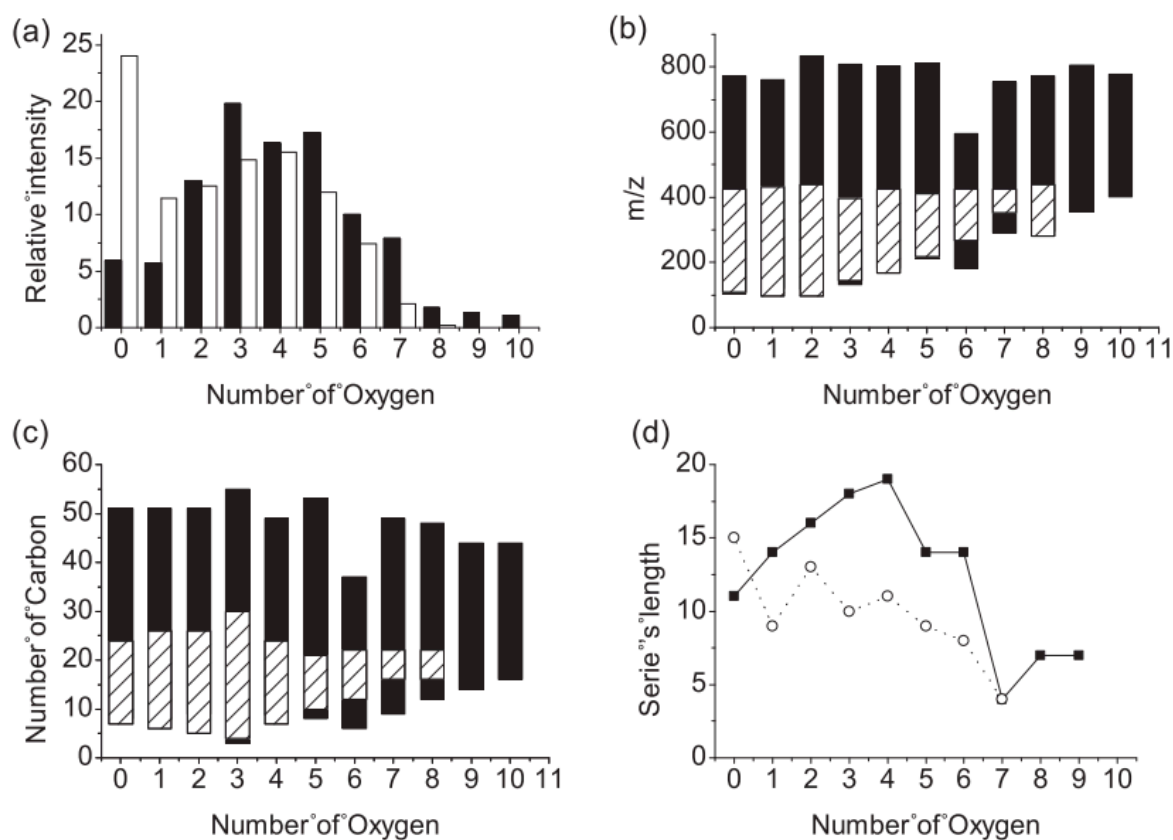


Figure 15: Proportion relative (%) et distribution des classes de composés extraits de l'eau à partir d'un film de HDPE avant (noir) et après biodégradation (blanc) (a). Répartition du rapport masse/charge des composés en fonction du nombre d'atomes d'oxygène par oligomère avant (noir) et après biodégradation (blanc rayé) (b). Evolution du nombre d'atomes de carbone par molécule par rapport au nombre d'atomes d'oxygène par molécule avant (noir) et après biodégradation (blanc rayé) (c). Evolution de la longueur de la série par rapport au nombre d'atomes d'oxygène par molécule avant (noir) et après biodégradation (blanc) (d).

(Eyheraguibel *et al.*, 2017)

3. L'assimilation consiste au transfert des molécules plastiques de taille $<600\text{Da}$ dans les cellules bactériennes et à leur transformation en composés cellulaires et en biomasse.

4. La minéralisation correspond à la dégradation complète du plastique en molécules oxydées (CO_2 , N_2 , CH_4 , H_2O).

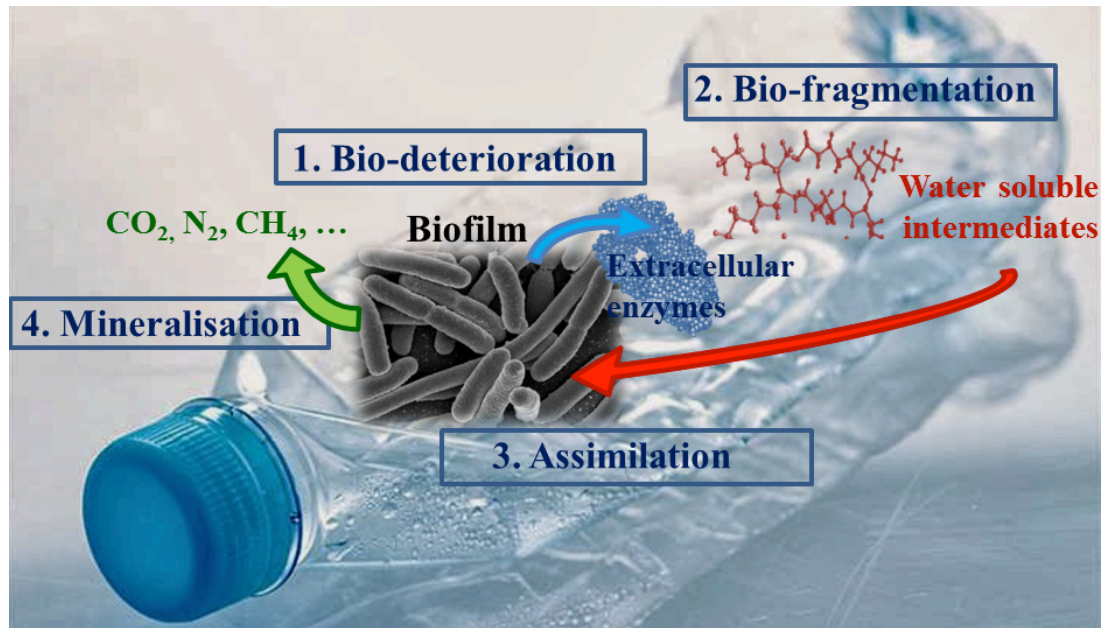


Figure 16: Etapes de biodégradation des plastiques en mer par les microorganismes. (Dussud and Ghiglione, 2014)

Des études ont démontré que la souche *Rhodococcus ruber* C208 incubée 30 jours sur du polyéthylène photo-oxydé conduisait à la formation d'un biofilm et contribuait à la perte de 8% du poids sec de plastique (Sivan, 2011). Plus récemment, l'équipe de Yoshida a caractérisé les voies enzymatiques utilisées par la souche *Ideonella sakaiensis* 201-F6 pour dégrader le PET (Yoshida *et al.*, 2016). Si d'autres exemples de ce type ont été rapportés dans la littérature, ces observations reposent néanmoins sur des études en condition de laboratoire qui utilisent une seule espèce bactérienne. Or, le processus en milieu naturel est certainement beaucoup plus complexe puisqu'il fait intervenir de nombreuses espèces bactériennes. Les communautés bactériennes qui colonisent les plastiques en mer sont de plus en plus étudiées (sujet traité en partie 4- de l'état de l'art).

3.3 Impacts écologiques

De par la grande diversité de taille des fragments plastiques, tout l'écosystème peut potentiellement être impacté (du zooplancton à la mégafaune), avec un transfert possible à différents échelons de la chaîne trophique. Les caractéristiques hydrophobes des polymères vont favoriser l'adsorption et la concentration de composés lipophiles, tels que les polluants organiques persistants (POPs) (Rios *et al.*, 2007). Les impacts potentiels causés par les débris plastiques en mer vont toucher les organismes marins, les habitats et écosystèmes, les activités économiques et la santé humaine et même peut-être les cycles biogéochimiques (Law *et al.*, 2017) (Fig. 17). Suivant la taille des fragments plastiques, les impacts sur le biota marin vont concerner des compartiments différents (mégafaune, macrofaune, microfaune). De très nombreuses études se sont penchées sur les interactions plastique/faune durant cette dernière décennie. L'état de l'art de Gall et Thompson (2015) sur ce sujet rapporte l'impact des déchets plastiques sur près de 700 espèces marines.

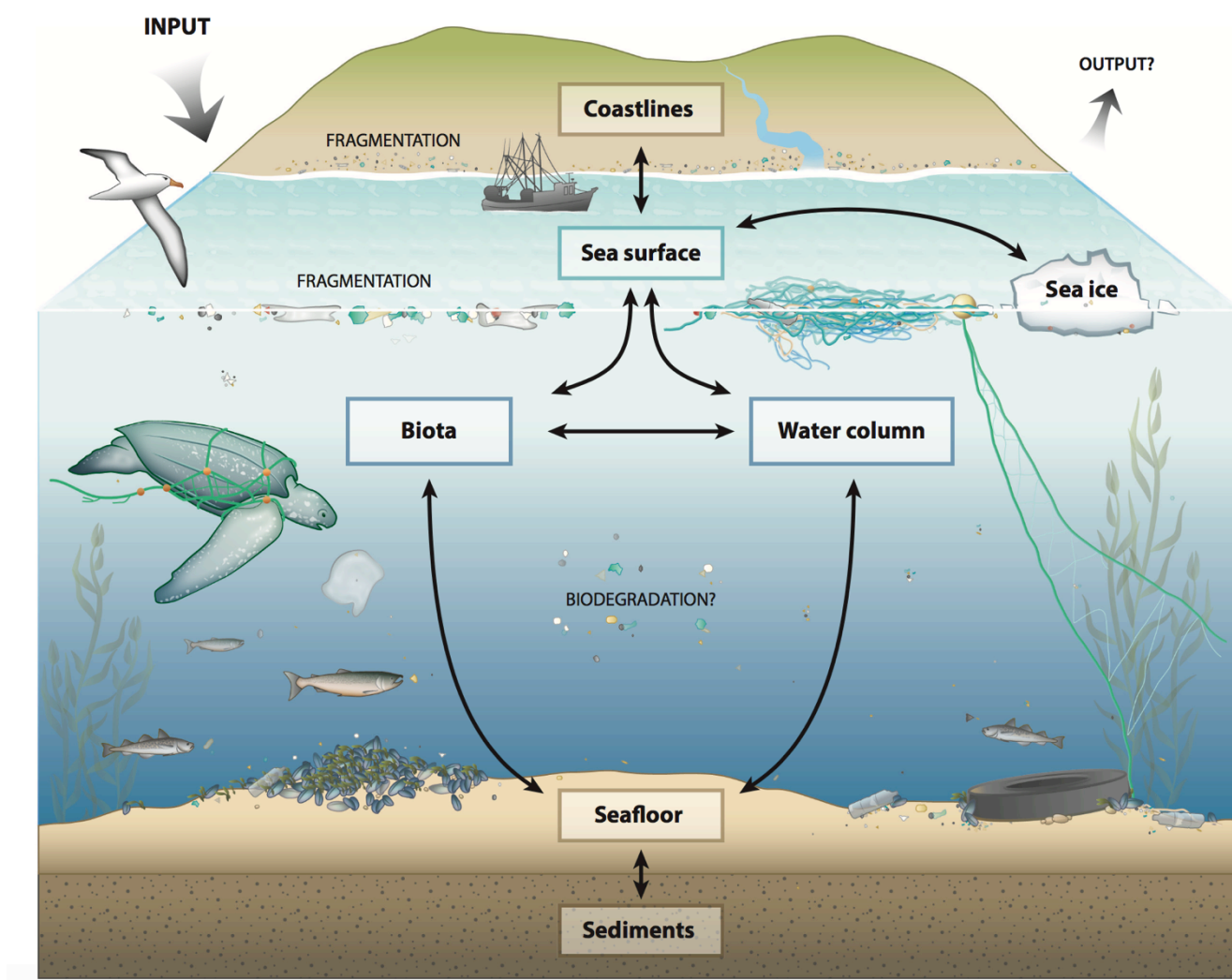


Figure 17: Schéma regroupant les différents réservoirs de débris plastiques. Les grosses flèches grises indiquent les flux entrants et sortants du milieu marin, en incluant la biodégradation potentielle des plastiques. Les flèches noires indiquent les échanges potentiels des plastiques entre les réservoirs. (Law, 2017)

3.3.1 A l'échelle de l'organisme

Sur la mégafaune

Les conséquences les plus connues et les plus marquantes de la pollution plastique en mer concernent les grands organismes : oiseaux, tortues, mammifères, poissons. Les principaux impacts recensés sont les cas d'étranglement (menant à des blessures, au piégeage et à la noyade), d'ingestion de débris (causant l'obstruction des voies digestives ou l'accumulation de matières indigestes dans l'estomac) (Rochman *et al.*, 2013, 2016; Law, 2017). Une étude récente s'est intéressée aux densités de macro et microplastiques dans les zones de nourrissage des baleines à bosses à l'intérieur d'une aire protégée en Méditerranée : le sanctuaire Pelagos (Baini *et al.*, 2017; Fossi *et al.*, 2017). Une forte concentration a été retrouvée et cette pollution menace les cétacés qui bioaccumulent les additifs (phthalates : DEHP et MEHP) dans leurs tissus (Fossi *et al.*, 2012). Avec leur grande espérance de vie, les baleines sont chroniquement exposées à ces contaminants persistants libérés lors de l'ingestion ou la dégradation des matières plastiques.

Sur la macro et microfaune

Les fragments plastiques de plus petites tailles affectent également les petits organismes. En 2012, Collignon et ses collaborateurs faisaient un constat alarmant : le ratio moyen entre le poids de microplastiques et celui de mesozooplancton est de 0,5 dans la zone Nord-Ouest de la Méditerranée (Fig. 18). Les prédateurs du zooplancton auraient donc un risque sur deux d'ingérer un fragment plastique à la place d'une proie ! En 2013, une étude fait l'état de l'art de l'impact des microplastiques sur les invertébrés et les vertébrés marins et conclue sur une contamination à tous les niveaux de la chaîne alimentaire (Wright *et al.*, 2013), bien que les effets toxiques indirects des MP restent à approfondir. Beaucoup d'expériences en laboratoire sont aujourd'hui réalisées pour comprendre l'impact néfaste de cette pollution. Par exemple, des huîtres soumises pendant 2 mois à des microbilles de polystyrène ont montré des diminutions significatives des capacités de reproduction (nombre et taille d'ovocytes diminués, vitesse moins importante des gamètes mâles, rendement larvaire plus faible, baisse de l'allocation de l'énergie pour la reproduction) et une modification des comportements alimentaires (Sussarellu *et al.*, 2016).

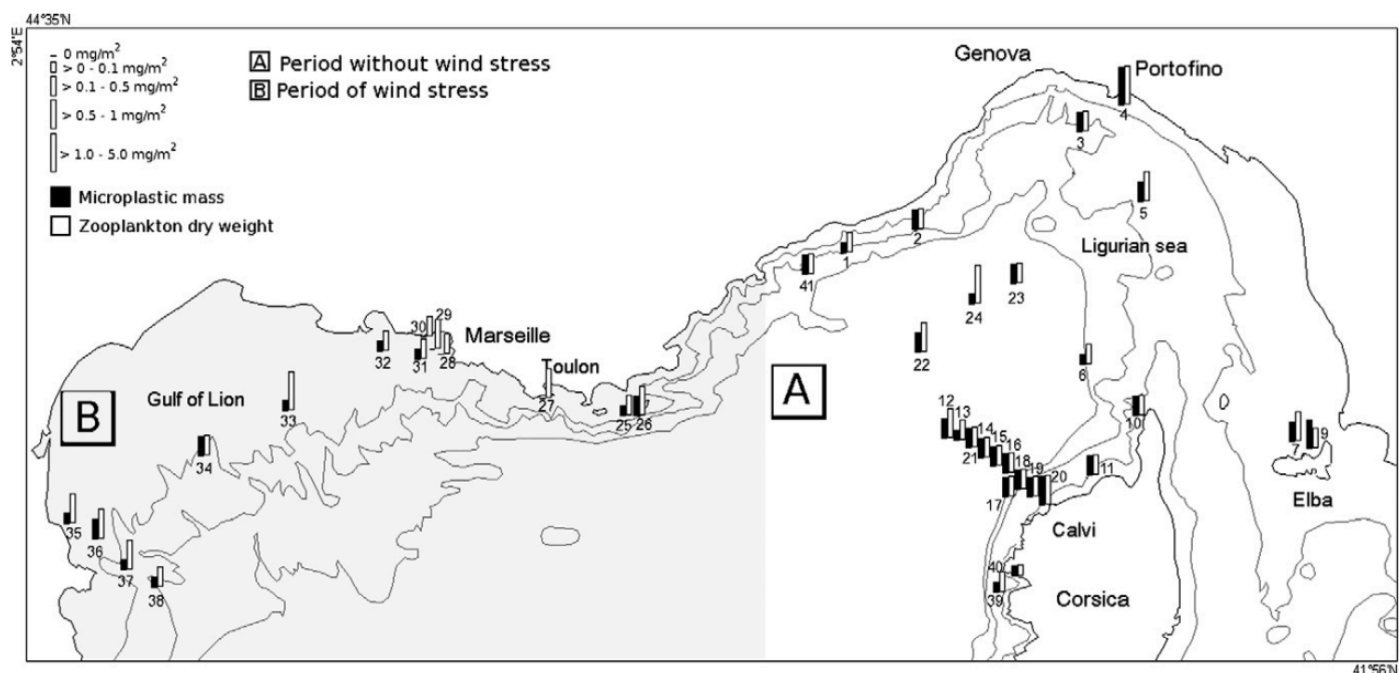


Figure 18: Distribution du zooplancton (poids sec) et de la masse de microplastiques (mg/m²) présents dans les échantillons de surface dans la zone Nord-Ouest Méditerranéenne. (Collignon *et al.*, 2012)

Les polluants organiques persistants (POPs) et additifs

Les MP sont capables de concentrer des POPs qui ont une plus grande affinité avec la surface hydrophobe de la matière qu'avec l'eau de mer environnante. Avec un rapport surface/volume élevé, les MP concentrent les contaminants jusqu'à 6 fois plus que l'eau (Hirai *et al.*, 2011; Mato *et al.*, 2000). Les MP représenteraient donc une voie d'exposition aux POPs via la bioaccumulation et la biomagnification dans les chaînes trophiques.

Les plastiques peuvent contenir eux-mêmes des composés chimiques potentiellement nocifs, qui sont sous forme d'additifs incorporés dans la matière. Ils sont destinés à améliorer les propriétés mécaniques, l'esthétique, la stabilité (chimique, UV, chaleur) et le prix de revient. 80% du marché des additifs concerne les polyoléfines, les styréniques et le PVC. Les phtalates (produits dérivés de l'acide phtalique) par exemple, font partie de ces additifs et sont facilement libérés dans le milieu puisqu'ils ne possèdent pas de liaisons covalentes avec le polymère qui les contient. Ils sont connus pour affecter les fonctions endocrines des organismes (Teuten *et al.*, 2009) et donc la viabilité des populations. Dernièrement, une équipe française a décrit une méthode analytique non invasive pour évaluer les concentrations

de sept phtalates en tant que traceurs d'exposition / ingestion de matière plastique par la faune marine (Baini *et al.*, 2017).

3.3.2 A l'échelle de l'écosystème

En plus des impacts chimiques et physiques, les déchets plastiques offrent un nouvel habitat pour les espèces s'accrochant à des substrats durs limités auparavant à des objets tels que le bois, les algues et la roche. Etant donné leur forte concentration, les déchets plastiques jouent le rôle de « radeaux artificiels » abondants en mer et de zones de recrutements larvaires. Ainsi, ils contribueraient grandement au transport d'espèces invasives qui entraînent de graves modifications des communautés (Molnar *et al.*, 2008). Ce processus commence à être bien décrit dans la littérature. On dénombre aujourd'hui 34 rapports faisant état de 259 espèces transportées via les plastiques, dont 6 sont identifiées comme invasives (Gall & Thompson, 2015).

4 Les bactéries et le plastique

Comme décrit dans la première partie de cet état de l'art, les bactéries sont retrouvées partout sur Terre et les surfaces plastiques ne font pas exception. Les premières observations de microorganismes sur des plastiques en mer ont été rapportées en 1972 par Carpenter *et al.* en mer des Sargasses (Carpenter *et al.*, 1972). Trois ans plus tard, l'ubiquité de communautés microbiennes sur des surfaces artificielles est décrite et observée par microscopie électronique à balayage (SEM) (Sieburth, 1975). Depuis, grâce aux avancées en biologie moléculaire, la présence d'une « plastisphère » a été mise en évidence (Zettler *et al.*, 2013) abritant des espèces bactériennes bien différentes de celles contenues dans l'eau de mer environnante.

Note : les différentes méthodes utilisées pour étudier la composition microbienne sur les plastiques dans le milieu marin sont rapportées dans le tableau récapitulatif 3.

4.1 L'observation du biofilm

Décrire le biofilm sur les déchets plastiques passe par l'observation en microscopie des cellules, essentiellement par SEM qui permet une illustration en trois dimensions des cellules. Les premières images datent de 1975 où déjà une grande variété de microorganismes étaient observés en SEM (diatomées, cyanobactéries filamenteuses et bactéries coques, (Fig. 19) (Sieburth, 1975). Aujourd'hui avec la même méthode mais avec une définition plus précise, les mêmes observations sont réalisées (De Tender *et al.*, 2017b). La SEM offre une visualisation détaillée de la structure morphologique des communautés et de leur répartition à la surface du plastique. Zettler *et al.* décrivent sur des MP (HDPE et PP) collectés en Atlantique Nord un biofilm non homogène plutôt organisé en agrégats avec majoritairement des bactéries filamenteuses, des bactéries rondes et des diatomées (Zettler *et al.*, 2013). L'étude rapporte également des signes de dégradation de la matière se manifestant par des craquelures et des trous en surface.

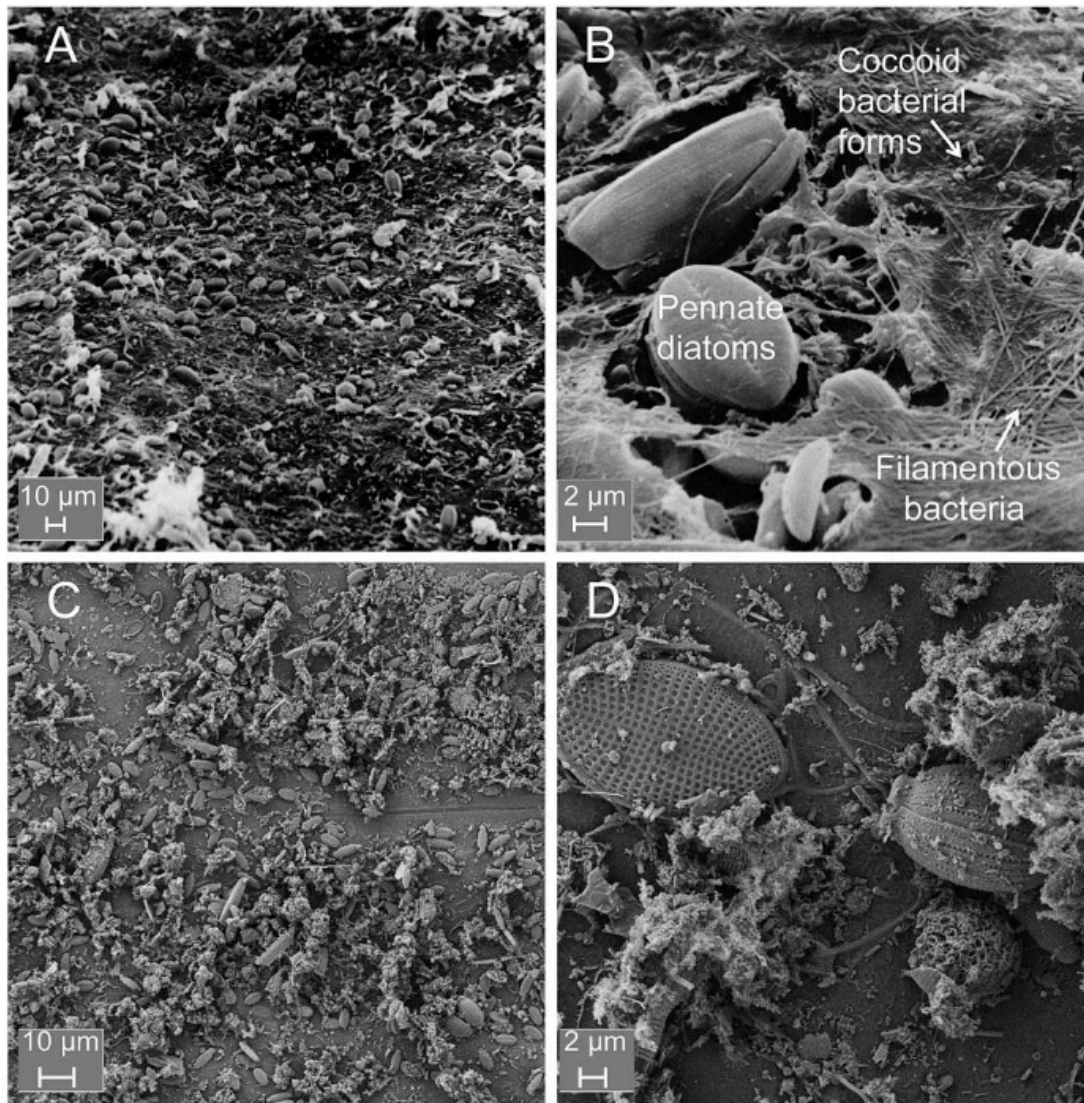


Figure 19: Photographies d'un biofilm sur du PE observé en microscopie à balayage. (A et B) Image à plus ou moins grande résolution d'un biofilm sur une bouteille (Sieburth, 1975). (C et D) Images d'un biofilm similaire observé sur un échantillon de PE dans les eaux aux alentours de Grenade (De Tender *et al.*, 2017b).

La microscopie à épifluorescence permet également de connaître la répartition des cellules à la surface des plastiques mais avec moins de détails (visualisation 2D). Cette technique permet de cibler certains groupes taxonomiques en utilisant des marquages spécifiques par sondes nucléotidiques (Fluorescence In Situ Hybridization FISH and CARD-FISH for CAtalyzed Reporter Deposition), ce qui permet d'observer sous microscope certains groupes taxonomiques. Une étude utilisant le CARD-FISH pour identifier certains groupes bactériens associés aux MP dans différents types de sédiments a pu identifier certains genres bactériens (*Arcobacter* et *Colwellia*) grâce à des sondes nucléotidiques-spécifiques (Harrison *et al.*, 2014). Cette technique demande en amont une connaissance des communautés

présentes pour utiliser la sonde adaptée, ce qui en limite l'usage pour évaluer la structure d'une communauté complexe sans *a priori*.

L'enjeu actuel des recherches repose sur la meilleure compréhension de la structure et l'activité des communautés naturelles sur les plastiques. Quelles espèces colonisent ces surfaces ? Quelle est l'activité bactérienne dans le biofilm en termes de quantité et de qualité ?

Les travaux cherchant à connaître la diversité bactérienne sur les plastiques à l'aide de nouvelles techniques moléculaires sont très récents (>2012) et n'ont cessé d'augmenter durant le cours de cette thèse (Fig. 20). Aujourd'hui, la majorité de ces études utilisent des approches de séquençage de nouvelle génération. Les premiers résultats obtenus par technique de séquençage de produits PCR sur des échantillons environnementaux ont été publiés en 2013 et ils ont démontré une distinction entre les communautés bactériennes de la « plastisphère » et celles de l'eau de mer environnante (Zettler *et al.*, 2013). Plus de 2000 unités taxonomiques opérationnelles (OTUs) ont été identifiées sur seulement 3 MP de PE et 3 MP de PP récoltés en Atlantique Nord (Fig. 21). Les études qui ont suivi ont confirmé une colonisation sur les surfaces plastiques par des communautés spécifiques comparées à celles de l'eau de mer environnante, mais aussi à celles du sédiment (Harrison *et al.*, 2014 ; Reisser *et al.*, 2014 ; Oberbeckmann *et al.*, 2016 ; De Tender *et al.*, 2017 ; Debroas *et al.*, 2017) (Tableau récapitulatif 3). Des familles clés de la primo-colonisation ont été identifiées (*Rhodobacterales*, *Rhizobiales*, *Cyanobacteria*, *Streptomyetales*) et généralement les clades des *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* et *Cyanobacteria* dominent sur les MP. Les auteurs rapportent parfois la forte présence d'espèces potentiellement pathogènes et insistent sur le danger d'accumulation et de transport de ces souches à travers l'écosystème (Zettler *et*

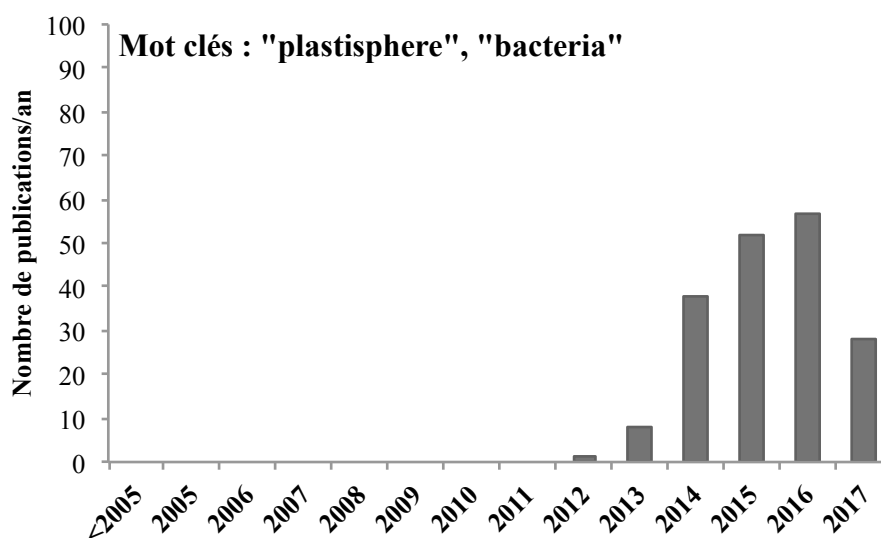


Figure 20: Nombre d'articles scientifiques par année de publication contenant les mots clés "plastisphere" et "bacteria".

al., 2013 ; De Tender *et al.*, 2017 ; Debroas *et al.*, 2017). Une seule étude à ce jour a utilisé une approche métagénomique (Bryant *et al.*, 2016) pour détecter les gènes fonctionnels exprimés dans le biofilm. Elle rapporte en particulier l'expression de gènes impliqués dans les systèmes de sécrétion suggérant un chimiotactisme surexprimé sur les plastiques et de gènes codant pour des activités de biodégradation de xénobiotiques.

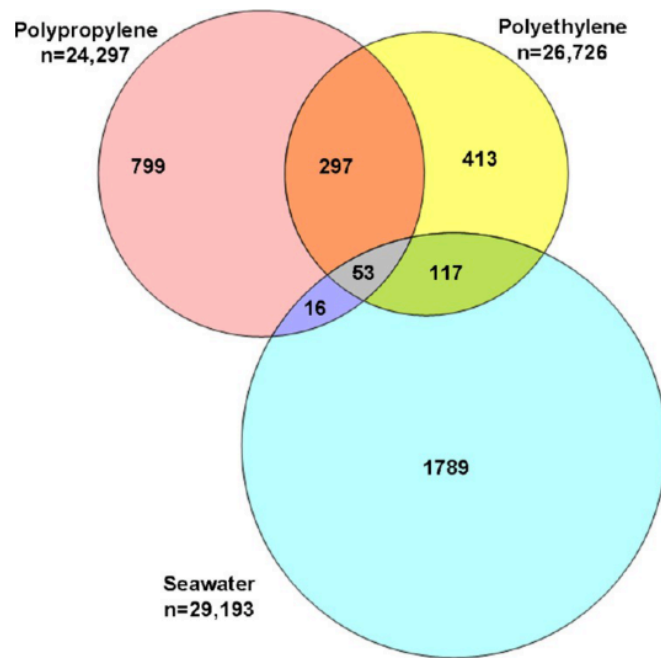


Figure 21: Diagramme de Venn représentant le nombre d'OTUs partagés ou non par le PP, le PE et l'eau de mer.
n = nombre de séquences par groupe.
(Zettler *et al.*, 2013)

Jusqu'à présent, la quantité de fragments plastiques analysés par séquençage (≤ 5 morceaux différents par type de plastique) reste trop faible pour généraliser les tendances observées. Cela dit la spécificité des communautés colonisant les déchets plastiques est rapportée dans chaque étude indépendamment de la zone géographique (Gyre du Pacifique Nord, Atlantique Nord, Mer du Nord) (Tab. 3). Cette thèse apporte une nouvelle étude sur les communautés bactériennes présentes sur un grand nombre de débris plastiques (72 fragments analysés) en mer Méditerranée collectés durant 7 mois lors de la mission Tara Méditerranée.

Méthode	Type plastique	Taille	Localisation	Référence
SEM	PE, PP	microplast	Atl. Nord	Zettler et al., 2013
	PE, PP, PS		Gyre Pac. Nord	Carson et al., 2013
	PE		Exp. En microcosmes	Harrison et al., 2014
	Inconnu		Côte Australienne	Reisser et al., 2014
	PE, PP, PS, PET, autres	macroplast	Pac. Nord et Atl. Nord	Zettler et al., 2015
	PE, plast biodeg		Mer Med.	Eich et al., 2015
AFM	PET		Mer du Nord	Oberbeckmann et al., 2016
	PET	macroplast	Port Australie	Webb et al., 2009
	PE		Oc. Indien	Sudhakar et al., 2008
Metabarcoding	PE, PP	microplast	Atl. Nord	Zettler et al., 2013
	PE, PP		Pac. Nord	Zettler et al., 2015
	PE		Côte Belge	De Tender et al., 2015
	PE, PS, PET	macroplast	Gyre Nord Atl.	Debroas et al., 2017
	PE		Côte Belge et port	De Tender et al., 2017
	PE, PP		Mer du Nord	De Tender et al., 2015
Métagénomique	PET	micro et macroplast	Mer du Nord	Oberbeckmann et al., 2016
	Inconnu		Gyre Pac. Nord	Bryant et al., 2016

Tableau 3: Récapitulatif des travaux scientifiques relatifs à l'observation et à la caractérisation du biofilm sur les déchets plastiques en mer en fonction du type de plastique et de la localisation.

4.2 Les étapes de colonisation des plastiques en mer

Pour comprendre les interactions complexes entre les microorganismes du biofilm et les matières plastiques, il est nécessaire de décrire les processus d'attachement des cellules sur les surfaces. On sait qu'en quelques secondes un film « conditionnant » de molécules organiques et inorganiques se forme sur n'importe quelle surface en milieu marin (Loeb and Neihof, 1975). Ensuite, les microorganismes entrent en contact avec la surface grâce aux forces attractives entre les membranes cellulaires et le film de biomolécules. Selon sa composition et ses propriétés de surface ce dernier conditionnerait la communauté colonisatrice sur le polycarbonate (Jones *et al.*, 2007).

Les mécanismes universels de formation d'un biofilm sont dépendant de divers paramètres physico-chimiques, énoncés dans la partie I.1.4, qui s'appliquent également aux surfaces plastiques. Sur les polymères, des études tentent de définir le rôle de ces paramètres dans l'attachement des cellules bactériennes en milieu marin. L'importance de la nature chimique et de l'énergie de surface du plastique dans les premiers stades de formation du biofilm est rapportée (Artham *et al.*, 2009). Le rôle de l'hydrophobicité et celui de la rugosité

sont aussi mal connus et les résultats publiés dans la littérature sont contradictoires. Certains travaux observent une corrélation positive de la rugosité avec le développement du biofilm sur du PS, PP, PE, PVC (Pompilio *et al.*, 2008; Lakshmi *et al.*, 2012), alors que d'après Artham *et al.* (2009), la rugosité possède une forte influence négative sur le biofouling sur du PE et PP. Nauendorf *et al.* (2016) rapporte une plus forte corrélation entre le développement bactérien et la rugosité qu'avec la propriété hydrophobe de sacs en PE et polymère biodégradable.

La grande variabilité des matières plastiques (composition chimique, additifs) affecte la diversité bactérienne qui les colonise (Restrepo-Flórez *et al.*, 2014), mais il n'est pas encore possible de donner des conclusions claires quant aux paramètres favorisant ou non le développement d'un biofilm bactérien. Effectivement, en fonction des études, la colonisation est observée avec différentes espèces en décrivant des caractéristiques physicochimiques sur des polymères différents.

Des travaux complémentaires sont donc nécessaires pour déterminer dans quelle mesure les paramètres environnementaux, qu'ils soient chimiques ou physiques, impactent sur le biofouling des déchets plastiques en mer.

Même si les facteurs qui dictent l'adhésion cellulaire sur les plastiques restent mal estimés, les mécanismes d'attachement des cellules sont certainement proches de ceux décrits sur d'autres surfaces. Ils regroupent un grand nombre de stratégies adaptatives (Hori and Matsumoto, 2010) notamment l'adaptation de la membrane (charges de surface, pili, fimbriae, flagelles, production d'EPS). Une fois les cellules primo-colonisatrices en place, les propriétés de surface initiales sont modifiées, ce qui favorise l'adhésion d'autres bactéries selon Lobelle et Cunliffe (2011). Les étapes classiques de la création d'un biofilm (exposées en partie 1.3) sont alors observées et elles ont été également énoncées sur les plastiques (Dang and Lovell, 2000; Webb *et al.*, 2009; De Tender *et al.*, 2017a). Une étude récente observe une succession de communautés sur du PE en milieu benthique côtier, suggérant une sélection spécifique de certaines espèces bactériennes (Harrison *et al.*, 2014). Deux ans plus tard, les résultats d'une étude sur du PET (comparé à du verre) ont suggéré que la structure des communautés microbiennes n'est pas dépendante du type de substrat (Oberbeckmann *et al.*, 2016).

Les parties II et IV de ce manuscrit présentent les résultats d'expériences en microcosmes sur les cinétiques de colonisation bactériennes de 10 polymères (conventionnels et biodégradables) en milieu marin. Cette étude a permis ainsi d'étoffer les connaissances sur les processus physico-chimiques qui gouvernent les premiers stades de colonisation.

5 Les objectifs de la thèse et organisation du manuscrit

A travers l'état de l'art qui vient d'être réalisé ici, nous avons pu constater que la recherche dans le domaine de la pollution par les déchets en milieu marin s'est largement développée depuis ces dix dernières années. L'analyse plus poussée sur les communautés microbiennes vivant à la surface des plastiques est, quant à elle, plus récente et elle a largement été étendue durant le cours de cette thèse. Du fait de la relative émergence de ce sujet d'étude, les articles à ce sujet sont souvent restreints à un type de plastique en particulier (généralement des polymères conventionnels comme le PE ou le PET), à des études en conditions contrôlées de laboratoire ou bien à des analyses basées sur des prélèvements en milieu naturel réalisées sur peu d'échantillons dont on ne connaît pas le temps de résidence dans le milieu. La grande variété de polymères ainsi que des milieux naturels où ils sont échantillonnés conduisent à des résultats variables, expliqués par la complexité des processus en jeu dans le phénomène de colonisation des déchets plastiques en mer. Cette variabilité réside dans la diversité génétique et métabolique des microorganismes colonisateurs ainsi que dans les différents facteurs environnementaux qui affectent la matière plastique mais aussi les communautés bactériennes.

On voit ici tout le challenge que représente ce sujet d'actualité, qui doit définir un processus biologique tout en prenant en considération les interactions complexes avec le substrat et les facteurs environnementaux. Une meilleure caractérisation de la colonisation bactérienne des déchets plastiques marins permettra une meilleure évaluation du risque causé par la pollution plastique sur les écosystèmes, mais aussi une meilleure compréhension dans la capacité des microorganismes à biodégrader ces matières artificielles et persistantes. En effet, avant de chercher à prouver une biodégradation des plastiques il est nécessaire de connaître les processus de colonisation ainsi que la structure et le fonctionnement de la « plastisphere ». Ce sujet entre également dans la thématique également en émergence de l'écotoxicologie microbienne, qui est un domaine de la science qui évalue à la fois l'impact des polluants sur les microorganismes, et inversement le rôle des microorganismes sur l'écodynamique des polluants en milieu naturel (Ghiglione *et al.* 2016).

Les différents chapitres de cette thèse ont comme objectif commun d'apporter de nouvelles connaissances sur les communautés bactériennes qui se développent à la surface des morceaux de plastique en milieu marin. Le manuscrit s'articule autour de trois articles scientifiques et de deux « reviews » acceptés, soumis ou en préparation visant à étoffer les

connaissances actuelles sur le sujet. A travers une étude *in situ* (chapitre 2) et deux suivis en microcosmes (chapitres 3 et 4), les questions centrales suivantes ont servi de fil conducteur de cette thèse :

- * Les communautés bactériennes retrouvées sur les plastiques en mer sont-elles comparables en diversité et en abondance à celles des fractions attachées à la matière organique ou libre dans l'eau de mer environnante ? (Chapitre 2, Article 2)
- * Quelle est la cinétique de colonisation microbienne sur les substrats plastiques ? (Chapitre 3, Article 3)
- * Quelle est l'activité du biofilm sur les plastiques par rapport à celle de l'eau de mer environnante ? (Chapitres 3 et 4, Articles 3 et 4)
- * Existe-t-il des différences en termes de communautés bactériennes et de processus de colonisation entre différents types de polymères (conventionnels ou « biodégradables ») ? (Chapitres 3 et 4, Articles 3 et 4)
- * Quels sont les changements physico-chimiques qui s'opèrent à la surface des polymères ? (Chapitres 3 et 4, Articles 3 et 4)

Chapitre 2

Des communautés bactériennes spécifiques sur les déchets plastiques en mer Méditerranée



© Sharif Mishak, Noe Sardet/Tara Méditerranée

Chapitre 2 Article n°1

1. Préambule

L'expédition Tara Méditerranée

Par ses caractéristiques géographiques et climatiques, la Méditerranée abrite près de 8 % de la diversité biologique marine, même si elle ne représente que 0,8 % de la surface de l'Océan. Aujourd'hui, la Méditerranée concentre 30% du trafic maritime mondial et abrite de nombreuses mégapoles. Les difficultés liées aux pollutions venant de la terre se multiplient et mettent sous pression l'écosystème marin, essentiel pour les populations et pour la vie en général. Parmi ces pollutions, la présence croissante de micro-plastiques dans la mer et sa probable incorporation dans la chaîne alimentaire, et donc dans nos assiettes, pose question. Il est urgent de proposer des solutions concrètes comme l'assainissement des eaux, la gestion des déchets, l'innovation pour un plastique biodégradable, la promotion du tourisme durable ou la création d'Aires Marines Protégées préconisées depuis des décennies par la Convention sur la Diversité Biologique de l'ONU ainsi que par l'Union Européenne.

L'expédition Tara-Méditerranée, la dixième pour la goélette Tara depuis 2003, a été l'occasion pour la Fondation Tara Expéditions de promouvoir les efforts d'associations locales et régionales sur les nombreux enjeux environnementaux liés la pollution par les déchets en Méditerranée, la *Mare Nostrum*, traduite littéralement comme « notre Mer ».

Durant 7 mois (Avril à Novembre 2014), la goélette Tara a sillonné la mer Méditerranée pour évaluer l'étendue globale de la pollution par les déchets plastiques (Fig. 22). L'expédition Tara-Méditerranée avait comme objectifs de dénombrer les MP en surface (à l'aide d'un filet Manta, Fig 22), de comparer les valeurs de concentration à celles du zooplankton, de caractériser les communautés microbiennes présentes à leur surface (objectif faisant l'objet du premier article présenté dans ce manuscrit de thèse) et de définir la quantité et la qualité des polluants adsorbés (plus de détails sont donnés sur le site de Tara Expéditions : <http://oceans.taraexpeditions.org/m/qui-est-tara/les-expeditions/tara-mediterranee/>). L'article scientifique associé à l'expédition est présenté dans ce chapitre sera la première publication scientifique issue de l'expédition Tara-Méditerranée.



2. Article n°1 : Evidence of niche partitioning among bacteria living on plastics, organic particles and surrounding seawaters

Submitted may 2017, Environmental Pollution

Dussud C¹, Meistertzheim AL¹, Conan P¹, Pujo-Pay M¹, George M², Fabre P², Coudane J³, Higgs P⁴, Elineau A⁵, Pedrotti ML⁵, Gorsky G⁵, Ghiglione JF^{1*}

¹Sorbonne Universités, CNRS, UPMC Univ Paris 06, UMR 7621, Laboratoire d'Océanographie Microbienne, Observatoire Océanologique de Banyuls, Banyuls sur mer, France

²Laboratoire Charles Coulomb (L2C), Univ. Montpellier, CNRS, Montpellier, France.

³Institut des Biomolécules Max Mousseron, CNRS UMR5247, Université de Montpellier, Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Montpellier, BP 14491, F-34093 Montpellier cedex5

⁴Symphony Environmental Ltd, Borehamwood, Hertfordshire WD6 1JD, UK.

⁵Sorbonne Universités, CNRS, UPMC Univ Paris 06, UMR 7093, Laboratoire d'Océanographie de Villefranche, Villefranche sur mer, France

***Corresponding author:**

JF Ghiglione, Laboratoire d'Océanographie Microbienne, Observatoire Océanologique de Banyuls, Avenue Fontaulé, F-66650 Banyuls/mer, France. Tel.: + 33 (0) 4 68 88 73 16. E-mail address: ghiglione@obs-banyuls.fr

Note : légendes des figures à la fin de la publication.

Abstract

The Mediterranean Sea is one of the most plastic-polluted zone and offer a unique opportunity to test the hypothesis of bacterioplankton partitioning between free-living (FL), organic particle-attached (PA) and the recently introduced plastic marine debris (PMD). The large set of samples taken during the *Tara*-Mediterranean expedition revealed for the first time a clear niche partitioning between the three co-occurring communities and marked originality in the PMD fraction. Bacterial counts in PMD presented higher cell enrichment factors than generally observed for PA fraction, when compared to FL bacteria in the surrounding waters. Taxonomic diversity was also higher in the PMD communities, where higher evenness indicated a favorable environment for a very large number of species. *Cyanobacteria* were particularly overrepresented in PMD, together with essential functions for biofilm formation and maturation. The consistent distinction of community structure between the three lifestyles, that exceeded the large-scale geographical variation in the Western Mediterranean basin, support a new trade-off for the maintenance of a large diversity of bacterioplankton in the Oceans. ‘Plastic specific bacteria’ recovered only on the PMD represented half of the OTUs, thus forming a distinct biota that should be further considered for understanding microbial biodiversity in changing marine ecosystems.

Keywords: microbial ecotoxicology, plastisphere, biofouling

Capsule: This study is the first description of bacterial abundance and diversity on plastic marine debris (PMD) in the Mediterranean Sea; it describes PMD as a particular biota for marine bacteria compared to particle-attached and free-living fractions in surrounding waters.

Introduction

Plastic litter have become the most common form of marine debris and a growing global pollution concern, affecting marine ecosystems and economic activities (Gregory, 2009). The discovery of five large-scale accumulation areas of floating PMD in the subtropical ocean gyres has captured worldwide attention, which often refers to these zones as “great garbage patches” (Cózar *et al.*, 2014; Eriksen *et al.*, 2014). These accumulation areas are dominated by plastic pieces, mainly smaller than 5 mm, commonly referred to as “microplastics” (Andrady, 2011; Law and Thompson, 2014). Recent studies have demonstrated that the Mediterranean Sea can be regarded as another great accumulation region with average concentration of more than 200 000 items km⁻², comparable to subtropical oceans gyres (Lebreton *et al.*, 2012; Pedrotti *et al.*, 2016). The accumulation of floating plastic in the Mediterranean Sea is explained by the high human density pressure together with the hydrodynamics of this semi-enclosed basin with residence time of 70 years (Durrieu de Madron *et al.*, 2011).

Bacterioplankton represent the most abundant organisms in seawater where they are also the main actors of nutrient regeneration and carbon cycling by converting organic matter to biomass, which supplies microbial food webs and transfers carbon and energy to higher trophic levels (Gasol *et al.*, 2008). Dissolution and degradation of 75% of the organic particles sinking to the sea floor revealed the key role played by PA bacteria in the regulation of the carbon storage by the Oceans (Farooq and Malfatti, 2007; Mével *et al.*, 2008). Particulate organic carbon and more precisely “phycospheres” and “detritospheres” represent micro-patches of concentrated substrates that are hot spots for pelagic bacterial processes (Ghiglione *et al.*, 2009). PA bacteria differ from the surrounding FL fraction in many aspects, including cell abundance, morphology, diversity and metabolic activities (Pulido-Villena *et al.*, 2014; Simon *et al.*, 2002). Microplastics may be considered as new particles recently

introduced within the last 60 years in the Oceans, which offer novel habitats for bacteria and enhance their dispersal over long ways by drifting with currents and winds (Lebreton *et al.*, 2012). Recently, Zettler *et al.* (2013) introduced the term “plastisphere” to describe the very diverse PMD-associated microorganisms, which were found in the seawater sub-surface to differ from the surrounding FL bacteria. Seafloor plastisphere was also found to be genetically unique from the FL water-column bacteria and in addition, they were distinct from the sediment communities in the North Sea (De Tender *et al.*, 2015).

The purpose of this study was first to test the hypothesis of the existence of specific communities associated to PMD particles compared to the PA bacteria. This question is not trivial since any surfaces exposed to seawater are rapidly colonized by bacteria and generally form biofilms (Siboni *et al.*, 2007; Lobelle and Cunliffe, 2011). Because the few studies so far on floating microplastics collected at Sea only compared the PMD to FL bacteria (Zettler *et al.*, 2013, 2015), the question of the existence of a ‘plastic-specific’ community in contrast to the PA fraction is still open. Here, we provide microscopic counts together with a large dataset of 16S metabarcoding of bacteria living in the PMD, PA and FL fractions collected during the *Tara*-Mediterranean expedition. We also used a computational approach to predict the potential functional differences between the three communities. Finally, we investigated the influence of the location-dependent environmental factors together with the plastic-related properties as potential drivers of the plastisphere characteristics.

Materials and methods

Plastic and surrounding seawater sampling

Samples were taken during the *Tara*-Mediterranean expedition (April-November 2014) aboard the RV *Tara*. PMD were recovered from 32 manta trawls (mesh size 333 μm) carried out in the Western Mediterranean Sea (Figure 1). A subset of these fragments was sorted with sterilized forceps, rinsed with sterile seawater and immediately frozen for further physical, chemical and bacterial diversity analysis. For microscopic observations, PMD were fixed for at least 20 min at room temperature with 2% (v/v) glutaraldehyde (final concentration) before freezing. A conductivity-temperature-fluorescence-depth profiler (CTD – SeaBird SBE 19) was deployed at each of the 32 stations, together with Niskin bottle for surface seawater collection. A fractionation procedure was performed onboard in one step for 2 L seawater sequential filtration through 3 μm -pore size (PA fraction) and 0.2 μm -pore size (FL fraction) polycarbonate filters (47mm diameter, Nucleopore) using a peristaltic pump (pressure <100 mbar) and filters were subsequently frozen until further DNA extraction, as previously described (Ghiglione et al. 1999).

Physical and chemical characterization of the PMD

The one-dimensional area of the surface, the major length and circularity of the individual PMD were determined using ZooScan system (Hydroptic Ltd., EMBRC France) (Gorsky *et al.*, 2010). Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) analysis was performed on the individual PMD using Spectrum 100 equipped with an ATR attenuated total reflectance (Perkin-Elmer) and compared to references for identification of the nature of the polymer. Carbonyl index values were determined as the ratio of the peak intensity at $1,715\text{ cm}^{-1}$ to the peak intensity at $1,460\text{ cm}^{-1}$, as previously described (Selke *et al.*, 2015).

Microscopic observations

Bacteria were enumerated on 70 plastic pieces sampled at 22 stations (from 1 to 4 pieces per manta, when microscopic observation was possible) by epifluorescence microscopy using an Olympus AX-70 PROVIS after 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining. The covering of the surface area of the plastic by bacterial cells was determined using Image J software. Cell enrichment factors were calculated by the ratio between bacterial counts in PMD and in the FL fraction, brought forward to a same volume of 1 mm^{-3} when considering a mean PMD thickness of $100 \mu\text{m}$.

For qualitative assessment of biofilm structure, a random collection of 8 samples was chosen for scanning electron microscopy (SEM) using Inspect S50 (FEI, Hillsboro, OR, USA), as described previously (Zettler *et al.*, 2013). Some of the samples were also analyzed by atomic force microscope (AFM) to get more resolved insight of the surface, using a Nanoscope V in dynamic mode (Bruker instruments, Madison, WI, USA) and standard silicon probes (Bruker, TESP-V2) (Binnig and Quate, 1986).

DNA extraction and next-generation sequencing

DNA was extracted from 72 PMD and from all the $3 \mu\text{m}$ - and $0.2 \mu\text{m}$ -pore size filters from surrounding seawater from each of the 32 stations. Between 2 and 4 plastic fragments were extracted separately at each station to evaluate intra-site variability. DNA extraction followed a classical phenol-chloroform-based protocol (Ghiglione *et al.*, 1999) with an additional sonication step (3 x 5 sec with 30% amplitude, Branson SLPe) for a better disruption of the biofilm. The molecular size and the purity of the DNA extracts were analyzed by agarose gel electrophoresis (1%) and the DNA was quantified by spectrophotometry (GeneQuant II, Pharmacia Biotech). Primers for PCR amplification of the 16S V3–V5 region were 515F-Y and 926R, particularly well-suited for marine samples according to Parada *et al.* (2016), with

Illumina-specific primers and barcodes. Sequencing was performed on an Illumina MiSeq by Research and Testing Laboratories (Lubbock, TX). Raw FASTA files were deposited at GenBank under the accession number SRP102645. Paired raw reads were joined, quality-filtered and assigned to taxa using Qiime pipelines, as previously described (Severin *et al.*, 2016). Operational taxonomic units (OTUs) were defined as clusters sharing 97 % sequence identity. Only Bacteria were treated in this study, due to the small number of Archaea reads. Bacterial sequences were randomly resampled in the OTU file to enable comparison between samples, by normalizing the number of sequences between samples to the sample with the fewest sequences (n=8,541) using MacQiime 1.9.0 (single_rarefaction.py). All further analyses were performed on the randomly re-sampled OTU table.

Statistical analysis, diversity assessment and predictive metagenome analysis

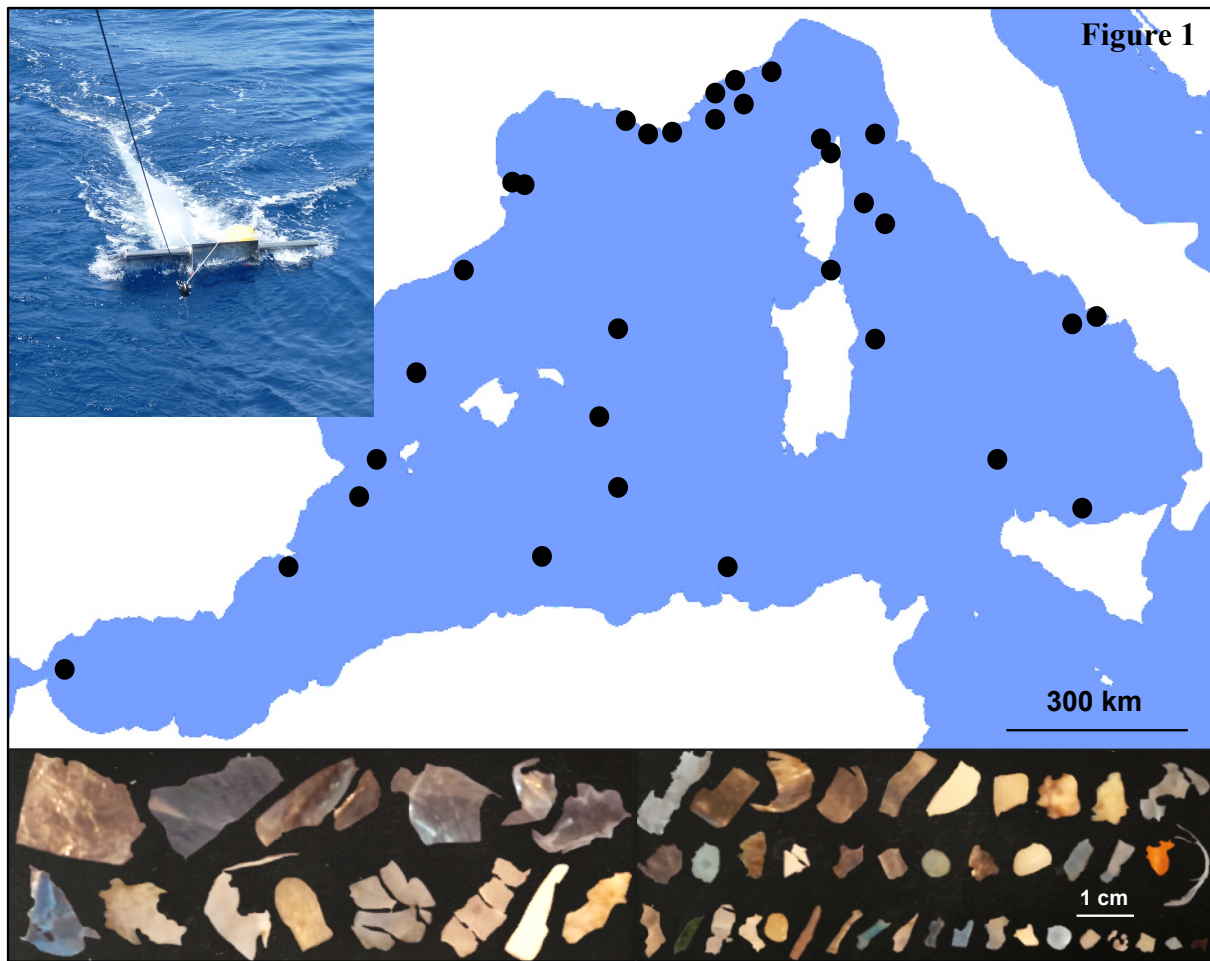
Alpha diversity was estimated by non-parametric Chao1 species richness estimator using SPADE software; together with Simpson, Shannon and Pielou diversity indexes using PRIMER 6 (PRIMER-E, UK). Differences between FL, PA and PMD richness and diversity indexes were tested using non-parametric Kruskal-Wallis test (R software). Nonmetric multidimensional scaling (NMDS) was used for visualization of beta-diversity based on Bray-Curtis similarities. One-way analysis of similarity was performed on the same distance matrix (ANOSIM, PRIMER 6) to test the significant difference and to partition the variance of the beta-diversity matrix between FL, PA and PMD. We performed a PICRUSt analysis to obtain a predictive functional profile of the bacterial communities, calculated by linking individual species to metabolic functions. The mean of Nearest Sequenced Taxon Index (NSTI) had a score of 0.08 ± 0.03 , thus indicating a reliable estimation of the predictions for our samples (Langille *et al.*, 2013). We identified the OTUs or the functions primarily responsible for dissimilarities between pairs of FL, PA and PMD groups using similarity percentage analysis

(SIMPER, PRIMER 6). To investigate the relationships between bacterial community structure and environmental parameters, we used a direct multivariate gradient approach, i.e., a canonical correspondence analysis (CCA) using the software package CANOCO 4.5, as previously described (Berdjeb *et al.*, 2011). Spearman rank pairwise correlations between the environmental variables helped to determine their significance. We used a Monte Carlo permutation full model test (199 permutations) to statistically evaluate the significance of the canonical axes. Explanatory variables were determined first by using a forward-selection procedure (999 permutations) and second, by successive addition of variables until it failed to contribute significantly ($p < 0.05$) to a substantial improvement of the model.

Results

PMD characterization and environmental parameters

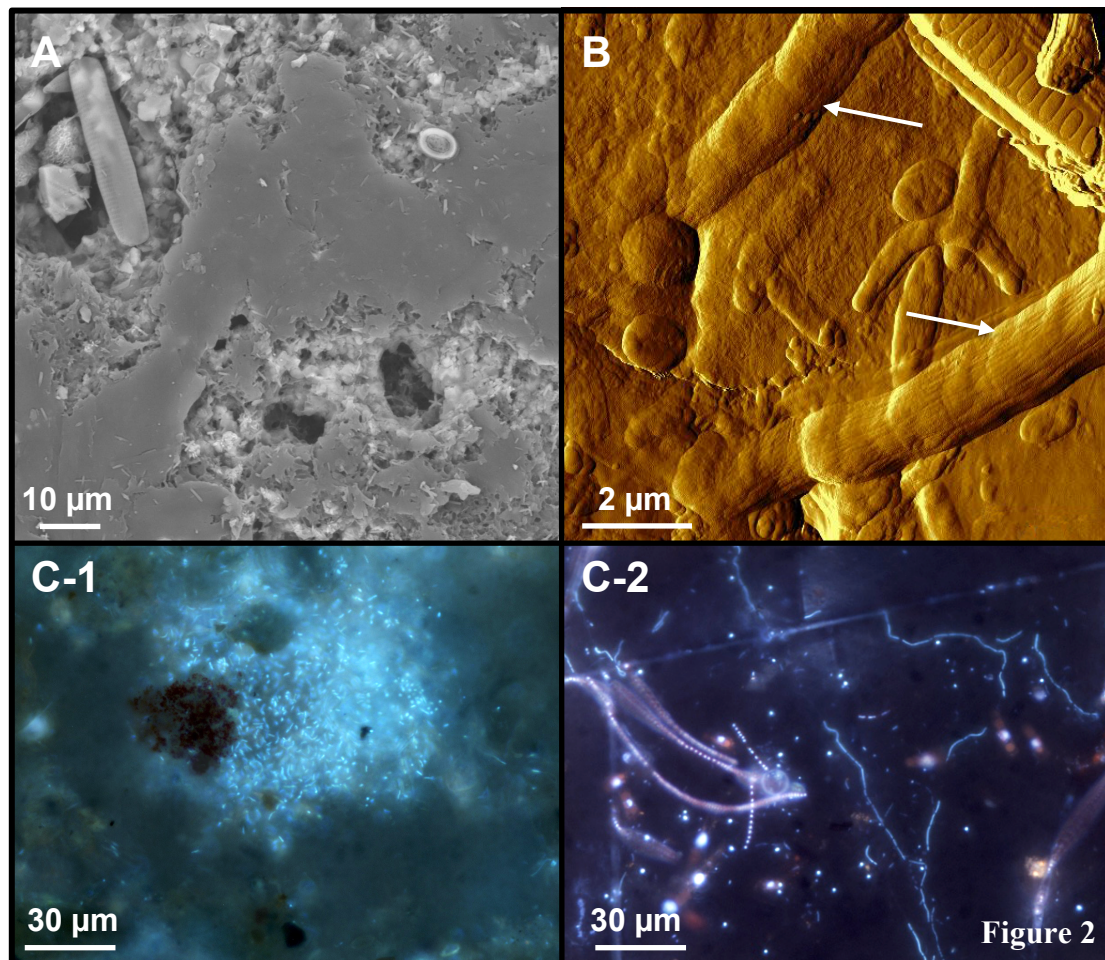
We visually selected 80 PMD in order to get between 2 to 5 pieces for each of the 32 Manta trawls. The size, shape, color, composition and oxidation state were determined for all pieces (Suppl. Table 1). The pieces showed varied shapes like filaments, pellets or sheets with about 46% transparent, 28% white and 12.5% colored (Figure 1). Zooscan analysis showed that the pieces were on average of 9.3 mm in size ($SD=4.7$). Ranging from 2.8 to 23.8 mm, most of the pieces did not correspond exactly to the arbitrary limit of microplastics (size < 5 mm), but were representative of the majority of PMD recovered in all manta nets. The shape of the pieces, as depicted by the contour circularity, ranged between 0.05 and 0.75 (mean=0.39, $SD=0.14$). FTIR analysis revealed that polyethylene (PE) dominated the composition in the 80 plastic pieces (72.2%), followed by polypropylene (PP) (18.0%), polystyrene (PS) (2.8%) and others, mainly dominated by composite plastics (7.0%). The mean carboxyl index (COi) was on average 15.3% ($SD=12.5\%$; min=1.6% and max=93.2%, both extreme values reached in PE pieces) with more than 8% of PMD presenting higher degree of oxidation ($> 25\%$).



Bacterial abundance on PMD

Inspection of 72 plastic pieces from 20 manta trawls by epifluorescence microscopy revealed that most of the samples were highly colonized by bacteria (Figure 2). Bacterial counts were on average 4.4×10^4 cells mm^{-2} ($\text{SD} = 3.7 \times 10^3$). It corresponded to an average enrichment factor of 888 ($\text{SD} = 731$, $\text{min}=80$ and $\text{max}=3748$) compared to the FL bacteria in surrounding waters, when considering the same volume. Variation in cell density (between 1.1×10^3 and 1.9×10^5 cells mm^{-2}) could not be statistically correlated to PMD characteristics (surface, shape) or environmental parameters (distance to the coast, temperature, salinity and chlorophyll *a* of the surrounding water). A large variety of morphotype was observed (Figure 2), including coccus-, rod- and spiral-shaped cells with a large number of cells with

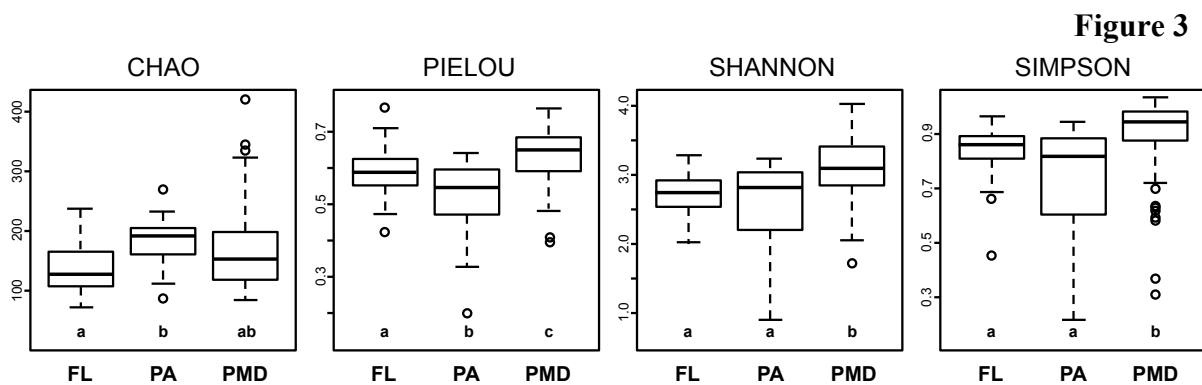
prosthecae and long filaments together with cells with pili and flagella. We often observed Cyanobacteria, such as *Calothrix sp.* frequently embedded in an amorphous mass of *Pleurocapsa sp.* cells. Often occurring in rows or patches, bacteria were non-uniformly distributed on the plastic surface, covering between 0 and 3.5% of the surface area of the plastic. Other eukaryotic organisms were observed on plastics, mainly diatoms and more randomly dinoflagellates, fungi and bryozoans, but were not further considered in this study. All plastics showed signs of degradation, including cracks and pitting hosting numerous organisms, as shown by scanning electron microscopy (SEM) and atomic force microscopy (AFM) (Figure 2).



Diversity indexes of PMD colonizers compared to FL and PA fractions

Next-generation DNA sequencing resulted in 1,135,953 sequences tags falling into 1,340

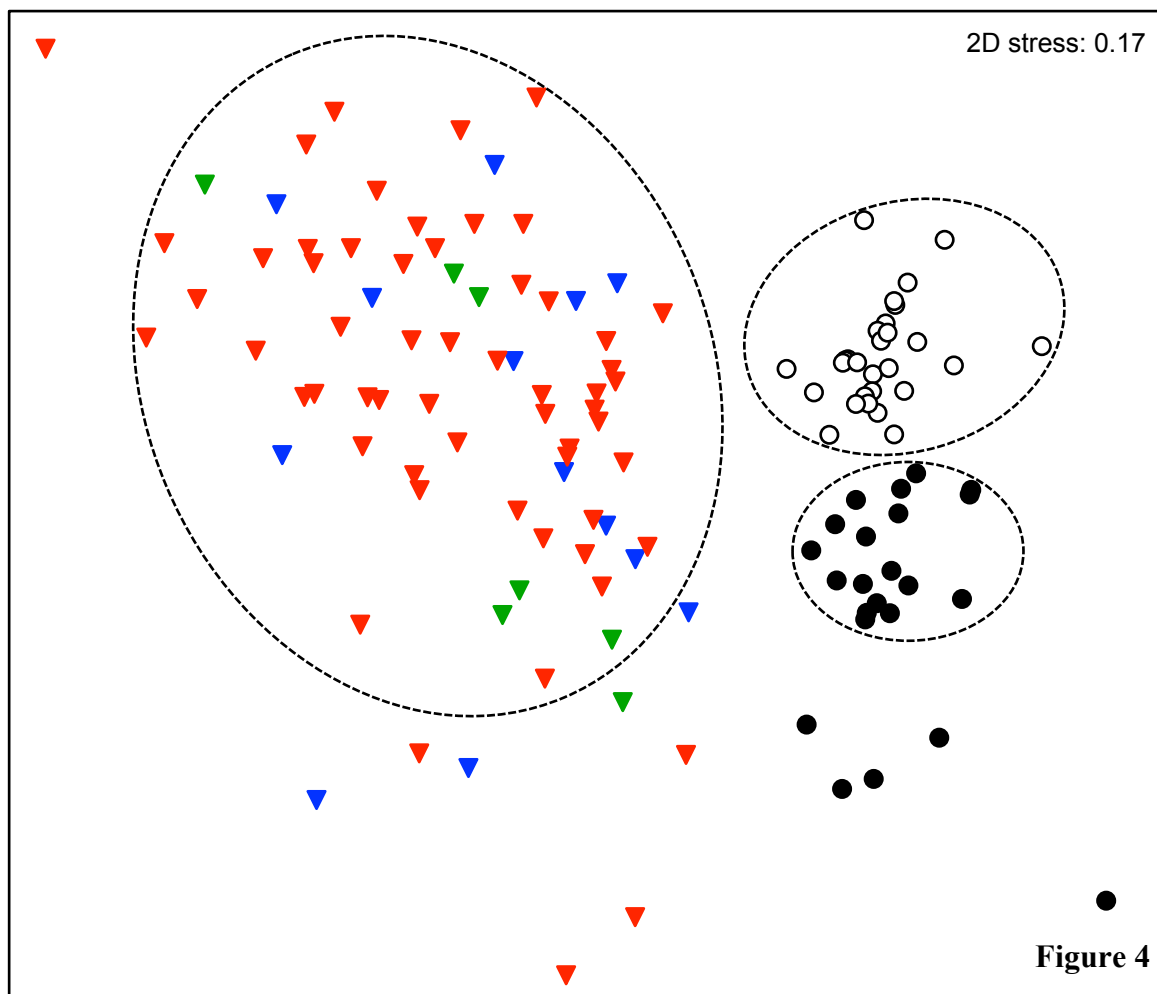
OTUs at the 97% similarity level, after randomly resampling to 8,541 sequences per sample to provide statistical robustness when comparing diversity measures among samples. Each of the FL, PA and PMD fractions were composed of 35.1, 56.0 and 83.6% of the total number of OTUs, respectively. Rarefaction analysis (not shown) suggested that the FL, PA and PMD bacterial diversity approached that of an asymptote. Chao1 estimator showed that the richness of the PA (mean=173, SD= 41.7, n= 24) was significantly higher (Kruskal-Wallis test, $p<0.001$) than the FL community (mean=125, SD=39.5, n=28), whereas PMD communities presented intermediate values (mean=160, SD=69.5, n=74) non-significantly different from the other two fractions (Figure 3). Pielou index revealed a significantly higher evenness in the PMD community (mean=0.65, SD=0.10) compared to the PA (mean=0.53, SD=0.11) and FL fractions (mean=0.60, SD=0.07) (Kruskal-Wallis test, $p<0.001$). Consequently, PMD presented a significantly higher Shannon diversity index (mean=3.10, SD=0.47) compared to the PA (mean=2.62, SD= 0.59) and FL fractions (mean=2.71, SD= 0.30) (ANOVA $p<0.001$).



Bacterial community structure in relation to PMD characteristics and environmental parameters

Non-metric multidimensional scaling (NMDS) based on Bray–Curtis dissimilarities revealed that the global pattern of bacterial diversity was explained in part by the FL, PA and PMD lifestyles (Figure 4). Analysis of similarity (ANOSIM) showed these groups to be highly significant (UniFrac and p test significance, both $p<0.001$). The overall dissimilarity between

PMD cluster and FL and PA cluster was 69%. FL and PA formed distinct sub-clusters with lower within dissimilarities than in the PMD cluster (41, 52 and 60%, respectively). To evaluate the factors driving the bacterial community structure of the PMD communities, we performed a canonical correspondence analysis (CCA) (Suppl. Figure S1). The best statistical model explained only 11.0% of the total variance ($P < 0.05$). Variation partitioning indicated that the PMD characteristics (surface, shape and carbonyl index) and the few environmental variables available across all datasets (temperature, salinity and Chl *a*) contributed equally to the total variance explained. No significant relationship was found neither with the polymer type (i.e. PE, PP, PS and others) nor among the geographical sampling sites (inter-site) or within plastic pieces sampled in the same Manta trawl (intra-site).



Taxonomic difference between FL, PA and PMD fractions

Most of the OTUs in the FL fraction were dominated by Alphaproteobacteria (45.0%, mainly *Pelagibacter sp.*), followed by Cyanobacteria (24.3%, mainly *Synechococcus sp.*), Flavobacteria and Gammaproteobacteria (11.3% and 11.1%, respectively) (Figure 5). OTUs in the PA fraction were characterized by closer percentages between the 3 dominant classes, including Alphaproteobacteria (25.9%, mainly *Erythrobacter sp.*), Gammaproteobacteria (25.0%, mainly *Alteromonas sp.*) and Cyanobacteria (17.9%, mainly *Synechococcus sp.*). The PMD fraction was dominated by Cyanobacteria (40.8%, mainly *Pleurocapsa sp.*) and Alphaproteobacteria (32.2%, mainly *Roseobacter sp.*). Most of the Cyanobacteria belong to Oscillatoriales, Chroococcales, Nostocales and Pleurocapsales orders. *Synechococcus sp.*, *Calothrix sp.*, *Scytonema sp.* and *Pleurocapsa sp.* were the more represented species.

Venn diagram revealed a large fraction (46.7%, dominated by *Ulviobacter litoralis*, *Rivularia sp.*, *Microchaete tenera* and *Shimia marina*) of the total OTUs found only in the PMD fraction. A very small fraction (5.9%, dominated by Marinimicrobia) was found only in FL, whereas specific OTUs found in PA represented 15.3% (dominated by Vibrionaceae). The ubiquitous OTUs found in the three fractions represented 24.6% (Figure 6).

Similarity percentage analysis (SIMPER) revealed 12 individual OTUs contributing to 50% of the dissimilarity between PMD and the surrounding water, including *Pleurocapsa sp.*, *Calothrix sp.*, *Scytonema sp.* and Oscillatoriales more abundant in the PMD and *Synechococcus sp.*, *Pelagibacter sp.*, *Alteromonas sp.* more abundant in FL and PA fractions (Figure 7). Comparison between PA and FL showed that five OTUs contributed to 50% of the dissimilarity, including *Pelagibacter sp.* and *Synechococcus sp.* more represented in FL and *Alteromonas sp.* more abundant in PA.

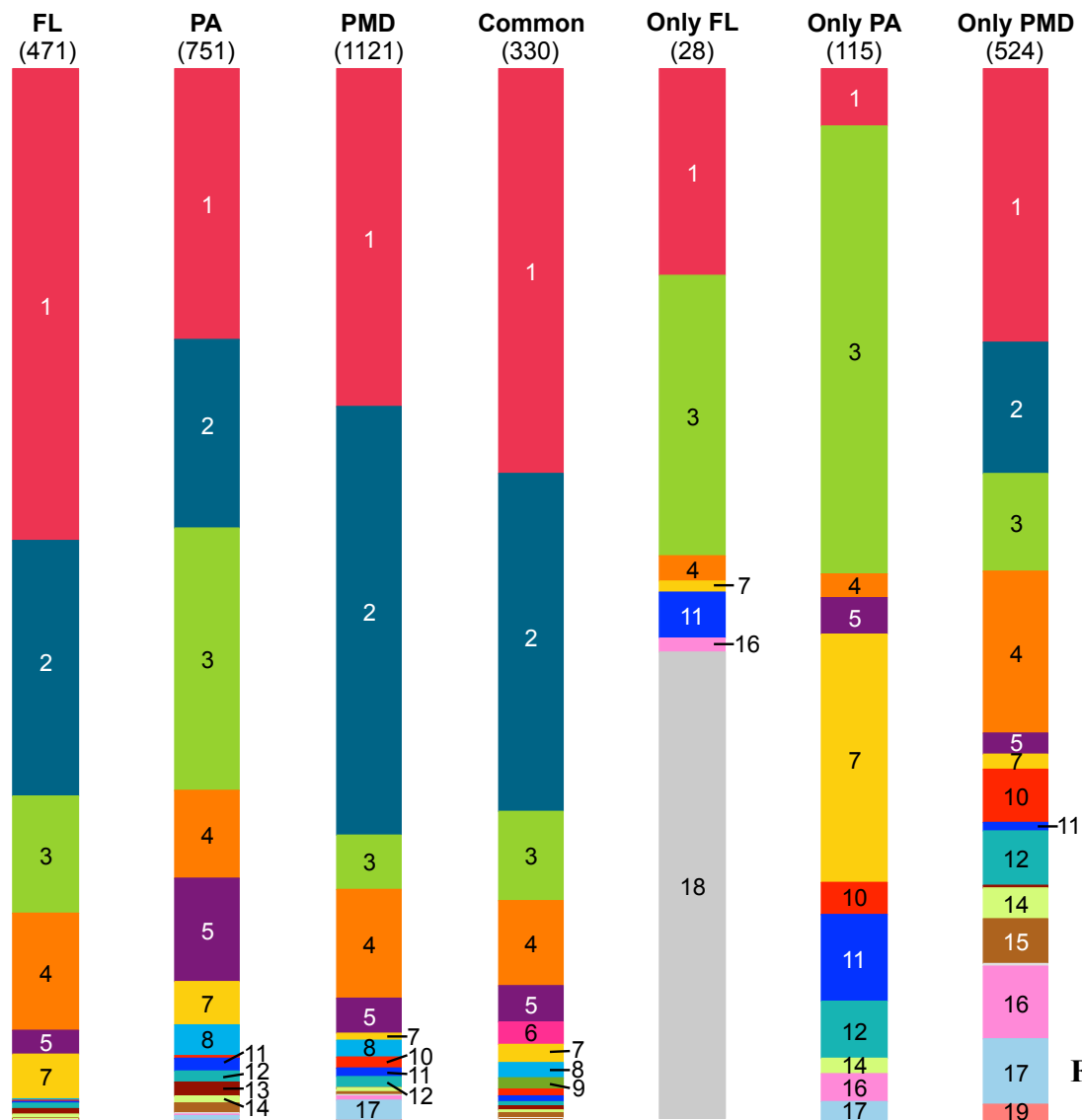


Figure 5

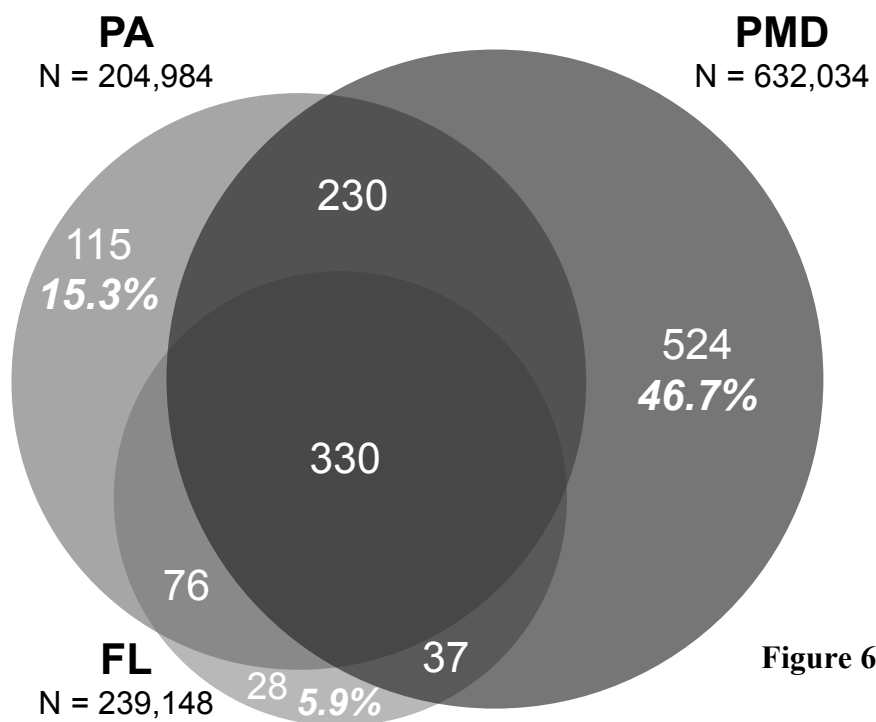


Figure 6

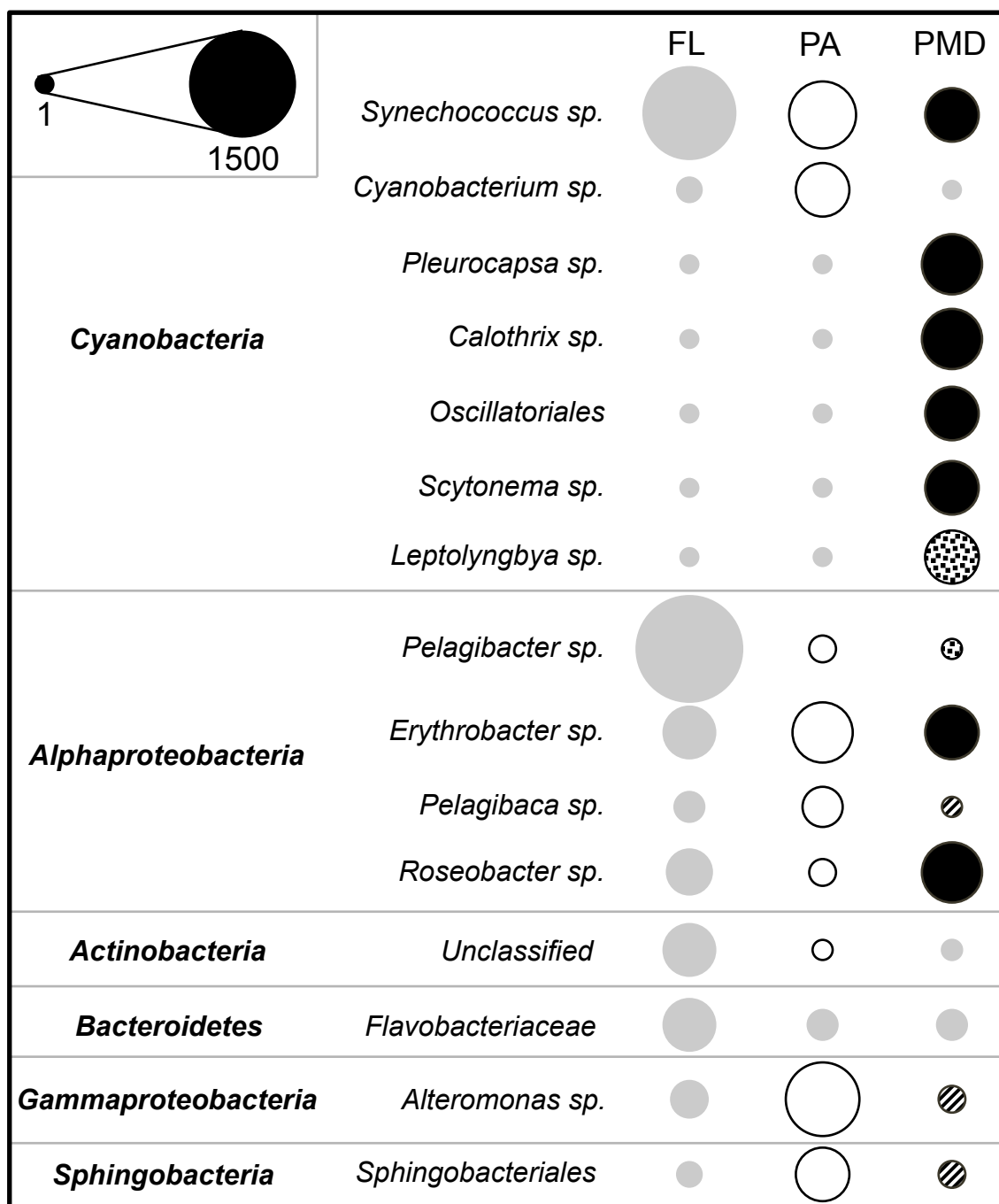
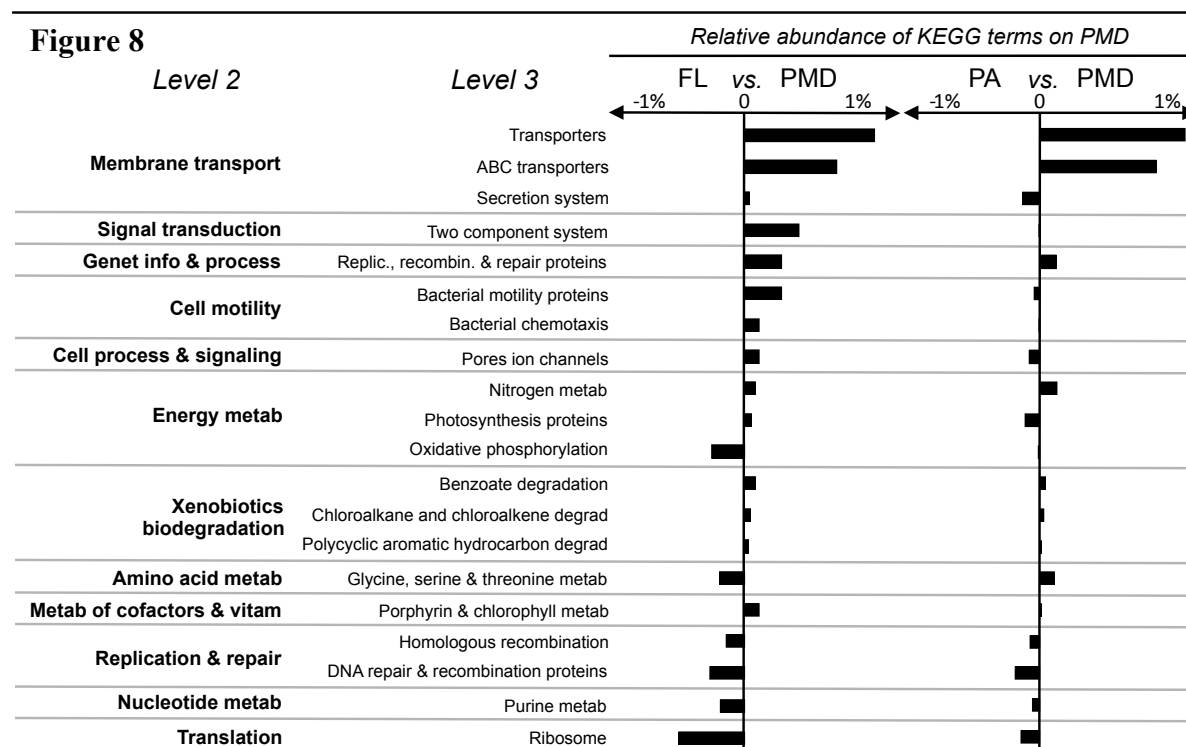


Figure 7

Potential metabolic differences between bacteria in FL, PA and PMD fractions

Analysis of the predicted metabolic functions potentially expressed by the bacterial communities associated to FL, PA and PMD fractions revealed several systematic differences (Figure 8). On KEGG level 2 (high hierarchical level in PICRUSt), membrane transport, cell motility and xenobiotics biodegradation were predicted to be significantly more encoded by PMD compared to FL communities (Kruskal-Wallis rank sum test; $p < 0.05$), while KEGG

terms related to translation, replication and repair and amino acid metabolism were predicted to be more represented in the FL fraction. We further used SIMPER to discriminate the predictive functions at a lower hierarchical level (KEGG level 3) explaining the most differences between the 3 fractions (the 20 most abundant functions contributing to 36.7% difference). General transporters and ABC transporters functions were more detected on PMD and explained from 10.5 to 13.8% of the dissimilarity with FL and PA. Xenobiotic biodegradation and metabolism functions were also more found on PMD. Photosynthesis proteins, cell motility, cellular process and signaling were more represented in both PMD and PA compared to FL.



A closer look at the OTU table for known hydrocarbonoclastic bacteria (77 OTUs including *Glaciecola* sp., *Muricauda* sp., *Pseudoalteromonas* sp., *Hyphomonas* sp., *Phormidium* sp., and *Erythrobacter* sp., which represented generally more than 0.1% of the community for each sample) showed that these OTUs were more present in PMD and PA fractions (7.4 and 7.8%, respectively) compared to FL (4.7%). The most dominant hydrocarbonoclastic OTUs

was *Erythrobacter sp.*, which dominated some samples of the PMD (43%) and PA (35%) communities. *Hyphomonas sp.* and *Phormidium sp.* in particular were 10 to 100 times more found in PMD compared to PA and FL, and were observed in almost all the plastic pieces.

We also focused on putative pathogens, based on taxonomic OTU identification. *Vibrio sp.* was generally found in the rare biosphere (<0.1%) in the FL, and sometimes in higher proportion in PMD and PA. Putative pathogen *Vibrio* species such as *V. anguillarum*, *V. harveyi*, *V. pectenocida* and *V. xiamenensis* were found on less than 5 plastic pieces, and neither detected on FL and PA. Other putative pathogens were particularly found on PMD and rather rare in PA and FL, such as the fish pathogen *Tenacibaculum sp.* or the crustacean and invertebrate pathogens *Phormidium sp.* and *Leptolyngbya sp.*, which were observed in more than three quarters of plastic pieces and represented 27.7% of the PMD community.

Discussion

A high density but patchy distribution of bacteria living on PMD compared to the PA and FL lifestyles.

We found a very high density of bacteria living on plastics, with a mean of 4.4×10^4 cells mm^{-2} . This is in the same order of magnitude as found in seawater biofilms covering glass (Mieszkin *et al.*, 2012), subtidal rocks (Chung *et al.*, 2010) or stainless steel (Devi, 1995). Microplastic concentration ranged between <1 to 36 pieces m^{-3} in the surface layers of the North Western Mediterranean Sea (Pedrotti *et al.*, 2016; Collignon *et al.*, 2012), thus suggesting that microplastics can no longer be considered as a negligible part of the marine particles in this region. Our epifluorescence microscopic observations give the first *in situ* estimation of the bacterial density on PMD in marine waters, even if plastic biofilms have been observed by electron microscopy in a number of studies starting in the 1970s (Carpenter *et al.*, 1972). We found that PMD cell enrichment factor (EF) was up to 4000 and more

generally around 900 compared to FL fraction, which is similar and even higher to EF generally observed for PA bacteria (Simon *et al.*, 2002). The biofilms covered between 0 and 3.5% of the surface area, revealing a rather patchy and non-uniform covering of the PMD. This observation is in accordance with the *in situ* observation of spatial heterogeneity ('patchiness') of mature biofilms in nature, controlled by a complex set of parameters including physical (hydrodynamic fluxes), chemical (nutrients, pH, oxygen) and biological conditions (quorum-sensing, toxic metabolic by-products) (Flemming *et al.*, 2016; Salta *et al.*, 2013).

PMD bacteria presented similar richness but higher evenness compared to FL and PA

We observed that PMD represent favorable environments for a large number of species, with significantly higher evenness compared to FL and PA fractions. These results are in accordance with Zettler *et al.* (2013), but differed with Mc Cormick *et al.* (2014), both comparing PMD and FL communities only. Such discrepancy may be due to the low number of samples analyzed in the previous studies (3 and 4 sites with a total of 6 and 4 PMD, respectively) compared to the 32 sites and 80 PMD analyzed here, which make the conclusions more robust. Theoretical studies suggested that spatial isolation (such as the colonization of PMD in seawater in our case) could limit competition, thereby supporting a high richness and a more uniform diversity (Zhou *et al.*, 2002). Further studies are needed to test if this trend may be explained by the superabundant or heterogeneous resources, fluctuating conditions and spatial heterogeneity offered by PMD.

Niche partitioning between PMD, FL and PA fractions.

NMDS results demonstrated niche partitioning in marine bacteria as reflected by the considerable proportion of the variance (69%) in community composition between PMD and

the surrounding FL or PA fractions. Niche partitioning is one of the hypotheses that could explain the maintenance of the tremendous diversity among marine bacteria, together with their capacity for dormancy (Baran *et al.*, 2015). The classical barriers known to affect the pelagic bacterial communities are transitions between marine and freshwater, coast and offshore or surface and deep waters (Ghiglione *et al.*, 2012). Here, we propose that spatial isolation provided by the large concentration of PMD offer a distinct strategy to avoid competition by occupying different physical locations, which support a new trade-off for the maintenance of a large diversity of bacteria in the Oceans (Sunagawa *et al.*, 2015). Together with additional metabolic diversification of sympatric microbial populations (i.e., resource limitation and cross-feeding), the evidence of spatial isolation on PMD give a new example of bacterial strategy to explain the high diversity of pelagic microbes in the Oceans, analogous to the “Hutchinson’s paradox of the plankton” for phytoplankton (Hutchinson, 1961).

Transition from one lifestyle to another and niche specificities.

Over the thousands of OTUs identified, a quarter of them were ‘generalists’. It suggests possible exchanges between the PMD, PA and FL communities rather than considering the three compartments as non-interacting environments. Attachment and detachment is a common feature already observed in biofilms and organic particles, with release of cells that become free, return to the planktonic mode of growth until they encounter another physical carrier (Stoodley *et al.*, 2002; Ghiglione *et al.*, 2007).

Interestingly, we observed that OTUs only found on PMD represented almost half of the total OTUs in our samples, thus suggesting a distinct selection strategy and reinforcing the view of PMD being a particular biota for marine bacteria. We may have hypothesis a high similarity between OTUs living on PMD and PA, as previously suggested in one study focusing on the early colonization of polyethylene terephthalate (PET) bottles in seawater (Oberbeckmann et

al. 2016). It was not the case in our study, with more than half of OTUs being distinct between these very different PA and PMD habitats. PA bacteria decompose the support where they live, which is made of detritus-dominated aggregates sinking in the water column (Simon *et al.*, 2002). This is not the case for PMD that presented very low biodegradation rates (Dussud and Ghiglione, 2014). Floating PMD are different habitats, with a longer history of drifting dispersion and being periodically submitted to ultraviolet (UV) radiation, mechanical forces and weathering, as well as to ingestion and release by pelagic filter feeders, and other zooplankton and micronekton (Collignon *et al.*, 2012).

Finally, we observed that ‘FL specialists’ were rather an exception than a rule, since the OTUs found exclusively in a FL state represented less than 6%. Similar tendency was found when comparing only FL and PA communities, using similar metabarcoding approach (Rieck *et al.*, 2015). Our results reinforce the view of Grossart *et al.* (2010), who underlined that much less attention has been paid to the large diversity of bacteria living on PMD and PA compared to FL, which may influence in an erroneous way emerging concepts in marine microbial ecology.

Taxonomic identification and predictive functions.

Bacteria living on PMD were dominated by Cyanobacteria and Alphaproteobacteria, whereas FL and PA fractions were in line with the general trends previously observed, i.e. with the FL dominated by Alphaproteobacteria (mainly *Pelagibacter sp.*) and PA dominated by Alphaproteobacteria (mainly *Erythrobacter sp.*) and Gammaproteobacteria (mainly *Alteromonas sp.*) (Crespo *et al.*, 2013; Mohit *et al.*, 2014). Consistent with the typical Cyanobacteria shapes widely observed in our SEM and AFM images, SIMPER analysis revealed that most of the taxonomic groups explaining the difference between the PMD vs. PA and FL belong to this group. It confirmed the specific occurrence of some OTUs in PMD

biofilms, where the presence of light and inorganic carbon released by neighbor microorganisms may be a driving factor for the selection of Cyanobacteria (Stal, 1995). Five genera of Cyanobacteria were particularly more represented in the PMD, including *Leptolyngbya sp.*, *Pleurocapsa sp.* and *Rivularia sp.*, which were already observed in the plastisphere in the North Pacific gyre (Zettler *et al.*, 2013; Bryant *et al.*, 2016). We also noted the presence of *Scytonema sp.* and *Calothrix sp.* in PMD, which were previously found on biofilms covering rocks or chalky crustaceans (Sivonen *et al.*, 2007; González-Resendiz *et al.*, 2015). Further studies are needed to evaluate the influence of the photosynthetic activities of Cyanobacteria living on PMD on the global pelagic primary production and more generally on their biogeochemical role on the carbon and nitrogen cycles in the Oceans.

In parallel, we used our OTU table for the prediction of microbial metagenomes, as recently proposed by several authors (Langille *et al.*, 2013; Louca *et al.*, 2016). PICRUSt analysis highlighted the dominance of porphyrin and chlorophyll metabolism functions on the PMD compared to FL and PA genomes. Although these observations were based only on predictions made from 16S rRNA gene sequences, this is consistent with the metagenomic data obtained from 12 plastic pieces in the North Pacific Gyre (Bryant *et al.*, 2016). Other prediction of overrepresented functional categories on PMD compared to FL and PA were also plausible: the membrane transport functions and the ABC transporters, as well as the cellular processes and signaling were previously described as essential functions in biofilm formation and maturation (Lasa and Penadés, 2006; Porter *et al.*, 2011; He and Bauer, 2014); the cell motility was described as a prerequisite for the chemotactic behavior and active interactions between bacteria and colonization sites (Simon *et al.*, 2002). Even though the overrepresentation of some functional categories needs to be interpreted with caution, this predictive method provided a good indication for the existence of functional differences in our system.

Evidence of bacterial degradation of hydrocarbon-based PMD remains an unresolved hypothesis in marine waters (Dussud and Ghiglione, 2014). Interestingly, several hydrocarbonoclastic bacteria were overrepresented in the PMD fraction, such as Erythrobacteraceae (e.g. *Erythrobacter* sp., *Croceicoccus naphthovorans*) (Wang *et al.*, 2016) or *Hyphomonas* sp. (Li *et al.*, 2014) found in almost all our plastic pieces. Predicted genomes of bacteria predominantly found in PMD were also notably enriched in xenobiotics biodegradation functions, mainly including hydrocarbon degradation. However, further investigations are needed to evaluate how much these consortia are good candidates for PMD biodegradation, since they may also be selected by hydrocarbon petroleum residues concentrated on their surfaces due to the hydrophobic properties of PMD (Rios *et al.*, 2007). Interests have been raised about opportunist pathogens dispersal on PMD, such as animal or human pathogenic *Vibrio* sp. (Zettler *et al.*, 2013). The potentially human pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* was recently observed on a number of PMD from North/Baltic Sea (Kirstein *et al.*, 2016), but were never detected in our dataset. Other potentially pathogenic *Vibrios* were observed, such as *V. anguillarum*, *V. harveyi*, *V. pectinica*, *V. xiamenensis*, but they generally belong to the rare biosphere (<0.1%) and they were not related to human diseases. Overall, *Vibrio* sp. was 7 times higher in the PMD compared to FL, but they were not particularly enriched compared to the PA fraction. SIMPER analysis highlighted the overrepresentation of *Tenacibaculum* sp., *Phormidium* sp. and *Leptolyngbya* sp. in the PMD compared to both FL and PA, a few members of these genus being known as fish pathogens (Austin *et al.*, 2012) or brine shrimp and coral black band disease (Rützler and Santavy, 1983; Frazão *et al.*, 2010). However, caution should be taken since metabarcoding approach is not an appropriate method for describing bacterial virulence, and further tests are needed before waving alarmist conclusions on the potential role of PMD as vector for the dispersal of harmful or even human pathogenic species (Kirstein *et al.*, 2016).

Conclusion

This study successfully evidences the occurrence of a specific and abundant bacterial life on PMD, when compared to the more frequently studied FL and PA fractions in the surrounding waters. Such niche partitioning raised stimulating questions about the functional role of these abundant communities, which are increasing together with the number of PMD in the World Ocean. Based on a large set of samples along the western Mediterranean Sea, our study gives new directions to estimate the ecological role of PMD communities, and in particular the Cyanobacteria group consistently found abundant on PMD that may influence the global carbon and nitrogen biogeochemical cycles in surface Oceans. Computational predictions also gave evidence of specific functions associated to PMD such as hydrocarbon degradation, which needs further studies to evaluate their capability to perform plastic biodegradation in marine waters.

Acknowledgements. *We thank the commitment of the following institutions, people and sponsors: CNRS, UPMC, LOV, Genoscope/CEA, the Tara Expeditions Foundation and its funders: agnès b. and Etienne Bourgois, the Veolia Environment Foundation, Lorient Agglomeration, Serge Ferrari, the Foundation Prince Albert II de Monaco, IDEC, the Tara schooner and teams. We are also grateful to the French Ministry of Foreign Affairs for supporting the expedition and to the countries that graciously granted sampling permissions. We thank Guigui PA, VJS, and Albuquerque N for insightful comments on the manuscript. This work was also supported by the PLASTICMICRO project founded by CNRS-EC2CO-Microbien.*

Conflict of interest. All of the reported work is original research, and authors have seen and approved the final version submitted. The material has not been previously published and has not been submitted for publication elsewhere while under consideration. The authors declare no conflict of interest. Likewise, consent is given for publication in The ISME Journal, if accepted.

Supplementary information. Supplementary information is available at Environmental Pollution website.

References

- Andrady AL. (2011). Microplastics in the marine environment. *Mar Pollut Bull* **62**: 1596–605.
- Austin B, Austin DA, Austin B, Austin DA. (2012). Bacterial fish pathogens. In: *Heidelberg Germany: Springer*. p 652.
- Baran R, Brodie EL, Mayberry-Lewis J, Hummel E, Da Rocha UN, Chakraborty R, *et al.* (2015). Exometabolite niche partitioning among sympatric soil bacteria. *Nat Commun* **6**: 8289.
- Berdjeb L, Ghiglione JF, Jacquet S. (2011). Bottom-up versus top-down control of hypo-and epilimnion free-living bacterial community structures in two neighboring freshwater lakes. *Appl Environ Microbiol* **77**: 3591–3599.
- Binnig G, Quate CF. (1986). Atomic Force Microscope. *Phys Rev Lett* **56**: 930–933.
- Bryant JA, Clemente TM, Viviani DA, Fong AA, Thomas KA, Kemp P, *et al.* (2016). Diversity and Activity of Communities Inhabiting Plastic Debris in the North Pacific Gyre. *mSystems* **1**: e00024-16.
- Carpenter E, Anderson S, Harvey G, Miklas H. (1972). Polystyrene spherules in coastal waters. *Science* **178**: 749–750.
- Chung HC, Lee OO, Huang Y-L, Mok SY, Kolter R, Qian P-Y. (2010). Bacterial community succession and chemical profiles of subtidal biofilms in relation to larval settlement of the polychaete *Hydroides elegans*. *ISME J* **4**: 817–828.
- Collignon A, Hecq J-H, Glagani F, Voisin P, Collard F, Goffart A. (2012). Neustonic microplastic and zooplankton in the North Western Mediterranean Sea. *Mar Pollut Bull* **64**: 861–864.
- Cózar A, Echevarría F, González-Gordillo JJ, Irigoien X, Ubeda B, Hernández-León S, *et al.* (2014). Plastic debris in the open ocean. *Proc Natl Acad Sci* **111**: 10239–10244.
- Crespo BG, Pommier T, Fernández-Gómez B, 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. *Microbiol Open* **2**: 541–552.
- Devi P. (1995). Abundance of bacterial and diatom fouling on various surfaces. *Proceeding-Indian Natl Sci Acad* **61**: 231–231.
- Durrieu de Madron X, Guieu C, Sempéré R, Conan P, Cossa D, D’Ortenzio F, *et al.* (2011). Marine ecosystems’ responses to climatic and anthropogenic forcings in the Mediterranean. *Prog Oceanogr* **91**: 97–166.
- Dussud C, Ghiglione JF. (2014). Bacterial degradation of synthetic plastics. In: Briand F (ed) Vol. 46. *Marine litter in the Mediterranean and Black Seas*. CIESM Publisher: Monaco, pp 43–48.
- Eriksen M, Lebreton LCM, Carson HS, Thiel M, Moore CJ, Borroero JC, *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.
- Farooq A, Malfatti F. (2007). Microbial structuring of marine ecosystems. *Nat Rev Microbiol* **5**: 782–791.
- Flemming H-C, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice SA, Kjelleberg S. (2016). Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol* **14**: 563–575.
- Frazão B, Martins R, Vasconcelos V. (2010). Are known cyanotoxins involved in the toxicity of picoplanktonic and filamentous north atlantic marine cyanobacteria? *Mar Drugs* **8**: 1908–1919.
- Gasol JM, Pinhassi J, Alonso-Sáez L, Ducklow H, Herndl GJ, Koblížek M, *et al.* (2008). Towards a better understanding of microbial carbon flux in the sea. *Aquat Microb*

- Ecol* **53**: 21–38.
- Ghiglione JF, Conan P, Pujo-Pay M. (2009). Diversity of total and active free-living vs. particle-attached bacteria in the euphotic zone of the NW Mediterranean Sea. *FEMS Microbiol Lett* **299**: 9–21.
- Ghiglione JF, Galand PE, Pommier T, Pedros-Alio C, Maas EW, Bakker K, *et al.* (2012). Pole-to-pole biogeography of surface and deep marine bacterial communities. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**: 17633–17638.
- Ghiglione JF, Mevel G, Pujo-Pay M, Mousseau L, Lebaron P, Goutx M. (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**: 217–231.
- Ghiglione JF, Philippot L, Normand P, Lensi R, Potier P. (1999). Disruption of narG, the gene encoding the catalytic subunit of respiratory nitrate reductase, also affects nitrite respiration in *Pseudomonas fluorescens* YT101. *J Bacteriol* **181**: 5099–5102.
- González-Resendiz L, León-Tejera HP, Gold-Morgan M. (2015). Morphological diversity of benthic nostocales (Cyanoprokaryota/cyanobacteria) from the tropical rocky shores of Huatulco region, Oaxaca, Mexico. *Phytotaxa* **219**: 221–232.
- Gorsky G, Ohman MD, Picheral M, Gasparini S, Stemmann L, Romagnan JB, *et al.* (2010). Digital zooplankton image analysis using the ZooScan integrated system. *J Plankton Res* **32**: 285–303.
- Gregory MR. (2009). Environmental implications of plastic debris in marine settings entanglement, ingestion, smothering, hangers-on, hitch-hiking and alien invasions. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **364**: 2013–2025.
- Grossart HP. (2010). Ecological consequences of bacterioplankton lifestyles: Changes in concepts are needed. *Environ Microbiol Rep* **2**: 706–714.
- He K, Bauer CE. (2014). Chemosensory signaling systems that control bacterial survival. *Trends Microbiol* **22**: 389–398.
- Hutchinson GE. (1961). The paradox of the plankton. *Am Nat* **95**: 137–145.
- 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.
- Langille M, Zaneveld J, Caporaso JG, McDonald D, Knights D, Reyes J, *et al.* (2013). Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nat Biotechnol* **31**: 814–21.
- Lasa I, Penadés JR. (2006). Bap: A family of surface proteins involved in biofilm formation. *Res Microbiol* **157**: 99–107.
- Law KL, Thompson RC. (2014). Microplastics in the seas. *Science* **345**: 144–145.
- Lebreton LCM, Greer SD, Borrero JC. (2012). Numerical modelling of floating debris in the world's oceans. *Mar Pollut Bull* **64**: 653–661.
- Li C, Lai Q, Li G, Liu Y, Sun F, Shao Z. (2014). Multilocus sequence analysis for the assessment of phylogenetic diversity and biogeography in *Hyphomonas* bacteria from diverse marine environments. *PLoS One* **9**: e101394.
- Lobelle D, Cunliffe M. (2011). Early microbial biofilm formation on marine plastic debris. *Mar Pollut Bull* **62**: 197–200.
- Louca S, Parfrey LW, Doebeli M. (2016). Decoupling function and taxonomy in the global ocean microbiome. *Science* **353**: 1272–1277.
- McCormick A, Hoellein TJ, Mason SA, Schluep J, Kelly JJ. (2014). Microplastic is an abundant and distinct microbial habitat in an urban river. *Environ Sci Technol* **48**: 11863–11871.
- Mével G, Vernet M, Goutx M, Ghiglione JF. (2008). Seasonal to hour variation scales in abundance and production of total and particle-attached bacteria in the open NW

- Mediterranean Sea (0–1000 m). *Biogeosciences* **5**: 1573–1586.
- Mieszkin S, Martin-Tanchereau P, Callow ME, Callow J a. (2012). Effect of bacterial biofilms formed on fouling-release coatings from natural seawater and *Cobetia marina*, on the adhesion of two marine algae. *Biofouling* **28**: 953–68.
- Mohit V, Archambault P, Toupoint N, 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**: 2071–2083.
- Parada AE, Needham DM, Fuhrman JA. (2016). Every base matters: Assessing small subunit rRNA primers for marine microbiomes with mock communities, time series and global field samples. *Environ Microbiol* **18**: 1403–1414.
- Pedrotti ML, Petit S, Elineau A, Bruzaud S, Crebassa JC, Dumontet B, *et al.* (2016). Changes in the floating plastic pollution of the mediterranean sea in relation to the distance to land. *PLoS One* **11**: 1–14.
- Porter SL, Wadhams GH, Armitage JP. (2011). Signal processing in complex chemotaxis pathways. *Nat Rev Microbiol* **9**: 153–165.
- Pulido-Villena E, Baudoux AC, Obernosterer I, Landa M, Caparros J, Catala P, *et al.* (2014). Microbial food web dynamics in response to a Saharan dust event: Results from a mesocosm study in the oligotrophic Mediterranean Sea. *Biogeosciences* **11**: 5607–5619.
- Rieck A, Herlemann DPR, Jürgens K, Grossart HP. (2015). Particle-associated differ from free-living bacteria in surface waters of the baltic sea. *Front Microbiol* **6**: 1297.
- Rios LM, Moore C, Jones PR. (2007). Persistent organic pollutants carried by synthetic polymers in the ocean environment. *Mar Pollut Bull* **54**: 1230–1237.
- Rützler K, Santavy DL. (1983). The Black Band Disease of Atlantic Reef Corals: I. Description of the Cyanophyte Pathogen. *Mar Ecol* **4**: 301–319.
- Salta M, Wharton JA, Blache Y, Stokes KR, Briand JF. (2013). Marine biofilms on artificial surfaces: Structure and dynamics. *Environ Microbiol* **15**: 2879–2893.
- Selke S, Auras R, Nguyen TA, Castro Aguirre E, Cheruvathur R, Liu Y. (2015). Evaluation of biodegradation-promoting additives for plastics. *Environ Sci Technol* **49**: 3769–3777.
- Severin T, Sauret C, Boutrif M, Duhaut T, Kessouri F, Oriol L, *et al.* (2016). Impact of an intense water column mixing (0-1500 m) on prokaryotic diversity and activities during an open-ocean convection event in the NW Mediterranean Sea. *Environ Microbiol* **18**: 4378–4390.
- Siboni N, Lidor M, Kramarsky-Winter E, Kushmaro A. (2007). Conditioning film and initial biofilm formation on ceramics tiles in the marine environment. *FEMS Microbiol Lett* **274**: 24–29.
- Simon M, Grossart HP, Schweitzer B, Ploug H. (2002). Microbial ecology of organic aggregates in aquatic ecosystems. *Aquat Microb Ecol* **28**: 175–211.
- Sivonen K, Halinen K, Sihvonen LM, Koskeniemi K, Sinkko H, Rantasärkkä K, *et al.* (2007). Bacterial diversity and function in the Baltic Sea with an emphasis on cyanobacteria. *Ambio* **36**: 180–185.
- Stal LJ. (1995). Physiological ecology of cyanobacteria in microbial mats and other communities. *New Phytol* **131**: 1–32.
- Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW. (2002). Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol* **56**: 187–209.
- Sunagawa S, Coelho LP, Chaffron S, Kultima JR, Labadie K, Salazar G, *et al.* (2015). Structure and function of the global ocean microbiome. *Science* **348**: 1261359.
- De Tender C, Devriese LI, Haegeman A, Maes S, Ruttink T, Dawyndt P. (2015). Bacterial community profiling of plastic litter in the Belgian part of the North Sea. *Environ Sci*

Technol **49**: 9629–9638.

- Wang H, Wang B, Dong W, Hu X. (2016). Co-acclimation of bacterial communities under stresses of hydrocarbons with different structures. *Sci Rep* **6**: 34588.
- Zettler ER, Mincer TJ, Amaral-zettler LA. (2013). Life in the ‘ Plastisphere ’ : Microbial Communities on Plastic Marine Debris. *Environ Sci Technol* **47**: 7137–7146.
- Zettler LA, Zettler ER, Slikas B, Boyd GD, Melvin DW, Morrall CE, *et al.* (2015). The biogeography of the Plastisphere: Implications for policy. *Front Ecol Environ* **13**: 541–546.
- Zhou J, Xia B, Treves DS, Wu L, Marsh TL, Neill RVO, *et al.* (2002). Spatial and Resource Factors Influencing High Microbial Diversity in Soil Spatial and Resource Factors Influencing High Microbial Diversity in Soil. *Appl Environ Microbiol* **68**: 326–334.

Figure legends:

Figure 1: Study area and station locations (n=32) in the Western Mediterranean Sea. Upper left: picture of the manta trawls used to collect PMD. At the bottom: light-micrograph of PMD analyzed in this study.

Figure 2: A: SEM image showing a plastic colonized by diverse organisms and surface deterioration; B: AFM amplitude error image showing pits and cracks on a very small scale, as well as organisms of different morphologies and size, among which two *Oscillatoria* are pointed (arrows) and a diatom visible on the upper right; C: Epifluorescence microscopy images of biofilms with a “patchy” organization (C-1) and a loaded biofilm with diverse morphotypes (C-2).

Figure 3: Alpha-diversity indices (Chao1, Pielou, Shannon, Simpson) of FL, PA and PMD bacteria. The boxplots show the median (heavy horizontal line inside the boxes), the box represents the first and third quartiles and unfilled circles indicate outliers. Lowercase letters (a, b, c) denote statistically different groups ($p \leq 0.05$).

Figure 4: Nonmetric multidimensional scaling (NMDS) plot showing dissimilarities among FL (open circles), PA (solid circles) and PMD (triangles: red for polyethylene, blue for polypropylene and green for other composition). Samples were grouped according to >30% Bray-Curtis similarity threshold (dotted circles).

Figure 5: Histograms showing taxonomic composition at the class level for FL, PA and PMD fractions, as well as for unique and common OTUs between the three fractions (see also Venn

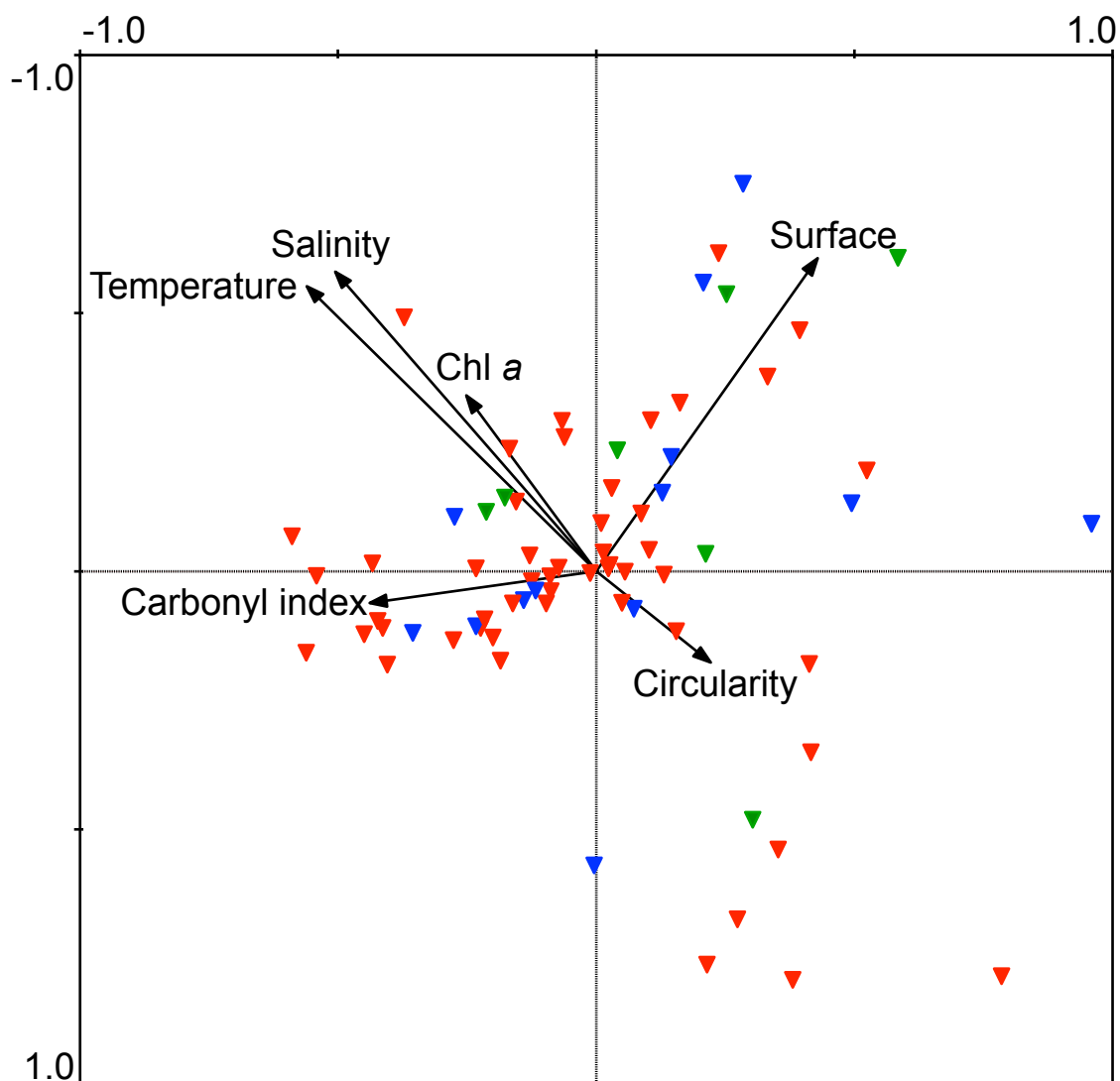
diagram Figure 6). For more clarity, the class representing $< 1\%$ are not represented. Numbers of OTUs are in parentheses. (1) Alphaproteobacteria, (2) Cyanophyceae, (3) Gammaproteobacteria, (4) Flavobacteriia, (5) Sphingobacteriia, (6) Proteobacteria (unclassified), (7) Actinobacteria, (8) Planctomycetia, (9) Bacteroidetes, (10) Cytophagia, (11) Bacilli, (12) Betaproteobacteria, (13) Opitutae, (14) Deltaproteobacteria, (15) Phycisphaerae, (16) Bacteroidia, (17) Clostridia, (18) Marinimicrobia.

Figure 6: Venn diagram showing overlaps between OTUs found in FL, PA and PMD fractions. Numbers inside circles represent the number of shared OTUs. The percentage of unique OTUs found in only one fraction is also indicated. N = number of reads per fraction.

Figure 7: Average abundance of the most significant OTUs contributing to 50% (cumulative) of the dissimilarity between FL, PA and PMD fractions based on SIMPER analysis. We indicated OTUs explaining the difference between FL and PA (white bubbles), FL and PMD (dotted bubbles), PA and PMD (stripped bubbles) and both FL/PMD and PA/PMD (black bubbles).

Figure 8: KEGG categories predicted by PICRUSt (level 2 and 3) differentially represented in bacterial communities found in PMD, FL and PA fractions (discriminant KEGG terms according to SIMPER analysis). Bars represent the difference of relative abundance of a KEGG term in PMD bacterial communities compared to FL fraction (left graph) or to PA fraction (right graph). Overexpression or underexpression of a KEGG term in PMD compared to FL or PA fractions are indicated by positive and negative percentage, respectively. Abbreviation of KEGG terms: metab, metabolism; info, information; process, processing; vitam, vitamins.

Supplementary files



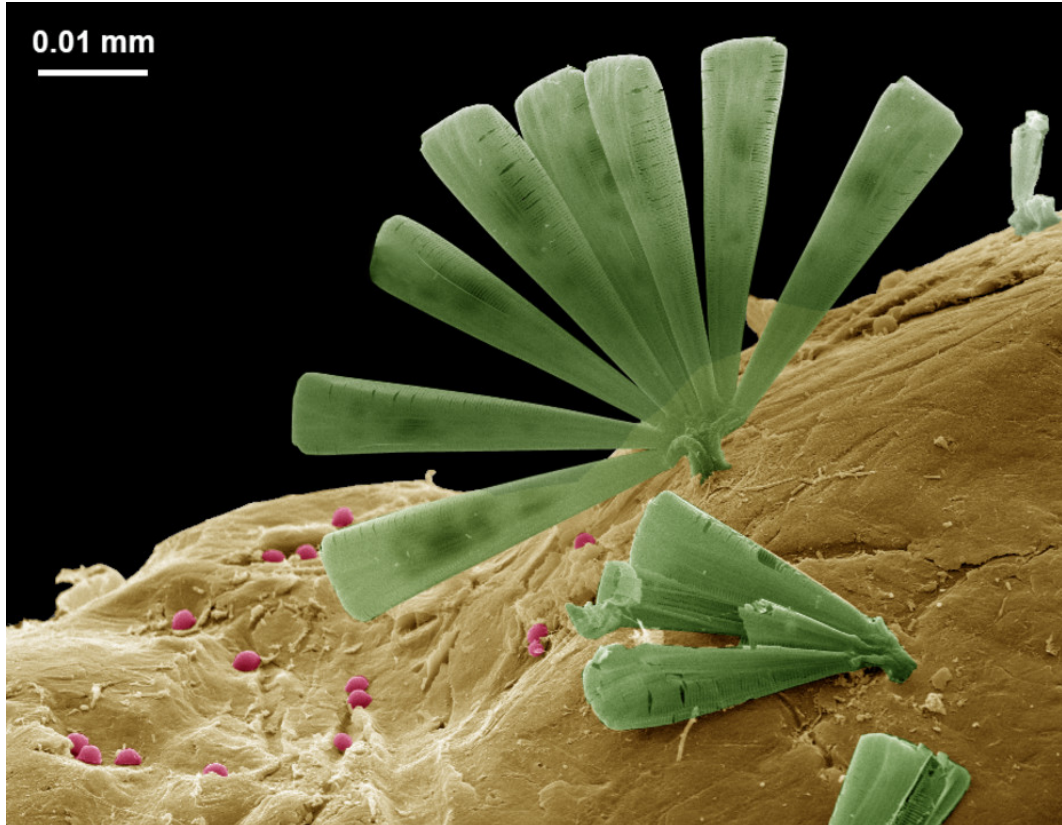
Supl. Figure S1: Canonical correspondence analysis of bacterial community structures living on plastics in relation to plastic characteristics (surface, shape and carbonyl index) and environmental variables (temperature, salinity, chlorophyll a, distance to the coast). Arrows point in the direction of increasing values of each variable and the length of the arrows indicates the degree of correlation with the represented axes. The first and second canonical axes explained 38 and 21% of the total variance, respectively. The remaining axes accounted for less than 13% of the total variance each and thus were not considered as significant enough.

Table S1: Contextual and physico-chemical data associated with the samples used in this study. PE: polyethylene, PP: polypropylene, PS: polystyrene, EVA: ethylene-vinyl acetate

Manta #	Study area	Latitude	Longitude	Distance to coast (km)	Composition	Shape	Color	Major size (mm)	Surface (mm ²)	Circularity	Carbonyl Index	Temperature	Salinity	Chl-a
M10P1	French Riviera (Monaco)	43.71	7.43	2.13	PE	pellet	white	4.92	15.77	0.67	1.61	ND	ND	ND
M10P2	French Riviera (Monaco)	43.71	7.43	2.13	PE	thick sheet	green	8.19	14.14	0.30	6.48	ND	ND	ND
M10P3	French Riviera (Monaco)	43.71	7.43	2.13	PE	sheet	white	11.67	56.43	0.19	9.84	ND	ND	ND
M15P3	Ligurian coast (Vintimiglia)	43.70	7.80	12.52	PE	sheet	white	13.37	88.43	0.16	10.66	ND	ND	ND
M15P4	Ligurian coast (Vintimiglia)	43.70	7.80	12.52	PP	sheet	transparent	17.31	164.10	0.46	8.06	ND	ND	ND
M19P1	French Riviera (Nice)	43.64	7.21	0.30	EVA	sheet	transparent	12.83	64.05	0.62	23.16	ND	ND	ND
M19P2	French Riviera (Nice)	43.64	7.21	0.30	Composite	sheet	white	21.04	234.02	0.52	43.09	ND	ND	ND
M20P1	French Riviera (Open sea)	43.46	7.54	28.82	PE	sheet	transparent	7.33	32.04	0.55	18.81	ND	ND	ND
M20P4	French Riviera (Open sea)	43.46	7.54	28.82	PE	sheet	transparent	5.02	16.05	0.75	23.86	ND	ND	ND
M20P6	French Riviera (Open sea)	43.46	7.54	28.82	PP	sheet	transparent	15.88	49.10	0.25	23.20	ND	ND	ND
M32P1	Gulf of Lions (Portoferraio)	42.86	10.18	5.15	PE	sheet	white	10.34	44.17	0.39	10.37	23.94	37.93	0.05
M32P2	Gulf of Lions (Portoferraio)	42.86	10.18	5.15	PE	pellet	white	6.28	22.25	0.60	13.49	23.94	37.93	0.05
M32P5	Gulf of Lions (Portoferraio)	42.86	10.18	5.15	PE	sheet	transparent	18.89	67.52	0.17	5.00	23.94	37.93	0.05
M32P6	Gulf of Lions (Portoferraio)	42.86	10.18	5.15	PE	sheet	transparent	6.46	16.51	0.38	8.08	23.94	37.93	0.05
M38P3	Gulf of Saint-Florent	42.82	9.29	2.85	PE	pellet	white	9.35	27.83	0.25	4.01	22.79	38.01	0.03
M42P1	Gulf of Saint-Florent (Open sea)	42.97	8.94	32.82	PE	sheet	transparent	3.41	8.34	0.56	17.39	23.21	38.09	0.04
M42P2	Gulf of Saint-Florent (Open sea)	42.97	8.94	32.82	PE	thick sheet	transparent	3.83	7.09	0.55	17.69	23.21	38.09	0.04
M42P3	Gulf of Saint-Florent (Open sea)	42.97	8.94	32.82	PE	sheet	transparent	7.21	12.63	0.31	9.94	23.21	38.09	0.04
M47P3	Tyrrhenian Sea (East Corsica)	42.26	9.66	8.59	PE	thick sheet	white	5.74	17.00	0.30	22.00	23.57	37.75	0.05
M47P5	Tyrrhenian Sea (East Corsica)	42.26	9.66	8.59	PE	sheet	white	6.07	16.57	0.30	14.90	23.57	37.75	0.05
M47P6	Tyrrhenian Sea (East Corsica)	42.26	9.66	8.59	PE	sheet	transparent	6.26	17.71	0.39	8.15	23.57	37.75	0.05
M51P2	Tyrrhenian Sea (East Corsica)	41.95	9.98	46.49	PP	sheet	transparent	5.59	17.63	0.62	8.85	24.06	37.87	0.03
M51P4	Tyrrhenian Sea (East Corsica)	41.95	9.98	46.49	PE	thick sheet	transparent	4.50	10.93	0.48	15.38	24.06	37.87	0.03
M56P1	Strait of Bonifacio (south Corsica)	41.37	9.17	0.65	Composite	sheet	white	9.95	50.25	0.42	15.82	22.27	38.04	0.04
M56P2	Strait of Bonifacio (south Corsica)	41.37	9.17	0.65	Composite	sheet	transparent	5.59	17.51	0.51	7.88	22.27	38.04	0.04
M60P1	Tyrrhenian Sea (East Sardinia)	41.04	10.66	94.45	PP	sheet	transparent	9.89	55.72	0.31	7.69	22.88	38.14	0.04
M60P4	Tyrrhenian Sea (East Sardinia)	41.04	10.66	94.45	PE	sheet	transparent	13.22	39.25	0.34	17.14	22.88	38.14	0.04
M60P5	Tyrrhenian Sea (North Sicily)	41.04	10.66	94.45	PE	sheet	transparent	8.21	17.78	0.24	1.92	22.88	38.14	0.04
M66P1	Tyrrhenian Sea (North Sicily)	39.00	12.42	68.01	PE	sheet	transparent	5.01	10.93	0.54	16.40	24.61	37.63	0.03
M66P2	Tyrrhenian Sea (North Sicily)	39.00	12.42	68.01	PE	pellet	transparent	4.39	13.68	0.65	24.30	24.61	37.63	0.03
M66P5	Tyrrhenian Sea (North Sicily)	39.00	12.42	68.01	PE	pellet	transparent	2.84	4.53	0.63	14.73	24.61	37.63	0.03
M165P1	Tyrrhenian Sea (Palermo)	38.27	13.82	32.52	PP	sheet	transparent	21.24	166.11	0.54	8.66	27.56	37.78	0.05
M165P3	Tyrrhenian Sea (Palermo)	38.27	13.82	32.52	PP	sheet	transparent	23.80	132.74	0.38	12.91	27.56	37.78	0.05
M165P5	Tyrrhenian Sea (Palermo)	38.27	13.82	32.52	PE	sheet	transparent	6.23	7.24	0.52	10.12	27.56	37.78	0.05
M173P1	Southeast Algerian Basin	37.36	7.15	30.04	PE	sheet	blue	14.06	88.99	0.36	9.46	26.41	37.36	0.04
M173P2	Southeast Algerian Basin	37.36	7.15	30.04	PE	sheet	transparent	17.19	83.78	0.32	7.56	26.41	37.36	0.04
M173P3	Southeast Algerian Basin	37.36	7.15	30.04	PE	sheet	orange	6.00	17.44	0.36	93.19	26.41	37.36	0.04
M173P4	Southeast Algerian Basin	37.36	7.15	30.04	PE	sheet	transparent	13.55	48.53	0.38	23.58	26.41	37.36	0.04
M178P2	Algerian Basin (Algiers)	37.73	3.80	91.86	PE	sheet	black	2.97	5.26	0.31	7.32	25.90	36.81	0.08
M178P3	Algerian Basin (Algiers)	37.73	3.80	91.86	PP	sheet	transparent	8.18	9.14	0.38	14.70	25.90	36.81	0.08
M178P4	Algerian Basin (Algiers)	37.73	3.80	91.86	PE	sheet	white	6.79	23.26	0.51	5.85	25.90	36.81	0.08
M189P1	Algerian Basin (Balearic Islands)	39.51	5.17	83.34	PE	thick sheet	white	7.87	24.94	0.29	12.46	26.37	37.46	0.02
M189P2	Algerian Basin (Balearic Islands)	39.51	5.17	83.34	PE	sheet	transparent	13.93	86.81	0.20	7.76	26.37	37.46	0.02
M189P3	Algerian Basin (Balearic Islands)	39.51	5.17	83.34	PE	sheet	transparent	8.24	17.90	0.36	17.48	26.37	37.46	0.02
M193P1	Algerian Basin (Balearic Islands)	40.47	5.27	100.01	PE	sheet	yellow	12.55	113.84	0.20	21.71	25.83	37.82	0.04
M193P2	Algerian Basin (Balearic Islands)	40.47	5.27	100.01	PE	pellet	light pink	10.57	14.95	0.30	14.10	25.83	37.82	0.04
M193P3	Algerian Basin (Balearic Islands)	40.47	5.27	100.01	PE	sheet	transparent	7.21	29.35	0.30	5.23	25.83	37.82	0.04
M193P4	Algerian Basin (Balearic Islands)	40.47	5.27	100.01	PE	sheet	blue	6.99	10.67	0.34	6.67	25.83	37.82	0.04
M202P1	Gulf of Lions (Marseille)	43.26	5.34	2.04	Composite	sheet	transparent	19.13	118.52	0.40	3.19	22.46	38.28	0.04
M202P2	Gulf of Lions (Marseille)	43.26	5.34	2.04	PS	sheet	transparent	7.22	36.46	0.46	22.00	22.46	38.28	0.04
M202P3	Gulf of Lions (Marseille)	43.26	5.34	2.04	PS	sheet	transparent	8.21	31.88	0.42	21.77	22.46	38.28	0.04
M234P1	Tyrrhenian Sea (Naples)	40.62	13.74	13.89	PP	sheet	white	7.00	17.03	0.45	12.82	23.87	37.90	0.04
M234P2	Tyrrhenian Sea (Naples)	40.62	13.74	13.89	PP	sheet	transparent	10.57	49.34	0.60	11.70	23.87	37.90	0.04
M238P5	Tyrrhenian Sea (Naples)	40.71	14.12	11.54	PP	sheet	transparent	9.39	38.24	0.48	11.80	23.78	37.95	0.04
M238P6	Tyrrhenian Sea (Naples)	40.71	14.12	11.54	PE	sheet	white	7.43	28.70	0.11	6.48	23.78	37.95	0.04
M238P7	Tyrrhenian Sea (Naples)	40.71	14.12	11.54	PE	sheet	transparent	6.03	20.87	0.39	10.98	23.78	37.95	0.04
M263P1	Gulf of Lions (Perpignan)	42.49	3.45	25.37	PE	sheet	white	12.49	70.84	0.34	11.22	22.26	38.24	0.03
M263P10	Gulf of Lions (Perpignan)	42.49	3.45	25.37	PE	thick sheet	white	3.02	5.05	0.40	8.91	22.26	38.24	0.03
M269P2	Balearic Sea (Barcelona)	41.23	2.13	6.87	PE	pellet	white	5.15	19.29	0.55	16.80	21.56	38.18	0.05
M269P3	Balearic Sea (Barcelona)	41.23	2.13	6.87	PE	sheet	green	10.57	66.04	0.30	7.54	21.56	38.18	0.05
M277P4	Balearic Sea (Gulf of Valencia)	39.00	0.77	55.73	PE	sheet	transparent	15.29	109.20	0.34	6.53	21.67	38.18	ND
M277P6	Balearic Sea (Gulf of Valencia)	39.00	0.77	55.73	PE	sheet	white	4.12	9.86	0.50	6.91	21.67	38.18	ND
M280P2	Balearic Sea (Costa Blanca)	38.27	-0.28	44.11	PP	sheet	green	7.31	17.82	0.37	14.07	23.07	38.07	ND
M280P5	Balearic Sea (Costa Blanca)	38.27	-0.28	44.11	PE	sheet	white	8.10	37.90	0.40	11.90	23.07	38.07	ND
M280P7	Balearic Sea (Costa Blanca)	38.27	-0.28	44.11	PE	sheet	white	4.12	4.78	0.40	19.61	23.07	38.07	ND
M283P4	Balearic Sea (Cartagena)	37.48	0.73	126.92	PP	sheet	transparent	9.10	49.41	0.24	18.97	22.10	37.92	ND
M283P5	Balearic Sea (Cartagena)	37.48	0.73	126.92	PE	pellet	transparent	4.05	10.71	0.44	22.25	22.10	37.92	ND
M283P6	Balearic Sea (Cartagena)	37.48	0.73	126.92	PE	sheet	transparent	8.65	25.85	0.23	25.30	22.10	37.92	ND
M285P1	Alboran Sea (Strait of Gibraltar)	36.12	-5.04	26.37	PE	sheet	white	15.05	127.58	0.05	13.92	18.46	36.43	ND
M285P4	Alboran Sea (Strait of Gibraltar)	36.12	-5.04	26.37	PE	sheet	transparent	9.59	57.38	0.42	4.49	18.46	36.43	ND
M285P5	Alboran Sea (Strait of Gibraltar)	36.12	-5.04	26.37	PP	sheet	transparent	9.77	46.43	0.45	4.97	18.46	36.43	ND
M285P6	Alboran Sea (Strait of Gibraltar)	36.12	-5.04	26.37	PE	thick sheet	white	7.70	22.67	0.25	12.80	18.46	36.43	ND

Chapitre 3

Successions de populations bactériennes sur différents polymères dans les premiers stades de colonisation en milieu marin



Bacteria and diatoms on polymer surface, SEM. © Reisser J & Shaw J

Chapitre 3 Article n°2

1. Préambule

Après avoir caractérisé les communautés bactériennes présentes sur des débris plastiques récoltés en milieu naturel, l'objectif était de suivre les différentes phases du développement du biofilm sur différents types de polymères, dans des conditions contrôlées mais le plus proche possible des conditions environnementales (Fig. 23). Toujours en gardant à l'esprit de comparer les communautés bactériennes entre les plastiques et l'eau de mer environnante, un système de courant continu a été installé pour avoir un renouvellement de l'eau et se rapprocher au mieux des conditions environnementales naturelles. Au regard de ce qui a été exposé dans l'état de l'art, les connaissances sur la dynamique de colonisation sur les surfaces plastiques restaient à étoffer. Cette étude apporte donc une nouvelle pièce au puzzle en analysant la colonisation de surfaces rarement étudiées comme l'OXO ou le PHVB. Le vieillissement artificiel du film OXO a également permis de reproduire une altération naturelle mais accélérée, pour évaluer le devenir dans l'environnement marin d'un polymère OXO pré-vieilli (AA-OXO) par comparaison à un polymère PE pré-vieilli (AA-PE) et aux polymères non-vieillis. De plus, ces travaux apportent pour la première fois une estimation de l'activité hétérotrophe bactérienne sur les surfaces plastiques par technique d'incorporation de leucine tritiée. *J'ai toujours été étonnée de la quantité de cellules bactériennes présentes sur ces surfaces artificielles, je l'ai été encore plus lorsque j'ai observé pendant cette étude, la rapidité avec laquelle elles se développent et l'importante activité qu'elles possèdent sur les plastiques par rapport à l'eau de mer.* A l'aide du Laboratoire Charles Coulomb de Montpellier, nous avons pu faire l'analyse couplée originale de nos données biologiques à celles de données physico-chimiques des polymères. L'article qui suit donne de nouveaux résultats sur la cinétique de colonisation bactérienne de plastiques conventionnels et (bio)dégradables et met en évidence l'importance des caractéristiques physico-chimiques des surfaces dans le développement du biofilm.

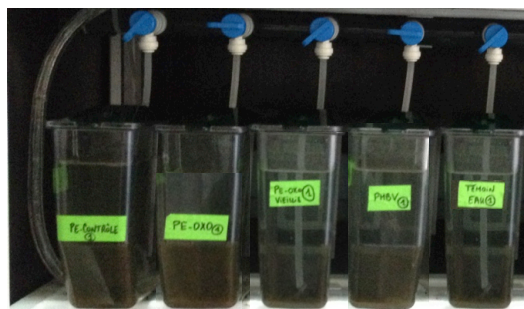


Figure 23 : Installation de l'expérience microcosmes n°1 pour effectuer le suivi de colonisation bactérienne sur des films PE, OXO, AA-OXO et PHBV sur 6 semaines.

2. Article n°2 : Colonization of conventional and (bio)degradable polymers by marine microorganisms.

Dussud C¹, Meistertzheim AL¹, Hudec C¹, Pujo-Pay M¹, Conan P¹, George M², Fabre P², Higgs P³, Eyheraguibel B⁴, Delort AM⁴, Bruzard S⁵, Ghiglione JF^{1*}

¹Sorbonne Universités, CNRS, UPMC Univ Paris 06, UMR 7621, Laboratoire d'Océanographie Microbienne, Observatoire Océanologique de Banyuls, Banyuls sur mer, France

²Laboratoire Charles Coulomb (L2C), Univ. Montpellier, CNRS, Montpellier, France.

³Symphony Environmental Ltd, Borehamwood, Hertfordshire WD6 1JD, UK.

⁴ Université Clermont Auvergne, CNRS, SIGMA Clermont, Institut de Chimie (ICCF), Clermont– Ferrand -France

⁵ Institut de Recherche Dupuy de Lôme (IRDL), FRE CNRS 3744, Université de Bretagne-Sud, Rue de Saint Maudé, 56321 Lorient Cedex, France

***Corresponding author:**

JF Ghiglione, Laboratoire d'Océanographie Microbienne, Observatoire Océanologique de Banyuls, Avenue Fontaulé, F-66650 Banyuls/mer, France. Tel.: + 33 (0) 4 68 88 73 16. E-mail address: ghiglione@obs-banyuls.fr

Abstract

Plastics are ubiquitous in the oceans and biofouling is a capital issue to understand ecological impacts and fate of this type of debris. Recent studies revealed a large diversity of microorganisms living on plastic (called “plastisphere”) in marine environments. In this study, we investigated the different steps of plastic colonization of conventional (low-density polyethylene, PE), oxodegradable (thermo-aged, AA-OXO or not, OXO) and biodegradable (poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate), PHBV) plastics. We combined measurements of physical surface properties of polymers (hydrophobicity, roughness) with microbiological characterization of the biofilm (cell counts, taxonomic composition, heterotrophic activity) using a wide range of techniques, some of which being used for the first time on plastics. Our experimental setup using microcosms with natural circulating seawater allowed us to characterize the primo-colonization, growing and maturation phases of the biofilm within 6 weeks incubation. We highlighted different trends between polymer types of different surface properties and composition, the AA-OXO and PHBV presenting higher colonization by very active and specific bacteria compared to other polymers. Succession of bacterial population occurred during the three colonization phases, with hydrocarbonoclastic bacteria being highly present in all plastic types. This study brings original data on the dynamic of the plastisphere and gives new insights on the fate of conventional and ‘biodegradable’ polymers in the oceans.

Introduction

Within a few decades, plastic has become the biggest form of pollution in the world's oceans (70 to 80% of marine litter consists of plastic), due to its very slow degradability and the growing accumulation of human waste products (Gewert *et al.*, 2015). The increasing awareness of this relatively recent environmental invasion has been accompanied by a growing number of studies which currently give an estimation of ± 5.25 trillion plastic particles within the world's oceans (Law, 2017). When released into the environment, plastic litter is fragmented by both physical and chemical processes into small pieces ($< 5\text{mm}$), commonly referred to as "microplastics" (MPs) (Barnes *et al.*, 2009). MPs represent more than 90% of the total counts of plastic debris at the sea surface (Eriksen *et al.*, 2014). At sea, they are almost immediately coated by inorganic and organic matter (so called the "conditioning film"), which is then rapidly colonized by microorganisms that form a biofilm on their surfaces (Loeb and Neihof, 1975) (Cooksey and Wigglesworth-Cooksey, 1995).

Bacterial biofilms are defined as surface-associated bacterial communities which are embedded within an exopolymeric substance matrix (EPS) (Costerton *et al.*, 1995). These natural assemblages act as a form of protection, nutritive resource, and offer metabolic cooperativity and an increase in the possibility of gene transfer amongst the residing cells (Davey and O'toole, 2000). The successive steps of such biofilm formations are well described within marine waters on artificial (glass, acryl, steel) or natural (rocks, algae) surfaces (Dang and Lovell, 2000; Salta *et al.*, 2013). First, "pioneer bacteria" colonize the surface particle through a step called "reversible attachment", where they interact with the conditioning film and form the first layer of the initial biofilm. "The growth of these primary colonizers" characterizes the second step which induces a modification in the properties of the substratum and promotes "irreversible attachment" by active mechanisms such as pili,

adhesion proteins and EPS produced by secondary species. This recruitment permits the construction of the biofilm community. The third step concerns “biofilm maturation” and occurs through diverse interactions between cells (competitive or synergistic interactions) with either recruitment or loss of species (Lorite *et al.*, 2011).

Few studies have described, to some extent, the biofilm formation steps present during the colonization of plastic surfaces in marine environments. Previous studies have characterized the early stage processes in microbial attachment to polyethylene (PE) plastic bags and microplastics during the 3 first weeks in seawater (Lobelle and Cunliffe, 2011) and in marine sediments (Harrison *et al.*, 2014). Other scientific articles have described long-term biofilm formation on PE for a period of 6 months on the seafloor, in the seawater column (using sheets and dolly ropes) (De Tender *et al.*, 2017a) or on polyethylene terephthalate (Webb *et al.*, 2009). These studies were mostly based on SEM observations and taxonomic identification of the present bacterial communities, but almost none have focused on bacterial abundance and activity. As far as we know, only one study has described colonization on PE and biosourced polymer within the marine environment and compared biofilm quantities and activities (O₂ concentration) between the two plastics after 15 and 33 days (Eich *et al.*, 2015). However, no DNA sequencing was done throughout the course of that experiment. Moreover, the formation of a biofilm is strongly dependent on substrate properties including hydrophobicity/hydrophilicity, structure and roughness, which are rarely taken into account in the description of plastic colonization (Lorite *et al.* 2011).

In 2013, it was revealed that plastic bacterial communities differ from those found in the surrounding water (Zettler *et al.*, 2013) and that the concentration of plastic litter is drastically increasing (Law, 2017), suggesting that the “plastisphere” could potentially play an important role in global microbial ecology. Because plastics serve as an attachment site, or “raft” for some marine species, its dispersal across bodies of water could ultimately lead to an

ecosystem disturbance through the introduction of possible invasive species (Bravo *et al.*, 2011). The understanding of the dynamics of plastic biofilm formation, its activity and modification therefore represent essential issues that need to be tackled.

Polyethylene (PE) dominates the composition of plastic waste found at the sea surface, followed by polypropylene (PP), and polystyrene (PS) (Auta *et al.*, 2017). PE is a very recalcitrant material due to its stable aliphatic chains (Tokiwa *et al.*, 2009). Within the frame of sustainable development, a wide range of degradable and biodegradable plastics have been developed and classified into two major groups: oxo-degradable (OXO) and inherently hydrolysable plastics (Vasquez *et al.* 2016). The former are conventional petroleum-based polymers, usually synthesized from PE to which a pro-degrading agent has been added to accelerate the degradation process. After abiotic degradation through peroxidation, which is accelerated by heat and UV light, a biodegradation process takes place once the polymer has reached a low molecular weight (<1500 Da) (Eyheraguibel *et al.* 2017). Hydrolysable plastics, on the other hand, are generally synthesized from renewable sources such as microorganisms, cellulose and starch and are derivatives from polymers such as polyhydroxyalkanoates (PHA) and polylactic acid (PLA). PHA which are microbial polyesters, have received considerable attention in the research community, being considered as promising biopolymers for the substitution of traditional plastics in some specific cases. They are versatile biobased polyesters produced by numerous bacterial species as intracellular storage compounds of carbon and energy (Elain *et al.*, 2015). The PHA production using carbon substrates in the presence of bacteria calls for the biotechnological processes as fermentation, which can offer a virtuous alternative to the chemical processes usually developed for the polymer elaboration (Elain *et al.*, 2016). PHA have many other advantages like biocompatibility and thermoplastic processing capacity. Moreover, their mechanical properties are similar to various synthetic thermoplastics (Corre *et al.*, 2012).

Their degradation takes place mainly through hydrolysis and biological uptake (Nampoothiri *et al.* 2010). Within the terrestrial environment, studies have shown that the micro-organisms which predominantly degrade PHA belong to the *Pseudonocardiaceae*, *Micromonosporaceae*, *Thermomonosporaceae*, *Streptosporangiaceae* and *Streptomycetaceae* families (Tokiwa and Calabia, 2004). Ammala *et al.* (2011) published a list of bacterial species known to degrade biodegradable polyolefin such as OXO in controlled conditions from a variety of different sources (culture collections, soil, marine environment (Sudhakar *et al.*, 2008), and laboratory isolates) (Ammala *et al.*, 2011). To our knowledge, the colonization of both oxo-degradable and hydrolysable plastics has never been studied within the marine environment.

In this study, we characterize the colonization steps of marine bacteria on microplastics from low-density polyethylene (PE), low-density oxo-degradable polymer based polyethylene after thermo-ageing (AA-OXO) or without thermo-aging (OXO), and one kind of PHA as poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-valerate) (PHBV). Colonization was monitored for a period of 45 days in marine water from the Bay of Banyuls (NW Mediterranean sea) in order to characterize the polymer surface physical properties (contact angle, roughness) as well as the colonizing bacterial communities (abundance, diversity and heterotrophic activity).

Material and methods

Polymer pieces preparation and microcosm conditions

In this study, we used four types of polymer: conventional low density polyethylene (PE), oxodegradable PE (OXO) (containing manganese/iron pro-oxidant additive, supplied by Symphony Environmental Ltd, United Kingdom), aged oxodegradable PE (thermal ageing during 6 months at 70°C of the same OXO formulation) (AA-OXO), and poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyvalerate) (PHBV) (provided by University of South Brittany, France). PHBV has the following characteristics: density = 1.25 g.cm⁻¹, T_g ≈ 4°C, T_m = 175°C and an average molecular weight $\overline{M}_w \approx 400 \text{ kg.mol}^{-1}$, with a melt-flow index (MFI) = 3.6 g/10 min (210°C, 2.16 kg). This grade has been comprehensively characterized in a previous paper (Corre *et al.*, 2012). Prior to compression molding, the PHBV pellets were dried over 12h under vacuum at 60°C to minimize the hydrolytic PHBV degradation during processing and compression molded in a Carver® hydraulic press at 180°C under a pressure of 10 metric tons for 3 min to obtain films of about 200µm of thickness. The PE, OXO and AA-OXO polymer films presented thickness of 100µm. Each type of polymer films was cut into 100 circular pieces of 9 mm diameter (area = 63.6 µm²) with a puncher machine, except for AA-OXO that presented already mean area of 13.9 µm² (SD = 4.8 µm²) after thermal ageing. Each polymer pieces were sterilized with 70% ethanol and rinsed with sterile seawater (SSW) before incubation in microcosms detailed hereafter.

We used 5 identical microcosms consisting in trays of 1.8L capacity (polycarbonate PC, Sodispan, Spain) continually renewed with 20µm pre-filtered seawater (2 successive polypropylene PP filters in a filtration station, Leroy Merlin, France) by individual water delivery valves and overflow ports setting a flow rate of 0.1 L min⁻¹. Seawater was pumped at 30 m from the coast at 4m depth in the Banyuls bay, closed to the SOLA observatory station (NW Mediterranean Sea, France). Seawater temperature in the

microcosms and in the Banyuls bay was between 12.5°C and 13.5°C and salinity was 38.5 during the course of the experiment. Microcosms were incubated in the dark to avoid UV-related degradation of the polymers and algal development. One of the microcosms was used as control containing circulating seawater only without polymer (called ‘control microcosm’ hereafter) and the 4 other microcosms contained the polymer pieces of one of the composition (PE, OXO, AA-OXO, PHBV). Polymer pieces of each type were sampled after 7, 15, 22, 30 and 45 days.

Atomic Force Microscopy

One polymer piece of each polymer were rinsed at each sampling times with sterile seawater (SSW) and fixed for at least 1h at 4°C with 1% (v/v) glutaraldehyde (final concentration) before freezing. Atomic force microscopy (AFM) was performed on each sample to get accurate insight of the surface state of the polymer. At least three 40x40 μm^2 areas were acquired at different points of each sample, using a Nanoscope V (Bruker instruments, Madison, WI, USA) in dynamic mode (Binnig and Quate, 1986) and standard silicon probes (Bruker, TESP-V2). Root mean square roughness (RMS) of the polymer surface were measured on 40x40 μm^2 height images with Gwyddion software, using masks to remove bacteria cells and other organic deposits from the measurements. Boxes of gradual sizes (10, 20, 30 and 40 μm) were used to estimate RMS standard deviation and to check the dependence of the RMS on the lateral size of the picture. On every samples, a plateau was reached at 30 μm .

Contact angle measurement

Contact angles (sterile sea water/air/polymer) were measured on each polymer, in its initial state and after 7 days of immersion in sterile seawater, using Profile Analyse

Tensiometer PAT1M (SINTERFACE Technologies, Berlin, Germany). A serial of profile was acquired for three different droplets on each sample during successive swelling and depletion stages. This serial was analysed using DropSnake (a plugin to Image J) (Stalder *et al.* 2006) to get the receding and advancing angle in each case. For each polymer, 3–6 measurements were made at different locations of the surface.

Epifluorescence microscopy

One polymer piece of each polymer were rinsed at each sampling times with sterile seawater (SSW) and fixed for at least 1h at 4°C with 1% (v/v) glutaraldehyde (final concentration) before freezing. Epifluorescence microscopy observations were done using an Olympus AX-70 PROVIS after 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining according to Porter and Feig (1980). Pictures were taken on 10 fields of each polymer type (Microbe Counter software). The covering of the surface area of the polymer by bacterial cells and by biofilm (cells + EPS) were determined using Image J software.

Flow cytometry

Three pieces of polymer pieces of each polymer were rinsed at each sampling times with sterile seawater (SSW) and fixed for at least 1h at 4°C with 1% (v/v) glutaraldehyde (final concentration) before freezing. In parallel, 3 x 1 mL of 3 µm filtered seawater (polycarbonate, 47 mm diameter, Whatman) from the control microcosm were also fixed using the same procedure. Bacterial cells were enumerated by flow cytometry after cell detachment, using 1mM pyrophosphate (1 mM final concentration, 30 min at room temperature in darkness) and sonication (3 x 5 seconds, 40kHz, 30% amplitude, sterilized probe Branson SLPe). This pre-treatment step was optimized by cell detachment protocol setup on each polymer substrates, when comparing flow cytometry and epifluorescence

microscopy cell counts with different pre-treatment conditions (data not shown). A 500- μ l subsample was mixed with the nucleic acid dye SYBR Green I (final concentration 0.05% [v/v], Sigma Aldrich) at room temperature for 15 min in darkness. Cell counts were performed with a FACSCanto II flow cytometer (BD Bioscience, San Jose, CA) equipped with a blue laser (488-nm, air-cooled, 20-mW solid state), as previously described (Mével *et al.*, 2008). Cell counts were expressed as number of cells cm^{-2} for polymers and cell ml^{-1} for seawater. Cell enrichment factors were calculated by the ratio between bacterial counts on polymer and in seawater, brought forward to a same volume of 1 cm^3 when considering a polymer thickness of 100 (PE, OXO, AA-OXO) or 200 μm (PHBV).

Heterotrophic bacterial production (BP)

BP was measured for each polymer type and sampling time by ^3H -leucine incorporation into proteins using a modified protocol from the filtration method (Kirchman *et al.* 1993). Briefly, ^3H -leucine (specific activity 112 Ci.mmol^{-1} ; Perkin Elmer) was added at final concentration of 1 nM (completed with cold leucine to 150nM) in triplicate polymer samples and 4.3nM to triplicate of 3 μm filtered seawater from the control microcosm (completed with cold leucine to 42.8 nM). Samples were incubated in the dark at *in situ* temperature for 3h in triplicate samples. We used the empirical conversion factor of 1.55 ng C. pmol^{-1} of incorporated leucine to calculate BP (Simon and Azam, 1989). Values were given in ng C $\text{dm}^{-2} \text{h}^{-1}$ for polymers and in ng C $\text{ml}^{-1} \text{h}^{-1}$ for seawater. Cell-specific activities were calculated by the ratio between BP and cell counts obtained with flow cytometry, where values were given in ng C $\text{cell}^{-1} \text{dm}^{-2} \text{h}^{-1}$ for polymers and ng C $\text{cell}^{-1} \text{L}^{-1} \text{h}^{-1}$ for seawater. BP enrichment factors were calculated by the ratio between BP on polymer and in seawater, brought forward to a same volume of 1 cm^3 when considering a polymer thickness of 100 (PE, OXO, AA-OXO) or 200 μm (PHBV).

DNA Extraction, PCR and sequencing

Four replicates were sampled for all polymer types and stored at -80°C until analysis. In parallel, 1 L seawater was sampled in the control microcosm, successively filtered onto 3µm and 0.2 µm-pore size polycarbonate filters (47mm diameter, Nucleopore) and filters were stored at -80°C until analysis. DNA extraction was performed on polymers or seawater at all sampling times, except day 15, using a classical phenol-chloroform method for seawater samples (Ghiglione *et al.*, 1999) and a slight modification of the method for the polymer samples. Briefly, the modification consisted in a sonication pretreatment (3 x 5 seconds with 30% amplitude, sterilized probe Branson SLPe), which was applied to increase the detachment of bacteria forming the biofilm. This pretreatment step was optimized by using different sonication procedures together (or not) with addition of different concentrations of pyrophosphate, which was proved useless in our conditions by microscopic evidence of cell detachment (data not shown). The molecular size and the purity of the DNA extracts were analyzed by agarose gel electrophoresis (1%) and the DNA was quantified by spectrophotometry (GeneQuant II, Pharmacia Biotech).

Primers for PCR amplification of the 16S V3–V5 region were 515F-Y and 926R, particularly well suited for marine samples according to Parada *et al.* (2016), with Illumina-specific primers and barcodes. Sequencing was performed on Illumina MiSeq by Research and Testing Laboratories (Lubbock, TX). Raw FASTA files were deposited at GenBank under the accession number XXX (*en cours de soumission à GenBank*). Paired raw reads were joined, quality-filtered and assigned to taxa using Qiime pipelines, as previously described (Severin *et al.*, 2016). Operational taxonomic units (OTUs) were defined as clusters sharing 97 % sequence identity. Only Bacteria were treated in this study, due to the small number of Archaea reads. Bacterial sequences were randomly resampled in the OTU

file to enable comparison between samples, by normalizing the number of sequences between samples to the sample with the fewest sequences (n=6,186) using MacQiime 1.9.0 (single_rarefaction.py). All further analyses were performed on the randomly re-sampled OTU table. Finally, 265,998 sequences splitted in 823 OTUs were obtained.

Statistical analysis

Alpha diversity was estimated by non-parametric Chao1 species richness estimator using SPADE software; together with Simpson, Shannon and Pielou diversity indexes using PRIMER 6 (PRIMER-E, UK). Differences between polymers and seawater richness and diversity indexes were tested using a post-hoc LSD test after an ANOVA test (Statistica software). Unweighted-pair group method with arithmetic mean (UPGMA) dendrogram based on Bray-Curtis similarities was used for visualization of beta-diversity. One-way analysis of similarity was performed on the same distance matrix (ANOSIM, PRIMER 6) to test the significant difference and to partition the variance of the beta-diversity matrix between polymer types and seawater. Significant correlations between environmental variables were tracked using Spearman rank pairwise correlations analysis.

Results

Polymers surface state characteristics

We used AFM analysis to get information about the surface state of PE, OXO, AA-OXO and PHBV in our experimental conditions (Fig 1). Initially, PE, OXO, AA-OXO present a rather smooth surface, in agreement with a very fine semi-cristalline structure (well dispersed crystallite of about 100nm size). On the contrary, PHBV shows an initial spherulite structure (of about 20 micron in diameter). Whereas the first three polymers do not present important surface modifications with increasing time of immersion up to 45 days, PHBV spherulite structure goes through important morphological alteration, with clear evidences of swelling and erosion that can be observed by AFM.

To get a quantitative indicator of the surface alterations, RMS roughness were measured on $40 \times 40 \mu\text{m}^2$ pictures of every samples (Table 1). Initial PE showed the lowest roughness with $56 \pm 7 \text{ nm}$ at ambient air. It did not change much after immersion until 22 days and slightly increased after 45 days in seawater ($\text{RMS} = 84 \pm 9 \text{ nm}$). OXO roughness presented the same kind of evolution with values a little bit higher. AA-OXO roughness is in the same range of previous polymers fluctuating between 63 and 110 nm in the first 22 days. It should be noted that AA-OXO roughness could not be measured at D45 due to too many cells covering the surface that couldn't be removed. In all these polymers, the evolution of the roughness is relatively small and in the same range over the 45 days of observation. On the contrary, PHBV presented a much higher roughness compared to other polymers with $208 \pm 21 \text{ nm}$ at ambient air. It presented large fluctuation after immersion over time, with a global increasing trend, following the important alteration of the initial spherulite structure. The maximum value of RMS was attained for PHBV at D45 (4 times higher than PE), where surface erosion was clearly visible in AFM micrographs.

Advancing and receding contact angles (sterile sea water/air/polymer) were measured for initial samples and after 7 days of immersion in sterile seawater (figure 1 and table 1. Conventional PE presented the highest hydrophobicity, followed by OXO and AA-OXO. PHBV samples showed similar hydrophobicity as PE. After immersion, we observed a decrease of both the advancing and receding contact angles for all polymers, suggesting that all polymers became more hydrophilic after immersion, regardless of their initial hydrophobicity.

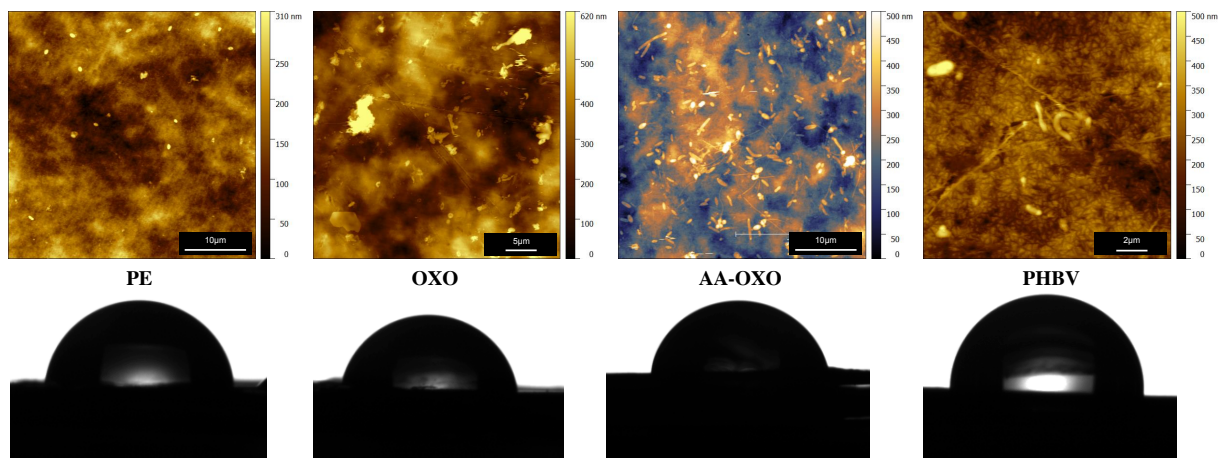


Figure 1

Atomic force microscopy images of PE, OXO, AA-OXO and PHBV polymer surfaces after 7 immersion days in seawater showing different amount of bacterial cells during the primo-colonization stage (upper image). Contact angle drops of the four polymers after 7 days in seawater showing different levels of surface hydrophobicity (lower image).

Dynamic of bacterial cell counts on polymers and surrounding waters

Epifluorescence microscopic observations highlighted three biofilm formation phases, similar in PE and OXO films (Fig 2). First, a primo-colonization phase (from the immersion at day 0 to day 7) was characterized by single cells spreading out homogenously on the surface (1% cell covering for PE). Second, the biofilm growing phase from days 15 to 22 corresponded to an increase of cell number and cell covering (5.1% cell covering for PE), with aggregated cells organized in a “patchy” distribution on the films. Third, the biofilm

maturation phase from days 22 to 45 was accompanied by a stabilization of the cell counts, an increase on the surface covered by the biofilm (from 15.1% to 29.2% for PE, respectively) and increase of EPS from the days 30 to 45 clearly observed on micrographs.

Unfortunately, microscopic observations were not possible for AA-OXO and PHBV because of strong background auto-fluorescence under UV light. For these polymers, only cell counts were made available by using flow cytometry measurements. Comparison between cells counts obtained by epifluorescence or by flow cytometry procedures gave very similar results for PE and OXO ($\pm 0.4 \times 10^5$ cells cm^{-2}) (Table 1).

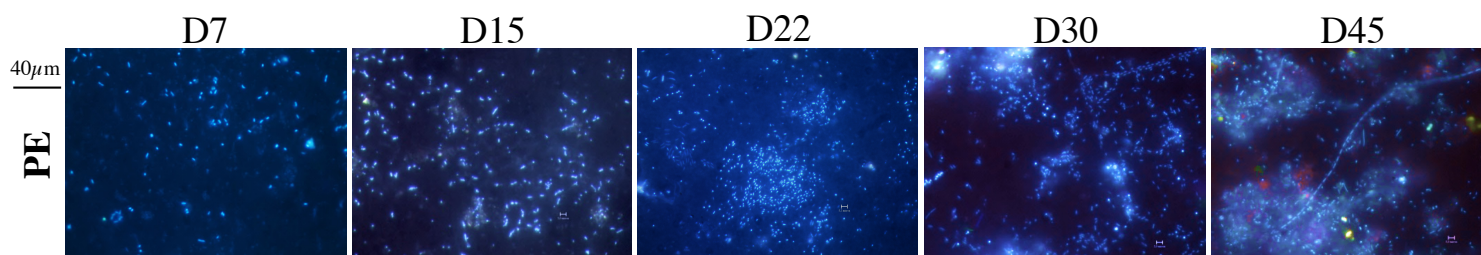


Figure 2

Epifluorescence microscopy images of PE biofilm development from 7 to 45 days in seawater.

Cytometry measurements (Table 1) gave the same patterns than microscopy observations and revealed a rapid colonization of the 4 polymers. From the day 7, biofilms cell concentration reached 1.25×10^5 cells. cm^{-2} (PHBV) to 9.25×10^5 cells. cm^{-2} (AA-OXO), at this primo-colonization state only AA-OXO showed significant highly cell abundance.

During the biofilm growth (Day 15) the cell concentration increased on all polymers and was significantly higher than cell abundance in surrounding water. Cells concentration on PHBV and AA-OXO biofilms were around 10 times higher than the other surfaces.

After day 15, cell abundance stabilization was noticed for PHBV like PE and OXO. Contrariwise, cell abundance continued to increase until 3.41×10^6 cells. cm^{-2} on AA-OXO

surface, so the stabilization stage was not reached. At the 6th week, AA-OXO sample showed the higher cell concentration followed by PHBV; PE and OXO that were nearer of SW.

Enrichment factor was over 100 during all the experimentation whatever the polymer. During the primo-colonization only AA-OXO EF was significantly higher (EF = 800). PHBV and AA-OXO reached maximum values at the growth stage (1705 and 1808 respectively) while PE and OXO EF were around 400. For PE and OXO the stabilization stage was characterized by a decrease of the EF until starting values. The AA-OXO EF kept high values of 1111.

Community successions on polymers

Next-generation DNA sequencing resulted in 265,998 tags falling into 823 bacterial OTUs at 97% similarity level, after randomly resampling to 6,186 sequences per sample to provide statistical robustness when comparing diversity measures among samples. NMDS analysis showed different bacterial community structure between the 4 polymers and seawater samples that formed a separated cluster with high Bray Curtis similarities (>70%) during the course of the experiment.

Overall, bacterial community structure of all polymer types showed spectacular changes between the primo-colonization phase compared to the growing and maturation phases. Indeed, a separated cluster was observed that included all polymer types sampled at day 7, with low similarity (<25%) with other samples. Within this cluster, PHBV community structure differed significantly (SIMPROF test) from the other polymer types (Bray Curtis similarity of 30%). The temporal dynamic of the bacterial assemblages during the growing and maturation phases were dependent of the polymer type. PE and OXO biofilms formed separated but close sub-clusters (53% similarity) and showed few changes (>55% similarity)

from days 22 to 45. Inversely, both communities from AA-OXO and PHBV presented strong changes during this period (<38% similarity from day 22 to day 45 between samples from the same polymer type).

The equitability (Pielou) on PE was significantly higher than AA-OXO, PHBV and SW (LSD test, p-value < 0.05). The diversity (Shannon index) was also higher on PE compared to AA-OXO (LSD test, p-value < 0.05). The variability observed on the diversity indexes (Shannon, Pielou, Chao1 and Simpson) was explained by the composition of the polymer (ANOVA test, p < 0.05) but not by the time. Shannon index range was from 2.8 to 3.9 and for Pielou index values were spread between 0.5 (AA-OXO D22) and 0.8 (PE D22). The minimum values expressed by Chao1 index were from 113 (OXO D7) and 322 (PHBV D45). This irregularity was noticed for polymers and not for surrounding water for which Shannon index was around 3.1 and Pielou index at 0.6 during the 6 weeks. The different stages of biofilm formation were not detected within the diversity indexes evolution.

Taxonomic analysis confirmed the specificity of the polymer community structure compared to surrounding water, the later being dominated by Alphaproteobacteria, Flavobacteria, Cyanobacteria and Actinobacteria throughout the experimentation (Fig 3). For the 4 polymer types, primo-colonizers were dominated by Gammaproteobacteria at day 7, which represented between 45 and 75% of the communities (Fig 3). This class was mainly dominated by *Alcanivorax sp.*, *Aestuariicella hydrocarbonica*, *Alteromonas sp.*, and *Thalassolituus sp.* followed by *Marinobacter sp.* and *Maricurvus* (Fig. 4). On PHBV, *Neptuniibacter sp.* encountered for more than 30% of the community, whereas this OTU was not detected on PE, OXO and AA-OXO.

As observed by NDMS analysis, PE and OXO samples do not varied greatly during the growing (days 15 to 22) and maturation phases (days 22 to 45) of the biofilms.

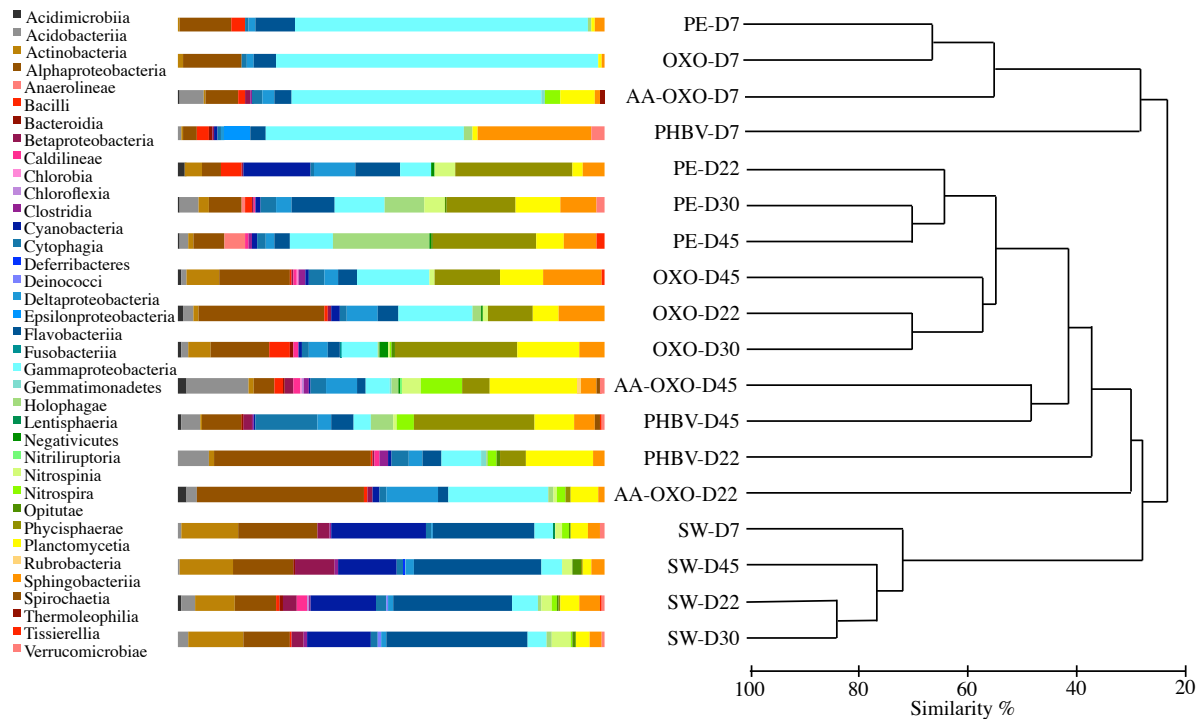


Figure 3

Clustering dendrograms of the four polymers and water according to the sampling time calculated by average clustering criteria (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean, UPGMA) based on Bray-Curtis similarities (right).

Cumulative bar charts comparing the relative class abundances between seawater and polymers according to immersion time (left).

Then during the growth stage (from D22), Gammaproteobacteria decreased and Alphaproteobacteria increased in proportion especially for OXO, AA-OXO and PHBV. The classes Phycisphaerae, Planctomycetia and Sphingobacteriia also increased during the next colonization steps in variable proportions. *Croceibacter sp.* became the majoritary OTU on PE, on OXO it was *Sneathiella glossodoripedis* (and many Unclassifieds). At the stabilization step or final growth, the community structure from D22 didn't change for PE and OXO samples and samples stayed in the same cluster even if a significant increase of *Solimonas sp.* at D45 on OXO was noticed.

Concerning the “biodegradable” polymers, more species successions were observed and at each sampling time samples communities dissimilarities. The OTUs *Lutibacterium*

anuloederans and *Pseudospirillum* sp. were found in high amounts on AA-OXO during the growth stage. On PHBV it was *Phaeobacter* sp. that stand out.

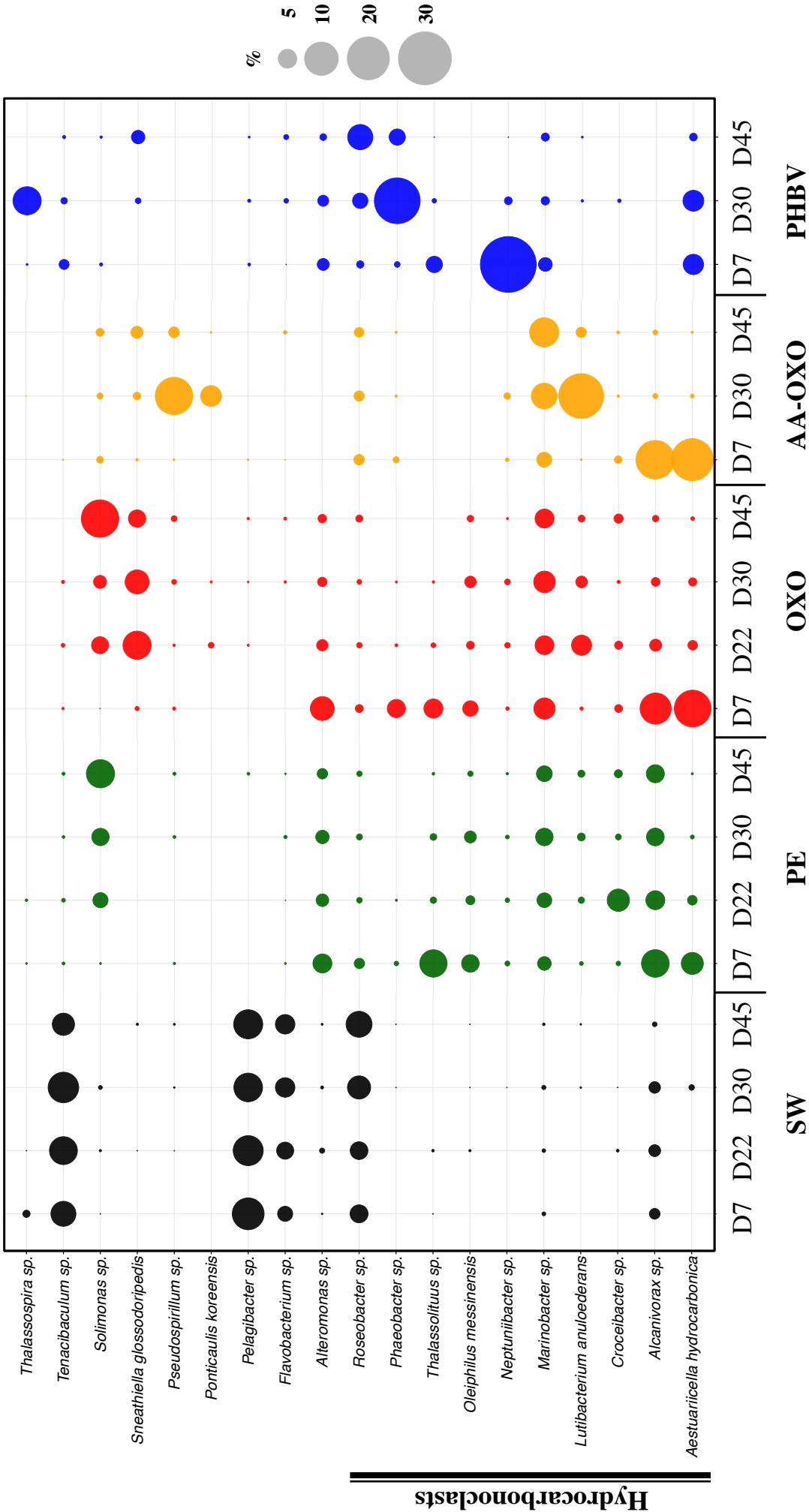
The majority of OTUs identified at D22 on AA-OXO and PHBV then decreased and more OTUs were unclassified at D45.

Sequencing analysis revealed no significant differences between DNA and cDNA (RNA) sequences.

Hydrocarbonoclastic bacteria (HCB) on all polymer types

58 putative hydrocarbonoclastic OTUs were found in this study (23.7% of the total sequences) and 97% of them were identified on polymer samples. Among the more represented OTUs per sample (> 5% of the total OTUs), we found *Alcanivorax* sp., *Aestuariicella hydrocarbonica*, *Marinobacter* sp., *Lutibacterium anuloederans* and *Neptuniibacter* sp. (Fig 4). Simper analysis showed that these 5 OTUs explained more than 13% of the dissimilarity between the polymers and the surrounding seawater communities. Overall, HCB represented the larger proportion of the communities during the primocolonisation phase on all polymer types and generally decreased after. *Aestuariicella hydrocarbonica* was found in higher abundance on all polymer types, reaching until 24 and 20% of the AA-OXO and OXO communities, respectively. *Alcanivorax* sp reached similar relative abundances, but was not detected on PHBV where the HCB were dominated by *Neptuniibacter*. These three OTUs decreased after day 7 and they were replaced by other HCB, such as *Lutibacterium anuloederans* on AA-OXO. Hydrocarbonoclasts were 1.7 to 3 times more identified on polymers at the start of the experiment compared to following times.

Figure 4 Bubble plot showing the relative abundance (%) of the majority OTUs (> 5%) between seawater and polymers samples and between immersion times. Dominance of hydrocarbonoclasts OTUs on polymers was highlighted.



Pathogen bacteria on polymer types

23 putative pathogen OTUs were identified on our samples (3% of the total sequences) and 80 % of them were identified in seawater samples (mainly *Tenacibaculum sp.*). Polymer samples hosted *Vibrio sp.* was the OTU the more represented (> 50% of the putative pathogen sequences) followed by *Tenacibaculum sp.* (20%) and *Staphylococcus aureus* (11%). Overall, the amount of putative pathogens was steady during the biofilm growing and maturation phases, whatever the polymer type.

Heterotrophic bacterial production (BP) on polymers

Leucine incorporation measurements revealed that BP on polymer biofilm was 3.5 to 17 times higher than in seawater at the day 7 (from 38.5 ngC.dm⁻².h⁻¹ for PE to 145.9 ngC.dm⁻².h⁻¹ for AA-OXO) (Table 1). At this primo-colonization stage, BP was not significantly different between the four polymers.

Temporal dynamic of BP was comparable between PE and OXO, peaking during the growing phase (between 178.7 and 426.7 ngC.dm⁻².h⁻¹ from days 15 to 22) and decreasing during the maturation phase to become not significantly different from seawater (between 29 to 60.3 ngC.dm⁻².h⁻¹ from days 30 to 45). AA-OXO and PHBV biofilms presented different trends. BP peaked at day 15 for AA-OXO and PHBV (1396.9 ngC.dm⁻².h⁻¹ and 1090.4 ngC.dm⁻².h⁻¹ respectively), being until 7 times higher than PE and OXO. PHBV biofilm became less active after day 15 and reached a plateau around 250 ngC.dm⁻².h⁻¹ until day 45. AA-OXO kept a high activity until day 22 and also decreased at day 45 to get back to comparable values as PE and OXO.

We calculated the enrichment factor of BP (EF_{BP}) on polymers compared to seawater (BP in seawater varied from 9 to 41 ngC.L⁻¹.h⁻¹). We found EF_{BP} between 92 to more than 7500

(mean = 1470, SD = 2114, maximum for AA-OXO biofilm), thus demonstrating an overall higher activity on polymers (Table 1).

Day/plastic/analysis		Init.	7	15	22	30	45
SW	Cell		1.16	0.89	1.71	1.15	3.07
	BP		9.09	10.5	16.8	21.3	41
	SA		0.009	0.042	0.012	0.068	0.133
PE	RMS	56	49		46		84
	CA	85-94	54-78				
	CI		0.74	0.48	0.39	0.56	0.57
	cell		1.53	3.4	6.76	9.05	3.7
	cell EF		132	382	394	786	121
	BP		38.5	352.3	426.7	29	55.6
	BP EF		245	1913	1545	95	92
	SA		1.687	10.37	6.33	0.32	1.503
OXO	RMS	87	122		106		112
	CA	61-79	40-67				
	CI		0.49	0.5	0.39	0.47	0.85
	cell		1.57	3.75	5.65	4.92	6.89
	cell EF		136	400	330	427	224
	BP		105.5	178.7	217.2	60.3	55.3
	BP EF		625	980	792	178	92
	SA		6.735	5.017	3.849	1.228	0.803
PEV	RMS	110	63		64		ND
	CA	52-76	45-67				
	CI		ND	ND	ND	ND	ND
	cell		9.25	16.1	28.4		34.1
	cell EF		800	1808	1658		1111
	BP		145.9	1396.9	1369.7		131.4
	BP EF		949	7586	3533		229
	SA		1.574	8.672	2.398		0.467
PHBV	RMS	208	129	322	240		358
	CA	78-99	52-81				
	CI		ND	ND	ND	ND	ND
	cell		1.25	15.2	15.3		16.3
	cell EF		108	1705	892		532
	BP		67	1090.4	259.4		240.9
	BP EF		406	5881	944		381
	SA		5.378	7.186	1.933		1.605

Biological and physical parameters of polymers surfaces according to immersion time. **RMS** = roughness (nm), **CA** = Contact angle (reciding – advancing) (°), **CI** = carbonyl index, **cell** = cell count ($\times 10^5$ cell.mL⁻¹ or $\times 10^5$ cell.cm⁻²), **cell EF** = cell enrichment factor, **BP** = bacterial production (ngC.l⁻¹.h⁻¹ or ngC.dm⁻².h⁻¹), **BP EF** = bacterial production enrichment factor, **SA** = specific activity ($\times 10^{-3}$ fgC.cell⁻¹.l⁻¹.h⁻¹ for seawater or $\times 10^{-3}$ fgC.cell⁻¹.dm⁻².h⁻¹ for polymers).

Discussion

Succession of biofilm colonization phases on polymers

This study emphasized an abundant and homogeneous biofilm from earliest sampling time with a cell density between 1.25×10^5 and 2.0×10^5 cell.cm⁻² after 7 days. As far as we know, direct cell quantification on polymer by flow cytometry was not reported yet. Previous studies with epifluorescence counting method observed between 9×10^5 and 103×10^7 cell.cm⁻² after 6 days incubation on Petri dishes (Chung *et al.*, 2010) or on polycarbonate (Jones *et al.*, 2007). Some studies evaluated the cell abundance with analysis of culturable heterotrophic bacteria (Dobretsov, 2010; Lobelle and Cunliffe, 2011) or with scanning electron, atomic force or epifluorescence micrographs (Harrison *et al.*, 2014; Bryant *et al.*, 2016), but none did a direct cell counting. The cell abundance measured in our microcosms water ranged from 8.9×10^4 to 3.1×10^5 cell.ml⁻¹ was in line with values commonly found in ocean waters (REF). It was also the first time that microbial biofilm on “degradable” polymer, like PHBV and OXO, were analyzed in marine environment.

In this study we observed the three steps characterizing the biofilm formation: initial stage, growth stage and maturation stage. Bacterial colonization was noticed from D7 on all polymer types, corresponding to the initial stage. For all the polymers, it was observed a rapid increasing in cell abundance during the firsts incubation weeks corresponding to biofilm growth stage. The calculation of an enrichment factor, up to 1800 (D15 for AA-OXO), confirmed the concentration of microorganisms on these surfaces. At this stage, cells formed aggregates and biofilms became more “patchy”, others studies on PET or on PMD in the North Pacific Gyre had the same observations (Webb *et al.*, 2009; Carson *et al.*, 2013) and we gave here new data for conventional polymer (PE) and biodegradable polymers (OXO, AA-OXO and PHBV). Biofilms seemed to stabilized after D22 without take account of cell

variation in seawater. Lobelle and Cunliffe also reported this assessment in a study on polyethylene polymer food bag after 2 weeks of submersion in a Plymouth Marina with a culturable heterotrophic bacterial count but did not count cells with a direct method. We confirmed in this study that we found the same successional biofilm structure either on conventional than on biodegradable polymers. The cells number steadiness after D22 could be explained by the reaching of carrying capacity of the surfaces given the limited resources or space on PMD or by a more difficult counting cells embedded in extrapolymeric matrix. During the stabilization stage, biofilms were more varied with more different morphotypes and EPS were clearly visible. The biofilm covering increased without significant cell abundance modification. Evolution of bacterial biofilm appearance on polymer in marine water seems to be a generality because early homogeneous stage and then “patchy” stage were noticed for all our polymers.

AA-OXO surfaces showed the higher cell amounts, this result proved that bacteria colonized as well as biopolymers (PHBV) than aged oxo-polymers.

As the cell number did not change in SW contrary to polymer on which successional shifts were observed, we tried in this study to explain abundance variations by polymer surfaces properties. Surface properties play an important role in the abundance of the colonization (Pasmore *et al.*, 2002). Several studies observed that hydrophobicity is positively correlated with the rate of colonization (Artham *et al.*, 2009; Lobelle and Cunliffe, 2011), and concluded that hydrophobicity could promote protein folding and bacterial adhesion (Alsteens *et al.*, 2007). In our study PE and PHBV were the more hydrophobic even after 7 day of immersion in SW. On the contrary, AA-OXO which has the lower contact angle that had higher bacterial colonization from initial stage.

Roughness is known to be another important parameter driving the rate of attachment of the cells on surfaces (Riedewald, 2006). Once again, in our experiments, this parameter

does not explain by itself the first stages of bacterial colonization. The higher number of cells found on PHBV surface, could be explained by its roughness (and more extensively by its structured surface topography) which is until 4 times higher than other polymers (PE, OXO, AA-OXO). Yet, these other polymers that exhibit roughness in the same range of magnitude in link with their same base composition present very different states of colonization, AA-OXO having the more developed biofilm. Moreover, all polymers presents early signs of roughness evolution with immersion time - in agreement with what was observed over longer time on PET for instance (Webb *et al.*, 2009) – but these evolution are not clearly linked with bacteria abundance.

The PHBV film surface became heterogeneous and rougher with apparition of holes and pores as previously observed on standard specimens like “dog-bones” (Deroiné *et al.*, 2014). These results are in agreement with literature where natural degradation of PHBV was characterized by large erosion surfaces (Deroiné *et al.*, 2015). The degradation mechanism initially occurs from the surface, with no appreciable change inside the films. The PHBV degradation by an erosion mechanism is attributed to enzymatic degradation, which is a heterogeneous surface reaction.

This is not that surprising considering that each polymer has a very specific chemistry which will interact differently with sea water. It should be noted that oxidation state (for AA-OXO) or co-polymer structure (for PHBV) will make the surface of these polymers especially sensitive to alteration with water, that can be soundly responsible for the diversity of colonization stages observed, both concerning bacterial adhesion than further development of the biofilm. Lorite *et al.*, noticed in a study focusing on bacterial adhesion on glass and silicon that the composition of the conditioning film was determinant for biofilm formation (Lorite *et al.*, 2011). In the case of AA-OXO the surface was oxidized and many oligomers were available (Eyheraguibel *et al.*, 2017) that facilitate the development of bacterial communities.

Before interpreting colonization in simple terms of roughness or hydrophobicity, the tremendous change of all the polymer surface properties in contact with water should be studied concomitantly.

Bacterial community succession on polymers

In our study, bacterial communities on polymer surfaces were different from surrounding water from the first sampling point. This assessment was in line with previous studies dealing with marine biofilm formation on artificial surfaces (stainless steel, polycarbonate, acryl and glass) (Jones *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2008). This distinction with SW bacterial population can be explained by the hypothesis that pioneer bacteria are present in the rare biosphere of seawater and attach and develop quickly on polymer to become abundant in the biofilm and create differences in community compositions.

From the first biofilm stage (D7) PHBV had different communities from PE and OXO surfaces even if a large proportion of Gammaproteobacteria was identified on all polymers. The dominance of members of Gammaproteobacteria at the firsts step of colonization was already reported on artificial surfaces and were often described as primo colonizers (Lee *et al.*, 2008; Elifantz *et al.*, 2013; Harrison *et al.*, 2014). On PHBV, drastic changes of the surface morphology happen concomitantly with repeated short-timed renewals of species. Therefore, adaptation of the bacteria to their evolving substrate takes place in the very early stages of colonization in marine environment. We noticed that PHBV was largely dominated by *Neptuniibacter sp.* at D7, this strain was for the first time reported colonizing polymer surfaces.

The growth stage (D22 to D30) was characterized by a change in class proportions for all the polymer types. We observed a decrease of the relative abundance of Gammaproteobacteria to move on to a dominance of Alphaproteobacteria class. With time

the proportions of majority classes became in balance but stayed different from seawater. It is well known that population shifts occur during biofilm formation (Siboni *et al.*, 2007) and that early stages of colonization were highly dynamic with changes in group proportions (Dang and Lovell, 2000). AA-OXO and PHBV were the polymers where higher communities shifts were observed, that prove a clear biofilm dynamic compared to PE and OXO with more stable communities.

Through both the biological (bacterial cell count analysis and taxonomic data) and physicochemical (roughness) parameters we observed a global stabilization for PE and OXO surfaces. These results could let imagine that the biofilm reached the maturation stage. It was not the case for AA-OXO and PHBV on which cell abundance and bacterial communities still changed (arrival and loss of species). Moreover, PHBV surface continued to change until the last incubation day that provided an unstable environment and did not facilitate the bacterial community stabilization.

Initial surface properties of a given polymer are clearly not sufficient to understand its colonization by bacteria since, even for the least degradable polymers like PE, they can undergo significant change after a few days of immersion in sea water, as shown by contact angle measurements. These comparative studies of surface properties and colonization behavior on polymers at very early stages of immersion show for the first time how critical the coupling is between them.

Dominance of hydrocarbonoclasts on polymers

Interestingly 96.7% of all the sequences affiliated to 52 OTUs selected to be hydrocarbonoclastic members, were found on polymers compared to surrounding water. A great proportion of OTU found in the first colonists of polymer belong to *Marinobacter sp.* and *Alcanivorax sp.*, known to be obligate hydrocarbonoclastic bacteria (Yakimov *et al.*,

2007). *Aestuariicella hydrocarbonica* identified on AA-OXO and OXO at D7 (at very high relative abundance of 24% and 20%) was recently isolated from sea tidal flat and described to be able to degrade a broad range of aliphatic hydrocarbons (Lo *et al.*, 2015). The rapid development of hydrocarbon specialists on our polymer emphasized a bacterial preference for polymer surface characteristics by bacteria that are used to adhere on very hydrophobic molecules. We can make the hypothesis of the capabilities of utilization of polymer molecules by some specific bacteria as a carbon source like it was demonstrated before in laboratory-based experiments on PE or PET (Sudhakar *et al.*, 2008; Yoshida *et al.*, 2016). But, here, even if we found a huge proportion of hydrocarbon specialists on our polymer samples, we did not observe a higher proportion of them on so-called biodegradable polymers compared to conventional ones. So the presence of these species is explained more by hydrophobic properties of polymers than by a biodegradation of polymer molecules.

A variable and high heterotrophic bacterial production on polymer

Heterotrophic bacterial production analysis in biofilms was generally poorly reported and few studies deal with leucine incorporation technique on plant bacterial biomass (Coelho-Souza *et al.*, 2013; Thomaz and Wetzel, 1995). This study gave the first data on bacterial heterotrophic activity on polymers and brings a new knowledge for better understanding polymer communities. Moreover, the heterotrophic bacterial production values measured in our microcosm SW correspond to results obtained in situ in NW Mediterranean sea from undetectable to 200 ngC.L⁻¹.h⁻¹ (Lemée *et al.*, 2002).

In this study, we showed that biofilm developing on polymer surfaces were very active, until 100 times higher than bacteria living in seawater. This great heterotrophic activity can be explained by the cell concentration on polymer surfaces (EF between 80 to

1800 compared to surrounding water) and by the creation of a high concentrated nutrient niche that increases cell viability in oligotrophic environments (Webb *et al.*, 2008).

Heterotrophic bacterial production showed a peak during the growth stage especially on AA-OXO and PHBV surface that coincided with cell abundance. Specific cell activities were maximal during this stage when biofilms are developing. From D30 cell amounts stayed more or less in balance but specific activity drastically decreased to be lower than those at D7. Among these observations we can make the hypothesis of an easier biofilm development on “degradable” polymers (AA-OXO and PHBV) with more cell adhesion and so higher heterotrophic activity, but we did not notice a higher specific cell activity and we are not in position to affirm a polymer biodegradation of AA-OXO and PHBV polymers by bacteria.

Conclusion

In this study the different results obtained with our microcosms experimentation gave a better knowledge of the successional steps of the bacterial colonization on polymers and were comparable to thus obtain in natural marine environments. Although laboratory-based experiment can be subject to inherent biases like dark conditions, we considered our microcosm experiment well reproduced the natural environment and bacterial populations and activity shifts obtained on polymer can be transposed to the open sea.

Even if general shifts of bacterial communities in early colonization stages are shared on the 4 polymer types in this study, it exists differences according to the polymer composition. AA-OXO and PHBV showed high cell abundance and activity on their surfaces. So, when a OXO is physically oxidized (temperature treatment here) it reacts clearly differently to seawater incubation compared to an original OXO and seems to show same trends than a biopolymer like PHBV. This study did not demonstrate a biodegradation of polymers but emphasized a better bacterial colonization and more dynamic biofilm

development on “degradable” polymer as AA-OXO and PHBV. Finally this study highlighted the importance to pay attention on polymer physicochemical changes to a better understanding of biofilm biological evolution.

References

- Alsteens D, Dague E, Rouxhet PG, Baulard AR, Dufrêne YF. (2007). Direct measurement of hydrophobic forces on cell surfaces using AFM. *Langmuir* 23: 11977–11979.
- Ammala A, Bateman S, Dean K, Petinakis E, Sangwan P, Wong S, et al. (2011). An overview of degradable and biodegradable polyolefins. Elsevier Ltd.
- Artham T, Sudhakar M, Venkatesan R, Madhavan Nair C, Murty KVGK, Doble M. (2009). Biofouling and stability of synthetic polymers in sea water. *Int Biodeterior Biodegrad* 63: 884–890.
- Auta HS, Emenike CU, Fauziah SH. (2017). Distribution and importance of microplastics in the marine environmentA review of the sources, fate, effects, and potential solutions. *Environ Int* 102: 165–176.
- Bravo M, Astudillo JC, Lancellotti D, Luna-Jorquera G, Valdivia N, Thiel M. (2011). Rafting on abiotic substrata: Properties of floating items and their influence on community succession. *Mar Ecol Prog Ser* 439: 1–17.
- Bryant JA, Clemente TM, Viviani DA, Fong AA, Thomas KA, Kemp P, et al. (2016). Diversity and Activity of Communities Inhabiting Plastic Debris in the North Pacific Gyre. *mSystems* 1: e00024-16.
- Carson HS, Nerheim MS, Carroll KA, Eriksen M. (2013). The plastic-associated microorganisms of the North Pacific Gyre. *Mar Pollut Bull* 75: 126–32.
- Chung HC, Lee OO, Huang Y-L, Mok SY, Kolter R, Qian P-Y. (2010). Bacterial community succession and chemical profiles of subtidal biofilms in relation to larval settlement of the polychaete *Hydroides elegans*. *ISME J* 4: 817–828.
- Coelho-Souza SA, Miranda MR, Salgado LT, Coutinho R, Guimaraes JRD. (2013). Adaptation of the 3H-Leucine Incorporation Technique to Measure Heterotrophic Activity Associated with Biofilm on the Blades of the Seaweed *Sargassum* spp. *Microb Ecol* 65: 424–436.
- Cooksey KE, Wigglesworth-Cooksey B. (1995). Adhesion of bacteria and diatoms to surfaces in the sea: A review. *Aquat Microb Ecol* 9: 87–96.
- Corre YM, Bruzaud S, Audic JL, Grohens Y. (2012). Morphology and functional properties of commercial polyhydroxyalkanoates: A comprehensive and comparative study. *Polym Test* 31: 226–235.
- Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. (1995). Microbial Biofilms. *Annu Rev Microbiol* 49: 711–745.
- Dang H, 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 Bacterial Primary Colonization and Early Succession on Surfaces in Marine Wa. *Appl Environ Microbiol* 66: 467–475.
- Davey ME, O'toole GA. (2000). Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev* 64: 847–67.
- Debeljak P, Pinto M, Proietti M, Reisser J, Ferrari FF, Abbas B, et al. (2016). Extracting DNA from ocean microplastics: a method comparison study. *Anal Methods* 0: 1–6.
- Deroiné M, Le Duigou A, Corre YM, Le Gac PY, Davies P, César G, et al. (2014). Seawater accelerated ageing of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate). *Polym Degrad Stab* 105: 237–247.
- Deroiné M, César G, Le Duigou A, Davies P, Bruzaud S. (2015). Natural Degradation and Biodegradation of Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate) in Liquid and Solid Marine Environments. *J Polym Environ* 493–505.

- Diéguez AL, Romalde JL. (2017). crossm Draft Genome Sequences of Clinical. 5: 4–5.
- Dobretsov S. (2010). Marine Biofilms. In: *Biofouling*. pp 123–136.
- Eich A, Mildenerberger T, Laforsch C, 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.
- Elain A, Le Fellic M, Corre YM, Le Grand A, Le Tilly V, Audic JL, *et al.* (2015). Rapid and qualitative fluorescence-based method for the assessment of PHA production in marine bacteria during batch culture. *World J Microbiol Biotechnol* **31**: 1555–1563.
- Elain A, Le Grand A, Corre YM, Le Fellic M, Hachet N, Le Tilly V, *et al.* (2016). Valorisation of local agro-industrial processing waters as growth media for polyhydroxyalkanoates (PHA) production. e-pub ahead of print, doi: 10.1016/j.indcrop.2015.10.052.
- Elifantz H, Horn G, Ayon M, Cohen Y, Minz D. (2013). Rhodobacteraceae are the key members of the microbial community of the initial biofilm formed in Eastern Mediterranean coastal seawater. *FEMS Microbiol Ecol* **85**: 348–357.
- Eriksen M, Lebreton LCM, Carson HS, Thiel M, Moore CJ, Borerro JC, *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.
- Eyheraguibel 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.
- Ghiglione JF, Philippot L, Normand P, Lensi R, Potier P. (1999). Disruption of narG, the gene encoding the catalytic subunit of respiratory nitrate reductase, also affects nitrite respiration in *Pseudomonas fluorescens* YT101. *J Bacteriol* **181**: 5099–5102.
- Harrison JP, Schratzberger M, Sapp M, Osborn a. (2014). Rapid bacterial colonization of low-density polyethylene microplastics in coastal sediment microcosms. *BMC Microbiol* **14**: 232.
- Jones PR, Cottrell MT, Kirchman DL, Dexter SC. (2007). Bacterial community structure of biofilms on artificial surfaces in an estuary. *Microb Ecol* **53**: 153–162.
- Kirchman, D. L., & Ducklow, H. W. (1993). Estimating conversion factors for the thymidine and leucine methods for measuring bacterial production. *Handbook of methods in aquatic microbial ecology*. Lewis, 513-517.
- Law KL. (2017). Plastics in the Marine Environment. 1–13.
- Lee JW, Nam JH, Kim YH, Lee KH, Lee DH. (2008). Bacterial communities in the initial stage of marine biofilm formation on artificial surfaces. *J Microbiol* **46**: 174–182.
- Lemée R, Rochelle-Newall E, Van Wambeke F, Pizay MD, Rinaldi P, Gattuso JP. (2002). Seasonal variation of bacterial production, respiration and growth efficiency in the open NW Mediterranean Sea. *Aquat Microb Ecol* **29**: 227–237.
- Lo N, Kim KH, Baek K, Jia B, Jeon CO. (2015). *Aestuiriicella hydrocarbonica* gen. nov., sp. nov., an aliphatic hydrocarbon-degrading bacterium isolated from a sea tidal flat. *Int J Syst Evol Microbiol* **65**: 1935–1940.
- Lobelle D, Cunliffe M. (2011). Early microbial biofilm formation on marine plastic debris. *Mar Pollut Bull* **62**: 197–200.
- Loeb GI, Neihof RA. (1975). Marine conditioning films. *Adv Chem* **145**: 319–335.
- Lorite GS, Rodrigues CM, de Souza AA, Kranz C, Mizaikoff B, Cotta MA. (2011). The role of conditioning film formation and surface chemical changes on *Xylella fastidiosa* adhesion and biofilm evolution. *J Colloid Interface Sci* **359**: 289–295.

- Mével G, Vernet M, Goutx M, Ghiglione JF. (2008). Seasonal to hour variation scales in abundance and production of total and particle-attached bacteria in the open NW Mediterranean Sea (0–1000 m). *Biogeosciences* 5: 1573–1586.
- Nampoothiri MK, Nair NR, John RP. (2010). An overview of the recent developments in polylactide (PLA) research. *Bioresour Technol* 101: 8493–8501.
- Parada AE, Needham DM, Fuhrman JA. (2016). Every base matters: Assessing small subunit rRNA primers for marine microbiomes with mock communities, time series and global field samples. *Environ Microbiol* 18: 1403–1414.
- Pasmore M, Todd P, Pfiefer B, Rhodes M, Bowman CN. (2002). Effect of polymer surface properties on the reversibility of attachment of *Pseudomonas aeruginosa* in the early stages of biofilm development. *Biofouling* 18: 65–71.
- Riedewald F. (2006). Bacterial adhesion to surfaces: the influence of surface roughness. *PDA J Pharm Sci Technol* 60: 164–171.
- Salta M, Wharton JA, Blache Y, Stokes KR, Briand JF. (2013). Marine biofilms on artificial surfaces: Structure and dynamics. *Environ Microbiol* 15: 2879–2893.
- Severin T, Sauret C, Boutrif M, Duhaut T, Kessouri F, Oriol L, et al. (2016). Impact of an intense water column mixing (0–1500 m) on prokaryotic diversity and activities during an open-ocean convection event in the NW Mediterranean Sea. *Environ Microbiol* 18: 4378–4390.
- Siboni N, Lidor M, Kramarsky-Winter E, Kushmaro A. (2007). Conditioning film and initial biofilm formation on ceramics tiles in the marine environment. *FEMS Microbiol Lett* 274: 24–29.
- Stalder AF, Kulik G, Sage D, Barbieri L, Hoffmann P. (2006). A snake-based approach to accurate determination of both contact points and contact angles. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp* 286: 92–103.
- Sudhakar M, Doble M, Murthy PS, Venkatesan R. (2008). Marine microbe-mediated biodegradation of low- and high-density polyethylenes. *Int Biodeterior Biodegradation* 61: 203–213.
- De Tender CA, Devriese LI, Haegeman A, Maes S, Vangeyte J, Cattrijsse A, et al. (2017). The temporal dynamics of bacterial and fungal colonization on plastic debris in the North Sea. *Environ Sci Technol* acs.est.7b00697.
- Thomaz SM, Wetzel RG. (1995). [3H]Leucine incorporation methodology to estimate epiphytic bacterial biomass production. *Microb Ecol* 29: 63–70.
- Tokiwa Y, Calabia BP. (2004). Degradation of microbial polyesters. *Biotechnol Lett* 26: 1181–1189.
- Webb HK, Crawford RJ, Sawabe T, Ivanova EP. (2009). Poly(ethylene terephthalate) polymer surfaces as a substrate for bacterial attachment and biofilm formation. *Microbes Environ* 24: 39–42.
- Yakimov MM, Timmis KN, Golyshin PN. (2007). Obligate oil-degrading marine bacteria. *Curr Opin Biotechnol* 18: 257–266.
- Yoshida S, Hiraga K, Takehana T, Taniguchi I, Yamaji H, Maeda Y, et al. (2016). A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate). 351: 1–5.
- Zettler ER, Mincer TJ, Amaral-zettler LA. (2013). Life in the ‘Plastisphere’: Microbial Communities on Plastic Marine Debris. *Environ Sci Technol* 47: 7137–7146.

Chapitre 4

Activité du biofilm bactérien colonisant des polymères conventionnels et (bio)dégradables en milieu marin



Christina Marcos/Concours Art Microbien

Chapitre 4 Article n°3

1. Préambule

Suite aux résultats particulièrement intéressants de la première expérience en microcosmes, nous avons souhaité augmenter le nombre de polymères étudiés ainsi que le temps d'immersion en milieu marin. Neuf types de polymères ont alors été incubés pendant plus de 200 jours (Fig. 24). En plus des analyses déjà réalisées pour l'expérience n°1, 2 types de mesures d'activités bactériennes ont été rajoutées : des mesures de production ectoenzymatiques et des mesures de respiration (production de CO₂ et consommation d'O₂) ont été réalisées. Dans l'article qui suit, ni les analyses de séquençages ni les résultats de respiration n'ont été exposés puisqu'ils sont encore en cours de traitement. Tout comme la première étude sur les microcosmes, ces travaux fournissent des connaissances supplémentaires sur la colonisation bactérienne en mer sur des substrats polymères variés. Encore une fois, nous avons constaté des différences en terme de colonisation et d'activité des cellules en fonction du type de plastique, démontrant de nouveau un attachement favorisé des bactéries sur les polymères « bio-dégradables ». Contrairement à nos attentes, les polymères dits « biodégradables » (PHBV, PLLA, PDLLA) utilisés dans cette expérience n'ont pas montrés de signes visibles à l'œil nu de dégradation au bout de 6 ½ d'immersion en milieu marin. Seul le polymère PCL s'est désagrégé au fil du temps.

Les résultats du séquençage 16S confirmeront ou non la spécificité des communautés à un type de surface (en cours de séquençage au Genoscope, Paris). Les analyses de respiration du biofilm en milieu minimum apporteront, quant à elles, des informations sur le potentiel de biodégradation de certaines cellules bactériennes du biofilm.



Figure 24 : Installation de l'expérience en microcosmes n°2 pour suivre la colonisation bactérienne sur des films PE, AA-PE, OXO, AA-OXO, PS, PHBV, PCL, PLLA, PDLLA sur 29 semaines.

2. Article n°3: Marine bacterial biofilm abundance and activities on conventional and (bio)degradable polymers.

Dussud C¹, Meistertzheim AL¹, Hudec C¹, Lauters M^{1,6}, Pujo-Pay M¹, Conan P¹, George M², Fabre P², Higgs P³, Eyheraguibel B⁴, Bruzaud S⁵, Ghiglione JF^{1*}

¹Sorbonne Universités, CNRS, UPMC Univ Paris 06, UMR 7621, Laboratoire d'Océanographie Microbienne, Observatoire Océanologique de Banyuls, Banyuls sur mer, France

²Laboratoire Charles Coulomb (L2C), Univ. Montpellier, CNRS, Montpellier, France.

³Symphony Environmental Ltd, Borehamwood, Hertfordshire WD6 1JD, UK.

⁴ Université Clermont Auvergne, CNRS, SIGMA Clermont, Institut de Chimie (ICCF), Clermont-Ferrand, France.

⁵ Université de Bretagne Sud, Institut de Recherche Dupuy de Lôme, CNRS FRE 3744, Lorient, France

⁶ Tara Expedition Foundation, Paris, France

***Corresponding author:**

JF Ghiglione, Laboratoire d'Océanographie Microbienne, Observatoire Océanologique de Banyuls, Avenue Fontaulé, F-66650 Banyuls/mer, France. Tel.: + 33 (0) 4 68 88 73 16. E-mail address: ghiglione@obs-banyuls.fr

Introduction

Plastic debris were found from land to seabed and represent the new environmental threat (Avio *et al.*, 2016). Global production has increased to more 230 million tons per year. The lack of efficient collect and the persistence of this material in the environment make it the litter the most common at sea (Law, 2017). The physical impacts on marine organisms by macroplastics (entanglement, suffocation) (Gall and Thompson, 2015), the proliferation of tiny plastic pieces called microplastics (MP, size ≤ 5 mm) in marine habitats (Thompson *et al.*, 2004; Auta *et al.*, 2017) is leading to a reevaluation of plastic litter ecological impacts (Galloway *et al.*, 2017). Microplastics represent both a chemical and physical danger to the ecological integrity of marine environment (Barnes *et al.*, 2009) due to their capacity to transport persistent organic pollutants and plastic additives into marine food webs (Teuten *et al.*, 2009) and their high potential to become ingested by wildlife (Cole *et al.*, 2013).

MPs represent more than 90% of the plastic debris at the sea surface (Eriksen *et al.*, 2014). At sea, they are almost immediately coated by inorganic and organic matter (so called the “conditioning film”), which is then rapidly colonized by microorganisms that form a biofilm on their surfaces (Loeb and Neihof, 1975). Bacterial biofilms are defined as surface-associated bacterial communities, which are embedded within an exopolymeric substance matrix (EPS) (Costerton *et al.*, 1995). These natural assemblages act as a form of protection, nutritive resource, and offer metabolic cooperativity and an increase in the possibility of gene transfer amongst the residing cells (Davey and O’toole, 2000). The first observations reported some Gram-negative bacteria on polystyrene spherules (Carpenter *et al.*, 1972). Other studies based on microcosms experiments demonstrated marine bacterial colonization on polyethylene terephthalate (Webb *et al.*, 2009; Oberbeckmann *et al.*, 2016) or on polyethylene (Lobelle and Cunliffe, 2011; De Tender *et al.*, 2017a). These studies were mostly based on SEM observations and bacterial taxonomic identification, but almost none of them focused on

bacterial abundance and activity. As far as we know, only one study focused on biofilm activities (O₂ production rate) by comparing PE and biosourced polymers (Mater-Bi N°014, a starch-based biopolymer–polyethylene terephthalate blend) after 15 and 33 days in marine environment (Eich *et al.*, 2015).

Polyethylene (PE) dominates the composition of plastic waste found at the sea surface, followed by polypropylene (PP), and polystyrene (PS) (Auta *et al.*, 2017). These are very recalcitrant material due to their stable aliphatic chains for PE and PP or aromatic chains for PS (Mooney *et al.* 2006, Tokiwa *et al.*, 2009). Within the frame of sustainable development, a wide range of degradable and biodegradable plastics have been developed and classified into two major groups: oxo-degradable (OXO) and inherently hydrolysable plastics (Vasquez *et al.* 2016). The former are conventional petroleum-based polymers, usually synthesized from PE to which a pro-degrading agent has been added to accelerate the degradation process. After abiotic degradation through peroxidation, which is accelerated by heat and UV light, a biodegradation process takes place once the polymer has reached a low molecular weight (<1500 Da) (Eyheraguibel *et al.* 2017). On the other hand, hydrolysable plastics are generally synthesized from renewable sources such as starch, cellulose or microorganisms, or they are derivatives from other polymers such as polyhydroxialcanoates (PHA) and polylactic acid (PLA) or from petrochemical source like PCL. Their degradation takes place mainly through hydrolysis and biological uptake (Nampoothiri *et al.* 2010).

In this study we analyzed bacterial abundance and activities on a large set of polymer types, including two conventional plastics, i.e. PE and PS, and biodegradable plastics, i.e. OXO, PHBV, PCL, PLLA and PDLLA. We present pioneer results on the colonization by marine bacteria during more than 200 days in an innovative microcosm experiment in open circuit to the sea.

Material and methods

Polymer pieces preparation and microcosm conditions

In this study, we used 9 types of polymers: conventional low density polyethylene (PE), aged PE (AA-PE) (UV ageing during 48 h, ASTM D5208: UVA 340, 0.78 W/m³/nm + accelerated thermal ageing during 96 h, ASTM D5510: 70°C), oxodegradable PE (OXO) (containing manganese/cobalt pro-oxidant additive), aged oxodegradable PE (AA-OXO) (UV ageing during 48 h, ASTM D5208: UVA 340, 0.78 W/m³/nm + accelerated thermal ageing during 96 h, ASTM D5510: 70°C); these 4 polymers were supplied by Symphony Environmental Ltd, United Kingdom, conventional polystyrene (PS), poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate) (PHBV) (provided by University of South of Bretagne, France), polycaprolactone (PCL), poly-L-lactide (PLLA) and poly-DL-lactide (PDLLA) made by Léc laboratory (Montpellier, France). The polymer films presented thickness of 200 µm for PS, PHBV, PCL and PLLA, 100 µm for PE, AA-OXO, OXO and AA-OXO and 2 mm for PDLLA. Each type of polymer films was cut into 100 circular pieces of 9 mm diameter (area = 63.6 µm²) with a puncher machine except for PDLLA that was already in pieces of 6 mm diameter. Each polymer pieces were sterilized with 70% ethanol and rinsed with sterile seawater (SSW) before incubation in microcosms detailed hereafter.

We used 10 identical microcosms consisting in trays of 1.8L capacity (polycarbonate PC, Sodispan, Spain) continually renewed with 20µm pre-filtered seawater (2 successive polypropylene PP filters in a filtration station, Leroy Merlin, France) by individual water delivery valves and overflow ports setting a flow rate of 0.1 L min⁻¹. Seawater was pumped at 30 m from the coast at 4m depth in the Banyuls bay, closed to the SOLA observatory station (NW Mediterranean Sea, France). Seawater temperature in the microcosms and in the Banyuls bay was between 12.5°C and 13.5°C and salinity was 38.5 during the course of the experiment. Microcosms were incubated in the dark to avoid UV-

related degradation of the polymers and algal development. One of the microcosms was used as control containing circulating seawater only without polymer (called ‘control microcosm’ hereafter) and the 9 other microcosms contained the polymer pieces of one of the composition (PE, AA-PE, OXO, AA-OXO, PS, PHBV, PCL, PLLA). Polymer pieces of each type were sampled after 3, 10, 31, 74, 116 and 206 days.

Epifluorescence microscopy

One polymer piece of each polymer were rinsed at each sampling times with sterile seawater and fixed for at least 1h at 4°C with 1% (v/v) glutaraldehyde (final concentration) before freezing. Epifluorescence microscopy observations were done using an Olympus AX-70 PROVIS after 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining according to (PORTER and FEIG, 1980). Pictures were taken on 10 fields of each polymer type and cell counting was done with the software Microbe Counter. The covering of the surface area of the polymer by bacterial cells and by biofilm (cells + EPS) were determined using Image J software.

Flow cytometry

Three pieces of each polymer were rinsed at each sampling times with sterile seawater and fixed for at least 1h at 4°C with 1% (v/v) glutaraldehyde (final concentration) before freezing. In parallel, 3 x 1 mL of 3 µm-filtered seawater (polycarbonate, 47 mm diameter, Whatman) from the control microcosm, were also fixed using the same procedure. Bacterial cells were enumerated by flow cytometry after cell detachment, using 1mM pyrophosphate (1 mM final concentration, 30 min at room temperature in darkness) and sonication (3 x 5 seconds, 40kHz, 30% amplitude, sterilized probe Branson SLPe). This pre-treatment step was optimized by cell detachment protocol setup on each polymer substrates, when comparing flow cytometry and epifluorescence microscopy cell counts with different pre-treatment

conditions (data not shown). A 500- μ l subsample was mixed with the nucleic acid dye SYBR Green I (final concentration 0.05% [v/v], Sigma Aldrich) at room temperature for 15 min in darkness. Cell counts were performed with a FACSCanto II flow cytometer (BD Bioscience, San Jose, CA) equipped with a blue laser (488-nm, air-cooled, 20-mW solid state), as previously described (Mével *et al.*, 2008). Cell counts were expressed as number of cells cm^{-2} for polymers and cell ml^{-1} for seawater. Cell enrichment factors were calculated by the ratio between bacterial counts on polymer and in seawater, brought forward to a same volume of 1 cm^3 when considering a polymer thickness of 100 (PE, AAPE, OXO, AA-OXO), 200 μm (PS, PHBV, PCL, PLLA) or 2 mm (PDLLA).

Heterotrophic bacterial production (BP)

BP was measured for each polymer type and sampling time by ^3H -leucine incorporation into proteins using a modified protocol from the filtration method (Kirchman *et al.* 1993). Briefly, ^3H -leucine (specific activity 112 Ci.mmol $^{-1}$; Perkin Elmer) was added at final concentration of 1 nM (completed with cold leucine to 150nM) in triplicate polymer samples and 4.3nM to triplicate of 3 μm -filtered seawater from the control microcosm (completed with cold leucine to 42.8 nM). Samples were incubated in the dark at *in situ* temperature for 3h in triplicate samples. We used the empirical conversion factor of 1.55 ng C. pmol $^{-1}$ of incorporated leucine to calculate BP (Simon and Azam, 1989). Values were given in ng C $\text{dm}^{-2} \text{h}^{-1}$ for polymers and in ng C $\text{ml}^{-1} \text{h}^{-1}$ for seawater. Cell-specific activities were calculated by the ratio between BP and cell counts obtained with flow cytometry, where values were given in ng C cell $^{-1} \text{dm}^{-2} \text{h}^{-1}$ for polymers and ng C cell $^{-1} \text{L}^{-1} \text{h}^{-1}$ for seawater. BP enrichment factors were calculated by the ratio between BP on polymer and in seawater, brought forward to a same volume of 1 cm^3 when considering a polymer thickness of 100 (PE, AAPE, OXO, AA-OXO), 200 μm (PS, PHBV, PCL, PLLA) or 2 mm (PDLLA).

Ecto-enzymes production measurements

Three ecto-enzymatic activities were analyzed: lipase, glucosidase and amino peptidase. Triplicate of ¼ of plastic piece of each polymer type were placed in a 96-well plate with a mix of analog substrates composed by a fluorescent synthesis molecule linked with natural molecules (amine acids, glucose). For lipase and glucosidase activities, we used the fluorogene L-leucine-4-méthylcoumarinyl-7-amide at 10 mM (Leu-MCA, MW: 324,81- Supplier: Sigma Aldrich (CAS: 62480-44-8)). For amino peptidase activity, we used the fluorogene 4-méthylumbelliféryl oléate at 20 mM (MUF, MW: 440,61- Supplier : Sigma Aldrich (CAS: 17695-48-6)). After 4 h (seawater) or 8 h (plastics) of incubation, 50 µL of a stop solution (SDS 10%) was added in all wells. The fluorescence produced by the complex after bacterial enzymatic hydrolysis can be quantified with a fluorometer (VICTOR™ 2D - PerkinElmer, Inc.) at wavelength of 380 nm for MCA and 364 nm for MUF. A control was done in triplicate for each activity and each plastic, by adding the stop solution at the beginning of incubation.

Results

Physical parameters of polymer surfaces

We obtained information about oxidation state for PE, AA-PE, OXO and AA-OXO, but analysis in micro-FTIR was not feasible for PHBV, PCL, PLLA and PHBV due to their too high thickness. PE, AA-PE and OXO did not demonstrate any oxidation during seawater immersion with absence of signal at 1715 cm^{-1} (Supplemental Table S1). Conversely, AA-OXO showed high signal at 1715 cm^{-1} from D10 and until D206.

Some visual observations of polymer pieces could be made concerning AA-OXO, PHBV and PCL. AA-OXO stayed whole during the experimentation, but was very breakable after only three days of immersion (Fig 1). PHBV, quite translucent before immersion, whitened rapidly in seawater. Finally, PCL broke down progressively with time in marine environment to become 5 times smaller for some pieces at the end of the experiment.



Figure 1: Physical evolution of the nine polymer pieces after 3 and 206 immersion days in seawater.

Fluorescent Microscopy

Microscopy cell counting revealed that bacteria colonized all plastics until 3 days of immersion in seawater (Fig 2). Conventional polymers (PE, OXO, PS) and PLLA had significantly lower cell abundance (mean = $1.3 \times 10^4\text{ cells.mm}^{-2}$) compared to aged polymers (AA-PE and AA-OXO) and PHBV (mean = $5.2 \times 10^4\text{ cells.mm}^{-2}$) (t test, p value $\ll 0.05$). PCL had the highest values of $1.8 \times 10^5\text{ cells.mm}^{-2}$, at least 3 times above the others

polymers. We observed increase of cell abundance on all the substrates with the time. We succeeded to make only one cell counting on PDLLA surface at day 10 and we found a high value of 1.4×10^5 cells.mm⁻². These difficulties to observe this polymer are explained by its large thickness incompatible with microscopic protocols and its auto fluorescence. The maximum abundances were attained at different time according to the different polymers. PHBV showed a peak at D31 (2.8×10^5 cells.mm⁻²) although PCL reached the highest value after 116 immersion days (7.8×10^5 cells.mm⁻²). At the end of the experiment biodegradable plastics (PHBV, PCL, AA-OXO) stayed significantly higher than conventional ones (PE, OXO, PS) (t test, p value << 0.05). At this time PCL had 4 to 36 times more cells on its surface. PLLA had cell abundance comparable to conventional plastics and AA-PE biofilm had values between conventionals and biodegradables.

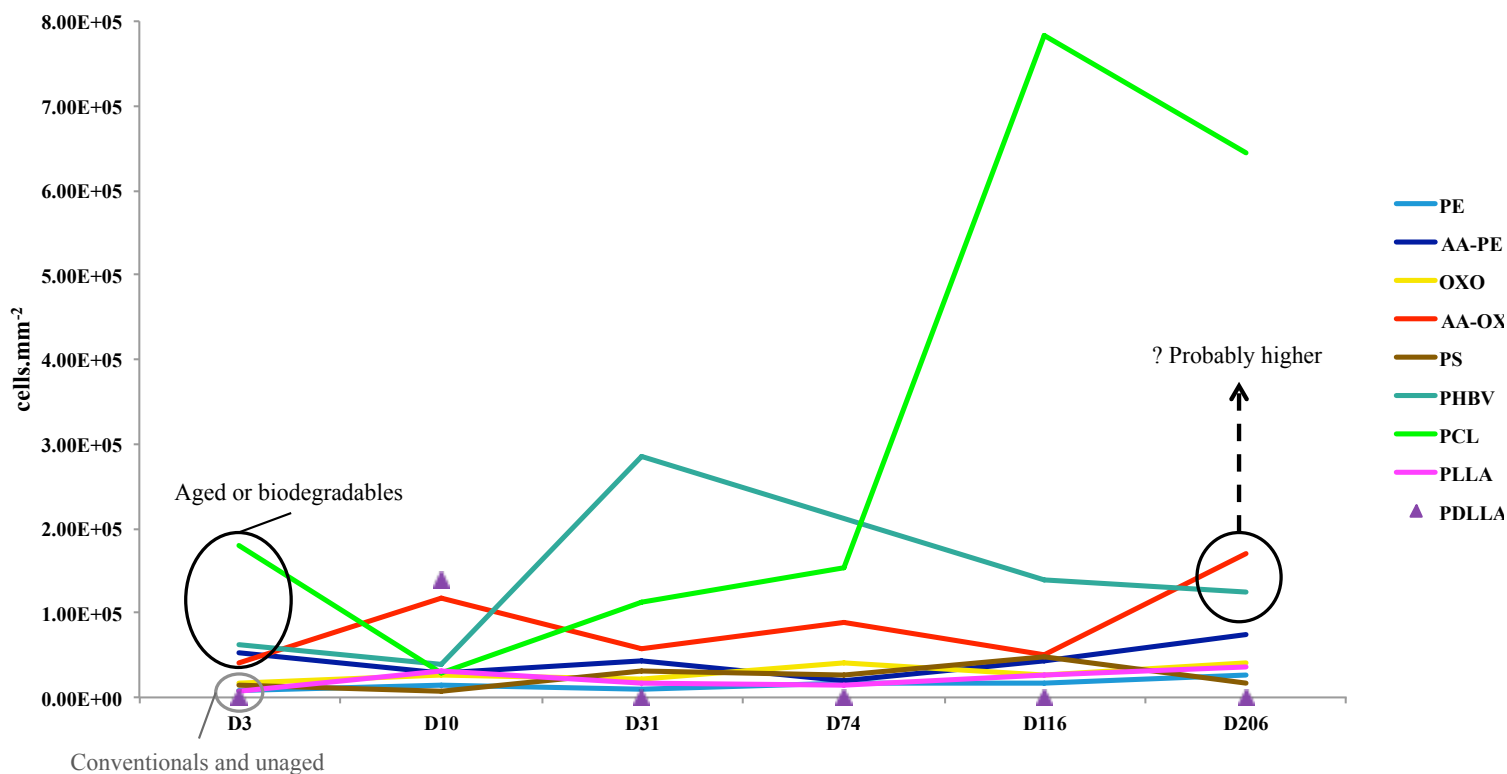


Figure 2: Line plot of the microscopic cell countings on the nine polymers depending on the time of seawater immersion (D = day). Values are expressed in cells.mm⁻².

Microscopic pictures of polymer biofilms confirmed the rapid colonization after 3 days in seawater (Fig 3). PCL showed already a well-developed biofilm and, consistent with the counting values, a decrease of the cell number at D10. PE surface was more slowly colonized rather than AA-OXO surfaces on which a very abundant biofilm with EPS was observed at D206. Micrographs demonstrated a greater colonization on biodegradable polymers (AA-OXO, PCL) compared to the conventional PE surface.

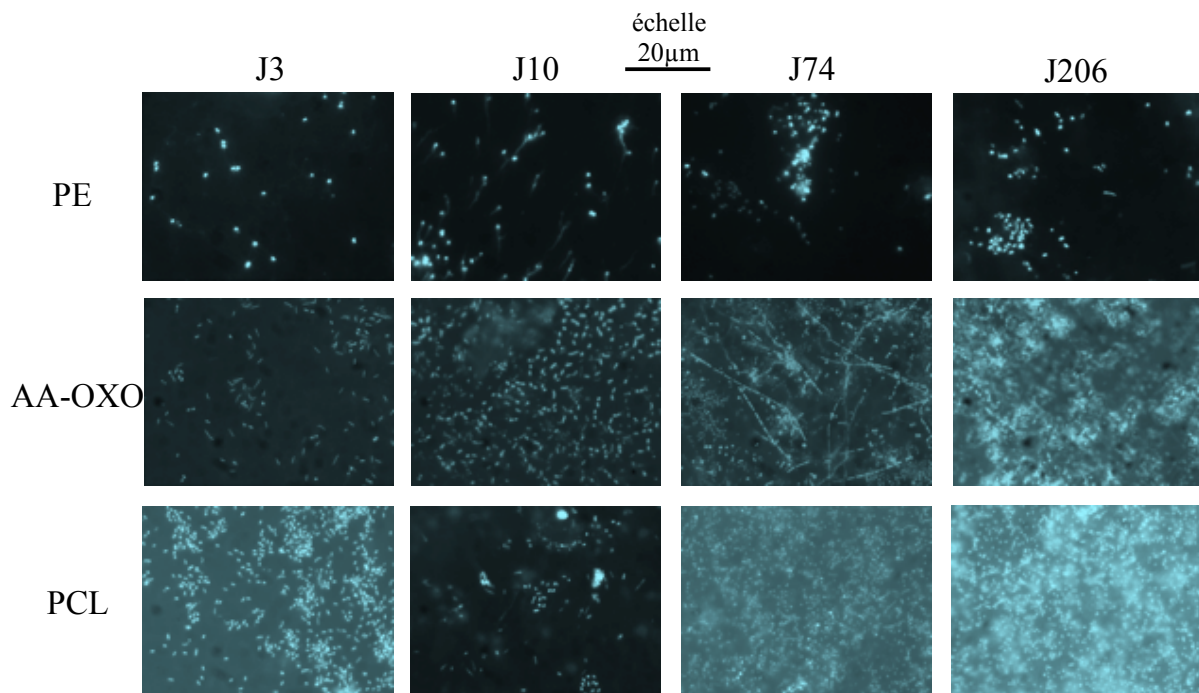


Figure 3: Epifluorescence micrographs of PE, AA-OXO and PCL surfaces showing the differences in bacterial colonization and formation of a biofilm with EPS after 3, 10, 74 and 206 days in seawater.

Flow cytometry

To be comparable to seawater, plastic values were calculated in cells.cm^{-3} (identical to cells.ml^{-1}) considering the different thickness of plastic sample (100µm for PE, AA-PE, OXO, AA-OXO; 200µm for PS, PHBV, PCL, PLLA and 2 mm for PDLLA) (Fig 4). Values obtained with flow cytometry for plastics were quite variables but stayed significantly higher than SW (mean SW = $3.3 \times 10^5 \text{ cells.cm}^{-3}$) (t test, p value < 0.05). On polymer surfaces

we noticed a high abundance at D3 (between 2.1×10^6 (PLLA) and 3.5×10^7 cells.cm⁻³ (PDLLA)) that decreased at D10 for all samples. Then amount of cells increased from one month except for PDLLA biofilm for which cell abundance decrease until D116. The maximum values were attained by biodegradable polymers (PHBV, PCL and AA-OXO) up to 7.4×10^7 cells.cm⁻³ after 116 days of incubation. Like microscopic results biodegradable polymers (PHBV, PCL, AA-OXO) were more colonized than conventional ones (PE, OXO, PS), AA-PE, PLLA and PDLLA (t test, p value < 0.05).

Enrichment factors were comprised between 3 and 476. PHBV and PCL biofilms had an EF average over 100, AA-OXO and PDLLA biofilm over 50 and PE, AA-PE, OXO, PS and PLLA biofilms under 25.

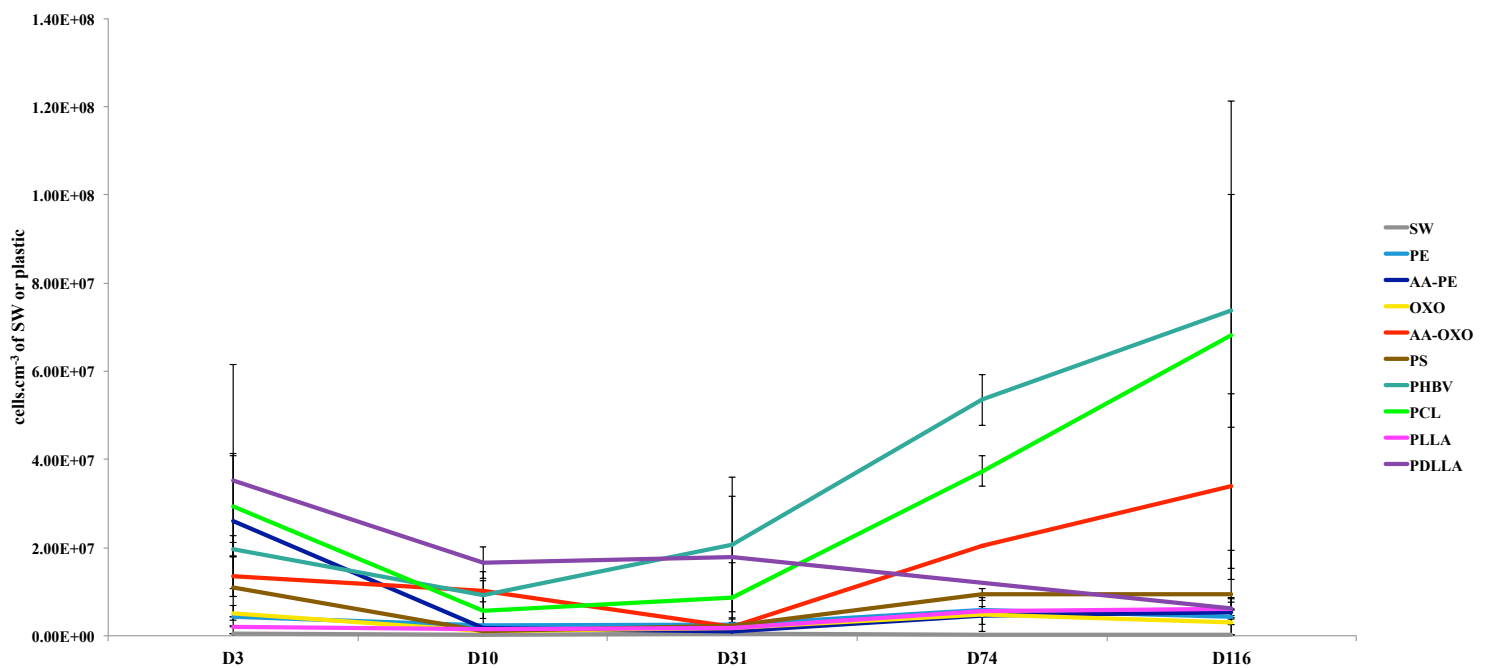


Figure 4: Line plot of cell abundance estimated by flow cytometry on the nine polymer surfaces after detachment of the biofilm (see Material and methods) and in seawater after 3, 10, 31, 74 and 116 immersion days. Results are expressed in cells.cm⁻³ of seawater or plastic (equivalent to cells.ml⁻¹).

Bacterial production

Conventional polymers (PE, OXO, PS), AA-PE, PLLA and PDLLA biofilms showed highest bacterial production during the first 3 days of immersion (between 1471 ng C.dm⁻².h⁻¹ and 394 ng C.dm⁻².h⁻¹) (Fig 5). Then they decreased to reach SW values (62 ng C.l⁻¹.h⁻¹) at D116. The 3 biodegradable plastic had not the same trend: AA-OXO biofilm had a peak of activity at D10 (869 ng C.dm⁻².h⁻¹) and decrease after; PHBV biofilm showed a maximum value at D74 (1340 ng C.dm⁻².h⁻¹) and kept more or less the same activity; PCL biofilm activity was above the other activities during all the incubation time and had the highest value at D116 (2450 ng C.dm⁻².h⁻¹).

If we look at the bacterial production average for the 29 weeks of seawater immersion, PCL biofilm was significantly more active (mean = 2008 ng C.dm⁻².h⁻¹)

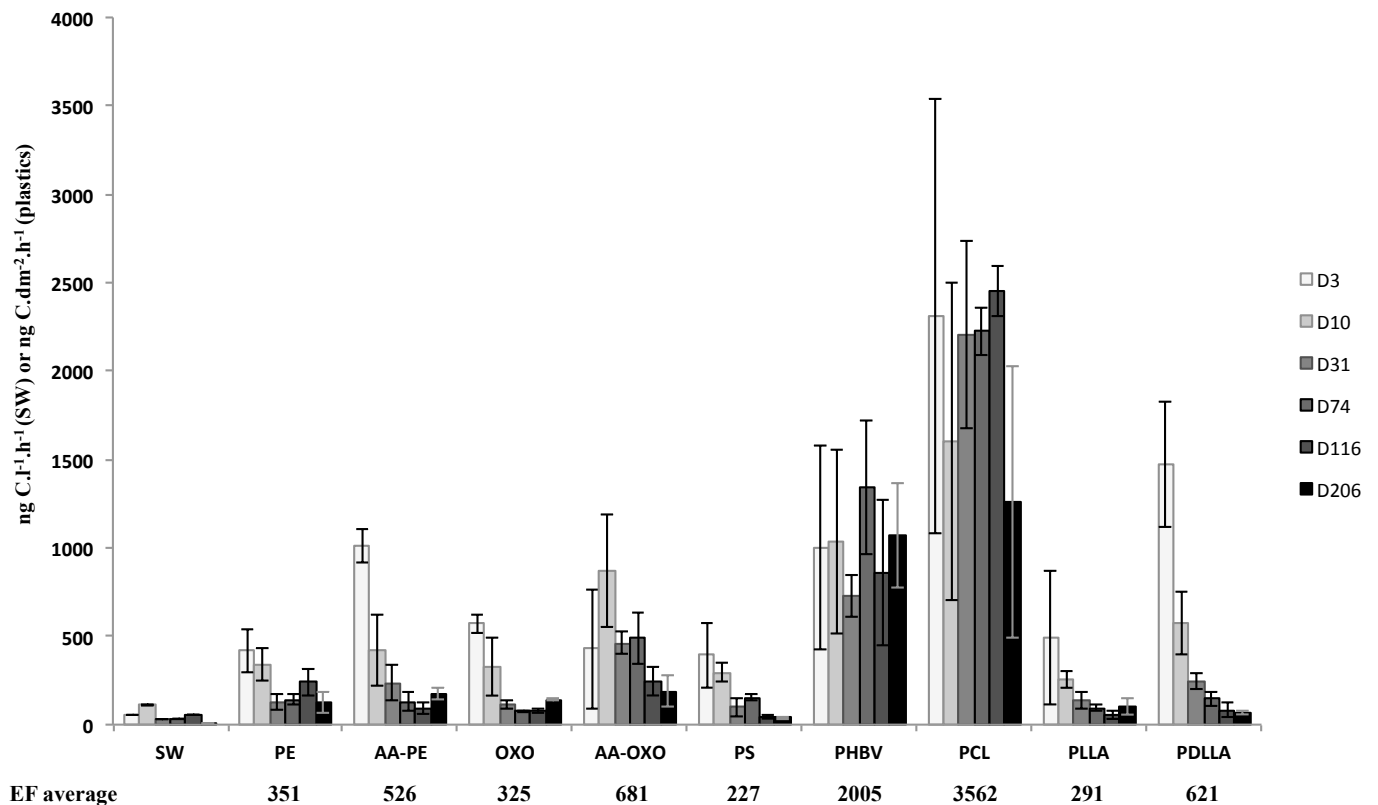


Figure 5: Boxplot representing the heterotrophic bacterial production on polymers and in seawater at the different sampling days (3, 10, 31, 74, 116 and 206). Values are expressed in ng of carbon per liter per hour for seawater and in ng of carbon per dm² per hour for plastic biofilms. Enrichment factor average is done below the boxplot for each polymer.

(t test, p value < 0.05) followed by PHBV biofilm (mean = 1006 ng C.dm⁻².h⁻¹). Biofilms on the other surfaces were fewer active (mean = 264 ng C.dm⁻².h⁻¹) but stayed above SW bacterial production (mean = 49 ng C.l⁻¹.h⁻¹). PLLA biofilm showed the more variable values with high bacterial production at the start of the incubation and exponential decrease afterwards.

Activity enrichment factor calculations confirmed a larger bacterial production on plastic surfaces compared to seawater, even on conventional ones (Fig 5). Higher EF was reached by PCL at the last sampling point: 6268 and lower EF was noticed for PS biofilm: 53. That means that the minimum activity measured on polymers was already 53 times higher than those in seawater for a same volume.

Ectoenzyme activities

Analysis of ectoenzymatic activities gave variable results. Among the 3 enzymes measured amino peptidase was the more produce by plastic biofilms (Fig 6). It was particularly excreted at D74 and D116 on PHBV and PCL polymers (between 2.4 and 4.7 µmol.l⁻¹) and at D206 on AA-OXO (1.2 µmol.l⁻¹). At D3 lipase production showed great values in seawater (0.055 µmol.l⁻¹) and in the majority of conventional plastic and PLLA biofilms (mean = 0.088 µmol.l⁻¹). On PCL and AA-OXO excretion of this enzyme was higher at D31 and D116 respectively (PCL_{D31} = 0.178 µmol.l⁻¹, AA-OXO_{D116} = 0.175 µmol.l⁻¹). Glucosidase enzyme was only well produced at D206 by PCL biofilm (0.355 µmol.l⁻¹) and in one replicate of AA-OXO samples (0.228 µmol.l⁻¹). But we observed higher values for the last sampling points in almost all the polymer biofilms. Among these observations, we noticed that lipase was more excreted during the start of immersion in seawater. Amino peptidase was produced much more from the day 74 and glucosidase at the end of the experiment.

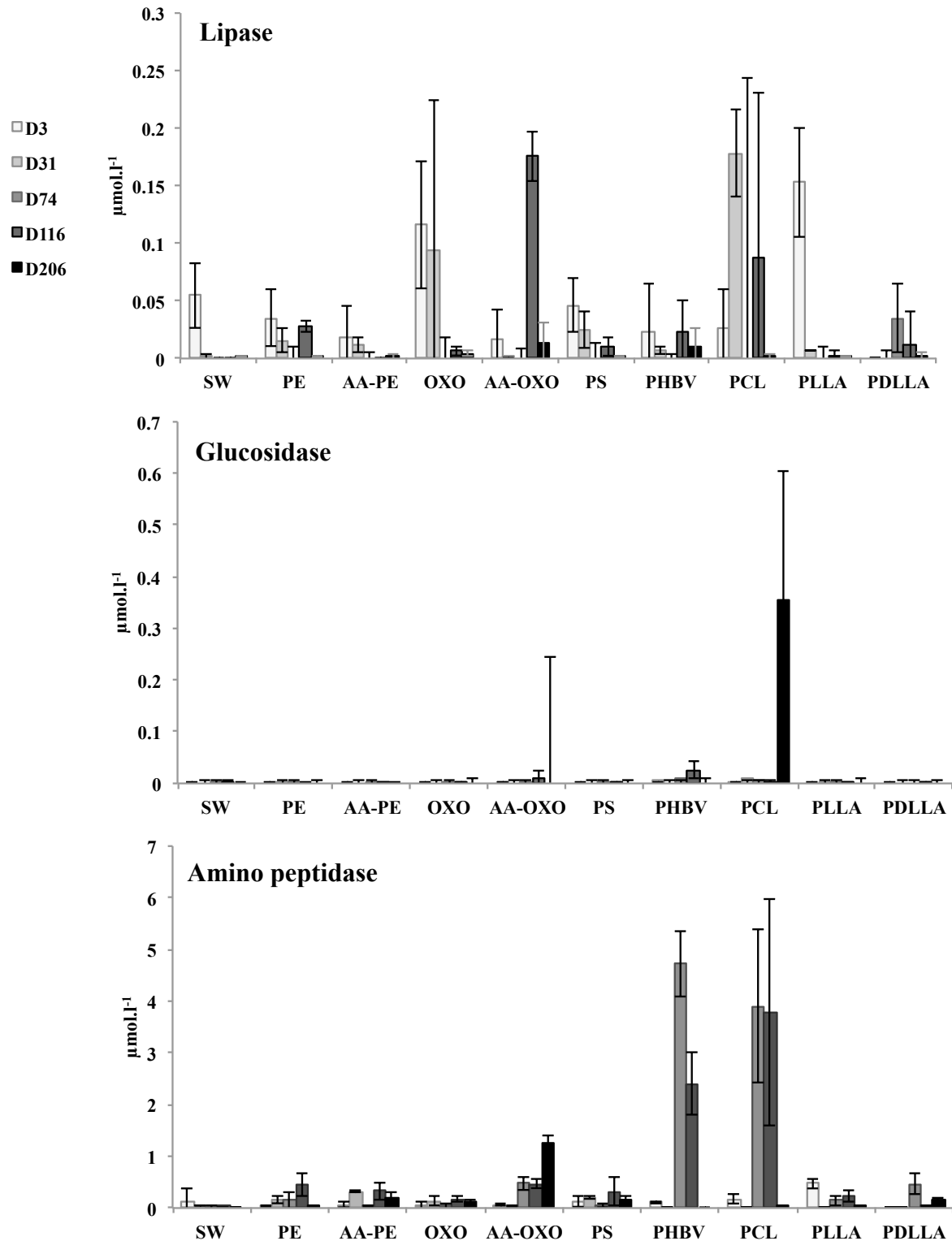


Figure 6: Boxplots representing the different production of ecto enzymes (lipase, glucosidase and amino peptidase) by bacteria on polymers or in seawater depending on time of immersion in seawater. Results are expressed in μmol of enzyme produced per milliliter.

Discussion

Higher bacterial colonization on biodegradable polymers

Our results showed a rapid bacterial colonization of more 10^4 cell.mm⁻² on almost all the polymer types. Early colonization on artificial surfaces is a common feature already described in marine environment with the same order of magnitude (Lee *et al.*, 2008). In this study, microscopic analysis together with flow cytometry allowed noticing significant higher cell abundance on the biodegradable AA-OXO, PHBV and PCL compared to the non-degradable PE, OXO or PS. The same conclusion was recently given in a study comparing bacterial colonization on PE and biodegradable plastic bags in marine sediments, showing a cell abundance 5 times higher on the latter (Nauendorf *et al.*, 2016). To our knowledge, here we gave the first results available on the biofouling of OXO, PHBV, PCL, PLLA and PDLA in natural marine environment, showing cell abundance from 2 to 20 times higher than on conventional PE.

We noticed some discrepancies in our estimation of cell counts estimations between microscopy and flow cytometry, the latter giving generally lower values (in average less than 10 times below, i.e; mean = 8.6 cell.mm⁻², SD=9.0, n=380). Such differences could certainly be explained by a non-optimal detachment of cells by the applied treatments before analysis by flow cytometry, due to a larger quantity of EPS compared to the preliminary tests performed in preliminary experiments (data not shown). Despite the underestimation of cell abundance by flow cytometry, we decided to keep these data as indicative of the surface colonization of polymers non-observable by microscopy because of auto-fluorescence, such as for PDLA. Moreover, microscopic counts on AA-OXO and PHBV were surely underestimated because of the high-developed biofilm on these surfaces.

Bacterial abundance observed on plastic surfaces was largely more concentrated than in surrounding SW for a same volume. We obtained EF until 476 for PHBV and in

average 55 (SD=99, N=44) between polymers and SW. Cell counts measured in SW on the control microcosm were consistent with values found in Mediterranean Sea (between 1.6 and $4.8 \cdot 10^5$ cells.ml⁻¹) (Pulido-Villena *et al.*, 2012). These results reassured in the representativeness of our results in open-circulation microcosms compared to seawater natural conditions.

Rapid evolution of bacterial activities on the different polymers

This study presents pioneer results of biofilm activities on various plastic surfaces. First, we found a bacterial heterotrophic production (BP) until 6270 times (in average 950 times, SD=1350, N=54) higher in plastic biofilms compared to bacteria living in the control seawater conditions. Values of BP in this control (between 10 and 110 ngC.L⁻¹.h⁻¹) were consistent with previous estimation in Mediterranean Sea, between 0 and 200 ngC.L⁻¹.h⁻¹ (Lemée *et al.*, 2002), thus reassuring that the bacteria passing through our open-circulation microcosms were in a non-stressing state.

On conventional polymers (PE, AA-PE, OXO, PS), but also on some biodegradable polymers (PLLA and PDLLA), BP peaked during the early colonization step (day 3) and decreased rapidly after. This observation could be explained by the presence of a conditioning film composed of organic and inorganic matter, which is generally formed in the first hours after seawater immersion on hard surfaces (Loeb and Neihof, 1975). The conditioning film has been described as playing an important role in the recruitment of bacterial cells on the surface and can represent a resource for cell growth and division (Lorite *et al.*, 2011). The consumption and decrease of this labile matter together with the rapid colonization by bacteria could explain the decrease of the BP after 3 days and its transition from the growth stage to the maturation stage (Dobretsov, 2010).

PHBV and PCL polymers gave different trends, with BP remaining high and relatively stable during the 206 immersion days. Such difference may be explained by the consumption of the polymers by the bacteria living on their surface. We are aware that BP is not a direct demonstration of biodegradation, and we cannot rely on other experiment demonstrating their biodegradability in marine environment. Direct visible observation of degradation after few weeks in our conditions was only observed for PCL (Fig 1).

AA-OXO biofilms presented an intermediate evolution, with higher BP than conventional (PE, AA-PE, OXO, PS) or PLLA and PDLLA, but lower than PHBV and PCL. This observation could also indicated biodegradation of AA-OXO in our conditions, but in a lower extend than PHBV and PCL. The biodegradation of AA-OXO was previously demonstrated in soil by fungi (Corti *et al.*, 2010) or in aqueous medium by *Rhodococcus rhodochrous* ATCC 29672 (Fontanella *et al.*, 2013; Eyheraguibel *et al.*, 2017), but never in seawater. Our results open new directions for further demonstration mineralization of AA-OXO oligomers in seawater.

Ecto-enzyme activities completed BP analysis by giving more details on the activity of biofilms on plastic surfaces. Ecto enzymes are effective “tools” for to bacteria to obtain carbon and nutrients from diverse type of compounds (Romaní *et al.*, 2012). Our results showed differentiated excretion of the 3 enzymes, depending on immersion time. Hydrolysis of lipids were more excreted during the first immersion days on all polymer types. Cleavage of amino acids was more pronounced from the 10th week, especially on biodegradable polymers (PHBV, PCL, and to a lesser extent on AA-OXO). Glycoside hydrolase enzyme was only excreted on PCL and a little on PHBV during the last days of the experiment. If these activities allow evaluating the amount of enzymes excreted by cells to degrade complex molecules, they also allow reflecting the quality of the organic matter available in the surrounding environment (Severin *et al.*, 2016). Using three bioassays with

sugar, amino acid and lipid substrates, these experiments indicated dynamic changes in the quality of the available organic matter for biofilm bacteria during the evolution of the biofilm. The link between ectoenzymatic activities and the quality of organic matter requires further studies a coupling with global measurements of organic matter (carbon, nitrogen, organic phosphorus) or with more precise measurements of the composition of lipids, proteins or peptides. A further study taking into account this type of measure would certainly help to better understand the variations of ecto-enzymatic activities measured in our study.

References

- Auta HS, Emenike CU, Fauziah SH. (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.
- Avio CG, Gorbi S, Regoli F. (2016). Plastics and microplastics in the oceans: From emerging pollutants to emerged threat. *Mar Environ Res.* e-pub ahead of print, doi: 10.1016/j.marenvres.2016.05.012.
- Barnes D, Galgani F, Thompson R, Barlaz M. (2009). Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments r R iew On ly. *Philisophical Trans R Soc B, Biol Sci* **364**: 1985–1998.
- Carpenter E, Anderson S, Harvey G, Miklas H. (1972). Polystyrene spherules in coastal waters. *Science* **178**: 749–750.
- Cole M, Lindeque P, Fileman E, Halsband C, Goodhead R, Moger J, *et al.* (2013). Microplastic ingestion by zooplankton. *Environ Sci Technol* **47**: 6646–55.
- Corti A, Muniyasamy S, Vitali M, Imam SH, Chiellini E. (2010). Oxidation and biodegradation of polyethylene films containing pro-oxidant additives: Synergistic effects of sunlight exposure, thermal aging and fungal biodegradation. *Polym Degrad Stab* **95**: 1106–1114.
- Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. (1995). Microbial Biofilms. *Annu Rev Microbiol* **49**: 711–745.
- Davey ME, O’toole GA. (2000). Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**: 847–67.
- Dobretsov S. (2010). Marine Biofilms. In: *Biofouling*. pp 123–136.
- Eich A, Mildenerberger T, Laforsch C, 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.
- Eriksen M, Lebreton LCM, Carson HS, Thiel M, Moore CJ, Borerro JC, *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.
- Eyheraguibel 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.
- Fontanella S, Bonhomme S, Brusson J-M, Pitteri S, Samuel G, Pichon G, *et al.* (2013). Comparison of biodegradability of various polypropylene films containing pro-oxidant additives based on Mn, Mn/Fe or Co. *Polym Degrad Stab* **98**: 875–884.
- Gall SC, Thompson RC. (2015). The impact of debris on marine life. *Mar Pollut Bull* **92**: 170–179.
- Galloway TS, Cole M, Lewis C. (2017). Interactions of microplastic debris throughout the marine ecosystem. *Nat Ecol Evol* **1**: 116.
- Law KL. (2017). Plastics in the Marine Environment. *Annu Rev Mar Sci* **9**: 205–229.
- Lee JW, Nam JH, Kim YH, Lee KH, Lee DH. (2008). Bacterial communities in the initial stage of marine biofilm formation on artificial surfaces. *J Microbiol* **46**: 174–182.
- Lemée R, Rochelle-Newall E, Van Wambeke F, Pizay MD, Rinaldi P, Gattuso JP. (2002). Seasonal variation of bacterial production, respiration and growth efficiency in the open NW Mediterranean Sea. *Aquat Microb Ecol* **29**: 227–237.
- Lobelle D, Cunliffe M. (2011). Early microbial biofilm formation on marine plastic debris. *Mar Pollut Bull* **62**: 197–200.
- Loeb GI, Neihof RA. (1975). Marine conditioning films. *Adv Chem* **145**: 319–335.

- Lorite GS, Rodrigues CM, de Souza AA, Kranz C, Mizaikoff B, Cotta MA. (2011). The role of conditioning film formation and surface chemical changes on *Xylella fastidiosa* adhesion and biofilm evolution. *J Colloid Interface Sci* **359**: 289–295.
- Mével G, Vernet M, Goutx M, Ghiglione JF. (2008). Seasonal to hour variation scales in abundance and production of total and particle-attached bacteria in the open NW Mediterranean Sea (0–1000 m). *Biogeosciences* **5**: 1573–1586.
- Nauendorf A, Krause S, Bigalke NK, Gorb E V, Gorb SN, Haeckel M, *et al.* (2016). Microbial colonization and degradation of polyethylene and biodegradable plastic bags in temperate fine-grained organic-rich marine sediments. *Mar Pollut Bull* **103**: 168–178.
- Oberbeckmann S, Osborn AM, Duhaime MB. (2016). Microbes on a bottle: Substrate, season and geography influence community composition of microbes colonizing marine plastic debris. *PLoS One* **11**: 1–24.
- PORTER KG., FEIG YS. (1980). The use of DAPI for identifying and counting aquatic microfloral. *Limnol Ocean* **25**: 943–948.
- Pulido-Villena E, Ghiglione J-F, Ortega-Retuerta E, Van Wambeke F, Zohary T. (2012). Heterotrophic bacteria in the pelagic realm of the mediterranean sea. In: *Life in the Mediterranean sea: a look at habitat changes*. pp 227–265.
- Romaní AM, Artigas J, Ylla I. (2012). Extracellular enzymes in aquatic biofilms: microbial interactions versus water quality effects in the use of organic matter. In: Academic C (ed). *Microbial biofilms: current research and applications*. Norfolk, p 153–174.
- Severin T, Sauret C, Boutrif M, Duhaut T, Kessouri F, Oriol L, *et al.* (2016). Impact of an intense water column mixing (0-1500 m) on prokaryotic diversity and activities during an open-ocean convection event in the NW Mediterranean Sea. *Environ Microbiol* **18**: 4378–4390.
- De Tender CA, Devriese LI, Haegeman A, Maes S, Vangeyte J, Cattrijse A, *et al.* (2017). The temporal dynamics of bacterial and fungal colonization on plastic debris in the North Sea. *Environ Sci Technol* acs.est.7b00697.
- Teuten EL, Saquing JM, Knappe DRU, Barlaz MA, Jonsson S, Björn A, *et al.* (2009). Transport and release of chemicals from plastics to the environment and to wildlife. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **364**: 2027–45.
- Thompson RC, Olsen Y, Mitchell RP, Davis A, Rowland SJ, John AWG, *et al.* (2004). Lost at sea: where is all the plastic? *Science* **304**: 838.
- Webb HK, Crawford RJ, Sawabe T, Ivanova EP. (2009). Poly(ethylene terephthalate) polymer surfaces as a substrate for bacterial attachment and biofilm formation. *Microbes Environ* **24**: 39–42.

Chapitre 5

Conclusions et perspectives



© Benjamin Von Wong

Chapitre 5 Conclusions et perspectives

1. Conclusions générales, synthèse des principaux résultats

Cette partie rappelle les points forts et les originalités des résultats acquis durant ma thèse, en prenant soin de comparer les résultats relatifs aux prélèvements *in situ* lors de l'expédition Tara-Méditerranée (chapitre 2) et aux expérimentations sur la colonisation de plastiques de différentes compositions pendant plusieurs semaines, dans les conditions de microcosmes en circuit ouvert sur la baie de Banyuls en Méditerranée (chapitre 3 et 4). Elle présente également des mises au point techniques qui n'ont pas été relatées dans les précédents chapitres, comme le développement d'un protocole de détachement des cellules du biofilm pour rendre possible leur analyse en cytométrie en flux et pour les mesures d'activités hétérotrophes bactériennes.

L'expédition Tara-Méditerranée a révélé au grand public que la concentration en microplastique en Méditerranée est du même ordre de grandeur que celle trouvée dans les gyres océaniques, et notamment dans le gyre du Pacifique Nord (appelé « 7^{ème} continent de plastique » et découvert en 1997 par l'océanographe Charles J. Moore). Cette expédition à laquelle j'ai eu la chance de participer nous a offert une opportunité unique d'analyser une grande quantité d'échantillons prélevés dans une large zone géographique. Cette thèse relate de travaux pionniers sur la colonisation bactérienne des plastiques en mer Méditerranée (chapitre 2). Ils nous ont permis de montrer la spécificité de la microflore associée aux plastiques par rapport aux communautés libres et attachées aux particules vivant dans l'eau environnante, ce qui constitue une originalité par rapport à la littérature existante à ce jour. De part un nombre très important d'échantillons récoltés durant la campagne Tara-Méditerranée (plus de 300 filets « manta » avec tri manuel de fragments de plastiques variant de 21 à 263 par trait de filet), nous avons choisi de focaliser notre étude sur le bassin occidental de la Méditerranée, permettant une couverture suffisamment représentative à l'échelle de ce bassin. Notre étude présente le nombre le plus important de morceaux de plastiques utilisés dans une même étude portant sur la « plastisphère », ce qui renforce sa représentativité et la portée de nos travaux. Dans un deuxième temps, des systèmes expérimentaux novateurs utilisant des microcosmes en circuit ouvert sur la mer nous ont offert la possibilité de suivre les premières étapes de colonisation de différents plastiques conventionnels et « biodégradables » en milieu marin (chapitres 3 et 4). L'évolution des communautés bactériennes a été suivie à la fois en

mesurant l'abondance, la diversité et l'activité des bactéries, ce qui constitue également une originalité. Nous avons également pris soin de coupler les mesures biologiques à des mesures physiques qui ont permis de caractériser les polymères étudiés, qui n'est pas systématiquement pris en compte dans la littérature.

1.1 Un biofilm abondant sur les surfaces plastiques

Plusieurs études ont montré qu'il existe une grande diversité de microorganismes vivant à la surface des plastiques en milieu marin. Pour illustrer cette diversité, ces travaux ont utilisés la technique de microscopie électronique à balayage (Zettler *et al.*, 2013; Harrison *et al.*, 2014; Eich *et al.*, 2015; Carson *et al.*, 2013; Oberbeckmann *et al.*, 2014; Reisser *et al.*, 2014). Si cette technique permet de produire des images en haute résolution et en trois dimensions de la surface d'un échantillon, elle ne permet pas de quantifier les microorganismes, ni d'évaluer les facteurs d'enrichissement entre les organismes vivant sur les plastiques par rapport à ceux de l'eau de mer environnante.

En utilisant la technique de microscopie à épifluorescence, nos travaux ont permis pour la première fois de quantifier l'abondance bactérienne sur les plastiques retrouvés en mer. De manière surprenante, il n'existait aucune étude utilisant la microscopie à épifluorescence, qui est pourtant une technique moins chronophage et qui permet de traiter un plus grand nombre d'échantillons que la microscopie à balayage. Sur la base de plus de 150 morceaux de plastiques observés par microscopie, nous avons identifié un biofilm abondant sur les polymères récoltés par l'expédition Tara-Méditerranée, et également sur ceux immergés en microcosmes (jusqu'à $6,5 \times 10^5$ cell.mm⁻²). Nos observations ont également permis de mettre en évidence une grande concentration de bactéries à la surface des polymères par comparaison à l'eau de mer environnante, jusqu'à 4000 fois supérieure (facteur d'enrichissement en moyenne de 900 pour les échantillons Tara et de 600 pour ceux des expériences en microcosmes). D'autres études ont montré que dès les premières minutes après immersion en mer, les matières artificielles comme le plastique sont recouvertes de molécules principalement organiques qui forment le « film conditionnant » (Loeb and Neihof, 1975). Durant cette phase, nous avons montré que les cellules « primo-colonisatrices » sont réparties de manière homogènes à la surface du polymère. Dans les stades suivants de croissance et de

maturation du biofilm, la répartition des bactéries s'organise ensuite sous forme d'agrégats de cellules qui ne recouvre pas totalement la surface du matériau.

La microscopie à épifluorescence présente l'avantage de pouvoir observer visuellement les organismes qui peuvent être quantifiés, mais nous avons pu observer ses limites à la fois lorsque le biofilm devient trop dense (en cellules ou en EPS) ou si la constitution du polymère produit de l'auto-fluorescence (émission de fluorescence par le matériau lui-même). Pour pallier aux obstacles qui nous empêchaient dans certains cas de comparer les échantillons entre eux, nous avons choisi d'utiliser la cytométrie en flux en parallèle de la microscopie à épifluorescence. La cytométrie permet une quantification et une caractérisation rapide des microorganismes, en faisant défiler les cellules à grande vitesse dans le faisceau d'un laser. Cette technique ne permet pas une observation directe de la forme des microorganismes et surtout, elle est limitée à la quantification de cellules libres individualisées dans l'eau. Dans notre cas, il a donc fallu élaborer un protocole qui permettait de détacher les cellules du biofilm pour pouvoir les compter par cytométrie en flux. Une série de prétraitements physiques (ultrasons, vortex), chimique (pyrophosphate de tétrasodium : PPi) et biologique (mélange enzymatique) ont été testés et la quantification obtenue par cytométrie en flux a été comparée à celle de la microscopie à épifluorescence sur les mêmes échantillons. Après dénombrement de 13 plastiques différents (prélevés dans le port de Banyuls sur mer) ayant subi 11 prétraitements comparés à un témoin, le couplage de 30 min d'incubation avec du PPi et 3x5 sec de sonde à ultra-sons s'est révélé être le traitement le plus efficace pour détacher le maximum de cellules (Tab. 4).

Analyse/Traitement	S	3VB	PPi	Enz	Ppi/S	Enz/S	PPi/3VB	Enz/3VB	Enz/PPi	Enz/PPi/S	Enz/PPi/3VB
Prod Bact	=	+++	-	+	++	+	+++	+	++	+	-
Cytométrie	++	+	=	=	+++	++	=	+	=	++	+

Tableau 4 : Résultats des différents essais de mise au point de la technique de détachement des cellules du support plastique, pour une mesure de production bactérienne hétérotrophe (ProdBact) et un comptage en cytométrie en flux (Cytométrie). Les conditions expérimentales donnant les valeurs les plus élevées avec une bonne concordance entre les techniques de cytométrie et de microscopie à épifluorescence sont notés +++.

Les tests comparatifs entre les valeurs obtenues avec les deux méthodes de dénombrement (microscopie à épifluorescence vs. cytométrie en flux) ont été concluant, à l'exception de certains échantillons très chargés en EPS où une sous-estimation des résultats de cytométrie en flux a été observé. Néanmoins, cette différence n'a jamais dépassé un facteur 10 entre les deux méthodes (Tab. 5). Pour les échantillons de la mission Tara-Méditerranée, la méthode de comptage par microscopie a été préférée à celle de la cytométrie en flux puisque

les biofilms étaient plus matures, rendant le détachement des cellules plus aléatoire. Par contre, la cytométrie était plus reproductible pour les expériences en microcosmes. Elle a permis notamment de déterminer l'abondance bactérienne sur le PHBV et l'AA-OXO, qui présentaient une auto-fluorescence et rendait impossible les comptages en microscopie à épifluorescence.

Microscopie cell.mm-2	Tara	Microcosmes Exp n°1	Microcosmes Exp n°2
Moy	4.4E+04	3.8E+04	7.8E+04
min	1.1E+03	1.3E+04	6.8E+03
max	1.9E+05	1.3E+05	6.4E+05
SD	3.7E+04	3.2E+04	1.1E+05
Cytométrie cell.mm-2			
Moy	/	6.9E+03	1.2E+04
min		8.4E+02	3.9E+01
max		3.4E+04	7.4E+04
SD		6.7E+03	1.6E+04
Ecart Micros/Cyto		5.6	6.4

Tableau 5 : Tableau comparatif des abondances cellulaires observées sur des morceaux de plastique échantillonné pendant la mission Tara Méditerranée ou lors des expériences en microcosmes.

La comparaison des abondances cellulaires moyennes dénombrées en microscopie sur les plastiques prélevés lors de l'expédition Tara-Méditerranée (chapitre 2) et sur ceux des microcosmes (chapitres 3 et 4) montrent une forte similarité. On aurait pu s'attendre à une concentration cellulaire plus importante sur les fragments plastiques ayant passé plus de temps en mer (Tara). Ces résultats confortent nos conclusions sur l'état de maturation des biofilms observés dans les expériences en microcosmes. La stabilisation des biofilms lors de la phase de maturation est bien décrite dans la littérature, sur plusieurs types de matériaux immergés en mer (Marshall *et al.*, 1971; Katsikogianni and Missirlis, 2004). Nos travaux montrent que cette observation est également valable pour les biofilms matures des surfaces plastiques, suggérant la présence d'une abondance limite atteinte rapidement en mer à partir de laquelle le nombre de cellules du biofilm n'évolue plus.

La quantification des bactéries présentes à la surface de différents types de polymères ont montré que le développement du biofilm bactérien était systématiquement plus important sur les plastiques dits « biodégradables » comme l'AA-OXO, le PHBV et le PCL

dans nos conditions de microcosmes en circuit ouvert sur la mer. C'est le cas en particulier des polymères OXO artificiellement pré-oxydés (AA-OXO, pré-vieillissement thermique), où nous avons observé un biofilm beaucoup plus important par rapport à un OXO non vieilli. Sur la base de nos observations, il est difficile d'expliquer cette différence puisque nous n'avons pas de preuve formelle de la biodégradation du polymère OXO pré-vieilli (AA-OXO) dans nos conditions expérimentales. Cette biodégradation pourrait conduire à une augmentation de la biomasse et de l'abondance des bactéries qui se nourriraient de ce polymère. L'abondance des cellules trouvées sur l'AA-OXO étant proche de celles trouvées sur le PHBV, nos conclusions pourraient aller dans le sens d'une biodégradation effective durant l'expérience, même si nous n'avons pas non plus de preuve formelle de biodégradation du PHBV dans nos conditions expérimentales (à notre connaissance, il n'existe pas de démonstration de la biodégradabilité du PHBV en mer qui aurait pu conforter cette hypothèse). D'autres hypothèses pourraient expliquer la plus grande abondance cellulaire sur le AA-OXO, comme les changements de rugosité de surface et d'hydrophobicité lors des traitements de vieillissement accélérés (voir partie V.1.5). Des travaux supplémentaires seront nécessaires pour trancher entre ces différentes hypothèses.

1.2 Des communautés bactériennes distinctes sur les plastiques

Les recherches menées pendant cette thèse ont apporté de nouvelles connaissances sur le sujet des communautés bactériennes associées aux déchets plastiques en mer. Tout d'abord, les analyses effectuées sur les fragments plastiques collectés en mer Méditerranée apportent les premiers résultats dans cette zone géographique particulièrement polluée (campagne Tara-Méditerranée, chapitre 2). Ensuite l'étude en microcosmes donne de nouvelles perspectives concernant la colonisation bactérienne sur les plastiques dits « biodégradables » (chapitres 3 et 4).

Ces deux niveaux d'études abordés pendant cette thèse, ainsi que d'autres travaux récents de la littérature, nous ont permis de vérifier l'existence de communautés bactériennes spécifiques et très diversifiées sur les déchets plastiques, par rapport aux fractions libre et attachée aux particules organiques présentes dans l'eau de mer environnante. Depuis l'article de Zettler et al. en 2013, la distinction des communautés bactériennes colonisant les plastiques par rapport à celles de l'eau environnante avait pu être vérifiée par des études

récentes (Oberbeckmann *et al.*, 2014; De Tender *et al.*, 2015a; Bryant *et al.*, 2016; Mincer *et al.*, 2016). Une telle répartition des niches écologiques soulève des questionnements sur le rôle fonctionnel de ces communautés spécifiquement retrouvées sur les plastiques, qui augmentent avec le nombre de fragments plastiques dans les océans mondiaux. La force de l'étude réalisée en mer Méditerranée grâce à l'expédition Tara Méditerranée repose sur la couverture géographique ainsi que sur le nombre de fragments plastiques étudiés (n=74). Sur la base de ce large éventail d'échantillons prélevés en mer Méditerranée occidentale, cette étude donne de nouvelles orientations pour estimer le rôle écologique des communautés sur les plastiques, grâce notamment à l'utilisation du logiciel PiCrust qui nous a permis d'obtenir un profil fonctionnel prédictif à partir de données de séquençage de l'ARNr16S. En parallèle, l'étude réalisée en microcosmes a apporté des conclusions originales sur le biofouling en mer d'autres types de polymères moins retrouvés lors de prélèvements *in situ* en mer, tels que le PHBV et l'OXO vieilli artificiellement ou non. Le premier résultat marquant commun à ces deux études est la différence significative observée entre les populations de la plastisphère et celles de la fraction libre ou attachée à la matière organique. Cette dernière fraction est rarement étudiée en comparaison à la plastisphère, alors que son analyse est indispensable pour évaluer l'attachement spécifique de certaines bactéries aux matières plastiques par rapport aux particules organiques.

Les résultats obtenus *in situ* à partir de la campagne Tara-Méditerranée n'ont pas montré de différence de structure de communautés en fonction du type de plastique (PE, PP, PS ou co-polymères) contrairement aux résultats issus des microcosmes où les polymères biodégradables (PHBV et AA-OXO) se distinguaient par rapport au PE ou à l'OXO. Cela peut s'expliquer par les différences de composition des plastiques biodégradables par rapport aux plastiques conventionnels non biodégradables (PE, PP, PS) retrouvés *in situ*, mais aussi par le fait que les échantillons prélevés lors de cette expédition étaient beaucoup plus vieux.

Après l'analyse taxonomique des communautés retrouvées sur les morceaux de polymères prélevés *in situ* lors de l'expédition Tara-Méditerranée (principalement du PE), le groupe des Cyanobactéries a été trouvé particulièrement abondant. La prolifération de ce taxa doté de capacité de photosynthèse à la surface des déchets plastiques pourrait influencer les cycles biogéochimiques du carbone et de l'azote à la surface des océans lorsqu'on prend en compte la quantité de particules plastiques retrouvées dans cette mer. Des travaux réalisés par l'Observatoire Océanologique de Villefranche (coordinateur de l'expédition Tara-

Méditerranée) sont actuellement en cours pour vérifier cette hypothèse. Dans nos conditions de microcosmes en circuit ouvert sur la baie de Banyuls, la quasi-absence de Cyanobactéries peut être expliquée par les conditions d'obscurité appliquées à l'expérience pour éviter la prolifération de micro-algues et la dégradation abiotique entraînée par les UV. Une autre hypothèse serait que les cyanobactéries n'étaient pas particulièrement abondantes en baie de Banyuls lors de notre étude, ou qu'elles auraient besoin d'un biofilm mature plus ancien pour se développer. La Figure 25 montre que plus généralement, la structure des communautés bactériennes retrouvées sur les morceaux plastiques immergés en microcosmes et celle identifiée *in situ* sont clairement différentes. Ces dissimilarités peuvent être expliquées par le temps de résidence des échantillons de plastiques récoltés *in situ*, qui doit être de plusieurs années puisqu'ils sont de petite taille (<1cm) et essentiellement composés de polymères considérés comme peu ou pas biodégradables (essentiellement du PE). Dans le cadre des expériences en microcosmes, les morceaux de plastiques initialement « neufs » ont été immergés à l'obscurité pendant un maximum de 6 semaines. Les conditions expérimentales ainsi que la durée d'immersion sont certainement les deux facteurs principaux pour expliquer la divergence de structure de population entre les plastiques récoltés *in situ* et ceux incubés en microcosmes. Nous verrons aussi que les premiers stades de formation du biofilm à la surface des polymères correspondent à des étapes de grands remaniements des communautés (Partie V.1.4.). Il est important de noter que si des dissimilarités sont observées entre les structures des communautés de la plastisphère des plastiques *in situ* et ceux des microcosmes, celles des eaux de mer sont très similaires. Ce résultat conforte la représentativité de nos expérimentations en microcosmes qui présentent l'originalité d'être en circuit ouvert sur la mer.

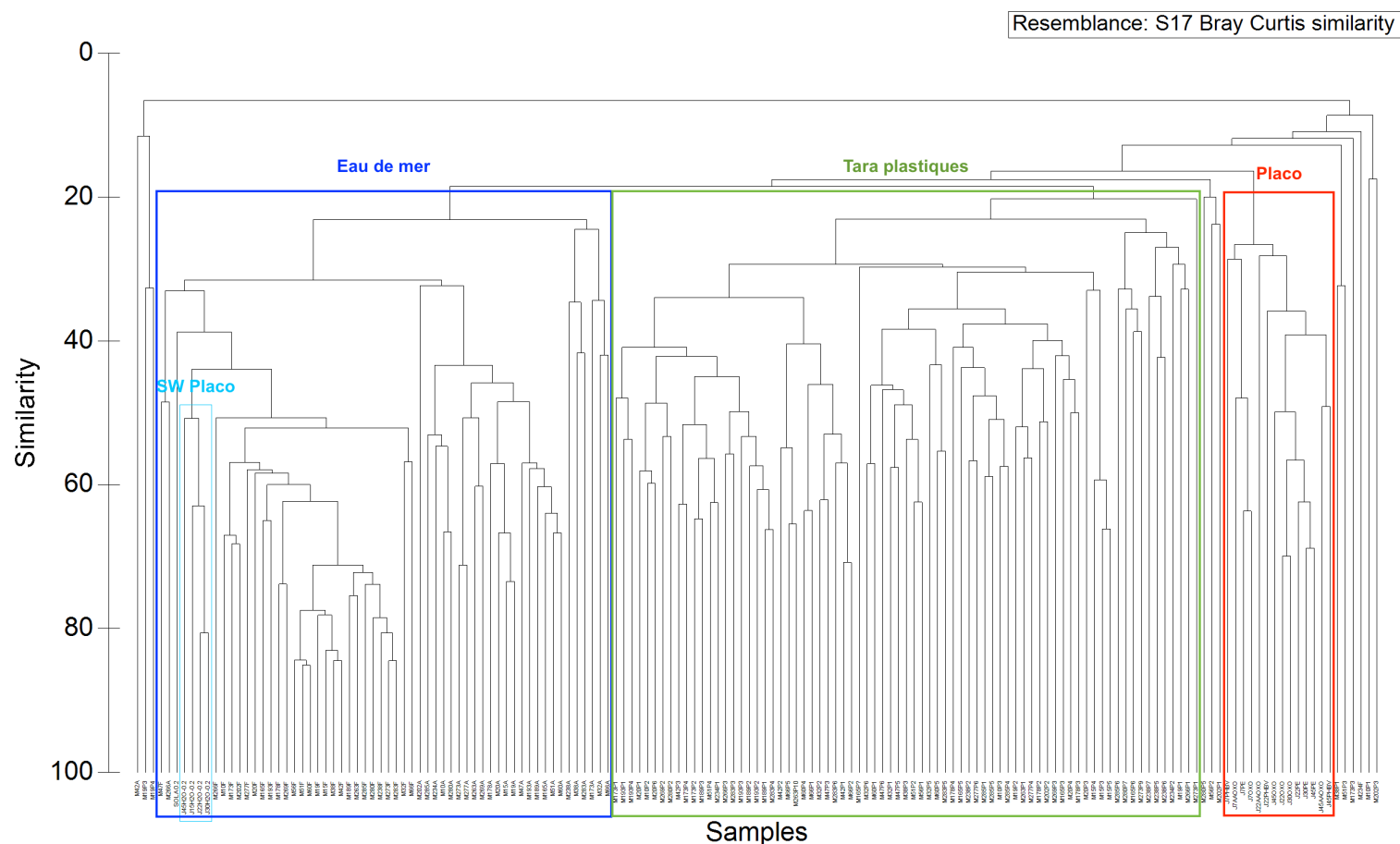


Figure 25 : Dendrogramme compilant les pourcentages de similarités des structures des communautés bactériennes des échantillons de plastiques prélevés *in situ* lors de l'expédition Tara-Méditerranée (chapitre 2) et lors de l'expérience en microcosme n°1 (chapitre 3) et montrant la ressemblance des populations présentes dans l'eau de mer environnante des deux conditions *in situ* et en microcosme en circuit ouvert sur la mer.

Plusieurs articles scientifiques ont rapporté la présence d'espèces potentiellement pathogènes vivant sur les plastiques, alertant sur le risque de propagation et de prolifération de souches pathogènes par les déchets plastiques. C'est notamment le cas des bactéries du genre *Vibrio* qui profiteraient des plastiques pour se disperser dans les océans (Zettler *et al.*, 2013; De Tender *et al.*, 2015b; Kirstein *et al.*, 2016; Debroas *et al.*, 2017). Les différentes études menées pendant cette thèse n'ont pas détecté une quantité plus importante de *Vibrio* sur les plastiques par rapport à l'eau de mer environnante. Nous avons choisi dans nos articles de nuancer l'hypothèse des déchets plastiques comme « radeaux pour les bactéries pathogènes » énoncée par des études se basant parfois sur un seul échantillon possédant une forte abondance relative de *Vibrio sp.*. Sachant que toutes les espèces de ce genre ne sont pas pathogènes et ne sachant pas si ces espèces sont réellement concentrées sur les polymères par

rapport à l'eau, il ne nous semble pas justifié en effet de qualifier les fragments plastiques de vecteurs de « dangereux auto-stoppeurs » (« dangerous hitchhikers »). D'autre part, il est important de souligner que le séquençage de l'ARNr16S, s'il permet une assignation taxonomique relativement précise, ne permet pas de prouver la pathogénicité de l'espèce identifiée. Pour prouver une prolifération, ou non, de souches pathogènes sur les polymères, il faudrait observer en laboratoire leur développement sur le substrat immergé dans un milieu marin dont leur concentration est connue. Ensuite, il serait nécessaire de tester la pathogénicité des souches présentes sur les prédateurs secondaires qui ingèrent les morceaux de plastique. Une seule étude à ce jour a proposé une expérience décrivant la colonisation de micro-billes de polystyrène par une souche de *Vibrio crassostreae* (Foulon *et al.*, 2016). Les auteurs concluent que la souche est un colonisateur secondaire et que son adhésion et son développement dépendent de la diversité de la communauté déjà présente, mais ne se positionnent pas sur la capacité des plastiques en général à disperser les pathogènes.

Cela dit une remarque complémentaire doit être prise en considération : le caractère persistant des matières plastiques va à la fois augmenter le taux de rétention des particules dans les organismes qui les ingèrent (Gall and Thompson, 2015), mais aussi augmenter le niveau de stress de l'animal (Sussarellu *et al.*, 2016). Les agents pathogènes opportunistes qui se sont développés à la surface des plastiques pourraient alors profiter de cette défaillance pour traverser la barrière intestinale de l'hôte et devenir pathogènes. La problématique ne concernerait pas seulement la dispersion des espèces potentiellement pathogènes, mais plutôt l'augmentation de la sensibilité de l'hôte. En effet, le stress engendré par l'ingestion de matières plastiques peut avoir un impact sur la diminution du système immunitaire de l'organisme et le rendre plus vulnérable. Cette remarque soulève une question qui reste non élucidée pour l'instant, qu'il faudra prendre en compte dans l'avenir en testant en parallèle la concentration à partir de laquelle les espèces dont la pathogénicité est avérée conduisent à des pathogénèses chez certains animaux marins et/ou chez l'homme.

Nous avons attiré l'attention dans nos articles sur la présence d'OTUs hydrocarbonoclastes, identifiés en plus grande quantité sur les polymères étudiés en microcosmes et dans une moindre mesure sur les plastiques prélevés *in situ* lors de l'expédition Tara-Méditerranée (Tab. 6). Ces espèces spécialisées dans le catabolisme de molécules de type hydrocarbures étaient particulièrement abondantes lors des premières phases de colonisation des surfaces des polymères. Leur présence sur les plastiques issus de la

pétrochimie pourrait porter à croire en leur capacité de biodégradation des plastiques qui leur conférerait un avantage sélectif pour la colonisation de ces matériaux. Néanmoins, leur dominance lors de la primo-colonisation et leur diminution lors des phases suivantes de maturation du biofilm ne supportent pas cette hypothèse. Il est plus raisonnable de penser que leur capacité d'attachement à des surfaces hydrophobes (c'est le cas des hydrocarbures, mais aussi des plastiques) leur confère un avantage sélectif lors de la primo-colonisation. La dominance des bactéries hydrocarbonoclastes démontre aussi l'importance des interactions substrat/cellule dans les premières phases de développement du biofilm. Ces bactéries joueraient donc un rôle essentiel pour le développement rapide du biofilm, dont la composition varie rapidement après la primo-colonisation. Il est à noter que la plupart des bactéries hydrocarbonoclastes identifiés dans nos échantillons appartenaient aux Gammaproteobacteria, très présentes sur les échantillons issus des microcosmes mais quasi absents sur les échantillons de l'expédition Tara-Méditerranée. Cette classe bactérienne a été identifiée comme regroupant des espèces généralement retrouvées dans les premiers stades de développement des biofilms (Lee *et al.*, 2008; Elifantz *et al.*, 2013; Harrison *et al.*, 2014). Les fragments plastiques récoltés *in situ* lors de l'expédition Tara-Méditerranée, ayant passé plus de temps en milieu marin, possèdent plus d'espèces des classes Alphaproteobacteria et Cyanobacteria. Encore une fois, il est important de prendre en considération les conditions expérimentales dans lesquelles ont été mises les microcosmes (obscurité notamment) avant de faire des conclusions trop hâtives. Les outils de prédictions métagénomiques (utilisation du logiciel PiCrust) ont également montré des fonctions spécifiques associées au biofilm telle que la dégradation des hydrocarbures. D'autres études seront nécessaires pour évaluer la capacité de certaines de ces espèces hydrocarbonoclastes à coloniser préférentiellement certains types de polymères plus ou moins hydrophobe, ou à biodégrader certains polymères en milieu naturel marin.

	Moyenne Microcosmes	Max Microcosmes	Moyenne Tara	Max Tara
Gammaproteobacteria				
<i>Alcanivorax sp</i>	5.3	20.3	0.0	0.3
<i>Marinobacter sp</i>	4.9	11.5	0.0	0.2
<i>Aestuariicella hydrocarbonica</i>	4.8	24.3	0.0	0.2
<i>Alcanivorax indicus</i>	3.9	20.7	0.0	0.0
<i>Neptuniibacter sp</i>	2.4	30.4	0.0	0.0
<i>Glaciecola punicea</i>	2.3	8.3	0.0	0.5
<i>Oleiphilus messinensis</i>	1.2	6.0	0.0	0.0
<i>Maricurvus nonylphenolicus</i>	1.0	3.3	0.0	0.0
<i>Glaciecola sp</i>	0.7	3.5	0.3	19.3
<i>Pseudoalteromonas sp</i>	0.3	1.4	0.6	21.1
Alphaproteobacteria				
<i>Lutibacterium anuloederans</i>	2.9	27.5	0.0	0.0
<i>Roseobacter sp</i>	1.3	6.0	4.6	62.1
<i>Hyphomonas sp</i>	0.7	2.2	0.9	5.9
<i>Erythrobacter sp</i>	0.0	0.1	3.8	43.1
Cyanobacteria				
<i>Phormidium sp</i>	0.0	0.0	1.1	10.6

Tableau 6 : Abondances relatives (%) des OTU hydrocarbonoclastes majoritairement retrouvées sur les polymères des différentes études.

1.3 Forte activité bactérienne de la plastisphère en milieu marin

Nos travaux exposent pour la première fois des mesures d'activités hétérotrophes bactériennes sur les plastiques, par incorporation de leucine tritiée dans les cellules. Une seule étude avait déjà réalisé des mesures de respiration (production d'O₂) sur un biofilm bactérien et microalgal (diatomées) sur du PE et du plastique biodégradable (Mater-Bi (N°014)). Ces travaux ont observé une consommation d'oxygène mais une trop grande variabilité des mesures pour conclure à des différences significatives entre les types de plastiques (Eich *et al.*, 2015).

Etant donné qu'aucune analyse de production bactérienne n'avait été faite auparavant sur des morceaux de plastiques, nous avons dû développer un protocole pour la mesure de la production bactérienne hétérotrophe sur les plastiques. En se basant sur le protocole classiquement utilisé pour les communautés bactériennes marines de (Kirchman *et al.*, 1985), différentes concentrations de leucine ainsi que différents pré-traitements ont été testés sur les biofilms des plastiques. La concentration optimale de leucine a été estimée à 150nM, soit 3,5 fois supérieure à celle utilisée pour la mesure d'activité dans l'eau de mer. De la même

manière que pour la cytométrie en flux, l'efficacité des 11 prétraitements ont été testés et le traitement 3 vortex-bain ultrasons (3 cycles de VB : 1' de vortex + 3' de bain à ultrasons) a été retenu pour mesurer au mieux l'activité du biofilm.

L'utilisation de la radioactivité n'ayant pas été autorisée à bord du navire océanographique TARA lors de l'expédition Tara-Méditerranée, ces mesures n'ont pu être réalisées que pour les 2 expérimentations en microcosme. Elles ont permis de montrer une activité hétérotrophe des bactéries de la plastisphère significativement plus importante que celle de l'eau de mer environnante (t-test, p-value $\ll 0,05$) (Tab. 7). Des valeurs statistiquement identiques ont été retrouvées pour le PE, l'OXO et l'AA-OXO au cours des deux expériences (t-test, p-value = 0,60, 0,38 et 0,33 respectivement), alors que l'activité mesurée dans l'eau de mer a montré des variations mineures mais significatives (t-test, p-value $< 0,05$) expliquées par les prélèvements à différentes saisons. Cette remarque permet de souligner que l'activité du biofilm sur les plastiques semble peu dépendante des variations de l'eau environnante dans nos microcosmes, renforçant l'idée que les déchets plastiques en mer offrent une nouvelle niche écologique aux bactéries.

De plus, la similarité des assemblages bactériens de la fraction totale (sur la base de l'ADNr 16S) et de la fraction métaboliquement active (sur la base de l'ARNr 16S) démontre que les cellules présentes sont généralement actives, ce qui confirme le caractère actif des communautés bactériennes des biofilms sur les polymères.

Les mesures de production bactérienne ont aussi permis de mettre en évidence une différence d'activité dépendante de la composition des plastiques. Les biofilms sur les plastiques dits « non biodégradables » (PE, OXO, PS) ont montré une activité bactérienne significativement plus faibles que les biofilms se développant sur les polymères « biodégradables » (AA-OXO, PHBV, PCL, PDLLA). Sans affirmer qu'une biodégradation de la matière plastique est en cours sur ces derniers, il est possible de conclure que les communautés bactériennes trouvent sur ces surfaces « biodégradables » plus de ressources qui leur permettent un développement plus actif. La qualité des ressources et leur adsorption plus importante sur les polymères biodégradables est un champ de recherche qui sera important à explorer dans l'avenir pour pouvoir mieux comprendre les facteurs limitant le biofouling sur les plastiques.

		VS		t-test, p-value	Signif
		SW	Plast tot	0.002	**
Moyenne (ngC/L/h)		SW	PE	0.001	**
SW	45.8	SW	OXO	0.01	*
Moyenne (ngC/dm2/h)		SW	AA-OXO	0.0004	***
PE	208.5	SW	PHBV	0.00005	***
OXO	171.5	PE	OXO	0.52	=
AA-OXO	572.5	PE	AA-OXO	0.01	*
PHBV	769.0	PE	PHBV	0.0005	***
		OXO	AA-OXO	0.006	**
		OXO	PHBV	0.0002	***
		AA-OXO	PHBV	0.44	=

Tableau 7 : Comparaison des moyennes de production bactérienne hétérotrophe en fonction des types de substrat à l'aide du test statistique de Student ($\alpha = 0.05$).

Lors de la deuxième expérience en microcosmes, des mesures complémentaires pour évaluer l'activité du biofilm ont été réalisées. En plus des analyses d'activités hétérotrophes bactériennes, l'analyse de 3 ectoenzymes produites (glucosidase, lipase, protéase) par les bactéries a permis de montrer une grande variabilité des valeurs dans le temps et en fonction des polymères. Aucune corrélation n'a été trouvée entre les activités ectoenzymatiques et les autres paramètres biologiques (abondance, production hétérotrophe) ou abiotiques (type de substrat, temps d'immersion). Si ces activités permettent d'évaluer la quantité d'enzymes excrétées par les cellules pour dégrader des molécules complexes, elles permettent également de refléter de la qualité de la matière organique disponible dans le milieu environnant les bactéries (Severin et al., 2016). Le lien entre les activités enzymatiques et la qualité de la matière organique nécessite un couplage avec des mesures globales de matière organique (carbone, azote, phosphore organique) ou avec des mesures plus précises de dosages de la composition en lipides, protéines ou sucres. Une prochaine étude prenant en compte ce type de mesures permettrait certainement de mieux comprendre les variations d'activités ectoenzymatiques mesurées dans notre étude. L'analyse prochaine de la diversité bactérienne sur ces échantillons devrait également permettre une interprétation plus complète de ces résultats.

Enfin, des mesures de consommation de dioxygène (O_2) et de production de dioxyde de carbone (CO_2) ont été réalisées en milieu minimum pour cette fois-ci prouver l'utilisation des molécules polymériques comme seule source de carbone pour les bactéries. Ces résultats

n'ont pas été présentés dans le chapitre 4, car nous sommes en train de valider cette technique et notamment l'utilisation de senseurs optiques de mesures d'O₂ de la marque (Presens precision sensing ®) pour notre utilisation. Seul le PCL a donné des résultats significatifs avec une disparition totale d'oxygène dans le milieu après 15 jours d'incubation en milieu minimum avec ce polymère comme seule source de carbone et d'énergie (Fig. 26). Ce polymère semble donc être biodégradable en milieu marin. L'observation à l'œil nu de la détérioration quasi-complète des morceaux de PCL après un peu plus de 6 mois en eau de mer va dans le sens de sa qualification de « biodégradable ». Une consommation, beaucoup moins marquée, de dioxygène par le biofilm des autres polymères a également été constatée dans les premiers jours d'incubation en milieu minimum. Cette diminution a été attribuée à la consommation de matière organique présente sur le substrat plutôt qu'au catabolisme des polymères. Ce résultat souligne la difficulté de l'utilisation de la mesure d'activité bactérienne dans un milieu que l'on considère n'ayant pas d'autre source de carbone que le plastique ajouté. En effet, les plastiques sont préalablement incubés en milieu naturel pour assurer une colonisation par des bactéries marines représentatives du milieu marin. Néanmoins, en milieu naturel, le plastique est aussi colonisé par de la matière organique qui peut détourner notre interprétation des résultats. Notre laboratoire tente actuellement d'optimiser cette mesure d'O₂ en utilisant les résultats acquis dans cette thèse pour détacher les cellules du biofilm. La mise au point de ce test pourra avoir des applications importantes dans le milieu de la plasturgie.

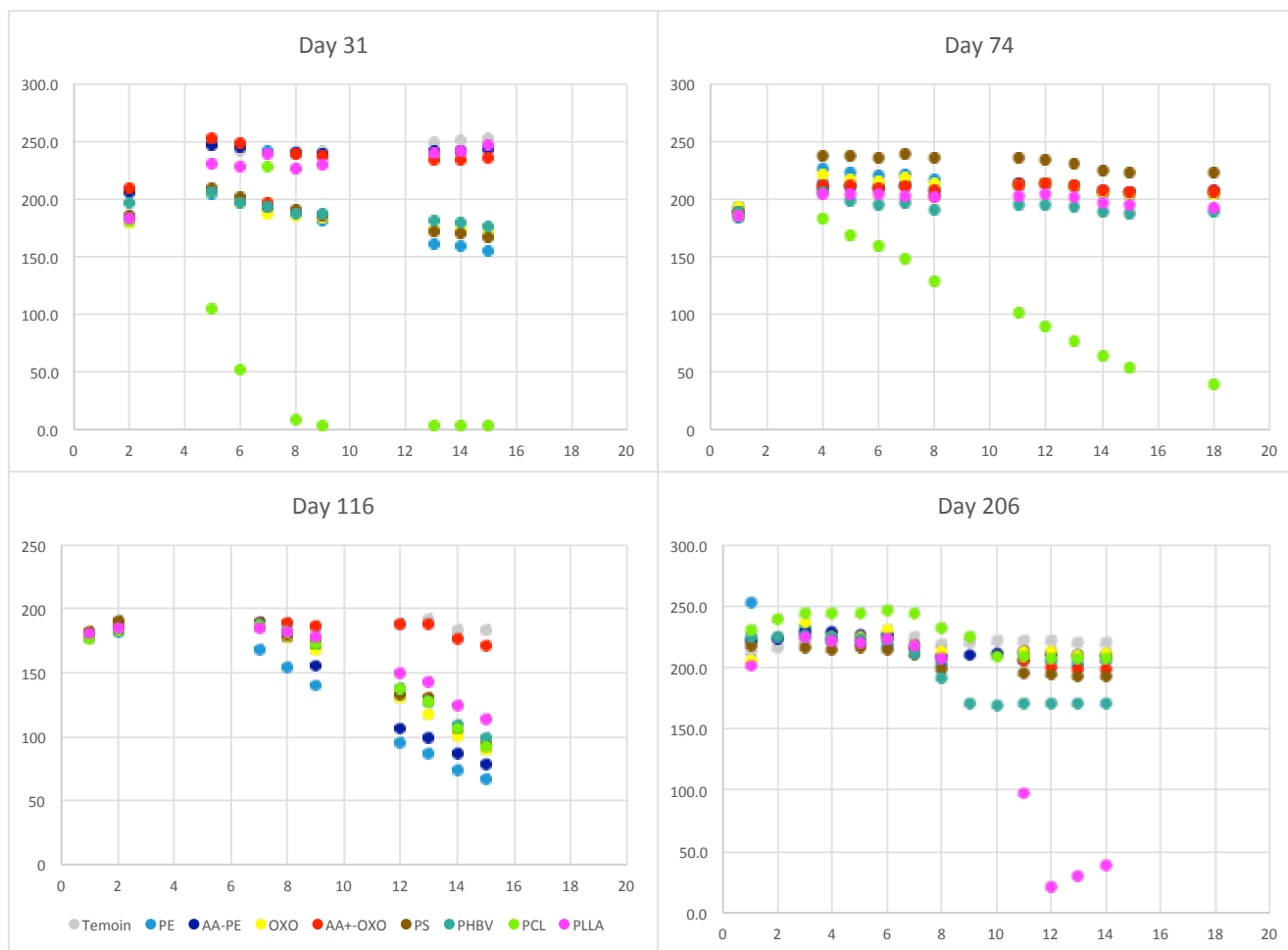


Figure 26 : Consommation d'oxygène par le biofilm des différents polymères en fonction des jours de prélèvement. L'axe des ordonnées représente la concentration en oxygène dans le milieu ($\mu\text{mol O}_2/\text{ml}$), l'axe des abscisses représente le nombre de jours après incubation en milieu minimum.

1.4 Description des étapes de formation du biofilm sur les plastiques en mer

Les étapes classiques de formation d'un biofilm sur substrat dur, i.e. (1) attachement, (2) croissance et (3) maturation du biofilm, ont été retrouvées sur toutes les surfaces plastiques testées dans nos conditions de microcosmes en circulation ouverte sur la mer. Grâce aux analyses couplées des résultats d'abondance, d'activité et de diversité bactériennes (caractérisation de la diversité uniquement pour l'expérience en microcosmes n°1 ; le séquençage est en cours pour l'expérience n°2), nous avons pu définir que l'étape initiale d'attachement des cellules se produit dès les premiers jours d'immersion. Elle est rapidement suivie de la phase de croissance plus ou moins marquée en fonction des polymères, caractérisée par une forte activité hétérotrophe associée à l'augmentation de l'abondance cellulaire. Les plastiques « biodégradables » (PHBV et AA-EXO pré-vieillis) semblaient encore se trouver dans cette phase à la fin de la première expérience (45 jours d'immersion). Le stade de maturation du biofilm, associé dans ces études à une diminution de l'activité bactérienne, a été atteint assez rapidement (à partir de 6 semaines) sur les plastiques conventionnels (PE, EXO, PS). Les biofilms sur les plastiques « biodégradables » AA-EXO, PHBV et PCL semblent passés au stade de maturation 10 semaines plus tard.

Les analyses de diversité obtenues avec l'expérience en microcosmes n°1 ont confirmé une stabilisation des communautés bactériennes sur le PE et l'EXO lors de la phase de maturation du biofilm. Au contraire, les biofilms du PHBV et AA-EXO présentaient des successions de communautés après 45 jours (identifiées principalement par l'apparition de certains OTU hydrocarbonoclastes en forte abondance) qui témoignaient d'une instabilité encore bien présente. Ce constat démontre que sur des surfaces physiquement et chimiquement stables comme le PE et l'EXO non vieilli, le biofilm n'évolue plus ou très peu dans nos conditions. A l'inverse, un substrat « biodégradable » subit des modifications de structure lorsqu'il est immergé (PHBV, AA-EXO), créant une instabilité de la surface qui engendre une évolution plus longue du biofilm à sa surface. Il est donc pertinent de se demander si en milieu naturel un biofilm qui se développe sur un polymère conventionnel atteint vraiment le stade de maturation ? Effectivement, les nombreux paramètres abiotiques volontairement occultés en microcosmes et bien présents en milieu naturel (UV, température, hydrodynamisme, prédation, développement d'organismes photosynthétiques) vont entraîner beaucoup plus d'instabilité de la surface plastique même sur la plus récalcitrante. Pour répondre à ce questionnement, la mise en place d'une expérience en présence de lumière, plus proche des conditions *in situ* et avec les mêmes types de polymères, serait à envisager.

L'analyse du séquençage des échantillons de l'expérience n°2 (en cours) permettra de confirmer ces tendances sur une plus grande variété de polymères.

Les études portant sur les phases de colonisation des surfaces plastiques (expérience microcosme 1 et 2) varient en terme de durée d'expérience, de type de substrat et d'environnement (Tab. 8). La cinétique des étapes de formation du biofilm à la surface des plastiques semble dépendre de nombreux facteurs biotiques et abiotiques (type de polymère, paramètres environnementaux tels que température, luminosité, quantité de nutriments, hydrodynamisme, etc.).

Durée d'exp (semaines)	Type de substrat	Environnement	Type d'expérience	Classification taxonomique	Référence
26	HDPE, LDPE, PP	Pleine eau, Baie du Bengal	<i>In Situ</i>	non	Sudhakar <i>et al.</i> , 2007
52	PC, LDPE, HDPE, PP	Pleine eau, Baie du Bengal	<i>In Situ</i>	non	Artham <i>et al.</i> , 2009
26	PET	Côte Australienne	Milieu de culture	non	Webb <i>et al.</i> , 2009
40	OXO, Mater-Bi, PE	Port de Plymouth, U.K	<i>In Situ</i>	non	O'Brine and Thompson, 2010
3	PE	Port de Plymouth, U.K	<i>In Situ</i>	oui	Lobelle and Cunliffe, 2011
2	LDPE	Sédiment, Humber Estuary, U.K	Microcosmes	oui	Harrison <i>et al.</i> , 2014
6	PET	Mer du Nord	<i>In Situ</i>	oui	Oberbeckmann <i>et al.</i> , 2014 et 2016
5	PE, Mater-Bi	Pleine eau et fond marin, mer Méditerranée	<i>In Situ</i>	oui	Eich <i>et al.</i> , 2015
14	PE, sac biodégradable	Sédiment, ouest mer Baltique	Microcosmes	non	Nauendorf <i>et al.</i> , 2016
44	PE	Sédiment, port et large, Mer du Nord	<i>In Situ</i>	oui	De Tender <i>et al.</i> , 2017
6	PE ,PS, OXO, AA-OXO, PHBV, PCL, PLLA	Eau Mer Méditerranée	Microcosmes	oui	Présents travaux de thèse

Tableau 8 : Récapitulatif des différentes études basées sur les étapes de formation du biofilm à la surface de matières plastiques.

1.5 Les changements de surface des polymères en milieu marin

Nos travaux ont souligné l'importance de prendre en considération les changements physico-chimiques du polymère pour une meilleure compréhension de l'évolution biologique du biofilm. En effet, différents travaux ont montré que les caractéristiques du substrat peuvent jouer un rôle prépondérant dans le biofouling (Fletcher and Loeb, 1979; Donlan, 2002). Il paraissait donc indispensable de caractériser les propriétés de surface des polymères étudiés, ainsi que leur évolution avec la durée d'immersion en parallèle de l'étude du biofilm.

D'après les résultats de l'expérience en microcosmes n°1, le PHBV est le polymère le plus instable structurellement. Une rugosité supérieure aux autres polymères et très variable dans le temps a été observée. Les images très sensibles obtenues par la technique d'AFM ont révélé de grandes modifications de structure avec des étapes de recristallisation de la matière. Les caractéristiques physiques du PHBV pourraient donc faciliter l'attachement et le développement des cellules sur cette surface. Par contre, le lien entre l'abondance cellulaire

observée sur l'AA-OXO et sa faible rugosité ainsi que sa plus forte mouillabilité est plus complexe. L'hypothèse de la présence de fissures de la matière dans lesquelles les cellules pourraient se développer serait à approfondir, sachant que ce plastique était très friable lors de sa manipulation. La fenêtre de 1600nm^2 analysée par l'AFM et l'auto-fluorescence en microscopie ne nous a pas permis d'identifier formellement ces cassures. Les plastiques conventionnels (PE, OXO) plus « lisses » ont logiquement été moins facilement colonisés.

Pour définir l'état de dégradation de nos échantillons, un indice carbonyle (IC, indiquant le niveau d'oxydation de la matière) a été mesuré en FTIR. Les morceaux de plastiques récoltés durant l'expédition Tara-Méditerranée ont présenté un IC de 0,31 en moyenne (ratio pic à 1714 / pic à 1471) avec un seul fragment possédant un IC au-delà de 1,77. La majorité des échantillons étant identifiés comme du PE, il nous a été possible de comparer ces indices à ceux déterminés sur les plastiques PE de l'expérience en microcosmes n°1. Les morceaux de PE incubés en microcosme sont passés d'un IC à 0.10 après 7 jours à un IC de 0.58 au 45^{ème} jour. Les plastiques de Tara qui se trouvent certainement en mer depuis plus de 45 jours paraissent avoir un niveau d'oxydation comparable au PE des microcosmes. Seuls 7.7% des échantillons Tara possèdent un IC supérieur ou égal à 0.58.

Ces résultats nous amènent aux interprétations suivantes : soit, après un temps relativement court (quelques semaines) l'état d'oxydation se stabilise et la surface n'évolue plus ; soit, les tendances sont le résultat d'un processus plus dynamique où les molécules oxydées qui font augmenter la valeur d'IC des polymères sont le résultat d'une utilisation par les micro-organismes directement sur le polymère et/ou d'un détachement d'oligomères ou de monomères oxydés qui conduiraient à une diminution de la valeur d'IC du polymère. L'analyse de l'état d'oxydation des polymères « biodégradables » semble aller dans le sens de la deuxième hypothèse. Effectivement, les valeurs d'IC, logiquement plus élevées de l'AA-OXO en début d'expérience (J7, IC AA-OXO = 2.1), diminuent après 22 jours d'immersion pour retrouver des valeurs similaires aux polymères conventionnels. Les oligomères aux radicaux oxydés semblent donc avoir été détachés (de manière biotique ou abiotique), ce qui a fait baisser la valeur d'IC. Les processus de dégradation continuant d'agir, la surface s'oxyde de nouveau, ce qui expliquerait la ré-augmentation de l'IC observée au 45^{ème} jour. Dans le cas du PHBV, la valeur manquante du prélèvement au 22^{ème} jour nous permet seulement de constater un état d'oxydation très avancé et une diminution de l'IC de 10.9 (J7) à 5.9 (J45). Cela dit l'hypothèse de la « consommation » des radicaux oxydés à la surface du polymère se confirme avec le PHBV.

Cette théorie est soutenue par l'étude récente de Eyheraguibel *et al.* (2017) qui a mesuré la quantité d'oligomères relargués en milieu aqueux par un film d'AA-OXO et leur biodégradabilité par la souche *R. rhodochrous*. Les résultats démontrent une disparition plus marquée des grosses molécules oxydées par rapport aux plus petites molécules et une assimilation de 95% des oligomères solubles par la souche bactérienne après 240 jours d'incubation.

Les surfaces des échantillons plastiques récoltés durant l'expédition Tara-Méditerranée se trouveraient donc à différents stades de dégradation, ce qui expliquerait les valeurs d'IC relativement basse par rapport au temps passé en milieu naturel marin.

2 Perspectives

Les perspectives sont organisées en trois parties qui proposent d'utiliser les résultats de la thèse pour des travaux à venir.

2.1 Caractériser une biodégradation bactérienne des plastiques en mer

Aujourd'hui, un défi majeur réside dans la démonstration directe d'une biodégradation de matières plastiques par les bactéries en milieu naturel. Cette première partie présente notamment un article publié sous forme de chapitre de livre : Dussud C, Ghiglione JF (2014). « Marine litter in the Mediterranean and Black Seas », 180 p., CIESM Publisher, Monaco). Ce chapitre de synthèse a également été traduit en français dans Dussud C, Ghiglione JF (2014). Biodégradation des plastiques en mer. Société française d'Ecologie, Regards et débats sur la biodiversité N°63.

2.1.1 (Article 4) Dussud C, Ghiglione JF (2014). « Marine litter in the Mediterranean and Black Seas », 180 p., CIESM Publisher, Monaco

Bacterial degradation of synthetic plastics

Claire Dussud^{1,2} and Jean-François Ghiglione^{1,2}

¹ CNRS, UMR 7621, Laboratoire d'Océanographie Microbienne, Observatoire Océanologique, Banyuls/mer, France

² Sorbonne Universités, UPMC Univ. Paris 06, UMR 7621, Laboratoire d'Océanographie Microbienne, Observatoire Océanologique, Banyuls/mer, France

ABSTRACT

Synthetic plastics are emerging environmental contaminants that have been found to accumulate within marine waters worldwide. In marine environments, microorganisms function as pioneering surface colonizers and drive critical ecosystem processes including primary production, biogeochemical cycling and the biodegradation of anthropogenic pollutants. This paper reviews the current knowledge on the biodegradation of synthetic plastics by microorganisms. The microbial biodegradation of plastic materials is a complex phenomenon that includes several steps that are described here.

INTRODUCTION

Colonization of plastic marine debris by microorganisms was first reported in the 1970s, where authors mention diatoms and other microbes on the debris (Carpenter *et al.*, 1972; Colton *et al.*, 1974). In marine waters, plastic debris represents a novel ecological habitat for microorganisms since it entered the consumer arena less than 60 years ago, acting as new floating type of particles for microbial colonization and transportation. Plastic has become the most common form of marine debris and it presents a major and growing global pollution problem. In the north western Mediterranean Sea, plastics were found at concentrations of up to 3.6×10^5 pieces/km² (Collignon *et al.*, 2012), which is equivalent to what was found in the “great Pacific garbage patch” (5.0×10^5 items/km² were found in the North Atlantic Subtropical Gyre, Law *et al.*, 2010). Particles may serve as a niche for microorganisms, offering a support for growth especially when it concerns organic aggregates, but also a protected area with limited predation. The presence of particles in aquatic systems is known to stimulate microbial productivity and respiration (Simon, 2002; Ghiglione *et al.*, 2009). However, detailed analyses on sorted plastic particles are scarce. So far, the only study dealing with bacterial communities living in the so-called ‘plastisphere’ showed a high diversity composed of heterotrophs, autotrophs, predators, symbionts and also some opportunistic pathogens (Zettler *et al.*, 2013).

The research on degradability of plastics began in the early 1980s and we dispose of numerous papers providing information on the microbial biodegradation of a variety of plastics such as polyesters, polyhydroxybutyrate (PHB), polycaprolactone (PCL), polylactic acid (PLA), polyurethane PUR, polyvinyl alcohol (PVA), nylon, and polyethylene (PE) (for example Shimao *et al.*, 2001).

The descriptor 10 (D 10) of the EU Marine Strategy Framework Directive (MSFD, 2008/56/EC) concerns marine litter. Started in 2011, a technical subgroup on marine litter (TSML) aims to provide scientific and technical background for the implementation of MSFD requirements with regard to D 10. With the excessive use of plastics and increasing pressure being placed on capacities available for plastic waste disposal, the need for biodegradable plastics and biodegradation of plastic wastes has assumed increasing importance in the last few years. Indeed, it is important to consider the microbial degradation of synthetic plastics in order to understand what is necessary for their biodegradation. This requires understanding of the interactions between materials and microorganisms and the biochemical changes involved.

This paper reviews the current research on the biodegradation of synthetic plastics by microorganisms. The microbial biodegradation of plastic materials includes several steps that are described here. Biodegradation is not disconnected from abiotic degradation, since several studies about biodegradation of some polymers show that the abiotic degradation (mechanical, light, thermal or chemical degradation) precedes microbial assimilation (Kister *et al.*, 2000; Proiakakis *et al.*, 2006).

DIFFERENT STEPS OF PLASTIC DEGRADATION BY MICROORGANISMS

Several steps occur in the plastic biodegradation process (Figure 1) and could be identified by specific terminology (Lucas *et al.*, 2008):

-**Bio-deterioration** defines the action of microbial communities and other decomposer organisms responsible for the physical and chemical deterioration that result in a superficial degradation that modifies the mechanical, physical and chemical properties of the plastic.

-**Bio-fragmentation** refers to the catalytic actions that cleave polymeric plastics into oligomers, dimers or monomers by ecto-enzymes or free-radicals secreted by microorganisms.

-**Assimilation** characterizes the integration of molecules transported in the cytoplasm in the microbial metabolism.

-**Mineralisation** refers to the complete degradation of molecules, resulting in the excretion of completely oxidized metabolites (CO_2 , N_2 , CH_4 , H_2O).

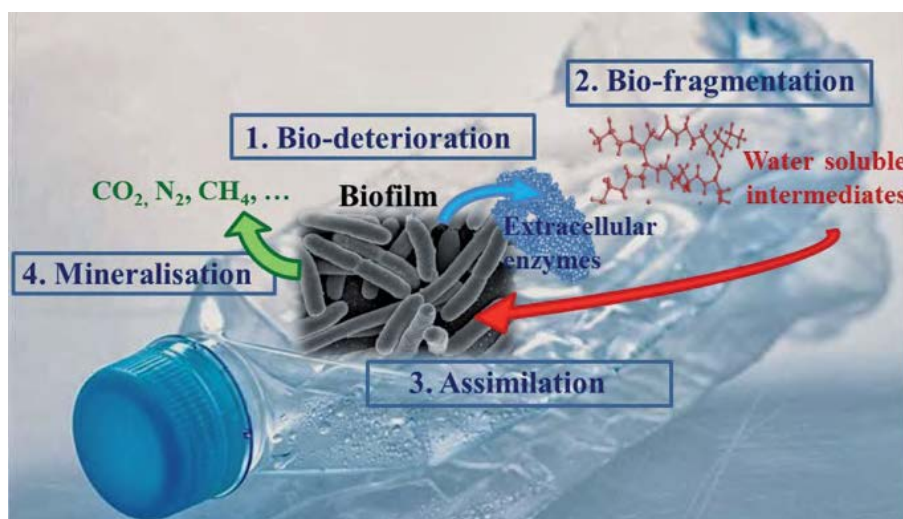


Figure 1. The different steps of plastic biodegradation by microorganisms.

We describe below the different degrees of the biodegradation process (bio-deterioration, bio-fragmentation, assimilation and mineralisation). The technical estimations related to each level of biodegradation are given in Table 1 and Table 2.

Table 1. Bio-degradability tests related to different steps of plastic degradation (left) and analytical techniques for bio-degradability estimation (right) (from Lucas *et al.*, 2008).

Tests	Norms	Characteristics		Estimating			
		Difficulty	Reality	AB ^a	BD ^b	BF ^c	A ^d
Out-door exposure		+	++++	X	X		
UV exposure	ISO 4582	+	++	X			
Suntest	ISO 4892 series	+	++	X			
Accelerated weathering chamber		++	+++	X			
Differential scanning calorimetry		++	+	X			
Thermogravimetric analysis		++	+	X			
Pyrolysis		++	+	X			
Microorganisms surface colonisation	ISO 846 ISO 11266 NF X41-513 NF X41-514 ASTM G22-76 ASTM G21-70 ASTM G21-90	+++	+++		X	X	
Weight loss	ISO 14852 ISO 14855 NF EN ISO 13432	+	+	X	X	X	
Significant enzymes in batch		++	++		X	X	
Clear zone test		+++	+++		X	X	
Respirometry	OECD series, ISO 14852, ISO 14855 ASTM D 5209	++	++				X

Analytical techniques	Norms	Characteristics		Estimating			
		Cost	Difficulty	AB	BD	BF	A
<i>Morphological</i>							
Yellowness	ASTM D 1925	+	+	X			
Photonic microscopy		++	++	X	X		
Electronic microscopy		++++	++++	X	X		
Polarization microscopy		+++	++	X	X		
<i>Rheological</i>							
Tensile	ISO 527-3	++	+	X	X	X	
X-ray diffraction		++++	+++	X	X	X	
Differential scanning calorimetry		++++	++	X	X	X	
Thermogravimetric analysis		++++	++	X	X	X	
Gravimetric		+	+	X	X	X	
<i>Spectroscopic</i>							
Fluorescence		++	++	X	X	X	
UV-visible		+	+	X	X	X	
FTIR		++	++	X	X	X	
RMN		++++	++	X	X	X	
Mass spectrometry		++++	+++	X	X	X	
<i>Chromatographic</i>							
Gel permeation chromatography		+++	++	X	X	X	
High performance Liquid chromatography		+++	++	X	X	X	
Gas phase chromatography		+++	++	X	X	X	

^a Abiotic degradation.
^b Biodeterioration.
^c Biofragmentation.
^d Assimilation.

Bio-deterioration

Deterioration is a superficial degradation that modifies mechanical, physical and chemical properties of the plastic. In most cases, abiotic parameters contribute to weaken the polymeric structure (Helbling *et al.*, 2006; Ipekoglu *et al.*, 2007). Sometimes, these abiotic parameters are useful either as a synergistic factor, or to initiate the biodegradation process (Jakubowicz *et al.*, 2006).

For more details on the role of pollutants attached to the plastic in the development of microbial biofilm, see Fotopoulou *et al.*, this volume.

The bio-deterioration seems to be triggered by the formation of a microbial **biofilm** growing on the surface and inside the plastic. The development of the biofilm is dependent on the composition and the structure of the plastic, but also on the environmental conditions (Lugauskas *et al.*, 2003). Since plastic polymers such as PE and PS are hydrophobic, forming a stable biofilm requires that the bacterial surface will also be hydrophobic. For example, the biofilm of *Rhodococcus ruber* C208 formed on polyethylene showed high viability and even after 60 days of incubation adhered to the polyethylene without any supplementation of external carbon (Figure 2).

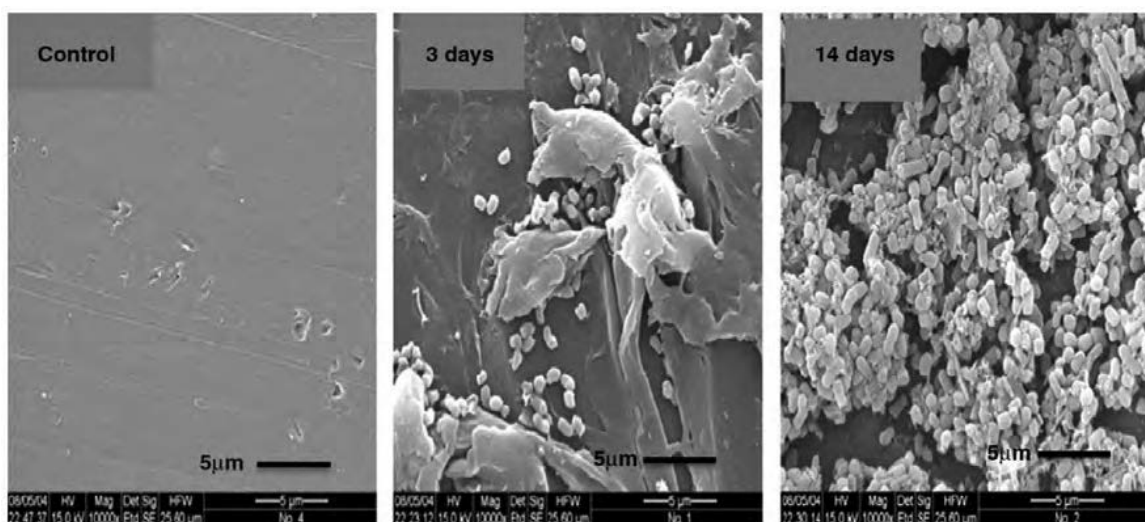


Figure 2. Scanning electron microscopy of biofilm formed by *Rhodococcus ruber* C208 on the surface of UV photo-oxidised polyethylene. Initiation of biodegradation was detected after 3 days. UV irradiated but not inoculated served as control (from Sivan, 2011).

The microbial biofilm provokes serious physical and chemical deterioration:

-physical deterioration: the formation of the microbial biofilm is associated to the secretion of extracellular polymeric substances (EPS) that reinforce the cohesion of the biofilm and the adhesion to the plastic surface. The EPS enters the pores, microorganisms can then grow inside, thus increasing the pore size and provoking cracks that weaken the physical properties of the plastic (Bonhomme *et al.*, 2003).

-chemical deterioration: the microbial communities that develop on plastic may be highly diverse (Zettler *et al.*, 2013) and the development of a biofilm may **release acid compounds** such as nitrous acid (e.g. *Nitrosomonas* spp.), nitric acid (e.g. *Nitrobacter* spp.) or sulphuric acid (e.g. *Thiobacillus* spp.) by chemolithotrophic bacteria. Organic acids such as oxalic, citric, fumaric, gluconic, glutaric, glyoxalic, oxalic and oxaloacetic acids may also be released by chemoorganotrophic communities. The pH inside the pores is then modified, resulting in a progressive degradation that changes the microstructure of the plastic matrix.

Bio-fragmentation

The fragmentation of plastic polymers into oligo- and monomers can be of various origins, i.e. mechanical, UV radiation, thermal, chemical and/or biological. Here we focus on the biological aspect; other reviews provide details about the abiotic fragmentation (see for example Singh and Sharma, 2008).

Plastic polymers are molecules with high molecular weight that cannot cross the cell wall. Microorganisms secrete extracellular enzymes (**exoenzymes**) that can catalyze reactions principally at the boundaries of the plastic polymer. They can perform many chemical reactions, but they generally need imbalance of electric charge to perform lysis. The main limit of bio-fragmentation is the stability of the plastic polymers, which are constituted by a long chain of carbons and hydrogens that contains very balanced charges. To destabilize the local electric charge, bacteria that can break down plastics usually contain enzymes called **oxygenases**, which can add oxygen to a long carbon chain. 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. Other transformations are then catalysed by lipases and esterases after the formation of carboxylic groups, or by endopeptidases for amide groups (Lugauskas *et al.*, 2003). Some of the **well-known microbes** which have the capacity to degrade plastic polymers into their respective simple monomeric are shown in Table 2 (from Ghosh *et al.*, 2013). The 15 bacterial genera listed have the capacity to degrade various types of plastics. Among them, *Pseudomonas*

is dominant. It can degrade polythene, PVC, PHB, poly(3-hydroxybutyrate-co-3-mercaptopropionate), and poly(3-droxypropionate). *Bacillus brevis* can degrade only polycaprolactone while *Streptomyces* can degrade PHB, poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate), and starch or polyester. *Ochrobactrum* TD is also able to degrade PVC. The majority of the strains that are able to degrade PHB belong to different taxa such as Gram-positive and Gram-negative bacteria, *Streptomyces*, and fungi (Mergaert and Swings, 1996). It has been reported that 39 bacterial strains of the classes Firmicutes and Proteobacteria can degrade PHB, PCL, and PBS, but not PLA (Suyama *et al.*, 1998). Other bacterial species identified as having the properties of degrading plastics are *Bacillus* sp., *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp., *Diplococcus* sp., *Micrococcus* sp., *Pseudomonas* sp., and *Moraxella* sp. (Kathiresan, 2003).

For more details on the biodegradation of most prominent synthetic plastics (PEs, PP, PS and PVC), see Raddadi *et al.*, this volume.

Table 2. List of microbial strains and the types of plastic which they degrade (from Ghosh *et al.*, 2013).

Plastic	Microorganism	Reference
Polyethylene	<i>Brevibacillus borstelensis</i>	Hadad et al. (2005)
	<i>Rhodococcus rubber</i>	Sivan et al. (2006); Gilan et al. (2004)
	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	Zheng et al. (2005)
	<i>Comamonas acidovorans</i> TB-35	Akutsu et al. (1998)
Polyvinyl chloride	<i>Pseudomonas putida</i> AJ	Anthony et al. (2004)
	<i>Ochrobactrum</i> TD	Mogil'nitskii et al. (1987)
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> B – 22	
BTA copolyester	<i>Thermomonospora fusca</i>	Kleeberg et al. (1998)
Some biodegradable/natural plastics and their degrading microorganisms		
Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-mercaptopropionate)	<i>Schlegelella thermodepolymerans</i>	Elbanna et al. (2004)
Poly(3-hydroxybutyrate)	<i>Pseudomonas lemoignei</i>	Jendrosseck et al. (1995)
Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-mercaptopropionate)	<i>Pseudomonas indica</i> K2	Elbanna et al. (2004)
Poly(3-hydroxybutyrate), poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)	<i>Streptomyces</i> sp. SNG9	Mabrouk and Sabry (2001)
Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxypropionate)	<i>Ralstonia pikettii</i> T1	Wang et al. (2002)
	<i>Acidovorax</i> sp. TP4	
Poly (3-hydroxybutyrate), poly(3-hydroxypropionate), poly(4-hydroxybutyrate), polyethylene succinate, polyethylene adipate	<i>Alcaligenes faecalis</i>	Kasuya et al. (1999)
	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	
Poly(3-hydroxybutyrate)	<i>Comamonas acidovorans</i>	
	<i>Alcaligenes faecalis</i>	Kita et al. (1997)
	<i>Schlegelella thermodepolymerans</i>	
	<i>Caenibacterium thermophilum</i>	Romen et al. (2004)
Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)	<i>Clostridium botulinum</i>	Abou-Zeid et al. (2001)
	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	
Polycaprolactone	<i>Clostridium botulinum</i>	Abou-Zeid et al. (2001)
	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	
	<i>Amycolatopsis</i> sp.	
	<i>Bacillus brevis</i>	
Polymer blends and its degrading microorganisms		
Starch/polyester	<i>Streptomyces</i>	Lee et al. (1991)

Assimilation and mineralisation

The formation of monomer does not guaranty their assimilation by microorganisms. They have to use specific carriers to cross the cell wall and/or cytoplasmic membrane. Some monomers may stay in the surrounding of microbial cells without being assimilated. Inside cells, the plastic monomers are oxidized through catabolic pathways to produce energy, cell structure and new biomass. Depending on the microbial abilities to grow in aerobic or anaerobic conditions, there exist three essential catabolic pathways to produce the energy to maintain cellular activity, structure and

reproduction: aerobic respiration, anaerobic respiration and fermentation. The assimilation refers to the integration of atoms inside microbial cells, but the degradation of the monomers may not be complete. The assimilation results in numerous secondary metabolites that can be transported outside the microorganism that does not have the metabolic capability to transform it or that does not need to metabolize or store it. The secondary metabolites excreted may be used by another cell that can perform further degradation, or can stay further in the pool of non-assimilable compounds. The mineralization refers to the complete degradation of primary and secondary metabolites that result in the excretion of completely oxidized metabolites (CO_2 , N_2 , CH_4 , H_2O).

CONCLUDING REMARKS AND PERSPECTIVES

For the last 30 years, scientists have been trying to develop some alternative ways where they can use microbes to degrade these long chain synthetic polymers into their respective monomers. Until now, there is very little evidence that scientists were able to develop some alternative ways to enhance the mode of degradation and make it faster.

Biodegradability tests are necessary to estimate the environmental impact of plastic materials and to find solutions to avoid the disturbing accumulation of polymers. The augmentation of derived biodegradability tests has led to confused interpretations about biodegradation mechanisms. To compensate for this problem, it is necessary to explain the different steps involved in biodegradation (i.e. bio-deterioration, bio-fragmentation, assimilation and mineralization). In addition, each biodegradation stage should be associated with the adapted estimation technique. Better knowledge on the different steps of plastic degradation by microorganisms may also help for improving biodegradation. Several factors may be explored for a better biodegradation of polymer plastics (i) by using surface active agents or inducing the microorganism to produce surfactant to allow better attachment of microorganisms on the polymer surface, (ii) by blending the polymers with biodegradable synthetic polymers such as polylactic acid or polycaprolactum (iii) by the pretreatment of the plastics which includes thermal, UV, high energy radiation and chemical treatment, (iv) by culturing those microorganisms that can efficiently degrade the plastics (bio-addition) and (v) by addition of nutrients that may be limiting in the environment (bio-stimulation).

The biodegradation of synthetic plastics is a complex phenomenon. Nature-like experiments are difficult to realize in laboratory due to the great number of parameters occurring during the biogeochemical recycling. Actually, all these parameters cannot be entirely reproduced and controlled *in vitro*. To date, most of the knowledge on the microbial ability to degrade synthetic plastics is based on few bacteria able to grow on culture media, that represent <0.1% of the total bacteria. Hence, the great natural source of high diversity of microorganisms is not fully exploited. By using -omics technologies (genomic, transcriptomic, proteomic, metabolomics), it is now possible to discover new non-culturable microorganisms involved in plastic colonization and degradation, and explore the new properties of microorganisms that arise from the interplay of genes, proteins, other macromolecules, small molecules, and the environment.

Low cost, efficient technology, eco-friendly treatments capable of reducing and even eliminating plastics, are of great environmental interest. Among biological agents, microbial enzymes are one of the most powerful tools for the biodegradation of plastics. There is a huge demand in exploring these microbes which can grow in different conditions and, under specific stress conditions, may be directed to grow and use the plastic carbon polymers as energy source.

References

- Bonhomme S., Cuer A., Delort A.M., Lemaire J., Sancelme M. and G. Scott. 2003. Environmental biodegradation of polyethylene. *Polymer Degradation and Stability*, 81: 441-452.
- Carpenter E.J. and K.L. Smith. 1972. Plastics on the Sargasso Sea surface. *Science*, 175: 1240-1241.
- Colton J.B., Burns B.R. and F.D. Knapp. 1974. Plastic particles in surface waters of the Northwestern Atlantic. *Science*, 185: 491-497.
- Ghiglione J.F., Conan P. and M. Pujo-Pay (2009) Diversity of total and active free-living vs. particle-attached bacteria in the euphotic zone of the NW Mediterranean Sea. *FEMS Microbiology Letters*, 299: 9-21.
- Ghosh S.K., Pal S. and S. Ray. 2013. Study of microbes having potentiality for biodegradation of plastics. *Environmental Science and Pollution Research* 20:4339-4355.
- Helbling C., Abanilla M., Lee L. and V.M. Karbhari. 2006. Issues of variability and durability under synergistic exposure conditions related to advanced polymer composites in civil infrastructure. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, 37: 1102-1110.
- Ipekoglu B., Böke H. and O. Cizer. 2007. Assessment of material use in relation to climate in historical buildings. *Building and Environment*, 42: 970-978.
- Kathiresan K. 2003. Diversity and effectiveness of tropical mangrove soil microflora on the degradation of polythene carry bags. *Revista de Biologia Tropical*, 51:629-634.
- Kister G., Cassanas G., Bergounhon M., Hoarau D. and M.Vert. 2000. Structural characterization and hydrolytic degradation of solid copolymers of D, L-lactide-co- ϵ -caprolactone by Raman spectroscopy. *Polymer*, 41: 925-932.
- Law K.L., Morét-Ferguson S., Maximenko N., Proskurowski G., Peacock E.E., Hafner J. and C.M. Reddy. 2010. Plastic accumulation in the North Atlantic subtropical gyre. *Science*, 329: 1185-1188.
- Lucas N., Bieniame C., Belloy C., Queneudec M., Silvestre F. and J.E. Nava-Saucedo. 2008. Polymer biodegradation: mechanisms and estimation techniques. *Chemosphere*, 73: 429-442.
- Lugauskas A., Levinskait L. and D. Peciulyte. 2003. Micromycetes as deterioration agents of polymeric materials. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 52: 233-242.
- Mergaert J. and J. Swings. 1996. Biodiversity of microorganisms that degrade bacterial and synthetic polyesters. *Journal of Industrial Microbiology*, 17:463-469.
- Proiakakis C.S., Mamouzelous N.J., Tarantili P.A. and A.G. Andreopoulos. 2006. Swelling and hydrolytic degradation of poly(D, L-lactic acid) in aqueous solution. *Polymer Degradation and Stability*, 91: 614-619.
- Shimao M. 2001. Biodegradation of plastics. *Current Opinion in Biotechnology*, 12: 242-247.
- Simon M., Grossart H.P., Schweitzer B., and H. Ploug. 2002. Microbial ecology of organic aggregates in aquatic ecosystems. *Aquatic Microbial Ecology*, 28: 175-211.
- Singh B. and N. Sharma. 2008. Mechanistic implications of plastic degradation. *Polymer degradation and stability*, 93: 561-584.
- Sivan A. 2011. New perspectives in plastic biodegradation. *Current Opinion in Biotechnology*, 22: 422-426.
- Suyama T., Tokiwa Y., Oichanpagdee P., Kanagawa T., Kamagata Y. 1998. Phylogenetic affiliation of soil bacteria that degrade aliphatic polyesters available commercially as biodegradable plastics. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 5008-5011.
- Zettler E.R., Mincer T.J. and L.A. Amaral-Zettler. 2013. Life in the “plastisphere”: microbial communities on plastic marine debris. *Environmental Science and Technology*, 47: 7137-7146.

2.1.2 Expériences de transfert de la norme AFNOR AC T 51-808 au milieu marin

En parallèle des études menées sur la description de la colonisation bactérienne de polymères en milieu marin, un transfert de la norme AFNOR AC T 51-808 est en cours d'application pour évaluer la biodégradabilité de polyéthylène additivé en pro-oxydants (OXO) en milieu marin.

La souche *Rhodococcus rhodochrous* ATCC ® 29672TM1 a été décrite comme étant capable de dégrader des PE-OXO vieillis (AA-OXO) en milieu minimum non salé (Norme AFNOR AC T 51-808 (Fontanella *et al.*, 2010)). L'halotolérance de cette souche a été démontrée en la cultivant en milieu minimum marin pendant 60 jours, le transfert de cette norme au milieu marin est donc envisageable.

Des mesures de respiration ont été effectuées et servent de proxy d'une activité biodégradatrice, en parallèle des mesures de concentration en ATP décrites dans la norme AFNOR. Afin de comparer notre méthode par respirométrie à celle par quantification de la concentration en ATP de la norme AFNOR, le choix d'un AA-OXO (Co/Mn) vieilli à un degrés d'oxydation considéré comme suffisant dans la norme (1 X/100) a été utilisé sur 2 types de milieu : un milieu minimum aquatique non salé (identique à celui utilisé dans la norme AFNOR) et un milieu minimum marin. Ces deux conditions représentent les témoins positifs. Le PE et le PE-OXO (uniquement en milieu minimum) ont été choisis comme témoins négatifs.

Les premiers résultats obtenus n'ont pas été concluants puisque les abondances cellulaires se sont révélées plus faibles à la surface des AA-OXO comparées au PE et à l'OXO et les valeurs obtenues pour la respirométrie et les mesures d'ATP sont restées égales à celles des témoins (sans plastiques) en désaccord avec la norme AFNOR. L'explication viendrait de la composition de l'OXO utilisé. Bien que le fournisseur de ce type de plastique ait attesté son impact négligeable sur l'environnement, des études prouvent que la présence de cobalt dans la composition de l'OXO a un effet toxique sur la souche *R. rhodochrous* (pour des concentrations en cobalt supérieures à 150 ppm) (Fontanella *et al.*, 2013). Des tests de toxicité réalisés sur nos échantillons par des collègues d'une équipe de biologie intégrative des organismes marins (BIOM - UMR 7232) sur les mêmes types de polymères ont également montré une toxicité élevée, dès le stade blastula des embryons d'oursins. A ce jour, la compagnie nous a fourni des polymères OXO composés d'additifs différents (Fe/Mn) pour pouvoir tenter de nouveau le transfert de la norme AFNOR en milieu marin.

Des améliorations de protocoles ont également été apportées notamment en combinant au mesure d'ATP celles de l'ADP et en conservant le plastique dans le volume réactionnel. D'autre part, la sélection de nouvelles souches marines naturelles s'étant développées sur milieu minimum avec le polymère OXO comme seule source de carbone et d'énergie permet d'envisager la possibilité de développer un test plus sensible et plus rapide en milieu marin.

2.1 Utilisation de la technique de DNA-Stable Isotope Probing (DNA-SIP)

La relation fonctions/communautés bactériennes représente un enjeu majeur pour les écologistes microbiens. La méthode de DNA-SIP a été développée depuis presque 20 ans et elle est largement utilisée dans l'étude des sols et dans une moindre mesure dans l'étude des communautés bactériennes marines. La communauté scientifique voit dans cette technique, couplée à des outils de métagénomique, la possibilité de révéler des liens diversité/fonction de populations microbiennes non cultivables (Chen and Murrell, 2010).

En 2014, une étude réalisée par notre équipe utilisant la méthode de DNA-SIP a démontré la présence de bactéries dégradant le phénanthrène, un hydrocarbure aromatique polycyclique (HAP), en mer Méditerranée (Sauret *et al.*, 2014). Ces résultats concluants permettent d'envisager une application à la problématique du plastique en milieu marin pour mettre en évidence les communautés capables de biodégrader cette matière. L'utilisation couplée des méthodes de SIP et de pyroséquençage haut débit serait un moyen d'identifier des communautés fonctionnelles « plasticlastes ». Le DNA-SIP consisterait en un marquage isotopique des molécules de carbone constituant le polymère et en un suivi de l'incorporation du ^{13}C à l'intérieur des cellules bactériennes. Après une période d'incubation des communautés bactériennes en présence de substrat marqué, l'ADN des cellules est extrait et les acides nucléiques contenant du ^{13}C sont séparés des autres par différentes étapes d'ultracentrifugations (Fig. 27). Le programme ANR-OXOMAR (2017-2020) coordonné par notre équipe (JF Ghiglione, UMR7621, LOMIC) devrait permettre à la fois de caractériser les espèces plasticlastes en milieu marin, mais aussi de quantifier les taux de biodégradation des polymères par des mesures d'incorporation des molécules marquées (collaboration avec l'Institut de Chimie de Clermont Ferrand, AM Delort). Les travaux de cette thèse seront utilisés pour la mise au point des expérimentations de DNA - SIP en utilisant des PE-OXO vieillis (AA-OXO) marqués au ^{13}C . Le marquage du PHBV au ^{13}C sera également réalisé en

collaboration avec l'université de Bretagne Sud (S. Bruzard) pour identifier les espèces bactériennes marines capables de le dégrader et également envisager des approches métagénomiques pour identifier les gènes impliqués dans sa biodégradation.

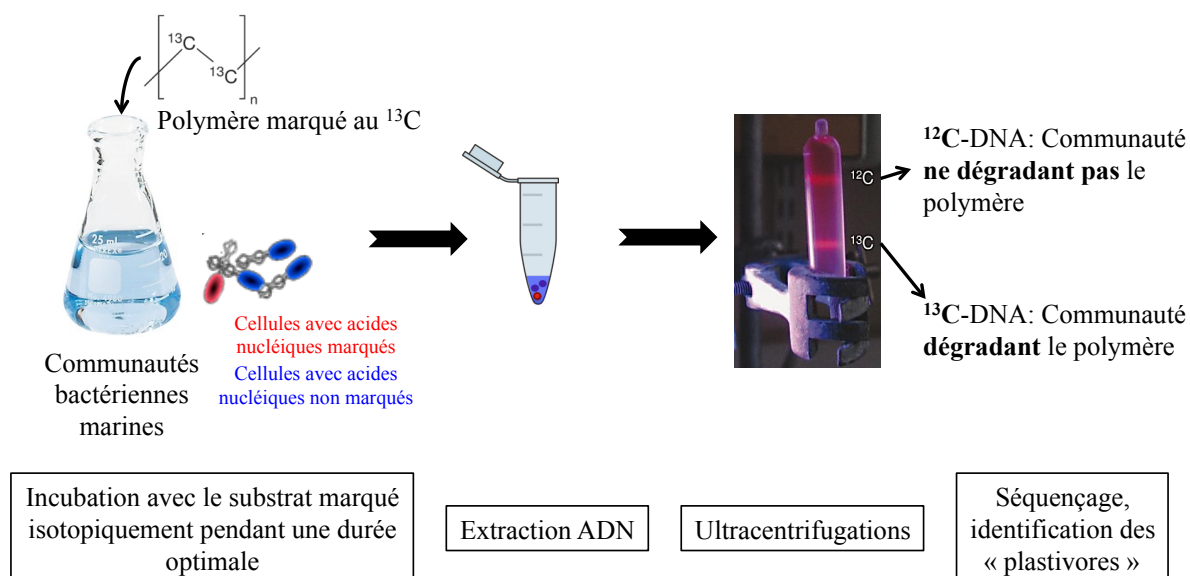


Figure 27 : Schéma simplifié de la technique de DNA-stable isotope probing pour mettre en évidence les espèces bactériennes marines capables de biodégrader un polymère marqué au ^{13}C .

2.2 Prise en compte de la boucle microbienne dans l'étude de la plastisphère en mer

Les études présentées dans ce manuscrit de thèse portent exclusivement sur les communautés bactériennes associées à la colonisation des déchets plastiques en mer. Considérant l'importance de la boucle microbienne en milieu marin (Pomeroy *et al.*, 2007), il serait intéressant de compléter nos études en prenant compte à la fois les facteurs de limitation du compartiment bactérien par les ressources (contrôle bottom-up) et par la lyse virale ou la prédation par les ciliés et flagellés (contrôle top-down). Des expériences réalisées par notre laboratoire permettent d'envisager ces questions, pour mettre en évidence l'importance relative des contrôles top-down et bottom-up en utilisant des analyses statistiques multivariées et des expérimentations permettant de séparer la lyse virale et la prédation par les flagellés (Van Wambeke *et al.*, 2009; Berdjeb *et al.*, 2011; Sauret *et al.*, 2014).

D'autre part, la diversité fongique est rarement prise en compte en milieu marin, alors que nous avons pu observer une grande diversité fongique lors de nos observations en microscopie à épifluorescence. Plusieurs espèces ont démontrées leurs capacités de

biodégradation de certains polymères (Russell *et al.*, 2011; Paço *et al.*, 2017). A ce jour seuls 3 articles traitent des communautés fongiques sur les surfaces plastiques en milieu marin (Oberbeckmann *et al.*, 2016; Debroas *et al.*, 2017; De Tender *et al.*, 2017a).

2.3 L'impact des microplastiques en mer à l'échelle de l'écosystème

Devant l'amplitude de la pollution en microplastiques dans les océans, la question des conséquences générées à plus grande échelle se pose. Les études sur les impacts à l'échelle de l'organisme sont variées et concernent tous les niveaux trophiques (Fig. 28). On recense principalement des diminutions du stock énergétique (augmentation d'ingestion de microplastiques au détriment de proies vivantes) et une augmentation du stress qui causent une baisse de la fécondité et de la croissance (Galloway and Lewis, 2016). Cependant, il existe un réel manque de connaissances sur la façon dont ces impacts à l'échelle de l'organisme peuvent mener à des risques écologiques. Les effets potentiels concerneraient les relations prédateurs/proies, la perturbation du cycle du carbone et la bioturbation (Galloway *et al.*, 2017).

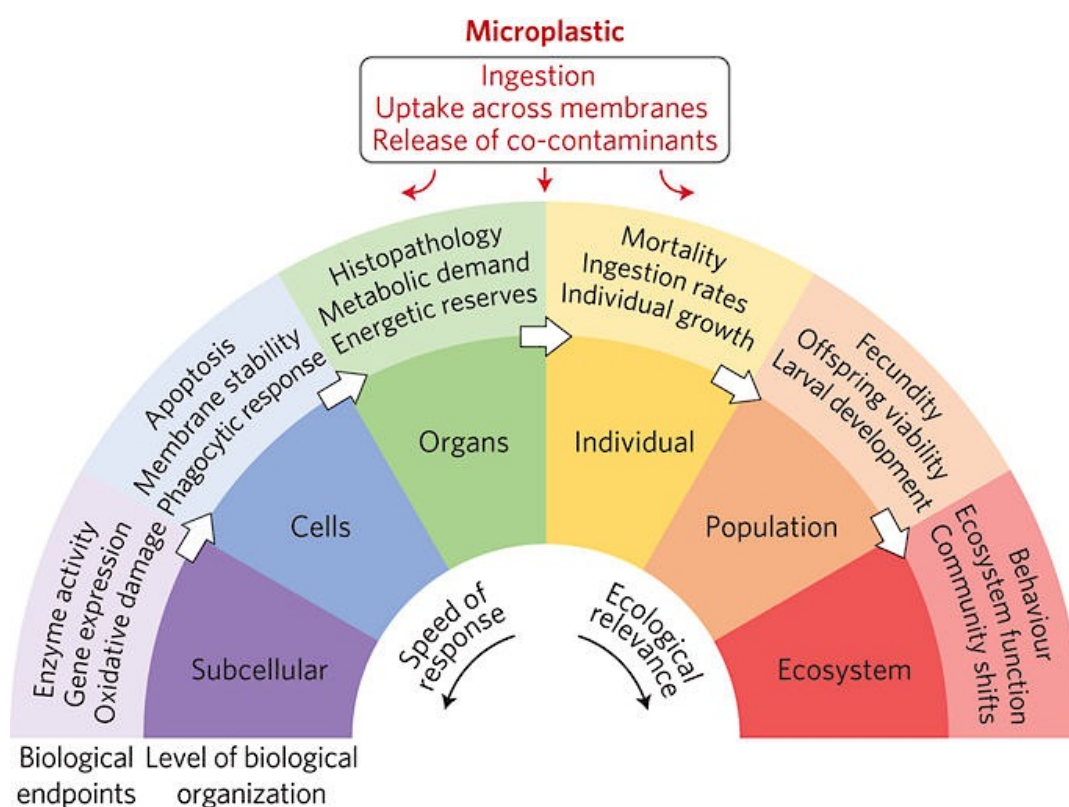


Figure 28 : Schéma simplifié des impacts potentiels causés par l'exposition aux microplastiques à travers les différents niveaux d'organisation biologique (Galloway *et al.*, 2017).

A l'échelle des microorganismes que nous avons étudiés dans cette thèse, l'impact de la plastisphère sur l'écosystème reste à démontrer.

Un premier effet pourrait concerner le pouvoir pathogène des microorganismes transportés par les plastiques. D'après nos résultats, même si certaines espèces potentiellement pathogènes ont été trouvées dans la plastisphère, elles n'étaient pas dans des proportions plus importantes que dans l'eau de mer environnante. Comme nous l'avons souligné précédemment, les analyses par séquençage de l'ARNr 16S ne permettent pas de conclure à la pathogénicité des espèces bactériennes retrouvées, ce qui tendrait à relativiser les informations parfois alarmistes de certains auteurs (Zettler *et al.*, 2013; De Tender *et al.*, 2015b; Kirstein *et al.*, 2016; Debroas *et al.*, 2017). Notre équipe s'intéresse néanmoins à cette question en isolant des souches bactériennes pathogènes du céphalocordé *Branchiostoma lanceolatum*. En mettant ces souches à différentes concentrations avec des communautés naturelles attachées à des microbilles de plastique, nous souhaiterions évaluer à partir de quelle concentration la pathogénicité est conservée lors de l'ingestion de microplastique en conditions les plus proches possibles du milieu naturel.

Un second effet des bactéries de la plastisphère concerne leur impact possible sur les cycles biogéochimiques (Mincer *et al.*, 2016). Les bactéries marines jouent un rôle essentiel dans le cycle du carbone, en reminéralisant jusqu'à 50% de la matière organique provenant de la production primaire (Ducklow *et al.*, 1999). Dans cette thèse, nous avons montré que les bactéries étaient particulièrement abondantes sur les plastiques, avec des activités hétérotrophes relativement plus importantes que dans l'eau de mer environnante. Ces mesures ont été uniquement réalisées dans nos conditions de microcosmes et nous avons décidé de ne pas extrapoler ces données au milieu naturel. Néanmoins, les protocoles mis au point dans cette thèse pour les mesures d'abondance bactérienne par cytométrie en flux et d'activité hétérotrophe par incorporation de leucine radioactive devraient permettre de réaliser des mesures *in situ* et permettre d'envisager ainsi une extrapolation des taux de reminéralisation sur les plastiques à l'échelle d'une mer ou d'un Océan, par rapport à l'eau de mer environnante.

Un autre aspect a été négligé dans cette thèse, qui s'est concentrée sur les plastiques échantillonnés en surface par un filet Manta lors de la campagne Tara-Méditerranée. Sachant que le biofouling entraîne une augmentation de densité et donc une diminution de la flottabilité des plastiques (Lagarde *et al.*, 2016; Rummel *et al.*, 2017), le plastique peut descendre dans la colonne d'eau et entraîner avec lui les communautés de surface ; ce qui pourrait créer un nouveau puits de carbone. Les déchets plastiques atteignant les fonds marins

peuvent également déséquilibrer un nouvel écosystème par l'apport de nouvelles communautés et de matières artificielles. Ces phénomènes de sédimentation se déroulent aussi pour les matières naturelles comme les neiges marines, le bois ou bien les carcasses de baleines mais ils sont plus ponctuels puisqu'ils restent moins longtemps en surface, ils sédimentent plus vite dans la colonne d'eau et leur dégradation s'effectue beaucoup plus rapidement. Dans le cas des plastiques, on ne sait pas encore dans quelle mesure la persistance et l'accumulation des déchets sur les fonds marins influencent l'équilibre des écosystèmes benthiques. Un programme piloté par une de nos unités de recherche de Banyuls-sur-Mer nommé *PLAISCOOL* (coordinateur F. Lartaud, LECOB, UMR 8222) étudie l'impact des déchets plastiques (macro et microplastiques) sur l'état de santé des coraux profonds constructeurs de récifs en Méditerranée (<http://lecob.obs-banyuls.fr/fr/index/projet-plaiscool.html>). Les premiers résultats semblent montrer une augmentation du stress des organismes quel que soit la taille des échantillons de plastique. Cette étude permettra d' étoffer les connaissances sur les impacts à l'échelle de l'organisme et jusqu'à l'échelle de l'écosystème corallien profond de Méditerranée en étudiant le transfert des microorganismes de la plastisphère dans l'holobionte corallien.

Un aspect important de la plastisphère concerne également la dominance des cyanobactéries sur les plastiques de surface, particulièrement soulignée par nos travaux *in situ* lors de la campagne Tara-Méditerranée. Ces microorganismes jouent un rôle essentiel dans la fixation d'azote atmosphérique et dans la production primaire marine. Leur présence en grande concentration sur les plastiques peut par conséquent influencer les cycles biogéochimiques des océans. Notre équipe est actuellement impliquée dans l'analyse d'échantillons de l'expédition Tara-Méditerranée qui présentent de fortes dominances de cyanobactéries filamenteuses, dans le cadre d'un projet piloté par le laboratoire d'Océanographie de Villefranche sur mer. La mise en culture de certaines souches de cyanobactéries identifiées dans le cadre de cette thèse en utilisant différents matériaux plastiques devrait permettre d'évaluer l'importance de ces microorganismes de la plastisphère dans les cycles biogéochimiques en milieu marin.

Références bibliographiques



Œuvre d'art exposée à la conférence internationale Micro16 (Lanzarote)

A

- Alsteens D, Dague E, Rouxhet PG, Baulard AR, Dufrêne YF. (2007). Direct measurement of hydrophobic forces on cell surfaces using AFM. *Langmuir* **23**: 11977–11979.
- Ammala A, Bateman S, Dean K, Petinakis E, Sangwan P, Wong S, *et al.* (2011). An overview of degradable and biodegradable polyolefins. *Prog Polym Sci* **36**: 1015–1049.
- Andrady AL. (2011). Microplastics in the marine environment. *Mar Pollut Bull* **62**: 1596–605.
- Arnold JW, Bailey GW. (2000). Surface finishes on stainless steel reduce bacterial attachment and early biofilm formation: scanning electron and atomic force microscopy study. *Poult Sci* **79**: 1839–1845.
- Artham T, Sudhakar M, Venkatesan R, Madhavan Nair C, Murty KVGK, Doble M. (2009). Biofouling and stability of synthetic polymers in sea water. *Int Biodeterior Biodegrad* **63**: 884–890.
- Austin B, Austin DA, Austin B, Austin DA. (2012). Bacterial fish pathogens. In: *Heidelberg Germany: Springer*. p 652.
- Auta HS, Emenike CU, Fauziah SH. (2017). Distribution and importance of microplastics in the marine environmentA review of the sources, fate, effects, and potential solutions. *Environ Int* **102**: 165–176.
- Avio CG, Gorbi S, Regoli F. (2016). Plastics and microplastics in the oceans: From emerging pollutants to emerged threat. *Mar Environ Res*. e-pub ahead of print, doi: 10.1016/j.marenvres.2016.05.012.

B

- Baini M, Martellini T, Cincinelli A, Campani T, Minutoli R, Panti C, *et al.* (2017). First detection of seven phthalate esters (PAEs) as plastic tracers in superficial neustonic/planktonic samples and cetacean blubber. *Anal Methods* **9**: 1512–1520.
- Baran R, Brodie EL, Mayberry-Lewis J, Hummel E, Da Rocha UN, Chakraborty R, *et al.* (2015). Exometabolite niche partitioning among sympatric soil bacteria. *Nat Commun* **6**: 8289.
- Barnes D, Galgani F, Thompson R, Barlaz M. (2009). Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. *Philosophical Trans R Soc B, Biol Sci* **364**: 1985–1998.
- Berdjeb L, Ghiglione JF, Jacquet S. (2011). Bottom-up versus top-down control of hypo- and epilimnion free-living bacterial community structures in two neighboring freshwater lakes. *Appl Environ Microbiol* **77**: 3591–3599.
- Binnig G, Quate CF. (1986). Atomic Force Microscope. *Phys Rev Lett* **56**: 930–933.
- Bonhomme S, Cuervo A, Delort A-M, Lemaire J, Sancelme M, Scott G. (2003). Environmental biodegradation of polyethylene. *Polym Degrad Stab* **81**: 441–452.
- Bratbak G, Thingstad F, Heldal M. (1994). Viruses and the microbial loop. *Microb Ecol* **28**: 209–221.
- Bravo M, Astudillo JC, Lancellotti D, Luna-Jorquera G, Valdivia N, Thiel M. (2011). Rafting on abiotic substrata: Properties of floating items and their influence on community succession. *Mar Ecol Prog Ser* **439**: 1–17.

- 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**: 453–63.
- Briassoulis D. (2007). Analysis of the mechanical and degradation performances of optimised agricultural biodegradable films. *Polym Degrad Stab* **92**: 1115–1132.
- Bryant JA, Clemente TM, Viviani DA, Fong AA, Thomas KA, Kemp P, *et al.* (2016). Diversity and Activity of Communities Inhabiting Plastic Debris in the North Pacific Gyre. *mSystems* **1**: e00024-16.
- Buchan A, LeClerc GR, Gulvik CA, Gonzalez JM. (2014). Master recyclers: features and functions of bacteria associated with phytoplankton blooms. *Nat Rev Microbiol* **12**: 686–698.

C

- Carpenter E, Anderson S, Harvey G, Miklas H. (1972). Polystyrene spherules in coastal waters. *Science* **178**: 749–750.
- Carson HS, Nerheim MS, Carroll KA, Eriksen M. (2013). The plastic-associated microorganisms of the North Pacific Gyre. *Mar Pollut Bull* **75**: 126–32.
- Van Cauwenberghe L, Devriese L, Galgani F, Robbens J, Janssen CR. (2015). Microplastics in sediments: A review of techniques, occurrence and effects. *Mar Environ Res* **111**: 5–17.
- Characklis WG. (1973). Attached microbial growths-I. Attachment and growth. *Water Res* **7**: 1113–1127.
- Chen Y, Murrell JC. (2010). When metagenomics meets stable-isotope probing: Progress and perspectives. *Trends Microbiol* **18**: 157–163.

- Chiellini E, Corti A, D'Antone S. (2007). Oxo-biodegradable full carbon backbone polymers – biodegradation behaviour of thermally oxidized polyethylene in an aqueous medium. *Polym Degrad Stab* **92**: 1378–1383.
- Chiu JMY, Zhang R, Wang H, Thiagarajan V, Qian PY. (2008). Nutrient effects on intertidal community: From bacteria to invertebrates. *Mar Ecol Prog Ser* **358**: 41–50.
- Chodak I. (2008). Polyhydroxyalkanoates: origin, properties and applications. In: *Monomers, polymers and composites from renewable resources*. pp 451–477.
- Chung HC, Lee OO, Huang Y-L, Mok SY, Kolter R, Qian P-Y. (2010). Bacterial community succession and chemical profiles of subtidal biofilms in relation to larval settlement of the polychaete *Hydroides elegans*. *ISME J* **4**: 817–828.
- Coelho-Souza SA, Miranda MR, Salgado LT, Coutinho R, Guimaraes JRD. (2013). Adaptation of the 3H-Leucine Incorporation Technique to Measure Heterotrophic Activity Associated with Biofilm on the Blades of the Seaweed *Sargassum* spp. *Microb Ecol* **65**: 424–436.
- Cole J, Findlay S, Pace M. (1988). Bacterial production in fresh and saltwater ecosystems: a cross-system overview. *Mar Ecol Prog Ser* **43**: 1–10.
- Cole M, Lindeque P, Fileman E, Halsband C, Goodhead R, Moger J, *et al.* (2013). Microplastic ingestion by zooplankton. *Environ Sci Technol* **47**: 6646–55.
- Collignon A, Hecq J-H, Glagani F, Voisin P, Collard F, Goffart A. (2012). Neustonic microplastic and zooplankton in the North Western Mediterranean Sea. *Mar Pollut Bull* **64**: 861–864.
- Colton J.B., Burns B.R. and F.D. Knapp. 1974. Plastic particles in surface waters of the Northwestern Atlantic. *Science*, 185: 491-497.
- Cooksey KE, Wigglesworth-Cooksey B. (1995). Adhesion of bacteria and diatoms to surfaces in the sea: A review. *Aquat Microb Ecol* **9**: 87–96.

- Corre YM, Bruzaud S, Audic JL, Grohens Y. (2012). Morphology and functional properties of commercial polyhydroxyalkanoates: A comprehensive and comparative study. *Polym Test* **31**: 226–235.
- Corti A, Muniyasamy S, Vitali M, Imam SH, Chiellini E. (2010). Oxidation and biodegradation of polyethylene films containing pro-oxidant additives: Synergistic effects of sunlight exposure, thermal aging and fungal biodegradation. *Polym Degrad Stab* **95**: 1106–1114.
- Costerton JW, Geesey GG, Cheng KJ. (1978). How bacteria stick.pdf. *Sci Am* **238**: 86–95.
- Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. (1995). Microbial Biofilms. *Annu Rev Microbiol* **49**: 711–745.
- Cózar A, Echevarría F, González-Gordillo JI, Irigoien X, Ubeda B, Hernández-León S, *et al.* (2014). Plastic debris in the open ocean. *Proc Natl Acad Sci* **111**: 10239–10244.
- Cózar A, Sanz-Martín M, Martí E, González-Gordillo JI, Ubeda B, Á.gálvez J, *et al.* (2015). Plastic accumulation in the mediterranean sea. *PLoS One* **10**: 1–12.
- Crespo BG, Pommier T, Fernández-Gómez B, 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. *Microbiol Open* **2**: 541–552.

D

- Dang H, 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 Bacterial Primary Colonization and Early Succession on Surfaces in Marine Wa. *Appl Environ Microbiol* **66**: 467–475.

- Davey ME, O'toole GA. (2000). Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**: 847–67.
- Debeljak P, Pinto M, Proietti M, Reisser J, Ferrari FF, Abbas B, et al. (2016). Extracting DNA from ocean microplastics: a method comparison study. *Anal Methods* 0: 1–6.
- Debroas D, Mone A, Ter Halle A. (2017). Plastics in the North Atlantic garbage patch: A boat-microbe for hitchhikers and plastic degraders. *Sci Total Environ* **599–600**: 1222–1232.
- Deroiné M, Le Duigou A, Corre YM, Le Gac PY, Davies P, César G, et al. (2014). Seawater accelerated ageing of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate). *Polym Degrad Stab* **105**: 237–247.
- Deroiné M, César G, Le Duigou A, Davies P, Bruzard S. (2015). Natural Degradation and Biodegradation of Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate) in Liquid and Solid Marine Environments. *J Polym Environ* **23**: 493–505.
- Devi P. (1995). Abundance of bacterial and diatom fouling on various surfaces. *Proceeding-Indian Natl Sci Acad* **61**: 231–231.
- Diéguez AL, Romalde JL. (2017). crossm Draft Genome Sequences of Clinical. 5: 4–5.
- Dobretsov S. (2010). Marine Biofilms. In: *Biofouling*. pp 123–136.
- Donlan RM. (2002). Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis* **8**: 881–890.
- Ducklow H, Carlson C, Smith W. (1999). Bacterial growth in experimental plankton assemblages and seawater cultures from the Phaeocystis antarctica bloom in the Ross Sea, Antarctica. *Aquat Microb Ecol* **19**: 215–227.

Durrieu de Madron X, Guieu C, Sempéré R, Conan P, Cossa D, D’Ortenzio F, *et al.* (2011). Marine ecosystems’ responses to climatic and anthropogenic forcings in the Mediterranean. *Prog Oceanogr* **91**: 97–166.

Dussud C, Ghiglione JF. (2014). Bacterial degradation of synthetic plastics. In: *Marine litter in the Mediterranean and Black Seas, CIESM Workshop Monographs n°46*. CIESM Publisher: Monaco, pp 43–48.

E

Eich A, Mildenerberger T, Laforsch C, 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.

Elain A, Le Fellic M, Corre YM, Le Grand A, Le Tilly V, Audic JL, *et al.* (2015). Rapid and qualitative fluorescence-based method for the assessment of PHA production in marine bacteria during batch culture. *World J Microbiol Biotechnol* **31**: 1555–1563.

Elain A, Le Grand A, Corre YM, Le Fellic M, Hachet N, Le Tilly V, *et al.* (2016). Valorisation of local agro-industrial processing waters as growth media for polyhydroxyalkanoates (PHA) production. e-pub ahead of print, doi: 10.1016/j.indcrop.2015.10.052

Elifantz H, Horn G, Ayon M, Cohen Y, Minz D. (2013). Rhodobacteraceae are the key members of the microbial community of the initial biofilm formed in Eastern Mediterranean coastal seawater. *FEMS Microbiol Ecol* **85**: 348–357.

Eriksen M, Lebreton LCM, Carson HS, Thiel M, Moore CJ, Borerro JC, *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.

Eyheraguibel 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.

F

Farooq A, Malfatti F. (2007). Microbial structuring of marine ecosystems. *Nat Rev Microbiol* **5**: 782–791.

Flemming H-C, Wingender J. (2010). The Biofilm Matrix. *Nat Rev Microbiol* **8**: 623–633.

Fletcher M, Loeb GI. (1979). Influence of substratum characteristics on the attachment of a marine pseudomonad to solid surfaces. *Appl Environ Microbiol* **37**: 67–72.

Fontanella S, Bonhomme S, Brusson J-M, Pitteri S, Samuel G, Pichon G, *et al.* (2013). Comparison of biodegradability of various polypropylene films containing pro-oxidant additives based on Mn, Mn/Fe or Co. *Polym Degrad Stab* **98**: 875–884.

Fontanella S, Bonhomme S, Koutny M, Husarova L, Brusson J-M, Courdavault J-P, *et al.* (2010). Comparison of the biodegradability of various polyethylene films containing pro-oxidant additives. *Polym Degrad Stab* **95**: 1011–1021.

Fossi MC, Panti C, Guerranti C, Coppola D, Giannetti M, Marsili L, *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**: 2374–2379.

Fossi MC, Romeo T, Baini M, Panti C, Marsili L, Campan T, *et al.* (2017). Plastic Debris Occurrence, Convergence Areas and Fin Whales Feeding Ground in the Mediterranean Marine Protected Area Pelagos Sanctuary: A Modeling Approach. *Front Mar Sci* **4**: 167.

Foulon V, Le Roux F, Lambert C, Huvet A, Soudant P, Paul-Pont I. (2016). Colonization of polystyrene microparticles by *Vibrio crassostreae*: light and electron microscopic investigation. *Environ Sci Technol* **50**: 10988–10996.

Frazão B, Martins R, Vasconcelos V. (2010). Are known cyanotoxins involved in the toxicity of picoplanktonic and filamentous north atlantic marine cyanobacteria? *Mar Drugs* **8**: 1908–1919.

G

Gall SC, Thompson RC. (2015). The impact of debris on marine life. *Mar Pollut Bull* **92**: 170–179.

Galloway TS, Cole M, Lewis C. (2017). Interactions of microplastic debris throughout the marine ecosystem. *Nat Ecol Evol* **1**: 116.

Galloway TS, Lewis CN. (2016). Marine microplastics spell big problems for future generations. *Proc Natl Acad Sci* **113**: 2331–2333.

Garlotta D. (2001). A Literature Review of Poly(Lactic Acid). *J Polym Environ* **9**: 63–84.

Gasol JM, Pinhassi J, Alonso-Sáez L, Ducklow H, Herndl GJ, Koblížek M, *et al.* (2008). Towards a better understanding of microbial carbon flux in the sea. *Aquat Microb Ecol* **53**: 21–38

Genin SN, Stewart Aitchison J, Grant Allen D. (2014). Design of algal film photobioreactors: Material surface energy effects on algal film productivity, colonization and lipid content. *Bioresour Technol* **155**: 136–143.

Ghiglione JF, Philippot L, Normand P, Lensi R, Potier P. (1999). Disruption of narG, the gene encoding the catalytic subunit of respiratory nitrate reductase, also affects nitrite respiration in *Pseudomonas fluorescens* YT101. *J Bacteriol* **181**: 5099–5102.

Ghiglione JF, Mevel G, Pujo-Pay M, Mousseau L, Lebaron P, Goutx M. (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**: 217–231.

- Ghiglione J.F., Conan P. and M. Pujo-Pay (2009) Diversity of total and active free-living vs. particle-attached bacteria in the euphotic zone of the NW Mediterranean Sea. *FEMS Microbiology Letters*, 299: 9-21.
- Ghiglione JF, Galand PE, Pommier T, Pedros-Alio C, Maas EW, Bakker K, *et al.* (2012). Pole-to- pole biogeography of surface and deep marine bacterial communities. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**: 17633–17638.
- Ghiglione JF, Martin-Laurent F, Pesce S (2016). Microbial ecotoxicology: an emerging discipline facing contemporary environmental threats. *Environmental Science and Pollution Research* **23**: 3981-3983.
- Ghosh SK, Pal S, Ray S. (2013). Study of microbes having potentiality for biodegradation of plastics. *Environ Sci Pollut Res Int* **20**: 4339–4355.
- del Giorgio PA, Duarte CM. (2002). Respiration in the open ocean. *Nature* **420**: 379–384.
- Giovannoni S. (2000). Evolution, diversity, and molecular ecology of marine prokaryotes. In: *Microbial ecology of the oceans*. pp 47–84.
- Giovannoni SJ, Britschgi TB, Moyer CL, Field KG. (1990). Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature* **345**: 60–63.
- González-Resendiz L, León-Tejera HP, Gold-Morgan M. (2015). Morphological diversity of benthic nostocales (Cyanoprokaryota/cyanobacteria) from the tropical rocky shores of Huatulco region, Oaxaca, Mexico. *Phytotaxa* **219**: 221–232.
- Gorsky G, Ohman MD, Picheral M, Gasparini S, Stemmann L, Romagnan JB, *et al.* (2010). Digital zooplankton image analysis using the ZooScan integrated system. *J Plankton Res* **32**: 285–303.
- Gregory MR. (2009). Environmental implications of plastic debris in marine settings entanglement, ingestion, smothering, hangers-on, hitch-hiking and alien invasions. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **364**: 2013–2025.

Grossart HP. (2010). Ecological consequences of bacterioplankton lifestyles: Changes in concepts are needed. *Environ Microbiol Rep* **2**: 706–714.

Gumel AM, Annuar MSM, Chisti Y. (2013). Recent Advances in the Production, Recovery and Applications of Polyhydroxyalkanoates. *J Polym Environ* **21**: 580–605.

H

Hammer J, Kraak MHS, Parsons JR. (2012). Plastics in the Marine Environment: The Dark Side of a Modern Gift. In: *Reviews of environmental contamination and toxicology*. Springer New York, pp 1–44.

Harrison JP, Schratzberger M, Sapp M, Osborn a. (2014). Rapid bacterial colonization of low-density polyethylene microplastics in coastal sediment microcosms. *BMC Microbiol* **14**: 232.

Helbling C., Abanilla M., Lee L. and V.M. Karbhari. 2006. Issues of variability and durability under synergistic exposure conditions related to advanced polymer composites in civil infrastructure. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, **37**: 1102-1110.

He K, Bauer CE. (2014). Chemosensory signaling systems that control bacterial survival. *Trends Microbiol* **22**: 389–398.

Hirai H, Takada H, Ogata Y, Yamashita R, Mizukawa K, Saha M, *et al.* (2011). Organic micropollutants in marine plastics debris from the open ocean and remote and urban beaches. *Mar Pollut Bull* **62**: 1683–1692.

Hobbie JE, Daley RJ, Jasper S. (1977). Use of nuclepore filter counting bacteria by fluorescence microscopy. *Appl Environ Microbiol* **33**: 1225–1228.

Hori K, Matsumoto S. (2010). Bacterial adhesion: From mechanism to control. *Biochem Eng J* **48**: 424–434.

Hutchinson GE. (1961). The paradox of the plankton. *Am Nat* **95**: 137–145.

I-J-K

Ipekoglu B., Böke H. and O. Cizer. 2007. Assessment of material use in relation to climate in historical buildings. *Building and Environment*, 42: 970-978.

Jones H, Roth I, Saunders W. (1969). Electron microscopic of a slime layer., 1969, 99, 316-25. *J Bacteriol* **99**: 316–25.

Jones PR, Cottrell MT, Kirchman DL, Dexter SC. (2007). Bacterial community structure of biofilms on artificial surfaces in an estuary. *Microb Ecol* **53**: 153–162.

Kathiresan K. 2003. Diversity and effectiveness of tropical mangrove soil microflora on the degradation of polythene carry bags. *Revista de Biologia Tropical*, 51:629-634.

Katsikogianni M, Missirlis YF. (2004). Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions. *Eur Cells Mater* **8**: 37–57.

Kerr A, Cowling MJ. (2003). The effects of surface topography on the accumulation of biofouling. *Philos Mag* **83**: 2779–2795.

Kirchman D, K'nees E, 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.

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.

- Kister G., Cassanas G., Bergounhon M., Hoarau D. and M.Vert. 2000. Structural characterization and hydrolytic degradation of solid copolymers of D, L-lactide-co-ε-caprolactone by Raman spectroscopy. *Polymer*, 41: 925-932.
- Kolber ZS, Plumley FG, Lang AS, Beatty JT, Blankenship RE, VanDover CL, *et al.* (2001). Contribution of aerobic photoheterotrophic bacteria to the carbon cycle in the ocean. *Science* **292**: 2492–5.
- Koutny M, Lemaire J, Delort A-M. (2006). Biodegradation of polyethylene films with prooxidant additives. *Chemosphere* **64**: 1243–52.

L

- Lagarde F, Olivier O, Zanella M, Daniel P, Hiard S, Caruso A. (2016). Microplastic interactions with freshwater microalgae: Hetero-aggregation and changes in plastic density appear strongly dependent on polymer type. *Environ Pollut* **215**: 331–339.
- Lakshmi K, Muthukumar T, Doble M, Vedaprakash L, Kruparathnam, Dineshram R, *et al.* (2012). Influence of surface characteristics on biofouling formed on polymers exposed to coastal sea waters of India. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **91**: 205–211.
- Langille M, Zaneveld J, Caporaso JG, McDonald D, Knights D, Reyes J, *et al.* (2013). Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nat Biotechnol* **31**: 814–21.
- Lasa I, Penadés JR. (2006). Bap: A family of surface proteins involved in biofilm formation. *Res Microbiol* **157**: 99–107.

- Lau SCK, Thiagarajan V, Cheung SCK, Qian PY. (2005). Roles of bacterial community composition in biofilms as a mediator for larval settlement of three marine invertebrates. *Aquat Microb Ecol* **38**: 41–51.
- Law KL. (2017). Plastics in the Marine Environment. *Annu Rev Mar Sci* **9**: 205–229.
- Lebreton LCM, Greer SD, Borrero JC. (2012). Numerical modelling of floating debris in the world's oceans. *Mar Pollut Bull* **64**: 653–661.
- Lee JW, Nam JH, Kim YH, Lee KH, Lee DH. (2008). Bacterial communities in the initial stage of marine biofilm formation on artificial surfaces. *J Microbiol* **46**: 174–182.
- Lemée R, Rochelle-Newall E, Van Wambeke F, Pizay MD, Rinaldi P, Gattuso JP. (2002). Seasonal variation of bacterial production, respiration and growth efficiency in the open NW Mediterranean Sea. *Aquat Microb Ecol* **29**: 227–237.
- Letunic I, Bork P. (2007). Interactive Tree Of Life (iTOL): An online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Bioinformatics* **23**: 127–128.
- Li S. (1999). Hydrolytic degradation characteristics of aliphatic polyesters derived from lactic and glycolic acids Hydrolytic Degradation Characteristics of Aliphatic Polyesters Derived from Lactic and Glycolic Acids. *J Biomed Mater Res* **48**: 342–353.
- Li WC, Tse HF, Fok L. (2016). Plastic waste in the marine environment: A review of sources, occurrence and effects. *Sci Total Environ* **566–567**: 333–349.
- Lo N, Kim KH, Baek K, Jia B, Jeon CO. (2015). *Aestuariicella hydrocarbonica* gen. nov., sp. nov., an aliphatic hydrocarbon-degrading bacterium isolated from a sea tidal flat. *Int J Syst Evol Microbiol* **65**: 1935–1940.
- Lobelle D, Cunliffe M. (2011). Early microbial biofilm formation on marine plastic debris. *Mar Pollut Bull* **62**: 197–200.
- Loeb GI, Neihof RA. (1975). Marine conditioning films. *Adv Chem* **145**: 319–335.

Lorite GS, Rodrigues CM, de Souza AA, Kranz C, Mizaikoff B, Cotta MA. (2011). The role of conditioning film formation and surface chemical changes on *Xylella fastidiosa* adhesion and biofilm evolution. *J Colloid Interface Sci* **359**: 289–295.

Louca S, Parfrey LW, Doebeli M. (2016). Decoupling function and taxonomy in the global ocean microbiome. *Science* **353**: 1272–1277.

Lucas N, Bienaime C, Belloy C, Queneudec M, Silvestre F, Nava-Saucedo JE. (2008). Polymer biodegradation: Mechanisms and estimation techniques - A review. *Chemosphere* **73**: 429–442.

M

Marshall KC, Stout R, Mitchell R. (1971). Mechanism of the Initial Events in the Sorption of Marine Bacteria to Surfaces. *J Gen Microbiol* **68**: 337–348.

Mato Y, Isobe T, Takada H, Kanehiro H, Chiyoko O, Kaminuma T. (2000). Plastic Resin Pellets as a Transport Medium for Toxic Chemicals in the Marine Environment. **35**: 318–324.

McCormick A, Hoellein TJ, Mason SA, Schluep J, Kelly JJ. (2014). Microplastic is an abundant and distinct microbial habitat in an urban river. *Environ Sci Technol* **48**: 11863–11871.

Medilanski E. E, Kaufmann KK., Wick LYL., Wanner O. O, Harms HH. (2002). Influence of the Surface Topography of Stainless Steel on Bacterial Adhesion. *Biofouling* **18**: 193–203.

Melchers RE. (2016). Principles of Marine Corrosion. In: Springer (ed). *Handbook of Ocean Engineering*. pp 111–126.

- Mergaert J. and J. Swings. 1996. Biodiversity of microorganisms that degrade bacterial and synthetic polyesters. *Journal of Industrial Microbiology*, 17:463-469.
- Mével G, Vernet M, Goutx M, Ghiglione JF. (2008). Seasonal to hour variation scales in abundance and production of total and particle-attached bacteria in the open NW Mediterranean Sea (0–1000 m). *Biogeosciences* **5**: 1573–1586.
- Mieszkin S, Martin-Tanchereau P, Callow ME, Callow J a. (2012). Effect of bacterial biofilms formed on fouling-release coatings from natural seawater and *Cobetia marina*, on the adhesion of two marine algae. *Biofouling* **28**: 953–68.
- Mincer TJ, Zettler ER, Amaral-Zettler LA. (2016). Biofilms on Plastic Debris and Their Influence on Marine Nutrient Cycling, Productivity, and Hazardous Chemical Mobility. In: *Hdb Env Chem*. pp 1–13.
- Mohit V, Archambault P, Toupoint N, 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**: 2071–2083.
- Molnar JL, Gamboa RL, Revenga C, Spalding MD. (2008). Assessing the global threat of invasive species to marine biodiversity. *Front Ecol Environ* **6**: 485–492.

N-O

- Nampoothiri MK, Nair NR, John RP. (2010). An overview of the recent developments in polylactide (PLA) research. *Bioresour Technol* **101**: 8493–8501.
- Nauendorf A, Krause S, Bigalke NK, Gorb E V, Gorb SN, Haeckel M, *et al.* (2016). Microbial colonization and degradation of polyethylene and biodegradable plastic bags in temperate fine-grained organic-rich marine sediments. *Mar Pollut Bull* **103**: 168–178.

Oberbeckmann S, Loeder MGJ, Gerdts G, 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* **49**: 478–492.

Oberbeckmann S, Osborn AM, Duhaime MB. (2016). Microbes on a bottle: Substrate, season and geography influence community composition of microbes colonizing marine plastic debris. *PLoS One* **11**: 1–24.

P

Pace N. (1997). A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* (80-) **276**: 734–740.

Paço A, Duarte K, da Costa JP, Santos PSM, Pereira R, Pereira ME, *et al.* (2017). Biodegradation of polyethylene microplastics by the marine fungus *Zalerion maritimum*. *Sci Total Environ* **586**: 10–15.

Palmer J, Flint S, Brooks J. (2007). Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. *J Ind Microbiol Biotechnol* **34**: 577–588.

Parada AE, Needham DM, Fuhrman JA. (2016). Every base matters: Assessing small subunit rRNA primers for marine microbiomes with mock communities, time series and global field samples. *Environ Microbiol* **18**: 1403–1414.

Pasmore M, Todd P, Pfiefer B, Rhodes M, Bowman CN. (2002). Effect of polymer surface properties on the reversibility of attachment of *Pseudomonas aeruginosa* in the early stages of biofilm development. *Biofouling* **18**: 65–71.

Pedrotti ML, Petit S, Elineau A, Bruzaud S, Crebassa JC, Dumontet B, *et al.* (2016). Changes in the floating plastic pollution of the mediterranean sea in relation to the distance to land. *PLoS One* **11**: 1–14.

- Pitt CG, Chasalow FI, Hibionada YM, Klimas DM, Park T, Carolina N. (1981). Aliphatic Polyesters . I . The Degradation of Poly (ϵ - caprolactone) In Vivo. *J Appl Polym Sci* **26**: 3779–3787.
- Pomeroy L, leB. Williams P, Azam F, Hobbie J. (2007). The Microbial Loop. *Oceanography* **20**: 28–33.
- Pompilio A, Piccolomini R, Picciani C, D’Antonio D, Savini V, 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.
- Porter KG., Feig YS. (1980). The use of DAPI for identifying and counting aquatic microfloral. *Limnol Ocean* **25**: 943–948.
- Porter SL, Wadhams GH, Armitage JP. (2011). Signal processing in complex chemotaxis pathways. *Nat Rev Microbiol* **9**: 153–165.
- Proiakakis C.S., Mamouzelous N.J., Tarantili P.A. and A.G. Andreopoulos. 2006. Swelling and hydrolytic degradation of poly(D, L-lactic acid) in aqueous solution. *Polymer Degradation and Stability*, 91: 614-619.
- Pulido-Villena E, Ghiglione J-F, Ortega-Retuerta E, Van Wambeke F, Zohary T. (2012). Heterotrophic bacteria in the pelagic realm of the mediterranean sea. In: *Life in the Mediterranean sea: a look at habitat changes*. pp 227–265.
- Pulido-Villena E, Baudoux AC, Obernosterer I, Landa M, Caparros J, Catala P, *et al.* (2014). Microbial food web dynamics in response to a Saharan dust event: Results from a mesocosm study in the oligotrophic Mediterranean Sea. *Biogeosciences* **11**: 5607–5619.

R

- Reading NC, Sperandio V. (2006). Quorum sensing: The many languages of bacteria. *FEMS Microbiol Lett* **254**: 1–11.
- Reisser J, Shaw J, Hallegraeff G, Proietti M, Barnes DKA, Thums M, *et al.* (2014). Millimeter-sized marine plastics: A new pelagic habitat for microorganisms and invertebrates. *PLoS One* **9**: 1–11.
- Restrepo-Flórez JM, Bassi A, Thompson MR. (2014). Microbial degradation and deterioration of polyethylene - A review. *Int Biodeterior Biodegrad* **88**: 83–90.
- Rieck A, Herlemann DPR, Jürgens K, Grossart HP. (2015). Particle-associated differ from free-living bacteria in surface waters of the baltic sea. *Front Microbiol* **6**: 1297.
- Riedewald F. (2006). Bacterial adhesion to surfaces: the influence of surface roughness. *PDA J Pharm Sci Technol* **60**: 164–171.
- Rios LM, Moore C, Jones PR. (2007). Persistent organic pollutants carried by synthetic polymers in the ocean environment. *Mar Pollut Bull* **54**: 1230–1237.
- Rochman CM, Browne MA, Underwood AJ, Van Franeker JA, Thompson RC, Amaral-Zettler LA. (2016). The ecological impacts of marine debris: Unraveling the demonstrated evidence from what is perceived. *Ecology* **97**: 302–312.
- Rochman CM, Hoh E, Kurobe T, Teh SJ. (2013). Ingested plastic transfers hazardous chemicals to fish and induces hepatic stress. *Sci Rep* **3**: 3263.
- Romaní AM, Artigas J, Ylla I. (2012). Extracellular enzymes in aquatic biofilms: microbial interactions versus water quality effects in the use of organic matter. In: Academic C (ed). *Microbial biofilms: current research and applications*. Norfolk, p 153–174.

- Rummel CD, Jahnke A, Gorokhova E, K?hnel D, Schmitt-Jansen M. (2017). The Impacts of Biofilm Formation on the Fate and Potential Effects of Microplastic in the Aquatic Environment. *Environ Sci Technol Lett* **acs.estlett.7b00164**.
- Russell JR, Huang J, Anand P, Kucera K, Sandoval AG, Dantzler KW, *et al.* (2011). Biodegradation of polyester polyurethane by endophytic fungi. *Appl Environ Microbiol* **77**: 6076–6084.
- Rützler K, Santavy DL. (1983). The Black Band Disease of Atlantic Reef Corals: I. Description of the Cyanophyte Pathogen. *Mar Ecol* **4**: 301–319.
- Ryan PG, Moore CJ, van Franeker JA, Moloney CL. (2009). Monitoring the abundance of plastic debris in the marine environment. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* **364**: 1999–2012.

S

- Salta M, Wharton J a, Stoodley P, Dennington SP, Goodes LR, Werwinski S, *et al.* (2010). Designing biomimetic antifouling surfaces. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci* **368**: 4729–4754.
- Salta M, Wharton JA, Blache Y, Stokes KR, Briand JF. (2013). Marine biofilms on artificial surfaces: Structure and dynamics. *Environ Microbiol* **15**: 2879–2893.
- Sauret C, Séverin T, Vétion G, Guigue C, Goutx M, Pujo-Pay M, *et al.* (2014). ‘Rare biosphere’ bacteria as key phenanthrene degraders in coastal seawaters. *Environ Pollut* **194**: 246–253.
- Scardino AJ, de Nys R. (2011). Mini review: Biomimetic models and bioinspired surfaces for fouling control. *Biofouling* **27**: 73–86.
- Schultz MP, Bendick J a, Holm ER, Hertel WM. (2011). Economic impact of biofouling on a naval surface ship. *Biofouling* **27**: 87–98.

- Selke S, Auras R, Nguyen TA, Castro Aguirre E, Cheruvathur R, Liu Y. (2015). Evaluation of biodegradation-promoting additives for plastics. *Environ Sci Technol* **49**: 3769-3777.
- Severin T, Sauret C, Boutrif M, Duhaut T, Kessouri F, Oriol L, *et al.* (2016). Impact of an intense water column mixing (0-1500 m) on prokaryotic diversity and activities during an open-ocean convection event in the NW Mediterranean Sea. *Environ Microbiol* **18**: 4378–4390.
- Shah AA, Hasan F, Hameed A, Ahmed S. (2008). Biological degradation of plastics: A comprehensive review. *Biotechnol Adv* **26**: 246–265.
- Shimao M. 2001. Biodegradation of plastics. *Current Opinion in Biotechnology*, 12: 242–247.
- Siboni N, Lidor M, Kramarsky-Winter E, Kushmaro A. (2007). Conditioning film and initial biofilm formation on ceramics tiles in the marine environment. *FEMS Microbiol Lett* **274**: 24–29.
- Sieburth JM. (1975). Bicrobial seascapes: a pictorial essay on marine microorganisms and their environment. *Univ Park Press*.
- Simon M., Grossart H.P., Schweitzer B., and H. Ploug. 2002. Microbial ecology of organic aggregates in aquatic ecosystems. *Aquatic Microbial Ecology*, 28: 175-211.
- Singh B, Sharma N. (2008). Mechanistic implications of plastic degradation. *Polym Degrad Stab* **93**: 561–584.
- Sivan A. (2011). New perspectives in plastic biodegradation. *Curr Opin Biotechnol* **22**: 422–426.
- Sivonen K, Halinen K, Sihvonen LM, Koskenniemi K, Sinkko H, Rantasärkkä K, *et al.* (2007). Bacterial diversity and function in the Baltic Sea with an emphasis on cyanobacteria. *Ambio* **36**: 180–185.

- Stal LJ. (1995). Physiological ecology of cyanobacteria in microbial mats and other communities. *New Phytol* **131**: 1–32.
- Stalder AF, Kulik G, Sage D, Barbieri L, Hoffmann P. (2006). A snake-based approach to accurate determination of both contact points and contact angles. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp* **286**: 92–103.
- Staley JT, Konopka A. (1985). Microorganisms in Aquatic and Terrestrial Habitats. *Annu Rev Microbiol* **39**: 321–346.
- Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW. (2002). Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol* **56**: 187–209.
- Sudhakar M, Doble M, Murthy PS, Venkatesan R. (2008). Marine microbe-mediated biodegradation of low- and high-density polyethylenes. *Int Biodeterior Biodegradation* **61**: 203–213.
- Sudhakar M, Trishul A, Doble M, Suresh Kumar K, Syed Jahan S, Inbakandan D, *et al.* (2007). Biofouling and biodegradation of polyolefins in ocean waters. *Polym Degrad Stab* **92**: 1743–1752.
- Sunagawa S, Coelho LP, Chaffron S, Kultima JR, Labadie K, Salazar G, *et al.* (2015). Structure and function of the global ocean microbiome. *Science* **348**: 1261359.
- Sussarellu R, Suquet M, Thomas Y, Lambert C, Fabioux C, Pernet MEJ, *et al.* (2016). Oyster reproduction is affected by exposure to polystyrene microplastics. *Proc Natl Acad Sci* **113**: 2430–2435.
- Suyama T., Tokiwa Y., Oichanpagdee P., Kanagawa T., Kamagata Y. 1998. Phylogenetic affiliation of soil bacteria that degrade aliphatic polyesters available commercially as biodegradable plastics. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 5008-5011

T

- Tang L, Pillai S, Revsbech NP, Schramm A, Bischoff C, Meyer RL. (2011). Biofilm retention on surfaces with variable roughness and hydrophobicity. *Biofouling* **27**: 111–121.
- De Tender CA, Devriese LI, Haegeman A, Maes S, Vangeyte J, Cattijssse A, *et al.* (2017a). The temporal dynamics of bacterial and fungal colonization on plastic debris in the North Sea. *Environ Sci Technol* [acs.est.7b00697](#).
- De Tender C, Devriese L, Haegeman A, Maes S, Ruttink T, Dawyndt P, *et al.* (2015a). Plastic debris : a distinct niche in the marine environment. In: *Conference poster*. pp 1–2.
- De Tender C, Devriese LI, Haegeman A, Maes S, Ruttink T, Dawyndt P. (2015b). Bacterial community profiling of plastic litter in the Belgian part of the North Sea. *Environ Sci Technol* **49**: 9629–9638.
- De Tender C, Schlundt C, Devriese LI, Zettler E, Mincer TJ, Amaral-Zettler L. (2017b). A review of microscopy and comparative molecular-based methods to characterize ‘Plastisphere’ communities. *Anal Methods* **9**: 2132–2143.
- Teuten EL, Saquing JM, Knappe DRU, Barlaz MA, Jonsson S, Björn A, *et al.* (2009). Transport and release of chemicals from plastics to the environment and to wildlife. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **364**: 2027–45.
- Thomaz SM, Wetzel RG. (1995). [3H]Leucine incorporation methodology to estimate epiphytic bacterial biomass production. *Microb Ecol* **29**: 63–70.
- Thompson RC, Olsen Y, Mitchell RP, Davis A, Rowland SJ, John AWG, *et al.* (2004). Lost at sea: where is all the plastic? *Science* **304**: 838.
- Tokiwa Y, Calabia BP. (2004). Degradation of microbial polyesters. *Biotechnol Lett* **26**: 1181–1189.

Tsai Y-P. (2005). Impact of flow velocity on the dynamic behaviour of biofilm bacteria. *Biofouling* **21**: 267–77.

V-W

Verran J, Boyd RD. (2001). The relationship between substratum surface roughness and microbiological and organic soiling: a review. *Biofouling* **17**: 59–71.

Waksman SA. (1934). The Role of Bacteria in the Cycle of Life in the Sea. *Sci Mon* **38**: 35–49.

Walpole SC, Prieto-Merino D, Edwards P, Cleland J, Stevens G, Roberts I. (2012). The weight of nations: an estimation of adult human biomass. *BMC Public Health* **12**: 439.

Van Wambeke F, Tedetti M, Duhamel S, Sempéré R. (2009). Diel variability of heterotrophic bacterial production and underwater UV doses in the eastern South Pacific. *Mar Ecol Prog Ser* **387**: 97–108.

Waters CM, Bassler BL. (2005). QUORUM SENSING: Cell-to-Cell Communication in Bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**: 319–346.

Webb HK, Crawford RJ, Sawabe T, Ivanova EP. (2009). Poly(ethylene terephthalate) polymer surfaces as a substrate for bacterial attachment and biofilm formation. *Microbes Environ* **24**: 39–42.

Whitman WB, Coleman DC, Wiebe WJ, Jun N, Whitman WB, Coleman DC, *et al.* (1998). Prokaryotes : The Unseen Majority. *Proc Natl Acad Sci* **95**: 6578–6583.

Woese CR. (1987). Bacterial evolution. *Microbiol Rev* **51**: 221–71.

Wright SL, Thompson RC, Galloway TS. (2013). The physical impacts of microplastics on marine organisms: A review. *Environ Pollut* **178**: 483–492.

Y-Z

- Yakimov MM, Timmis KN, Golyshin PN. (2007). Obligate oil-degrading marine bacteria. *Curr Opin Biotechnol* **18**: 257–266.
- 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**: 1–5.
- Zettler ER, Mincer TJ, Amaral-zettler LA. (2013). Life in the ‘ Plasticsphere ’ : Microbial Communities on Plastic Marine Debris. *Environ Sci Technol* **47**: 7137–7146.
- Zettler LA, Zettler ER, Slikas B, Boyd GD, Melvin DW, Morrall CE, *et al.* (2015). The biogeography of the Plasticsphere: Implications for policy. *Front Ecol Environ* **13**: 541–546.
- Zhou J, Xia B, Treves DS, Wu L, Marsh TL, Neill RVO, *et al.* (2002). Spatial and Resource Factors Influencing High Microbial Diversity in Soil Spatial and Resource Factors Influencing High Microbial Diversity in Soil. *Appl Environ Microbiol* **68**: 326–334.
- Zimmermann R. (1974). A new method for fluorescence staining of bacterial populations on membrane filters. *Kieler Meeresforsch* **30**: 24–27.
- Zobell CE. (1943). The Effect of Solid Surfaces upon Bacterial Activity. *J Bacteriol* **46**: 39–56.

Annexes



Voilier Tara Expeditions

Annexes

ANNEXE 1 : Article R63, Société Française d'Ecologie

Lien : <https://www.sfecologie.org/regard/r63-plastiques-en-mer-dussud-et-ghiglione/>

R63 La dégradation des plastiques en mer, par C. Dussud et J-F. Ghiglione

par [Anne T](#) | Déc 26, 2014 | [10 commentaires](#)

La Société Française d'Ecologie ([SFE](#)) vous propose en cette fin d'année 2014 ce regard de Claire Dussud et Jean-François Ghiglione, écotoxicologues, sur la dispersion et dégradation des plastiques en mer.

MERCI DE PARTICIPER à ces [regards et débats sur la biodiversité](#) en postant vos [commentaires et questions](#) sur les forums de discussion qui suivent les articles; les auteurs vous répondront.

La dégradation des plastiques en mer

par Claire Dussud^{1,2} et Jean-François Ghiglione^{1,2}

1 : CNRS, UMR 7621, Laboratoire d'Océanographie Microbienne, Observatoire Océanologique, F-66650 Banyuls/mer, France

2 : Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMR 7621, Laboratoire d'Océanographie Microbienne, Observatoire Océanologique, F-66650 Banyuls/mer, France

Mots clés : écotoxicologie microbienne, écosystèmes marins, déchets, réseaux trophiques, bioaccumulation, bioremédiation, relation Homme-Nature

Le devenir des déchets en mer est une préoccupation environnementale de premier ordre qui fait aujourd'hui partie de la définition du « bon état écologique » des écosystèmes marins, selon la Directive Cadre Sur le Milieu Marin (DCSMM, descripteur n°10). En milieu marin, ces déchets sont composés de 40 à 80% de plastiques (Barnes et al., 2009). Des travaux récents estiment à 5 250 milliards le nombre de particules plastiques qui flottent à la surface des mers et océans, équivalent à 268 940 tonnes de déchets (Eriksen et al., 2014).

Une pollution mondiale

La pollution par les déchets plastiques touche tous les océans, y compris les zones polaires. Il existe néanmoins des zones d'accumulation créées par des courants marins appelés gyres océaniques (Lebreton et al., 2012). La plus connue est la zone d'accumulation dans le gyre du

Pacifique Nord (« 7ème continent de plastique » ou « grande zone d'ordure du Pacifique »), mais cet exemple n'est pas un cas isolé. Les modèles de circulations océaniques suggèrent des zones d'accumulations dans quatre autres gyres (Pacifique Sud, Atlantique Nord, Atlantique Sud et Océan Indien). La Méditerranée est également très polluée par les plastiques du fait de son caractère de mer semi-fermée, avec un taux de renouvellement des eaux de 90 ans alors que la persistance des plastiques est supérieure à 100 ans (Lebreton et al., 2012).

La présence de ces matériaux synthétiques dans le milieu naturel est relativement récente, puisque l'essor de l'industrie du plastique date des années 1970. Les débris plastiques retrouvés à la surface de l'eau sont dominés par les particules de taille inférieure à 5mm, communément appelées des microplastiques (Hidalgo-Ruz et al., 2012). Les microplastiques sont issus de la fragmentation des plastiques et sont également dispersés dans tous les océans (Ivar do Sul et al., 2014). Ces fragments sont très stables et peuvent parfois persister jusqu'à 1000 ans dans le milieu marin (Cózar et al., 2014).

Toxicité des plastiques et perturbation des chaînes alimentaires

Dans l'environnement, la pollution par les plastiques peut avoir plusieurs conséquences. Mise à part la pollution visuelle qu'ils engendrent, les plastiques touchent les organismes marins de manière directe ou indirecte à différents échelons de la chaîne alimentaire (Wright et al., 2013). Au plan chimique, les matières plastiques sont constituées d'enchaînements de séquences identiques (ou polymères) de molécules carbonées, principalement d'hydrocarbures*, molécules organiques toxiques pour de nombreux organismes, susceptibles de s'accumuler le long des chaînes alimentaires.

Dans les zones d'accumulation, la concentration de microplastiques observée (de taille de 0,5 à 5mm) est comparable à celle du zooplancton (entre 0.005 mm et plus de 50 mm). La Méditerranée, par exemple, présente des ratios microplastiques/zooplancton entre 1/10 à 1/2 (Collignon et al., 2012). Le risque pour les prédateurs du zooplancton (i.e. les poissons) d'ingérer du microplastique est donc considérable. Le temps de résidence du plastique dans de petits poissons pélagiques est évalué entre 1 jour et 1 an (Davidson & Asch, 2011). Les fragments de microplastiques ingérés sont retrouvés dans les déjections des animaux, ils peuvent couler avec les cadavres ou encore être transférés aux prédateurs et ainsi atteindre les échelons supérieurs de la chaîne alimentaire (Cózar et al., 2014).

Les plastiques sont également des vecteurs de dispersion de composés toxiques qui peuvent aussi s'accumuler dans les chaînes alimentaires. Ces composés peuvent être directement présent dans la composition des plastiques, ou bien s'adsorber à leur surface. Dans le premier cas, il s'agit d'additifs (phtalates, biphényles) incorporés à certains plastiques pour augmenter leur résistance. Différents travaux ont montré que ces composés peuvent être toxiques pour certains animaux et l'homme (Lithner et al. 2011). D'autres composés toxiques (hydrocarbures, pesticides, DDT, PCB) peuvent s'adsorber sur les plastiques, ce qui est susceptible d'augmenter leur dispersion, leur persistance en mer et leur accumulation dans les échelons trophiques les plus élevés (Teuten et al., 2009).

Les effets désastreux de l'ingestion des débris de plastiques confondus avec des proies sont également bien documentés, avec des conséquences sur les systèmes digestifs des animaux tels que les poissons, les oiseaux, les tortues de mer et les mammifères marins, pouvant entraîner leur mort (Andrady 2011). Ces débris sont également considérés comme vecteurs de dispersion d'algues toxiques (Masó et al. 2007) et de microorganismes pathogènes (Zettler et al., 2011).

Dégradation des plastiques en mer

Plusieurs études se sont attachées à décrire les étapes physiques, chimiques et biologiques intervenant dans la décomposition du plastique (Andrady, 2011). La dégradation biologique est en majeure partie réalisée par les microorganismes, essentiellement des bactéries (Shah et al., 2008). Organismes les plus abondants dans les océans (~100 millions de bactéries et >500 espèces par litre d'eau de mer), ces microorganismes invisibles à l'œil nu ont des capacités métaboliques extrêmement variées. Dans leur milieu naturel, les bactéries jouent un rôle d'éboueur des océans (organismes saprophytes) puisqu'elles reminéralisent la moitié du carbone organique qui provient des déchets de la chaîne alimentaire. De nombreuses bactéries sont également spécialisées dans la dégradation des hydrocarbures (bactéries hydrocarbonoclastes), composants majeurs des plastiques. La capacité de dégradation de différents types de plastiques par les bactéries a largement été abordée dans la littérature, montrant une vaste diversité de bactéries capables de les dégrader (voir par exemple la revue de Shah et al. 2008). On aperçoit ici l'enjeu environnemental des recherches actuelles visant à mieux caractériser la biodégradation des plastiques par les communautés bactériennes.

Les étapes de la dégradation en mer

Un plastique qui arrive en mer va d'abord subir une dégradation abiotique (non biologique). Des dégradations physiques (vagues, température et UV) et chimiques (oxydation ou hydrolyse) vont contribuer à fragiliser les structures des polymères (Ipekoglu et al., 2007) et réduire le plastique en morceaux de plus petite taille. La dégradation biologique intervient ensuite. Elle est composée de quatre étapes successives (Figure 1).

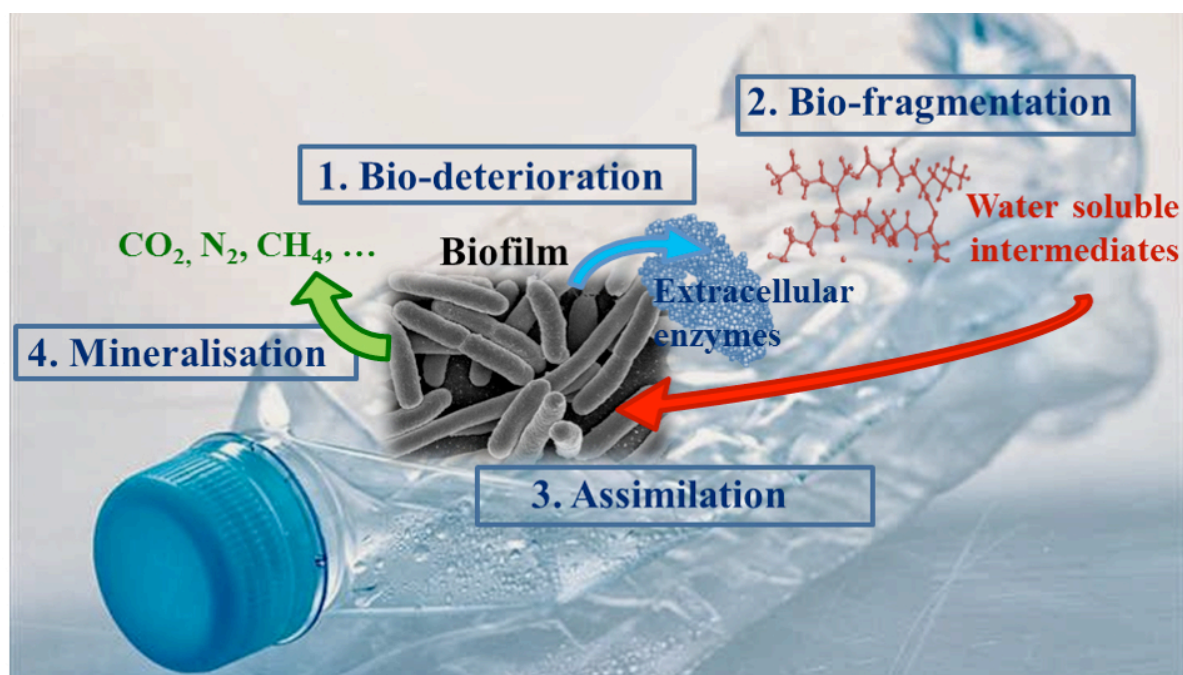


Figure 1 : Les différentes étapes de la biodégradation du plastique par les bactéries (Dussus et Ghiglione, sous presse).

1. La bio-détérioration est engendrée par l'action mécanique du biofilm bactérien qui se forme à la surface du plastique (Figure 2) et qui va pouvoir agrandir les fissures déjà présentes (Bonhomme et al., 2003). Une dégradation chimique peut également être orchestrée par la grande diversité des espèces présentes dans le biofilm, telle que la production de composés acides par les bactéries chimiolithotrophes et chimioorganotrophes.

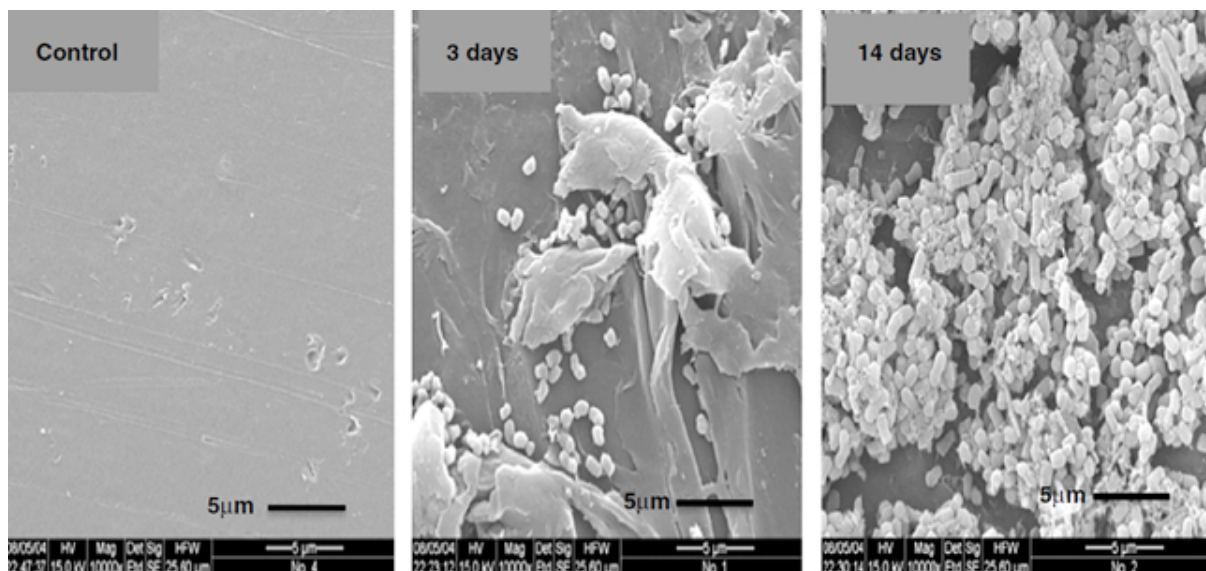


Figure 2 : Biofilm formé par *Rhodococcus ruber* C208 sur la surface de polyéthylène UV photo-oxydée, observé au microscope électronique à balayage. Initiation de la biodégradation détectée dans les 3 jours. Contrôle : Surface non inoculée (selon Sivan et al. 2011).

2. La bio-fragmentation est l'action d'enzymes bactériennes libérées à l'extérieur des cellules pour cliver les polymères plastiques en séquences plus courtes, oligomères et monomères. Les oxygénases, par exemple, rendent les polymères de plastique plus hydrosolubles et donc plus facilement dégradables par les bactéries. Les lipases et les estérases attaquent spécifiquement les groupes carboxyliques et les endopeptidases les groupements amines. Différentes espèces bactériennes sont impliquées dans ce processus (Ghosh et al. 2013).

3. L'assimilation consiste au transfert des molécules plastiques de taille <600Da (daltons) dans les cellules bactériennes et à leur transformation en composés cellulaires et en biomasse.

4. La minéralisation correspond à la dégradation complète du plastique en molécules oxydées (CO₂, N₂, CH₄, H₂O).

Des études ont démontré que la souche *R. ruber* C208 incubée 30 jours sur du polyéthylène photo-oxydé (Figure 2) conduisait à la formation d'un biofilm et contribuait à la perte de 8% du poids sec de plastique (Sivan 2011). Si d'autres exemples de ce type ont été rapportés dans la littérature, ces observations reposent néanmoins sur des études en condition de laboratoire qui utilisent une seule espèce bactérienne. Or, le processus en milieu naturel est beaucoup plus complexe et fait intervenir de nombreuses espèces bactériennes. A notre connaissance, une seule étude a caractérisé les communautés bactériennes qui colonisent les plastiques avec les nouvelles approches de pyroséquençage haut-débit (Zettler et al. 2013), mais ces travaux ne donnent aucune indication sur leur capacité de dégradation des plastiques.

L'enjeu actuel des recherches dans ce domaine repose sur la meilleure compréhension des mécanismes de biodégradation des plastiques par les communautés naturelles. Quelles espèces colonisent les plastiques et lesquelles sont capables de les dégrader ? Les mécanismes moléculaires mis en jeu pour la dégradation sont-ils aussi différents que la grande variété de leur composition ? Actuellement, le programme national [PlasticMicro](#) coordonné par le Laboratoire d'Océanographie Microbienne de Banyuls (PI. JF Ghiglione) et financé par le

CNRS tente de répondre à cette question. Une approche couplée de DNA-SIP et de pyroséquençage haut débit déjà utilisée pour identifier les bactéries capables de dégrader les hydrocarbures aromatiques polycycliques (Sauret et al. 2014) est proposée dans ce programme. Cette approche repose sur le marquage isotopique des plastiques et le suivi de leur incorporation par les bactéries pour accéder à la communauté fonctionnelle des « bactéries plasticlastes ». Ces travaux sont également mis en relation avec la récente expédition scientifique « [Tara Méditerranée](#) » coordonnée par l'Observatoire Océanologique de Villefranche (PI. G. Gorsky et M.L. Pedrotti) qui a récolté les microplastiques dans toute la Méditerranée.

Les plastiques biodégradables : une solution ?

La dégradation des plastiques conventionnels en mer est un processus très lent (>100 ans) qui conduit à leur accumulation dans les océans. Par exemple, on estime que la concentration de microplastiques en Méditerranée augmentera de 8% dans les 30 prochaines années (Lebreton et al., 2012). De nouveaux plastiques dits « biodégradables » apparaissent sur le marché pour réduire l'impact des déchets plastiques en mer.

La définition d'un plastique biodégradable est donnée par la norme européenne [EN 13432](#) de 2007 qui fixe la biodégradabilité à un seuil d'au moins 90% de dégradation en six mois maximum dans des conditions de compostage (environnement microbiologique actif dans des conditions particulières d'humidité et de température). Le résultat de cette dégradation est la formation de biomasse bactérienne ou sa minéralisation. Cette norme ne donne pas d'information sur la biodégradabilité dans des conditions environnementales – en milieu marin notamment – et suggère une collecte des plastiques biodégradables. Sachant que les plastiques retrouvés en mer ont pour origine un manque de collecte, le fait de répondre à cette norme ne résout pas le problème des déchets plastiques en mer. Néanmoins, la recherche et l'innovation peuvent proposer d'autres solutions.

Les plastiques biodégradables sont de deux types :

- Les plastiques « hydro-biodégradables » ou « biosourcés » sont des produits issus de l'agriculture tels que l'amidon de maïs ou de pomme de terre. Si ce type de plastiques répond à la norme EN 13432 (qui suppose leur compostage), sa dégradation en milieu « naturel » reste sujette à controverse. D'autre part, il est entre 4 et 10 fois plus coûteux qu'un plastique classique et encourage l'agriculture intensive (utilisation d'engrais et de pesticides pour améliorer le rendement des récoltes).
- Les plastiques « oxo-biodégradables » sont de même composition primaire que les plastiques conventionnels (polyéthylène, polypropylène, polystyrène,... même filières de production) auxquels ont été ajoutés des stabilisants qui permettent de prédire leur durée de vie et des pro-oxydants qui facilitent leur biodégradation par les microorganismes. Si la dégradation abiotique de ces plastiques est bien documentée, la démonstration de leur biodégradation reste un sujet d'équivoque dans le domaine. Néanmoins, les évolutions des formulations des additifs semblent prometteuses. Très récemment, l'additif « d2w » (<http://www.symphonyenvironmental.com/d2w/>) a obtenu un écolabel (365.001/14) décerné aux produits respectueux de l'environnement selon les normes ISO 14020:2002 et 14024:2004.

Conclusions

Différentes actions de recherches nationales et internationales ont été encouragées ces dernières années devant l'ampleur de la pollution par les plastiques en mer. La compréhension

des mécanismes de leur biodégradation en mer est à ses balbutiements. Si certains mécanismes ont été observés en condition de laboratoire, leur étude en milieu naturel reste largement inexplorée. Par exemple, les mécanismes moléculaires de bio-détérioration, bio-fragmentation, bio-assimilation et bio-minéralisation sont aujourd'hui inconnus. La diversité des microorganismes associés à ces différentes étapes de la biodégradation est également ignorée. La compréhension de ces processus permettra de mieux définir les taux de biodégradation des plastiques et de mieux prédire le devenir des plastiques dits « biodégradables » en mer.

La mer est le réceptacle ultime de tous les déchets produits sur terre (80% des déchets retrouvés en mer proviennent de la terre). La solution au problème de la pollution des plastiques en mer ne viendra certainement pas de la mer elle-même, mais d'une prise de conscience des citoyens qui sont responsables de cette pollution (plus de 30% des déchets plastiques retrouvés en mer proviennent d'un manque de collecte de la part des ménages).

Glossaire

Bactéries chimiolithotrophes : Bactéries puisant leur énergie dans les liaisons chimiques de composés minéraux.

Bactéries chimioorganotrophes : Bactéries puisant leur énergie dans les liaisons chimiques de molécules organiques.

Groupe carboxyle : – CO₂

Gyre océanique : tourbillon d'eau océanique formé d'un ensemble de courants marins et provoqué par la force de Coriolis.

Hydrocarbure : composé organique constitué exclusivement d'atomes de carbone et d'hydrogène.

Organismes saprophytes : micro-organismes qui se nourrissent de matières organiques en décomposition qu'ils transforment en matière minérale.

Poissons pélagiques : poissons vivant et se nourrissant dans la colonne d'eau.

Pyroséquençage haut débit : technique permettant de séquencer le génome rapidement avec une lecture directe de la séquence.

SIP : Stable Isotope Probing, technique en écologie microbienne qui permet de tracer les flux de nutriments utilisés par les microorganismes. Le substrat est enrichi avec un isotope stable qui est consommé par les organismes à étudier.

Zooplankton : organismes de type animal qui flottent au gré des courants, ils sont à la base de la plupart des chaînes alimentaires.

Bibliographie

- Andrady AL, 2011. Microplastics in the marine environment. *Mar. Pollut. Bull.* 62: 1596-1605.
- Bonhomme S, Cuet A et al. 2003. Environmental biodegradation of polyethylene. *Polymer Degradation and Stability*, 81: 441-452.
- Barnes DK, 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(1526): 1985-1998.
- Collignon A, Hecq JH, Galgani F, Voisin P, Collard F et Goffart A, 2012. Neustonic microplastic and zooplankton in the North Western Mediterranean Sea. *Marine pollution bulletin*, 64(4): 861-864.
- Cózar A, Echevarría, et al., 2014. Plastic debris in the open ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(28): 10239-10244.

- Davison P et Asch RG, 2011. Plastic ingestion by mesopelagic fishes in the North Pacific Subtropical Gyre. *Marine Ecology Progress Series*, 432: 173-180.
- Dussud C and Ghiglione JF. Bacterial degradation of synthetic plastics. CIESM Monograph 46 on Marine Litters. Sous presse.
- Eriksen M, Lebreton LC 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(12): e111913.
- Ghosh SK, Pal S and Ray S, 2013. Study of microbes having potentiality for biodegradation of plastics. *Environmental Science and Pollution Research* 20: 4339-4355.
- Hidalgo-Ruz V, Gutow L, Thompson RC and Thiel M, 2012. Microplastics in the marine environment: A review of the methods used for identification and quantification. *Environ Sci Technol* 46(6): 3060–3075.
- Ipekoglu B, Böke H and Cizer O., 2007. Assessment of material use in relation to climate in historical buildings. *Building and Environment*, 42: 970-978.
- Ivar do Sul JA and Costa MF, 2014. The present and future of microplastic pollution in the marine environment. *Environmental Pollution*, 185: 352-364.
- Lebreton LCM, Greer SD and Borrero JC, 2012. Numerical modelling of floating debris in the world's oceans. *Mar Pollut Bull* 64(3): 653–661.
- Lithner D, Larsson A and Dave G, 2011. Environmental and health hazard ranking and assessment of plastic polymers based on chemical composition. *Sci. Total Environ.* 409: 3309e3324.
- Masó M, Garcés E, Pagès F and Camp J, 2007. Drifting plastic debris as a potential vector for dispersing Harmful Algal Bloom (HAB) species. *Sci. Mar.* 67: 107–111.
- Sauret C, Severin T and a., 2014. 'Rare biosphere' bacteria as key phenanthrene degraders in coastal seawaters. *Applied and Environmental Microbiology* 194: 246-253.
- Sivan A, 2011. New perspectives in plastic biodegradation. *Current Opinion in Biotechnology*, 22: 422-426.
- Shah AA, Hasan F, Hameed A and Ahmed S, 2008. Biological degradation of plastics: a comprehensive review. *Biotechnology advances*, 26(3): 246-265.
- Teuten EL, Saquing JM et al., 2009. Transport and release of chemicals from plastics to the environment and to wildlife. *Phil. Trans. R. Soc. B* 364: 2027e2045
- Wright SL, Thompson RC and Galloway TS, 2013. The physical impacts of micro- plastics on marine organisms: a review. *Environ. Pollut.* 178: 483e492.
- Zettler ER, Mincer TJ and Amaral-Zettler LA, 2013. Life in the “plastisphere”: microbial communities on plastic marine debris. *Environmental Science and Technology*, 47: 7137-7146.



ANNEXE 2 : Article en co-auteur

Biogeochemical cycling and phyto- and bacterioplankton communities in a large and shallow tropical lagoon (Términos Lagoon, Mexico) under 2009–2010 El Niño Modoki drought conditions

Pascal Conan¹, Mireille Pujo-Pay¹, Marina Agab¹, Laura Calva-Benítez², Sandrine Chifflet³, Pascal Douillet³, Claire Dussud¹, Renaud Fichez³, Christian Grenz³, Francisco Gutierrez Mendieta², Montserrat Origel-Moreno^{2,3}, Arturo Rodríguez-Blanco¹, Caroline Sauret¹, Tatiana Severin¹, Marc Tedetti³, Rocío Torres Alvarado², and Jean-François Ghiglione¹

¹Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, CNRS, Laboratoire d’Océanographie Microbienne (LOMIC), Observatoire Océanologique, 66650, Banyuls/mer, France

²Universidad Autónoma Metropolitana, Departamento de Hidrobiología, México D.F., Mexico

³Aix-Marseille Université, CNRS-INSU, Université de Toulon, IRD, Mediterranean Institute of Oceanography (MIO) UM 110, 13288, Marseille, France

Correspondence to: Pascal Conan (pascal.conan@obs-banyuls.fr)

Received: 8 July 2016 – Discussion started: 11 August 2016

Revised: 6 January 2017 – Accepted: 25 January 2017 – Published: 2 March 2017

Abstract. The 2009–2010 period was marked by an episode of intense drought known as the El Niño Modoki event. Sampling of the Términos Lagoon (Mexico) was carried out in November 2009 in order to understand the influence of these particular environmental conditions on organic matter fluxes within the lagoon’s pelagic ecosystem and, more specifically, on the relationship between phyto- and bacterioplankton communities. The measurements presented here concern biogeochemical parameters (nutrients, dissolved and particulate organic matter [POM], and dissolved polycyclic aromatic hydrocarbons [PAHs]), phytoplankton (biomass and photosynthesis), and bacteria (diversity and abundance, including PAH degradation bacteria and ectoenzymatic activities). During the studied period, the water column of the Términos Lagoon functioned globally as a sink and, more precisely, as a “nitrogen assimilator”. This was due to the high production of particulate and dissolved organic matter (DOM), even though exportation of autochthonous matter to the Gulf of Mexico was weak. We found that “bottom-up” control accounted for a large portion of the variability of phytoplankton productivity. Nitrogen and phosphorus stoichiometry mostly accounted for the heterogeneity in phytoplankton and free-living prokaryote distribution in the lagoon. In

the eastern part, we found a clear decoupling between areas enriched in dissolved inorganic nitrogen near the Puerto Real coastal inlet and areas enriched in phosphate (PO_4) near the Candelaria estuary. Such a decoupling limited the potential for primary production, resulting in an accumulation of dissolved organic carbon and nitrogen (DOC and DON, respectively) near the river mouths. In the western part of the lagoon, maximal phytoplankton development resulted from bacterial activity transforming particulate organic phosphorus (PP) and dissolved organic phosphorus (DOP) to available PO_4 and the coupling between Palizada River inputs of nitrate (NO_3) and PP. The Chumpan River contributed only marginally to PO_4 inputs due to its very low contribution to overall river inputs. The highest dissolved total PAH concentrations were measured in the El Carmen Inlet, suggesting that the anthropogenic pollution of the zone is probably related to the oil-platform exploitation activities in the shallow waters of the southern of the Gulf of Mexico. We also found that a complex array of biogeochemical and phytoplanktonic parameters were the driving force behind the geographical distribution of bacterial community structure and activities. Finally, we showed that nutrients brought by the Palizada River supported an abundant bacterial community of PAH

degraders, which are of significance in this important oil-production zone.

1 Introduction

Coastal lagoons are complex environments, combining features of shallow inland waterbodies wholly or partly sealed off from the adjacent coastal oceans. They are influenced by tides, river inputs, the precipitation versus evaporation balance, and the surface heat balance. Interactions between freshwater and marine sources generate strong gradients of salinity, light, and nutrient availability (Hauenstein and Ramírez, 1986). Biological diversity is generally high in these environments (Milessi et al., 2010). Located in the southern Gulf of Mexico near Campeche Sound, the Términos Lagoon is one of the largest tropical coastal lagoons worldwide, and its recognized environmental importance and protected status are potentially threatened by petroleum-related industrial activities inshore and offshore (García-Ríos et al., 2013). A first tentative budget of salt and nutrients concluded that the Términos Lagoon was slightly autotrophic on a yearly basis (David, 1999), but this assessment was clearly based on scarce environmental data. Chlorophyll *a* (Chl *a*) concentration and phytoplankton net production have been reported to range from 1 to 17 $\mu\text{g L}^{-1}$ and from 20 to 300 $\text{gC m}^{-2} \text{yr}^{-1}$ respectively (Day et al., 1982), suggesting a potential shift from oligotrophic to eutrophic conditions.

In aquatic ecosystems, bacteria utilize a large fraction (up to 90 %) of the primary production, since algal carbon exudates can be the principal source for bacterial production (Cole et al., 1988; Conan et al., 1999). Besides the utilization of a considerable part of the available organic matter, bacterioplankton communities also absorb inorganic nutrients, thus competing with phytoplankton communities (Conan et al., 2007; Hobbie, 1988). The bulk of the organic matter is a highly heterogeneous matrix which is primarily composed of complex and refractory substrates (Hoppe et al., 2002), but which also contains labile substrates such as proteins or peptides, oligosaccharides, and fatty acids. Extracellular enzymes are thus essential to aquatic microorganisms as they allow for the partitioning of complex organic substrates, including high molecular weight compounds which cannot pass through the cell membrane (Arnosti and Steen, 2013). As a function of genetic diversity, the capacity to produce extracellular enzymes is differently distributed in the bacterial community, directly impacting the range of substrates metabolized (Zimmerman et al., 2013). This phenomenon has global-scale implications since several meta-analyses have clearly evidenced differences in the metabolic capacities of microorganisms from temperate, tropical, or high latitude waters (Amado et al., 2013; Arnosti et al., 2011). At a local scale, alteration of the evaporation–precipitation balance due to climate change can be challenging, especially in the

case of a coastal lagoon, as it is well known that changes in salinity may alter bacterial diversity and activity (Pedrós-Alió et al., 2000). Local anthropogenic inputs of organic pollutants such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) may also affect bacterial diversity and activity (Aguayo et al., 2014; Jiménez et al., 2011; Rodríguez-Blanco et al., 2010). Indeed, PAHs, which can comprise as much as 25–35 % of total hydrocarbon content in crude oils (Head et al., 2006), are among the most abundant and ubiquitous pollutants in the coastal environment (González-Gaya et al., 2016). These compounds are recognized by the European and US environmental agencies as priority pollutants for the aquatic medium due to their toxicity, persistence, and ability to accumulate in the biota (Kennish, 1992). Hence, the presence of PAHs in the marine environment may induce an increase in the indigenous populations of marine bacteria that can break down and utilize these chemicals as a carbon source, the so-called “PAH-degrading bacteria” or “PAH degraders”. These bacteria are generally strongly selected in oil-impacted ecosystems, where they may account for 70 to 90 % of the total bacterial community (Gutierrez et al., 2014; Head et al., 2006).

Despite their importance, few studies have considered the bacterial communities of tropical inland aquatic ecosystems (Roland et al., 2010) or coastal lagoons (Abreu et al., 1992; Hsieh et al., 2012; MacCord et al., 2013; They et al., 2013) and almost none have dealt with tropical coastal lagoons (Scofield et al., 2015). Among the existing studies, very few have been conducted on bacterial communities and most of them have been based on culture-dependent methods (Lizárraga-Partida et al., 1987, 1986). However, cultivable bacteria represent a very small fraction of the total present bacteria (< 0.1 %; Ferguson et al., 1984), and culture-independent methods are needed to more accurately assess the diversity and activity of whole bacterial communities in such a vast and understudied system. Additionally, the Términos Lagoon is potentially impacted by PAHs which may come from a variety of sources which all carry various urban and industrial wastes (fuel combustion and traffic exhaust emissions) including sea-based activities (ballast water discharge, drilling, and spills from ships, platforms and pipelines), rivers, surface runoffs, and the atmosphere. Nevertheless, to our knowledge, little is known about the PAH content in this ecosystem. Even though Noreña-Barroso et al. (1999) reported on PAH concentrations in the American oyster *Crassostrea virginica* and Osten-Von Rendon et al. (2007) studied PAH concentrations in surface sediments, no data are currently available concerning dissolved PAH concentrations in the surface waters of the Términos Lagoon.

Our study aims to evaluate the link between (i) biogeochemical (nutrients, dissolved and particulate organic matter [POM]), (ii) phytoplanktonic (biomass and photosynthetic activity), and (iii) free-living prokaryote (diversity, including PAH-degrading bacteria, and ectoenzymatic activities) parameters in the water column of the Términos Lagoon (Mexico) after a sustained period of minimum river discharge rel-

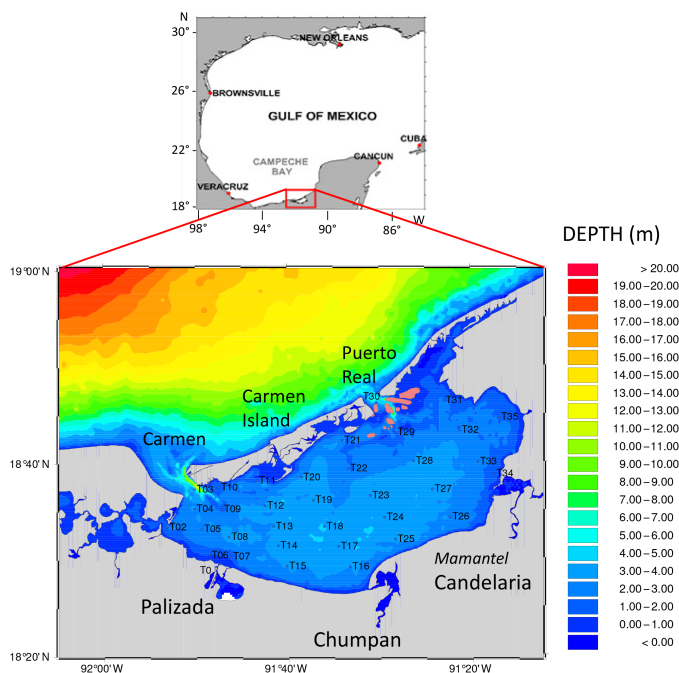


Figure 1. Study site location and distribution of the 35 sampled stations in the lagoon.

ative to the 2009–2010 El Niño Modoki episode. After having identified the main sources of nutrients in the lagoon (focused on nitrogen and phosphorus), we propose a geographical organization of the ecosystem to explain the distribution of the microbial pelagic communities across the lagoon.

2 Materials and methods

2.1 Study site and sampling

The Términos Lagoon is a large (1936 km², volume 4.65 km³) and shallow (average depth 2.4 m) coastal lagoon located in the Mexican state of Campeche (Fig. 1), 18°20' to 19°00' N and 91°10' to 92°00' W. Temperature shows low seasonal variation (27 to 33 °C), but salinity oscillates from brackish to marine waters due to high variability in river runoffs (Fichez et al., 2016; Gullian-Klanian et al., 2008). River discharge, precipitation, and groundwater seepage account for 95.44, 4.53 and 0.03 %, respectively. The Chumpan, Candelaria–Mamantel (hereafter Candelaria), and Palizada Estuaries account for 5, 19, and 76 %, respectively, of the freshwater delivered yearly ($\sim 12 \times 10^9 \text{ m}^3 \text{ yr}^{-1}$; i.e. about 2.6 times the lagoon volume) to the lagoon (Fichez et al., 2016). The lagoon is connected to the coastal sea by two inlets: El Carmen on the northwestern side (4 km long) and Puerto Real on the northeastern side (3.3 km in length). About half of the water volume is renewed every 9 days, mostly as a result of tidal exchange. The tide is mainly diurnal, with a mean range of 0.3 m. (David and Kjerfve, 1998). Recent results on tidal current modeling (Contreras Ruiz Es-

parza et al., 2014) reveal both a dynamic inshore current entering the lagoon through the El Carmen Inlet, flowing through the southern half of the lagoon and exiting through Puerto Real, and a much slower inverse water current flooding the northern central part of the lagoon. This tidally induced hydrodynamic trend generates a counterclockwise circulation gyre located in the center of the lagoon, on the leeward side of Carmen Island.

Samples were collected at a 0.2 m depth at 35 stations distributed over the whole lagoon (Fig. 1) from 21 to the 27 October 2009. In 2009, a yearly cumulative discharge of $4.83 \pm 1.71 \times 10^9 \text{ m}^3$ broke a historical deficit record over the 1992–2011 period for the Palizada River (average yearly cumulative discharge of $7.19 \pm 4.22 \times 10^9 \text{ m}^3 \text{ yr}^{-1}$) (Fichez et al., 2017). That exceptional drought period impacted the entire formerly Mesoamerican region during the 2009–2010 El Niño Modoki episode. This resulted in a positive salinity anomaly in the Términos Lagoon that developed most strongly during the post-wet season period (Fichez et al., 2016) at the time of our sampling.

A vertical profile of temperature, salinity, and fluorescence was carried out at each of the 35 stations using a Sea–Bird CTD probe (SBE 19) with a precision of 0.01 °C for temperature and 0.001 for salinity. Once the profile was completed, water was sampled using a 5 L Niskin bottle maintained horizontally at 0.2 m below the surface.

2.2 Nutrients and dissolved organic matter

As soon as the Niskin sampler was retrieved on board, a previously acid-washed 40 mL Schott® glass vial was rinsed with sampled water, filled, immediately injected with the fluorometric detection reagent for ammonia determination (as described in Holmes et al., 1999), sealed, and stored in the dark for later analysis in the laboratory. Following this, two 30 mL and one 150 mL plastic acid-washed vials were then rinsed with sampled water, filled, and stored in a specifically dedicated and refrigerated ice cooler, to be later deep-frozen in the laboratory while awaiting analysis of dissolved inorganic and organic nutrients, as follows:

Nitrate ($\text{NO}_3 \pm 0.02 \mu\text{M}$), nitrite ($\text{NO}_2 \pm 0.01 \mu\text{M}$), phosphate ($\text{PO}_4 \pm 0.01 \mu\text{M}$), and silicate ($\text{Si(OH)}_4 \pm 0.05 \mu\text{M}$) concentrations were measured on a continuous flow Technicon® AutoAnalyzer II (Aminot and Kérouel, 2007), as previously described in Severin et al. (2014). Ammonium ($\text{NH}_4 \pm 10 \text{ nM}$) was detected at nanomolar concentrations by fluorometric detection (Holmes et al., 1999) on a Turner Designs Trilogy fluorometer.

Samples for dissolved organic matter (DOM) were filtered through two precombusted (24 h, 450 °C) glass fiber filters (Whatman GF/F, 25 mm). A total of 20 mL of dissolved organic carbon (DOC) was collected in precombusted glass tubes, acidified with orthophosphoric acid (H_3PO_4), and analyzed by high temperature catalytic oxidation (HTCO) (Cauwet, 1999) on a Shimadzu TOCV analyzer. Typical ana-

lytical precision is ± 0.1 – 0.5 (SD) or 0.2 – 1 % (CV). A total of 20 mL of dissolved organic nitrogen (DON) and phosphorus (DOP) was collected in Teflon vials and analyzed by Persulfate wet oxidation following Pujo-Pay and Raimbault (1994) and Pujo-Pay et al. (1997).

2.3 Particulate organic matter, chlorophyll, and phaeopigment

A 4 L acid-washed plastic container was also used for subsampling from the Niskin bottle. This container was rinsed with sampled water, filled, and stored in a dedicated ice cooler while awaiting filtration in the laboratory as follows: 250 mL of seawater was filtered through a precombusted (24 h, 450 °C) Whatman® GF/F glass filters (25 mm), placed into a Teflon vial, and oxidized for particulate organic nitrogen (PON) and phosphorus (PP) measurements (according to Pujo-Pay and Raimbault, 1994). Approximately 1 L was filtered on precombusted (24 h, 450 °C) glass fiber filters (Whatman GF/F, 25 mm) for particulate organic carbon (POC) and PON measurements. Filters were oven dried at 50 °C and stored in washed glass vials in a desiccator until analysis using a Perkin Elmer 2400 CHN elemental analyzer following the cruise.

For chlorophyll, 250 mL samples were filtered using 25 mm diameter Whatman® GF/F filters and immediately stored in liquid nitrogen. Chl and phaeopigment (Phaeo) were later extracted from the filters with 100 % methanol (Marker, 1972). Concentrations were determined by using the fluorometric technique (Lorenzen, 1966) on a Turner Design Trilogy fluorometer.

2.4 Photosynthetic parameters

Photosynthetic–irradiance parameters (α , P_m^b and I_k) were measured using the radioactive ^{14}C tracer technique (Fitzwater et al., 1982) in a specially designed homemade incubator. The 10×60 mL Nunc® culture vials were carefully filled and inoculated with $\text{Na}_2\text{H}^{14}\text{CO}_3$ (final activity of $\sim 0.2 \mu\text{Ci mL}^{-1}$), incubated for 45 min in a 10 light level irradiance gradient (from 0 to 1327 W m^{-2}) before being filtered on Whatman GF/F 25 mm filters, rinsed with 10 % HCl, dried at 45 °C for 12 h, and placed into scintillation vials. A total of 10 mL of a liquid scintillation cocktail (Ultima Gold uLLT) was added to the set of scintillation vials 6 h before processing in a Beckman Scintillation Counter. The photosynthetic parameters were determined by fitting each obtained curve to the “hyperbolic tangent model without photoinhibition” proposed by Jassby and Platt (1976).

2.5 Measurements of dissolved total PAH concentrations

Dissolved total PAH concentrations were determined by using the EnviroFlu-HC submersible UV fluorometer (TriOS Optical Sensors, Germany), a commercially available instrument dedicated to the in situ and real-time quantification of PAHs in water. The sensor was calibrated in the laboratory before the cruises following Tedetti et al. (2010) and Sauret et al. (2016). In this work, the mean dissolved total PAH concentrations derived from the sensor are given in ng L^{-1} with a mean coefficient of variation of 10 %.

2.6 Abundance of prokaryotes

Free-living prokaryotes were determined by flow cytometry (Mével et al., 2008). Two-milliliter seawater samples were fixed with 2 % formaldehyde for 1 h at 4 °C. A 1 mL subsample was incubated with SYBR Green I (Sigma Aldrich, final conc. 0.05 % [v/v] of the commercial solution) for 15 min at 20 °C in the dark and analyzed with a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA) equipped with an air-cooled argon laser (488 nm, 15 mW). Data acquisition and analysis were done with Cell-Quest software (Becton Dickinson). The discrimination of the heterotrophs was undertaken using SYBR Green I to induce a green fluorescence and enable the separation of the prokaryotes using the SSC (side scatter) diffraction parameter.

2.7 Total and metabolically active bacterial community structure

Nucleic acids were extracted on 0.2 μm -pore-size filters (47 mm, PC, Nucleopore) by the filtration of 1 L of pre-filtered (3 μm) water. Co-extraction of DNA and RNA was performed after chemical cell lysis (Ghiglione et al., 1999) with the Qiagen AllPrep DNA/RNA extraction kit using the manufacturer’s instructions. DNA and cDNA (by murine leukemia virus, M-MLV, reverse transcription of 16S rRNA, Promega) were used as a template for PCR amplification of the variable V3 region of the 16S rRNA gene (*Escherichia coli* gene positions 329–533; Brosius et al., 1981). The primer w34 was fluorescently labeled at the 5’-end position with phosphoramidite (TET, Applied Biosystems). A CE-SSCP (capillary electrophoresis single-strand conformation polymorphism) analysis was performed using the 310 Genetic Analyzer and GeneScan Analysis Software (Applied Biosystems) as previously described by Ortega-Retuerta et al., 2012.

2.8 Extracellular enzymatic activities

Aminopeptidase, β -glucosidase, and lipase were measured using a VICTOR3 spectrofluorometer (Perkin Elmer) after incubations of 2 h at in situ temperature with L-leucine-7amido-4-methyl coumarin (LL, 5 μM final), MUF- β -D-

glucoside (β -Glc, 0.25 μ M final), or MUF-palmitate (Lip, 0.25 μ M final). These saturated concentrations and optimized time incubations were determined prior to the extracellular enzymatic activities measurement as previously described by Van Wambeke et al., 2009.

2.9 Quantification of PAH-degrading bacteria by the most probable number method

The quantification of PAH-degrading bacteria was performed using the most probable number (MPN) method. A total of 100 μ L of each sample was introduced in triplicate into a 48-well microplate with 900 μ L of sterile minimum medium, as previously described (Rodríguez-Blanco et al., 2010; Sauret et al., 2016). A mixture of six PAHs from two to five rings (naphthalene, fluorene, phenanthrene, fluoranthene, pyrene, and benzo[a]pyrene) prepared in dichloromethane in equimolar concentration was introduced into each well at a final concentration of 10 μ g mL⁻¹ as previously described by Sauret et al. (2016). This corresponds to a very high concentration of PAH in nature, i.e. 50 times higher than the values found in the Leghorn harbor (Cincinelli et al., 2001). After two weeks of incubation, the change from blue to pink – indicating oxidation of the resazurin contained in the medium – was checked. Based on the flow cytometry quantification of the abundance of bacteria at the beginning of the incubation (see Sect. 2.6) and taking into account the dilution factors where we visually observed color changes after two weeks, the traditional MPN table gave the most probable number of bacteria able to degrade the mixture of six PAHs (Alexander, 1982).

2.10 Statistical analysis

The comparative analysis of 16S rDNA- or 16S rRNA-based CE-SSCP fingerprints was carried out with the PRIMER 6 software (PRIMER-E, Ltd., UK) using Bray-Curtis similarities. We used the similarity profile test (SIMPROF) (PRIMER 6) to check whether a specific sub-cluster can be recreated by randomly permuting the entry ribotypes and samples when using hierarchical agglomerative clustering. The significant branch (SIMPROF, $p < 0.05$) was used as a prerequisite for defining bacterial clusters, and clusters were reported using non-metric multidimensional scaling (NMDS) representation.

Canonical correspondence analysis (CCA) was used to investigate the variations in the CE-SSCP profiles under the constraint of our set of environmental variables using CANOCO software (version 5.0) as previously described in Berdjeb et al. (2011). Significant variables (i.e. variables that significantly explained changes in 16S rDNA- and 16S rRNA-based fingerprints) in our dataset were chosen using a forward-selection procedure. Explanatory variables were added until further addition of variables failed to contribute significantly ($p < 0.05$) to a substantial improvement in the

model's explanatory power. Environmental parameters were previously transformed according to their pairwise distributions, and Spearman's rank pairwise correlations between the transformed environmental variables were used to determine their significance with StatEL v2.7.

2.11 Results

2.12 Distribution of physical parameters

In the studied period, the Términos Lagoon was characterized by a northwest–southeast positive temperature gradient from > 30 to about 27 °C (Fig. 2a). Salinity was maximal at the Puerto Real Inlet (37.50) and along the southern limits of Carmen Island, intermediate at Candelaria and Chumpan River mouths, and minimal (21.57) near the Palizada River (Fig. 2b).

2.13 Distribution of biogeochemical parameters

Nitrate and ammonium concentrations (Fig. 2c and d) were at maximum near the Palizada river outlet (16.6 and 0.3 μ M, respectively) and the Puerto Real Inlet (2.5 μ M in NO₃ and the highest NH₄ concentration of 1 μ M). In the rest of the lagoon, NO₃ concentrations were quite low and homogeneous (close to the detection limit of 0.01 μ M). NH₄ concentrations were more variable, with minimum values on the northern side of the lagoon and concentrations in the 0.1 to 0.3 μ M range on the southern inshore side.

The distribution pattern for PO₄ (Fig. 2e) differed significantly from N-nutrients. Minimum concentrations (< 0.05 μ M) were measured in the western part of the lagoon under the influence of the Palizada River, indicating very low PO₄ inputs from that river as opposed to nitrogen-nutrients. PO₄ concentrations were also low (< 0.10 μ M) in the center of the lagoon. The highest PO₄ concentration was measured in the vicinity of the Chumpan River (0.17 μ M) whereas significant inputs in the eastern part came from the Candelaria River (0.13 μ M) and the Puerto Real Inlet (0.12 μ M).

The distributions of dissolved organic carbon (DOC; Fig. 2f), nitrogen (DON; Fig. 2g), and phosphorus (DOP; Fig. 2h) concentrations followed a pattern comparable to that of PO₄. The higher concentrations of DOC, DON, and DOP were measured in the southeastern part of the lagoon. However, the maximal DOC and DON concentrations (> 400 and 20 μ M, respectively) were measured near the Candelaria River outlet, whereas the maximal DOP concentrations were observed off of the Chumpan River (> 1 μ M). The lowest concentrations < 200 , 5, and 0.1 μ M of DOC, DON, and DOP were measured in the vicinity of the Palizada River outlet. These relatively weak concentrations even spread along the northern shore of Carmen Island for DOC. Significant Spearman's rank correlations ($n = 35$, $p < 0.05$) were found between DON and DOC ($\rho = 0.64$), DOP ($\rho = 0.64$), and temperature ($\rho = -0.32$).

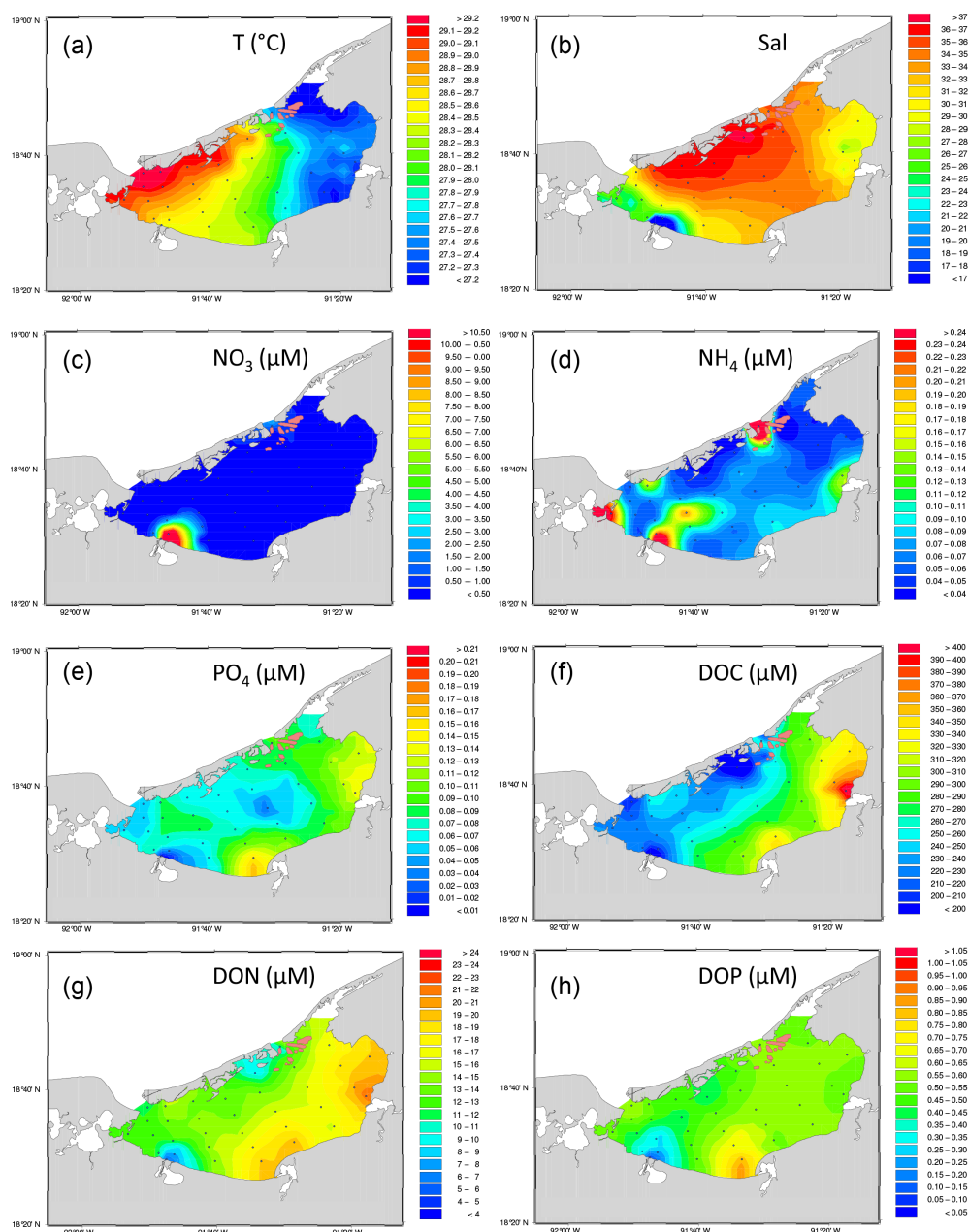


Figure 2. Mapped distribution of the physico-chemical parameters measured in the Términos Lagoon in October 2009 for (a) temperature (°C); (b) salinity; (c) nitrate concentrations (NO₃ in μM); (d) ammonium concentrations (NH₄ in μM); (e) phosphate concentrations (PO₄ in μM); (f) dissolved organic carbon concentrations (DOC in μM); (g) dissolved organic nitrogen concentrations (DON in μM); and (h) dissolved organic phosphorus concentrations (DOP in μM).

The three rivers were clearly the main source of particulate organic nitrogen and phosphorus in the lagoon (Fig. 3). PON reached a maximum concentration of 9.3 μM in the vicinity of the Chumpan Estuary and progressively decreased while spreading to the north (Fig. 3a). Concerning PP, the Palizada River was the main source with concentrations close to 0.9 μM, progressively decreasing to 0.6 μM while spreading along the southern shore toward the Chumpan Estuary and 0.5 μM in the northeastern drift toward the Puerto Real passage (Fig. 3b). Significant Spearman's rank correla-

tions ($n = 35$, $p < 0.05$) were found between PP and PON ($\rho = 0.73$), NO₃ ($\rho = 0.57$), and salinity ($\rho = -0.56$).

2.14 Photosynthetic pigment and activity

Chlorophyll (Chl) and phaeopigment followed a convergent distribution pattern (Fig. 3c and d) with maximum concentrations close to or in the vicinity of the Palizada River mouth ($> 6 \mu\text{g Chl L}^{-1}$ and $\sim 2 \mu\text{g Phaeo L}^{-1}$). A range of 1–6 μg Chl L⁻¹ and 1–2 μg Phaeo L⁻¹ was encountered in the western part of the lagoon. Concentrations $< 1 \mu\text{g Chl L}^{-1}$

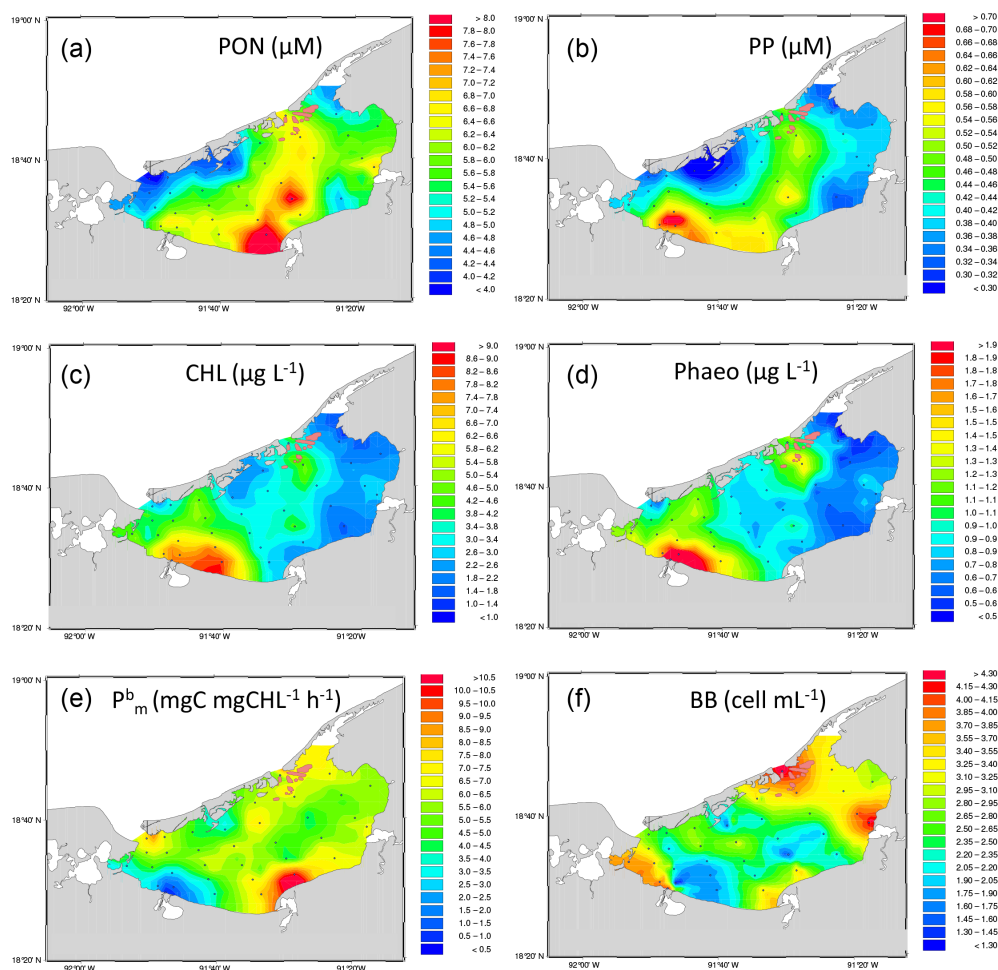


Figure 3. Same as Fig. 2 but for (a) particulate organic nitrogen concentrations (PON in μM); (b) particulate organic phosphorus concentrations (PP in μM); (c) total chlorophyll concentrations (Chl in mg m^{-3}); (d) phaeopigments (Phaeo in mg m^{-3}); (e) maximum photosynthetic rate normalized to chlorophyll (P_m^b in $\text{mg C mg Chl}^{-1} \text{ h}^{-1}$); and (f) free-living prokaryote abundance ($10^6 \text{ cell mL}^{-1}$).

and $1\text{--}2 \mu\text{g Phaeo L}^{-1}$ were mostly confined to the eastern part. On a global view, Phaeo accounted for $28 \pm 8\%$ of Chl on average, thus attesting to rather active phytoplankton communities. Significant Spearman's rank correlations ($n = 35$, $p < 0.05$) were found between Chl and Phaeo ($\rho = 0.82$) and PP ($\rho = 0.74$).

The maximum rate of carbon production per unit of chlorophyll at light saturation (P_m^b , Fig. 3e) was minimal ($< 0.5 \text{ mg C mg Chl}^{-1} \text{ h}^{-1}$) in the Palizada plume in association with the maximum Phaeo : Chl ratio measured ($> 44\%$). Maximum P_m^b values in excess of $8.0 \text{ mg C mg Chl}^{-1} \text{ h}^{-1}$ were measured close the Chumpan Estuary in an area with a low Phaeo : Chl ratio ($< 25\%$).

2.15 Bacterial abundance and extracellular enzymatic activities

Free-living prokaryote abundance ranged from 1.0 to $4.8 \times 10^6 \text{ cell mL}^{-1}$ (mean = $2.8 \times 10^6 \text{ cell mL}^{-1}$, $\text{SD} = 0.9 \times 10^6 \text{ cell mL}^{-1}$, $n = 35$), with maximum values observed in

the Puerto Real passage and near the river mouths (Candelaria and Chumpan Rivers) the except for the Palizada River which showed the highest river–lagoon gradient for maximum to minimum values (Fig. 3f).

Cell-specific aminopeptidase (Leu-MCA) and phosphatase (MUF-P) activities reached maximum values near the mouths of the Palizada and Chumpan rivers at 33 , and $131.9 \text{ fmol L}^{-1} \text{ h}^{-1} \text{ cell}^{-1}$, respectively (Fig. 4a and b). Cell-specific lipase activity (MUF-Lip) was at maximum ($10.9 \text{ fmol L}^{-1} \text{ h}^{-1} \text{ cell}^{-1}$; Fig. 4c) from the Chumpan River mouth northward towards Carmen Island, crossing the lagoon approximately in the middle following the isotherms (Fig. 2a). Much lower activities were found over most of the lagoon for all the activities (mean values in $\text{fmol L}^{-1} \text{ h}^{-1} \text{ cell}^{-1}$ are 12.6 ± 8.4 for Leu-MCA, 12.1 ± 24.2 for MUF-P, and 2.4 ± 2.6 for MUF-Lip). Significant Spearman's rank correlations ($n = 35$, $p < 0.01$) were found between DOC ($\rho = -0.27$), PON ($\rho = 0.33$), aminopeptidase activities and, to a greater extent, between

phosphatase activities and PO_4 ($\rho = -0.46$), PP ($\rho = 0.60$), NO_3 ($\rho = 0.69$), and Chl ($\rho = 0.53$).

2.16 Dissolved PAH concentrations and estimated abundance of bacterial PAH degraders

Dissolved total PAH concentrations (Fig. 5a) were higher near the El Carmen Inlet (332 ng L^{-1}) and relatively lower near the Palizada River (187 ng L^{-1}) and the Chumpan River mouths (166 ng L^{-1}). They were generally lower in the rest of the lagoon ($< 130 \text{ ng L}^{-1}$). Quantification by MPN counts showed high enrichment of PAH degraders near the Palizada River (estimated at $4.6 \times 10^4 \text{ cells mL}^{-1}$, equivalent to 4.4 % of free-living prokaryotes) (Fig. 5b). Lower values were found near the Chumpan River mouth (estimated at $4.7 \times 10^3 \text{ cells mL}^{-1}$, equivalent to 0.2 % of free-living prokaryotes) and commonly represented less than 0.1 % of the free-living prokaryote abundance in the rest of the lagoon. Quantification by MPN counts showed a significant, though low, Spearman's rank correlation with dissolved total PAH concentrations ($\rho = 0.37$, $p < 0.05$, $n = 35$). MPN count correlations ($p < 0.05$, $n = 35$) were stronger with PP ($\rho = 0.65$) and Chl ($\rho = 0.53$).

2.17 Spatial distribution of total and metabolically active bacteria by CE-SSCP fingerprints

Bacterial community structure defined as a function of 16S rDNA-based fingerprints from each sample singled out three individual stations (Palizada River, El Carmen Inlet and Candelaria River) and aggregated five groups of stations (Fig. 6a). Three of these groups included a large number of samples: nine stations located in the northeastern part of the lagoon near the Puerto Real Inlet; nine stations positioned in the middle of the lagoon north from Chumpan River; and eight stations situated to the southwest of Carmen Island. Two other groups with fewer stations identified intermediate communities found between the El Carmen Inlet and the Palizada River in the western part of the lagoon (stations 2, 4, and 6) and the Candelaria River in the middle of the lagoon (stations 22, 24, and 27).

Metabolically active bacterial communities as a function of 16S rRNA-based fingerprints singled out two stations (Palizada River and El Carmen Inlet) and aggregated five groups of stations that were slightly different from the DNA-based clusters (Fig. 6b). Three of these groups included a large number of samples: 15 stations located in the eastern part of the lagoon; 9 stations in the middle of the lagoon north of the Chumpan River; and 5 stations in the northwestern part of the lagoon near the El Carmen Inlet. Two other groups with fewer stations showed intermediate communities found near the Palizada River mouth (stations 6 and 8) and further east (stations 9 and 12).

2.18 Environmental drivers of the total and active prokaryote community structures

To analyze the main environmental factors controlling the spatial distribution of total (Fig. 7a) and active (Fig. 7b) prokaryote communities, we performed a canonical correspondence analysis. In both DNA- and RNA-based analyses, the cumulative percentage of variance of the species–environment relationship indicated that the first and second canonical axes explained 48 and 24 % of the total variance for DNA and 45 and 31 % for RNA, respectively. The remaining axes accounted for less than 14 % of the total variance each and thus were not considered as significant enough.

In the DNA-based CCA, the first canonical axis was positively correlated with NO_3^- and Chl and negatively correlated with the concentration of DOC, DOP, DON and oxygen. In the RNA-based CCA, the first canonical axis was positively correlated with NO_3^- and PAHs and negatively correlated with the concentration of POC, PON, oxygen, salinity, PO_4 , and Chl. The concomitant effect of those parameters explained 27 and 40 % (ratio between the sum of all canonical eigenvalues and the sum of all eigenvalues) of the changes in bacterial community structure found in the DNA- and RNA-based fractions, respectively (Fig. 7).

3 Discussion

3.1 Biogeochemical characteristics of the Términos Lagoon under low river discharge conditions

With a contribution of about 76 % to the river inputs in the lagoon (Fichez et al., 2016; Jensen et al., 1989), the Palizada River delivers most of the new nitrogen input as nitrate and ammonium. High concentrations of nitrogen were also measured in the Puerto Real Inlet, suggesting a second nitrogen source from coastal seawater. These two sources have clearly different impacts on primary producer development and activity as shown by the Phaeo : Chl ratio (< 20 % in the vicinity of the Palizada River, but > 30 % near the Puerto Real Inlet) and P_m^b values (low in the Palizada area and higher near the inlet). Therefore, despite greater chlorophyll degradation (indicated by high Phaeo concentrations), phytoplanktonic cells were more productive under the influence of waters from the Gulf of Mexico when compared to those under the river's influence. Specifically, there were similar nutrient, DOM, and POM concentrations for the two zones, and we measured a similar potential primary production-per-unit volume (27.5 and $30.2 \text{ mg C m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ for the Palizada River and Puerto Real Inlet, respectively). However, the chlorophyll stock was about 2-fold lower in the area of the inlet (6.3 and $3.9 \text{ mg Chl m}^{-3}$ for the Palizada River and Puerto Real Inlet, respectively). This is in apparent contradiction with what has traditionally been reported on the influence of river inputs, which generally largely enhance primary productivity

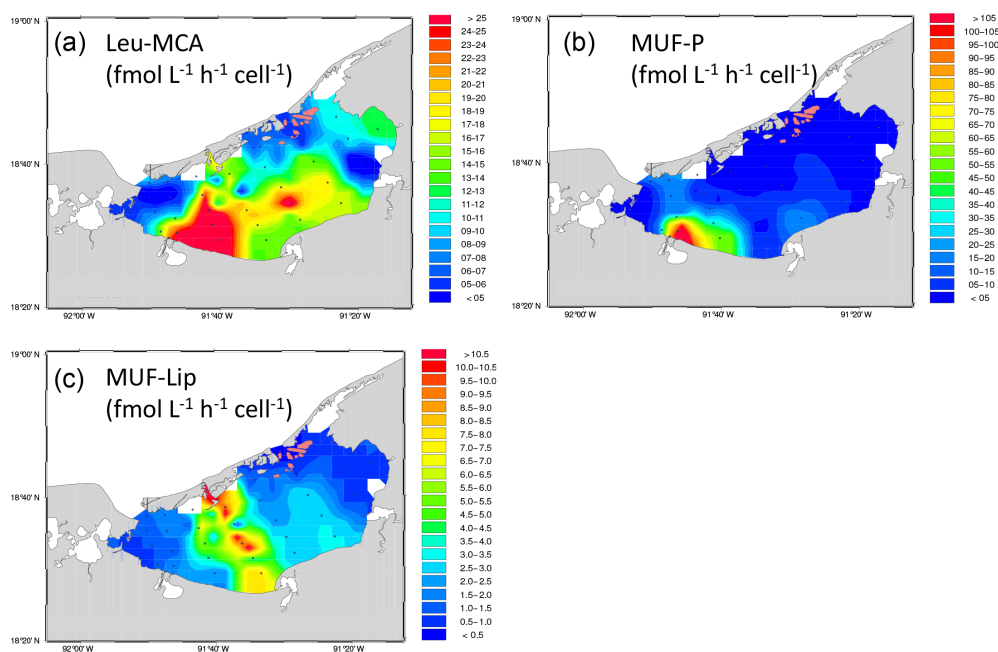


Figure 4. Same as Fig. 2 but for (a) aminopeptidase activities ($\text{fmol L}^{-1} \text{h}^{-1} \text{cell}^{-1}$); (b) phosphatase activities ($\text{fmol L}^{-1} \text{h}^{-1} \text{cell}^{-1}$); and (c) lipase activities ($\text{fmol L}^{-1} \text{h}^{-1} \text{cell}^{-1}$).

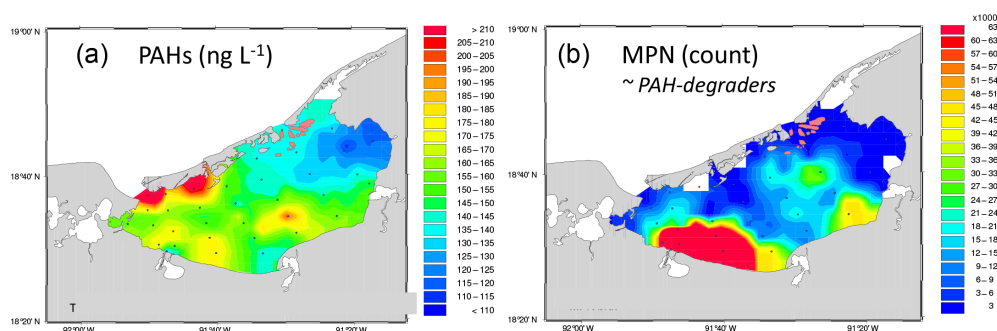


Figure 5. Same as Fig. 2 but for (a) total dissolved PAHs (ng L^{-1}); and (b) the most probable number (MPN count).

(see for example the Rhone River in the Mediterranean Sea; Pujo-Pay et al., 2006), in coastal areas. The decreasing turbidity along the estuarine-to-inlet transect is the first factor explaining the seaward offset of phytoplankton productivity. However, higher grazing activity by herbivores in the coastal waters or in the vicinity of the inlet could be an explanation to further justify the conjunction of higher Phaeo concentrations with active phytoplankton physiology (this requires further study).

Moreover, Day et al. (1982) demonstrated that small additions of filtered mangrove water had a stimulatory effect on pelagic primary production in the Términos Lagoon. This observation was later confirmed by Rivera-Monroy et al. (1998) who also evidenced a large temporal variability in the stimulating effect and a rapid inhibition due to variable humic substance concentrations. The relative decrease of productivity close to the Palizada plume could be due to humic matter, as we also found relatively high concentrations in dis-

solved PAHs (see hereafter Sect. 4.4). Finally, it is clear that bottom-up control of the system (by nutrients and/or humic substances) drove the differential responses of phytoplankton productivity in the eastern and western part of the lagoon, probably in conjunction with grazing activity (top-down control).

At the time of our study, the Palizada River and Puerto Real Inlet were major sources of nitrogen for the lagoon. Sediments are generally considered to be a significant internal source of nutrients in shallow coastal ecosystems, but they may also be a net sink of dissolved nitrogen, at least during certain times of the year (Sundbäck et al., 2000; Tyler et al., 2003). Rivera-Monroy et al. (1995a) measured nitrogen fluxes between Estero Pargo (an unpolluted tidal creek), and a fringe mangrove forest in the Términos Lagoon. They reported that mangrove sediments were a sink of NO_3 and NH_4 throughout the year. Denitrification, the dissimilatory reduction of NO_3 to produce N_2O and N_2 , was considered the main

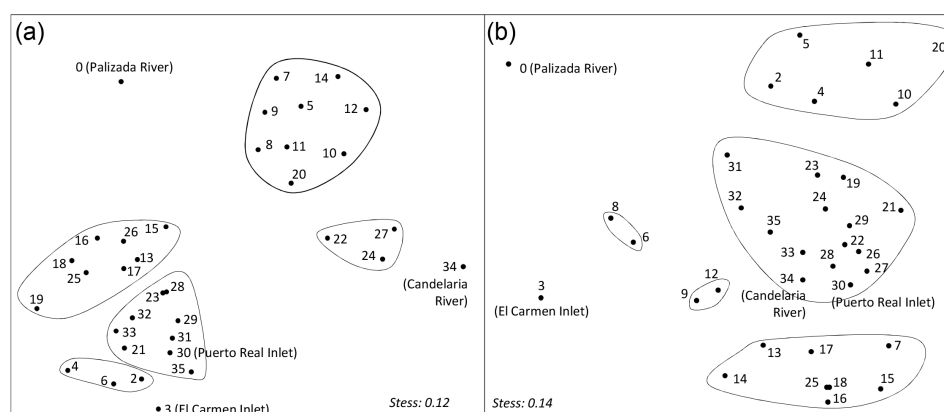


Figure 6. Non-metric multidimensional scaling (NMDS) plot of the (a) total and (b) metabolically active prokaryotic community structures as determined from CE-SSCP profiles based on the Bray–Curtis similarity index. Clusters were determined according to the SIMPROF similarity profile test ($p < 0.05$).

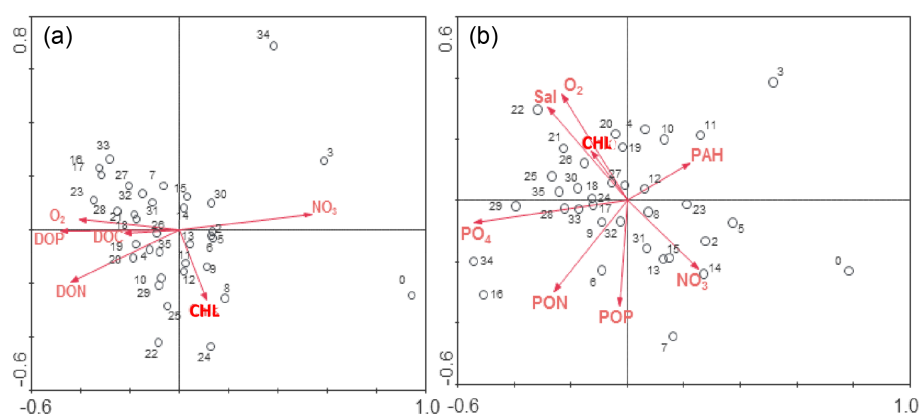


Figure 7. Canonical correspondence analysis of (a) total and (b) active bacterioplankton community structures from the 35 samples using physico-chemical parameters. Arrows point in the direction of increasing values of each variable. The length of the arrows indicates the degree of correlation with the represented axes. The position of samples relative to the arrows is interpreted by projecting the points on the arrow. This indicates the extent to which a sample prokaryotic community composition is influenced by the environmental parameter represented by that arrow. The variance explained by the environmental variables selected by the model represent 27 and 40 % of the variability at the DNA and RNA level, respectively.

process contributing to NO_3 loss. However, direct measurements of denitrification rates in the fringe and basin mangroves of the Términos Lagoon indicated a low sink of NO_3 (Rivera-Monroy et al., 1995b), contrary to what has been evidenced in other mangrove forests (i.e. Twilley, 2013). This was later confirmed by Rivera-Monroy et al. (2007), who hypothesized that most of the inorganic nitrogen was retained in the sediments and not lost via denitrification. Rivera-Monroy et al. (2007) also measured a decoupling between sources of nitrogen and phosphorus and, because P is a limiting nutrient, they assumed that the dominant source was from tidal inputs as opposed to remineralization from organic matter in the sediment. During our study, Origel Moreno (2015) found that benthic carbon mineralization consumed a large proportion (between 67 and 86 %) of the pelagic carbon production. These values are at the upper end of the range calculated for subtropical lagoons (Grenz et al., 2010; Machado and Knop-

pers, 1988) and indicate high biological activity in the sediments. Additionally, Origel Moreno (2015) estimated that 50 to 95 % of nitrogen was mineralized in the sediment through various N-consuming processes and that nitrogen was more efficiently mineralized than phosphorus.

Our large-scale study considering the whole lagoon provides some information about the potential origin of phosphorus in the water column. It is clear from our measurements that the phosphate distribution in the lagoon is disconnected from nitrogen. This impacts the stoichiometry of particulate organic matter (N : P ratio) through the whole lagoon, as shown by the surprisingly and relatively low values of the PON : PP ratio (< 13) at all stations (indicating a particulate nitrogen deficit), with the exception of those located in the southwest part of the lagoon where a canonical Redfield ratio of 16 was measured (Fig. 8). To sustain their growth requirement, primary producers have the ability

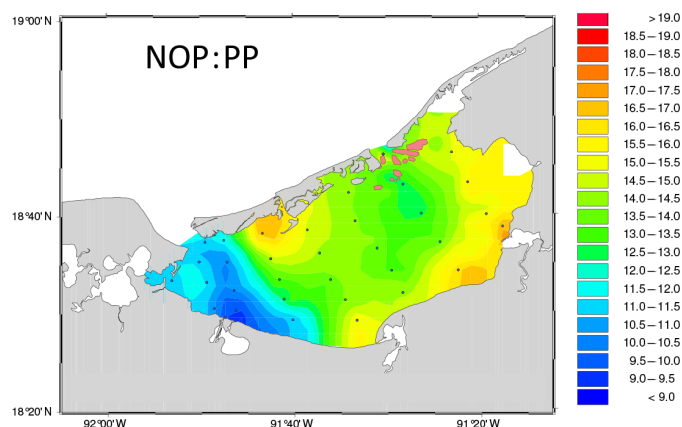


Figure 8. Same as Fig. 2 but for the NOP : PP ratio.

to decouple their consumption of phosphorus and nitrogen with respect to a variable metabolic plasticity (Conan et al., 2007). In comparison to the two previously discussed main sources of NO_3 and NH_4 (Palizada River and Puerto Real Inlet) located in the western and northern part of the lagoon, we identified two distinct main sources of PO_4 in the Términos Lagoon during the sampled period: (i) river inputs from the Candelaria and Chumpan rivers in the south part, even though their contribution to the overall river discharge is low; and (ii) mineralization of organic phosphorus (PP and DOP) by prokaryote activity (coherent with ectoenzymatic activities; see hereafter Sect. 4.2). Note that the major source of PP in the lagoon was the Palizada River whereas accumulation of DOP was measured between the Palizada and Chumpan rivers in the southwest of the lagoon. In this area, distribution of dissolved oxygen was minimal compared to the rest of the lagoon, which is consistent with high rates of organic matter mineralization in the water column. Finally, during our study, the dominant source of PO_4 was not tidal flooding as hypothesized by Rivera-Monroy et al. (2007), but rather the mineralization of organic matter by free-living prokaryotes in the water column. If this conclusion appears valid in the context of weak river discharges, further studies will be necessary to test its potential extension to other environmental conditions (rainy periods, river flooding, and tidal amplitude).

3.2 Relationship between biogeochemical conditions and prokaryotic activities

Our analysis of biogeochemical trends in the Términos Lagoon has been combined with the study of the spatial distribution of prokaryotic extracellular activity. Bacterial aminopeptidase and lipase extracellular activities play a key role in the transformation of biopolymers into small monomers, since a large part of organic matter is in the form of large molecules whereas small molecules (< 600 Da) are only directly assimilable by bacteria (Weiss et al., 1991). The expression of aminopeptidase activity indicates the absence of direct bacterial assimilation of dissolved organic matter

and their ability to actively release enzymes outside the cells (Van Wambeke et al., 2009). Moderate but significant negative correlations were found between aminopeptidase activity per cell and DOC concentration in the Términos Lagoon ($\rho = 0.27$, $n = 35$, $p < 0.01$). Higher DOC concentrations associated with lower aminopeptidase activity suggest a higher amount of labile organic matter for bacteria. The high aminopeptidase activity in the Palizada River plume confirmed the presence of recalcitrant organic matter from terrestrial origin, as opposed to minimum activities in Puerto Real marine waters or in the Candelaria River mouth, where DOC concentrations were maximal. Lipase activities showed different trends, with higher activities found in the middle of the lagoon north of the Chumpan River. We previously published results indicating that ambient quantity and quality of hydrolyzable acyl lipids clearly couple with the measurement of their in situ hydrolysis rates (Bourguet et al., 2009). The differences between the spatial distributions of ectoenzymatic aminopeptidase and lipase activities suggest that organic matter from a different composition resided in the central zone of the Términos Lagoon, a result in strong agreement with a recent study on hydrodynamics that identified a large circulation cell in the same central area (Contreras Ruiz et al., 2014). Unfortunately, the contribution of the protein or lipid pool to the total organic matter was not measured at the time of the study, which may have strengthened our hypothesis concerning the role of the composition of organic matter in the spatial distribution of extracellular enzyme activities. This lack of information may explain the very low or absent correlation found between extracellular activities and measured biogeochemical parameters.

Phosphatase activity is well known to be controlled by the availability of soluble reactive phosphorus (Van Wambeke et al., 2009). This activity was essentially observed in the vicinity of the Palizada River, which is the main source of PP in the lagoon. However, in the Puerto Real Inlet, which includes the two PO_4 -depleted zones which indirectly influence the stoichiometry of particulate organic matter as discussed above (Fig. 8). Thus, a zone with clear phosphatase activity but which is P-depleted indicates a very low P availability for phytoplanktonic growth. This is consistent with the low phytoplankton productivity observed, indicating weak C fixation rates in the Palizada River mouth which strengthens our bottom-up control hypothesis. Extracellular phosphatase activity was significantly ($p < 0.05$, $n = 35$) negatively correlated with PO_4 ($\rho = -0.46$) and positively correlated with PP ($\rho = 0.60$). Our data therefore converge with the model previously proposed by Robadue et al. (2004) which predicted a different behavior between the eastern and western sides of the lagoon in terms of both water budget and ecosystem functioning. This distinction is mostly driven by the respective influences of the Palizada River discharge in the west and the Puerto Real marine water inputs in the northeast.

3.3 Prokaryotic community structure and ectoenzyme activities

Molecular fingerprinting (such as CE-SSCP) and next-generation sequencing technologies generally yield converging results (Ghiglione et al., 2005; Ghiglione and Murray, 2012; Ortega-Retuerta et al., 2012; Sauret et al., 2015), evidencing clear shifts in bacterial community structure as a function of changes in biogeochemical characteristics (Ghiglione et al., 2005). Numerous factors can regulate microorganism population dynamics, often simultaneously, and the literature contains evidence (Berdjeb et al., 2011; Fuhrman et al., 2013; Ghiglione et al., 2008) underlining the importance of relevant statistical analyses to investigate the relative importance of environmental factors in predicting bacterial community dynamics. It is generally recognized that the expression of ectoenzyme activities could result from species selection and population dynamics (Martinez et al., 1996), and the zonation of prokaryotic community structure in the eastern, middle, and western parts of the lagoon agree with such a paradigm. The community composition in the eastern part could be divided into two sub-clusters corresponding to the respective influences of the Palizada River mouth and El Carmen Inlet. Both DNA- and RNA-based fingerprinting show that the Palizada River and El Carmen Inlet hosted distinct prokaryotic communities, as previously observed in transition zones such as rivers (Ortega-Retuerta et al., 2012) or lagoon mouths (Rappé et al., 2000). The relationship between community composition and ectoenzyme activities was particularly evident when the lipase and aminopeptidase rates were considered. Lipase activity was magnified in the middle of the lagoon, with a south to north increasing gradient from the Chumpan River to Carmen Island that coincided with specific communities (cluster II in both DNA- and RNA-based fingerprinting). Other communities were found in the western part under the influence of the Palizada River where higher aminopeptidase activity was measured.

The combination of DNA and RNA strengthens our observations as DNA-based analysis alone would have failed to distinguish between active, dormant, senescent, or dead cells and would thus prevent the assessment of the level of activity of each detected bacterial population (Rodríguez-Blanco et al., 2010). Even though the abundance of bacteria in the sea is high, only a small fraction is considered to be metabolically active (Del Giorgio and Bouvier, 2002). Bacterial growth rate has been shown to correlate with cellular rRNA content (Kemp et al., 1993); therefore, information on cellular activity may be obtained by tracking reverse-transcribed 16S rRNA (Lami et al., 2009). In the present study, we focused on the free-living prokaryotes and disregarded the particle-attached fraction by pre-filtering the water by 3 µm. This allowed us to eliminate the problem of DNA eukaryotic chloroplasts which may have biased our results in the context of the gradients of productive zones. The combination

of DNA and RNA results in the Términos Lagoon showed similar trends, with total and active communities presenting a strong zonation between the eastern, middle, and western parts of the lagoon in addition to the smaller transition zones located around major sources of coastal (El Carmen Inlet) and river inputs (Palizada and Candelaria). Here, the combination of DNA and RNA showed similar tendencies within the total and active communities presenting the eastern, middle, and western distribution across the lagoon. These results indicate that most of the free-living bacterial communities detected by molecular fingerprinting (DNA-based) were active (RNA-based) within the lagoon, with the exception of the local transition zones between the lagoon waters in the coastal (El Carmen Inlet) or river areas (Palizada and Candelaria).

3.4 Biogeochemical parameters and PAHs drive the prokaryotic community structure

Through the use of direct gradient multivariate ordination analyses, we demonstrate that a complex array of biogeochemical parameters was the driving force behind prokaryotic community structure shifts in the Términos Lagoon. Physico-chemical parameters such as nitrate, oxygen, dissolved organic matter (DOC, DON, DOP), and chlorophyll *a* acted in synergy to explain bacterial assemblage changes in rDNA level. Some differences were observed to explain the geographical patterns of the metabolically active bacterial communities (rRNA level). Indeed, salinity, particulate organic matter (PON, PP), and phosphate were needed in addition to the nitrate, oxygen, and Chl parameters already outlined in the rDNA level. The variance explained by the environmental variables selected by the statistical model represented 27 and 40 % of the variability at the DNA and RNA level, respectively. Further studies are therefore needed to elucidate the unexplained variance of the model due to other parameters not taken into account in our study, such as the ecological relationships between bacterial communities themselves or top-down control by predation and viral lysis (Ghiglione et al., 2016).

The concentration of dissolved total PAHs was also a significant explanatory variable of the metabolically active bacterial community structure. PAHs are considered the most toxic component of crude oil to marine life and are ubiquitous pollutants in the coastal environment (Kennish, 1992). Our study was performed just before the 2010 Deepwater Horizon blowout in the Gulf of Mexico, but several offshore oil platforms exist in the shallow waters of the Campeche Bank in the southern part of the Gulf of Mexico, for example in the Campeche field (Cheek-1) which is only 60 km north of the Términos Lagoon (Warr et al., 2013). The coast of Campeche itself was also impacted by the 1979 *Ixtoc I* platform oil spill, roughly 100 km northwest of the Términos Lagoon (Warr et al., 2013). PAH concentrations in the Términos Lagoon indicated an input into the lagoon from the El Car-

men Inlet (maximal concentration of 332 ng L^{-1}) that mostly impacted the eastern part, with concentration $< 130 \text{ ng L}^{-1}$ in the rest of the lagoon. We observed a high enrichment of PAH degraders in the southeastern part of the lagoon, with a low but significant correlation with PAH concentrations ($\rho = 0.37$, $p < 0.05$, $n = 35$). This enrichment was particularly high (estimated at $4.6 \times 10^4 \text{ cell mL}^{-1}$ and equivalent to 4.4 % of the free-living prokaryotes abundance) in the Palizada River mouth. Nitrogen fertilization from allochthonous inputs from the Palizada River may be crucial for PAH degradation potential in the Términos Lagoon. Indeed, it is well accepted that bacterial degradation of hydrocarbons (carbon source for bacteria) is dependent on nutrients to re-equilibrate the C:N:P ratio (Sauret et al., 2015, 2016). Some halotolerant bacteria such as *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* sp. 17 (Grimaud et al., 2012) may have the capability to degrade PAHs and survive in rivers, lagoons, and seawater. Further studies using PAH-stable isotopes coupled with pyrosequencing (Dombrowski et al., 2016; Sauret et al., 2016) are necessary to identify the dynamics of these functional communities in the Términos Lagoon. Using similar approaches, previous reports have shown that the pollutant content and PAHs, in particular, were responsible for the bacterial community structure dynamic in the sediment of the Bizerte Lagoon, Tunisia (Ben Said et al., 2010). Such a massive impact of pollutants was not observed here, possibly because of the difference in the degree of pollution between the two areas (moderately contaminated in the Términos Lagoon versus highly contaminated in Bizerte). The metabolically active bacterial community structure in the Términos Lagoon was significantly impacted by PAH pollution, even though it did not exceed the effect of other environmental parameters and their specificity at each geographical location.

4 Conclusions

This study provides a new original set of biogeochemical characteristics for one of the largest shallow tropical coastal lagoons. Due to the 2009–2010 El Niño Modoki episode, climatic conditions in the Términos Lagoon region were exceptionally dry at the time of our sampling, hence potentially indicative of future environmental conditions resulting from the predicted trends in climate change in the Central American region. We evidenced a clear distinction in ecosystem functioning between the eastern and western parts of the lagoon. Most of the oceanic water entering through the inlets spread toward the southeast where dissolved organic matter accumulated. This area did not support significant phytoplankton development. In the west, we hypothesized a balance shift between top-down and bottom-up control to explain the different responses in terms of phytoplankton productivity. The decoupling between nitrogen inputs brought by oceanic waters, the Palizada River, and phosphate inputs from the Chumpan River did not allow for phytoplank-

ton C fixation. Most of the phytoplankton biomass was aggregated around the Palizada River mouth (which carried most of the freshwater into the lagoon) in a P-depleted area (low phosphate concentration and high bacterial phosphatase activity). Bacterial ectoenzyme activities were mainly observed in the middle of the lagoon along a south to north cross section stretching from the Chumpan River up to Carmen Island. Maximum mineralization activities were found in this area, which coincided with high extracellular lipase and aminopeptidase activities and low DOC and O_2 concentrations. The lagoon produced significant quantities of particulate and dissolved organic matter thanks to the (i) nutrient inputs from the rivers, (ii) uncoupling between nitrogen and phosphate, and (iii) the prokaryotic activities. However, in the end, most of this autochthonous matter was internally processed or stored and only a little was exported to the Gulf of Mexico's coastal waters. Therefore, during our study, the water column of the Términos Lagoon functioned globally as a kind of nitrogen assimilator. The highest PAH concentrations were measured in the El Carmen Inlet, suggesting anthropogenic pollution in this zone which is probably related to the oil-platform exploitation activities in the shallow waters to the south of the Gulf of Mexico and, more locally, to the efflux from the El Carmen harbor which serves as a logistical support to the oil extraction industry. We also evidenced the importance of nitrogen fertilization from the Palizada River, which seems to support an abundant prokaryotic community of PAH degraders.

Another significant outcome of our study has been to (i) link the spatial distribution of ectoenzymatic activities with changes in prokaryotic community structure and (ii) show that a combination of a complex set of physical and biogeochemical parameters was necessary to explain the changes in prokaryotic community structure. This study also emphasizes the use of direct multivariate statistical analyses to keep the influence of pollutants in perspective without denying the role of other physico-chemical variables to explain the dynamics of prokaryotic community structure in polluted areas.

Our study provides an extensive dataset efficiently mixing biogeochemical status with information on phytoplankton and prokaryotic structure and dynamics. This has never before been measured in the Términos Lagoon and the outcome offers a strong base of information and reflection for future studies on this essential coastal system and into the potential environmental conditions which might prevail as a consequence of future climate change. Further studies are needed to compare our dataset with high river input regime conditions and assess both how this might affect the observed uncoupling between nitrogen and phosphate and the dominant source of phosphorus and its consequences on primary production and prokaryotic activities. Finally, the role of top-down control should also be investigated in order to better understand the variability of the observed responses.

Data availability. Data for this paper are now referenced in doi:10.13140/RG.2.2.18609.99680.

Competing interests. The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgements. The present work was conducted within the frame of the Joint Environmental Study of the Términos Lagoon (JEST) and jointly financed by the French National Program EC2CO-DRIL, the Institut de Recherche pour le Développement (IRD), the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the University of “Université de Lille-I”, and the Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa (UAM-I). The authors are extremely grateful to the Instituto de Ciencias del Mar y Limnología and the Universidad Nacional Autónoma de México (ICML-UNAM) for providing full access to their field station in Ciudad del Carmen. We also acknowledge P. A. and M. V. Ghigli for carefully proofreading. Thanks also to Julia, Joan, and Vivien for their support. M. Origel-Moreno was financially supported by Bonafont S. A De .C.V. and CONACyT during her PhD work.

Edited by: C. Woulds

Reviewed by: two anonymous referees

References

- Abreu, P. C., Biddanda, B. B., and Odebrecht, C.: Bacterial dynamics of the Patos Lagoon estuary, southern Brazil (32° S, 52° W): Relationship with phytoplankton production and suspended material, *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 35, 621–635, 1992.
- Aguayo, P., Gonzalez, C., Barra, R., Becerra, J., and Martinez, M.: Herbicides induce change in metabolic and genetic diversity of bacterial community from a cold oligotrophic lake, *World J. Microb. Biot.*, 30, 1101–1110, 2014.
- Alexander, M.: Most probable number method for microbial populations, in: *Methods of Soil Analysis*, edited by: Page, A. L., Miller, R. H., and Keeney, D. R., American Society of Agronomy, Madison, WI, 815–820, 1982.
- Amado, A. M., Meirelles-Pereira, F., Vidal, L. O., Sarmiento, H., Suhett, A. L., Farjalla, V. F., Cotner, J. B., and Roland, F.: Tropical freshwater ecosystems have lower bacterial growth efficiency than temperate ones, *Front Microbiol.*, 4, doi:10.3389/fmicb.2013.00167, 2013.
- Aminot, A. and Kérouel, R.: Dosage automatique des nutriments dans les eaux marines. Méthodes en flux continu, Ed Ifremer-Quae, 2007.
- Arnosti, C. and Steen, A. D.: Patterns of extracellular enzyme activities and microbial metabolism in an Arctic fjord of Svalbard and in the northern Gulf of Mexico: contrasts in carbon processing by pelagic microbial communities, *Frontiers in Microbiology*, 4, doi:10.3389/fmicb.2013.00318, 2013.
- Arnosti, C., Steen, A. D., Ziervogel, K., Ghobrial, S., and Jeffrey, W. H.: Latitudinal Gradients in Degradation of Marine Dissolved Organic Carbon, *PLoS ONE*, 6, e28900, doi:10.1371/journal.pone.0028900, 2011.
- Ben Said, O., Goni-Urriza, M., El Bour, M., Aissa, P., and Duran, R.: Bacterial community structure of sediments of the bizerte lagoon (Tunisia), a southern Mediterranean coastal anthropized lagoon, *Microb. Ecol.*, 59, 445–456, 2010.
- Berdjeb, L., Ghiglione, J. F., Domaizon, I., and Jacquet, S.: A 2-Year Assessment of the Main Environmental Factors Driving the Free-Living Bacterial Community Structure in Lake Bourget (France), *Microb. Ecol.*, 61, 941–954, 2011.
- Bourguet, N., Goutx, M., Ghiglione, J.-F., Pujo-Pay, M., Mével, G., Momzikoff, A., Mousseau, L., Guigue, C., Garcia, N., Raimbault, P., Pete, R., Oriol, L., and Lefèvre, D.: Lipid biomarkers and bacterial lipase activities as indicators of organic matter and bacterial dynamics in contrasted regimes at the DYFAMED site, NW Mediterranean, *Deep Sea Res. Pt. II*, 56, 1454–1469, 2009.
- Brosius, J., Dull, T. J., Sleeter, D. D., and Noller, H. F.: Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*, *J. Mol. Biol.*, 148, 107–127, 1981.
- Cauwet, G.: Determination of dissolved organic carbon (DOC) and nitrogen (DON) by high temperature combustion, in: *Methods of seawater analysis*, edited by: Grashoff, K., Kremling, K., and Ehrhard, M., 1999.
- Cincinelli, A., Stortini, A. M., Perugini, M., Checchini, L., and Lepri, L.: Organic pollutants in sea-surface microlayer and aerosol in the coastal environment of Leghorn – (Tyrrhenian Sea), *Mar. Chem.*, 76, 77–98, 2001.
- Cole, J. J., Findlay, S., and Pace, M. L.: Bacterial production in fresh and saltwater ecosystems: a cross-system overview, *Marine ecology progress series*, Oldendorf, 43, 1–10, 1988.
- Conan, P., Turley, C. M., Stutt, E., Pujo-Pay, M., and Van Wambeke, F.: Relationship between Phytoplankton Efficiency and the Proportion of Bacterial Production to Primary Production in the Mediterranean Sea, *Aquat. Microb. Ecol.*, 17, 131–144, 1999.
- Conan, P., Søndergaard, M., Kragh, T., Thingstad, F., Pujo-Pay, M., Williams, P. J. B., Markager, S., Cauwet, G., Borch, N. H., Evans, D., and Riemann, B.: Partitioning of organic production in marine plankton communities: The effects of inorganic nutrient ratios and community composition on new dissolved organic matter, *Limnol. Oceanogr.*, 52, 753–765, 2007.
- Contreras Ruiz Esparza, A., Douillet, P., and Zavala-Hidalgo, J.: Tidal dynamics of the Terminos Lagoon, Mexico: observations and 3D numerical modelling, *Ocean Dynam.*, 64, 1349–1371, 2014.
- David, L. T.: Laguna de Términos, Campeche, Netherlands Institute for Sea Research, Texel, NL, 9–15, 1999.
- David, L. T. and Kjerfve, B.: Tides and currents in a two-inlet coastal lagoon: Laguna de Términos, México, *Cont. Shelf Res.*, 18, 1057–1079, 1998.
- Day, J. W. J., Day, R. H., Barreiro, M. T., Ley-Lou, F., and Madden, C. J.: Primary production in the Laguna de Terminos, a tropical estuary in the southern Gulf of Mexico, *Oceanol. Acta*, 5, 269–276, 1982.
- Del Giorgio, P. A. and Bouvier, T. C.: Linking the physiologic and phylogenetic successions in free-living bacterial communities along an estuarine salinity gradient, *Limnol. Oceanogr.*, 47, 471–486, 2002.
- Dombrowski, N., Donaho, J. A., Gutierrez, T., Seitz, K. W., Teske, A. P., and Baker, B. J.: Reconstructing metabolic pathways of hydrocarbon-degrading bacteria from the Deep-

- water Horizon oil spill, *Nature Microbiology*, 1, 16057, doi:10.1038/nmicrobiol.2016.57, 2016.
- Ferguson, R. L., Buckley, E., and Palumbo, A.: Response of marine bacterioplankton to differential filtration and confinement, *Appl. Environ. Microb.*, 47, 49–55, 1984.
- Fichez, R., Archundia, D., Grenz, C., Douillet, P., Gutiérrez Mendieta, F., Origel Moreno, M., Denis, L., Contreras Ruiz Esparza, A., and Zavala-Hidalgo, J.: Global climate change and local watershed management as potential drivers of salinity variation in a tropical coastal lagoon (Laguna de Terminos, Mexico), *Aquat. Sci.*, doi:10.1007/s00027-016-0492-1, in press, 2017.
- Fitzwater, S. E., Knauer, G. A., and Martin, J.-M.: Metal contamination and its effect on primary production measurements, *Limnol. Oceanogr.*, 27, 544–551, 1982.
- Fuhrman, J., Follows, M., and Forde, S.: Applying “-omics” Data in Marine Microbial Oceanography, *Eos, Transactions American Geophysical Union*, 94, 241–241, 2013.
- García-Ríos, V., Alpuche-Gual, L., Herrera-Silveira, J., Montero-Muñoz, J., Morales-Ojeda, S., Pech, D., Cepeda-González, M. F., Zapata-Pérez, O., and Gold-Bouchot, G.: Towards a coastal condition assessment and monitoring of the Gulf of Mexico Large Marine Ecosystem (GoM LME): Terminos Lagoon pilot site, *Environmental Development*, 7, 72–79, 2013.
- Ghiglione, J. F. and Murray, A. E.: Pronounced summer to winter differences and higher wintertime richness in coastal Antarctic marine bacterioplankton, *Environ. Microbiol.*, 14, 617–629, 2012.
- Ghiglione, J.-F., Philippot, L., Normand, P., Lensi, R., and Potier, P.: Disruption of *narG*, the gene encoding the catalytic subunit of respiratory nitrate reductase, also affects nitrite respiration in *Pseudomonas fluorescens* YT101, *J. Bacteriol.*, 181, 5099–5102, 1999.
- Ghiglione, J.-F., Larcher, M., and Lebaron, P.: Spatial and temporal scales of variation in bacterioplankton community structure in the NW Mediterranean Sea, *Aquat. Microb. Ecol.*, 40, 229–240, 2005.
- Ghiglione, J. F., Palacios, C., Marty, J. C., Mével, G., Labrune, C., Conan, P., Pujo-Pay, M., Garcia, N., and Goutx, M.: Role of environmental factors for the vertical distribution (0–1000 m) of marine bacterial communities in the NW Mediterranean Sea, *Biogeosciences*, 5, 1751–1764, doi:10.5194/bg-5-1751-2008, 2008.
- Ghiglione, J.-F., Martin-Laurent, F., and Pesce, S.: Microbial ecotoxicology: an emerging discipline facing contemporary environmental threats, *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 23, 3981–3983, 2016.
- González-Gaya, B., Fernandez-Pinos, M.-C., Morales, L., Mejanelle, L., Abad, E., Pina, B., Duarte, C. M., Jimenez, B., and Dachs, J.: High atmosphere-ocean exchange of semivolatile aromatic hydrocarbons, *Nat. Geosci.*, 9, 438–442, 2016.
- Grenz, C., Denis, L., Pringault, O., and Fichez, R.: Spatial and seasonal variability of sediment oxygen consumption and nutrient fluxes at the sediment water interface in a sub-tropical lagoon (New Caledonia), *Mar. Pollut. Bull.*, 61, 399–412, 2010.
- Grimaud, R., Ghiglione, J.-F., Cagnon, C., Lauga, B., Vaysse, P.-J., Rodriguez-Blanco, A., Mangenot, S., Cruveiller, S., Barbe, V., Duran, R., Wu, L.-F., Talla, E., Bonin, P., and Michotey, V.: Genome Sequence of the Marine Bacterium *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SP17, Which Forms Biofilms on Hydrophobic Organic Compounds, *J. Bacteriol.*, 194, 3539–3540, 2012.
- Gullian-Klanian, M., Herrera-Silveira, J. A., Rodríguez-Canul, R., and Aguirre-Macedo, L.: Factors associated with the prevalence of *Perkinsus marinus* in *Crassostrea virginica* from the southern Gulf of Mexico, *Dis. Aquat. Organ.*, 79, 237–247, 2008.
- Gutierrez, T., Rhodes, G., Mishamandani, S., Berry, D., Whitman, W. B., Nichols, P. D., Semple, K. T., and Aitken, M. D.: Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation of phytoplankton-associated *Arenibacter* spp. and description of *Arenibacter algicola* sp. nov., an aromatic hydrocarbon-degrading bacterium, *Appl. Environ. Microb.*, 80, 618–628, 2014.
- Hauenstein, E. and Ramírez, C.: The influence of salinity on the distribution of *Egeria densa* in the Valdivian river basin Chile, *Arch. Hydrobiol.*, 1074, 511–519, 1986.
- Head, I. M., Jones, D. M., and Roling, W. F.: Marine microorganisms make a meal of oil, *Nature reviews, Microbiology*, 4, 173–182, 2006.
- Hobbie, J. E.: A comparison of the ecology of planktonic bacteria in fresh and salt water, *Limnol. Oceanogr.*, 33, 750–764, 1988.
- Holmes, R. M., Aminot, A., Kérouel, R., Hooker, B. A., and Peterson, B. J.: A simple and precise method for measuring ammonium in marine and freshwater ecosystems, *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 56, 1801–1808, 1999.
- Hoppe, H. G., Arnosti, C., and Herndl, G. J.: Ecological significance of bacterial enzymes in the marine environment, in: *Enzymes in the Environment: Activity, Ecology, and Applications*, edited by: Burns, R. G. and Dick, R. P., Taylor & Francis, Marcel Dekker: New York, NY, USA, 2002.
- Hsieh, W.-C., Chen, C.-C., Shiah, F.-K., Hung, J.-J., Chiang, K.-P., Meng, P.-J., and Fan, K.-S.: Community Metabolism in a Tropical Lagoon: Carbon Cycling and Autotrophic Ecosystem Induced by a Natural Nutrient Pulse, *Environ. Eng. Sci.*, 29, 776–782, 2012.
- Jassby, A. D. and Platt, T.: Mathematical formulation of the relationship between photosynthesis and light for phytoplankton, *Limnol. Oceanogr.*, 21, 540–547, 1976.
- Jensen, J. R., Kjerfve, B., Ramsey III, E. W., Magill, K. E., Medeiros, C., and Sneed, J. E.: Remote sensing and numerical modeling of suspended sediment in Laguna de terminos, Campeche, Mexico, *Remote Sens. Environ.*, 28, 33–44, 1989.
- Jiménez, N., Viñas, M., Guiu-Aragonés, C., Bayona, J. M., Albaigés, J., and Solanas, A. M.: Polyphasic approach for assessing changes in an autochthonous marine bacterial community in the presence of Prestige fuel oil and its biodegradation potential, *Appl. Microbiol. Biot.*, 91, 823–834, 2011.
- Kemp, P. F., Lee, S., and Laroche, J.: Estimating the growth rate of slowly growing marine bacteria from RNA content, *Appl. Environ. Microb.*, 59, 2594–2601, 1993.
- Kennish, M. J.: Polynuclear aromatic hydrocarbons, *Ecology of estuaries: anthropogenic effects*, CRC Press, Boca Raton, 1992.
- Lami, R., Ghiglione, J.-F., Desdevises, Y., West, N. J., and Lebaron, P.: Annual patterns of presence and activity of marine bacteria monitored by 16S rDNA-16S rRNA fingerprints in the coastal NW Mediterranean Sea, *Aquat. Microb. Ecol.*, 54, 199–210, doi:10.3354/ame01264, 2009.
- Lizárraga-Partida, M. L., Muñoz-Rubio, J., Porras-Aguirre, J., Izquierdo-Vicuna, F. B., and Wong Chang, I.: Taxonomy and distribution of hydrocarbonoclastic bacteria from the Ixtoc-1 area, GERBAM – Deuxième Colloque International de Bactériologie marine, 633–638, 1986.

- Lizárraga-Partida, M. L., Carballo Cruz, R., Izquierdo-Vicuna, F. B., Colwell, R. R., and Chang, I. W.: Bacteriología de la Laguna de Terminos, Campeche, Mexico, *Anales del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología*, 14, 97–108, 1987.
- Lorenzen, C. J.: A method for the continuous measurement of in vivo chlorophyll concentration, *Deep Sea Res. Ocean. Abstr.*, 13, 223–227, 1966.
- MacCord, F., Azevedo, F. D. A., Esteves, F. A., and Farjalla, V. F.: Regulation of bacterioplankton density and biomass in tropical shallow coastal lagoons, *Acta Limnologica Brasiliensia*, 25, 224–234, 2013.
- Machado, E. C. and Knoppers, B. A.: Sediment oxygen consumption in an organic-rich, subtropical lagoon, Brazil, *Sci. Total Environ.*, 75, 341–349, 1988.
- Marker, A. F. H.: The use of acetone and methanol in the estimation of chlorophyll in the presence of phaeophytin, *Freshwater Biol.*, 2, 361–385, 1972.
- Martinez, J., Smith, D. C., Steward, G. F., and Azam, F.: Variability in ectohydrolytic enzyme activities of pelagic marine bacteria and its significance for substrate processing in the sea, *Aquat. Microb. Ecol.*, 10, 223–230, 1996.
- Mével, G., Vernet, M., Goutx, M., and Ghiglione, J. F.: Seasonal to hour variation scales in abundance and production of total and particle-attached bacteria in the open NW Mediterranean Sea (0–1000 m), *Biogeosciences*, 5, 1573–1586, doi:10.5194/bg-5-1573-2008, 2008.
- Milessi, A. C., Danilo, C., Laura, R.-G., Daniel, C., Javier, S., and Rodríguez-Gallego, L.: Trophic mass-balance model of a subtropical coastal lagoon, including a comparison with a stable isotope analysis of the food-web, *Ecol. Model.*, 221, 2859–2869, 2010.
- Noreña-Barroso, E., Gold-Bouchot, G., and Sericano, J. L.: Polynuclear aromatic hydrocarbons in American oysters *Crassostrea virginica* from the Terminos Lagoon, Campeche, Mexico, *Mar. Pollut. Bull.*, 38, 637–645, 1999.
- Origel Moreno, M.: Variabilité spatiale et temporelle des cycles biogéochimiques à l'interface eau-sédiment dans la lagune de Términos, Mexique, 2015, Thèse de doctorat, Institut Méditerranéen d'Océanologie, Université d'Aix-Marseille, Ecole Doctorale des Sciences de l'Environnement, 250 pp., 2015.
- Ortega-Retuerta, E., Jeffrey, W. H., Babin, M., Bélanger, S., Benner, R., Marie, D., Matsuoka, A., Raimbault, P., and Joux, F.: Carbon fluxes in the Canadian Arctic: patterns and drivers of bacterial abundance, production and respiration on the Beaufort Sea margin, *Biogeosciences*, 9, 3679–3692, doi:10.5194/bg-9-3679-2012, 2012.
- Osten-von Rendon, J., Memije, M., Ortiz, A., and Benitez, J.: Potential sources of PAHs in sediments from Terminos lagoon, Campeche, Mexico, *Toxicology Letters*, 172, Supplement, S162, 2007.
- Pedrós-Alió, C., Calderón-Paz, J. I., MacLean, M. H., Medina, G., Marrasé, C., Gasol, J. M., and Guixa-Boixereu, N.: The microbial food web along salinity gradients, *FEMS Microbiol. Ecol.*, 32, 143–155, 2000.
- Pujo-Pay, M. and Raimbault, P.: Improvement of the wet-oxydation procedure for simultaneous determination of particulate organic nitrogen and phosphorus collected on filters, *Mar. Ecol.-Prog. Ser.*, 105, 203–207, 1994.
- Pujo-Pay, M., Conan, P., and Raimbault, P.: Excretion of dissolved organic nitrogen by phytoplankton assessed by wet oxidation and N-15 tracer procedures, *Mar. Ecol.-Prog. Ser.*, 153, 99–111, 1997.
- Rappé, M. S., Vergin, K., and Giovannoni, S. J.: Phylogenetic comparisons of a coastal bacterioplankton community with its counterparts in open ocean and freshwater systems, *FEMS Microbiol. Ecol.*, 33, 219–232, 2000.
- Rivera-Monroy, V. H., Day, J. W., Twilley, R. R., Vera-Herrera, F., and Coronado-Molina, C.: Flux of nitrogen and sediment in a fringe mangrove forest in terminos lagoon, Mexico, *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 40, 139–160, 1995a.
- Rivera-Monroy, V. H., Twilley, R. R., Boustany, R. G., Day, J. W., Vera-Herrera, F., and del Carmen Ramirez, M.: Direct denitrification in mangrove sediments in Terminos Lagoon, Mexico, *Mar. Ecol.-Prog. Ser.*, 126, 97–109, 1995b.
- Rivera-Monroy, V. H., Madden, C. J., Day, J. W., Twilley, R. R., Vera-Herrera, F., and Alvarez-Guillén, H.: Seasonal coupling of a tropical mangrove forest and an estuarine water column: enhancement of aquatic primary productivity, *Hydrobiologia*, 379, 41–53, 1998.
- Rivera-Monroy, V. H., de Mutsert, K., Twilley, R. R., Castañeda-Moya, E., Romigh, M. M., Davis, I., and Stephen E.: Patterns of nutrient exchange in a riverine mangrove forest in the Shark River Estuary, Florida, USA, *Hidrobiológica*, 17, 169–178, 2007.
- Robadue, D. J., Oczkowski, A., Calderon, R., Bach, L., and Cepeda, M. F.: Characterization of the Region of the Términos Lagoon: Campeche, Mexico, University of Rhode Island, 50 pp., 2004.
- Rodríguez-Blanco, A., Antoine, V., Pelletier, E., Delille, D., and Ghiglione, J.-F.: Effects of temperature and fertilization on total vs. active bacterial communities exposed to crude and diesel oil pollution in NW Mediterranean Sea, *Environ. Pollut.*, 158, 663–673, 2010.
- Roland, F., Lobão, L. M., Vidal, L. O., Jeppesen, E., Paranhos, R., and Huszar, V. L. M.: Relationships between pelagic bacteria and phytoplankton abundances in contrasting tropical freshwaters, *Aquat. Microb. Ecol.*, 60, 261–272, 2010.
- Sauret, C., Böttjer, D., Talarmin, A., Guigue, C., Conan, P., Pujo-Pay, M., and Ghiglione, J.-F.: Top-Down Control of Diesel-Degrading Prokaryotic Communities, *Microb. Ecol.*, 70, 445–458, 2015.
- Sauret, C., Tedetti, M., Guigue, C., Dumas, C., Lami, R., Pujo-Pay, M., Conan, P., Goutx, M., and Ghiglione, J.-F.: Influence of PAHs among other coastal environmental variables on total and PAH-degrading bacterial communities, *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 23, 4242–4256, 2016.
- Scofield, V., Jacques, S. M. S., Guimaraes, J. R. D., and Farjalla, V. F.: Potential changes in bacterial metabolism associated with increased water temperature and nutrient inputs in tropical humid lagoons, *Frontiers in Microbiology*, 6, doi:10.3389/fmicb.2015.00310, 2015.
- Severin, T., Conan, P., Durrieu de Madron, X., Houpert, L., Oliver, M. J., Oriol, L., Caparros, J., Ghiglione, J. F., and Pujo-Pay, M.: Impact of open-ocean convection on nutrients, phytoplankton biomass and activity, *Deep-Sea Res. Pt. I*, 94, 62–71, 2014.
- Sundbäck, K., Miles, A., and Göransson, E.: Nitrogen fluxes, denitrification and the role of microphytobenthos in microtidal shallow-water sediments: an annual study, *Mar. Ecol.-Prog. Ser.*, 200, 59–76, 2000.

- Tedetti, M., Guigue, C., and Goutx, M.: Utilization of a submersible UV fluorometer for monitoring anthropogenic inputs in the Mediterranean coastal waters, *Mar. Pollut. Bull.*, 60, 350–362, 2010.
- They, N. H., Ferreira, L. M. H., Marins, L. F., and Abreu, P. C.: Stability of Bacterial Composition and Activity in Different Salinity Waters in the Dynamic Patos Lagoon Estuary: Evidence from a Lagrangian-Like Approach, *Microb. Ecol.*, 66, 551–562, 2013.
- Twilley, R. R.: Coupling of Mangroves to the Productivity of Estuarine and Coastal Waters, in: *Coastal-Offshore Ecosystem Interactions*, Springer-Verlag, 2013.
- Tyler, A. C., McGlathery, K. J., and Anderson, I. C.: Benthic algae control sediment – water column fluxes of organic and inorganic nitrogen compounds in a temperate lagoon, *Limnol. Oceanogr.*, 48, 2125–2137, 2003.
- Van Wambeke, F., Ghiglione, J.-F., Nedoma, J., Mével, G., and Raimbault, P.: Bottom up effects on bacterioplankton growth and composition during summer-autumn transition in the open NW Mediterranean Sea, *Biogeosciences*, 6, 705–720, doi:10.5194/bg-6-705-2009, 2009.
- Warr, L. N., Friese, A., Schwarz, F., Schauer, F., Portier, R. J., Basirico, L. M., and Olson, G. M.: Bioremediating Oil Spills in Nutrient Poor Ocean Waters Using Fertilized Clay Mineral Flakes: Some Experimental Constraints, *Biotechnology Research International*, 9, doi:10.1155/2013/704806, 2013.
- Weiss, M., Abele, U., Weckesser, J., Welte, W., Schiltz, E., and Schulz, G.: Molecular architecture and electrostatic properties of a bacterial porin, *Science*, 254, 1627–1630, 1991.
- Zimmerman, A. E., Martiny, A. C., and Allison, S. D.: Microdiversity of extracellular enzyme genes among sequenced prokaryotic genomes, *ISME J.*, 7, 1187–1199, 2013.

ANNEXE 3 : POSTER AFEM (2015)

Microbial biofilms on marine plastic debris

Claire Dussud¹, Pascal Conan¹, Mireille Pujo-Pay¹, Olivier Crispi¹, Jacques Lemaire², Dominique Fromageot², Maria-Luiza Pedrotti³, Jean-François Ghiglione¹

¹: Laboratoire d'Océanographie Microbienne (LOMIC) - CNRS : UMR7621, Université Pierre et Marie Curie (UPMC) - Paris VI Observatoire Océanologique, Banyuls/mer - France.

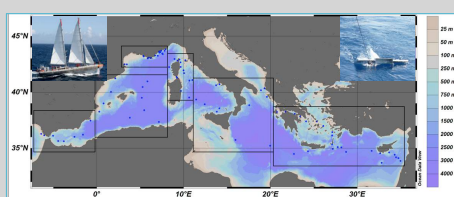
²: Centre National d'Evaluation de Photoprotection (CNEP) - Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II Ensemble Universitaire des Cèzeaux 24 avenue des Landais - B.P. 30234 63174 Aubière Cedex - France.

³: Laboratoire d'Océanographie de Villefranche (LOV) - INSU, CNRS : UMR7093, Université Pierre et Marie Curie (UPMC) - Paris VI Observatoire Océanologique Station zoologique 181, chemin du lazaret BP 28 06230 VILLEFRANCHE SUR MER Cedex - France

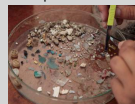
Plastic debris have become the most common form of marine debris and present a major and growing global pollution concern. In marine waters, plastic fragments are rapidly colonized by microorganisms (Shah *et al.* 2008). They form a biofilm characterized by a very diverse community, called "plastisphere" (Zettler *et al.* 2013).

Most of our samples were collected during the "TARA-Mediterranean" expedition. We demonstrated that 100% of the Mediterranean Sea is contaminated by micro-plastics (<5mm size) with a total weight of up to 6,000 tons (to be compared to the estimated 12,000 tons in the "great Pacific garbage patch" (Eriksen *et al.* 2014)). Micro-plastic concerns are possible accumulation in the trophic chain, including the contaminants attached at the surface or included in the plastic composition.

Our researches focus on the characterization of the biofilm formed on marine plastic litters. We evaluate the abundance, activity and diversity of the microorganisms using a wide range of techniques. Beyond the vast diversity found in the biofilm, focus is also made on pathogens which may be spread by plastic dispersal along oceanic currents.



Map of Tara Mediterranean coastal and offshore sampling during the 7 months expedition.



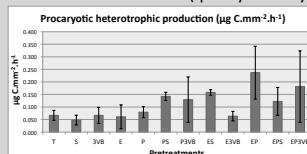
Biofilm characterization

➤ Samples : plastics and seawater (free-living vs. particle-attached)

- TARA-Mediterranean (more of 300 sampling stations)
- Other samples from the Gulf of Lion marine national park

➤ Techniques :

- Abundance : microscopy (DAPI, MEB), flow cytometry
- Activity : prokaryotic heterotrophic production, ectoenzymatic activity, respiration
- Diversity : DNA and RNA extraction, metagenomics.
- Plastic characterization (quality and oxydation state) by micro-FTIR



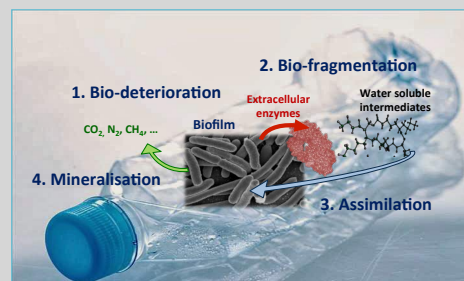
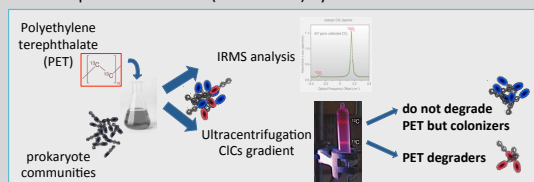
Example of tests used for the detachment of the biofilm
(T: control, S: sonication, 3VB: 3 cycles of vortex+ultrasonic bath, E: enzymatic mix, P: tetrasodium pyrophosphate) for activity measurements.

Objective 2

Demonstration of biodegradation

Use of stable isotope probing :

- to prove the prokaryotic assimilation of plastic molecules by micro-FTIR.
- to identify the community of plastic-degraders (¹³C fraction) and distinguish from the plastic-colonizers (¹²C fraction) by DNA-SIP.



The different steps of biodegradation (Dussud and Ghiglione 2015)



Scanning electron microscopy of biofilm and kaldnes found in a Tara's sample

Dispersal of pathogens

The hypothesis of pathogen dispersal by plastic debris has never been accurately proven. Here we focus on small plastic wheels called "kaldnes", which are used in wastewater treatments to provide the maximum active surface area for the bacteria to colonize. This process has been proved to remove harmful ammonia and nitrite from the water. Overflow of treatment basin may lead to release of kaldnes coated with biofilm and pathogens in marine waters, but their fate is unknown.

- MiSeq and Hiseq pyrosequencing and qPCR are used to target pathogens from sewage treatment plant to marine waters.

This project will give new insights on the biofilm of microorganisms (including pathogens) growing on plastic litters. This study will also provide the first direct demonstration of plastic biodegradation by prokaryotes *in situ*, including original informations about the identity of the functional community of plastic-degraders and about biodegradation rates of plastics from different compositions. This project is funded by CNRS-INSU-EC2CO-PlasticMicro and by TARA-Mediterranean expedition.

References :

- Dussud C and Ghiglione JF. Bacterial degradation of synthetic plastics. CIESM Monograph 46 on Marine Litters.
Eriksen M., Lebreton L. C., Carson H. S., Thiel M., Moore C. J., Borerro J. C., ... & Reisser J. (2014). Plastics in the ocean: a review. *PLoS one*, 9: e111913.
Shah AA, Hasan F, Hameed A, Ahmed S (2008). Biological degradation of plastics: a comprehensive review. *Biotechnology advances*, 26: 246-265.
Zettler E. R., Mincer T. J., & Amaral-Zettler L. A. (2013). Life in the "plastisphere". *Environmental science & technology*, 47: 7137-7146.



ANNEXE 4 : Organisation d'une collecte de déchets à Banyuls-sur-Mer via Surfrider Foundation

Reportage YouTube : <https://www.youtube.com/watch?v=LhHG7Vkej7k>



PARTICIPEZ AUX 20 ANS DES INITIATIVES OCÉANES
DATE ET LIEU :

initiativesoceanes.org INITIATIVES
#OceanInitiatives OCEANES

25 Avril 2015

9h00 – 13h00

BANYULS SUR MER
entre mer et montagne, le soleil et le vent s'unissent

RDV Place du canon, plage de Fontaulé



