

**UNIVERSITÉ DU QUÉBEC**

**UTILISATION DE POLYMÈRES DE CHITOSANE DANS LA  
FORMULATION DE PEINTURES MARINES ANTI-SALISSURES**

**MÉMOIRE DE MAÎTRISE**

**PRÉSENTÉ À**

**L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À RIMOUSKI**

**Comme exigence partielle du programme de Maîtrise d'Océanographie**

**PAR**

**CLAUDIE BONNET**

**Août, 2005**

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À RIMOUSKI  
Service de la bibliothèque

Avertissement

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

## REMERCIEMENTS

Merci à Émilien Pelletier, sans qui cette étude n'aurait jamais eu lieu, mais également pour sa confiance, son optimisme et ses conseils. À Clermont Beaulieu, de Marinard Biotech, pour une formation efficace dans les méthodes de production et de transformation du chitosane, ainsi que pour avoir fourni la matière première nécessaire à cette étude. Sans oublier toute l'équipe de Marinard Biotech et particulièrement Stéphane Saint-Pierre pour son agréable collaboration. À Karine Lemarchand pour son aide plus que précieuse, son appui et ses connaissances bactériologiques. À Patrick Poulin, pour sa bonne humeur et son aide constante à différents chapitres de mon projet, ainsi qu'à Ghislain Canuel pour son assistance, essentielle, dans la conception des montages et leur mise en place. À David Fournier, François Proulx, Michel Rousseau et Gilles Desmeules pour leur contribution dans la longue préparation des plaquettes et des montages. Un merci tout spécial à mes amis Nicolas Pichaud et Guillaume Werstink, pour leur renfort au quai de Rimouski-Est, même sous la pluie battante. Merci aussi à Gervais Ouellet, Aurore Trottet, Sébastien Mas. Merci à Jean-Pierre Chanut pour le partage de ses connaissances en matière de statistiques, ainsi qu'à Philippe Archambault sans qui bien des choses seraient demeurées nébuleuses. Sans oublier Mélanie Simard, Robert Chabot et tout spécialement Michel Poulin pour leur collaboration dans l'identification et l'observation des microalgues marines. Finalement, merci à mes parents et à mon frère pour leurs sourires et leur support.

## RÉSUMÉ

Les conséquences environnementales découlant de l'utilisation de peintures anti-salissures à base de métaux lourds ont mis en évidence l'urgence de développer de nouvelles alternatives sécuritaires pour le milieu marin. Des composés écologiques capables de restreindre la croissance des salissures, et particulièrement des premiers stades bactériens et algaux, sont recherchés. Polymère abondant et dérivé de résidus de crevettes, le chitosane possède des propriétés antibactériennes et antialgales bien connues qui pourraient s'avérer utiles en tant qu'ingrédient bioactif dans une peinture anti-salissure. Des polymères de chitosanes, variant en poids moléculaire et en degré de désacétylation, ont été ajoutés à une peinture marine commerciale au polyuréthane et à la silicone, *Easypoxy*. Leur efficacité a été comparée avec des peintures anti-salissures existantes dans un test d'immersion statique effectué dans des eaux nordiques et salées. Les résultats, obtenus suite à des analyses biologiques et chimiques détaillées des premiers moments de la colonisation, démontrent une activité antibactérienne du chitosane. Cependant, les peintures au chitosane, tout comme les peintures sans additif *Easypoxy*, n'ont démontré aucune action anti-algale. De plus, les observations microscopiques révèlent une plus grande diversité de diatomées à la surface des peintures au chitosane et de la peinture *Easypoxy* qu'à la surface des peintures à base de cuivre, indiquant une action anti-algale réelle et ciblée de l'oxyde de cuivre. Bien qu'une efficacité antisalissures, autant antibactérienne qu'antialgale, des peintures à base d'oxyde de cuivre, *Bottomkote XXX*, soit observée, et particulièrement celles auxquelles les biocides organiques *Sea-Nine 211* et *Copper Omadine* sont ajoutés, le poids total de matière organique récolté à la surface des plaquettes n'est pas significativement différent d'une peinture à l'autre, même après 63 jours d'immersion. À long terme, l'emploi du cuivre et de biocides n'apparaît pas être avantageux. La biomasse totale mesurée à la surface d'*Easypoxy* semble toutefois présenter des valeurs supérieures aux autres. Toutes les méthodes utilisées ont bien sûr permis de comparer l'efficacité des différentes peintures testées, mais aussi de suivre de façon précise et détaillée la progression de la colonisation par les salissures marines dans les premiers temps d'immersion des structures marines dans les eaux froides du Saint-Laurent. De plus, les résultats obtenus démontrent bien que l'utilisation du chitosane en tant qu'agent anti-bactérien combiné à un composé anti-algal écologique pourrait s'avérer une perspective de développement de peintures marines sécuritaires pour l'environnement.

## TABLE DES MATIÈRES

<b>REMERCIEMENTS</b>	<b>2</b>
<b>RÉSUMÉ</b>	<b>3</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES</b>	<b>4</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b>	<b>6</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b>	<b>7</b>
<b>CHAPITRE I</b>	<b>8</b>
<b>1. INTRODUCTION</b>	<b>8</b>
<b>1.1. Les salissures marines</b>	<b>8</b>
<b>1.2. Facteurs chimiques et physiques de colonisation</b>	<b>11</b>
<b>1.3. Environnement et économie</b>	<b>13</b>
<b>1.4. Historique du contrôle des salissures marines</b>	<b>13</b>
<b>1.5. Les peintures antisalissures à base de TBT</b>	<b>14</b>
<b>1.6. Les peintures à base d'oxyde de cuivre et les biocides organiques</b>	<b>15</b>
<b>1.7. Composés naturels</b>	<b>19</b>
<b>1.8. Le chitosane</b>	<b>19</b>
<b>1.9. Activité antimicrobienne du chitosane</b>	<b>23</b>
1.9.1. Origine biologique	23
1.9.2. Pourcentage de désacétylation	23
1.9.3. Le poids moléculaire	24
1.9.4. Concentration	25
<b>1.10. Objectifs</b>	<b>26</b>

<b>CHAPITRE II</b>	<b>29</b>
<b>2. EVALUATION OF THE ANTIFOULING ACTIVITY OF CHITOSAN POLYMERS AS ADDITIVE TO MARINE PAINT</b>	<b>29</b>
<b>2.1. Abstract</b>	<b>30</b>
<b>2.2. Introduction</b>	<b>31</b>
<b>2.3. Materials and methods</b>	<b>33</b>
2.3.1. Chitosan preparation and production	33
2.3.2. Sampling device	33
2.3.3. Commercial and chitosan paints	35
2.3.4. Sampling procedure	36
2.3.5. Analysis of physiochemical parameters	37
2.3.6. Visual Observation	37
2.3.7. Flow cytometry	38
2.3.8. Fluorimetry	38
2.3.9. Dry weight	39
2.3.10. Statistical tests	39
<b>2.4. Results</b>	<b>41</b>
2.4.1. Physiochemical parameters	41
2.4.2. Bacterial analyses	42
2.4.3. Algae analyses	43
2.4.4. Visual observation	46
2.4.5. Dry weight	53
<b>2.5. Discussion</b>	<b>55</b>
2.5.1. Bacteria	55
2.5.2. Algae	57
2.5.3. Total biomass	59
<b>2.6. Conclusion</b>	<b>61</b>
<b>2.7. Acknowledgment</b>	<b>63</b>
<b>CHAPITRE III</b>	<b>64</b>
<b>3. CONCLUSION GÉNÉRALE</b>	<b>64</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>66</b>
<b>ANNEXE I</b>	<b>74</b>

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Organismes retrouvés sur les structures immergées dans l'eau de mer	10
Tableau 2: Facilitation et induction du peuplement, de l'attachement et de la métamorphose des larves par le biofilm	12
Tableau 3: Biocides organiques et leurs différentes applications	16
Tableau 4: Effets des biocides organiques sur certains organismes vivants	18
Tableau 5 : Propriétés chimiques du chitosane	21
Tableau 6 : Applications du chitosane	22
Table 7: Industrial and chitosan paints used and identification given in the text	35
Table 8: Panel tests sampling times	36
Table 9: Two-way ANOVAs comparing all the different paints used at all the different times sampled for all biological and chemical analyses performed	33
Table 10: Water specificity and nutrients concentration at time zero for the first and the second experiment, the middle of the experiment and the end of the experiment	41
Tableau 11 : Peintures au chitosane et peintures commerciales utilisées	79
Tableau 12: Temps de prélèvement des plaquettes du premier test d'immersion	80
Tableau 13 : Temps de prélèvement des plaquettes du deuxième test d'immersion	80

## LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Chronologie de colonisation de surfaces dures immergées	9
Figure 2 : Conformation des biocides organiques utilisés	17
Figure 3: Conformation de la cellulose, de la chitine et du chitosane.	20
Figure 4 : Protocole expérimental des analyses biologiques et chimiques effectuées en laboratoire	28
Figure 5: Exposure rack with panels framed	34
Figure 6: Concentration of bacteria/cm <sup>2</sup>	43
Figure 7: Concentration of phytoplanktonic cell/cm <sup>2</sup> after 1, 4 and 14 days	44
Figure 8: Chlorophyll a in ng/cm <sup>2</sup>	45
Figure 9: Structure of the whole assemblage, nMDS ordination on presence-absence data, using Bray-Curtis similarity measures. Bacteria, bacterial clusters and variation of microalgae morphology observed.	47
Figure 10: Epifluorescence microscopy 60X, after 21 days of immersion.	49
Figure 11: Panels of experiment 1 after 56 days of immersion	50
Figure 12: Inverted microscopy, 40X, experiment 1 after 63 days of immersion.	51
Figure 13: Scanning electron microscopy	52
Figure 14: Dry weight in mg/m <sup>2</sup>	54
Figure 15: Étapes de la production du chitosane	75
Figure 16 : Étapes du protocole expérimental	78



## CHAPITRE I

### 1. INTRODUCTION

#### 1.1. Les salissures marines

Le biofouling marin, ou « salissures marines », désigne la colonisation massive et nuisible des surfaces artificielles immergées dans l'eau de mer par les microorganismes, les plantes et les animaux (Yebera *et al.*, 2004). Ce processus de successions biotiques débute dès les premières minutes d'immersion d'une structure (Figure 1). Des ions et des substances dissoutes telles des sucres, des acides aminés, des protéines ainsi que des acides gras et des acides humiques, s'adsorbent à la surface de la structure en concentration saturante (Railkin, 2004). Ce conditionnement biochimique rapide favorise l'attachement des bactéries qui coloniseront la structure en l'espace de quelques heures (Costerton *et al.*, 1995 ; Railkin, 2004). Ces microorganismes prolifèrent et forment, avec les diatomées, un assemblage que l'on appelle « biofilm », dont l'adhésion à la surface est essentiellement liée à la sécrétion de substances polymériques gélatineuses par les algues unicellulaires (Callow & Callow, 2002). Ce film, composé à 99% de bactéries et de diatomées, mais également de protistes et de champignons microscopiques, constitue le microfouling (Railkin, 2004).

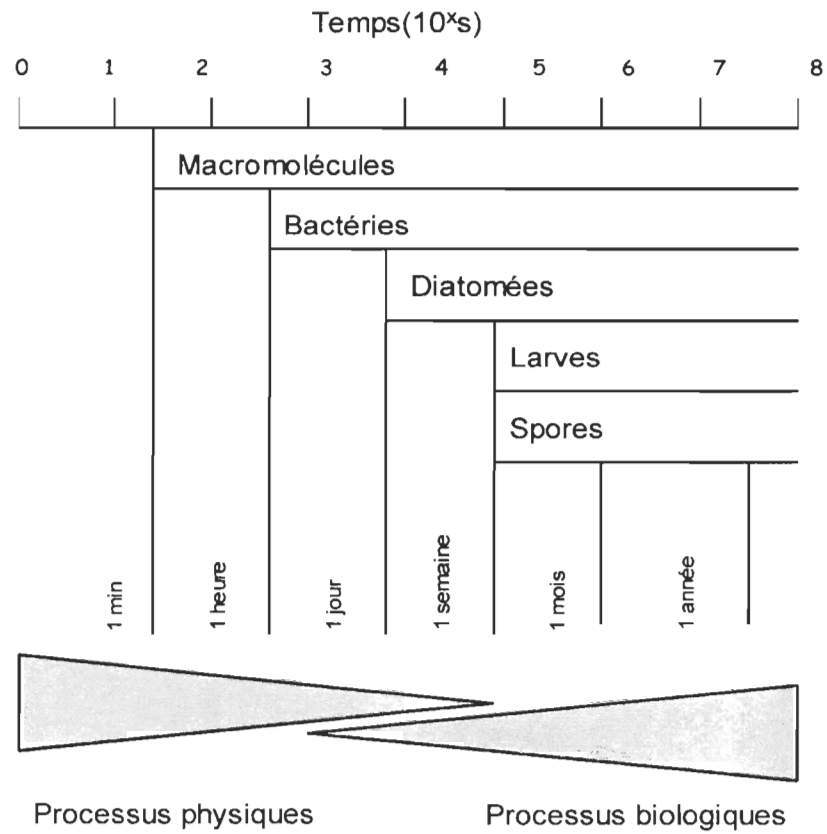


Figure 1 : Chronologie de colonisation de surfaces dures immergées  
(Tiré de Railkin, 2004. Modifié à partir de Wahl, M.,1989.)

Après quelques semaines apparaissent des propagules de macroorganismes, des spores de macroalgues ainsi que des larves d'invertébrés et de chordés inférieurs tels les tuniciers. Cette étape est la première du macrofouling (Railkin, 2004). Avec le temps, suivent des organismes supérieurs tels des balanes, des bryozoaires, des éponges, des macroalgues, des moules, etc. (Tableau 1). La diversité et la vitesse de colonisation dépendent du type d'organismes présents dans l'eau, de la température, de la profondeur d'immersion et varient selon les saisons, les courants et l'aire géographique (Railkin, 2004 ; WHOI, 1952).

Tableau 1: Organismes retrouvés sur les structures immergées dans l'eau de mer

(Modifié d'après Omae, 2003).

<b>Organismes</b>	<b>Pourcentage</b>
Bactéries	2,1
Champignons	0,8
Diatomées	6,4
Algues	25,9
Protozoaires	5,7
Porifera	1,9
Coelenterés	16,4
Annélides	6,1
Tentaculata	7,9
Arthropodes	16,7
Échinodermes	1,1
Chordés	7,3
Autres invertébrés	1,7

## 1.2. Facteurs chimiques et physiques de colonisation

Le microfouling crée des conditions favorables aux successions suivantes de macrofouling. En effet, le biofilm facilite et induit le peuplement, l'attachement et la métamorphose des larves de cnidaires, d'éponges, de polychètes, de tuniciers, de bivalves, de crustacés et d'échinodermes (Tableau 2). Sélectifs envers les substrats sur lesquels ils se fixent, les microorganismes mobiles et autres organismes marins, sont attirés par certaines substances chimiques mais aussi repoussés par d'autres, comme les peintures (Railkin, 2004). De même, les surfaces immergées possèdent des caractéristiques physiques, dont la forme, la taille, la texture et même la couleur, vont influencer l'adhésion et la croissance des organismes. Sur des surfaces planes, les organismes présentent une distribution aléatoire. Sur les petites surfaces, de taille non limitante pour la croissance ou l'attachement, la colonisation est plus élevée que sur les grandes surfaces. La rugosité est considérée comme un facteur de colonisation positif par les larves, mais tous les grands groupes taxonomiques incluent des espèces préférant les surfaces lisses ou relativement indifférentes au microrelief (Railkin, 2004). De plus, quoique faiblement significatives, les couleurs claires favoriseront l'installation des larves de nombreuses espèces (Railkin, 2004).

Tableau 2: Facilitation et induction du peuplement, de l'attachement et de la métamorphose des larves par le biofilm

(Modifié d'après Railkin, 2004).

Espèces de larves	Source de biofilm	Effet du biofilm
<b>Éponges</b>		
<i>Halicondria panicea</i>	MF	F p
<i>Halisarca dujardini</i>	MF de <i>Fucus vesiculosus</i>	l p, a, m
<b>Cnidaires</b>		
<i>Hydractinia echinata</i>	Bactéries provenant de carapaces de crabes et bactérie <i>Alteromonas espejina</i>	l p, a, m
<i>Clava multicornis</i>	MF d'algues brunes	l p
<i>Laomedea flexuosa</i>	MF d'algues brunes et rouges	F p
<i>Gonothyrea loveni</i>	MF de <i>Fucus</i> spp.	F p ; l p, a, m
<i>Aurelia aurita</i>	Bactéries <i>Micrococcaceae</i>	l a
<i>Cassiopea andromeda</i>	Bactéries <i>Vibrio</i>	F p, a, m
<i>Cyanea</i> sp.	MF	F p
<b>Polychètes</b>		
<i>Hydroides elegans</i>	MF, bactéries <i>Roseobacter</i>	l p
<i>Ophelia bicornis</i>	MF	F p
<i>Polydora ciliata</i>	MF	F p
<i>Pomatoceros lamarckii</i>	Microalgue : <i>Rhinomonas reticulata</i> , <i>Tetraselmis chui</i>	l p
<i>Spirorbis borealis</i>	Microalgue <i>Chlamydomonas</i> , bactéries <i>Synechococcus</i> , diatomées	l m, F p
<i>Spirorbis corallinae</i>	Microalgue	F p
<i>Spirorbis tridentatus</i>	Microalgue	F p
<b>Crustacés</b>		
<i>Balanus amphitrite</i>	MF	F p
<i>Elminius modestus</i>	MF	F p
<i>Semibalanus balanoides</i>	MF, diatomées	F p
<b>Bivalves</b>		
<i>Crassostrea gigas</i>	Bactéries	l p, m
<i>Crassostrea virginica</i>	Bactéries	l p, m
<i>Mytilus edulis</i>	MF	F p, a
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	MF	F p
<i>Placopecten magellanicus</i>	MF	F p
<i>Saccostrea commercialis</i>	MF	F p
<b>Bryozoaires</b>		
<i>Bugula neritina</i> , <i>B. simplex</i> , <i>B. stolonifera</i> , <i>B. turrita</i> .	Diatomées et MF	F p et l p
<b>Échinodermes</b>		
<i>Apostichopus japonicus</i>	Diatomées	F p
<i>Arbacia punctulata</i>	Bactéries	l p, a, m
<i>Lytechinus pictus</i>	Bactéries	l p, a, m
<b>Tuniciers</b>		
<i>Ciona intestinalis</i>	Bactéries <i>Pseudomonas</i> sp.	F p
<i>Molgula citrina</i>	MF	F p

Notes : MF-microfouling, F-facilitation, l-Induction, p-peuplement, a-attachement, m-métamorphose

### **1.3. Environnement et économie**

De nombreux problèmes environnementaux et économiques à l'échelle globale sont reliés au biofouling. Les salissures envahissent toutes les structures sous-marines, augmentent la corrosion et limitent leur fonctionnement. Elles sont particulièrement néfastes pour la navigation (Railkin, 2004 ; WHOI, 1952; Yebra *et al.*, 2004). Sur la coque d'un seul navire plus de 2 millions d'organismes peuvent être recensés. Un phénomène souvent relié à l'introduction d'espèces exotiques et au déséquilibre des écosystèmes marins (Champ, 2000 ; Yebra, 2004). De plus, cette colonisation massive augmente considérablement le poids total du navire et accroît la friction entre la coque et l'eau (Bennett, 1996). Une résistance qui entraîne une baisse notable de la manoeuvrabilité et jusqu'à 40% de réduction de la vitesse (Bennett, 1996; Railkin, 2004). Les coûts se chiffrent entre 500 millions et 1 milliard de dollars américains supplémentaires en carburant chaque année (Champ, 2000; Stupak *et al.*, 2003). Cette augmentation de 30 à 40% de la consommation engendre invariablement des émissions supplémentaires de composés toxiques tels le CO<sub>2</sub> et le SO<sub>2</sub> (Yebra *et al.*, 2004). De plus, le nettoyage fréquent des structures immergées entraîne des pertes économiques, essentiellement liées au temps, et des conséquences environnementales suite à l'augmentation des déchets toxiques (Yebra *et al.*, 2004).

### **1.4. Historique du contrôle des salissures marines**

Loin d'être une problématique moderne, le contrôle du biofouling marin existe depuis très longtemps. La poix, la cire, le goudron et l'asphalte étaient utilisés par les anciens Phéniciens et Carthaginois. De l'huile mélangée à de l'arsenic ou du soufre était employée en 412 av. J.-C. et au 3<sup>e</sup> siècle (WHOI, 1952). Les Grecs se servaient, en plus

de la cire et de la poix, d'un recouvrement au plomb pour lutter contre l'envahissement des salissures marines (WHOI, 1952). Mais ce n'est qu'au début du 20<sup>e</sup> siècle qu'une méthode efficace, de l'approbation générale, apparaît : le revêtement au cuivre (Bennett, 1996; WHOI, 1952). Depuis, plusieurs versions de peintures à base d'oxyde de cuivre ont été formulées (Yebra *et al.*, 2004). Pour améliorer l'efficacité et la durée de vie de ces peintures au cuivre, des biocides tels l'insecticide dichlorodiphényltrichloroethane (DDT), des organomercures, des organoplombs et des composés d'arsenic ont été ajoutés. Dans les années 60, le tributylétain (TBT) fait son apparition et est rapidement commercialisé pour ses propriétés antisalissures (Bennett, 1996). D'abord utilisé en tant que produit co-toxique dans les peintures de haute performance à base de cuivre, il est ensuite utilisé dans des substrats à base de vinyle et d'acrylate (Bennett, 1996 ; Yebra *et al.*, 2004).

### **1.5. Les peintures antisalissures à base de TBT**

Contrairement aux peintures à base de cuivre, les peintures à base de TBT ne causent pas de corrosion galvanique sur les coques en aluminium et sont incolores. Elles sont de plus très toxiques et possèdent une longue durée de vie, ce qui en fait, à ce jour, la méthode la plus efficace de lutte contre le biofouling (Bosselmann, 1996 ; Yebra *et al.*, 2004). L'utilisation de ces peintures donne lieu chaque année à l'économie de millions de dollars de carburant et réduit ainsi de 22 millions de tonnes les émissions de CO<sub>2</sub> et de 0,6 million de tonnes les émissions de SO<sub>2</sub> (Bennett, 1996). Des frais de nettoyage et des millions de litres de déchets toxiques sont également évités (Bennett, 1996). En 2000, les peintures au TBT couvraient plus de 70% des navires de la flotte commerciale internationale (Evans *et al.*, 2000). Mais ces peintures, bien qu'à l'origine

de bénéfices économiques importants, contiennent et dispersent dans l'environnement la substance la plus toxique jamais introduite délibérément dans le milieu aquatique (Goldberg, 1986 dans Evans *et al.*, 1995). Sa persistance dans l'environnement marin rend le TBT extrêmement dommageable aux organismes indigènes non ciblés. À de très faibles concentrations, de l'ordre du ng/L, le composé cause des effets nocifs et peut entraîner la mort de certains organismes (Bosselmann, 1996). Des malformations, des faibles taux de croissance menant au déclin des populations, l'hypercalcification des huîtres (Alzieu, 1998), l'imposex chez les gastéropodes (Bryan *et al.*, 1986), l'accumulation chez les mammifères et une baisse des réponses immunitaires chez les poissons ont été observés à la suite d'une exposition au TBT (Bosselmann, 1996 ; Yebra *et al.*, 2004). Pour toutes ces raisons, plusieurs pays ont adopté des législations nationales visant à restreindre et à éliminer l'utilisation de composés de tributylétain dans les peintures anti-salissures (Champ, 2000). En 2001, dans le cadre d'une convention internationale, un bannissement de l'application des peintures anti-salissures au TBT a été proposé pour 2003 et l'exclusion de leur présence sur les navires a été suggérée pour 2008 (Champ, 2001 dans Yebra *et al.*, 2004).

#### **1.6. Les peintures à base d'oxyde cuivre et les biocides organiques**

Depuis cette interdiction, les peintures au cuivre contenant des biocides organiques ont commencé à remplacer les peintures à l'étain (Tableau 3). Les biocides utilisés augmentent l'efficacité des peintures en agissant contre les organismes tolérants au cuivre dont de nombreuses espèces d'algues telles *Enteromorpha* spp., *Ectocarpus* spp., et *Achnanthes* spp. (Voulvoulis *et al.*, 1999). À l'heure actuelle, aucune des alternatives disponibles aux peintures au TBT n'est approuvée à l'échelle internationale



(Champ, 2000). Bien que l'augmentation des concentrations en cuivre dans les eaux ne semble pas constituer un risque significatif pour les écosystèmes aquatiques, les biocides et leurs produits de dégradation peuvent entraîner des problèmes environnementaux (Voulvoulis *et al.*, 1999). Plusieurs de ces composés, issus de l'agriculture (Tableau 3 & Figure 2), sont connus et certains de leurs effets recensés (Tableau 4). Cependant, le manque d'information concernant leur toxicité rend les études d'impacts difficiles et leur accumulation dans le milieu marin pourrait être aussi, sinon plus, toxique que celle du TBT (Evans *et al.*, 2000 ; Voulvoulis *et al.*, 1999). L'utilisation de composés naturels dans la formulation des peintures anti-salissures présente donc un intérêt capital tant d'un point de vue économique qu'écologique.

Tableau 3: Biocides organiques et leurs différentes applications

(D'après Voulvoulis *et al.*, 1999)

<b>Biocides</b>	<b>Autres applications</b>
Chlorothalonil	Agriculture (fongicide), Peintures, Adhésif
Dichlofluanid	Agriculture (fongicide)
<i>Dithiocarbamates</i> : Maneb, Thiram, Zineb, Ziram	Agriculture (fongicide)
Diuron	Agriculture (herbicide)
Isothiazolone (Sea-nine 211, Kathon 5287)	Aucune autre
TCMS pyridine	Aucune autre
TCMTB	Agriculture (fongicide), Agent de conservation du bois, Industrie du cuir
Triazine (Irgarol 1051)	Agriculture (herbicide)
Zinc pyrithione	Agriculture (bactéricide, fongicide), Shampooing

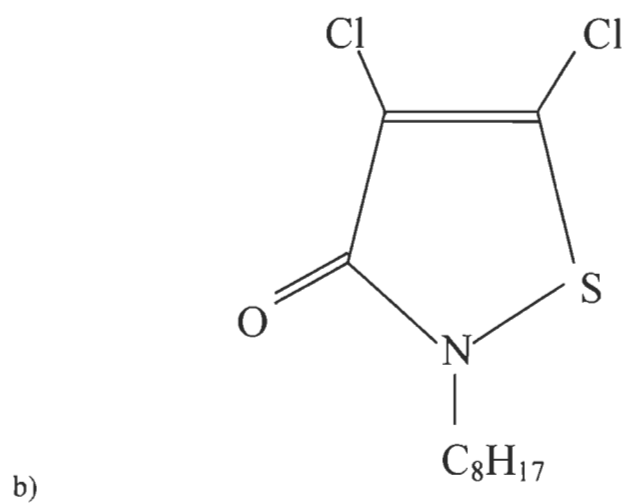
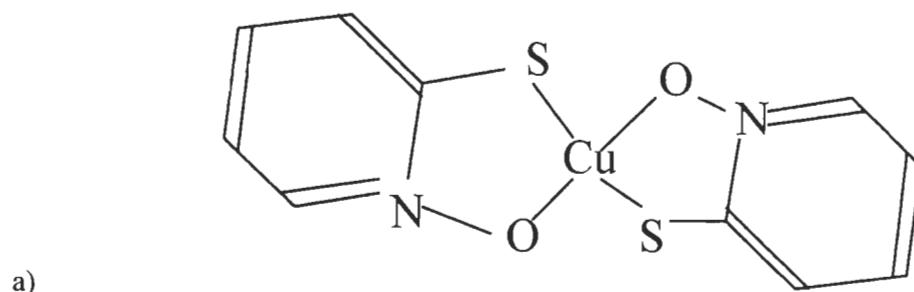


Figure 2 : Conformation des biocides organiques utilisés

a) Pyrithione cuivrique. Copper *Omadine*. Arch Chemicals Inc. 1999. b) 4,5-dichloro-2-n-octyl-4-isothiazolin-3-one. *Sea-Nine 211*. Rohm and Haas Company, 2002.

Tableau 4: Effets des biocides organiques sur certains organismes vivants

(D'après Evans *et al.*, 2000)

<b>Biocides</b>	<b>Effets</b>
Chlorothalonil	Temps de production des jeunes retardé chez <i>Daphnia</i>
Dichlofluanid	Cancérogène/mutagène
<i>Dithiocarbamates:</i> Maneb, Thiram, Zineb, Ziram	Effets tératogènes sur les larves de poisson et les rats, Leucopénie chez les poissons, Facilitation de la capture des métaux lourds par les microbes, Développement de tumeurs et anomalies du sperme chez la souris
Diuron	Inhibition de la photosynthèse chez les plantes, Cancérogène
Isothiazolone (Sea-nine 211, Kathon 5287)	Irritation des yeux, Inhalation toxique et allergies dermatiques chez les humains
Triazine (Irgarol 1051)	Inhibition de la photosynthèse chez les plantes
Pyrrithione de zinc	Allergies dermatiques chez les humains, Inhibition de la croissance cellulaire chez les mammifères, Inhibition du système de transport membranaire chez les champignons, Paralysies chez les lapins, Potentiel mutagène, Effets tératogènes sur les larves de poisson

### 1.7. Composés naturels

De nombreuses recherches mettent en évidence l'incorporation de produits d'origine naturelle dans des peintures anti-salissures. Plusieurs de ces composés ont été isolés d'organismes marins, particulièrement d'invertébrés benthiques sessiles ayant développé, au cours de l'évolution, des systèmes de défense chimique variés contre le biofouling (Clare, 1996 ; Fusetani, 2004). Des extraits de bactéries marines (Armstrong *et al.*, 2000 ; Burgess *et al.*, 2003), de plusieurs espèces de macroalgues (Hellio *et al.*, 2001) et des composés naturels actifs dérivés d'éponges (Diers *et al.*, 2004 ; Henrikson & Pawlik, 1995), d'algues rouges et brunes (Henrikson & Pawlik, 1995), de cnidaires (Mizobuchi *et al.*, 1994 *in* Clare, 1996), de bryozoaires et de tuniciers ont déjà été testés (Callow & Callow, 2002 ; Clare, 1996 ; Fusetani, 2004 ; Henrikson & Pawlik, 1995). Cependant, certains se sont révélés hautement toxiques et rares sont ceux qui ont pu démontrer un réel intérêt écologique (Clare, 1996 ; Callow & Callow, 2002 ; Fusetani, 2004). La plupart de ces composés ont été testés en laboratoire par des biotests sur un nombre limité d'espèces. De plus, l'obtention de quantités suffisantes et à faible coût de composés d'origine naturelle présente un obstacle supplémentaire à leur utilisation (Clare, 1996).

### 1.8. Le chitosane

En raison de son abondance, de son faible coût de production, et de ses propriétés antibactériennes et antialgales bien connues, le chitosane présente un grand intérêt pour le développement de peintures antisalissures sécuritaires pour l'environnement (Ravi Kumar, 2000).

La chitine, composant majeur de l'exosquelette des crustacés et des insectes, est le polysaccharide naturel produit par biosynthèse le plus abondant sur terre après la cellulose (Figure 3; Roberts, 1992; Shahidi *et al.*, 1999). La production annuelle de ce polymère de N-acétylglucosamine biocompatible et biodégradable, atteint chaque année de  $10^9$  à  $10^{10}$  tonnes (Chung *et al.*, 2003; Hejazi & Amiji, 2003; Keyhani & Roseman, 1999, Ravi Kumar, 2000). Le terme chitosane est utilisé lorsque 60 à 70% des monomères de chitine sont désacétylés (Li *et al.*, 1992) ou lorsque le produit de cette désacétylation est soluble en milieu acide dilué (Muzzarelli, 1985).

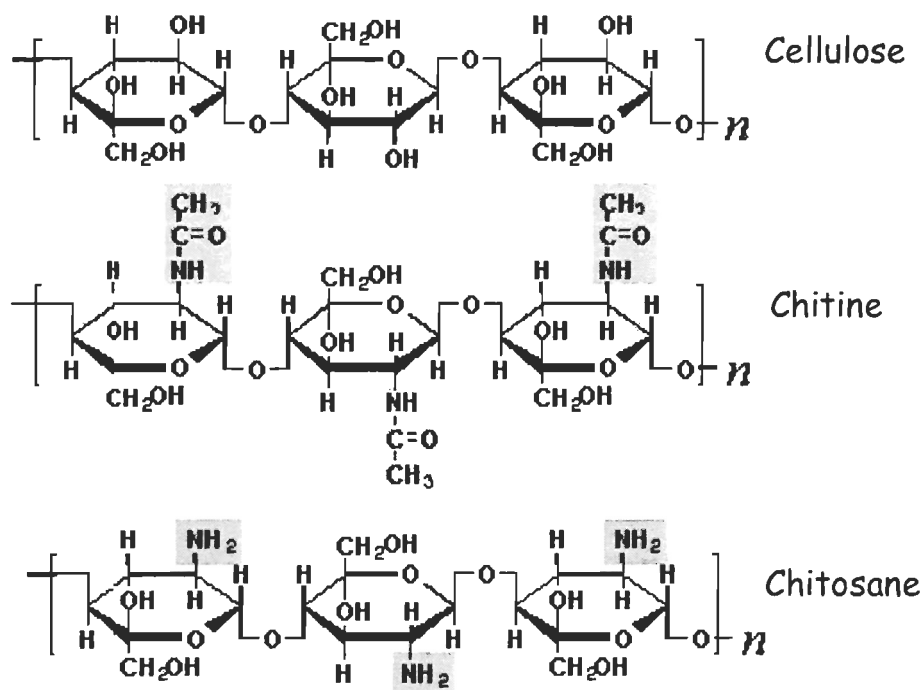


Figure 3: Conformation de la cellulose, de la chitine et du chitosane.

(Modifié à partir de

<http://www.halosource.com/corporate/platforms/chitosan/structures.gif>)

Tableau 5 : Propriétés chimiques du chitosane

(D'après Hejazi &amp; Amiji, 2003).

<b>Propriétés chimiques du chitosane</b>
Polyamine cationique
Haute densité de charge à $\text{pH} < 6.5$
Adhère aux surfaces chargées négativement
Forme des gels avec des polyanions
Polyélectrolyte de haut poids moléculaire et linéaire
Viscosité de faible à élevée
Chélate certains métaux de transition
Accessible aux modifications chimiques
Groupements aminés et hydroxyles réactifs

Le polymère de chitosane possède un grand nombre de propriétés chimiques (Tableau 5), mais ses nombreuses applications (Tableau 6) sont principalement dépendantes de sa nature cationique. Cette charge positive interagit fortement avec les surfaces chargées négativement, telles les protéines et les acides nucléiques, et permet également la formation de complexes avec des ions métalliques.

Tableau 6 : Applications du chitosane

<b>Alimentation</b>	<b>Références</b>
Agent de conservation	Shahidi <i>et al.</i> , 1999; Li <i>et al.</i> , 1996.
Agent antimicrobien	Shahidi <i>et al.</i> , 1999
Films biodégradables pour l'emballage	Bégin <i>et al.</i> , 1999
Clarification et désacidification des jus de fruits	Shahidi <i>et al.</i> , 1999
Agent émulsifiant	Shahidi <i>et al.</i> , 1999
Épaississant et stabilisant	Shahidi <i>et al.</i> , 1999; Li <i>et al.</i> , 1996
Fibre diététique	Shahidi <i>et al.</i> , 1999
Réduction de l'absorption des lipides	Shahidi <i>et al.</i> , 1999;
Agent antigastrique	Ravi Kumar, 2000.
Supplément dans l'alimentation des nourrissons	Shahidi <i>et al.</i> , 1999
Immobilisation enzymatique	Shahidi <i>et al.</i> , 1999
Production de fromage	Ausar <i>et al.</i> , 2002
<b>Agriculture</b>	
Antifongique	Colwell, 2002
Anti-transpirant pour plantes	Bittelli <i>et al.</i> , 2001
Déclencheur des mécanismes de défense des plantes	Li <i>et al.</i> , 1996
Fertilisant, stimulateur de croissance et inducteur d'enzymes	Li <i>et al.</i> , 1996
Protection contre le gel	Li <i>et al.</i> , 1996
Pellicule protectrice pour les fruits et les légumes	Li <i>et al.</i> , 1996
Enrobage des semences	Freepons, 1996
Inhibition de la multiplication virale chez les plantes	Cuero, 1999
<b>Pharmaceutique, médecine et cosmétiques</b>	
Agent anticancérigène	Sekiguchi <i>et al.</i> , 1994 Sekiguchi <i>et al.</i> , 1994, Ravi Kumar, 2000.
Agent antimicrobien	Bégin <i>et al.</i> , 1999
Agent antifongique	Shahidi <i>et al.</i> , 1999., Li <i>et al.</i> , 1996.
Agent hypocholestérolémiant	Ravi Kumar, 2000, Li <i>et al.</i> , 1996
Peau artificielle, vaisseaux sanguins artificiels	Jumaa <i>et al.</i> , 2002; Felt <i>et al.</i> , 2000
Formulation de larmes artificielles	Jumaa <i>et al.</i> , 2002, Li <i>et al.</i> , 1996
Pâte à dents, inhibition de la plaque dentaire	Jumaa <i>et al.</i> , 2002
Pansements	Jumaa <i>et al.</i> , 2002; Shahidi <i>et al.</i> , 1999.
Encapsulation de nutraceutiques	Ravi Kumar, 2000
Matériel antithrombogène et hémostatique	Ravi Kumar, 2000
Lentilles de contact, pansements oculaires	Ravi Kumar, 2000, Li <i>et al.</i> , 1996
Crèmes, hydratants, lotions, maquillage	Ravi Kumar, 2000, Li <i>et al.</i> , 1996
Traitements capillaires, vernis à ongle	Ravi Kumar, 2000, Li <i>et al.</i> , 1996
<b>Environnement</b>	
Purification des eaux (Réduction des odeurs, capture des ions métalliques, des pesticides, des phénols, des BPC, des protéines, des acides aminés et des colorants).	Shahidi <i>et al.</i> , 1999., Ravi Kumar, 2000, Li <i>et al.</i> , 1996.
Récupération de déchets liés à la transformation alimentaire	Shahidi <i>et al.</i> , 1999
Contrôle de la croissance des algues	Cuero & Lillehoj, 1990
<b>Textiles</b>	
Textiles antimicrobiens (Médical, hygiène, allergies)	Shin <i>et al.</i> , 2001; Li <i>et al.</i> , 1996.
Production de vêtements de sports ( Protection contre les odeurs, les taches et la détérioration )	Shin <i>et al.</i> , 2001

## 1.9. Activité antimicrobienne du chitosane

L'activité antibactérienne et antifongique du polymère de chitosane est influencée par de nombreux facteurs incluant l'origine biologique du chitosane, le pourcentage de désacétylation, le degré de polymérisation ou le poids moléculaire (PM) (Kendra & Hadwiger, 1984; No *et al.*, 2002). De plus, le degré de l'effet antimicrobien et le mode d'action varient en fonction de l'organisme ciblé (Cuero, 1999). La réponse du microorganisme dépend de la structure chimique du chitosane utilisé et des conditions environnementales lors de l'interaction (Cuero, 1999).

### 1.9.1. Origine biologique

Les propriétés fonctionnelles du chitosane sont influencées par le matériel brut utilisé pour sa production. En effet, les propriétés peuvent varier en fonction des espèces, mais également au sein d'une même espèce au cours de variations saisonnières (Skaugrud & Sargent, 1990). Le chitosane provenant de crustacés démontre des mécanismes antibactériens plus diversifiés que le chitosane d'origine microbienne. En plus de bloquer l'accès aux nutriments des cellules microbiennes, il induit la production de la chitosanase et de composés phénoliques (Cuero, 1999).

### 1.9.2. Pourcentage de désacétylation

Plus le chitosane est désacétylé, plus son activité antimicrobienne est forte (Cuero, 1999), indiquant que les groupes fonctionnels pour l'inhibition de la croissance sont les groupes aminés cationiques (Jumaa *et al.*, 2002; Song *et al.*, 2002; Stössel & Leuba, 1984).



### 1.9.3. Le poids moléculaire (PM)

Les études effectuées sur la relation entre le PM et l'effet antimicrobien présentent des résultats contradictoires. Selon certaines études (Sekiguchi *et al.*, 1994; Shin *et al.*, 2001), les chitosanes de haut PM seraient plus efficaces dans l'inhibition de la croissance bactérienne que les chitosanes de faible PM, particulièrement ceux possédant un PM supérieur à 10 KDa (Jeon *et al.*, 2001). Alors que No *et al.* (2001) rapportent que les chitosanes d'environ 10 KDa sont peu ou pas antibactériens, que les chitosanes de 470 à 746 KDa sont les plus efficaces, que ceux entre 2 et 4 KDa sont d'avantage antibactériens envers les bactéries Gram positives tandis et que ceux de 1 KDa le sont envers celles Gram négatives. Selon Zheng & Zhu (2003) les polymères de chitosane d'environ 305 KDa sont efficaces, ceux de 5 KDa le sont envers les bactéries Gram négatives, mais un mélange de chitosanes de poids moléculaires variables représente la meilleure solution antibactérienne. Choi *et al.*(2001) avancent qu'une dépolymérisation partielle augmente l'activité antimicrobienne et Stössel & Leuba (1984) que l'effet antifongique diminue avec l'augmentation de la taille des polymères de chitosane. Des études démontrent que les polymères constitués de moins de 6 ou 7 unités de glucosamines présentent la plus faible activité antimicrobienne (Sekiguchi *et al.*, 1994; Choi *et al.*, 2001). Ces variations de résultats s'expliquent par le fait que l'action antimicrobienne du chitosane, qui affecte la croissance et la physiologie de la plupart des microorganismes, incluant les algues, les champignons, les bactéries, les protozoaires et les virus (Cuero, 1999) s'effectue à travers divers mécanismes :

1. *Chélation* : Dans le milieu, le processus de chélation du chitosane limite la disponibilité des métaux et des nutriments et empêche la croissance des microorganismes (Choi *et al.*, 2003; Qin *et al.*, 2002; Shahidi *et al.*, 1999).

2. *Accumulation à la surface* : L'interaction des groupements aminés polycationiques du chitosane avec les groupements anioniques des surfaces cellulaires microbiennes (protéines, lipopolysaccharides, acide teïchoïque, etc.) et la formation de complexes polyélectrolytes génèrent une couche imperméable autour de la cellule qui restreint le transport des éléments essentiels (Choi *et al.*, 2003, Jung *et al.*, 1999; Muzzarelli, 1990; Sekiguchi *et al.*, 1994; Shahidi *et al.*, 1999; Tokura *et al.*, 1997). Cette action est spécifique envers les cellules microbiennes chargées négativement, entraîne la fuite des constituants intracellulaires et ralentit le métabolisme (Jung *et al.*, 1999; Shahidi *et al.*, 1999).

3. *Pénétration dans la cellule* : Les oligomères de chitosane possédant un PM inférieur à 5 KDa pénètrent à l'intérieur des organismes unicellulaires, se lient à l'ADN et inhibent la synthèse d'ARNm (Jung *et al.*, 1999; Kendra & Hadwinger, 1984; Shahidi *et al.*, 1999; Tokura *et al.*, 1997). L'activité antimicrobienne est engendrée par les groupes amines libres dans un environnement acide aqueux (Jung *et al.*, 1999).

#### 1.9.4. Concentration

Dans tous les cas, plus la concentration en polymères de chitosane est élevée plus l'activité antimicrobienne est observée. Avec une concentration de 1% p/v le taux d'inhibition des bactéries *E.coli* et *S.aureus* atteint 100% (Zheng & Zhu, 2003) et une concentration de seulement 0,2-0,3% p/v est suffisante pour empêcher la croissance de *B. cereus* et *S.epidermidis* (Sekiguchi *et al.*, 1994). L'action antimicrobienne du chitosane envers certains genres répandus de bactéries marines responsables des salissures marines tels *Pseudomonas* et *Vibrio* ou encore, quoique moins fréquent, *Bacillus* (Railkin, 2004), a déjà été démontrée à des concentrations inférieures à 2% p/v

(Jumaa *et al.*, 2002; Sekiguchi *et al.*, 1994; No *et al.*, 2002). Mais cette action du chitosane envers les microorganismes n'a jamais été directement testée en milieu marin lorsqu'incorporé dans des peintures. En ce sens, les présents travaux de recherche sont innovateurs et tentent de démontrer le potentiel d'un additif de chitosane dans une peinture marine classique sans agent anti-salissure. En effet, l'obtention d'une peinture écologique et antimicrobienne à base de chitosane présenterait un grand intérêt en tant que peinture marine anti-salissure, mais pourrait également être développée pour le milieu médical pour faciliter l'entretien de surfaces peintes et éliminer toute prolifération bactérienne.

### **1.10. Objectifs**

L'objectif général de cette étude est d'évaluer l'intérêt de polymères de chitosane en tant qu'ingrédients bioactifs dans une peinture anti-salissure en milieu côtier. Avec pour objectifs spécifiques :

- de préparer différentes formulations de peintures anti-salissures à base de chitosane,
- de mettre au point et d'utiliser différentes méthodes pour déterminer la progression du biofouling en fonction du temps et,
- de déterminer l'efficacité de ces nouvelles formulations de peintures à base de chitosane comparativement à certaines peintures anti-salissures existantes.

Un partenariat de développement avec l'entreprise, *Marinard Biotech Ltée* située à Rivière-au-Renard en Gaspésie a permis l'étude des méthodes d'extraction, de purification et de production du chitosane. Ce laboratoire de recherche, affilié aux *Pêcheries Marinard Ltée*, est spécialisé dans la production, l'analyse du chitosane et le

développement de nouvelles applications aux résidus des carapaces de crevettes *Pandalus borealis*. À partir de la littérature, des chitosanes aux propriétés intéressantes dans le cadre de cette étude ont été choisis et développés. Ainsi, des chitosanes possédant un taux de désacétylation élevé, soit presque 100%, avec des poids moléculaires variables ont été sélectionnés pour leur potentiel antimicrobien.

Dans les laboratoires chimiques de l'Institut des sciences de la mer de Rimouski, les différents chitosanes, d'abord pulvérisés à 60 mesh, ont été incorporés dans la peinture commerciale sans produit anti-salissure *Easypoxy* à des concentrations estimées fortement antimicrobiennes de 5% et 20%. Ces peintures, incluant le chitosane comme agent anti-salissure, ont été appliquées sur des plaquettes planes en acier de 10 cm X 20 cm et leur efficacité comparée avec des peintures anti-salissures commerciales lors d'un test d'immersion standard en milieu marin côtier peu profond. Ainsi, les peintures suivantes ont été évaluées :

- la peinture au cuivre *Bottomkote™ XXX* d'Interlux®,
- l'additif liquide aux peintures au cuivre *Sea-Nine 211™* de Rohm & Haas Inc.,
- l'additif en poudre aux peintures au cuivre Copper *Omadine™* d'Arch Chemicals Inc., et finalement,
- *Easypoxy™* de Pettit Marine Paints, utilisée en tant que standard pour les surfaces non-toxiques.

La caractérisation et la quantification de la progression du biofouling en fonction du temps dans la zone côtière de l'estuaire maritime du Saint-Laurent en saison estivale se sont effectuées par différentes analyses biologiques et chimiques. Après les observations visuelles et le prélèvement du biofouling ayant adhéré aux plaquettes avec une lame de rasoir stérile, des analyses en fluorimétrie, en cytométrie en flux, en

microscopie à épifluorescence, en microscopie inversée et en microscopie électronique ainsi que des mesures de poids sec ont été réalisées (Figure 4). La figure 4 représente, de façon imagée, le protocole expérimental suivi pour la récolte des échantillons sur chacune des plaquettes et pour l'analyse subséquente de ces échantillons. Les analyses effectuées ont permis de caractériser le biofilm et de comparer avec différentes méthodes l'efficacité anti-salissures des différentes peintures au chitosane et des peintures marines commerciales utilisées. Enfin, elles ont permis de déterminer de façon précise la progression des premiers stades du biofouling en fonction du temps dans la zone côtière de l'estuaire maritime du Saint-Laurent sur des surfaces fixes peintes.

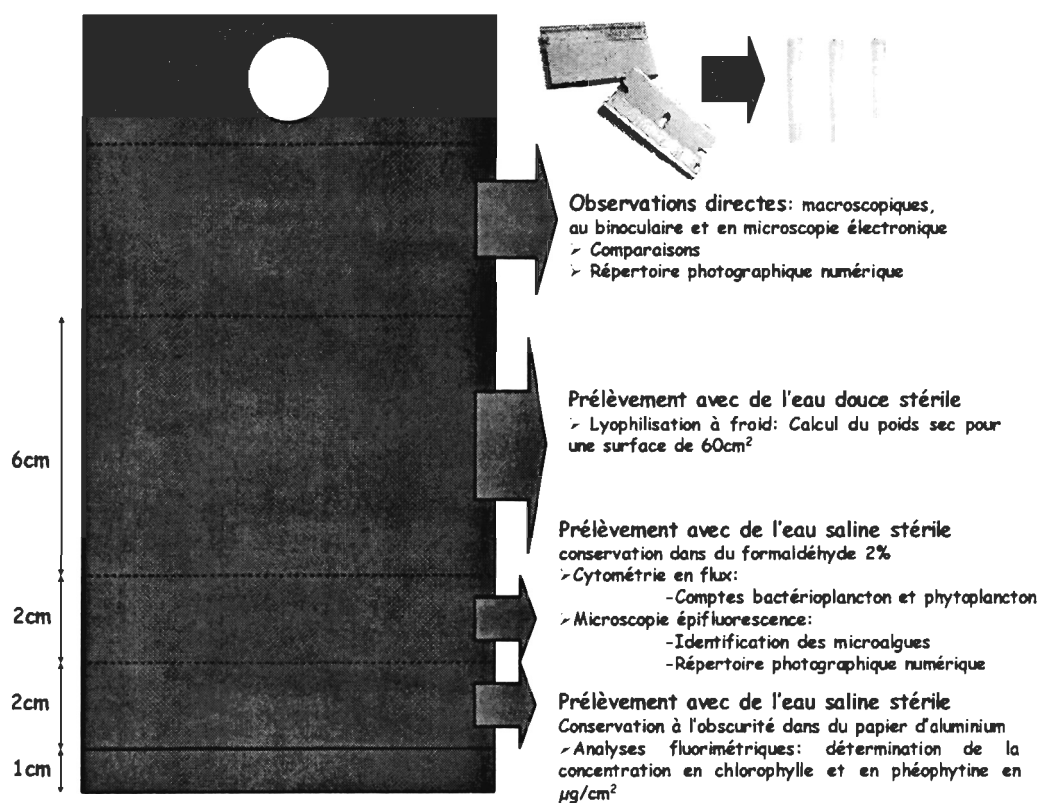


Figure 4 : Protocole expérimental des analyses biologiques et chimiques effectuées en laboratoire

## CHAPITRE II

### **2. EVALUATION OF THE ANTIFOULING ACTIVITY OF CHITOSAN POLYMERS AS ADDITIVE TO MARINE PAINT**

Bonnet, C., Pelletier, E., Lemarchand, K.

Institut des Sciences de la Mer de Rimouski  
Université du Québec à Rimouski

Manuscrit à soumettre au journal scientifique « Biofouling ».

## 2.1. ABSTRACT

Ecological concerns with tin and copper antifouling compounds have highlighted the need to develop environmentally friendly antifouling coatings. Chitosan, an abundant molecule derived from waste shrimp shells, has been investigated for a possible antifouling action against the first stages of colonization. Powdered chitosans of different molecular weight and different deacetylation degrees were tested and compared to actual industrial antifouling paints. A standard static panel test was performed in a shallow northern sea environment in the St. Lawrence Estuary. Results, obtained from innovating biological and chemical analyses of the first moments of biofouling, demonstrated an antibacterial action of chitosan polymers as powder additives to the *Easypoxy* polyurethane marine paint. No anti-algae action from chitosan was detected. Cuprous oxide paint *Bottomkote XXX* and specially the added organic biocides *Sea-Nine 211* and Copper *Omadine*, were efficient against bacteria and algae invasion. Although, the overall dry weight after 63 days of immersion was similar for all paints, suggesting no real long term efficiency from copper and biocides in cold waters. A higher number of microalgae species were present on the surface of chitosan paints and *Easypoxy* paints compared to cuprous oxide based paints. All methods used enabled to follow the progression of biofouling throughout time giving new insights on the first stages of the fouling process in the St. Lawrence Estuary. Analyses also permits to compare effectively the anti-fouling action against the first stages of colonisation of the various paints tested in a static immersion test.

## 2.2. INTRODUCTION

Being a source of environmental and economical problems, the invasive process of biofouling creates adverse effects on all immersed structures limiting their utilization and accelerating their corrosion (Yebra *et al.*, 2004). On ship hulls, it leads to speed reduction of 30 to 40%, to manoeuvrability loss and to an increased fuel consumption rising emissions of toxic compounds such as CO<sub>2</sub> and SO<sub>2</sub> (Bennett, 1996; Railkin, 2004; Stupak *et al.*, 2003; Yebra *et al.*, 2004).

Of all the solutions proposed to prevent biofouling, tributyltin self-polishing copolymer paints were the most successful above all and used on more than 70% of the world commercial fleet in mid-1990s (Bosselmann, 1996; Evans *et al.*, 2000). Unfortunately, it also was found to be the most toxic substance ever introduced in the marine environment with harmful effects to non-target organisms (Goldberg 1986 in Evans *et al.*, 1995). National regulations around the world were forced and ban of the application of TBT-based antifouling paints for 2003 and of the presence of those paints on the surface of vessels for 2008 was officially requested at the International Convention held in 2001 (Champ, 2001 in Yebra *et al.*, 2004). Copper paints with organic booster biocides are used as the major components of the tin-free alternative antifouling agents (Voulvoulis *et al.*, 1999). So far, even if those booster biocides appear to be cost effective, too little information about their fate and toxicity in the marine environment make accurate risk assessments difficult (Evans *et al.*, 2000; Voulvoulis *et al.*, 1999). Stable degradation products could cause environmental problems by their increasing concentration. None of the existing and available alternatives have been yet accepted and approved on a global basis (Champ, 2001; Evans *et al.*, 2000).



Compounds isolated from marine organisms such as bacteria, algae, sponges, cnidaria, bryozoa, chordate and other sessile benthic invertebrates were tested against biofouling (Armstrong *et al.*, 2000; Burgess *et al.*, 2003; Callow & Callow, 2002; Clare, 1996; Diers *et al.*, 2004; Fusetani, 2004; Hellio *et al.*, 2001; Henrikson & Pawlik, 1995). Few were ecologically relevant and some proved to be also highly toxic to non-targeted marine macroorganisms (Callow & Callow, 2002; Fusetani, 2004).

Chitin is a naturally abundant mucopolysaccharide and a major constituent of the exoskeleton of crustaceans, insects and molluscs (Ravi Kumar, 2000). Chitosan, obtained from the partial deacetylation of chitin, possesses antimicrobial properties against a number of organisms including bacteria, fungi and algae (Le Roux *et al.*, 2005; Roller & Covill, 1999). Those specific properties of the polymer are particularly interesting in the battle against fouling microorganisms. It actually makes the investigation of chitosan as a marine antifouling paint additive to limit or prevent the growth of the first stages of biofouling worth it. However, even if this hypothesis presents a good potential, the activity of chitosan is influenced by various factors like the type of chitosan used, the degree of polymerization and deacetylation (Kendra & Hadwiger, 1984; No *et al.*, 2002).

This paper reports the evaluation of antifouling activities of chitosan polymers as additives to marine paint in a northern marine coastal environment. The development of biological and chemical methods to determine the progression of biofouling in time is also presented.

## 2.3. MATERIALS AND METHODS

### 2.3.1. Chitosan preparation and production

Chitosan was prepared from waste shrimp shells of *Pandalus borealis* from *Les Pêcheries Marinard Inc.*, by successive deproteinisation, demineralisation and deacylation of chitin. The average molecular weight of different polymers of chitosan was determined by HPLC on two GPC columns at 35°C and 0,25M of acetate buffer in mobile phase (0.8 mL/min). Dextran standards (Sigma-Aldrich, Inc.) from 50 to 4500 KDa were used. Degree of deacylation was calculated by colloidal titration with 0.05 % potassium polyvinyl sulfate (PVSK) and 0.2% of toluidine. Partial depolymerization was performed by hydrolysis with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or enzyme hydrolysis with mildew.

### 2.3.2. Sampling device

Steel panels of 10 cm X 20 cm with a 2 cm diameter centered hole 1 cm from the top were used. Abrasive blasting of the panels, cleaning and drying were performed before pretreatment with one coat of primer (Interprotect 2000E, Interlux®). Paint was sprayed on both sides of the panels for the first test series. Due to technical difficulties, paint was applied with a paint brush for the second test series. Panels were vertically and randomly framed in triplicate on ABS tubes of the exposure racks (following ASTM 1998 protocol, Figure 5). Each rack was attached to the East Rimouski pier floating raft (48°28' N 68°30'W), in the St. Lawrence Estuary with a south west sun exposition and immersed at 50 cm below the water level (Stupak *et al.*, 2003).

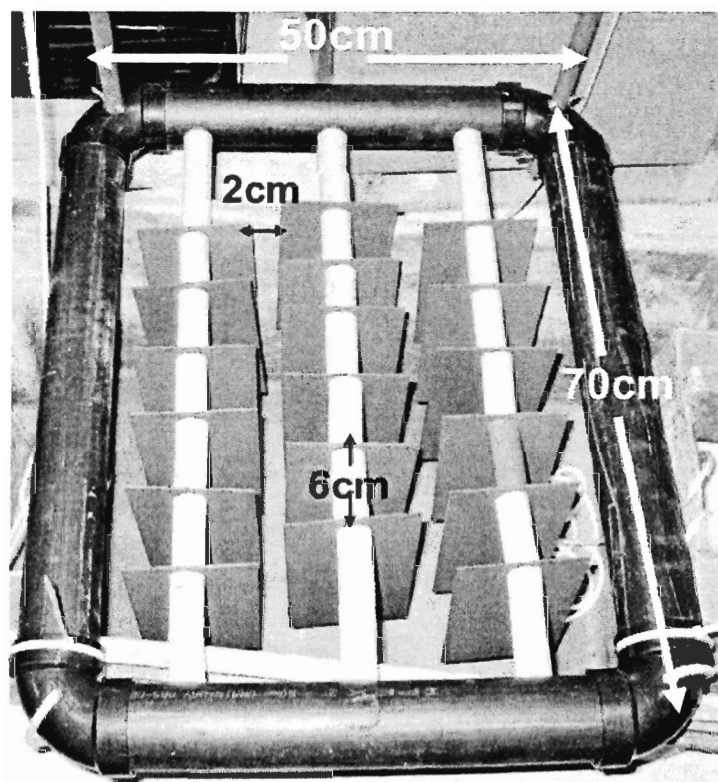


Figure 5: Exposure rack with panels framed

Table 7: Industrial and chitosan paints used and identification given in the text

<b>Industrial Name</b>	<b>Identification</b>
Cuprous oxide paint ( <i>Bottomkote XXX</i> , Interlux)	<i>CuO</i>
Isothiazolone. <i>Sea-Nine 211</i> (Rohm & Haas Company, Philadelphia, U.S 2002.), concentrated 5% in copper paint	<i>SN</i>
Copper pyrithione, Copper <i>Omadine</i> (Arch Chemicals, Inc., Norwalk, U.S. 1999), concentrated 5% in copper paint	<i>Oma</i>
Silicon-polyurethan. <i>Easypoxy</i> (Pettit Marine Paints)	<i>Ep</i>
<b>Chitosans * (all added in <i>Easypoxy</i> paint)</b>	
Chitosan 100% of deacylation, 480 KDa, concentrated 5% (w/v)	<i>C1</i>
Chitosan 100% of deacylation, 480 KDa, concentrated 20% (w/v)	<i>C2</i>
Chitosan 88% of deacylation, 260 KDa, concentrated 5% (w/v)	<i>C3</i>
Chitosan 96% of deacylation, 34 KDa, concentrated 5%, (w/v) treated with H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	<i>C4</i>
Chitosan 100% of deacylation, 140 KDa, concentrated 5%, (w/v) incubated with mildew	<i>C5</i>

\* all chitosans were pulverized 60 mesh prior to use

### 2.3.3. Commercial and chitosan paints

Three commercially available paints, cuprous oxide paint *Bottomkote XXX*<sup>TM</sup> from Interlux®, liquid additive to cuprous oxide paint *Sea-Nine 211*<sup>TM</sup> from Rohm & Haas Inc. and powder additive to cuprous oxide paint Copper *Omadine*<sup>TM</sup> from Arch Chemicals Inc., and five different chitosan paints were compared for their antifouling properties (Table 7). *Easypoxy*<sup>TM</sup> from Pettit Marine Paints, paint without antifouling component, was used as a standard of non-toxic surface. All paints used were red to minimise the possible color effect on the biofouling.

Table 8: Panel tests sampling times

Sample number	<u>First panel test</u>
	Elapsed time from the beginning (days)
0 (Sea water sampled)	0
1	1
2	4
3	14
4	21
5	28
6	56
7	63

Sample number	<u>Second panel test</u>
	Elapsed time from the beginning (days)
0 (Sea water sampled)	0
1	1
2	7
3	35

#### 2.3.4. Sampling procedure

Two different static immersion panel tests were performed (Table 8). The first one included seven racks all sampled at different times over a two-month period. It was immersed earlier in the summer and compared *Ep*, *CuO*, *Oma*, *SN*, *C1* and *C2* paints. The second one, performed over a 35-day period, included 3 racks and compared *Ep*, *CuO*, *Oma*, *SN*, *C1*, *C3*, *C4* and *C5* paints. An exposure rack was removed and inspected at each sampling time. Organic material was scrapped off with a sterile razor (Araya *et al.*, 2003). Material collected from a 60 cm<sup>2</sup> surface with sterile fresh water was freeze-dried. A surface of 20 cm<sup>2</sup> was sampled with sterile saline water (SSW: 33gNaCl/L), preserved in formalin 2% at -80°C and analysed in flow cytometry, epifluorescence microscopy and in inverted microscopy. Organic material collected

from another 20 cm<sup>2</sup> surface with SSW was preserved at dark at -80°C and analysed in fluorimetry. After sampling, panels were directly frozen at -20°C and later on observed in scanning electron microscopy.

### **2.3.5. Analysis of physiochemical parameters**

Water temperature and salinity were measured *in situ* using YSI electrode model 10/10 FT and pH was measured using a HANNA instruments model HI9025. Dissolve oxygen was measured with a YSI probe model 58 and solar radiation data were furnished by the IML-4 weather station (48°40'N – 68°35'W). Nutrients and suspended organic particles were determined after water filtration on GSWP 25 mm, 0.22 µm pore sized and GFF 47 mm filters, respectively.

### **2.3.6. Direct and microscopic observations**

Digital photographic records were performed and used to compare biofouling progression. Frozen steel panels were thawed 15 min prior to direct analysis by scanning electron microscope (JEOL, JSM-6460LV). From the thawed samples preserved in formalin, as previously described, 100µL diluted in SSW were observed in inverted microscopy at 40X (Wild Heerbrug, according to procedures described in Lund *et al.*, 1958) and pictures of the observations taken. Prior to observation in epifluorescence microscopy, 500µL were stained 15 min at 20°C in the dark with 0.2% SYBR green I (Molecular Probes Inc.). After staining, bacteria and algae from the biofilm were trapped onto black polycarbonate membranes (Pore size 0.2 µm, Osmonics, Inc.) and observed with Olympus BX40 microscope. FITC filter at 530 nm was used for direct observation and photographic records.

### 2.3.7. Flow cytometry

Samples preserved at -80°C in 2% formalin, as previously described, were thawed and 1mL was used for flow cytometry analysis (FACSort, Becton Dickinson). Bacterial population samples were stained with the high-affinity nucleic acid SYBR green I (according to procedures described in Lebaron *et al.*, 2001) and natural fluorescence of the phytoplankton population was detected. An internal standard mixture, consisting of 0.2µm diameter beads (Polysciences) was added to each sample. Analyses were performed on CellQuest software version 1.0 (Becton Dickinson Immunocytometry Systems). An isolated bacterial population, formed of cells smaller than 2µm, was detected and measured. Bacterial counts were measured per cm<sup>2</sup> as a reference of surface colonisation as following:

$$[(x / y*z)*a ] / 20 \text{ cm}^2 = \text{number of bacteria} / \text{cm}^2$$

x = count of the isolated bacterial population

y= time of sampling in seconds

z= flow of sampling in µL/second

a= number of µL in the sample

### 2.3.8. Fluorimetry

Samples preserved at -80°C at dark, as previously described, were thawed and 1mL was analysed in fluorimetry (following Trees *et al.*, 2000). Briefly, samples were added in a 90% acetone solution, quickly sonicated (Sonicator Ultrasonic Processor XL) and incubated 24h at 4°C for pigment extraction. Analysis was performed with a Turner Designs Fluorometer, Model 10-005 and concentrations expressed in ng of chlorophyll *a* and phaeo-pigments per cm<sup>2</sup> were calculated using Strickland & Parsons (1972) method.

### **2.3.9. Dry weight**

Samples preserved at -80°C in filtered fresh water, as previously described, were freeze-dried with a Uni-Trap model 10-100, from Virtis. Weights were expressed in mg (dry weight) per m<sup>2</sup>.

### **2.3.10. Statistical tests**

Differences in the mean values of biofouling growth in time between each paints were determined using a two-way analysis of variance (ANOVA) (Table 9). Results from flow cytometry and fluorimetry analyses were log<sub>10</sub> transformed to obtain a normal distribution of frequencies. Although the transformation did not fully normalize the data, ANOVAs are robust to small variations of normality (Scherrer, 1984; Zar, 1984; Underwood, 1997). Data from dry weight analyses were already following a normal distribution. Results were considered homogeneous given that analysis of variance is relatively robust to heterogeneous variances, particularly if there are many independent estimates of variance and if the design is balanced (Box, 1953; Underwood, 1997). Three replicates were used in all analyses except analyses obtained from the rack sampled after 7 days within the second experiment. Technical problems reduced n to 2 for this sampling time. No area of interference was calculated. The geographical position of all racks was considered having no effects on the results. The analysis of variance was followed by a Tuckey post-hoc test. Probabilities lower than or equal to 0.05 were considered significant. Systat Software 10.2® was used to perform the statistical analyses.



Table 9: Two-way ANOVAs comparing all the different paints used at all the different times sampled for all biological and chemical analyses performed. The data were log 10 transformed for cytometry and fluorimetry.

	Source	Experiment 1				Experiment 2			
		df	MS	F-ratio	p	df	MS	F-ratio	p
<b>Cytometry</b> (Bacterial analyses)	Time	2	32.50	245.20	≤0.001	1	28.87	915.77	≤0.001
	Paint	5	0.98	7.37	≤0.001	7	0.30	9.49	≤0.001
	Time*Paint	10	0.32	2.40	0.027	7	0.09	2.68	0.026
	Error	36	0.13			32	0.03		
<b>Cytometry</b> (Phytoplankton analyses)	Time	2	4.03	139.20	≤0.001	1	0.32	11.39	0.002
	Paint	5	0.47	16.21	≤0.001	7	0.17	6.06	≤0.001
	Time*Paint	10	0.57	19.68	≤0.001	7	0.26	9.11	≤0.001
	Error	36	0.03			32	0.03		
<b>Fluorimetry</b> (Chlorophyll a)	Time	6	245.99	420.71	≤0.001	2	1.50E+12	43.84	≤0.001
	Paint	5	21.17	36.20	≤0.001	7	1.56E+11	4.54	0.001
	Time*Paint	30	3.41	5.83	≤0.001	14	1.54 E+11	4.48	≤0.001
	Error	84	0.59			48	3.43 E+10		
<b>Lyophilisation</b> (Dry weight)	Time	6	0.01	99.54	≤0.001	2	0.00	69.14	≤0.001
	Paint	5	0.00	4.88	0.001	7	0.00	1.15	0.352
	Time*Paint	30	0.00	1.46	0.089	14	0.00	1.93	0.046
	Error	84	0.00			48	0.00		

Using the photographic record obtained from microscopic epifluorescence, multivariate analyses were performed for the first experiment. Differences in the structure of whole assemblages among the 6 paints were identified by non-metric multi-dimensional scaling (nMDS) ordination on presence-absence data, using the Bray-Curtis similarity measure (Clarke, 1993). The presence or the absence of bacteria, bacterial clusters and various morphologies of microalgae were specifically observed.

## 2.4. RESULTS

### 2.4.1. Physiochemical parameters

The water temperature at East-Rimouski pier in the St. Lawrence Estuary (48°28'N – 68°30'W) fell from 13.7°C to 7.1°C throughout the experiment and a decrease of solar radiation from 47.5 E/m<sup>2</sup>•day to 17.5 E/m<sup>2</sup>•day was observed. Table 10 shows measures obtained for dissolved oxygen concentration, relatively stable, for salinity, varying with tides from 19.7 to 24.5 and pH, varying 6.86 to 8.08. A peak of 90.43 mg/L of suspended particular organic material (SPOM), a high concentration of silicates, 22.52 µmol/L, and maximum values of phosphates, 1.50 µmol/L, and nitrates, 8.54µmol/L were observed at the end of August following stormy conditions.

Table 10: Water specificity and nutrient concentrations at time zero for the first and the second experiment, the middle and the end of both experiments

Date	Weather forecast	Salinity	pH	Oxygen (mg/L)	Phosphates (µmol/L)	Nitrates (µmol/L)	Silicates (µmol/L)	SPOM (mg/L)
Time 0, first rack	sun	24.3	8.08	9.00	0.73	6.69	13.48	2.63
Time 0, second rack	rain	24.5	6.86	8.20	1.50	8.54	22.52	90.43
Middle	clouds	19.7	8.02	9.70	0.72	5.39	25.85	3.55
End	sun	23.3	7.78	9.50	0.81	5.82	11.31	3.22

#### 2.4.2. Bacterial analyses

Only samples from the first two weeks were analysed in flow cytometry. Further analyses of individual cells from the biofilm were limited by the growing size of the aggregates. Within experiment 1 (Figure 6A), after 24h, *Ep* presents significantly higher concentration of bacteria on its surface than *C1*, *CuO*, *Oma* and *SN*. Data showing an antibacterial action of the chitosan paint *C1* (480KDa, 5% w/v, 100% deacylated), as good as the already existing antifouling paints. After 4 days, *Oma* presents significantly lower bacterial cells on its surface than *CuO*, *Ep* and *SN*, but do not present significant differences with *C1* or *C2*. Those results suggest an antimicrobial action of both chitosan formulated paints. Moreover, an action lasting longer than *CuO* or *SN* paints. After 14 days, the tendency of *Oma* and *C2* (480KDa, 20% w/v, 100% deacylated) to be less colonised by bacteria is still visible. On a longer period of immersion *C2*, appears to be more effective against bacteria than *C1*, giving importance to the concentration of chitosan in the paint.

Within experiment 2, (Figure 6B) after 24h, no significant difference is noted. However, *C4* (36KDa, 96% deacylated) appears to be less colonised than *C1* ( $P=0.058$ ). After 7 days, *SN* is significantly less populated than all other paints except *Oma*. For this sampling time the *n* was reduced due to technical problems. For both experiments, the biofouling process was easily followed as the bacterial cells numbers obviously increased with time of soaking.

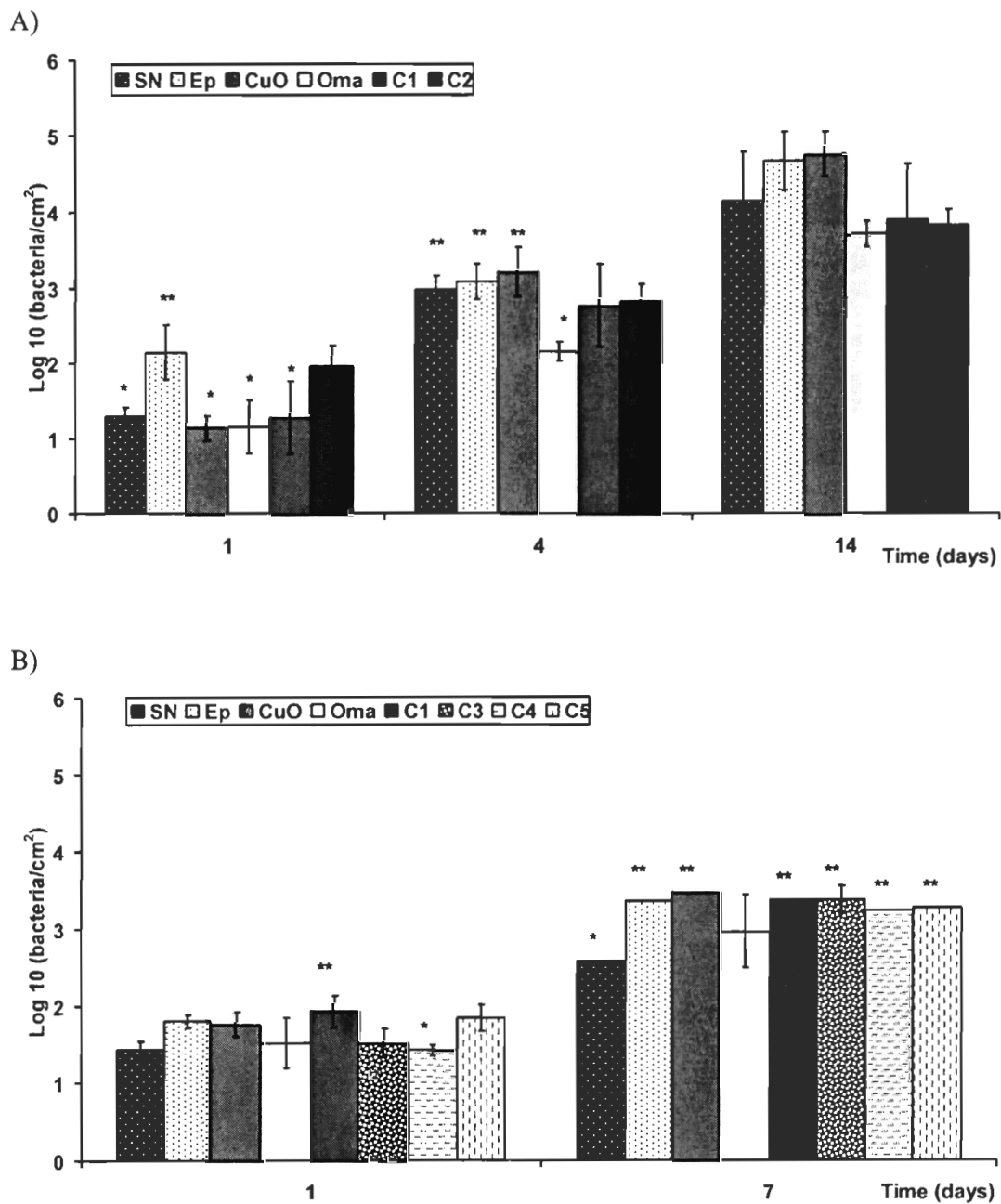


Figure 6: Concentration of bacteria/cm<sup>2</sup>

A) After 1, 4 and 14 days. Experiment 1, B) After 1 and 7 days. Experiment 2. Standard deviation is showed with the error bars. Columns with one asterisk (\*) present values significantly different from columns with two (\*\*). Columns without asterisk are not significantly different from those with one or those with two asterisks.

### 2.4.3. Algae analyses

Of the six paints compared in the first experiment, *Ep*, *C1* and *C2* present significantly higher concentrations of phytoplankton cells on their surfaces than any other paints after 14 days (Figure 7). Results also observed in fluorimetry: after 14 days *CuO*, *Oma* and *SN* do present the lowest concentration of chlorophyll *a* (Figure 8A). Although, after 28 days the algae concentrations on *CuO* equal concentrations observed on *Ep*, *C1* and *C2* (Figure 8A). On panel, the overall chlorophyll *a* concentrations clearly increase with time until 56 days, after what they reach a plateau phase, all paints presenting similar concentrations of pigments (Figure 8A).

Processed on a shorter period of time, experiment 2 does not show a plateau phase after five weeks of immersion. Though, results are in good accordance with experiment 1: *SN*, *CuO* and *Oma* demonstrate significantly lower concentrations of pigment then all chitosan paints and *Ep* (Figure 8B). After 35 days, only *SN* and *Oma* still present lower concentrations of chlorophyll *a* (Figure 8B).

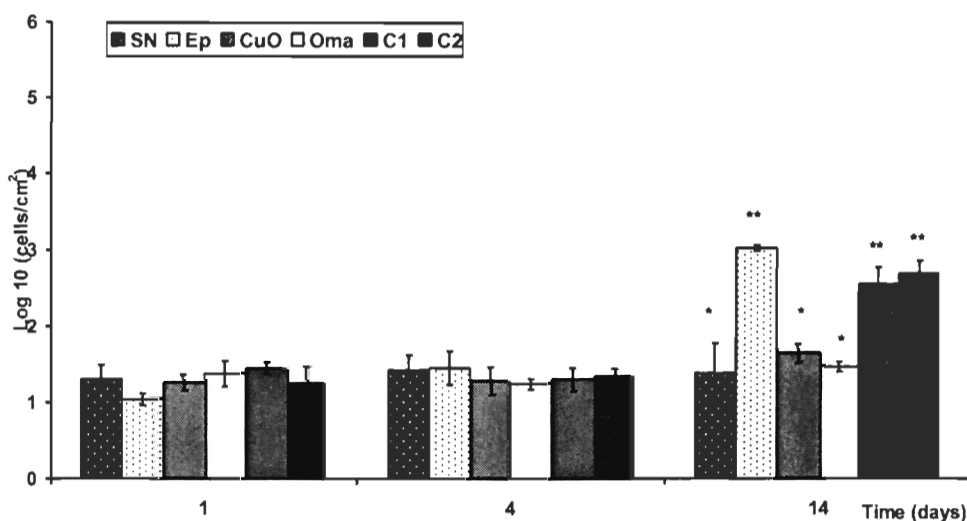
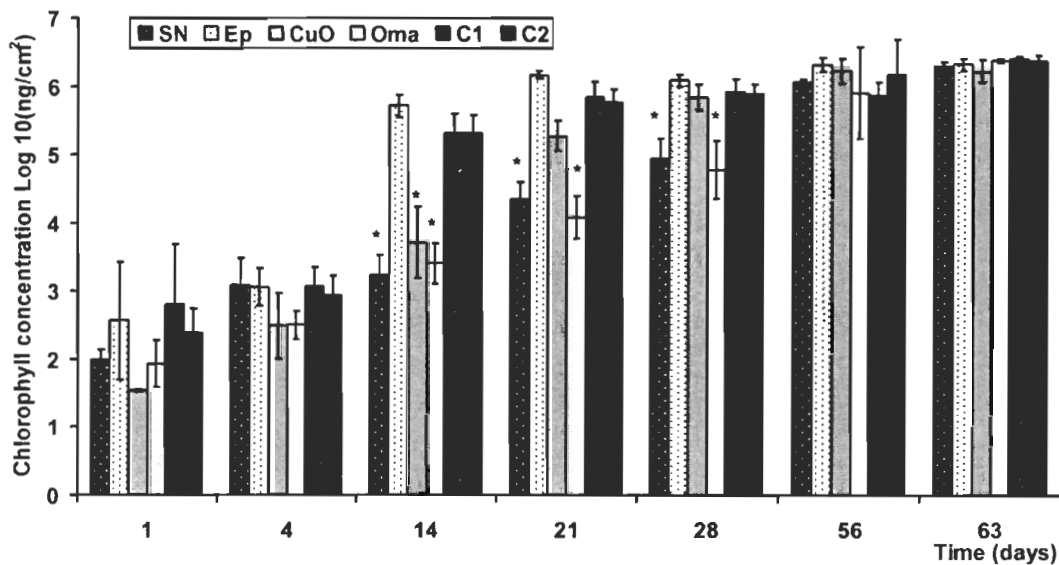


Figure 7: Concentration of phytoplanktonic cell/cm<sup>2</sup> after 1, 4 and 14 days. Experiment 1. Standard deviation is showed with the error bars. Columns with one asterisk (\*) present values significantly different from columns with two (\*\*). Columns without asterisk are not significantly different from those with one or those with two asterisks.

A)



B)

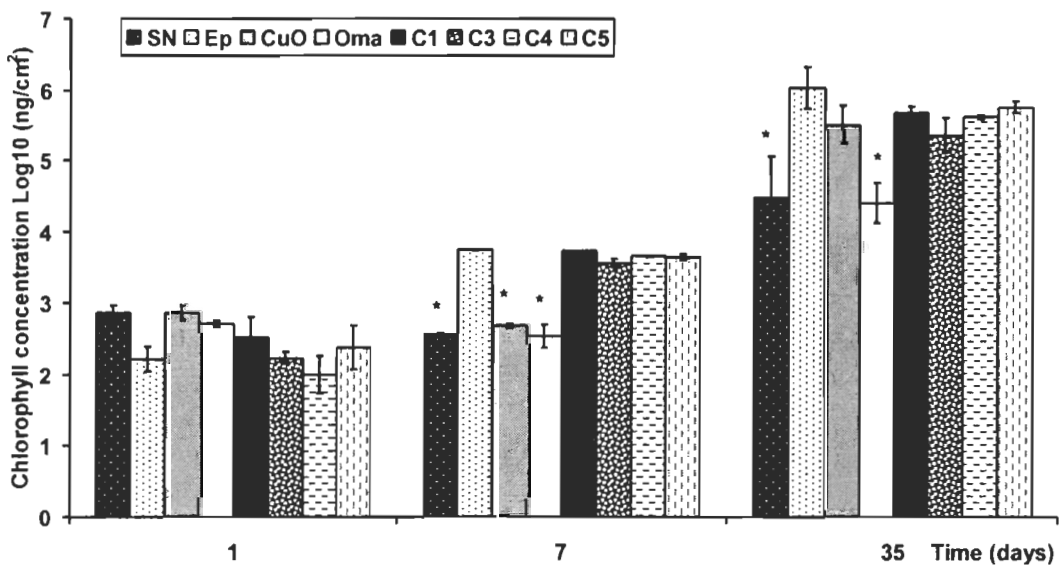


Figure 8: Chlorophyll a in ng/cm<sup>2</sup>. A) After 1, 4, 14, 21, 28, 56 and 63 days Experiment 1. B) After 1, 7 and 35 days, experiment 2. Standard deviation is showed with the error bars. Columns with one asterisk (\*) present values significantly different from columns with two (\*\*). Columns without asterisk are not significantly different from those with one or those with two asterisks.

#### 2.4.4. Microscope observations

Based on the photographic record obtained from epifluorescence microscopy, a non-metric multivariate analysis on the presence-absence of bacteria, bacterial clusters and of the various morphologic forms of microalgae observed, was performed. Figure 9 represents the differences and similarities between the paints of the first experiment. *Ep*, *C1* and *C2* are similarly populated. *CuO*, *Oma* and *SN*, are more spread but still relatively similar one to the others. Although, *CuO*, *Oma* and *SN* have no common point in their biofouling communities assemblages with *Ep*, *C1* and *C2* paints. The stress indication of 0.06 reveals an excellent graphical representation of the differences and similarities between the paints in time.

A closer look to painted panels reveals that within the first experiment, after 14 days of immersion, a filamentous algal film is perceptible on *C1*, *C2* and *Ep* and slightly on *CuO*. *Oma* whereas *SN* panels are not colonized by algae. After 21 days, *C1*, *C2* and *Ep* panels are completely covered with an algal film, composed of various species of diatoms (Figure 10 A & B). *CuO* is trailed with brown and sticky algae obviously different with the ones present on *C1*, *C2* and *Ep* (Figure 10 C). On *Oma* and *SN* algae cells are still not visible (Figure 10 D) in agreement with fluorimetry results. After 28 days, macroalgae are visible on *Ep* panels, as well as on *C1* and *C2*, though in a lower proportion. *CuO* is covered with a brown sticky layer of algae, the same that are starting to invade *SN* and *Oma*. After 56 days of immersion, all panels are well colonized by algae but species present on copper based paints (*CuO*, *Oma* and *SN*) are different from those detected on *Easypoxy* and chitosan paints (Figure 11 A to F). After 63 days, even *SN* and *Oma* panels are completely covered with algae.

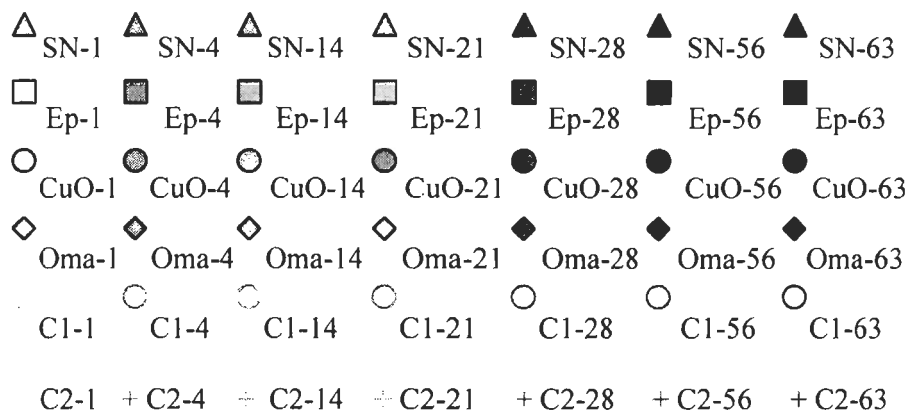
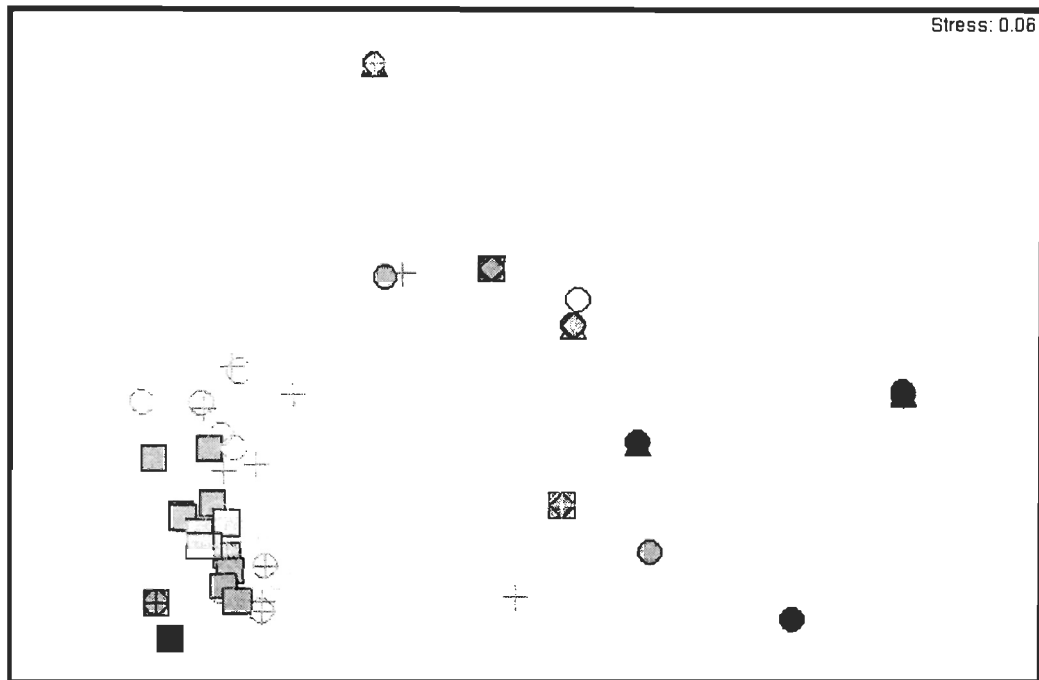


Figure 9: Structure of the whole assemblage, nMDS ordination on presence-absence data, using Bray-Curtis similarity measures. Bacteria, bacterial clusters and variation of microalgae morphology observed. Stress  $\leq 0.2$  demonstrate a good graphical representation of the differences and similarities of the paints.



On panels of experiment 2, small differences are visible after 7 days in epifluorescence microscopy. Few unicellular algae are present on *C1*, *C3* and *C5* and bacterial clusters are visible on *Ep*. After 35 days, brown macroalgae are present on *Ep*, as well as on *C3* and *C5*, in lower concentration, and few specimens are visible on *C4*. *CuO* is covered with brown algae and traces of those algae are visible on *SN* and *Oma*. In microscopy, *Ep*, as well as *C3* and *C5*, are covered with various genus of microalgae. Specimens are also noted on *C1* and *C4*. *CuO* is covered with a bacterial biofilm and populated with different microalgae. On *SN*, the bacterial biofilm is well developed and algae present are similar to those growing on *CuO*, in lower concentration. On *Oma*, only a bacterial biofilm is visible.

Observations performed in inverted microscopy on samples immersed 63 days make identification of diatoms possible. Moreover, it confirms the presence of two different communities involved in the biofouling process of either cuprous oxide (*SN*, *CuO*, *Oma*) or *Easypoxy* (*Ep*, *C1*, *C2*) paints. More species of microalgae are visible on *Ep* paints. Diatoms such as *Navicula* spp., *Cocconeis* spp., *Nitzshcia* spp., *Fragilaria* spp., and *Amphora* spp. are observed (Bérard-Thériault *et al.*, 1986 ; Cardinal *et al.*, 1984; Cardinal *et al.*, 1986 ; Chabot & Rossignol, 2003 ; Poulin *et al.*, 1984abc ; Poulin *et al.*, 1987 ; Poulin *et al.*, 1990. Figure 12 A). *Amphora* spp., different species than those observed previously, mainly compose the diatom population present on cuprous oxide paints (Figure 12 B). Diversity of the microalgal population observed on chitosan and *Ep* paints is also visible in electron microscopy, where *Navicula* spp. and *Cocconeis scutellum* have been identified (Cardinal *et al.*, 1984; Cardinal *et al.*, 1986 ; Poulin *et al.*, 1984a ; Poulin *et al.*, 1987. Figure 13 A, B &C).

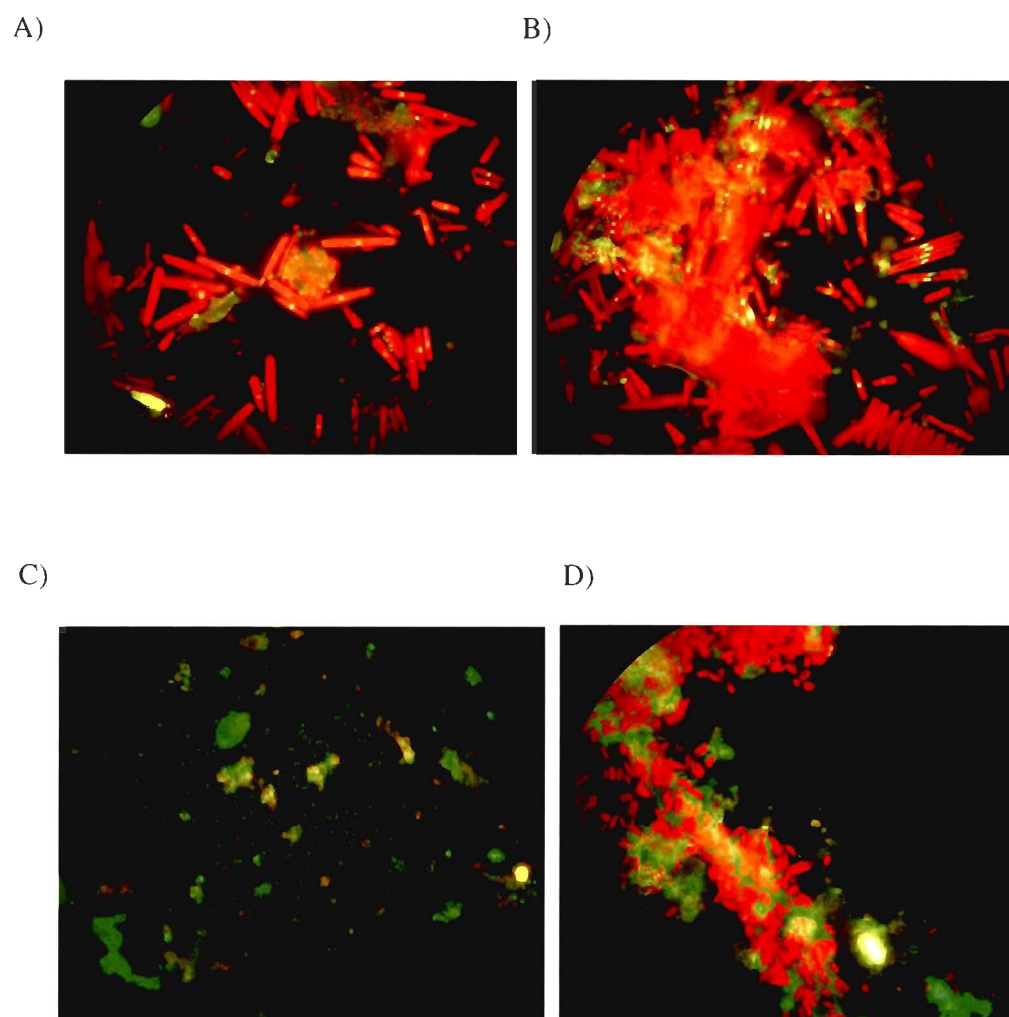


Figure 10: Epifluorescence microscopy 60X, experiment 1 after 21 days of immersion. A) *CI*, B) *Ep*, C) *CuO*, D) *SN*. Yellow: salt crystals, Green: bacteria, Red: microalgae.

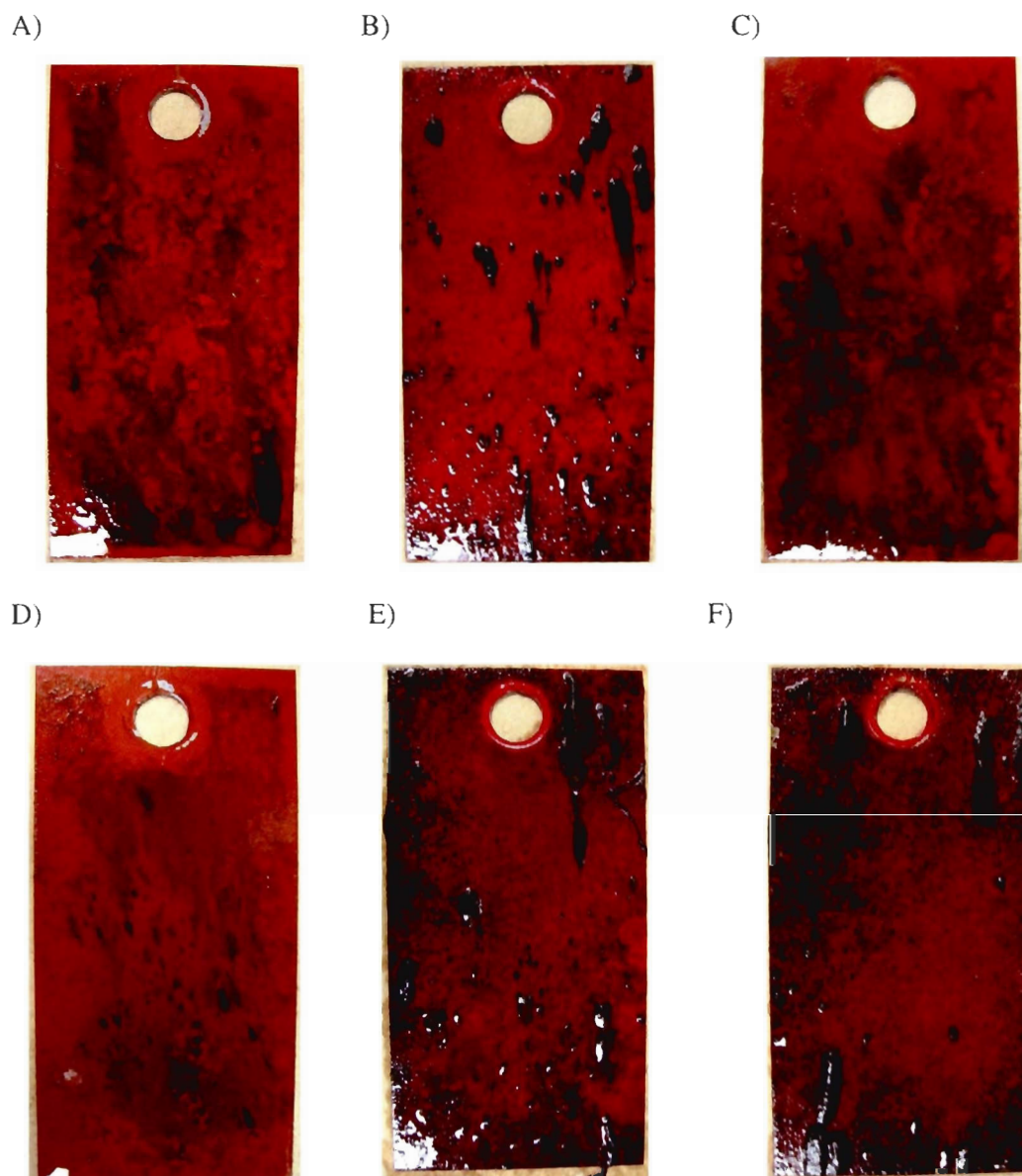
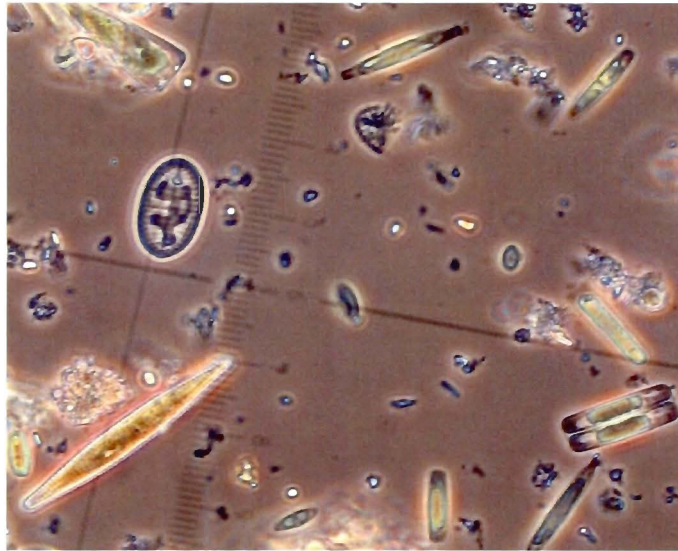


Figure 11: Panels of experiment 1 after 56 days of immersion  
A) SN, B) Ep, C)CuO, D)Oma, E)C1, F) C2.

A)



B)

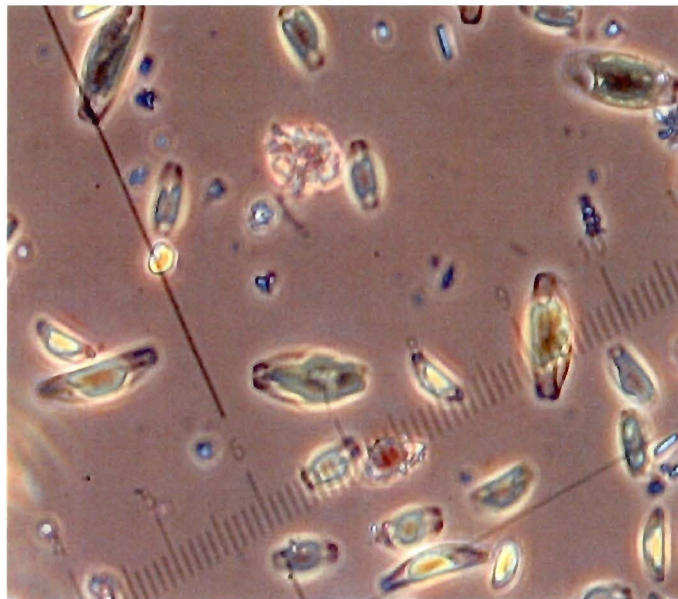


Figure 12: Inverted microscopy, 40X, experiment 1 after 63 days of immersion.  
A) *Ep*, B) *Oma*

A)



B)



C)

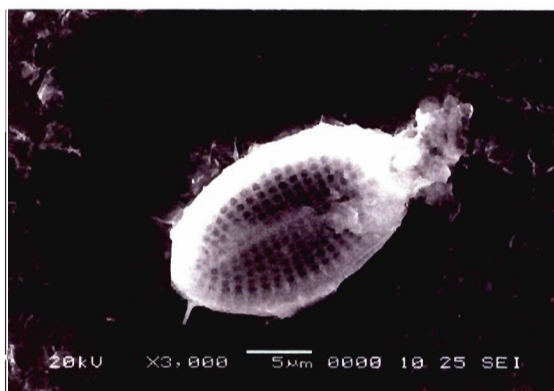
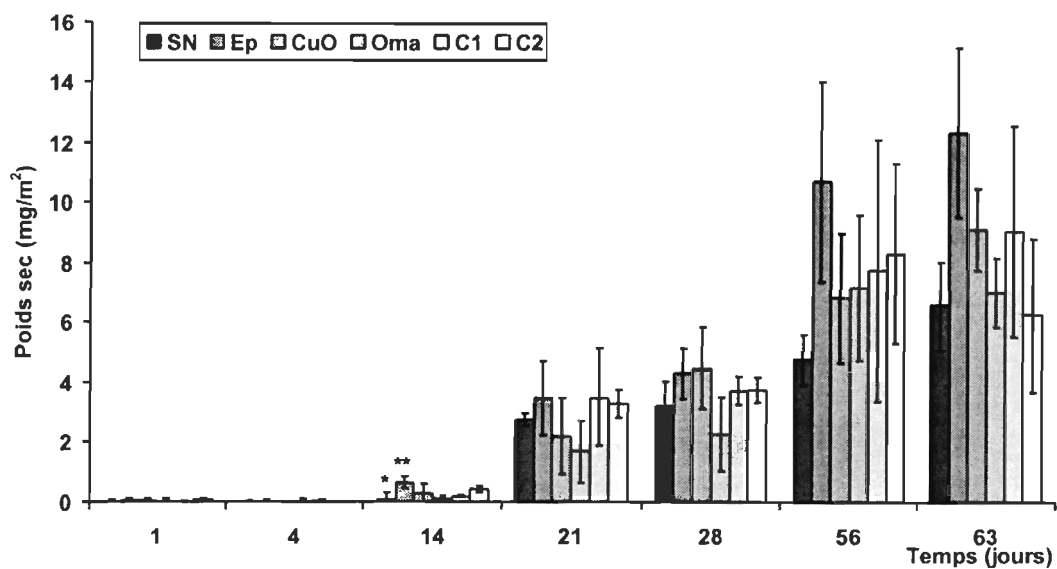


Figure 13: Scanning electron microscopy. A) *Navicula* sp. on C4, B) *Navicula* sp. on Ep, C) *Cocconeis scutellum* on Ep. (Cardinal *et al.*, 1984; Cardinal *et al.*, 1986 ; Poulin *et al.*, 1984a ; Poulin *et al.*, 1987).

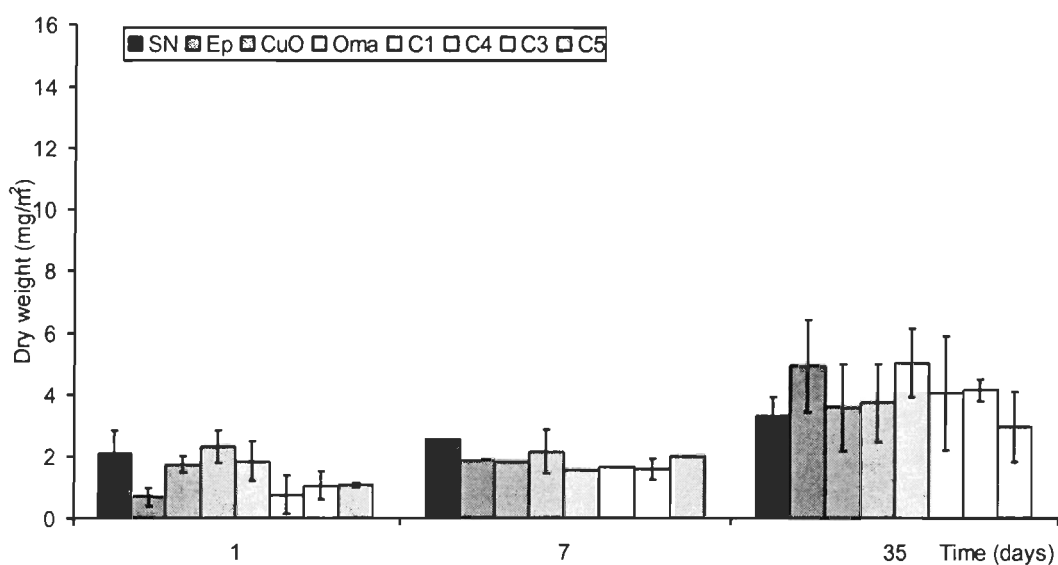
#### 2.4.5. Dry weight

An increase of the dry weight of the biomass in time is undeniable. No significant differences in the total biomass weighted between paints, even after 63 days of immersion, are observed (Figure 14 A & B). Although, *Ep* has the tendency to present higher values of biomass after 56 days and with  $P=0.065$ , C2 could be suggested to present the lowest values of biomass on its surface after 63 days. After 14 days, a small difference is detected; *SN* values of dry weight being significantly lower (Figure 14 A). The weighted dry organic material was of minimal quantity carrying high variability of measures. Weight calculated ranges from  $0.003 \text{ mg/m}^2$  after 24 h to  $8.37 \text{ mg/m}^2$  after 63 days for the first experiment. For the second experiment it ranged from  $1.45 \text{ mg/m}^2$  after 24 h to  $3.97 \text{ mg/m}^2$  after 35 days.

A)



B)

Figure 14: Dry weight in mg/m<sup>2</sup>

A) After 1, 4, 14, 21, 28, 56 and 63 days. Experiment 1. B) After 1, 7 and 35 days. Experiment 2. Standard deviation is showed by the error bars. Columns with one asterisk (\*) present values significantly different from columns with two (\*\*). Columns without asterisk are not significantly different from those with one or those with two asterisks.

## 2.5. DISCUSSION

Marine antifouling coatings represent the most efficient, most cost effective and easiest way to prevent the undesirable accumulation and invasion of microorganisms, plants and animals on immersed structures. Targeting the early stage of the biofilm, bacteria and other unicellular organisms, leads to a surface lacking the necessary characteristics to permit the settlement of subsequent foulers such as algae and larvae (Burgess *et al.*, 2003). Therefore, the development of an antibacterial paint could prevent or at least retard further biofouling on marine structures. However, toxic compounds added to the paints, such as TBT, have generated undeniable damages to the aquatic environment and harmful effects to non-targeted marine organisms. The need for the development of an ecological paint has become a global concern. Several studies reported the incorporation of natural products in anti-fouling paint formulation (Armstrong *et al.*, 2000; Burgess *et al.*, 2003; Hellio *et al.*, 2001). However, no attempts have been reported to evaluate the potential of chitosan polymers as additives to a polyurethane-silicon marine paint. Using innovative methods to determine biofouling growth in time, the efficiency of those new paint formulations was compared to already existing commercial marine paints.

### 2.5.1. Bacteria

Nutrient levels, pH, temperature and oxygen concentration play a role in the rate of microbial attachment to the painted panels (Donlan, 2002). Particularly pH, as variation of the cation and anion concentrations imply a variation of forces of attraction and repulsion between negatively charged microbial cells and the painted surface



(Donlan, 2002). Variations of pH were considered to favour species rather than others but to have, on all paints, the same effect on the density of the microbial community. All physical and chemical parameters data were used to characterise the overall weather conditions in the northern sea waters of the St. Lawrence Estuary. Flow cytometry and epifluorescence microscopy were used to quantitatively compare the antibacterial activity of the paints used.

Chitosan C1 presents an interesting antibacterial action after 24 h, although in the second experiment C4 (36KDa) appears to be more efficient than C1 (480 KDa), suggesting an even better antibacterial action from the smallest chitosan after 24 h of immersion on the paints (Figure 5 A&B). As revealed in numerous studies (Jeon *et al.*, 2001; Kendra & Hadwiger, 1984; No *et al.*, 2002; Sekiguchi *et al.*, 1994; Stössel & Leuba, 1984; Tokura *et al.*, 1997; Zheng & Zhu, 2003), the molecular weight of chitosan has an influence on the antimicrobial activity. Even if conflicting results are reported, chitosan presenting molecular weight under 5 KDa or over 10 KDa seems to be the more efficient ones as long as their weight is over 750 KDa. On a long term trial, C2 definitely appears as the most promising antimicrobial chitosan used (Figure 5 B). This observation reveals the importance of the chitosan concentration in the paint throughout time. *In vitro*, a concentration of 1% w/v is enough to inhibit completely *E.coli*, *S.aureus*, *B.cereus* and *S.epidermidis* bacteria (Zheng & Zhu, 2003; Sekiguchi *et al.*, 1994). With concentrations below 2% w/v chitosan presents antibacterial activity against some genus of microorganisms involved in the biofouling process: *Pseudomonas*, *Vibrio* and *Bacillus* (Jumaa *et al.*, 2002; Sekiguchi *et al.*, 1994; No *et al.*, 2002).

The antimicrobial activity of chitosan was never directly evaluated in the marine environment as a paint additive and the needed concentration for an antibacterial action was then unknown. Between the two tested concentrations (5 and 20% w/v), the 20% w/v one seems the better at a long-term standing. Of all the polymers of chitosan used in this study, only C3 was less than 95% deacylated and it did not demonstrate any antibacterial activity. Expected results as it was previously demonstrated that the more the chitosan is deacylated the more it is antimicrobial (Stössel & Leuba, 1984; Jumaa *et al.*, 2002; Song *et al.*, 2002; Cuero, 1999).

A superior antibacterial activity of the additive *Omadine* over all other paints including the cuprous oxide paint alone was demonstrated. Results were in agreement with literature where Copper *Omadine* is reported to exhibit pronounced growth inhibiting activity against a broad spectrum of both gram negative and gram positive bacteria as well as, fungi, yeast and mold and to outperform all paints containing only cuprous oxide (Arch Chemicals, Inc., 1999). Even if the liquid additive *Sea-Nine 211* presents a better antibacterial activity than the cuprous oxide paint *Bottomkote XXX* alone, it is still not as good as *Omadine*. Although, the isothiazolone is said to have a broad spectrum activity against bacterial slime (Rohm & Haas Company, 2002).

### **2.5.2. Algae**

Chitosan is known to be an anti-algal polymer, controlling the growth of these organisms (Cuero & Lillehoj, 1990; Ravi Kumar, 2000). Its action was never directly tested in the marine environment as an anti-fouling additive. Within the present experiment the anti-algal activity of the various polymers of chitosan was not revealed and panels presented an algal growth closely similar to the positive control, panels

painted with *Ep* (Figure 6 & 7). All cuprous oxide based paints demonstrated an anti-algal action, *SN* and *Oma* additives being more efficient than any other paint on a long term point of view, from 14 to 28 days (Figure 6 & 7). However, even if the commercial additives were more active against algae until 35 days, after 56 all paints presented on their surfaces similar concentrations of chlorophyll *a* pigments (Figure 6 & 7). Those results suggest an inhibition of the anti-algae action of the biocides beyond 2 months of immersion in cold estuarine seawater.

Results presenting a better anti-algae action of the additives comparing to the cuprous oxide paint alone were anticipated. Diatoms, dominant in the microfouling biofilm, are known to be highly resistant to copper antifouling paints (Anderson *et al.*, 2003). The organic biocides are added to cuprous oxide paint to control the growth of resistant algae such as *Enteromorpha* spp., *Ectocarpus* spp., and *Achnanthes* spp. (Voulvoulis *et al.*, 1999). *Sea-Nine 211*<sup>TM</sup>, is even related to have a broad spectrum activity against diatoms, algae, barnacles, tubeworms, hydroids, bryozoans and tunicates (Rohm & Haas Company, 2002).

Fluorimetry revealed to be a good and simple tool to estimate the evolution of algal biomass with time, but it does not enable to differentiate between species involved in the colonisation process of the painted panels. Visual observations showed differences of alga genus colonising cuprous oxide based paints (*SN*, *Oma*, *CuO*) and *Easypoxy* based paints (*Ep*, *C1*, *C2*, *C3*, *C4*, *C5*). These variations in the composition of the communities were confirmed by epifluorescence and inverted microscopy. A higher number of species were visible on *Ep* paints, diatoms such as *Navicula* spp., *Cocconeis* spp., *Nitzschia* spp., *Melosira* sp., *Fragilaria* spp., *Licmophora* spp. and some species of *Amphora* spp. are observed (Poulin *et al.*, 1984a, 1984b, 1984c, 1987, 1990; Bérard-

Thériault *et al.*, 1986; Cardinal *et al.*, 1984, 1986). The frequent occurrence on test surfaces of the genus *Licmophora* spp., *Navicula* spp. and *Nitzschia* spp., is related in the literature (WHOI, 1952), but types and numbers of native fouling organisms differ within regions (Brady, Jr., 2000), especially in regions where marked seasonal variations in temperature occur (WHOI, 1952). As a matter of fact, this study, performed in the shallow waters of the St. Lawrence Estuary gives new insights on the fouling microalgal community present in this particular region. On the cuprous oxide paints, the diatom population was mainly composed of *Amphora* spp. Results expected and confirming the resistance of this genus of diatom to copper (Brown *et al.*, 1988).

The increase of the nutrient concentration, following stormy conditions at the end of August, was correlated with an increase of macroalgae growth clearly visible with the photographic record and detectable in epifluorescence microscopy. Other factors could also be involved in this sudden algal growth. Although, the decreasing solar radiation and temperature throughout the experiment probably reduced the algae growth rate (Yebra *et al.*, 2004; Thériault *et al.*, 1990).

### **2.5.3. Total biomass**

Although the biofouling on a submerged surface may be described by counting organisms and by identifying species, the whole has specific properties additional to those of the separate individuals. Dry weight analysis considers living and non-living organisms and gives a good estimation of the total biomass of biofouling with time.

All paints presented on their surface similar values of total biomass throughout the experiment. However, a tendency of *Ep* paint to present higher values of dry weight is noted and C2 seems to present the lowest weight values after 63 days of immersion.

Those observations suggest small differences but values obtained are really small and the important residual variation might hide further differences between paints. In spite of these restrictions in the experimental limitations, it can be concluded that, in a static immersion test, biofouling total biomass and algae concentration are similar between paints, with or without toxic compounds, after 8 weeks of immersion of the painted panels.

Newly adapted methods to evaluate the biofouling growth in time were useful to compare the importance of colonisation onto the different paints. It also enables to underline the unnecessary use of additives organic biocides in the north sea waters as biofouling biomass is similar with or without after a relatively short time period of immersion of 8 weeks.

## 2.6. CONCLUSION

Original methods developed in this study to determine the progression of biofouling in time gave reliable results. Analyses performed on the bacterial and the phytoplankton populations, enabled to characterise in detail the early stages of biofouling in the St. Lawrence Estuary, never investigated before. Moreover, the various methods used allowed to compare, in a simple and short field trial, the activity of the different paints used. Additionally, microscopic observations gave visual information and specific indications on the algal community composition, precious information improving knowledge of the fouling diatoms in the Estuary. With photographic records, fluorimetry and dry weight analyses the kinetic of fouling process was followed and differences in the antifouling activity between the various paints could be observed throughout the experiments.

The discovery of the antibacterial activity of chitosan as a powder additive to an commercial marine paint without antifouling compounds, moreover if it is present at 20% w/v in the paint, is encouraging. Although interesting as anti-bacterial additive, chitosan is not useful as an anti-algal additive. Comparison of the different antifouling paints such as *SN* and *Oma* with the copper paint *Bottomkote XXX* and *Easypoxy*, demonstrates the usefulness on a short exposure period, of the additives against bacteria and algae. Although, it should be kept in mind that fate and toxicity of organic biocides is poorly known and that heavy metals constitute the major contaminants of aquatic environments (Railkin, 2004). *Sea-Nine 211*, for example, is claimed a green chemistry product because it degrades rapidly both biologically and chemically in seawater and sediment. But it was also reported to exert a long-term effect on natural marine

phytoplankton leading to more homogenous communities (Larsen *et al.*, 2003) and to be more toxic than the herbicides *Irgarol 1051* and *Diuron* in toxicity bioassays (Konstantinou & Albanis, 2004). It was also observed that *Sea-Nine 211* and *Copper Pyrithione* (Copper *Omadine*) were much more toxic to sea urchins than TBTO (Kobayashi & Okamura, 2002).

Several advantages come from the use of natural antifoulants for commercial applications. Not only have they been selected for millions of years for their efficacy in this function, but also, to avoid auto-toxicity they are not broad spectrum biocides and are biodegradable (Steinberg, 2001). Chitosan flakes were reported to successfully demonstrate antifouling properties in a bioreactor against yeast cells (Le Roux *et al.*, 2005). But its antifouling activity in a coastal environment is not conclusive. Although encouraging as it appears to be effective against bacterial biofilm. Genetic analyses on the bacterial population present at the surface of the different paint could give valuable information (Araya *et al.*, 2003). Characterization of the biofilm microbial communities and precise comparison of the antibacterial action of the different paints could lead to a more specific action from the additives. Antifouling formulation will need to contain a number of different environmentally friendly compounds in order to ensure that all organisms are repelled from a surface in a similar way to the multicomponent antifouling strategies seen in nature (Armstrong *et al.*, 2000). In that thought, the use of chitosan as an antibacterial additive combined to an environmentally safe anti-algal additive could justify possible efforts for further tests.

## 2.7. ACKNOWLEDGMENT

This research has been supported by *Marinard Biotech Inc.*, Québec and NSERC - Discovery Program, Canada Research Chair in Molecular Ecotoxicology in Coastal Areas (E.P.). Many thanks to Dr. Clermont Beaulieu, Dr. Philippe Archambault, Dr. Michel Poulin and Dr. Jean-Pierre Chanut for their scientific advices. Also, great thanks go to Patrick Poulin, Ghyslain Canuel, Stéphane Saint-Pierre, Mélanie Simard, Nicolas Pichaud, Guillaume Werstink, Sébastien Mas, and Dannick Gallant for their technical assistance.



## CHAPITRE III

### 3. CONCLUSION GÉNÉRALE

La mise au point et l'utilisation de différentes méthodes pour déterminer la progression du biofouling en fonction du temps ont permis d'évaluer l'intérêt des polymères de chitosane en tant qu'ingrédients bioactifs dans une peinture anti-salissure en milieu côtier. De plus, ces méthodes, utilisées dans cette optique pour la première fois, ont permis la comparaison du potentiel anti-salissure du chitosane, en tant qu'additif à une peinture commerciale à la silicone et polyuréthane, avec des peintures marines commerciales existantes.

L'activité antibactérienne du chitosane a été démontrée par les mesures obtenues en cytométrie en flux (Figure 5) et vérifiées en microscopie épifluorescence. La concentration du polymère dans la peinture semble importante, particulièrement à long terme, C2 étant apparemment plus efficace que C1 après 14 jours (Figure 5). Les peintures au cuivre testées, avec et sans biocides organiques ajoutés, inhibent également les premières étapes de colonisation microbienne. Aucune action anti-algale du chitosane n'a été révélée par les mesures de cytométrie, ni par celles de fluorimétrie (Figures 6 & 7). Par contre, les additifs à la peinture d'oxyde de cuivre, *Sea-Nine 211* et *Copper Omadine*, ont démontré leur efficacité à contrer la croissance algale. En effet, ces peintures présentent à leur surface moins de pigments chlorophylliens que toutes les autres peintures comparées, en incluant la peinture d'oxyde de cuivre seule. Les résultats des mesures de poids sec présentent une grande variabilité et ne permettent aucune différenciation significative entre les peintures. Cependant, la biomasse récoltée

à la surface de la peinture *Ep* présente une forte tendance à être plus élevée que les autres et celle de C2 plus faible. De plus, ces analyses de biomasse totale donnent des indications sur la vitesse de progression de l'ensemble de la communauté responsable des salissures marines (Figure 13). Ces résultats d'analyses du poids sec total révèlent la faible pertinence de l'utilisation de peintures contenant des biocides organiques dans les eaux salées froides. La biomasse totale présente à la surface des structures étant similaires avec ou sans additifs toxiques.

Ainsi, les diverses méthodes développées pour quantifier et observer la progression du biofouling dans le temps sont fiables. Elles permettent également la comparaison rapide de l'efficacité anti-salissures de plusieurs peintures et ce à différents niveaux de la colonisation marine. De plus, grâce aux techniques de microscopie, l'identification des communautés et de certaines espèces de microalgues colonisatrices a pu être possible. Des résultats fournissant des informations précieuses sur les diatomées proliférant à la surface des structures immergées dans les eaux froides et salées du Saint-Laurent. Cependant, une étude approfondie des populations microbiennes et algales par des méthodes génétiques pourrait présenter un intérêt particulier pour le développement d'une peinture écologique dont l'action serait ciblée.

Même si les résultats obtenus soulignent l'utilité des biocides organiques, il ne faut pas perdre de vue qu'ils présentent pour l'environnement un risque important. Dans le développement de peintures antisalissures écologiques, le chitosane pourrait démontrer un réel intérêt en tant qu'agent antibactérien lorsque combiné à un agent anti-algal également sécuritaire pour l'environnement. De plus, l'utilisation, sous une autre forme, de ce polymère présenterait un potentiel de recherche prometteur dans l'étude de la prévention des salissures marines.

## BIBLIOGRAPHIE

Alzieu, C. (1998). Tributyltin: case study of a chronic contaminant in the coastal environment. *Ocean & Coastal Management* 40, 23-36.

Anderson, C., Atlar, M., Callow, M., Candries, M., Milne, A., Townsin, R.L. (2003). The development of foul-release coatings for seagoing vessels. *Journal of Marine Design and Operations* B4, 11-23.

Araya, R., Tani, K., Takagi, T., Yamaguchi, N., Nasu, M. (2003). Bacterial activity and community composition in stream water and biofilm from an urban river determined by fluorescent in situ hybridization and DGGE analysis. *FEMS Microbiology Ecology* 43, 111-119.

Arch Chemicals Inc. (1999). Copper *Omadine* bactericide-fungicide for antifouling marine paint. Technical product information, Marine antifouling paints, Technical Bulletin. AB-9. Vers.1, Eff 4/99.

Armstrong, E., Boyd, K.G., Burgess, J.G. (2000). Prevention of marine biofouling using natural compounds from marine organisms. *Biotechnology Annual Review* 6, 221-241.

ASTM (1998). Standard test method for testing antifouling panels in shallow submergence. In *Annual book of ASTM Standards*, American Society for Testing Materials ed. (West Conshohocken, PA, USA.). Designation D 3623-78a.

Ausar, S. F., Passalacqua, N., Castagna, L.F., Bianco, I.D., Beltramo, D.M. (2002). Growth of milk fermentative bacteria in the presence of chitosan for potential use in cheese making. *International Dairy Journal* 12, 899-906.

Bégin, A., Van Calsteren, M.R. (1999). Antimicrobial films produced from chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules* 26, 63-67.

Bennett, R. F. (1996). Industrial manufacture and applications of tributyltin compounds. In *Tributyltin: case study of an environmental contaminant.*, S. J. De Mora, ed. (Cambridge University Press). 38-61.

Bérard-Thériault, L., Cardinal, A., Poulin, M., (1986). Les diatomées (Bacillariophyceae) benthiques de substrats durs des eaux marines et saumâtres du Québec.6. Naviculales (Cymbellaceae et Gomphonemaceae). *Naturaliste Canadien (Rev. Ecol. Syst.)*, 113, 405-429.

Bittelli, M., Flury, M., Campbell, G.S., Nichols, E.J. (2001). Reduction of transpiration through foliar application of chitosan. *Agricultural and Forest Meteorology* 107, 167-175.

Bosselmann, K. (1996). Environmental law and tributyltin in the environment. S. J. De Mora, ed. (Cambridge University Press). 237-243.

Box, G.E.P. (1953) Non-normality and tests on variances. *Biometrika* 403, 8-335

Brady, Jr. R. F. (2000). No more tin. What now for fouling control? *Journal of protective coatings and linings* 17, 42-46.

Brown, L. N., Robinson, M.G., Hall, B.D. (1988). Mechanisms for copper tolerance in *Amphora coffeaeformis*-internal and external binding. *Marine Biology* 97, 581-586.

Bryan, G. W., Gibbs, P.E., Burt, G.R., Hummerstone, L.G. (1986). The decline of the gastropod *Nucella lapillus* around South-West England: evidence for the effect of tributyltin from anti-fouling paints. *Journal of Marine Biological Association* 66, 733-744.

Burgess, J. G., Boyd, K.G., Armstrong, E., Jiang, Z., Yan, L., Berggren, M., May, U., Pisacane, T., Granmo, A., Adams, D.R. (2003). The development of a marine natural product-based antifouling paint. *Biofouling* 19, 197-205.

Callow, M. E., Callow, J.A. (2002). Marine biofouling: a sticky problem. *Biologist* 49, 1-5.

Cardinal, A., Poulin, M., Bérard-Thériault, L. (1984). Les diatomées benthiques de substrats durs des eaux marines et saumâtres du Québec. 4. Naviculales, Naviculaceae (à l'exclusion des genres *Navicula*, *Donkinia*, *Gyrosigma* et *Pleurosigma*). *Naturaliste Canadien (Rev. Ecol. Syst.)*, 111, 369-394.

Cardinal, A., Poulin, M., Bérard-Thériault, L., (1986). Les diatomées benthiques de substrats durs des eaux marines et saumâtres du Québec.5. Naviculales, Naviculaceae (les genres *Navicula*, *Donkinia*, *Gyrosigma* et *Pleurosigma*). *Naturaliste Canadien (Rev. Ecol. Syst.)*, 113, 167-190.

Chabot, R., Rossignol, A. (2003). Algues et faune du littoral du Saint-Laurent maritime: Guide d'identification. (Institut des sciences de la mer de Rimouski; Pêches et Océans Canada (IML)).113p.

Champ, M. A. (2000). A review of organotin regulatory strategies, pending actions, related costs and benefits. *The Science of The Total Environment* 258, 21-71.

Champ, M. A. (2001). Proceedings of the 24th UJNP (US/Japan) marine facilities panel meeting in Hawaii. November, 7-8. in Yebra, D. M., Kiil, S., Dam-Johansen, K. (2004). Antifouling technology-past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings. *Progress in Organic Coatings* 50, 75-104.

Choi, B. K., Kim, K.Y., Yoo, Y.J., Oh, S.J., Choi, J.H., Kim, C.Y. (2001). In vitro antimicrobial activity of a chitooligosaccharide mixture against *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Streptococcus mutans*. *International Journal of Antimicrobial Agents* 18, 553-557.

Chung, Y. C., Wang, H.L., Chen, Y.M., Li, S.L. (2003). Effect of abiotic factors on the antibacterial activity of chitosan against waterborne pathogens. *Bioresource Technology* 88, 179-184.

Clare, A. S. (1996). Marine natural products antifoulants: status and potential. *Biofouling* 9, 211-229.

Clarke, K.R. (1993). Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. *Australian Journal of Ecology* 18, 117-143.

Colwell, R. R. (2002). Fulfilling the promise of biotechnology. *Biotechnology Advances* 20, 215-228.

Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Korber, D.R., Lappin-Scott, H.M. (1995). Microbial biofilms. *Annual Review Microbiology* 49, 711-745.

Cuero, R. G. (1999). Antimicrobial action of exogenous chitosan. *EXS* 87, 315-333.

Cuero, R., Lillehoj, E. (1990). N-Carboxymethylchitosan: Algistatic and algicidal properties. *Biotechnology Letters* 4, 275-280.

Diers, J. A., Pennaka, H.K., Peng, J., Bowling, J.J., Duke, S.O., Hamann, M.T. (2004). Structural activity relationship studies of Zebra Mussel antifouling and antimicrobial agents from Verongid sponges. *Journal of Natural Products* 67, 2127-2120.

Donlan, R.M. 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging infectious diseases*. 8, 881-890.

Evans, S. M., Birchenough, A.C., Brancato, M.S. (2000). The TBT Ban: out of the frying pan into the fire? *Marine Pollution Bulletin* 40, 204-211.

Evans, S. M., Leksono, T., McKinnell, P.D. (1995). Tributyltin pollution: a diminishing problem following legislation limiting the use of TBT-based anti-fouling paints. *Marine Pollution Bulletin* 30, 14-21.

Felt, O., Carrel, A., Baehni, P., Buri, P., Gurny, R. (2000). Chitosan as tear substitute: a wetting agent endowed with antimicrobial efficacy. *Journal of ocular pharmacology and therapeutics* 16, 261-270.

Freepons, D. (1996). Enhancing food production with chitosan seed coating technology. In Applications of chitin and chitosan, M. F. A. Goosen, ed., pp. 336.

Fusetani, N. (2004). Biofouling and antifouling. Natural Product Reports 21, 94-104.

Goldberg, E. D. (1986). TBT: an environmental dilemma. Environment 28, 17-44.

Hejazi, R., Amiji, M. (2003). Chitosan-based gastrointestinal delivery systems. Journal of Controlled Release 89, 151-165.

Hellio, C., De La Broise, D., Dufossé, L., Le Gal, Y., Bourgougnon, N. (2001). Inhibition of marine bacteria by extracts of macroalgae: potential use for environmentally friendly antifouling paints. Marine Environmental Research 52, 231-247.

Henrikson, A. A., Pawlik, J.R. (1995). A new antifouling assay method: results from field experiments using extracts of four marine organisms. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 194, 157-165.

<http://www.halosource.com/corporate/platforms/chitosan/structures.gif> . Vanson Halo Source Inc. 2005. Redmond, Washington, USA. Avril 2005.

Jeon, Y. J., Park, P.J., Kim, S.K. (2001). Antimicrobial effect of chitooligosaccharides produced by bioreactor. Carbohydrate Polymers 44, 71-76.

Jumaa, M., Furkert, F.H., Muller, B.W. (2002). A new lipid emulsion formulation with high antimicrobial efficacy using chitosan. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 53, 115-123.

Jung, B. O., Kim, G.H., Choi, K.S., Moo Lee, Y., Kim, J.J. (1999). Preparation of amphiphilic chitosan and their antimicrobial activities. Journal of Applied Polymer Science 72, 1713-1719.

Kendra, D. F., Hadwiger, L.A. (1984). Characterization of the smallest chitosan oligomer that is maximally antifungal to *Fusarium solanj* and elicits pisatin formation in *pisum sativum*. Experimental mycology 8, 276-281.

Kobayashi, N., Okamura, H. (2002). Effects of new antifouling compounds on the development of sea urchin. Marine Pollution Bulletin 44, 748-751.

Konstantinou, I. K., Albanis, T.A. (2004). Worldwide occurrence and effects of antifouling paint booster biocides in the aquatic environment: a review. Environment International 30, 235-248.

Larsen, D. K., Wagner, I., Gustavson, K., Forbes, V.E., Lund, T. (2003). Long-term effect of Sea-Nine on natural coastal phytoplankton communities assessed by pollution induced community tolerance. *Aquatic toxicology* 62, 35-44.

Lebaron, P., Parthuisot, N., Catala, P. (1998). Comparison of Blue Nucleic Acid Dyes for Flow Cytometric Enumeration of Bacteria in Aquatic Systems. *Applied and environmental microbiology* 64, 1725-1730.

Lebaron, P., Servais, P., Agogue, H., Courties, C., Joux, F. (2001). Does the high nucleic acid content of individual bacterial cells allow us to discriminate between active cells and inactive cells in aquatic systems? *Applied and environmental microbiology* 67, 1775-1782.

Le Roux, I., Kriegb,H.M.,Yeatesa, C.A., Breytenbach, J.C. (2005). Use of chitosan as an antifouling agent in a membrane bioreactor. *Journal of Membrane Science* 248, 127-136.

Li, Q., Dunn, E.T., Grandmaison, E.W., Gosen, M.F.A. (1992). Application and properties of chitosan. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* 7, 370-382.

Li, Q., Dunn, E.T., Grandmaison, E.W., Gosen, M.F.A. (1996). Applications and properties of chitosan. *In Applications of chitin and chitosan*, M. F. A. Goosen, Ed., pp. 336.

Lund, J.W.G., Kipling, C., Le Cren, E.D. (1958). The inverted microscope method of estimating algal numbers and the statistical basis of estimations by counting. *Hydrobiology* 11, 143-170.

Mizobuchi, S., Shimidzu, N., Katsuoka, M., Adachi, K., Miki, W. (1994). Antifouling substances from a Palauan octocoral *Sinularia* sp. *Fisheries Science* 60, 345-346.

Muzzarelli, R. A. A. (1985). Chitin. *In The Polysaccharides*, G.O.Aspinall, ed. (Orlando, Fl, Academic press), pp. 417.

Muzzarelli, R., Tarsi, R., Filippini, O., Giovanette, E., Biagini, G., Varaldo, P.E. (1990). Antimicrobial properties of N-Carboxybutyl chitosan. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 34, 2019-2023.

No, H. K., Park, N.Y., Lee, S.H., Meyers, S.P. (2002). Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *International Journal of Food Microbiology* 74, 65-72.

Omae, I. (2003). General aspects of tin-free antifouling paints. *Chemical reviews* 103, 3431-3448.

Poulin, M., Bérard-Thériault, L., Cardinal, A. (1984a). Les diatomées benthiques de substrats durs des eaux marines et saumâtres du Québec. 1. Cocconeioideae (Achnanthes, Achnantheae). *Naturaliste Canadien (Annual Review of Ecology and Systematics)*, *111*, 45-61.

Poulin, M., Bérard-Thériault, L., Cardinal, A. (1984b). Les diatomées benthiques de substrats durs des eaux marines et saumâtres du Québec. 2. Tabellarioideae et Diatomoideae (Fragilariales, Fragilariaceae). *Naturaliste Canadien (Annual Review of Ecology and Systematics)*, *111*, 275-295.

Poulin, M., Bérard-Thériault, L., Cardinal, A. (1984c). Les diatomées benthiques de substrats durs des eaux marines et saumâtres du Québec. 3. Fragilarioideae (Fragilariales, Fragilariaceae). *Naturaliste Canadien (Annual Review of Ecology and Systematics)*, *111*, 349-367.

Poulin, M., Bérard-Thériault, L., Cardinal, A. (1987). Les diatomées (Bacillariophyceae) benthiques de substrats durs des eaux marines et saumâtres du Québec. 7. Naviculales (les genres *Plagiotropis* et *Entomoneis*.), Epithemiales et Surirellales. *Naturaliste Canadien (Annual Review of Ecology and Systematics)*, *114*, 67-80.

Poulin, M., Bérard-Thériault, L., Cardinal, A., Hamilton, P.B. (1990). Les diatomées (Bacillariophyta) benthiques de substrats durs des eaux marines et saumâtres du Québec. 9. Bacillariaceae. *Naturaliste Canadien (Annual Review of Ecology and Systematics)*, *117*, 73-101.

Qin, C., Du, Y., Xiao, L., Liu, Y., Yu, H. (2002). Moisture retention and bacterial activity of modified chitosan by hydrogen peroxide. *Journal of Applied Polymer Science* *86*, 1724-1730.

Railkin, A. I. (2004). *Marine biofouling: colonization processes and defenses* (Boca Raton, Florida, CRC Press).

Ravi Kumar, M. N. V. (2000). A review of chitin and chitosan applications. *Reactive & Functional Polymers* *46*, 1-27.

Roberts, G. A. F. (1992). *Chitin chemistry*. The Macmillan Press, London, U.K.

Rohm & Haas Company. (2002). *Material safety data sheet, Sea-Nine 211 marine anti-fouling agent*. Philadelphia, PA., Key: 866324-3. 1-7.

Roller, S., Covill, N. (1999). The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice. *International Journal of Food Microbiology* *47*, 67-77.

Scherrer, B. (1984) *Biostatistique*. Gaëtan Morin, Chicoutimi, 850 pp.



Sekiguchi, S., Miura, Y., Kaneko, H., Nishimura, S.L., Nishi, N., Iwase, M., Tokura, S. (1994). Molecular weight dependency of antimicrobial activity by chitosan oligomers. In Food hydrocolloids: Structures, Properties and Functions, K. Nishinari, and Doi, E., ed. (New York, Plenum Press), pp. 71-76.

Shahidi, F., Kamil, J., Arachchi, V., Jeon, Y.J. (1999). Food applications of chitin and chitosans. *Trends in Food Science & Technology* 10, 37-51.

Shin, Y., Yoo, D.I., Jang, J. (2001). Molecular weight effect on antimicrobial activity of chitosan treated cotton fabrics. *Journal of Applied Polymer Science* 80, 2495-2501.

Skaugrud, O., Sargent, G. (1990). Chitin and chitosan: crustacean biopolymers with potential. Paper presented at: International by-products conference (Anchorage, Alaska).

Song, Y., Babiker, E.E., Usui, M., Saito, A., Kato, A. (2002). Emulsifying properties and bactericidal action of chitosan-lysozyme conjugates. *Food Research International* 35, 459-466.

Steinberg, P. (2001). *Delisea pulchra* and natural antifoulants. Paper presented at: Workshop on environmentally friendly marine coatings (Goteborg, Sweden.).

Steinberg, P. D., De Nys, R., Kjelleberg, S. (2002). Chemical cues for surface colonization. *Journal of Chemical Ecology* 28, 1935-1951.

Stössel, P., Leuba, J.L. (1984). Effect of chitosan, chitin and some aminosugars on growth of various soilborne phytopathogenic fungi. *Journal of Phytopathology - Phytopathologische Zeitschrift* 111, 82-90.

Strickland, J. D. H., Parsons, T.R. (1972). A practical handbook of seawater analysis, Bulletin 167, Second Edition (Ottawa). 310p.

Stupak, M. E., Garcia, M.T., Pérez, M.C. (2003). Non-toxic alternative compounds for marine antifouling paints. *International Biodeterioration & Biodegradation* 52, 49-52.

Therriault, J. C., Legendre, L., Demers, S. (1990). Oceanography and ecology of phytoplankton in the St. Lawrence estuary. In Coastal and estuarine studies. Oceanography of a large-scale estuarine system, the St. Lawrence, M. El-Sabh, Silverberg, N., ed. (Springer-Verlag, New York), pp. 269-295.

Tokura, S., Ueno, K., Miyazaki, S., Nishi, N. (1997). Molecular weight dependent antimicrobial activity by chitosan. *Macromolecular Symposia* 120, 1-9.

Trees, C. C., Bidigare, R.R., Karl, D.M, Van Heukelem, L., Dore, J. (2000). Fluorimetric chlorophyll *a*: sampling, laboratory, methods, and data analysis protocols. *In* For satellite ocean color sensor validation, NASA Technological Memo.

Underwood, A.J. (1997) Experiments in ecology: their logical design and interpretation using analysis of variance. Cambridge University Press, Cambridge

Voulvoulis, N., Scrimshaw, M.D., Lester, J.N. (1999). Review: Alternative antifouling biocides. *Applied Organometallic Chemistry* 13, 135-143.

Wahl, M. (1989). Marine epibiosis. I. Fouling and antifouling: some basic aspects. *Marine Ecological Progress Series* 58, 175.

W.H.O.I. (Woods Hole Oceanographic Institution) (1952). Marine fouling and its prevention, Vol 580 (Annapolis, MD., United States Naval Institute). 388p.

Yebra, D. M., Kiil, S., Dam-Johansen, K. (2004). Antifouling technology-past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings. *Progress in Organic Coatings* 50, 75-104.

Zar, J. H. (1984). *Biostatistical analysis*, 2nd ed. Prentice-Hall Inc, New Jersey, 718 pp.

Zheng, L. Y., Zhu, J.F. (2003). Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. *Carbohydrate Polymers* 54, 527-530.

## ANNEXE I

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

**Préparation de la chitine et du chitosane**

À partir de résidus de crevettes *Pandalus borealis* générés par *Les pêcheries Marinard*, la chitine a été obtenue par déprotéinisation des carapaces par traitement au NaOH et par déminéralisation au HCl. La désacétylation de la chitine dans une solution aqueuse de NaOH 60-70% a produit du chitosane. Après avoir été séché par lit fluidisé, broyé entre 5 et 20 mesh ou pulvérisé entre 50 et 120 mesh, le chitosane a été analysé dans les laboratoires de Marinard biotech à Rivière-au-Renard en Gaspésie.

**Mesure de la viscosité**

D'abord dissous dans une solution d'eau et d'acide acétique 1%, le chitosane a ensuite été incubé 24 heures à 25°C. Sa viscosité, à une concentration de 1%, a été déterminée par le viscosimètre Cole-Parmer 98 936 series.

**Mesure du pourcentage de désacétylation**

Le pourcentage de désacétylation des différents polymères de chitosane a été calculé par titration colloïdale avec 0,05% de PVSK (Polyvinyl Sulfate Potassium) et 0,1% de toluidine. La formule suivante a été employée :

$$\% \text{ DAC} = \frac{A}{A+B} = \frac{X/161}{X/161 + Y/203}$$

Où :

$$X = V_{\text{PVSK}}(\text{mL}) \times [\text{PVSK} (\text{mol/L}) \times 0,161]$$

$$A = V_{\text{PVSK}}(\text{mL}) \times [\text{PVSK} (\text{mol/L}) \times 0,001]$$

$$Y = \{0,005 [(100-\% \text{H}_2\text{O})/100]\} - \{[V_{\text{PVSK}}(\text{mL}) \times [\text{PVSK} (\text{mol/L}) \times 0,161]]\}$$

$$B = \{0,005 [(100-\% \text{H}_2\text{O})/100]\} - \{[V_{\text{PVSK}}(\text{mL}) \times [\text{PVSK} (\text{mol/L}) \times 0,161]]\}/203$$

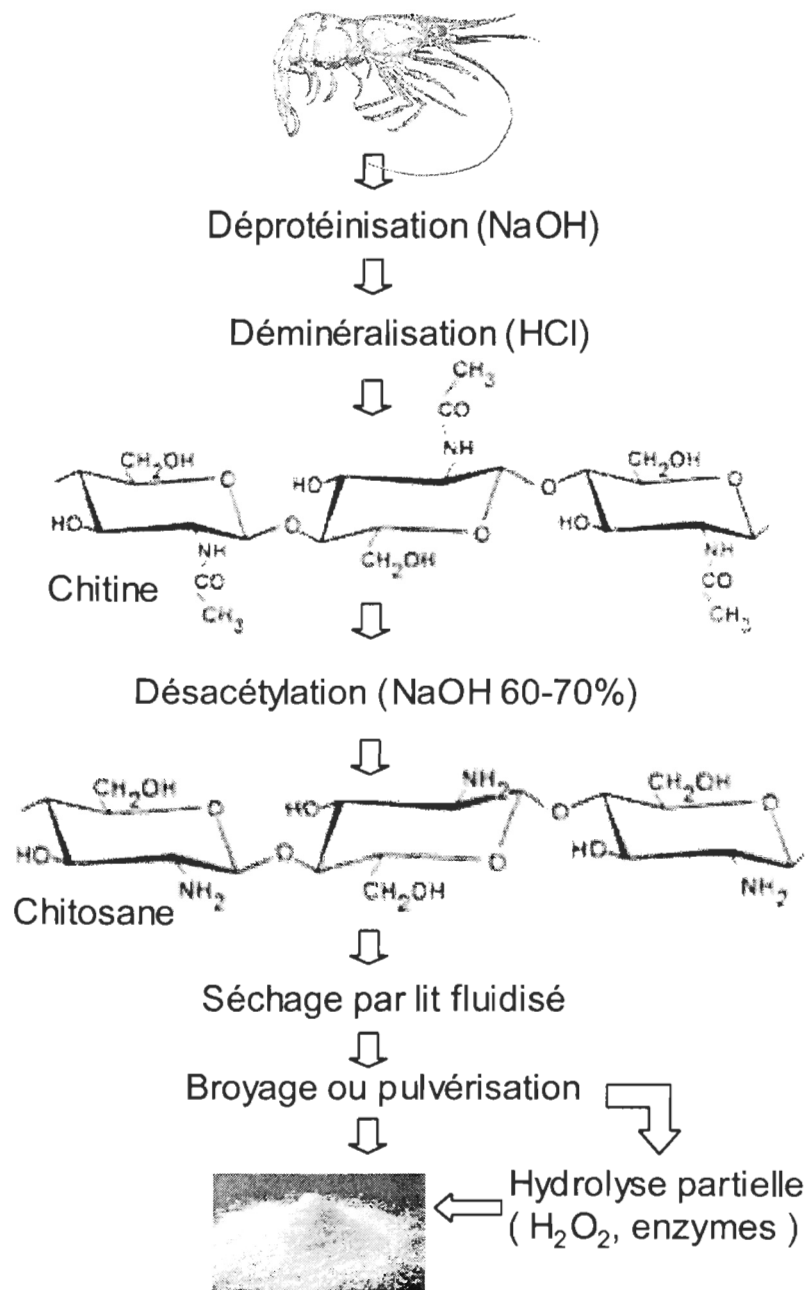


Figure 15: Étapes de la production du chitosane

### Mesure du poids moléculaire

Le poids moléculaire des différents polymères de chitosane a été estimé par HPLC sur deux colonnes GPC à 35°C et 0,25M de tampon acétate en phase mobile à un taux de 0,8 mL/min. Des standards de Dextran (Sigma-Aldrich) de 50 000 à 4 500 000 Da ont été utilisés.

### Chitosanes

*Hydrolyse partielle avec des moisissures* : L'hydrolyse enzymatique du chitosane s'est effectuée avec une concentration de chitosane de 2,5% dans une solution d'acide lactique 85% concentrée en moisissures non identifiées. Trois solutions de départ ont été préparées à partir du lot de chitosane 166 405, dont la viscosité initiale à 1% est de 28cps et le PM de 482 688 Da et avec la même concentration en moisissures. Le pH de la première solution n'a pas été ajusté et celle-ci a été incubée à 25°C pendant plus de deux semaines. La réaction enzymatique a été arrêtée par une précipitation avec 1N de NaOH lorsque la viscosité est descendue à 30cps, le poids moléculaire alors déterminé par HPLC était de 141 611 Da. Les deuxième et troisième solutions ont d'abord été ajustées à un pH de 5 et de 5,5 respectivement avec du NaOH 1N et incubées à 35°C durant 1 semaine avant d'être arrêtées. La solution 2, à pH 5 présentait une viscosité de 11,4 cps et un PM de 111 250 Da. La solution 3, à pH 5,5 avait une viscosité de 4,3 cps et un PM de 46 199 Da. Pour des questions de quantité, le chitosane incubé avec des moisissures à 25°C a été retenu pour l'étude, est utilisé en concentration de 5% et est appelé C5.

*Hydrolyse partielle avec H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>* : Une hydrolyse au peroxyde a également été effectuée afin de comparer son efficacité avec l'hydrolyse enzymatique. Toujours avec le lot de chitosane 166 405, une incubation avec 30% de peroxyde a été réalisée à 60-

70°C. La réaction a été neutralisée au NaOH 1N après 1 heure, 3 heures et 6 heures, avec pour résultats les PM suivants : 72 KDa, 35 KDa et 34 KDa respectivement. Cependant, une baisse du degré de désacétylation est observable avec le temps, après 6 heures elle passe de 100% à 96%. Pour son faible poids moléculaire et sa quantité raisonnable le chitosane traité durant 6 heures a été sélectionné pour l'étude, est utilisé à 5% de concentration (p/v) et est appelé *C4*.

Le chitosane non hydrolysé du lot 166405 a été utilisé à 2 concentrations différentes et est nommé *C1* lorsque concentré 5%(p/v) et *C2* lorsque concentré 20%(p/v). Le chitosane *C3*, correspond au chitosane du lot 140 303, son degré de désacétylation est moindre, 88%, il est particulièrement dense et a été pulvérisé en usine à 120 mesh. Il est également utilisé à une concentration de 5%(p/v).

### **Modèle expérimental**

Des plaquettes d'acier de 10 cm X 20 cm avec un trou de 2 cm de diamètre perforé 1 cm de bord supérieur ont été découpées par Soudures DML Inc., Rimouski. Chaque plaque a été, des deux côtés, sablée manuellement, lavée au solvant (2316N, Interlux), séchée et recouverte d'une couche d'apprêt (Interprotect 2000E, Interlux) avec un fusil à peinture. Dans les 24 heures suivant l'application de la couche de base, une couche de peinture a été appliquée au fusil, dans le cas des premiers montages immergés, et appliquée au pinceau pour la deuxième partie expérimentale (Figure 2).

Après une semaine de séchage, les plaquettes ont été suspendues verticalement et de façon aléatoire sur les montages fabriqués en tuyaux ABS (Gerald Leblond Ltée., Rimouski). Les plaquettes ont été insérées en triplicatas et parallèlement sur les

montages, espacées chacune de 6 cm et séparées latéralement de 2 cm (ASTM, 1998). Les 10 montages furent attachés au quai flottant de Rimouski-Est (48°28'N-68°30'W) dans l'estuaire maritime du Saint-Laurent, à 50 cm sous le niveau de l'eau (ASTM, 1998, Stupak *et al.*, 2003) avec une exposition sud-ouest au soleil.

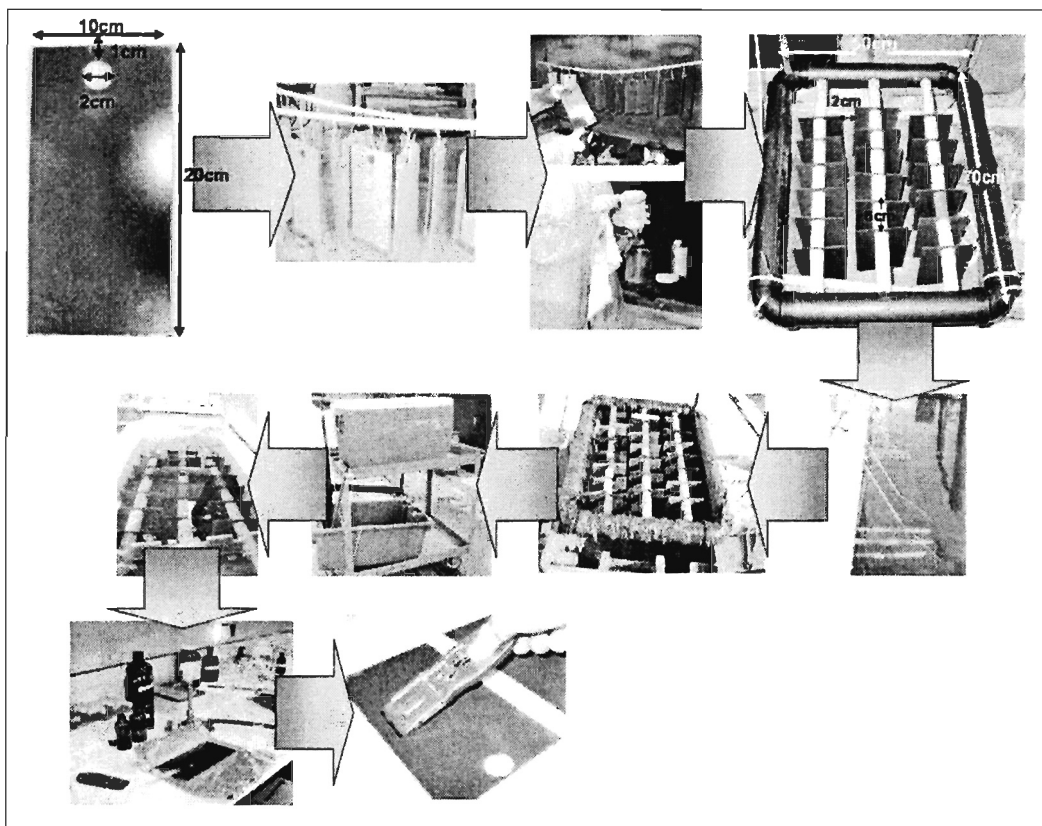


Figure 16 : Étapes du protocole expérimental

Quatre peintures industrielles et cinq peintures à base de chitosane ont été comparées.

- La peinture au cuivre *Bottomkote XXX* d'Interlux,
- l'additif liquide aux peintures au cuivre *Sea-Nine 211* de Rohm & Haas Inc.,
- l'additif en poudre aux peintures au cuivre *Copper Omadine* d'Arch Chemicals Inc., et ;
- *Easypoxy* de Pettit Marine Paints, une peinture sans composés antisalissure, qui a été utilisée en tant que standard pour les surfaces non-toxiques.

Tous les chitosanes produits ont été incorporés à différentes concentrations dans la peinture *Easypoxy* afin d'évaluer leur capacité antisalissure.

Tableau 11 : Peintures au chitosane et peintures commerciales utilisées

<b>Peintures industrielles</b>	<b>Identification</b>
Copper paint (Bottomkote XXX, Interlux)	<i>CuO</i>
Sea-Nine 211 (Rohm & Haas Company)	<i>SN</i>
Copper pyrithione, Copper Omadine (Arch Chemicals, Inc.)	<i>Oma</i>
Easypoxy (Pettit Marine Paints)	<i>Ep</i>
<b>Peintures au chitosane (Tous ajoutés dans la peinture Easypoxy)</b>	
Chitosane 100% désacétylé, 480 KDa, concentré 5% (p/v)	<i>C1</i>
Chitosane 100% désacétylé, 480 KDa, concentré 20% (p/v)	<i>C2</i>
Chitosane 88% désacétylé, 260 KDa, concentré 5% (p/v)	<i>C3</i>
Chitosane 96% désacétylé, 34 KDa, concentré 5% (p/v), traité avec H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	<i>C4</i>
Chitosane 100% désacétylé, 140 KDa, concentré 5% (p/v), incubé avec des moisissures	<i>C5</i>

\* Tous les chitosanes ont été pulvérisés 60 mesh avant leur utilisation



Au cours des premiers tests, effectués du 12 août 2004 au 14 octobre 2004 pour une immersion totale d'une durée de 9 semaines, les peintures *C1*, *C2*, *CuO*, *Ep*, *Oma* et *SN* ont été comparées. Les peintures *CuO*, *SN*, *Oma*, *Ep*, *C1*, *C3*, *C4* et *C5* ont été utilisées pour les secondes expérimentations du 30 août 2004 au 7 octobre 2004, pour une durée de 5 semaines. À chaque temps de prélèvement, la totalité des plaquettes d'un montage furent échantillonnées.

Tableau 12: Temps de prélèvement des plaquettes du premier test d'immersion

Temps zéro	eau de mer prélevée lors de la mise à l'eau
Temps 1	24 heures
Temps 2	4 jours
Temps 3	2 semaines
Temps 4	3 semaines
Temps 5	4 semaines
Temps 6	8 semaines
Temps 7	9 semaines

Tableau 13 : Temps de prélèvement des plaquettes du deuxième test d'immersion

Temps zéro	eau de mer prélevée lors de la mise à l'eau
Temps 1	24 heures
Temps 2	1 semaine
Temps 3	5 semaines

L'échantillonnage s'est effectué à l'obscurité dans un environnement stérile. Le matériel organique a été gratté de la surface des plaquettes avec une lame de rasoir stérile (Araya *et al.*, 2003) et récupéré avec de l'eau de mer stérile (33gNaCl/L) ou de l'eau douce stérile (pour la lyophilisation à sec) dans des cryovials stériles de 5mL. Les échantillons ont été conservés dans du formaldéhyde 2% (pour les analyses bactériologiques en cytométrie en flux et en microscopie épifluorescence et aussi pour les analyses en microscopie inverse) ou enroulés dans du papier d'aluminium (pour les analyses en fluorimétrie) avant leur congélation à -80°C.

### **Conditions météorologiques**

Les données d'ensoleillement ont gracieusement été fournies par la station météorologique IML-4 (48°40'N-68°35'W). Les mesures d'éléments nutritifs et de matière particulaire en suspension ont été mesurées après filtration sur GSWP 25 mm, 0,22µm et GFF 47 mm respectivement. Les données d'oxygène dissous ont été mesurées avec une sonde YSI modèle 58, le pH mesuré avec HANNA instruments modèle HI9025 et la salinité et la température de l'eau avec l'électrode YSI modèle 10/10 FT.

### **Observations directes**

Comparaison de la croissance en utilisant les photographies numériques prises directement et à travers l'objectif de la binoculaire à grossissements 1X, 2X, 3X et 7X avec une caméra numérique pour chaque peinture et chaque prélèvement.

### **Microscopie électronique**

Une plaquette d'acier de chaque peinture à chaque prélèvement a été conservée dans du papier d'aluminium à -20°C. Les plaquettes ont été sorties du congélateur 15 minutes avant leur observation en microscopie électronique (JEOL, JSM-6460LV).

### **Poids sec**

Chaque cryovial a d'abord été pesé sans bouchon. La surface de 60 cm<sup>2</sup> a été grattée et le matériel récupéré dans un cryovial de 5mL avec de l'eau stérile, environ 3mL. Les échantillons conservés à -80°C ont été lyophilisés à froid (Uni-Trap model 10-100, Virtis) de 48 à 120 heures. Les cryovials ont été pesés de nouveau et le poids sec en mg/m<sup>2</sup> calculé.

### **Microscopie en épifluorescence**

500µL des échantillons conservés dans le formaldéhyde 2% ont été incubés 15 minutes à 20°C dans le noir avec 0,2% de SYBR green I obtenu de la solution mère congelée (Molecular Probes, 10,000X concentrée dans le DMSO). Après l'incubation, l'échantillon a été filtré sur des filtres noirs polycarbonates (taille des pores : 0,2 µm, *OSMONICS INC.*) et rincé avec de l'eau distillée stérilisée. Les filtres ont ensuite été apposés sur des lames à microscope, recouverte d'une goutte d'huile à immersion et d'une lamelle. Les lames ont été observées à la noirceur en microscopie à épifluorescence (Olympus BX40), grossissement 60X, en utilisant le filtre FITC à 530 nm. Des photographies numériques ont été prises directement à travers l'oculaire.

### Cytométrie en flux

Une surface de 20 cm<sup>2</sup> a été grattée et le matériel récupéré préservé à -80°C dans 4mL d'eau saline stérile (33gNaCl/L) et 2% de formaldéhyde (400µl de formol 20% dans 4,0mL d'eau de mer stérile). Les échantillons ont été décongelés 30 minutes avant leur analyse par cytométrie en flux (Becton Dickinson FACSort). Pour déterminer le compte bactérien, à 1mL d'échantillon 1µL de SYBR green I 0,05% v/v a été ajouté et le tout laissé à incuber 15 minutes à 20°C dans le noir. 1µL de billes 0,2µm (Polysciences) est ensuite ajouté. Pour le compte du phytoplancton le marquage n'est pas nécessaire, la fluorescence naturelle est détectée. 1µL de billes 2µm a également été ajouté à 1mL d'échantillon. Pour les analyses bactériennes, les paramètres suivants ont été employés : TRESHOLD : FSC:52, SSC:52, FL1:150, FL2:52, FL3:52 et DETECTORS/AMPS : SSC:450, FL1:620 : FL2:550, FL3:550. Pour les analyses de phytoplancton les paramètres suivants ont été utilisés : TRESHOLD : FSC:52, SSC:52, FL1:52, FL2:52, FL3:52 et DETECTORS/AMPS : SSC:250, FL1:350, FL2:550, FL3:550. Les résultats obtenus ont été traités avec le logiciel CellQuest version 1.0. Le compte total bactérien a été calculé en délimitant une population distincte. Le compte total de cellules phytoplanctoniques a été calculé en déduisant le bruit de fond et le compte des billes.

*Préparation du formol :* À partir de formaldéhyde 37%, préparer une solution mère de 250 ml 20%. Basifier le pH entre 7 et 8 avec du carbonate de calcium (environ 1g par 100ml). Décanter au moins une nuit et filtrer sur filtre 0, 22µm.

### Fluorimétrie

Une surface de 20 cm<sup>2</sup> a été grattée et le contenu préservé à -80°C dans 4mL d'eau saline stérile (33gNaCl/L) dans des cryovials enveloppés de papier d'aluminium. Après décongélation, 1mL de chaque échantillon a été ajouté dans des tubes falcon de 15mL remplis de 9mL d'acétone 100%. Une brève sonification (Sonicator Ultrasonic Processor XL) a été effectuée avant l'extraction 24 heures à 4°C. Avant analyse sur le fluorimètre (Turner Designs Fluorometer, Model 10-005) les échantillons ont été centrifugés 4 minutes à 3000rpm, puis transférés dans des tubes à fluorimètre pour lecture (13 X 100 mm Fisher). Pour la lecture de la phéophytine, un peu de HCl 10% a été ajouté à chaque échantillon avant relecture. Pour calculer la concentration des pigments en µg/mL la formule suivante, extraite de Strickland et Parsons, 1972, a été utilisée :

$$\text{Chlorophylle a } (\mu\text{g/mL}) = Fd (\tau/\tau-1) \times (Rb-Ra) \times (v/V)$$

$$\text{Phéophytine } (\mu\text{g/mL}) = Fd (\tau/\tau-1) \times (\tau X Ra - Rb) \times (v/V)$$

$$\text{Où : } Fd = 1,0589$$

$$\tau = 2,23$$

Rb = valeur mesurée avant l'ajout d'HCl

Ra = valeur mesurée après l'ajout d'HCl

v = volume d'acétone

V = volume filtré

La concentration des pigments en µg/cm<sup>2</sup> a ensuite été calculée.

### Tests statistiques

La différence de colonisation entre les différentes peintures durant les différents temps de prélèvements a été analysée grâce à une analyse de variance à deux facteurs (ANOVA). Les résultats de cytométrie et de fluorimétrie ont été transformés en base Log10 afin d'obtenir une distribution normal de leur fréquences. Bien que les

transformations n'aient pas complètement normalisé les données, les ANOVAS sont suffisamment robustes pour supporter de petites variations de normalité (Scherrer, 1984; Zar, 1984; Underwood, 1997). Les données de poids sec suivaient une distribution normale. L'ensemble des résultats ont été considérés homogènes, considérant que les analyses de variance sont suffisamment robustes aux variances hétérogènes, particulièrement lorsqu'il y a plusieurs estimés indépendants de variance et que le plan est balancé (Box, 1953; Underwood, 1997). Trois réplicas ont été utilisés dans toutes les analyses l'exception des analyses obtenues à partir du montage échantillonné après 7 jours. Des problèmes techniques ayant réduit le n à deux. Aucune aire d'interférence n'a été calculée. La position géographique de tous les montages considérée identique. Un test post-hoc de Tukey a permis d'évaluer cas par cas les différences entre les peintures. Les probabilités inférieures ou égales à 0,05 ont été considérées significatives. Le programme informatique Systat 10.2 a été utilisé pour traiter statistiquement les résultats. Grâce aux photographies obtenues en microscopie épifluorescente, des analyses multivariées ont été réalisées pour la première expérience. Les différences de structures d'assemblage entre les six peintures ont été identifiées par une ordination non-métrique multidimensionnelle (nMDS) sur des données de présence-absence utilisant la mesure de similarité de Bray-Curtis (Clarke, 1993). La présence ou l'absence de bactéries, d'amas de bactéries ou de différentes microalgues selon leur morphologie ont été particulièrement observées.