







Université du Québec  
à Rimouski

**ÉTUDE DES RISQUES DE TRANSFERTS D'ESPÈCES  
MICROBIENNES ALLOCHTONES PAR L'UTILISATION  
DE REVÊTEMENTS ANTIFOULING DE NOUVELLE  
GÉNÉRATION**

Mémoire présenté

dans le cadre du programme de maîtrise en océanographie

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

PAR

© **CHLOÉ PAZART**

**juillet 2024**



**Composition du jury :**

**Souhir Marsit, présidente du jury, UQAR**

**Christian Nozais, directeur de recherche, UQAR**

**Karine Lemarchand, codirectrice de recherche, UQAR**

**Kim Doiron, codirectrice de recherche, ISOBIOKEM**

**Kathleen Macgregor, examinatrice externe, Institut Maurice-Lamontagne, MPO**

Dépôt initial le 26 avril 2024

Dépôt final le 31 juillet 2024



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 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**

La réalisation de ce mémoire n'aurait pu aboutir grâce à mon équipe de direction. Je tiens à remercier Christian Nozais mon directeur, Kim Doiron et Karine Lemarchand mes codirectrices, pour leur soutien et leur précieux conseils durant ces dernières années.

Je souhaite également remercier mes ami.es de la Cale, Cloé, Pauline et Rachel. Leur camaraderie ont fait de ces dernières années d'études une expérience mémorable et enrichissante. Merci à Flavie, ma première camarade de la Cale, dont l'amitié a été un soutien sans faille malgré la distance en Floride.

Je tiens à remercier mon amie et voisine de bureau Marie-Anne, pour son amitié inestimable. Nos échanges et nos rires ont rendu cette aventure tumultueuse de la Maitrise bien agréable. Notre présence constante à l'ISMER et nos routines partagées nous ont d'ailleurs valu le surnom affectueux des mamies de la Cale.

Merci à mon copain Benjamin, de m'avoir remonté le moral aidé durant mon sprint de rédaction en me préparant de bons petits plats.

Enfin, je dédie et je tiens à exprimer toute ma gratitude envers mes parents, mes plus fidèles soutiens dans la vie. Leur encouragement et leur soutien inconditionnel m'ont permis d'atteindre où je suis aujourd'hui. Leur présence et leur amour sont le moteur de mes choix de vie, et je ne saurais jamais assez les remercier pour tout ce qu'ils ont fait pour moi. Merci du fond du cœur.



## RÉSUMÉ

Les biofilms sont constitués de différentes communautés de microorganismes, attachées à une surface. Ils sont à l'origine du phénomène de biofouling sur toute structure immergée en milieu aquatique. Le biofouling est connu pour être un vecteur potentiel de propagation d'espèces invasives par la navigation. Afin de limiter sa formation, des revêtements antifouling à base de biocides sont présentement utilisés dans la navigation. Toutefois, ces revêtements sont susceptibles d'être néfastes pour la diversité aquatique et la santé humaine.

Ce projet de Maîtrise fait partie du projet PAINTS, collaboration internationale franco-québécoise dont l'objectif est de développer de nouveaux revêtements antifouling permettant de limiter la formation de biofouling sur les surfaces immergées, tout en respectant l'ensemble de la diversité biologique des milieux.

Le premier objectif de ce mémoire est d'évaluer l'efficacité de nouveaux revêtements antifouling exempts de biocides en milieu estuarien. Huit revêtements expérimentaux ont été immergés *in situ* à la marina de Rimouski en conditions statiques. La colonisation des huit revêtements a été caractérisée à l'échelle du macrofouling par photographies à haute résolution, et du microfouling par microscopie confocale à balayage laser après un mois et six mois d'immersion. Cette colonisation a été comparée avec celles obtenues sur un témoin PVC et sur un revêtement commercial X3+. Ceci a permis de sélectionner les deux revêtements les plus efficaces.

Le deuxième objectif est d'évaluer le risque de transfert d'espèces microbiennes allochtones potentiellement invasives de ces revêtements. L'étude a été réalisée en simulant un transfert maritime de deux revêtements et d'un témoin PVC entre Rimouski et Sept-Îles (Québec, Canada). L'abondance et la diversité des biofilms ont été analysées respectivement par cytométrie en flux et métabarcoding, permettant ainsi une comparaison entre les revêtements et un suivi de la colonisation le long des transplantations. Les conditions de l'étude n'ont pas permis de montrer une efficacité maximale des revêtements pour limiter la colonisation en terme d'abondance. La diversité retrouvée dans les biofilms formés sur les revêtements antifouling n'a pas présenté de différence avec ceux du témoin PVC. Le transfert d'espèces microbiennes n'a été évalué comme un risque dans le sens de la transplantation Rimouski-Sept-Îles. Cependant, ce risque a été évalué dans le sens de transplantation Sept-Îles-Rimouski. Ces résultats montrent l'importance de développer des études de risque de transfert d'espèces invasives, dans l'optique de développer de nouveaux revêtements plus respectueux de l'environnement à l'échelle de la navigation mondiale. De plus, les analyses couplées d'abondance et de diversité microbienne permettent d'avoir une meilleure compréhension de la dynamique du biofilm et du biofouling face aux variations

environnementales sur les surfaces immergées. Sur le long terme, ce type d'étude permettra de mieux prévenir le risque de transfert d'espèces invasives par l'utilisation de nouveaux revêtements plus respectueux de l'environnement, potentiellement à l'échelle mondiale.

Mots clés : biofouling, biofilm marin, peinture antifouling, fouling-release, métagénomique, espèces invasives

## ABSTRACT

Biofilms are made up of different communities of microorganisms attached to a surface. They are responsible of the formation of biofouling on any submerged structure in an aquatic environment. Biofouling is known to be a potential vector for the spread of invasive species through navigation. In order to limit its formation, antifouling coatings based on biocides are currently used in shipping. However, these coatings are likely to be harmful to aquatic diversity and human health.

This Master's project is part of the PAINTS project, an international Franco-Quebec collaboration whose aim is to develop new antifouling coatings that limit the formation of biofouling on submerged surfaces, while respecting the biological diversity of the environment.

The first objective of this thesis is to evaluate the effectiveness of new biocide-free antifouling coatings in estuarine environments. Eight experimental coatings were immersed *in situ* at Rimouski marina under static conditions. The colonization of the eight coatings was characterized at macrofouling scale by high-resolution photography, and at microfouling scale by confocal laser scanning microscopy after one and six months of immersion. This colonization was compared with that obtained on a PVC control and on a commercial X3+ coating. This made it possible to select the two most effective coatings.

The second objective is to assess the risk of transfer of potentially invasive allochthonous microbial species from these coatings. The study was carried out by simulating a marine transfer of two coatings and a PVC control between Rimouski and Sept-Îles (Quebec, Canada). Biofilm abundance and diversity were analyzed by flow cytometry and metabarcoding respectively, enabling comparison between coatings and monitoring of colonization along the transplants. The conditions of the study did not allow us to demonstrate the maximum effectiveness of the coatings in limiting colonization in terms of abundance. The diversity found in biofilms formed on antifouling coatings did not differ from that of the PVC control. The transfer of microbial species was not assessed as a risk in the Rimouski-Sept-Îles transplantation direction. However, this risk was assessed in the Sept-Îles-Rimouski transplantation direction. These results show the importance of developing risk studies for the transfer of invasive species, with a view to developing new, more environmentally-friendly coatings on a global navigation scale. In addition, coupled analyses of microbial abundance and diversity provide a better understanding of biofilm and biofouling dynamics in the face of environmental variations on submerged surfaces. In the long term, this type of study will enable us to better prevent the risk of transferring invasive

species through the use of new, more environmentally-friendly coatings, potentially on a global scale.

*Keywords:* biofouling, marine biofilm, antifouling coatings, fouling-release, metagenomic, invasive species

## TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	vii
RÉSUMÉ.....	ix
ABSTRACT.....	xi
TABLE DES MATIÈRES.....	xiii
LISTE DES TABLEAUX.....	xv
LISTE DES FIGURES.....	xvii
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES.....	xxi
LISTE DES SYMBOLES.....	xxiii
INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
CHAPITRE 1 EFFICACITÉ DES REVÊTEMENTS ANTIFOULING DE NOUVELLE GÉNÉRATION EN MILIEU ESTUARIEN.....	15
1.1 INTRODUCTION.....	15
1.2 METHODOLOGIE.....	18
1.2.1 Revêtements expérimentaux.....	18
1.2.2 Site d'étude.....	18
1.2.3 Immersion <i>in situ</i> .....	19
1.2.4 Mesures des paramètres environnementaux.....	20
1.2.5 Analyse de la colonisation : macrofouling.....	21
1.2.6 Analyse par microscopie confocale à balayage laser du microfouling.....	23
1.2.7 Traitement de données et analyses statistiques.....	23
1.2.8 Archivage des données.....	24
1.3 RESULTATS.....	25
1.3.1 Suivi des paramètres environnementaux.....	25
1.3.2 Évaluation du recouvrement par le macrofouling selon les différents revêtements.....	26

1.3.3	Évaluation du recouvrement par le microfouling sur les différents revêtements .....	29
1.4	DISCUSSION.....	33
1.5	CONCLUSIONS .....	39
CHAPITRE 2 ESTIMATION DU RISQUE DE TRANSFERT INTER-SITES D'ESPÈCES POTENTIELLEMENT INVASIVES PAR L'UTILISATION DE REVÊTEMENTS ANTIFOULING EXEMPTS DE BIOCIDES .....		41
2.1	INTRODUCTION.....	41
2.2	METHODOLOGIE.....	43
2.2.1	Sites d'étude.....	43
2.2.2	Revêtements antifouling FRC expérimentaux .....	43
2.2.3	Immersion <i>in situ</i> .....	44
2.2.4	Transplantations entre Rimouski et Sept-Îles .....	45
2.2.5	Mesures des paramètres environnementaux des sites d'immersion .....	47
2.2.6	Analyse de l'abondance des communautés microbiennes des eaux de mer et des biofilms .....	47
2.2.7	Diversité microbienne des sites d'immersions et des biofilms.....	49
2.2.8	Analyses statistiques .....	52
2.2.9	Archivage des données .....	53
2.3	RESULTATS .....	53
2.3.1	Caractérisation des milieux d'immersion .....	53
2.3.2	Abondance des microorganismes dans différents biofilms formés sur les revêtements.....	59
2.3.3	Diversité des microorganismes dans les biofilms formés sur les différents revêtements.....	63
2.4	DISCUSSION.....	75
2.4.1	Caractérisation des sites d'immersions.....	75
2.4.2	Formation de biofilm sur les différents revêtements .....	77
2.4.3	Risque de transfert par l'utilisation de nouveaux revêtements antifouling.....	86
2.5	CONCLUSIONS .....	88
CONCLUSION GÉNÉRALE.....		91
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....		95

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Récapitulatif des grandes catégories de revêtements antifouling .....	17
Tableau 2. Évaluation du facteur d'intensité I. ....	22
Tableau 3. Évaluation du facteur de gravité G. Sur les sites français du projet, il a été possible de différencier visuellement le biofilm bactérien des microalgues formés sur les revêtements, contrairement au site de Rimouski au Québec. ....	22
Tableau 4. Suivi des paramètres environnementaux (températures, salinité, pH, oxygène dissous, carbone et azote organique dissous et sels nutritifs) pendant six mois d'immersion à la marina de Rimouski (mai à octobre 2021). NA : non analysé. ....	26
Tableau 5. Indice d'efficacité N de chaque revêtement et témoin mesuré à chaque temps d'échantillonnage (n= 3) lors de l'immersion de six mois à Rimouski (été 2021). Les indices en rouge représentent les plus faibles indices mesurés à un et six mois d'immersion. ....	29
Tableau 6. Préparation des échantillons d'ADN pour l'amplification PCR. Les amorces Forward (F) et Reverse (R) ont été utilisées selon l'ADNr ciblé (16S : 515F-Y/926R ; 18S : 960F/NSR1438). ....	50
Tableau 7. Étapes de l'amplification par PCR des échantillons de l'étude. ....	51
Tableau 8. Paramètres environnementaux dans les marinas de Rimouski et de Sept-Îles au premier jour (T0 Rimouski : 15/07/23, T0 Sept-Îles : 01/08/23) et au dernier jour (T30 Rimouski : 15/08/23, T30 Sept-Îles : 31/08/23) d'immersion des mouillages. ....	54



## LISTE DES FIGURES

Figure 1. Carte du système fluvial, estuarien et du golfe du Saint-Laurent (Plan d'action Saint-Laurent 2017).....	2
Figure 2. Schéma temporel de la formation du biofouling sur une surface immergée, inspiré de Lejars et al. (2012).....	3
Figure 3. Formation et maturation d'un biofilm, adapté de Nakanishi et al. (2021).....	5
Figure 4. Schéma du mode d'action des revêtements FRC, adapté de Lejars et al. (2012). .....	11
Figure 5. A : Photographie du mouillage avant immersion, mai 2021 (haut). Schéma du mouillage consacré à l'analyse du macrofouling (bas). B : Photographie du mouillage avant immersion à la marina de Rimouski, mai 2021 (haut). Schéma du mouillage consacré à l'analyse du microfouling (bas). Toutes les plaques sont en triplicata sur chaque mouillage. Le mouillage a été immergée à la verticale sur les six mois d'immersion. ....	20
Figure 6. Suivi photographique de la colonisation du macrofouling des différents revêtements expérimentaux et des témoins contrôles pendant six mois d'immersion à la marina de Rimouski. ....	28
Figure 7. Pourcentage du recouvrement total avec écart-types du macrofouling mesuré sur les différents revêtements (n=3) après un mois d'immersion (A) et après six mois d'immersion (B) à Rimouski. * Différences statistiques entre les revêtements (p-value < 0,05).....	28
Figure 8. Pourcentage du recouvrement total avec écart-types du microfouling mesuré à $\lambda = 500$ nm (Syto 9 en rouge foncé) et à $\lambda = 669$ nm (Chlorophylle <i>a</i> en brun clair) par microscopie confocale à balayage laser après un mois d'immersion (A) et six mois d'immersion (B) à Rimouski (n=3 par revêtement). Les cercles noirs représentent les valeurs aberrantes.....	31
Figure 9. Biovolume ( $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ ) avec écart-types des biofilms formés sur les différents revêtements (n=3) après un mois d'immersion (A) et six mois d'immersion à Rimouski (B).....	32
Figure 10. Épaisseur ( $\mu\text{m}$ ) avec écart-types des biofilms formés sur les différents revêtements (n=3) après un mois d'immersion (A) et six mois d'immersion à	

Rimouski (B). * Différences statistiques entre les revêtements (p-value < 0,05).....	32
Figure 11. Schéma des coupons des revêtements collés sur une grande plaque de PVC (gauche). Photographie d'une plaque installée sur le mouillage (droite). Sur chaque plaque ont été montés des triplicatas de chaque revêtement. ....	44
Figure 12. A : Mouillage immergé à la marina de Rimouski du 15 juillet au 15 août 2023. B : Système de mouillage immergé à la marina de Sept-Îles du 1 <sup>er</sup> août au 21 août 2023.....	45
Figure 13. Schéma des différents temps d'échantillonnages des biofilms formés sur les revêtements lors des deux transplantations entre Rimouski et Sept-Îles de mi-juillet à fin août 2022. T1 : Échantillonnage après un mois d'immersion en milieu naturel. T2 : Échantillonnage après transplantation sur l'autre site. T3 : Échantillonnage après 15 jours d'immersion contrôlée sur le site receveur.....	46
Figure 14. Abondance relative (%) et moyenne (cellules/mL) des espèces microbiennes hétérotrophes retrouvées dans les marinas de Rimouski et de Sept-Îles au premier jour (T0) et au dernier jour (T30) de l'immersion des revêtements.....	55
Figure 15. Abondance relative (%) et moyenne (cellules/mL) des espèces autotrophes mesurées dans les marinas de Rimouski et de Sept-Îles au premier jour (T0) et au dernier jour (T30) d'immersion des revêtements.....	56
Figure 16. Abondance relative (%) des ASV obtenus par séquençage Illumina de l'ARN16S et après traitement sur DADA2 et assignation taxonomique avec SILVA138 au niveau des phyla. La diversité des communautés bactériennes a été déterminée au premier jour (T0) et au dernier jour (T30) des sites d'immersion.....	57
Figure 17. Abondance relative (%) des ASV obtenus par séquençage Illumina de l'ARN18S et après traitement sur DADA2 et assignation taxonomique par PR <sup>2</sup> au niveau des supergroupes. La diversité des communautés eucaryotes a été déterminée au premier jour (T0) et au dernier jour (T30) des sites d'immersion.....	58
Figure 18. Abondance totale moyenne (cellules/mL) des espèces microbiennes hétérotrophes des biofilms formés sur les différents revêtements après 1 mois d'immersion (T1), après transplantation (T2) et après 15 jours d'immersion contrôlée (T3) lors de la transplantation Rimouski-Sept-Îles (A) et Sept-Îles-Rimouski (B). * Différences statistiques entre les revêtements (p-value < 0,05).....	60

Figure 19. Abondance totale moyenne (cellules/mL) des espèces microbiennes autotrophes des biofilms sur les différents revêtements après 1 mois d'immersion (T1), après transplantation (T2) et après 15 jours d'immersion contrôlée (T3) lors de la transplantation Rimouski-Sept-Îles (A) et Sept-Îles-Rimouski (B). * Différences statistiques entre les revêtements (p-value < 0,05).....	62
Figure 20. Indices de diversité de Shannon et de Chao1 pour les espèces microbiennes (16S) composant les biofilms formés sur PVC et les revêtements N2 et M2 après transplantation et immersion contrôlée entre Rimouski et Sept-Îles. ....	66
Figure 21. Abondance relative (%) des phyla retrouvés au sein des ASV obtenus par séquençage Illumina de l'ADNr16S et après traitement sur DADA2. L'assignation taxonomique a été réalisée à partir de la base de données SILVA138. La diversité des communautés procaryotes des revêtements N2, M2 et PVC a été déterminée après transplantation et immersion contrôlée sur la transplantation Rimouski-Sept-Îles (A) et Sept-Îles-Rimouski (B). Le groupe NA représente les séquences bactériennes dont l'assignation taxonomique a échoué. En gras sont représentés les phyla majoritaires retrouvés au sein des biofilms. ....	67
Figure 22. Abondance relative (%) des familles retrouvées au sein des ASV obtenus par séquençage Illumina de l'ADNr16S et après traitement sur DADA2. L'assignation taxonomique a été réalisée à partir de la base de données SILVA138. La diversité des communautés procaryotes des revêtements N2, M2 et PVC a été déterminée après transplantation et immersion contrôlée sur la transplantation Rimouski-Sept-Îles (A) et Sept-Îles-Rimouski (B). Les 13 familles bactériennes majoritaires sur l'ensemble des échantillons de biofilms sont représentées. Les autres familles et les séquences bactériennes dont l'assignation taxonomique a échoué sont dans le groupe Autres. ....	68
Figure 23. Représentation NMDS (Non-metric MultiDimensional Scaling) avec la distance de Bray-Curtis, appliqué aux échantillons de biofilms 16S des revêtements après transplantation (T2) et immersion contrôlée (T3) sur les différentes transplantations entre Rimouski et Sept-Îles.....	69
Figure 24. Indices de diversité de Shannon et de Chaos1 pour les espèces microbiennes (18S) composant les biofilms formés sur PVC et les revêtements N2 et M2 après transplantation et immersion contrôlée entre Rimouski et Sept-Îles. ....	72
Figure 25. Abondance relative (%) des supergroupes retrouvés au sein des ASV obtenus par séquençage Illumina de l'ADNr18S et après traitement sur DADA2. L'assignation taxonomique a été réalisée à partir de la base de données PR <sup>2</sup> . La diversité des communautés eucaryotes des revêtements N2, M2 et PVC a été déterminée après transplantation et immersion contrôlée sur	

la transplantation Rimouski-Sept-Îles (A) et Sept-Îles-Rimouski (B). Le groupe NA représente les séquences eucaryotes dont l'assignation taxonomique a échoué. .... 73

Figure 26. Abondance relative (%) des subdivisions retrouvées au sein des ASV obtenus par séquençage Illumina de l'ADNr18S et après traitement sur DADA2. L'assignation taxonomique a été réalisée à partir de la base de données PR<sup>2</sup>. La diversité des communautés eucaryotes des revêtements N2, M2 et PVC a été déterminée après transplantation et immersion contrôlée sur la transplantation Rimouski-Sept-Îles (A) et Sept-Îles-Rimouski (B). Les 13 subdivisions des organismes eucaryotes majoritaires dans l'ensemble des échantillons de biofilms sont représentées. Les autres subdivisions et séquences eucaryotes dont l'assignation taxonomique a échoué sont dans le groupe Autres..... 74

Figure 27. Représentation NMDS (Non-metric MultiDimensional Scaling) avec la distance de Jaccard, appliqué aux échantillons de biofilms 18S des revêtements après transplantation (T2) et immersion contrôlée (T3) sur les différentes transplantations entre Rimouski et Sept-Îles. .... 75

## LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

<b>ADNr</b>	ADN ribosomal
<b>DOC</b>	carbone organique dissous
<b>EPS</b>	substance exopolysaccharide
<b>FRC</b>	fouling-release coating
<b>HCl</b>	acide chlorhydrique
<b>L1 / L1</b>	revêtement antifouling expérimental Université de Lorient
<b>M2 / M4</b>	revêtement antifouling expérimental Université de Toulon
<b>MK1 / MK2</b>	revêtement antifouling expérimental Mirapakon Inc.
<b>N1 / N22</b>	revêtement antifouling expérimental Peintures Marines Nautix
<b>NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	nitrite/nitrate
<b>PBS</b>	tampon phosphate salin
<b>PC</b>	phycocyanine
<b>PCR</b>	réaction de polymérisation en chaîne
<b>PE</b>	phycoérythrine
<b>PO<sub>4</sub><sup>3-</sup></b>	phosphate
<b>PVC</b>	polychlorure de vinyle
<b>PVCS</b>	polychlorure de vinyle sablé

<b>SiO<sub>2</sub></b>	silice
<b>TBT</b>	tributylétain
<b>TDN</b>	azote total dissous
<b>X3+</b>	Hempasil X3+

## LISTE DES SYMBOLES

$\chi^2$

khi deux



## INTRODUCTION GÉNÉRALE

Les écosystèmes aquatiques subissent de graves impacts liés aux activités humaines, incluant la surpêche, l'introduction de produits chimiques et de déchets plastiques, ainsi que les émissions de gaz à effet de serre émis lors de la navigation (Hader et al. 2020; Halpern et al. 2008; Jackson et al. 2001; Schultz 2007). Zones de transition, les estuaires abritent des écosystèmes diversifiés particuliers à ces conditions spécifiques, et sont particulièrement vulnérables aux activités anthropiques (Kennish 2019). Parmi ces estuaires, le Saint-Laurent, situé à l'est du Québec (Figure 1), est une voie maritime majeure entre le Canada et les États-Unis. Elle est ouverte à la navigation toute l'année, permettant aux navires de l'Atlantique d'atteindre les Grands Lacs à l'intérieur des terres. Chaque année, environ 5 000 navires commerciaux empruntent l'estuaire du Saint-Laurent (Plan d'action Saint-Laurent 2017).

L'industrie maritime peut exercer diverses pressions sur l'écosystème du Saint-Laurent. Parmi celles-ci, le trafic intense des navires commerciaux augmente le risque de déversement d'hydrocarbures et également le risque de collision avec les mammifères marins résidents de l'estuaire (Chion et al. 2018; Desjardins et canadien de consultation Scientifique 2018). Le trafic maritime sur le Saint-Laurent accroît également le risque d'introduction d'espèces invasives *via* les eaux de ballast (Transport Canada 2019). En juin 2021, le Canada a mis en place le Règlement sur les eaux de ballast pour réduire l'introduction d'espèces potentiellement invasives dans les eaux (Transport Canada 2019). Diverses études régionales ont mis en évidence une autre voie d'introduction à partir des bioalissures présentes sur les navires commerciaux et de plaisance (MPO et Secrétariat canadien des avis scientifiques 2022). Ces bioalissures, communément appelées « biofouling », se forment sur toutes les surfaces immergées, dont les coques de bateaux, suite à une succession de colonisations naturelles par des microorganismes puis des macroorganismes aquatiques (Callow et Callow

2002). L'implication du biofouling dans le transfert d'espèces invasives est encore peu étudiée au Canada, et sa gestion (application de revêtements antifouling conformes, inspection et nettoyage des coques) n'est pas réglementée au niveau de la navigation de plaisance (MPO et Secrétariat canadien des avis scientifiques 2022). Les sites portuaires et les marinas sont les principaux lieux touchés par l'introduction d'espèces invasives (Minchin et Gollasch 2003). L'abondance des ports et des marinas dans le système Saint-Laurent, couplée à la forte activité maritime et de plaisance, sont susceptibles de favoriser la dispersion d'espèces potentiellement invasives entre les différents sites (Darbyson et al. 2009; Dufour 2007).

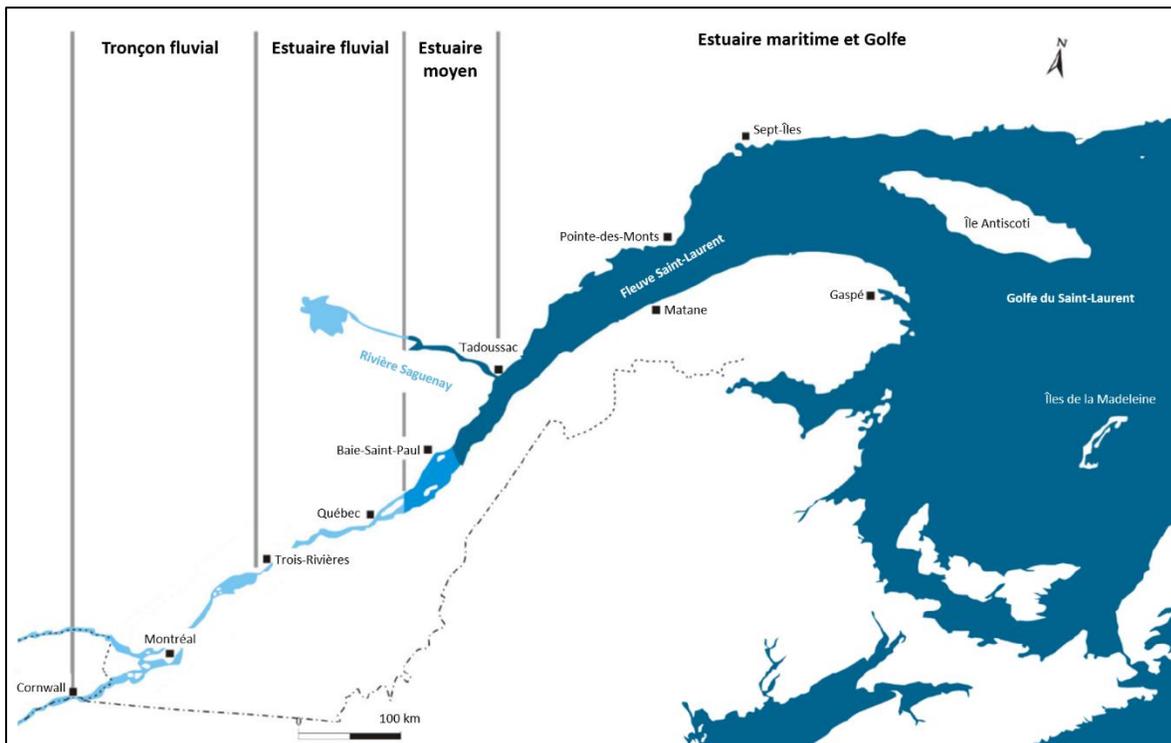


Figure 1. Carte du système fluvial, estuarien et du golfe du Saint-Laurent (Plan d'action Saint-Laurent 2017).

## 1. FORMATION DU BIOFOULING

Le biofouling se forme progressivement sur une surface immergée par l'adhésion des espèces colonisatrices du milieu en six étapes (Figure 2).

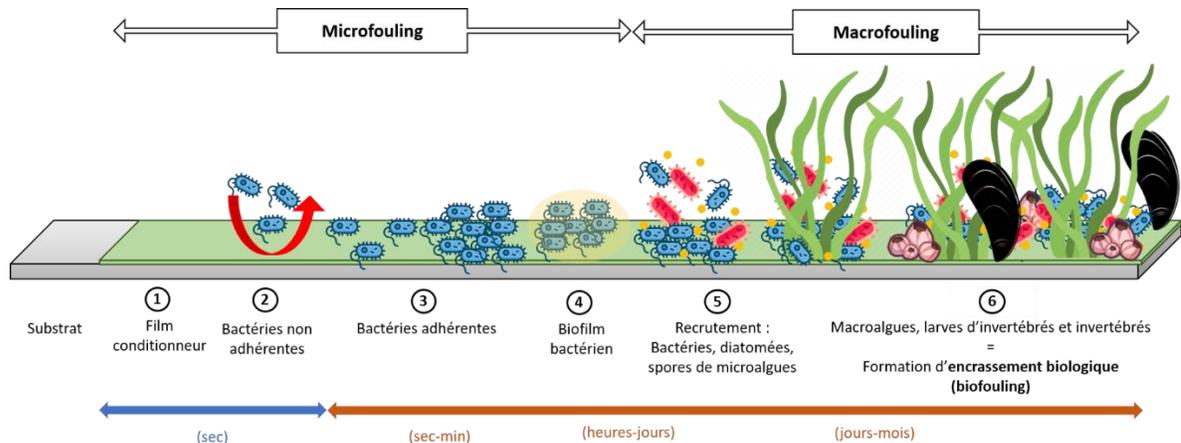


Figure 2. Schéma temporel de la formation du biofouling sur une surface immergée, inspiré de Lejars et al. (2012).

La première étape de colonisation débute dès l'immersion, par la mise en place d'une structure appelée « film conditionneur » dont la formation est influencée par la composition chimique du milieu (Étape 1, Figure 2). Ce film conditionneur peut être formé à partir de différentes molécules, telles que des acides nucléiques, des glycoprotéines, des protéines ou des polysaccharides (Lejars et al. 2012). Selon sa composition, certaines propriétés de la surface (tension, mouillabilité et énergie libre) peuvent être modifiées, influençant ainsi le recrutement des bactéries pionnières colonisatrices (Abe et al. 2011; Bakker et al. 2004; Bhosle 2004; Hwang et al. 2013; Taylor et al. 1997). Ces bactéries sont présentes dans la colonne d'eau et ont un rôle clé dans le développement futur du biofilm. Elles sont les premières à interagir de manière non spécifique avec le film conditionneur par des forces de Van der Waals, puis des interactions hydrophobes (Étape 2 Figure 2 et 3). Ces interactions initient une première adhésion réversible des bactéries pionnières sur la surface immergée (Conrad 2012). Au bout de quelques minutes, les interactions deviennent spécifiques entre les structures cellulaires et la surface, induisant chez les bactéries l'expression génique et la

formation de polymères adhésifs tels que l'adhésine et des substances exopolymériques (Berne et al. 2015). Ces peptides et ces matrices favorisent le point d'ancrage des bactéries pionnières, et conduisent à leur adhésion irréversible (Étape 3 Figure 2, Figure 3). Ces bactéries vont alors devenir un substrat pour le recrutement de nouveaux microorganismes bactériens. L'ensemble de ces microorganismes s'agglutinent et se multiplient, menant à la formation de microcolonies c'est-à-dire d'un biofilm (Étape 4, Figure 2) (Tremblay et al. 2014). Ce dernier se développe grâce à la production continue de substances exopolysaccharides (EPS), qui favorise l'augmentation du volume et de la densité cellulaire du biofilm (Stoodley et al. 2002).

Une fois parvenu à maturation, le biofilm devient un microenvironnement tridimensionnel diversifié et complexe, comportant des canaux d'eau permettant les apports en oxygène et en nutriments (Donlan 2002; O'Toole et al. 2000). Différents facteurs vont alors initier le détachement des bactéries présentes sur la partie supérieure du biofilm (Figure 3) (Nakanishi et al. 2021). Ces dernières se dispersent dans la colonne d'eau, et vont avoir la capacité de se fixer à proximité du biofilm initial, ou sur de nouvelles surfaces pour reformer un biofilm (Tremblay et al. 2014). Une fois mature, le biofilm a également la capacité de recruter d'autres microorganismes, tels que des microalgues ou encore des diatomées (Étape 5, Figure 2). L'ensemble de ces processus se répétant, permet une propagation du biofilm et une colonisation totale de la surface immergée sous forme de microfouling (Lejars et al. 2012; McDougald et al. 2012).

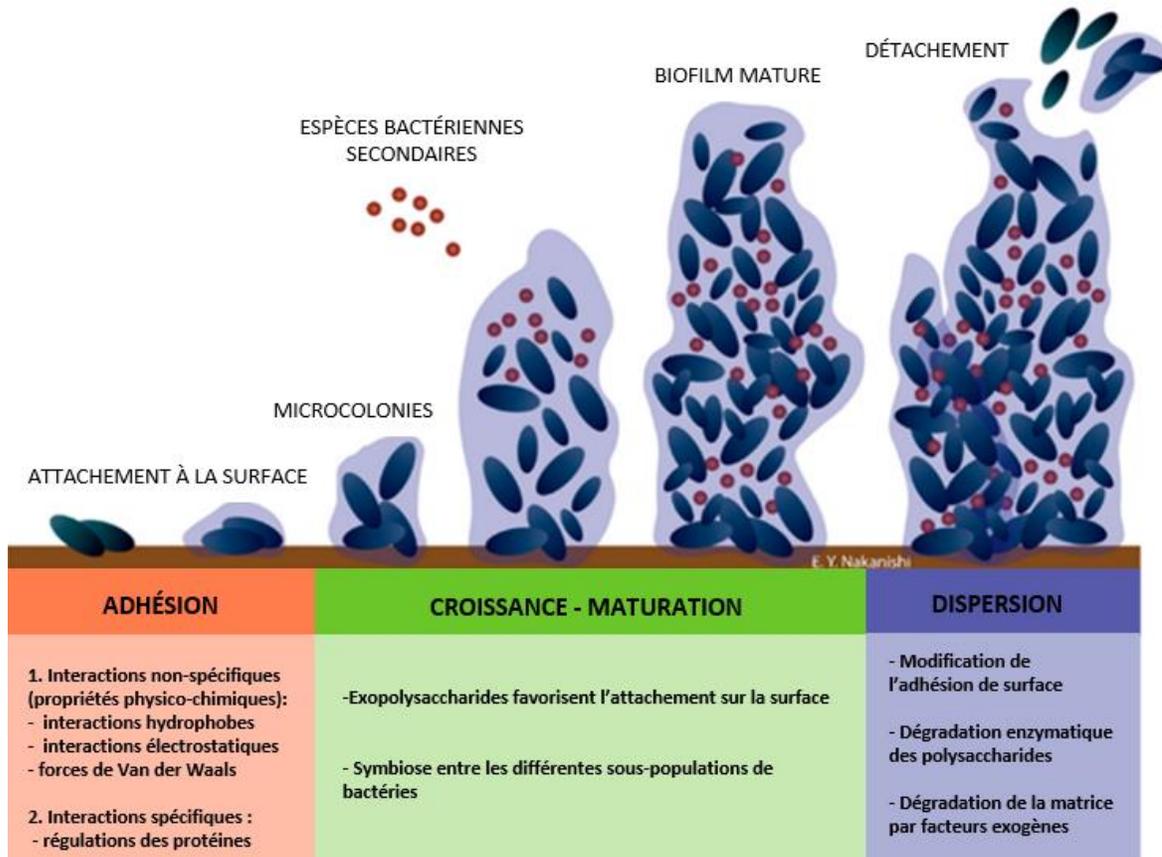


Figure 3. Formation et maturation d'un biofilm, adapté de Nakanishi et al. (2021).

La composition chimique et biologique du microfouling influencent l'établissement et la croissance des futurs macroorganismes tels que des invertébrés et des macroalgues, constituant le macrofouling (Étape 6, Figure 2), (Beech et al. 2005). Les organismes contribuant au macrofouling ont pour caractéristiques d'avoir un taux de croissance rapide et une grande adaptabilité à différents environnements (Yebra et al. 2004). L'ensemble du microfouling et du macrofouling constitue le biofouling (Lejars et al. 2012).

Les paramètres environnementaux, tels que la température, la salinité, l'intensité lumineuse ou encore la concentration en oxygène, influencent la dynamique de croissance du biofouling (Lejars et al. 2012). Ces paramètres varient de manière saisonnière et selon la localisation géographique (Hellio et Yebra 2009). Dans les eaux tropicales, les conditions environnementales sont propices à une croissance rapide du biofouling. Les faibles variations

saisonniers dans ces milieux favorisent le biofouling sur les surfaces immergées tout au long de l'année (Yebra et al. 2004). Au contraire, le phénomène de biofouling varie dans les régions tempérées et polaires, telles que l'estuaire du Saint-Laurent, où les saisons sont plus marquées (Galbraith *et al.* 2019; Hellio et Yebra 2009). En période hivernale, la présence d'une couverture de glace dans le Saint-Laurent, ainsi que la diminution de température et de l'intensité lumineuse réduisent la productivité de ces milieux, limitant ainsi la formation de biofouling (Hellio et Yebra 2009). C'est seulement pendant la période estivale lorsque la température, les concentrations en nutriments et l'intensité lumineuse augmentent à nouveau que l'environnement redevient favorable à la formation de biofouling (Lejars et al. 2012).

## **2. IMPACT DU BIOFOULING SUR LA NAVIGATION**

Le biofouling entraîne des coûts financiers majeurs pour le secteur maritime. Les dépenses annuelles découlant directement de la présence d'organismes non désirables sont de l'ordre de plusieurs milliards de dollars, en raison du surcoût des opérations d'entretien et des nettoyages réguliers des navires (Schultz et al. 2011).

L'accumulation des organismes constituant le macrofouling sur les coques augmente le poids des navires et accentue la rugosité de surface, favorisant une résistance aux frottements lors de la navigation (Yebra et al. 2004). La diminution de l'hydrodynamisme des bateaux peut conduire à une augmentation de 10 % de la consommation de carburant par an (Schultz et al. 2011). Cette hausse d'utilisation de carburant favorise l'augmentation d'émission de gaz à effet de serre dans la navigation maritime (Demirel et al. 2017; Schultz et al. 2011). D'après les résultats préliminaires d'une étude réalisée par l'Organisation Maritime Internationale (IMO), les émissions de gaz à effet de serre émis seraient influencés par la taille du navire et la sévérité de la colonisation de biofouling sur les coques (IMO 2022).

Le biofouling engendre l'usure précoce des coques de navires (Flemming 1996). En effet, parmi les espèces bactériennes composant les biofilms marins (microfouling), certaines sont impliquées dans la corrosion des surfaces métalliques immergées. C'est le cas des

bactéries sulfato-réductrices et les bactéries aérobies du fer, souvent retrouvées dans les biofilms formés sur des surfaces métalliques immergées (Dzierzewicz et al. 1997; Liu et al. 2015a). Le métabolisme de ces bactéries produit divers biocomposés, amenant à une corrosion localisée de la surface, et augmentant les coûts d'entretien des navires (Liu et al. 2015a).

En plus des impacts économiques, le biofouling a également des conséquences écologiques sur les milieux soumis à la navigation. Il est, après les eaux de ballast, un vecteur important de transfert d'espèces « allochtones » à grande échelle par la navigation (Bailey et al. 2020; Hewitt et al. 2009). Une espèce allochtone est toute espèce se trouvant hors de son aire de répartition naturelle (Valery et al. 2009). Une introduction d'espèces allochtones dans un nouvel environnement résulte des activités anthropiques, suite à un transport intentionnel ou accidentel (Galil et Occhipinti-Ambrogi 2004). Dans le cas d'une introduction induit par le biofouling, il est également utilisé le terme « non-indigène » pour définir ces espèces. Les espèces non indigènes sont toutes espèces qui n'était pas présente naturellement dans un milieu avant des temps relativement modernes, leurs introductions ayant été favorisé par les activités humaines (Simard et al. 2024). Pour la suite de ce mémoire, le terme allochtone sera privilégié.

Avec l'essor de l'industrie maritime de ces trente dernières années, ce risque d'introduction par le biofouling ne cesse d'augmenter (Diagne et al. 2021). L'accumulation des différents organismes présents au sein du biofouling est influencée entre autres par l'historique géographique du navire et sa durée de séjour dans les ports (Chan et al. 2022; Darbyson et al. 2009). Une fois en transit dans les zones portuaires ou dans les marinas, deux processus favorisent la remise en suspension des organismes composant le biofouling formé sur les navires : le lessivage naturel induit par les vents et marées, et les étapes de nettoyage obligatoire dans les marinas (Minchin et Gollasch 2003). Souvent, l'introduction d'une nouvelle espèce allochtone dans un environnement n'est pas détectable. Toutefois, si l'environnement est favorable à sa croissance, et que cette espèce peut avoir un effet négatif

sur l'écosystème, sur l'économie et la santé humaine, alors cette espèce est considérée comme envahissante (CCFAM 2004; McKindsey et al. 2007).

Différentes caractéristiques biologiques contribuent au potentiel invasif des espèces allochtones : un fort taux de reproduction, une croissance rapide, une bonne capacité d'adaptation et une résistance aux perturbations environnementales (Conseil du Saint-Laurent 2017). De plus, l'établissement de ces espèces allochtones envahissantes dans un nouveau milieu dépend des conditions environnementales, en particulier de la température et de la salinité (Yebra et al. 2004). Lorsque ces conditions sont favorables, les organismes libérés dans la colonne d'eau peuvent coloniser le nouvel environnement, et entrer en compétition pour des ressources, comme les nutriments et l'espace, avec les espèces déjà présentes (Hellio et Yebra 2009).

L'introduction et la prolifération des espèces allochtones envahissantes sont à considérer, car elles peuvent avoir des conséquences néfastes que ce soit au niveau écologique ou économique. Une dominance de ces espèces envahissantes entraîne des changements dans la composition des communautés, menant parfois à une perte de biodiversité dans l'environnement (Meinesz et al. 1993). Aujourd'hui, ce risque de propagation est défini comme la deuxième principale menace pour la biodiversité des milieux aquatiques (Simberloff et Rejmánek 2011). Au Québec, un bon nombre d'espèces aquatiques envahissantes sont établies, comme par exemple le crabe vert (*Carcinus maenas*) et la moule zébrée (*Dreissena polymorpha*), dont leur introduction est issue du trafic maritime (Gouvernement du Canada 2024).

Il est important de prendre en compte que les connaissances actuelles sur les espèces envahissantes introduites par le biofouling portent majoritairement sur les macroorganismes (macrofouling), et que ce risque d'introduction au niveau des microorganismes (microfouling) est encore peu connu.

### 3. LES REVÊTEMENTS ANTIFOULING : MOYEN DE CONTROLE DU BIOFOULING

Considérant les risques associés au biofouling, il est nécessaire de contrôler et limiter la colonisation des surfaces immergées des navires. Pour ce faire, une des solutions la plus abordable et efficace est l'application préventive et régulière de revêtements antifouling (Dafforn et al. 2011). Durant les cinquante dernières années, une grande variété de revêtements antifouling contenant des biocides a été développée dans l'objectif de limiter le biofouling par le biais d'une libération constante de biocides à la surface (Yebra et al. 2004).

Au début des années 1970, les revêtements à base de tributylétain (TBT) étaient majoritaires sur le marché en raison de leur efficacité et de leur durabilité (Lejars et al. 2012). L'utilisation de ce produit permettait de protéger les surfaces immergées des navires jusqu'à cinq ans contre la formation de biofouling. Cependant, le TBT s'est révélé être hautement toxique pour différents organismes marins non ciblés tels que les algues, les invertébrés ou encore les poissons (Amara et al. 2018). Par exemple, le TBT s'est révélé être à l'origine du phénomène d'imposex chez les gastéropodes marins *Nucella lapillus*. Le développement de caractéristiques sexuelles mâles a été observé chez les gastéropodes femelles exposés à ce produit même à faible concentration (Oehlmann et al. 1991). En raison de ses multiples impacts sur les organismes et sa persistance dans les sédiments marins, l'utilisation du TBT a été interdite dans les revêtements par l'OMI en 2001 (Antizar-Ladislao 2008; IMO 2001; Lejars et al. 2012).

Depuis cette interdiction, différentes catégories de revêtements antifouling tels que les revêtements co-biocides ont été développés comme alternatives au TBT (Lejars et al. 2012). Ces revêtements contiennent des composés organométalliques (dérivés de zinc ou de cuivre), mélangés à des composés organiques (par exemple l'Irgarol 1051 et le Diuron) qui permettent d'améliorer les performances antifouling. Les co-biocides sont considérés comme moins dangereux que le TBT pour l'environnement, car ils possèdent une action ciblée (de type bactéricide, fongicide) sur un type d'organisme (Konstantinou et Albanis 2004). Les revêtements co-biocides possèdent une activité antimicrobienne pour limiter la formation du

biofilm marin, et ont également l'avantage d'avoir un faible coût d'application. Cependant, ces produits s'érodent avec le temps et perdent leur efficacité rapidement (Lejars et al. 2012). De plus, ces nouveaux produits biocides conservent une toxicité pour les organismes marins, comme pour l'humain (Konstantinou et Albanis 2004). De plus, lors du processus de nettoyage des coques par arrosage à haute pression, des particules de biocides sont rejetées dans l'environnement. Ces nettoyages périodiques augmentent le risque d'exposition aux molécules toxiques par inhalation pour l'humain. La libération des particules toxiques couplée à leur persistance dans l'environnement marin engendrent une pollution aigüe et chronique localisée dans les sédiments des zones à fortes activités nautiques tels que les ports et les marinas (Konstantinou et Albanis 2004). Ces études sur la toxicité de ces produits ont amené à leur régulation en Europe suite à la Directive des Produits Biocides (98/8/EC) depuis les années 2000, mais également dans l'état de Washington aux États-Unis (Legislature 2011). La nouvelle réglementation européenne permet de vérifier l'innocuité des co-biocides pour autoriser leur application et leur commercialisation (Hellio et al. 2009).

Considérant les nouvelles réglementations en vigueur à l'échelle internationale qui interdisent de plus en plus l'usage des molécules biocides dans les revêtements, de nouveaux revêtements antifouling respectueux de l'environnement marin sont à développer. Dans une optique de développement durable de la navigation maritime, une des solutions envisagées est le développement de revêtements de type « fouling-release coating » (FRC). Ces revêtements sont hydrophobes avec une faible énergie de surface, réduisant l'adhésion des microorganismes colonisateurs sur la surface immergée. Lors d'un stress hydrodynamique (effet de lessivage), la surface enduite développe de nouvelles propriétés d'auto-nettoyage, permettant le détachement des salissures (Figure 4). Exempts d'action biocide, ces revêtements ont l'avantage d'être non létaux pour les microorganismes de l'environnement, et ont une efficacité de longue durée (Lejars et al. 2012).

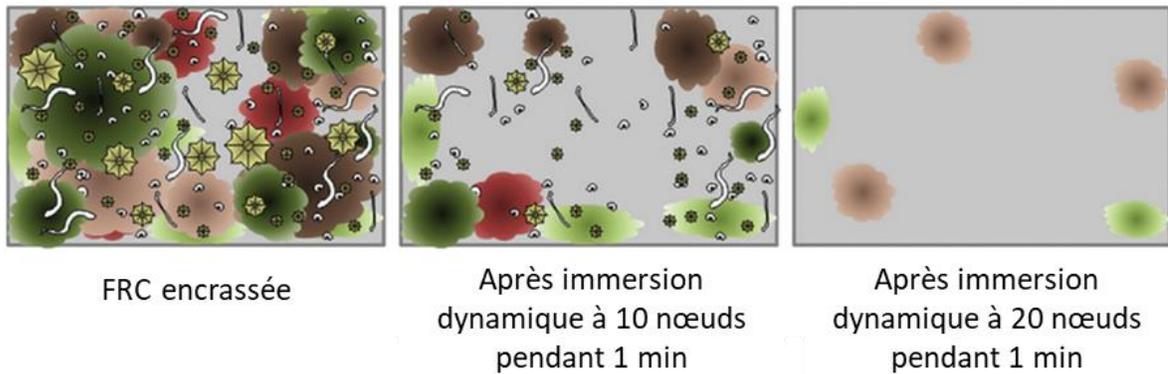


Figure 4. Schéma du mode d'action des revêtements FRC, adapté de Lejars et al. (2012).

Cependant, ces revêtements FRC nécessitent une application plus régulière sur les surfaces à protéger, l'activité antifouling étant moins efficace que celle des autres revêtements classiques. En effet, leur capacité d'auto-nettoyage ne fonctionne pas à une vitesse inférieure à 8 nœuds (Lejars et al. 2012).

Il apparaît nécessaire de trouver une alternative acceptable à ces revêtements en développant de nouveaux outils efficaces pour limiter la vitesse de formation et l'adhésion du biofouling sur de longues durées. Ces nouveaux produits contribueront ainsi à réduire l'impact de la navigation maritime dans l'estuaire du Saint-Laurent et à l'échelle mondiale sur les écosystèmes marins. Cependant, il existe peu de données sur la formation et le développement ultérieur du biofilm suite à l'utilisation de revêtements FRC.

#### 4. OBJECTIFS

Le projet PAINTS (Peintures Antifouling propres pour l'Industrie de Navigation dans une optique de Transition Socio-écologique vers l'éconavigation, financement ANR/FRQ) mis en place en 2020, a pour objectif général de développer des revêtements antifouling de nouvelle génération permettant de limiter la colonisation microbienne irréversible sur les surfaces immergées, tout en respectant l'ensemble de la diversité aquatique. C'est un projet collaboratif France/Québec entre les laboratoires UQAR-ISMER (Rimouski, Québec, Canada), le Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines (UBS, Lorient, France), le

Laboratoire Matériaux Polymères Interfaces Environnement Marin de l'Université de Toulon (UTLN, Toulon, France), les industries Peintures Maritimes Nautix (France) et les Enduits MIRAPAKON Inc. (Québec, Canada) en partenariat avec l'INREST (Sept-Îles, Québec, Canada), IRMA (Lorient, France) et NIXA (Île de la Réunion, France).

Avec le réchauffement des eaux et la perte de couverture de glace, la hausse des activités de navigation couplée à l'évolution des conditions découlant des changements climatiques, pourrait accroître le risque de transfert d'espèces potentiellement invasives dans le Saint-Laurent (Dufour et Quellet 2007). Ce projet de maîtrise fait partie intégrante de PAINTS et a pour objectif de démontrer l'efficacité de revêtements antifouling expérimentaux exempts de biocides et d'estimer le risque de transfert d'espèces microbiennes allochtones potentiellement invasives en milieux estuariens, dans le système du Saint-Laurent (Québec). Ce projet de Maitrise se compose de deux axes de recherche.

Dans le premier axe de recherche, l'efficacité antifouling de huit revêtements expérimentaux a été étudiée en conditions naturelles d'immersion. Ces revêtements ont été immergés pendant six mois à la marina de Rimouski durant l'été 2021. Suite à cette immersion, les premiers stades de colonisation (microfouling) ont été étudiés par microscopie confocale et les étapes subséquentes de colonisation (macrofouling) par l'établissement d'un indice d'efficacité N, basé sur le pourcentage de recouvrement du biofouling (Camps et al. 2014). L'ensemble de ces données ont été comparées avec un témoin positif de colonisation (surface nue) et un revêtement FRC commercial. Il est attendu d'observer une colonisation du microfouling et du macrofouling sur les revêtements FRC expérimentaux, qui sera toutefois inférieure à celle attendue sur le contrôle PVC. Concernant la colonisation du microfouling, il est attendu de retrouver des biofilms plus matures sur les contrôles PVC que sur les revêtements FRC expérimentaux et commerciaux.

Dans le second axe de recherche, le risque de transfert d'espèces microbiennes allochtones potentiellement invasives intersites en milieu froid a été étudié en considérant l'emploi des deux revêtements expérimentaux les plus efficaces. Deux objectifs spécifiques ont été ciblés : 1) caractériser les espèces microbiennes (microfouling) capables de coloniser

les surfaces immergées enduites de revêtements sans biocides et les surfaces non enduites de revêtements antifouling (témoin positif) *via* une approche *in situ* par immersion en milieu naturel et 2) évaluer le potentiel de transfert intersites après transfert de plaques colonisées dans un milieu présentant des paramètres environnementaux différents de ceux du site d'immersion d'origine. Pour répondre à ces deux sous-objectifs, l'abondance des microorganismes autotrophes et hétérotrophes a été mesurée pour chaque revêtement, à différentes étapes de la transplantation. De même, la composition microbienne des biofilms a été analysée par métabarcoding. Suite aux immersions en milieu naturel, il est attendu d'observer une différence de la colonisation microbienne en termes d'abondance et de diversité (indice de Shannon et Chao 1) sur les surfaces enduites par les revêtements FRC expérimentaux contrairement aux plaques non enduites. Par conséquent, il sera possible de d'évaluer la sélectivité des différents revêtements sur la colonisation (comparativement aux surfaces PVC non enduites) après transfert dans un nouvel environnement.



# **CHAPITRE 1**

## **EFFICACITÉ DES REVÊTEMENTS ANTIFOULING DE NOUVELLE GÉNÉRATION EN MILIEU ESTUARIEN**

### **1.1 INTRODUCTION**

L'estuaire du Saint-Laurent est la plus grande voie maritime commerciale entre l'Europe et l'Amérique du Nord. Chaque année, près de 5 000 navires commerciaux empruntent ce passage, contribuant ainsi de manière significative à l'essor économique du Québec (Plan d'action Saint-Laurent 2017). Cet intense trafic maritime ne se limite pas qu'au secteur commercial. Avec 80% de la population québécoise résidant le long des rives du fleuve, la navigation de plaisance est également très prisée sur le Saint-Laurent (Plan d'action Saint-Laurent 2017).

L'important trafic maritime est susceptible d'avoir des impacts sur les écosystèmes du Saint-Laurent. Parmi ceux-ci, on peut citer les collisions accidentelles avec les mammifères marins résidents et la menace potentielle d'introduction et propagation de nouvelles espèces invasives (Chion et al. 2018; MPO et Secrétariat canadien des avis scientifiques 2022). Au Canada, les eaux de ballasts représentent le principal vecteur d'introduction d'espèces invasives en milieu marin (Transport Canada 2019). L'eau de ballast est importante pour les navires car elle permet une stabilisation de ce dernier durant le voyage. Selon le chargement du navire, l'eau de ballast est chargée ou libérée dans l'environnement. Lors d'une navigation entre des eaux douces et des eaux salées, le risque d'introduction d'espèces allochtones potentiellement envahissantes est limitée. Cependant, dans le cas d'une navigation entre deux sites en milieux salée, ce risque devient plus élevé (Drake et al. 2020). Ainsi un règlement sur les eaux de ballast a été mis en place pour réduire l'introduction d'espèces potentiellement invasives dans les eaux canadienne (Transport Canada 2019).

En plus des eaux de ballast, il est également reconnu que la présence de biofouling sur les parties immergées des bateaux de plaisance et commerciaux constitue une source non négligeable de risque de propagation d'espèces invasives dans le Saint-Laurent (MPO et Secrétariat canadien des avis scientifiques 2022).

Pour limiter les impacts du biofouling, des revêtements antifouling sont appliqués sur les coques des navires (Lejars et al. 2012). Les premiers revêtements mis sur le marché étaient à base de TBT, mais leur haute toxicité sur les organismes marins non ciblés a mené à l'interdiction de ces produits par l'OMI en 2001 (IMO 2001). Depuis, divers revêtements alternatifs à base d'oxydes de cuivre et de biocides ont été développés et sont actuellement utilisés dans la navigation maritime. Toutefois, l'utilisation de ces revêtements présente toujours un risque pour la santé des écosystèmes et la santé humaine (Konstantinou et Albanis 2004). De nouveaux revêtements exempts de biocides et de type fouling-release coating (FRC), sont envisagés pour les remplacer (Lejars et al. 2012). L'hydrophobicité et la faible énergie de surface des revêtements FRC participent à la diminution de l'adhérence des organismes sur la surface immergée. Ce décrochement des organismes composant le biofouling est favorisé lors d'un stress hydrodynamique, notamment par le mouvement des bateaux (Lejars et al. 2012). Cependant, ces nouveaux revêtements FRC présentent une efficacité plus faible que les revêtements co-biocides. Des études ont démontré que des biofilms formés sur les FRC sont difficiles à décrocher même à haute vitesse (Lejars et al. 2012). Toutefois, l'absence de molécules toxiques fait qu'ils ne sont pas soumis à la réglementation des biocides, les présentant ainsi comme de nouveaux outils efficaces plus respectueux de l'environnement.

Tableau 1. Récapitulatif des grandes catégories de revêtements antifouling

Type de revêtements	Mode d'action	Avantages	Inconvénients
<b>TBT</b>	Inhibiteur de croissance pour les organismes marins	Efficacité élevée contre la croissance de biofouling, Durabilité	Toxicité élevée pour les organismes marins en général, Persistants dans l'environnement, Interdiction d'utilisation par l'OMI en 2001
<b>Co-biocides</b>	Action antimicrobienne contre la formation de biofilm marin	Efficacité élevée, Faible coût d'application	Risque de toxicité sur les organismes marins et l'humain, Législations d'utilisation selon le composé biocide utilisé
<b>FRC</b>	Faible énergie de la surface diminue l'adhésion du biofouling lors d'un stress hydrodynamique	Absence de molécules toxiques, Non soumis à des législations	Activité d'auto-nettoyage ne fonctionne pas à moins de 8 nœuds, Biofilm formé difficile à décrocher même à haute vitesse, Haut coût d'application

Dans le cadre de ce projet, l'efficacité de huit revêtements expérimentaux exempts de biocides a été évaluée. Pendant six mois, les revêtements ont été immergés en milieu naturel à la marina de Rimouski (Québec, Canada) dans l'estuaire maritime du Saint-Laurent. La colonisation de chacun des huit revêtements a été caractérisée à l'échelle du macrofouling et du microfouling après un mois et six mois d'immersion, et a été comparée avec un témoin de polychlorure de vinyle (PVC) non recouvert (témoin de colonisation maximale) et un témoin PVC recouvert d'un revêtement de type FRC commercial (témoin de colonisation régulée). L'objectif était de vérifier si l'utilisation de ces revêtements antifouling de nouvelle génération permet non seulement de réduire la formation de biofouling sur la surface, mais également de limiter l'abondance d'espèces microbiennes colonisatrices sur les surfaces traitées par l'utilisation de ces revêtements.

## **1.2 METHODOLOGIE**

### **1.2.1 Revêtements expérimentaux**

Un total de huit revêtements de type FRC ont été développés par les partenaires du projet : Peintures Marines Nautix (N), Les Enduits Mirapakon inc. (MK), le Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines de l'Université de Bretagne-Sud (L) et le Laboratoire Matériaux Polymères Interfaces Environnement Marin de l'Université de Toulon (M). Deux prototypes de revêtements ont été développés par laboratoire, et ont été nommés selon les abréviations suivantes : N1, N2, MK1, MK2, L1, L2, M2 et M4. Le support de chacun de ces revêtements est du PVC de 5 mm d'épaisseur. En plus de ces huit revêtements, un témoin de PVC sablé (PVCS) et un témoin de PVC non sablé (PVC) non recouverts ont été utilisés pour mesurer la colonisation maximale sur des surfaces non protégées par un revêtement antifouling (témoins de colonisation). Un revêtement commercial de type FRC, l'Hempasil X3+ (Hempel 2016), a été utilisé en tant que témoin de référence pour l'efficacité des revêtements expérimentaux (témoin de colonisation minimale). L'Hempasil X3+ a été développé par l'entreprise Hempel, et est le premier revêtement fouling-release sans biocide à être vendu sur le marché mondial de la navigation (Hempel 2016).

### **1.2.2 Site d'étude**

Les immersions ont été réalisées au Québec dans l'estuaire maritime du Saint-Laurent, à la marina de Rimouski (48°28'42.2"N, 68°30'39.3"W). L'estuaire du Saint-Laurent est l'un des écosystèmes estuariens les plus productifs au monde (Dufour et Quillet 2007). C'est un milieu tempéré froid, influencé par le courant du Labrador d'origine arctique et le Gulf Stream d'origine tropicale (Dufour et Quillet 2007). L'estuaire du Saint-Laurent est soumis à des marées semi-diurnes, c'est-à-dire que deux pleines mers et deux basses mers se produisent quotidiennement (Dohler 2007). Pendant la saison hivernale, une partie de l'estuaire du Saint-Laurent est recouverte de glace, variant selon les conditions météorologiques et la température de l'eau (Dufour 2007). Si cette couverture de glace peut parfois bloquer la

navigation pendant l'hiver, une partie de l'estuaire du Saint-Laurent reste cependant navigable (Dufour 2007). Le Saint-Laurent est également caractérisé par deux fortes périodes de productivité phytoplanctonique chaque année. La première période de productivité phytoplanctonique survient au printemps, lorsque la lumière devient suffisante pour la photosynthèse et que les concentrations en éléments nutritifs augmentent après la fonte des glaces (Dufour et al. 2010). La seconde période se produit à la fin de l'été en raison de la diminution de la lumière. Ces cycles de productivité saisonnière contribuent à la richesse et à la biodiversité de l'estuaire (Dufour et Quéllet 2007).

### **1.2.3 Immersion *in situ***

Afin d'étudier l'efficacité des revêtements expérimentaux, une immersion de six mois en milieu naturel a été effectuée de mai à octobre 2021 à la marina de Rimouski. La marina est un milieu abrité, mais tout de même exposé aux vents et aux cycles de marée. Un premier mouillage a permis un suivi de la colonisation selon les revêtements. Ce mouillage se composait en triplicata des huit revêtements, de 3 plaques de PVC, de PVCS, et de X3+ (mesurant chacune 11 cm × 12 cm), soit un nombre total de 33 plaques (Figure 5A). Après immersion, ces plaques destinées à mesurer la colonisation par le macrofouling, ont été analysées à partir de photographies numériques à hautes résolutions (Olympus Tough TG-6 4K).

Un deuxième mouillage a été réalisé avec un total de 66 plaques de PVC de 7,2 cm × 2,8 cm, soit 6 plaques par revêtement et témoin. La moitié des plaques a été immergée pendant 1 mois (plaques E, Figure 5B) et l'autre moitié pendant 6 mois (plaques A, Figure 5B) afin de mesurer la colonisation par le microfouling par microscopie confocale.

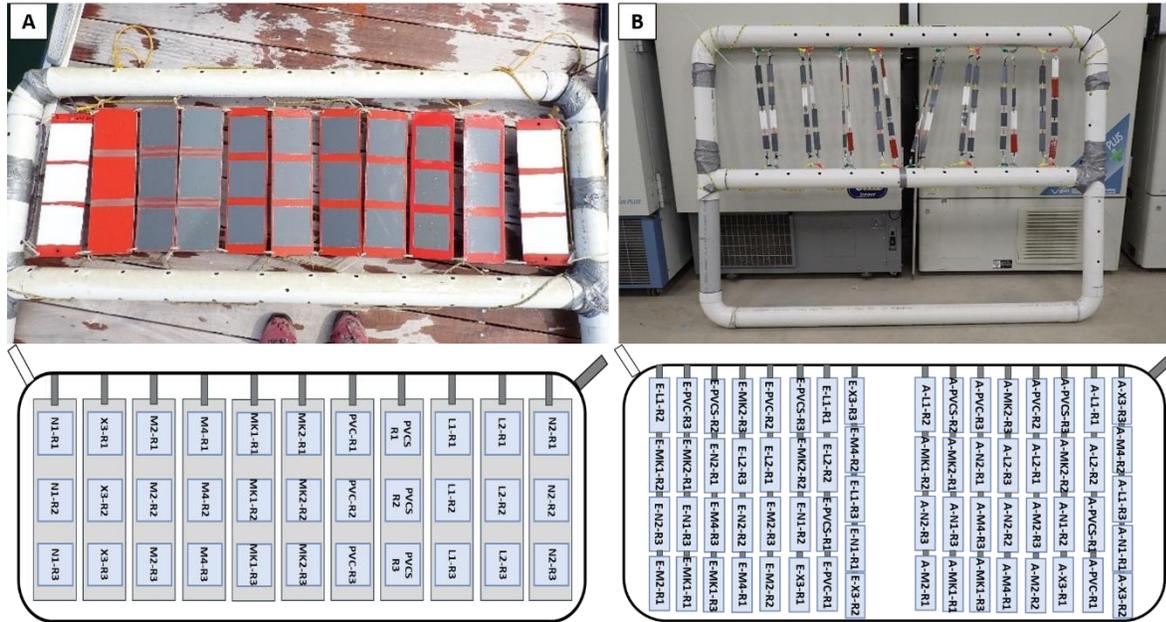


Figure 5. A : Photographie du mouillage avant immersion, mai 2021 (haut). Schéma du mouillage consacré à l’analyse du macrofouling (bas). B : Photographie du mouillage avant immersion à la marina de Rimouski, mai 2021 (haut). Schéma du mouillage consacré à l’analyse du microfouling (bas). Toutes les plaques sont en triplicata sur chaque mouillage. Le mouillage a été immergée à la verticale sur les six mois d’immersion.

### 1.2.4 Mesures des paramètres environnementaux

Pendant toute la durée de l’immersion, des mesures de pH (VWR sympHony™), d’oxygène dissous (EStikII Dissolved Oxygen), de température et de salinité (HANNA HI 9828) ont été effectuées toutes les semaines pendant le premier mois, puis aux deux semaines.

Des prélèvements d’eau de mer ont été effectués mensuellement afin de mesurer les concentrations en sels nutritifs (nitrates, nitrites, phosphates, silicates), en carbone organique dissous (DOC) et azote organique dissous (TDN). L’échantillonnage des sels nutritifs a été réalisé à l’aide de seringue de prélèvements et de tubes préalablement nettoyés dans du HCl 10% et rincés à l’eau osmosée et à l’eau nanopure. Les échantillons et un blanc de protocole en duplicata ont ensuite été filtrés sur un filtre PES 25 mm de diamètre et 0,2 µm de porosité (Oursel et al. 2013). Les échantillons filtrés ont été conservés à -80°C jusqu’à analyse à l’aide

d'un analyseur automatique AA500 (Seal Analytical) selon le protocole d'Oursel et al. (2013).

Pour l'analyse des contenus en carbone organique dissous et azote organique dissous, l'eau prélevée a été filtrée sur des filtres GF/F de 25 mm de diamètre et de 0,7 µm de porosité, au préalable brûlés à 450°C pendant six heures. Les échantillons d'eau et un blanc de protocole ont été prélevés en duplicata et filtrés selon le protocole d'Oursel et al. (2013). Ils ont ensuite été entreposés à -20°C pour analyse ultérieure avec un analyseur Shimadzu TOC-Vcpn avec module TNM-1 (Total nitrogen measurement unit) selon le protocole Oursel et al. (2013).

### **1.2.5 Analyse de la colonisation : macrofouling**

Le suivi de la colonisation par le macrofouling sur les différents revêtements a été effectué à l'aide de photographies numériques à haute résolution (Olympus Tough TG-6 4K). Chaque plaque a été photographiée en triplicata à chaque semaine durant le premier mois d'immersion, puis chaque mois jusqu'à la fin de l'immersion.

Pour chaque photographie, les types d'organismes composant le macrofouling ont été identifiés par observation visuelle. Le pourcentage de recouvrement de chaque organisme a été mesuré selon le nombre de pixels occupés par rapport aux pixels totaux pour chaque plaque à l'aide du logiciel Image J (Schneider et al. 2012). Ainsi, un pourcentage de recouvrement total a été déterminé pour chaque plaque.

À partir de ces données, un indice d'efficacité (indice N) a été calculé pour chaque photographie (Camps et al. 2014). Cet indice permet de comparer l'efficacité des revêtements en se basant sur le pourcentage de recouvrement par le biofouling, et est calculé en tenant compte du pourcentage de recouvrement et du type d'organisme colonisant la surface selon l'équation,

$$N = \sum (I.G)_i \quad (\text{Éq. 1.1})$$

Soit :

I = Facteur d'intensité déterminé en fonction de la surface colonisée (Tableau 2)

G = Facteur de gravité associé à la nature des organismes adhérents (Tableau 3)

Tableau 2. Évaluation du facteur d'intensité I.

Pourcentage de recouvrement (%)	Facteur d'intensité I
Aucune salissure	0
$0 < \% \leq 10$	1
$10 < \% \leq 20$	2
$20 < \% \leq 40$	3
$40 < \% \leq 60$	4
$60 < \% \leq 100$	5

Tableau 3. Évaluation du facteur de gravité G. Sur les sites français du projet, il a été possible de différencier visuellement le biofilm bactérien des microalgues formés sur les revêtements, contrairement au site de Rimouski au Québec.

Espèces	Indice G
Biofilm (slime)	1
Microalgues	2
Algues (cheveux)	3
Algues (salade)	4
Espèces non encroûtantes	5
Espèces encroûtantes	6

Le calcul d'indice N se base sur le pourcentage de recouvrement du biofouling sur la surface et de la gravité. Plus la valeur de l'indice est élevée, plus la surface est dite inefficace pour limiter la formation de biofouling (Camps et al. 2014). Pour chacun des revêtements, une moyenne du pourcentage de recouvrement total et de l'indice N a été calculée à partir des triplicatas de photographie et d'échantillons.

### **1.2.6 Analyse par microscopie confocale à balayage laser du microfouling**

Une moitié des revêtements et témoins a été échantillonnée en juin 2021, les plaques restantes ont été récoltées en octobre 2021. Après échantillonnage, chaque plaque a été placée dans 50 mL d'une solution de glutaraldéhyde 2,5% et conservée à 4°C pendant une nuit à l'obscurité. Après fixation, les plaques ont été rincées trois fois avec du tampon phosphate pH 7,35 pendant 10 minutes. Puis elles ont été marquées avec 1 mL de Syto 9 (Invitrogen) 1  $\mu$ M dilué dans du tampon phosphate salin (PBS) pendant 30 minutes à l'obscurité. Les plaques ont été rincées deux fois pendant 5 minutes dans un tampon PBS, avant de déposer une goutte d'huile antifading (Prolong Diamond Antifade Mountant) entre plaque et lamelle.

Chaque plaque a été analysée par microscopie confocale à balayage laser (MCBL) LSM700 (Carl Zeiss, Germany). Deux lasers différents ont été utilisés pour cette analyse : l'un mesurant la fluorescence du Syto 9, un intercalant de l'ADN ( $\lambda$  excitation et émission : 480 et 500 nm), et l'autre mesurant la fluorescence naturelle de la chlorophylle *a* ( $\lambda$  excitation et émission : 430 et 669 nm). La fluorescence émise par le Syto 9 permet de mesurer le pourcentage de recouvrement de cellules totales sur la plaque, et celle de la chlorophylle *a* de mesurer le pourcentage de recouvrement des microalgues. Dix photographies ont été prises aléatoirement à un grossissement de 10X pour chaque plaque. Ces lames ont ensuite été soumises à un balayage laser à intervalle d'épaisseur de 1  $\mu$ m à 40X pour obtenir des images en 3 dimensions de l'arrangement cellulaire sur trois emplacements aléatoires.

### **1.2.7 Traitement de données et analyses statistiques**

#### **1.2.7.1 Traitements de données : microfouling**

Les photographies ont été traitées à l'aide du logiciel Image J (Schneider et al. 2012) afin de mesurer le pourcentage d'occupation de la fluorescence au Syto 9 et de la fluorescence naturelle de la chlorophylle *a* sur chaque plaque. L'ensemble des données a permis de calculer un pourcentage total de recouvrement des différentes fluorescences sur l'ensemble des revêtements et témoins après un et six mois d'immersion.

La biomasse cellulaire représentée sur les images 3D a pu être déterminée pour chaque revêtement après un et six mois d'immersion. À l'aide des logiciels Comstat 1 (Heydorn et al. 2000) et Matlab (Vorregaard 2008), le biovolume ( $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ ) et l'épaisseur ( $\mu\text{m}$ ) de la colonisation par le microfouling ont été calculés à partir des images obtenues par microscopie confocale.

#### 1.2.7.2 Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel R-4.2.2 pour comparer les pourcentages de recouvrement par le macrofouling et le microfouling selon les différents revêtements et contrôles. Ces comparaisons ont été effectuées après un et six mois d'immersion. L'homogénéité des variances a été vérifiée avec un test de Bartlett. La normalité des ratios d'intensité a été testée au préalable avec un test de Shapiro-Wilk (Legendre et Legendre 2012; Shapiro et Wilk 1965). Les ratios moyens de pourcentage de recouvrement ont ensuite été testés au moyen du test non paramétrique de Kruskal-Wallis et du test post-hoc de Nemenyi (Kruskall et Wallis 1952; Legendre et Legendre 2012).

Les biovolumes cellulaires et l'épaisseur des biofilms ont été comparés après un mois et six mois d'immersion entre les revêtements avec le test non paramétrique de Kruskal-Wallis et le test paramétrique ANOVA à un facteur suivi d'un test post-hoc de Tukey (Girden 1992; Kruskall et Wallis 1952; Legendre et Legendre 2012). Pour l'ensemble des tests statistiques de l'étude, la limite de significativité utilisée est de 0,05.

#### 1.2.8 Archivage des données

Les données expérimentales obtenues dans le cadre de cette Maîtrise seront rendues accessibles dans un premier temps à l'ensemble des partenaires du projet PAINTS sur la base de données ANR-FRQ-PAINTS. Il pourrait être envisagé de rendre ces données disponibles sur des bases de données telles que NCBI.

## 1.3 RESULTATS

### 1.3.1 Suivi des paramètres environnementaux

Durant les six mois d'immersion, la température varie entre 8,8 et 16,8°C et la salinité entre 23,5 et 37,7 (Tableau 4). Les données de pH sont constantes, variant entre des valeurs de 7,7 à 8,1. L'oxygène dissous varie entre 71,9 et 94% d'oxygène dissous (Tableau 4). Les concentrations de carbone et d'azote organique dissous sont également constantes, variant respectivement entre des concentrations de 1,7 à 2 mgC/L et de 0,1 à 0,3 mgC/L. Au contraire, les concentrations en nitrites/nitrates et en silicates varient au cours de l'immersion. Durant les deux premiers mois, les concentrations en nitrites/nitrates sont supérieures à 6 µmol/L avant de diminuer à de plus faibles concentrations entre 0,8 et 4,4 µmol/L de fin juin à juillet. À partir du mois d'août, une nouvelle augmentation des concentrations de nitrites/nitrates est observée jusqu'au mois d'octobre, avec des concentrations qui varient entre 5 et 8 µmol/L. De même pour le silicate, une forte concentration a été mesurée début mai (16,2 µmol/L) avant de diminuer dès début juin à 9,2 µmol/L. Les concentrations en silicates retrouvées entre mi-juin et début août sont relativement faibles, avec des concentrations comprises 3,8 et 7 µmol/L. Une augmentation est observée à partir de septembre avec une concentration comprise en 9,6 et 11,4 µmol/L en octobre.

Tableau 4. Suivi des paramètres environnementaux (températures, salinité, pH, oxygène dissous, carbone et azote organique dissous et sels nutritifs) pendant six mois d’immersion à la marina de Rimouski (mai à octobre 2021). NA : non analysé.

Temps d'échantillonnage	T0 14/05/21	T1 27/05/21	T2 01/06/21	T3 08/06/21	T4 16/06/21	T5 29/06/21	T6 21/07/21	T7 04/08/21	T8 08/09/21	T9 05/10/21
Température (°C)	8,8	10,2	7,7	16,8	10,6	14,5	16,8	15,3	14,1	12,1
Salinité (PSU)	37,7	28,1	27,1	23,5	26	27,3	27,5	27,3	27,8	28,7
pH	7,82	7,96	8,1	7,68	7,9	7,7	7,9	7,74	7,8	7,8
Oxygène dissous (%)	84,2	80,4	81,8	84	87,6	83,2	94	71,9	74	73
Carbone organique dissous (mgC/L)	2	NA	1,7	NA	1,9	1,6	1,8	1,72	1,8	1,9
Azote organique dissous (mgC/L)	0,3	NA	0,2	NA	0,2	0,2	0,1	0,2	0,3	0,3
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (µmol/L)	0,7	NA	0,6	NA	0,5	0,6	0,4	0,7	0,5	0,7
NO <sub>2</sub> /NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (µmol/L)	7,6	NA	6,1	NA	2,8	4,4	0,8	8	5	7,2
Silicates (µmol/L)	16,2	NA	9,2	NA	3,8	5,9	4	7	9,6	11,4

### 1.3.2 Évaluation du recouvrement par le macrofouling selon les différents revêtements

Après deux semaines d’immersion (T1 et T2, Figure 6), aucune trace de colonisation n’est visible à l’œil nu sur les différents revêtements. La colonisation visible par le biofilm commence à partir de la troisième semaine sur la majorité des revêtements (T3, Figure 6). Après un mois d’immersion, la colonisation par le biofilm sur les différentes surfaces varie entre 0,1 et 17% (Figure 7A). La présence de biofilm augmente visuellement sur les surfaces colonisées PVC, PVCS, L1, L2, MK1 et MK2 lors de la quatrième semaine d’immersion (T4, Figure 6). Les revêtements N2, N1 et M2 sont les moins colonisés après un mois d’immersion (< 1,5%, Figure 7A). Une différence significative est observée entre les pourcentages de recouvrement du biofilm en fonction des revêtements (df = 10,  $\chi^2 = 27,9$ , p-value < 0,05, Kruskal-Wallis). Ces différences sont observées entre N2 et L1 (p-value < 0,05, Nemenyi) ; et entre N2 et MK1 (p-value < 0,05, Nemenyi). Les indices N des revêtements N2, M1 et M2 (respectivement 0,3, 1, 1, Tableau 5) restent faibles et du même niveau que l’indice N du témoin de référence X3+ (indice N = 1) à cette période d’immersion (T5, Tableau 5).

À partir du deuxième mois, la colonisation se complexifie avec une apparition d'algues filamenteuses sur les revêtements L1, L2, MK1, MK2, N1 et les témoins PVC, PVCS. Les revêtements X3+, M2, M4 et N2 ne présentent que peu d'évolution visible de la colonisation (T5, Figure 6). À la fin des six mois d'immersion, tous les revêtements présentent une colonisation de type biofouling (T9, Figure 6), avec un recouvrement du macrofouling compris entre 23,2 et 94,3% (Figure 7B). Les surfaces enduites des revêtements M2 et N2, sont les moins colonisées et présentent un recouvrement par le macrofouling inférieur à 25% (Figure 7B), et les plus faibles indices N d'une valeur de 2,7 et 3 (T9, Tableau 5). Ces valeurs sont comparables à celles observées sur le revêtement de référence X3+. En revanche, les surfaces enduites des revêtements MK1, MK2 et N1 présentent une colonisation similaire aux témoins PVC et PVCS, avec un recouvrement supérieur à 80% (Figure 7B), et un fort indice N d'une valeur de 9 (T9, Tableau 5). Une différence significative est observée entre les pourcentages du recouvrement du macrofouling en fonction des revêtements au bout de ces six mois d'immersion ( $df = 10$ ,  $\chi^2 = 28,5$ ,  $p\text{-value} < 0,05$ , Kruskal-Wallis). Ces différences se situent entre PVC et N2 ( $p\text{-value} < 0,05$ , Nemenyi), et PVCS et N2 ( $p\text{-value} < 0,05$ , Nemenyi).

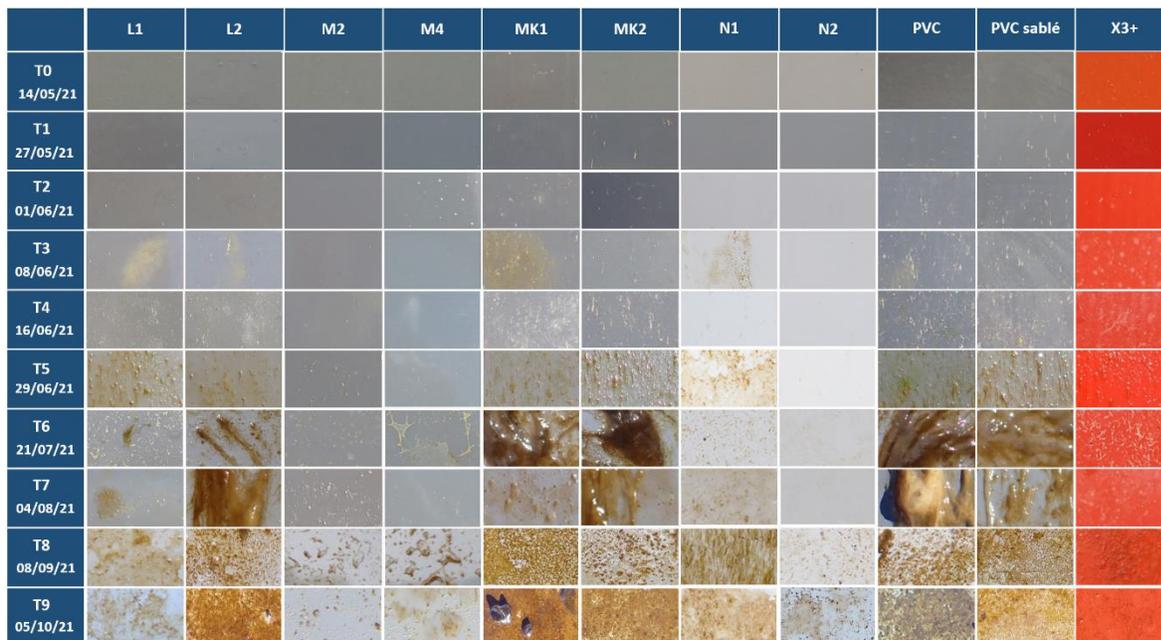


Figure 6. Suivi photographique de la colonisation du macrofouling des différents revêtements expérimentaux et des témoins contrôles pendant six mois d'immersion à la marina de Rimouski.

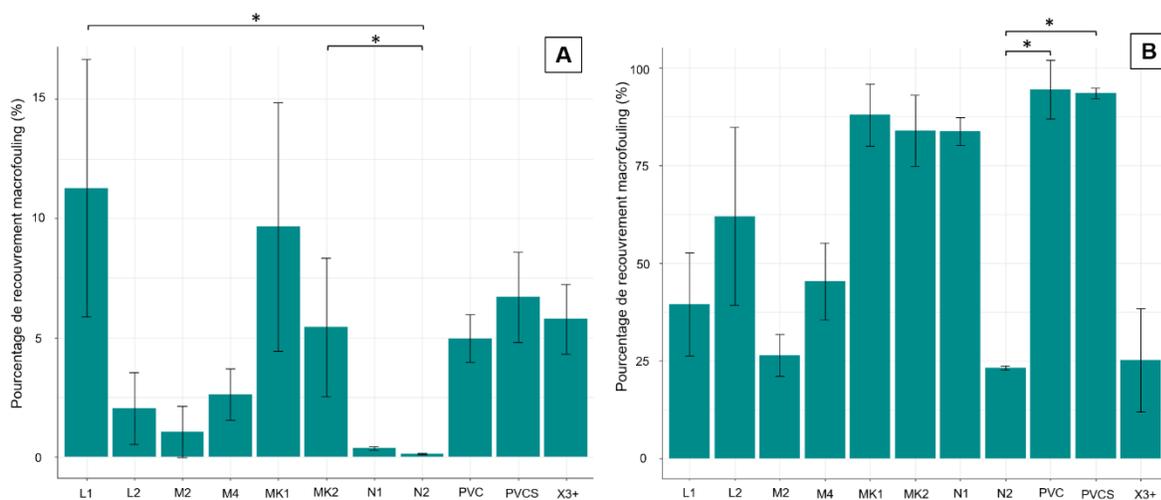


Figure 7. Pourcentage du recouvrement total avec écart-types du macrofouling mesuré sur les différents revêtements (n=3) après un mois d'immersion (A) et après six mois d'immersion (B) à Rimouski. \* Différences statistiques entre les revêtements (p-value < 0,05).

Tableau 5. Indice d'efficacité N de chaque revêtement et témoin mesuré à chaque temps d'échantillonnage (n= 3) lors de l'immersion de six mois à Rimouski (été 2021). Les indices en rouge représentent les plus faibles indices mesurés à un et six mois d'immersion.

	Indice N								
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9
L1	0,7	1	1	1,3	5	3,7	2	3,3	6,3
L2	0,3	0,7	0,7	1	1,3	5,7	6,3	9,7	11,3
M2	0	1	0	1	1	1	1	3,7	2,7
M4	1	1	1	3	1	2,7	1	3	3,7
MK1	1	1	1	1,3	7,3	12	8,3	10	9
MK2	1	1	1	1	6,3	9,7	11,7	11,7	10
N1	0,7	0,3	1	1	4	3	4,7	16,7	8
N2	1	0	0	1	0,3	1	1	1,7	3
PVC	1	1	1	1	6,3	12,7	12,3	11	9
PVCS	1	1	1	1	7,7	14	7,3	12	9
X3+	1	1	2,3	1	1	5	1,3	7,7	6

### 1.3.3 Évaluation du recouvrement par le microfouling sur les différents revêtements

#### 1.3.3.1 Pourcentage de recouvrement par le microfouling sur les revêtements

L'ensemble des surfaces présente un recouvrement microbien total (Syto 9) compris entre 10 et 70%, et par les microalgues (chlorophylle *a*) entre 5 et 80% après un mois d'immersion (Figure 8A). Les pourcentages de recouvrement sont significativement différents entre les pourcentages de recouvrement des cellules totales (df = 10,  $\chi^2 = 100$ , p-value < 0,05, Kruskal-Wallis) et ceux des microalgues selon les revêtements (df = 10,  $\chi^2 = 69,5$ , p-value < 0,05, Kruskal-Wallis). Au niveau du pourcentage de recouvrement des cellules totales, cette différence se situe entre les revêtements N2 et M2 (p-value < 0,05, Nemenyi), X3+ et MK1 (p-value < 0,05, Nemenyi) et entre PVC et N2 (p-value < 0,05, Nemenyi). Au niveau du pourcentage de recouvrement par les microalgues, ces différences sont rencontrées entre les revêtements MK1 et M2 (p-value < 0,05, Nemenyi), X3+ et M2 (p-value < 0,05, Nemenyi), N2 et M4 (p-value < 0,05, Nemenyi), PVCS et MK2 (p-value < 0,05, Nemenyi).

À la fin des six mois d'immersion, le pourcentage de recouvrement des cellules totales a été mesuré entre 6,3 et 34,6%, et entre 6,9 et 30,3% pour les microalgues sur les différents revêtements (Figure 8B). Parmi l'ensemble des revêtements testés, X3+ et M4 ont les plus faibles fluorescences mesurées sur leur surface, que ce soit au niveau des cellules totales (X3 : 6,3%, M4 : 7,7%, Figure 8B) que des microalgues (X3 : 10%, M4 : 8,5%, Figure 8B). Au contraire, MK1 et MK2 présentent des pourcentages de recouvrement de cellules totales (MK1 : 34,6%, MK2 : 25,2%) et microalgues (MK1 : 21,7%, MK2 : 30%) supérieurs à ceux des témoins de PVC (Syto 9 : 10,5%, chlorophylle *a* : 21,6%) et de PVCS (Syto 9 : 13,8%, chlorophylle *a* : 30,1%, Figure 8B). Des différences significatives des pourcentages de recouvrements de cellules totales ( $df = 10$ ,  $\chi^2 = 132,8$ ,  $p\text{-value} < 0,05$ , Kruskal-Wallis) et de microalgues ( $df = 10$ ,  $\chi^2 = 80$ ,  $p\text{-value} < 0,05$ , Kruskal-Wallis) sont observées entre les revêtements. Les pourcentages de recouvrement des cellules totales sont significativement différents entre M4 et M2 ( $p\text{-value} < 0,05$ , Nemenyi) ; N2 et N1 ( $p\text{-value} < 0,05$ , Nemenyi) et PVC et N1 ( $p\text{-value} < 0,05$ , Nemenyi). Au niveau du pourcentage de recouvrement des microalgues, des différences sont observées entre MK1 et M4 ( $p\text{-value} < 0,05$ , Nemenyi), PVC et MK2 ( $p\text{-value} < 0,05$ , Nemenyi), X3 et MK2 ( $p\text{-value} < 0,05$ , Nemenyi), et PVCS et N2 ( $p\text{-value} < 0,05$ , Nemenyi).

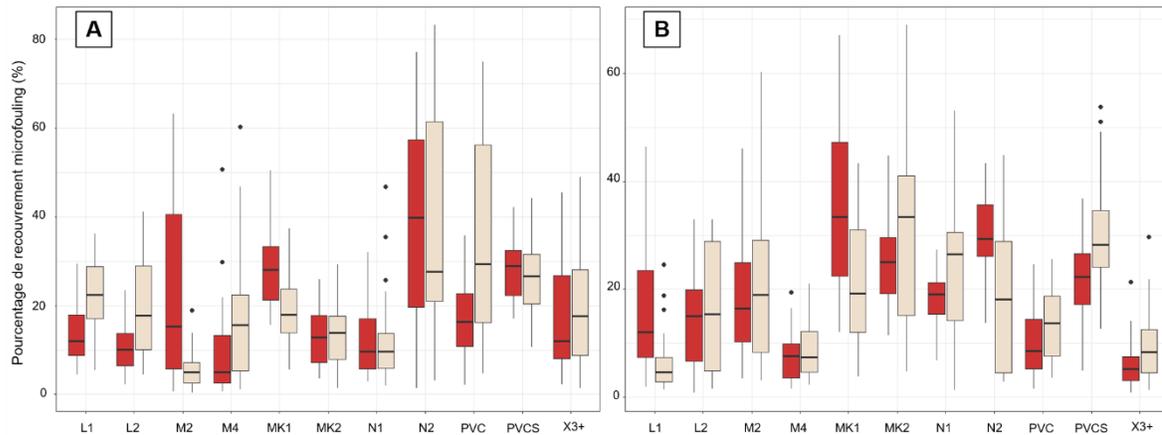


Figure 8. Pourcentage du recouvrement total avec écart-types du microfouling mesuré à  $\lambda = 500$  nm (Syto 9 en rouge foncé) et à  $\lambda = 669$  nm (Chlorophylle *a* en brun clair) par microscopie confocale à balayage laser après un mois d'immersion (A) et six mois d'immersion (B) à Rimouski ( $n=3$  par revêtement). Les cercles noirs représentent les valeurs aberrantes.

### 1.3.3.2 Biovolumes cellulaires et épaisseurs des biofilms

Après un mois d'immersion, les biofilms formés sur les différentes surfaces présentent des biovolumes compris entre  $4,3$  et  $21,7 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$  (Figure 9A) et des épaisseurs comprises entre  $10$  et  $37,2 \mu\text{m}$  (Figure 10A). Les biofilms sur les surfaces enduites des revêtements N2 et M2 ont les plus faibles biovolumes (N2 :  $4,3 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$  et M2 :  $6,7 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ , Figure 9A) et épaisseurs (N2 :  $10 \mu\text{m}$  et M2 :  $14,3 \mu\text{m}$ , Figure 10A). Les biofilms formés sur les revêtements PVC, PVCS et le revêtement MK1 ont des biovolumes supérieurs à  $18 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$  (Figure 9A) et des épaisseurs supérieures à  $29 \mu\text{m}$  (Figure 10A). Aucune différence significative n'est observée entre les biovolumes ( $df = 10$ ,  $F = 1,6$ ,  $p\text{-value} > 0,05$ , ANOVA) et les épaisseurs des biofilms ( $df = 10$ ,  $\chi^2 = 13,3$ ,  $p\text{-value} > 0,05$ , Kruskal-Wallis) sur les différentes surfaces après un mois d'immersion. Après six mois d'immersion, les valeurs des biovolumes observées sur les différents revêtements sont comprises entre  $1,6$  et  $18 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$  (Figure 9B), et les épaisseurs mesurées entre  $4,8$  et  $31,5 \mu\text{m}$  (Figure 10B). Le biofilm formé sur la surface PVC présente le biovolume et l'épaisseur les plus faibles

comparativement à MK2 dont le biovolume et l'épaisseur sont les plus élevés (Figure 10B). Des différences significatives sont présentes entre les biovolumes ( $df = 10$ ,  $F = 2,3$ ,  $p\text{-value} < 0,05$ , ANOVA) et l'épaisseur ( $df = 10$ ,  $F = 1,6$ ,  $p\text{-value} < 0,05$ , ANOVA) des biofilms entre les revêtements. Une différence significative du biovolume et de l'épaisseur du biofilm est observée entre le PVC et MK2 ( $p\text{-value} < 0,05$ , Tukey). Une différence significative est également retrouvée au niveau de l'épaisseur du biofilm entre les deux témoins PVC et PVCS ( $p\text{-value} < 0,05$ , Tukey).

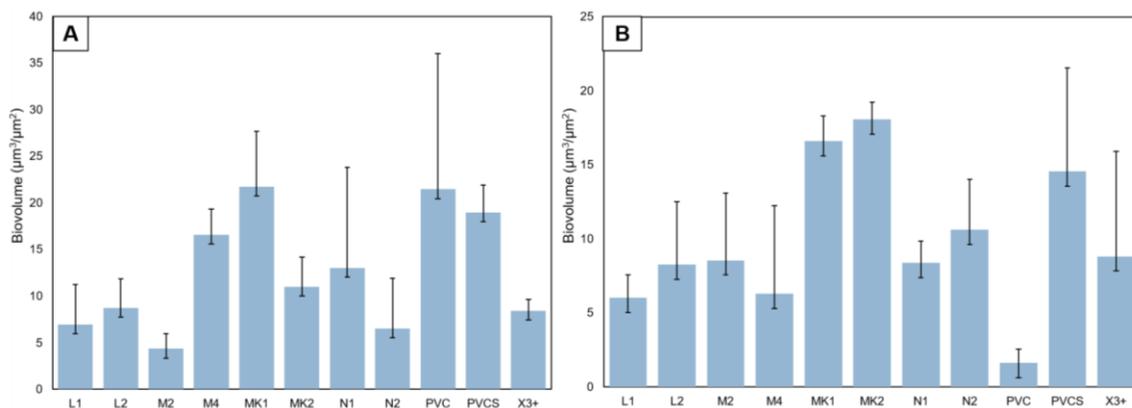


Figure 9. Biovolume ( $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ ) avec écart-types des biofilms formés sur les différents revêtements ( $n=3$ ) après un mois d'immersion (A) et six mois d'immersion à Rimouski (B).

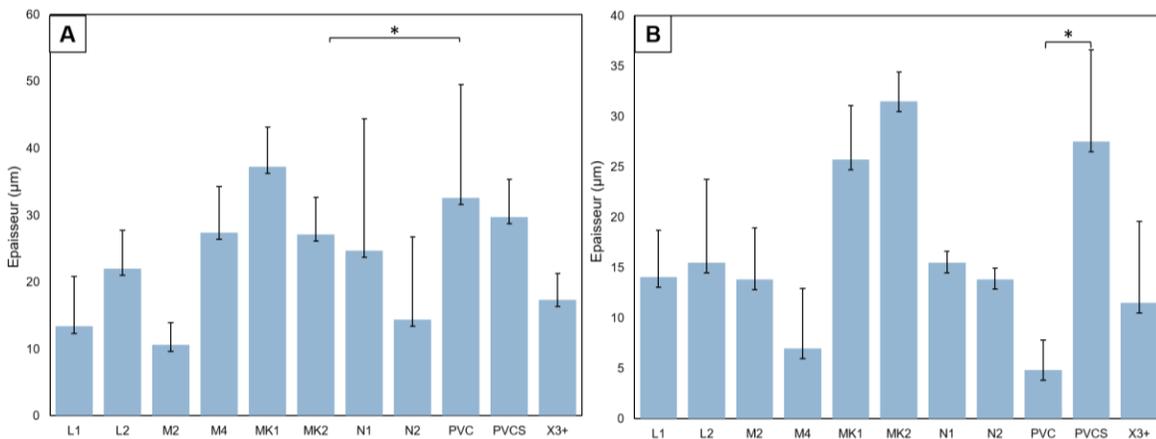


Figure 10. Épaisseur ( $\mu\text{m}$ ) avec écart-types des biofilms formés sur les différents revêtements ( $n=3$ ) après un mois d'immersion (A) et six mois d'immersion à Rimouski (B). \* Différences statistiques entre les revêtements ( $p\text{-value} < 0,05$ ).

## 1.4 DISCUSSION

Le premier objectif de cette étude était d'évaluer l'efficacité des revêtements expérimentaux à réduire la formation de biofouling de surface. Pour ce faire, la colonisation par le macrofouling a été étudiée au cours d'une expérience d'immersion de six mois à Rimouski. Les plaques de PVC et de PVCS ont servi de témoins de colonisation maximale d'une surface immergée dans un environnement marin tempéré froid. La colonisation de ces surfaces témoins a été progressive au cours de l'immersion. Le suivi photographique a permis de montrer que la colonisation était plus marquée après un mois d'immersion (fin juin), avec une augmentation visible du biofilm formée sur ces surfaces. Une autre colonisation plus importante s'est déroulée au cinquième mois d'immersion (début septembre), avec une augmentation de la présence de macroalgues ayant colonisé ces surfaces. Ces deux épisodes de fortes colonisations observées sur les plaques de PVC, concordent avec les deux périodes de forte productivité primaire annuelle, caractéristiques des milieux estuariens tempérés froids tels que l'estuaire du Saint-Laurent (Dufour et al. 2010). Ces pics de productivité primaire, couplés à l'augmentation de température de l'eau de surface, favorisent la formation de biofouling dans les milieux tels que le Saint-Laurent (Hellio et Yebra 2009). Au terme des six mois d'immersion, les témoins PVC et PVCS sont les surfaces les plus fortement colonisées avec près de 80% occupées par le biofouling, et une valeur d'indice N de 9. Dans l'étude de Camps et al. (2014), l'indice N calculé du témoin PVC a une valeur de 40 après un an d'immersion dans la baie de Toulon, milieu considéré comme tempéré chaud. La présence d'espèces encroûtantes augmente le facteur de gravité et donc la valeur de l'indice N calculé, car leur adhésion favorise une détérioration de la surface immergée (Camps et al. 2014). Dans l'étude de ces auteurs, le macrofouling formé est majoritairement composé d'algues brunes, mais comporte également des organismes encroûtants tels que les éponges, les ascidies et les balanes (Camps et al. 2014). Dans notre étude, les indices N calculés pour les témoins PVC et PVCS à la fin de l'immersion sont relativement faibles ( $N < 10$ ). L'estuaire du Saint-Laurent est un milieu tempéré froid où la présence d'une couverture de glace, la diminution de la température de l'eau et de l'intensité lumineuse en

période hivernale ne sont pas propices à la prolifération et à la croissance des organismes composant le biofouling (Hellio et Yebra 2009). C'est durant la période estivale lorsque la température de l'eau, les concentrations en nutriments et l'intensité lumineuse augmentent que l'environnement redevient favorable pour la croissance du biofouling (Lejars et al. 2012). Ces variations saisonnières rendent ainsi le biofouling moins important que dans les régions tempérées et tropicales, ce qui expliquerait cette plus faible valeur d'indice N calculée sur le site de Rimouski. De plus dans notre étude, aucune espèce encroûtante n'a été retrouvée à la fin de six mois d'immersion, le macrofouling étant majoritairement composé d'algues filamenteuses. Selon l'étude de Pernet *et al.* (2003), les forts courants peuvent limiter l'attachement d'invertébrés benthiques marins sur des surfaces immergées. Il est possible que l'orientation verticale du mouillage couplée à de fort courants marins ont limité la colonisation d'organismes encroûtant sur les surfaces PVC et PVCS.

Les surfaces enduites du revêtement Hempasil X3+ ont présenté les plus faibles colonisations observables à l'œil nu. Ce revêtement, développé par le groupe Hempel, est à base d'hydrogel renforcé de silicone sans biocide (Hempel 2016). C'est un revêtement amphiphile, dont l'effet antiadhérent combiné à une surface lisse lui confère une action fouling-release, favorisant le détachement des organismes de la surface (Silva et al. 2021). La partie hydrophile du revêtement X3+ est une matrice hydrogel. Une fois au contact de l'eau, cette matrice interagit avec les molécules d'eau, ce qui conduit à la formation d'une couche hydratée sur la surface immergée. Cette couche hydratée empêche les molécules de l'environnement d'interagir avec la surface immergée. Les molécules ne pouvant adhérer à cette dernière, la formation ultérieure du biofilm et du biofouling sur la surface est par conséquent empêchée (Faria et al. 2020; Romeu et Mergulhao 2023). Le revêtement X3+ s'est révélé efficace au cours des six mois d'immersion, en limitant la colonisation du biofouling à un pourcentage inférieur à 25% sur la surface, comparativement aux témoins PVC et PVCS où le biofouling occupait plus de 80% de la surface.

Les revêtements antifouling expérimentaux développés par les entreprises et les laboratoires partenaires sont également de type fouling-release, avec un mode d'action

similaire à celui de X3+. MK1 et MK2 se sont révélés être visuellement les revêtements expérimentaux les plus colonisés après six mois d'immersion. Leur pourcentage de recouvrement par le macrofouling était supérieur à 75%, et majoritairement composé d'algues filamenteuses. Les indices N de ces deux revêtements sont égaux, voire supérieurs à ceux des PVC et PVCS (indice  $N \geq 9$ ), traduisant leur inefficacité pour retarder la formation de biofouling sur leur surface dans les conditions expérimentales. Tout d'abord, il faut prendre en compte que ces revêtements FRC expérimentaux sont dépourvus de produits biocides. La colonisation par le biofouling n'est donc pas complètement empêchée sur la surface immergée enduite de ces revêtements (Lejars et al. 2012). De plus, l'efficacité des revêtements a été analysée en condition statique pour des raisons logistiques, soit la pire condition d'usage de ce type de revêtement. En effet, les revêtements de type FRC se révèlent être plus efficaces lors d'un mouvement hydrodynamique (Lejars et al. 2012). Pour remettre en contexte vers une potentielle utilisation de ces revêtements dans la navigation, il est important de considérer que les navires ne sont pas toujours en mouvement, et qu'ils peuvent être à quai durant plusieurs jours voire semaines dans les zones portuaires ou marinas. Cependant, il est relativement rare que les navires restent à quai aussi longtemps que les six mois d'immersion de notre étude. Les résultats de cette étude montrent que l'utilisation des revêtements MK1 et MK2 ne semble pas être pertinente pour les navires qui restent majoritairement à quai durant la saison estivale. Il en va de même avec les revêtements N1 et L2, dont le recouvrement du macrofouling occupait près de 75% et 60% de leurs surfaces après les six mois d'immersion. Les revêtements L1 et M4 ont présenté une meilleure efficacité contre la formation de biofouling, avec respectivement 35% et 50% de la surface recouverte sur ces revêtements. Cependant, cette efficacité reste moyenne comparativement à celle de X3+, où seulement 25% de la surface a été recouverte de biofouling au terme de six mois d'immersion. Les revêtements N2 et M2 ont montré des résultats intéressants. Un retardement de la colonisation par le macrofouling a été observé visuellement au troisième mois d'immersion pour le revêtement N2. Une colonisation par le macrofouling a été observée visuellement après un mois d'immersion sur le revêtement M2, similaire aux témoins PVC et PVCS. Ces revêtements expérimentaux sont de type FRC amphiphile à base

de silicone. Le caractère hydrophobe et la faible énergie de surface de ce type de revêtement favorisent le décrochement du biofouling lors d'un stress hydrodynamique (Liu et al. 2022). De plus, ces revêtements FRC ont également la même propriété hydrophile que X3+. La couche hydratée formée à leur surface limiterait l'adhésion des molécules et microorganismes de l'environnement, et par conséquent la formation ultérieure du biofilm et du macrofouling sur la surface (Faria *et al.* 2020; Romeu et Mergulhao 2023). Malgré l'immersion statique ne montrant pas leur plein potentiel, N2 et M2 ont montré une efficacité similaire au revêtement commercial X3+. N2 et M2 sont les plus efficaces de l'étude pour retarder et limiter la formation de biofouling avec un pourcentage de recouvrement du macrofouling d'environ 25% après un mois d'immersion.

Le second objectif de cette étude était de vérifier que l'utilisation de ces nouveaux revêtements fouling-release permettait de limiter l'abondance des espèces colonisatrices du biofouling. À l'échelle du microfouling, les analyses par microscopie confocale à balayage laser ont révélé la présence d'un tapis bactérien sur les surfaces de PVC et un début de présence de microalgues sur les témoins PVC et PVCS. Dès le début de l'immersion au mois de mai, les différentes étapes de la formation du biofilm se sont déroulées progressivement sur les deux surfaces témoins. Ces étapes consistent à la mise en place du film conditionneur, l'attachement réversible et irréversible des bactéries pionnières et la maturation du biofilm avec le recrutement d'autres microorganismes (Lejars et al. 2012). Les biofilms formés sur les témoins PVC et PVCS ont présenté une plus forte épaisseur (32 et 29  $\mu\text{m}$ ) avec biovolume plus élevé (21 et 18  $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ ), traduisant la maturité du biofilm (O'Toole et al. 2000). En effet, lors de la maturation du biofilm, le recrutement de nouveaux microorganismes et la production d'EPS favorisent l'augmentation de l'épaisseur et du volume cellulaire de ce dernier, conduisant à une structure 3D complexe (O'Toole et al. 2000; Stoodley et al. 2002). Cependant après six mois d'immersion, les biovolumes et épaisseurs des témoins PVC et PVCS n'ont pas augmenté. Sur le témoin PVC, le biovolume et l'épaisseur mesurés ont diminué en dessous de 5  $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$  et de 5  $\mu\text{m}$ . Le biofilm formé sur le témoin PVCS a diminué de biovolume ( $< 20 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ ) et l'épaisseur est similaire à celle mesurée après un mois d'immersion (32  $\mu\text{m}$ ). La forte diminution de ces paramètres sur le

PVC et l'absence de développement du biofilm sur le PVCS seraient possiblement liées à deux tempêtes qui ont eu lieu durant l'immersion, une durant le mois de septembre 2021 et l'autre début octobre 2021. Ces événements ont été accompagnés de fortes rafales de vent (56 km/h le 18/09/21; 41 km/h le 08/10/21) et ont coïncidé avec de hautes marées à fort marnage (4,4 m le 18/09/21 ; 4,2 m le 08/10/21) sur le site d'immersion de la marina de Rimouski (OGSL 2024). Différentes études ont montré que le vent et les vagues peuvent exercer une force mécanique sur les biofilms attachés à une surface immergée (Battin et al. 2003; Paul et al. 2012). En particulier, les vagues peuvent générer des forces de cisaillements qui agissent sur la couche externe du biofilm, favorisant son décollement de la surface (Battin et al. 2003; Paul et al. 2012). Ces facteurs auraient potentiellement influencé les résultats obtenus au bout de six mois d'immersion non seulement sur les témoins PVC, mais également sur les revêtements expérimentaux. Cependant, les analyses par microscopie confocale ont pu montrer la présence d'un biofilm mature sur le témoin PVC avec la présence de canaux d'eau dans la structure 3D du biofilm (O'Toole et al. 2000). Ces canaux d'eau sont essentiels pour assurer la structure et la dynamique des biofilms notamment en facilitant l'approvisionnement en nutriments et en oxygène, mais également en assurant la gestion des déchets et la communication cellulaire au sein de la structure (Flemming et Wingender 2010; O'Toole et al. 2000; Stoodley et al. 2002).

Après un mois d'immersion, le biofilm formé sur le revêtement X3+ a présenté un biovolume cellulaire de  $8 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$  et d'une épaisseur de  $17 \mu\text{m}$ . Ces valeurs inférieures à celles mesurées sur les biofilms formés sur PVC et PVCS, suggèrent que le biofilm formé sur le revêtement X3+ aurait atteint un stade de maturité inférieur à celui du contrôle. En effet, la maturité d'un biofilm se caractérise par l'augmentation de son volume cellulaire lié à sa complexification et la production d'EPS (O'Toole et al. 2000; Stoodley et al. 2002). Ce retard de maturation à un mois d'immersion pourrait s'expliquer par la propriété hydrophile de la matrice hydrogel de X3+. En interagissant avec les molécules d'eau du milieu, cette matrice permet la formation d'une couche hydratée à sa surface (Faria et al. 2020). Cette couche hydratée empêche les interactions physico-chimiques entre la surface immergée et les molécules de l'environnement, en réduisant la disponibilité des sites de liaison sur la

surface (Romeu et Mergulhao 2023). De plus, la présence d'eau dans la couche hydratée peut modifier les propriétés de surface du revêtement, le rendant moins favorable à l'adhésion des molécules sur la surface. L'adhésion des protéines composant le film conditionneur est ainsi retardée, tout comme celle des microorganismes de l'environnement et par conséquent la formation ultérieure du biofilm sur la surface (Faria et al. 2020; Romeu et Mergulhao 2023).

Après un mois d'immersion, les biofilms formés sur les revêtements FRC expérimentaux L1, L2 et N1 ont présenté des biovolumes inférieurs à  $13 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$  et des épaisseurs inférieures à  $24 \mu\text{m}$ . Ces valeurs sont supérieures à celles mesurées sur le revêtement X3+, mais restent inférieures à celles retrouvées sur les PVC et PVCS. Ces revêtements FRC ayant la même propriété hydrophile que X3+, la couche hydratée formée à leur surface limiterait l'adhésion des molécules environnantes sur la surface, et donc la formation de film conditionneur. Sans la présence de ce dernier, les bactéries libres de l'environnement et pionnières de la colonisation de biofilm ne peuvent interagir avec la surface immergée. Ces bactéries pionnières ont leur importance dans la formation du biofilm marin, car elles sont les premières à interagir par des interactions non spécifiques (forces de Van der Waals, interactions hydrophobes) avec le film conditionneur normalement formé sur la surface immergée. Ces interactions non spécifiques initient une première adhésion réversible de ces bactéries pionnières sur la surface immergée (Conrad 2012). Les interactions deviennent ensuite spécifiques entre les bactéries et la surface, induisant la formation de polymères adhésifs tels que les EPS chez les bactéries (Berne et al. 2015). Les EPS favorisent l'adhésion irréversible des bactéries pionnières sur la surface en servant de point d'ancrage. Les bactéries pionnières deviennent ensuite un substrat pour le recrutement de nouveaux microorganismes, qui en s'agglutinant et se multipliant, forment un biofilm (Tremblay et al. 2014). Les biovolumes et épaisseurs des trois revêtements L1, L2 et N1 indiqueraient un biofilm moins mature formé sur leur surface. Ils auraient donc une certaine efficacité pour retarder de la formation de biofilms sur leurs surfaces, mais cette activité serait moins efficace que le revêtement commercial X3+. Cependant, cette limitation de la formation de biofouling ne dure pas dans le temps en raison des interactions hydrophiles qui faiblissent sur le long terme (Jin et al. 2022). Après six mois d'immersion, un microfouling

composé à la fois de bactéries et de microalgues s'est développé sur l'ensemble des revêtements expérimentaux de l'étude. La formation d'un biofilm composé de diatomées fortement adhérentes sur une surface enduite de FRC est référencée dans la littérature, notamment en conditions statiques où l'efficacité du revêtement est faible (Silva et al. 2021).

Diverses études ont montré que le microfouling formé sur les revêtements FRC peut être constitué majoritairement de microalgues telles que les diatomées (Anderson et al. 2003; Cassé et Swain 2006). La colonisation observée sur les revêtements M2, M4 et N2 après un et six mois d'immersion dans notre étude ont confirmé ces observations précédentes (Anderson et al. 2003; Cassé et Swain 2006). Il semblerait que la capacité hydrophile des revêtements FRC a permis de limiter l'adhésion des molécules impliquées dans la formation du film conditionneur, et par conséquent l'adhésion des bactéries pionnières dans la formation de biofilm (Lejars et al. 2012; Liu et al. 2022). Contrairement à ce qui est observé pour les bactéries, la mise en place d'un film conditionneur et la présence des bactéries pionnières ne sont pas essentielles pour l'adhésion de diatomées sur la surface (Smith et Callow 2006). Les diatomées s'approchent de la surface immergée soit par transport passif par l'action des courants, soit par sédimentation liée à la gravité, ou encore par mouvement des gamètes pour les diatomées flagellés (Smith et Callow 2006). Une fois au contact de la surface immergée, les diatomées passent par un stade d'adhérence primaire. C'est une phase temporaire durant laquelle les diatomées peuvent se déplacer sur les zones les plus favorables à l'adhésion de la surface, ou se détacher si cette surface est jugée inhospitalière (Molino et Wetherbee 2008). Les diatomées vont également sécréter divers composés telles que des substances polymériques extracellulaires amenant à leur adhésion sur la surface immergée (Finlay et al. 2002; Hoagland 1993).

## **1.5 CONCLUSIONS**

L'efficacité de huit revêtements antifouling expérimentaux de type FRC a été évaluée et comparée avec des témoins PVC et un revêtement commercial en conditions naturelles d'immersion dans un milieu estuarien tempéré froid. Dans un premier temps, une

comparaison de la formation du macrofouling après 1 mois et 6 mois d'immersion a été effectuée entre les différents revêtements, par la prise de photographies et le calcul d'indices N et de pourcentages. Ces premiers résultats ont permis de montrer que les revêtements FRC expérimentaux N2 et M2 sont aussi efficaces que le revêtement commercial X3+ pour limiter la colonisation par le biofouling dans les conditions environnementales de l'étude. Au contraire les revêtements MK1 et MK2 se sont révélés être les plus colonisés de l'étude, avec une formation de biofouling similaire à celle observée sur les témoins PVC et PVCS.

Dans un second temps, c'est la colonisation par le microfouling qui a été évaluée et comparée entre les différents revêtements suite à des analyses par microscopie confocale à balayage laser. Malgré l'influence de deux tempêtes sur les résultats de biovolumes cellulaires et de l'épaisseur des biofilms sur les différents revêtements, N2 et M2 se sont révélés être à nouveau les deux plus efficaces pour limiter la colonisation des microorganismes pionniers de la formation de biofilm. Les revêtements MK1 et MK2 au contraire étaient peu efficace pour limiter la formation de microfouling.

Bien que les revêtements N2 et M2 semblent retarder la colonisation par le microfouling, un biofilm majoritairement composé de microalgues se forme tout de même sur leur surface lors d'une immersion prolongée. Les biofilms de microalgues sont difficiles à retirer sur les surfaces protégées par les FRC malgré une forte vitesse des navires. La persistance de ce biofilm sur les surfaces peut présenter un risque de transfert d'espèces potentiellement invasives par l'utilisation de ces nouveaux revêtements FRC. Il est donc nécessaire d'évaluer ce risque sur les deux revêtements N2 et M2 les plus efficaces de cette étude, afin de valider leur utilisation sur les navires marchands.

## **CHAPITRE 2**

### **ESTIMATION DU RISQUE DE TRANSFERT INTER-SITES D'ESPÈCES POTENTIELLEMENT INVASIVES PAR L'UTILISATION DE REVÊTEMENTS ANTIFOULING EXEMPTS DE BIOCIDES**

#### **2.1 INTRODUCTION**

L'essor de la navigation sur le fleuve Saint-Laurent est susceptible d'augmenter le risque de transfert d'espèces invasives. Les principaux vecteurs de ce risque, que ce soit à l'échelle mondiale ou sur le Saint-Laurent, sont les eaux de ballast, lors de leur chargement et de leur déchargement une fois les navires en transit (MPO et Secrétariat canadien des avis scientifiques 2022). Depuis 2021, une nouvelle législation a été mise en place sur le traitement des eaux de ballast pour limiter les risques d'introduction d'espèces (Transport Canada 2019).

Le biofouling présent sur les surfaces immergées des navires est également connu pour être un autre vecteur de propagation d'espèces invasives par la navigation, qu'elle soit commerciale ou de plaisance (MPO et Secrétariat canadien des avis scientifiques 2022). Lors des séjours au port et du nettoyage des bateaux, les organismes accrochés sur les coques sont susceptibles d'être remis en suspension dans la colonne d'eau (Minchin et Gollasch 2003). Avec le réchauffement des eaux et la réduction du couvert de glace, la propagation par les microorganismes composant le biofouling pourrait être favorisée, de même que la survie d'espèces invasives qui n'auraient pu s'établir dans l'estuaire du Saint-Laurent en raison de ses conditions froides (MPO et Secrétariat canadien des avis scientifiques 2022; Parmesan et Yohe 2003). Il est à prévoir que la forte activité de navigation couplée à l'évolution des conditions environnementales découlant des changements climatiques, accéléreront le risque de transfert d'espèces allochtones potentiellement invasives dans le Saint-Laurent à l'avenir (Dufour 2007; Piola et al. 2009).

Afin de limiter la formation de biofouling et ses risques associés, des revêtements antifouling sont appliqués sur les coques de navires (Lejars et al. 2012). Comme abordé précédemment, en raison de la forte toxicité sur des organismes non ciblés des revêtements commercialisés actuellement, de nouveaux revêtements de type FRC exempts de produits biocides ont été développés (Lejars et al. 2012). Cependant, l'utilisation de ces nouveaux revêtements sur des surfaces immergées statiquement favorise la formation d'un microfouling formé d'un biofilm de microalgues. Ce dernier est capable de persister sur la surface malgré une vitesse élevée lors de la mise en mouvement du navire (Anderson et al. 2003). Il existe peu de données scientifiques disponibles sur la formation et le développement ultérieur du biofilm constituant le microfouling suite à l'application de revêtements FRC sans biocides. De plus, le risque de transfert d'espèces invasives chez les microorganismes constituant ces biofilms est peu caractérisé (Sweat et al. 2017).

L'objectif de cette recherche est d'évaluer au niveau du microfouling le risque de transfert d'espèces microbiennes allochtones potentiellement invasives par l'utilisation de ces nouveaux revêtements FRC expérimentaux. Pour ce faire, les deux revêtements expérimentaux les plus efficaces (déterminés au chapitre 1 : M2 développé par le laboratoire MAPIEM et N2 par Peintures Marines Nautix), ont été utilisés afin d'évaluer ce risque associé à leur utilisation. L'étude a été réalisée en simulant un transfert maritime entre Rimouski et Sept-Îles, deux sites clés du système golfe estuaire maritime du Saint-Laurent présentant des conditions hydrographiques et des activités maritimes contrastées. La colonisation en termes d'abondance et de diversité a été mesurée sur les biofilms des deux revêtements expérimentaux et comparée avec ceux formés sur un témoin de polychlorure de vinyle (PVC). De plus, ces mesures d'abondance et de diversité ont été effectuées sur chacun des revêtements avant et après transfert entre les sites, afin d'évaluer le risque de transfert d'espèces allochtones potentiellement invasives par leur utilisation.

## **2.2 METHODOLOGIE**

### **2.2.1 Sites d'étude**

L'évaluation du risque de transfert d'espèces microbiennes potentiellement invasives a été effectuée en simulant un transfert entre deux sites au Québec : la marina de Rimouski située dans le Bas-Saint-Laurent (N 48°28'44.857", O 68°30'42.7") et la marina de Sept-Îles située sur la Côte-Nord (N 50°12'8.98", O 66°23'11.121"). Ces deux marinas ont été retenues, car elles accueillent des navires de différentes tailles et sont exposées à des conditions environnementales différentes (température, salinité, pH et oxygène dissous). Le site de Sept-Îles est le plus important port minéralier de l'Amérique du Nord, avec près de 530 navires visitant ce port chaque année (Port de Sept-Îles 2023). Le site de Rimouski est quant à lui majoritairement destiné à la navigation de plaisance. Ces fortes activités portuaires pour l'un et plaisancières pour l'autre induisent un risque de transfert d'espèces invasives sur les deux sites. Le site de Rimouski, situé dans l'estuaire maritime, se trouve dans des eaux plus tempérées que celui de Sept-Îles, situé sur la Côte-Nord dans le golfe Saint-Laurent et subissant l'influence du courant du Labrador. Ce courant induit un apport d'eaux froides riches en oxygène en profondeur dans le golfe du Saint-Laurent *via* le détroit de Belle Isle (Petrie et al. 1988). Cette masse d'eaux froides profondes représente une des trois couches caractéristiques de la colonne d'eau du golfe du Saint-Laurent. Parmi elles se trouve la couche de surface, dont la température varie avec les saisons (Dufour et al. 2010).

### **2.2.2 Revêtements antifouling FRC expérimentaux**

Les deux revêtements FRC expérimentaux déterminés au chapitre 1, ont été développés respectivement par les Peintures Marines Nautix (N2) et le laboratoire MAPIEM de l'Université de Toulon (M2). Ces deux revêtements ont été utilisés pour recouvrir des coupons de PVC de dimensions 5 cm × 5 cm. En plus de ces revêtements, des coupons de PVC non enduits ont servi de témoin positif de colonisation. Au total, 108 coupons ont été utilisés dans cette étude. Ils ont été montés sur des plaques en PVC de dimension

24 cm × 32 cm à l'aide d'une colle silicone conçue pour l'eau de mer, de manière à obtenir sur une même plaque trois coupons de chaque revêtement et disposés aléatoirement entre les plaques (Figure 11). Au total, l'ensemble des coupons a été réparti sur 12 plaques.

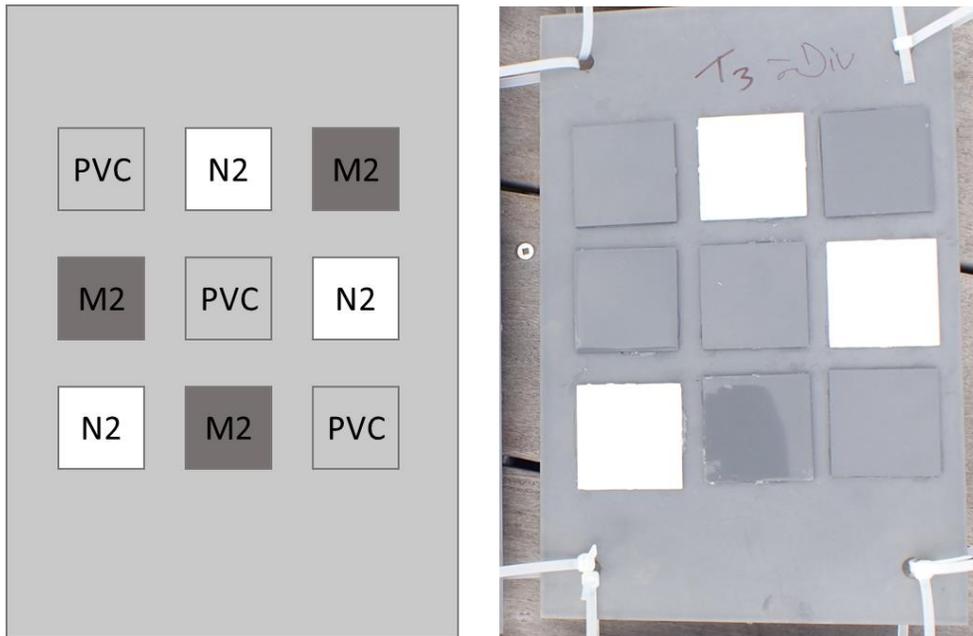


Figure 11. Schéma des coupons des revêtements collés sur une grande plaque de PVC (gauche). Photographie d'une plaque installée sur le mouillage (droite). Sur chaque plaque ont été montés des triplicatas de chaque revêtement.

### 2.2.3 Immersion *in situ*

Les plaques ont été réparties sur deux mouillages identiques qui ont été immergés aux deux sites d'étude pendant 30 jours en conditions statiques (Figure 12). Pour des raisons logistiques et afin de considérer les variations saisonnières entre les deux environnements, l'immersion a été réalisée entre 15 juillet 2022 et le 15 août 2022 à Rimouski (Figure 12A), et entre le 1<sup>er</sup> et le 31 août à Sept-Îles (Figure 12B). Les mouillages ont été immergés à la verticale sur les deux sites à environ 1 m de profondeur.

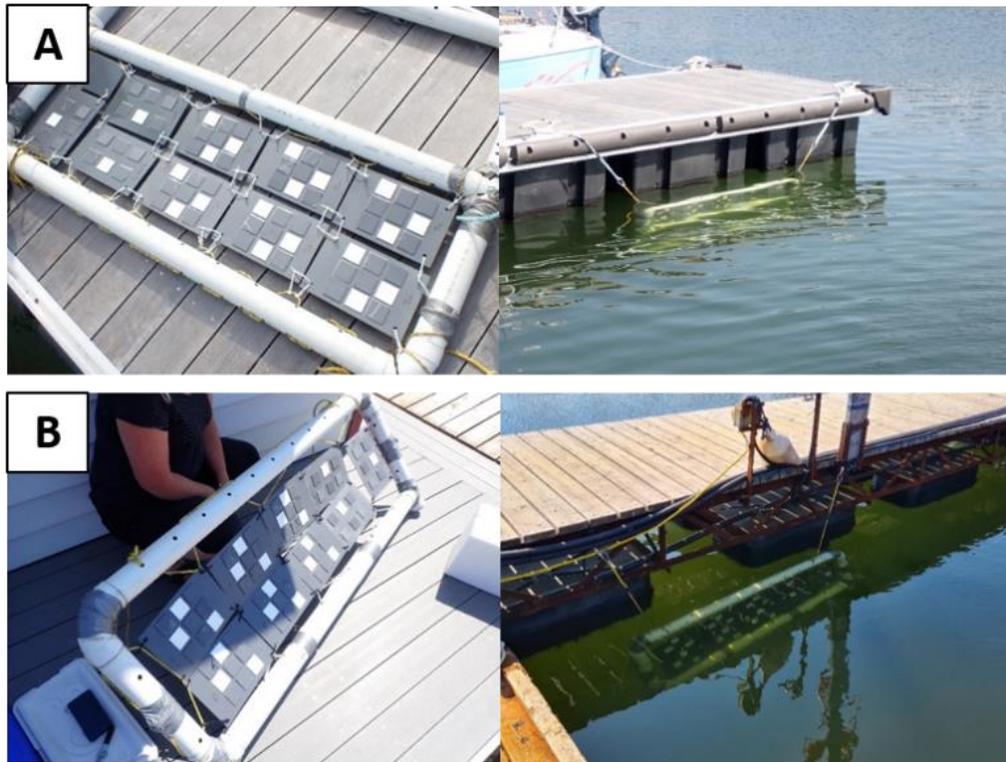


Figure 12. A : Mouillage immergé à la marina de Rimouski du 15 juillet au 15 août 2023. B : Système de mouillage immergé à la marina de Sept-Îles du 1<sup>er</sup> août au 21 août 2023.

#### 2.2.4 Transplantations entre Rimouski et Sept-Îles

Après un mois d’immersion, deux plaques contenant chacune les coupons enduits en triplicatas, ont été retirées pour échantillonnage. Une plaque a servi pour l’analyse de diversité, l’autre pour l’analyse d’abondance, et ce pour chaque temps d’échantillonnage. Les biofilms formés sur les coupons ont été échantillonnés par grattage à l’aide d’un grattoir à lame de rasoir stérile (1 ½ po l. x 1 po L.) sur les deux sites d’étude (T1). Les quatre plaques restantes ont été transportées vers le site receveur. Ce transport a été effectué par voie terrestre dans une glacière remplie d’eau de mer provenant du site d’origine (Figure 13).

Une fois arrivé sur le site receveur, deux plaques ont été échantillonnées après transplantation pour vérifier l’effet du transport sur le biofouling (T2). Les deux dernières plaques ont été immergées pendant 15 jours dans un aquarium de 40 L en conditions contrôlées, pour éviter toute contamination du site récepteur par importation de

microorganismes. L'aquarium a été placé dans une chambre à température régulée, pour respecter les conditions de température des eaux de l'estuaire et du golfe du Saint-Laurent au moment de l'expérience de transplantation (10°C à Rimouski et 18°C à Sept-Îles). Un système de néons a permis d'appliquer une intensité lumineuse de 150  $\mu\text{moles}/\text{m}^2/\text{s}$  et selon le cycle jour/nuit suivant : 13 h de jour à Rimouski, 14 h de jour à Sept-Îles. Un système de bulleurs a été installé pour une meilleure oxygénation de l'eau de l'aquarium. La moitié du volume d'eau de l'aquarium a été renouvelée tous les deux jours avec de l'eau du site d'étude concerné. Les échantillons de biofilms présents sur les deux dernières plaques ont été grattés à la fin des 15 jours d'immersion contrôlée (T3). Les eaux des aquariums ont été décontaminées à la fin des immersions contrôlées en ajoutant de l'eau de javel.

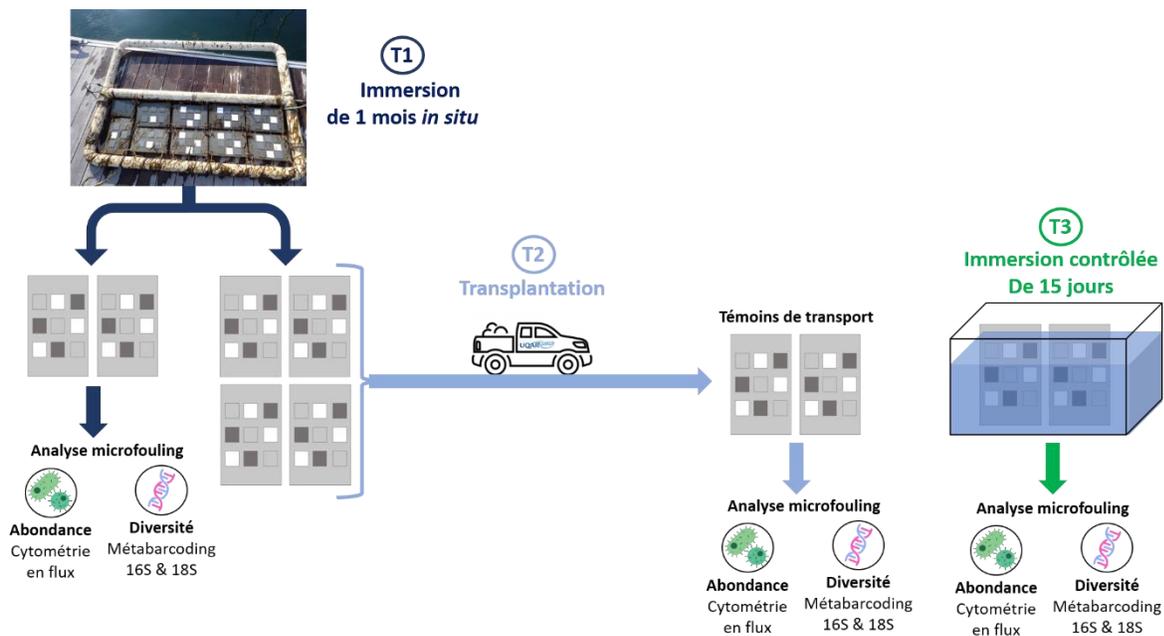


Figure 13. Schéma des différents temps d'échantillonnages des biofilms formés sur les revêtements lors des deux transplantations entre Rimouski et Sept-Îles de mi-juillet à fin août 2022. T1 : Échantillonnage après un mois d'immersion en milieu naturel. T2 : Échantillonnage après transplantation sur l'autre site. T3 : Échantillonnage après 15 jours d'immersion contrôlée sur le site receveur.

### **2.2.5 Mesures des paramètres environnementaux des sites d'immersion**

Les paramètres physico-chimiques des eaux telles que le pH, l'oxygène dissous, la température et la salinité ont été mesurées à l'aide de différentes sondes associées sur le site de la marina de Rimouski (VWR sympHony™, ESTikII Dissolved Oxygen et HANNA HI 9828) et de Sept-Îles (HANNA HI 9828). L'ensemble de ces mesures a été effectué au premier jour (T0) et au dernier jour d'immersion (T30) des mouillages sur les deux sites.

Des prélèvements d'eau de mer ont été effectués à T0 et T30 sur les deux sites selon les protocoles appliqués au chapitre 1 (1.2.4) afin de mesurer les concentrations en sels nutritifs (nitrates, nitrites, phosphates, silicates), en carbone organique dissous (DOC) et azote organique dissous (TDN). Les échantillons de sels nutritifs ont été conservés à -80°C d'être analysés par l'analyseur automatique AA500 (Seal Analytical); et les échantillons de DOC et TDN ont été conservés à -20°C avant analyse par l'analyseur Shimadzu TOC-Vcpn avec module TNM-1 (Total nitrogen measurement unit) à partir du protocole Oursel et al. (2013).

### **2.2.6 Analyse de l'abondance des communautés microbiennes des eaux de mer et des biofilms**

#### **2.2.6.1 Abondance des communautés microbiennes aux sites d'études**

Afin de caractériser l'abondance microbienne (communautés autotrophes et hétérotrophes) des deux milieux étudiés, 10 mL d'eau de mer ont été prélevés et conservés dans des tubes stériles contenant 0,04 mL d'une solution glutaraldéhyde 25% au début (T0), et à la fin de l'immersion des mouillages sur chaque site (T30). Les échantillons ont été conservés à -80°C jusqu'à l'analyse.

Pour l'analyse d'abondance des communautés autotrophes (pico-eucaryotes, nano-eucaryotes et cyanobactéries) des milieux, 10 µL d'échantillon ont été dilués dans 990 µL d'eau de mer artificielle (ASW) d'une salinité de 28 (28 g de sel de mer Sigma aldrich dans

1000 g d'eau distillée) après décongélation. Ensuite, 2  $\mu$ L de billes de polystyrène de 2  $\mu$ m de diamètre (Fluoresbrite YG, Polysciences) ont été ajoutés dans les différents tubes en tant que standard interne pour la calibration de l'appareil d'analyse. L'utilisation de ces billes permet de distinguer les pico-eucaryotes (< 2  $\mu$ m) des nano-eucaryotes (2 – 20  $\mu$ m) (Araújo et al. 2022). L'ensemble des échantillons a été vortexé puis 230  $\mu$ L de chaque tube ont été déposés dans une plaque de 96 puits. Les échantillons ont été analysés à l'aide du cytomètre en flux CytoFLEX Flow Cytometer (Beckman Coulter Inc.) équipé d'un laser bleu (488 nm) et d'un laser rouge (638 nm), permettant de mesurer la fluorescence orange de phycoérythrine (582 nm) et la fluorescence rouge de la chlorophylle (690 nm) (Araújo et al. 2022).

Pour l'analyse de la communauté hétérotrophe, une dilution au 1/10<sup>e</sup> des échantillons initiaux a été effectué dans du tampon Tris-EDTA avant analyse. Ensuite, 2  $\mu$ L de billes de 1  $\mu$ m de diamètre (Fluoresbrite YG, Polysciences) ont été rajoutés dans les tubes à titre de standard interne (taille et fluorescence des microorganismes hétérotrophes) pour la calibration de l'appareil. Les échantillons ont été marqués au SYBR Green I (525 nm), agent se fixant aux acides nucléiques, à l'obscurité pendant 10 minutes. Ils ont ensuite été analysés selon le protocole de Belzile et al. (2008), à l'aide d'un cytomètre en flux CytoFLEX Flow Cytometer (Beckman Coulter Inc.), équipé d'un laser à 488 nm. L'abondance relative des espèces microbiennes a été mesurée dans les échantillons et une distinction a été faite entre les populations de type High Nucleic Acid (HNA) et Low Nucleic Acid (LNA).

#### 2.2.6.2 Abondance des communautés microbiennes des biofilms

Le biofilm formé sur chaque triplicata de chaque revêtement a été échantillonné par grattage tel que mentionné au point 2.2.4 à chaque temps de prélèvement des transplantations (T1, T2 et T3). Après conservation à -20°C, les échantillons de biofilms ont été dilués avant analyse dans une solution composée de 4  $\mu$ L de Tween 80, 800  $\mu$ L de pyrophosphate de sodium (PPiNa) à 10 mM et 3,2 mL d'eau de mer artificielle (ASW). Une sonication dans un bain à ultrason (CAPTE) a ensuite été effectuée pendant 3 minutes, avant le transfert des échantillons dans un bain de glace pendant 15 minutes. Après 1 minute de vortex à 800 g, le

surnageant des échantillons de biofilms a été filtré sur des tamis cellulaires de 40 µm pour retirer les débris cellulaires. Les échantillons ont été préparés puis transférés pour analyse de l'abondance des autotrophes et hétérotrophes par cytométrie en flux (CytoFLEX Flow Cytometer) selon le protocole de Araújo et al. (2022) et Belzile et al. (2008), et selon les méthodes décrites dans la section 2.2.6.1.

## **2.2.7 Diversité microbienne des sites d'immersions et des biofilms**

### **2.2.7.1 Extractions d'ADN des échantillons d'eau de mer et de biofilms**

Pour chaque site d'immersion, un litre d'eau de mer a été filtré sur une membrane Durapore (GVWP, Millipore) de 47 mm de diamètre et de 0,2 µm de porosité au début (T0) et à la fin du mois d'immersion (T30). Les filtres ont été conservés à -80°C puis envoyés pour analyse au laboratoire MAPIEM à Toulon (France). L'ADN a été extrait des filtres selon la méthode du SA-GenElute<sup>TM</sup>-LPA (Vasselon et al. 2017).

Les biofilms ont été récoltés par grattage à l'aide d'une lame de rasoir stérile (T1, T2 et T3) et conservés à -80°C avant leur envoi au laboratoire MAPIEM pour analyse. L'ADN a été extrait à partir de 0,2 g de biofilm selon les instructions du kit DNeasy PowerBiofilm (QIAGEN). La concentration (ng/µL) de l'ADN extrait et sa pureté (ratio des longueurs d'onde A260 : A280, témoin de la contamination protéique) ont été mesurées par spectrophotométrie (Thermo Scientific Nanodrop 2000). Les échantillons dont la concentration en ADN était inférieure à 20 ng/µL ont été dilués avec de l'eau stérile au 1/10<sup>e</sup> pour réaliser l'amplification et le séquençage suivants. Les échantillons dont la concentration était supérieure à 20 ng/µL ont été dilués au 1/100<sup>e</sup>.

### 2.2.7.2 Amplification et séquençage de l'ADN extrait des échantillons d'eau de mer et de biofilms

Chaque ADN extrait a été préparé pour l'amplification PCR (Polymerase chain reaction) selon le tableau suivant :

Tableau 6. Préparation des échantillons d'ADN pour l'amplification PCR. Les amorces Forward (F) et Reverse (R) ont été utilisées selon l'ADNr ciblé (16S : 515F-Y/926R ; 18S : 960F/NSR1438).

	<b>Volume pour 1 échantillon (µL)</b>
<b>Eau sans nucléase</b>	8,5
<b>GoTaq® Long PCR Master Mix</b>	12,5
<b>Amorce Forward (F)</b>	1
<b>Amorce Reverse (R)</b>	1
<b>Échantillon ADN</b>	2
<b>Volume total</b>	25

L'ensemble des ADN extraits a été amplifié par PCR sur deux gènes cibles : l'ADNr 16S (Parada et al. 2016) et l'ADNr 18S (Debroas et al. 2017). La région hypervariable V4-V5 de l'ADNr16S a été amplifiée à l'aide des amorces universelles 515F-Y (5'-GTG YCA GCM GCC GCG GTAA-3') et 926R (5'-CCG YCA ATT YMT TTR AGT TT-3') (Parada et al. 2016). La région hypervariable V7 de l'ADNr 18S a été amplifiée à l'aide du couple d'amorces 960F (5'-GGC TTA ATT TGA CTC AAC RCG-3') et NSR1438 (5'-GGG CAT CAC AGA CCT GTT AT-3') (Gast et al. 2004; Van de Peer et al. 2000). Les échantillons ont été amplifiés par PCR sur un thermocycleur T100 BioRad Thermal Cycler selon le programme suivant :

Tableau 7. Étapes de l'amplification par PCR des échantillons de l'étude.

Étapes	Températures (°C)	Temps	Cycle
Dénaturation initiale	94	5 min	1
Dénaturation initiale	94	1 min	30
Hybridation	55	45 sec	
Élongation	72	45 sec	
Étape final d'élongation	72	7 min	1

L'intégrité de l'ADN (5 µL) a été contrôlée par une électrophorèse sur gel d'agarose 1,5% dilué avec du tampon tris-acétate-EDTA (TAE) 1X. Un marqueur de taille GelPilot 100 pb a été utilisé comme témoin de migration (5 µL). La migration a duré 45 minutes à 150 V. La diversité microbienne a ensuite été caractérisée par métabarcoding des amplicons obtenus par la technique MiSeq-Illumina (2 x 300 pb) par la compagnie Eurofins France.

### 2.2.7.3 Traitement des séquences

Après séquençage, les variants de séquences d'amplicon (ASV) obtenus ont été analysés avec le logiciel R-4.2.2 à l'aide du pipeline bio-informatique DADA2 v1.16 (Divisive Amplicon Denoising Algorithm) (Callahan et al. 2019; Callahan et al. 2016). Ces logiciels ont permis de filtrer les séquences brutes obtenues après séquençage Illumina. L'assignation taxonomique de chaque ASV filtré a été effectuée à partir de la base de données SILVA 138.1 pour les séquences bactériennes d'ADNr 16S (Quast et al. 2013; Yilmaz et al. 2014), et la base de données PR<sup>2</sup> pour les séquences eucaryotes d'ADNr 18S (Guillou et al. 2013). Les ASV n'ayant pas été assignés lors du traitement des données d'ADNr 16S et 18S ont été retirés.

## 2.2.8 Analyses statistiques

### 2.2.8.1 Abondance microbienne des biofilms

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel R-4.2.2 pour comparer les abondances des espèces bactériennes et eucaryotes totales présentes dans les biofilms formés. Ces comparaisons ont été effectuées entre les revêtements, entre les temps d'échantillonnage (T1, T2, T3), et entre chaque transplantation Rimouski – Sept-Îles et Sept-Îles – Rimouski. L'homogénéité des variances a été vérifiée avec un test de Bartlett ou de Levene, et la normalité des ratios d'intensité a été testée au préalable avec un test de Shapiro-Wilk (Legendre et Legendre 2012; Shapiro et Wilk 1965). Des analyses de variance ANOVA à deux facteurs suivie d'un test post-hoc de Tukey, ou un test de Kruskal-Wallis ont été réalisés sur les données d'abondances (Girden 1992; Legendre et Legendre 2012). Pour l'ensemble des tests statistiques, la limite de significativité utilisée est de 0,05.

### 2.2.8.2 Diversité microbienne des biofilms

La diversité des communautés spécifiques des espèces bactériennes et eucaryotes (diversité alpha) a été calculée pour les biofilms formés sur les surfaces des différents revêtements, à chaque temps d'échantillonnage des transplantations (package phyloseq v1.4-2, RStudio). Pour ce faire, l'indice de diversité de Shannon a été déterminé, permettant de mesurer le nombre d'espèces dans la communauté des biofilms et de la répartition des ASV au sein de ces espèces (Legendre et Legendre 2012). De même, un indice de Chao1 a également été mesuré, dont le calcul se base sur le nombre d'espèces rares ou peu abondantes susceptibles d'être présentes dans l'échantillon (Chao 1984).

Une représentation non paramétrique de type NMDS (Non-metric Multi-dimensional Scaling, package vegan v2.6-4, Rstudio) en représentation 2D a été appliquée sur une matrice de similarité Bray-Curtis afin de visualiser les différences de diversité bactériennes des biofilms entre les revêtements et sur les transplantations (Clarke 1993). Une représentation NMDS a été appliquée sur une matrice de similarité Jaccard pour visualiser les différences

de diversité eucaryote des biofilms entre les revêtements et les transplantations (Legendre et Legendre 2012). Une analyse de similarité (ANOSIM) à facteurs combinés a également été réalisée sur les matrices de similarité de Bray-Curtis et de Jaccard pour identifier les revêtements et les temps d'échantillonnage qui présentent une composition taxonomique différente (Clarke 1993).

### **2.2.9 Archivage des données**

Les données expérimentales obtenues dans le cadre de cette Maîtrise seront rendues accessibles dans un premier temps à l'ensemble des partenaires du projet PAINTS sur la base de données ANR-FRQ-PAINTS. Il pourrait être envisagé de rendre ces données disponibles sur des bases de données telles que NCBI.

## **2.3 RESULTATS**

### **2.3.1 Caractérisation des milieux d'immersion**

#### **2.3.1.1 Paramètres environnementaux**

Les températures mesurées à la marina de Sept-Îles au mois d'août se sont révélées être plus élevées que celles mesurées dans les eaux de Rimouski durant le mois de juillet (18°C vs 13°C, Tableau 8). Sur le site de Rimouski, une augmentation de la salinité (T0 : 26,5, T30 : 30,9) et de l'oxygène dissous (T0 : 73%, T30 : 92,4%) a été mesurée durant le mois d'immersion. Sur le site de Sept-Îles, les valeurs de salinité et d'oxygène dissous sont similaires entre le début et la fin du mois d'août à une valeur de 25 (Tableau 8).

Tableau 8. Paramètres environnementaux dans les marinas de Rimouski et de Sept-Îles au premier jour (T0 Rimouski : 15/07/23, T0 Sept-Îles : 01/08/23) et au dernier jour (T30 Rimouski : 15/08/23, T30 Sept-Îles : 31/08/23) d'immersion des mouillages.

Sites et temps d'échantillonnage	Marina de Rimouski		Marina de Sept-Îles	
	T0	T30	T0	T30
Température (°C)	13	13,8	18,7	18
Salinité (PSU)	26,5	30,9	25,2	25
pH	7,9	7,6	7,9	7,8
Oxygène dissous (%)	73	92,4	74,2	73
Carbone organique dissous (mg/C/L)	2,1	1,7	2,6	1,8
Azote organique dissous (mg/C/L)	0,3	0,3	0,2	0,2
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (µmol/L)	0,5	0,7	0,3	0,5
NO <sub>2</sub> / NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (µmom/L)	7,1	4,8	2,7	4,6
NO <sub>2</sub> (µmol/L)	0,1	0,1	0,1	0,1
SiO <sub>2</sub> (µmol/L)	12,4	10,9	10	9,8

### 2.3.1.2 Abondance microbienne des sites d'immersion

#### a) ABONDANCE DES MICROORGANISMES HÉTÉROTROPHES SUR LES SITES D'IMMERSION

Les abondances moyennes de microorganismes hétérotrophes, mesurées dans la colonne d'eau des marinas de Rimouski et de Sept-Îles par cytométrie en flux, ont augmenté entre le début et la fin de l'immersion et étaient du même ordre de grandeur sur les deux sites (Figure 14). À la marina de Rimouski, cette abondance a augmenté, passant de  $1,5 \times 10^6$  à  $2,2 \times 10^6$  cellules/mL et à Sept-Îles de  $1,5 \times 10^6$  à  $1,7 \times 10^6$  cellules/mL, (Figure 14).

En termes d'abondance relative, les bactéries High Nucleic Acid (HNA) étaient majoritaires dans les colonnes d'eau de la marina de Rimouski durant le mois d'immersion (83% à T30), et également à Sept-Îles dans une moindre mesure (55% à T30, Figure 14).

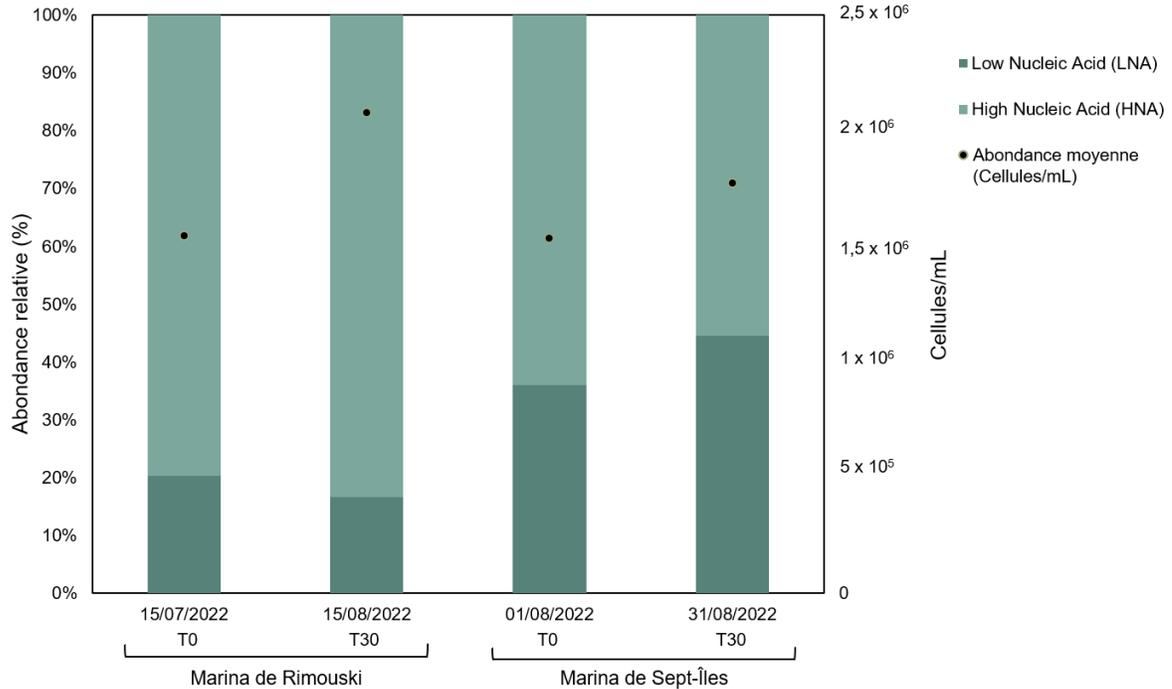


Figure 14. Abondance relative (%) et moyenne (cellules/mL) des espèces microbiennes hétérotrophes retrouvées dans les marinas de Rimouski et de Sept-Îles au premier jour (T0) et au dernier jour (T30) de l’immersion des revêtements.

b) *ABONDANCE DES MICROORGANISMES AUTOTROPHES SUR LES SITES D’IMMERSION*

Les valeurs d’abondance moyennes des microorganismes autotrophes totaux mesurées dans la colonne d’eau de la marina de Rimouski par cytométrie en flux étaient plus élevées que celles mesurées dans la marina de Sept-Îles (Figure 15). À la mi-juillet à Rimouski, l’abondance moyenne de microorganismes autotrophes totaux dans la colonne d’eau était de  $3,6 \times 10^4$  cellules/mL, pour décroître à  $2,3 \times 10^4$  cellules/mL à la mi-août (Figure 15). En début d’immersion, les pico-eucaryotes et les nano-eucaryotes prédominaient dans la colonne d’eau de la marina de Rimouski au début d’immersion, respectivement à 77% et 22%. Les proportions des pico-eucaryotes et des nano-eucaryotes se sont maintenues à 85% et 14% à la fin des 30 jours d’immersion (Figure 15).

En août, l’abondance moyenne de microorganismes autotrophes totaux dans la colonne d’eau a augmenté à Sept-Îles, passant de  $1,1 \times 10^4$  cellules/mL en début d’immersion à

2,2 x 10<sup>4</sup> cellules/mL après 30 jours d’immersion (Figure 15). Au début du mois d’août, les nano-eucaryotes (56%) et les pico-eucaryotes (35%) dominaient dans la colonne d’eau de Sept-Îles, avec une présence minoritaire de cyanobactéries (pico-PE-cyanobactéries : 8%, nano-PE-cyanobactéries : 3%, Figure 15). Ces dernières sont devenues dominantes dans la colonne d’eau à la fin du mois d’août (pico-PE-cyanobactéries : 70%, Figure 15).

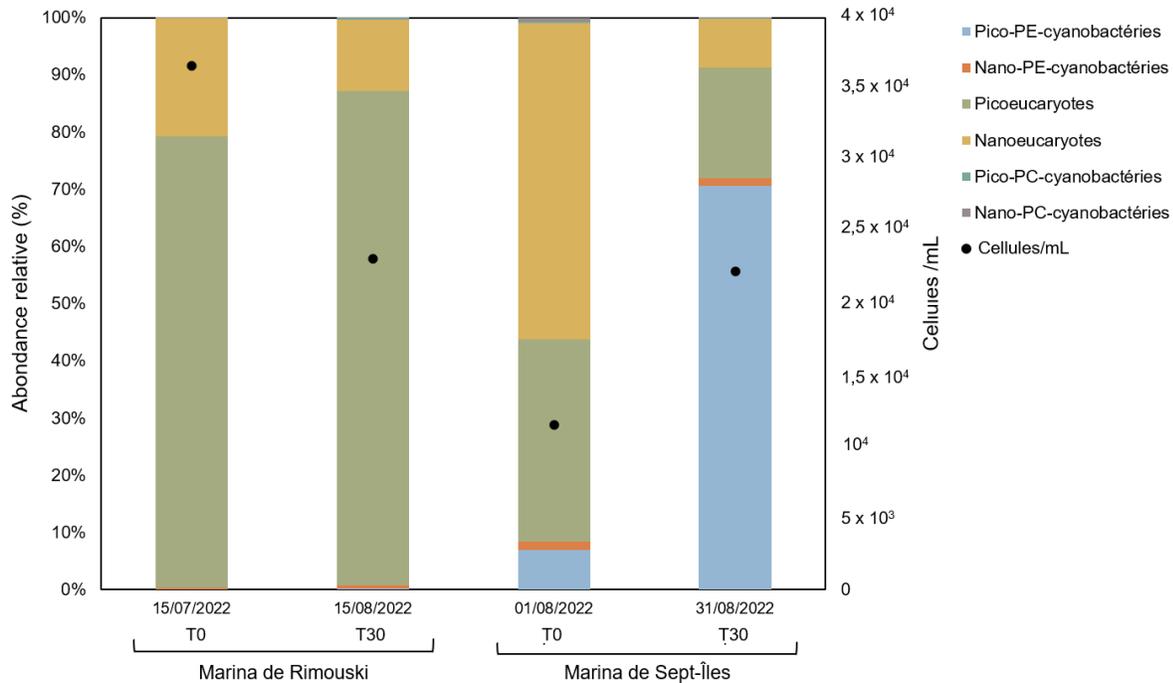


Figure 15. Abondance relative (%) et moyenne (cellules/mL) des espèces autotrophes mesurées dans les marinas de Rimouski et de Sept-Îles au premier jour (T0) et au dernier jour (T30) d’immersion des revêtements.

### 2.3.1.3 Diversité microbienne des milieux d’immersion

#### a) DIVERSITE DES COMMUNAUTES BACTERIENNES

Une forte diversité de phyla a été observée dans la colonne d’eau à Rimouski mi-juillet (Figure 16). Les communautés bactériennes y sont majoritairement réparties entre les phyla Firmicutes (59,3%) et Proteobacteria (22,1%), puis entre les phyla Actinobacteria (5,5%), Bacteroidota (4,2%), Planctomycetota (3,4%), et Verrucomicrobia (2,5% Figure 16). À la

mi-août (T30), le phylum Proteobacteria est devenu dominant (74,6% Figure 16). Une diminution de la diversité générale a été observée sur le site de Rimouski à T30, liée à la diminution de l'abondance des communautés minoritaires qui étaient présentes à la mi-juillet (Figure 16).

Lors de l'immersion à Sept-Îles en août, le phylum Proteobacteria dominait dans la colonne d'eau (T0 : 76,2%, T30 : 77,9%, Figure 16) par rapport aux Bacteroidota (T0 : 10,6%, T30 : 7,1%), et Firmicutes (T0 : 5,7%, T30 : 7,6%, Figure 16). Contrairement aux eaux de Rimouski, le phylum des Cyanobacteria était plus abondant dans les eaux de Sept-Îles (T0 : 6,7%, T30 : 3,3%, Figure 16).

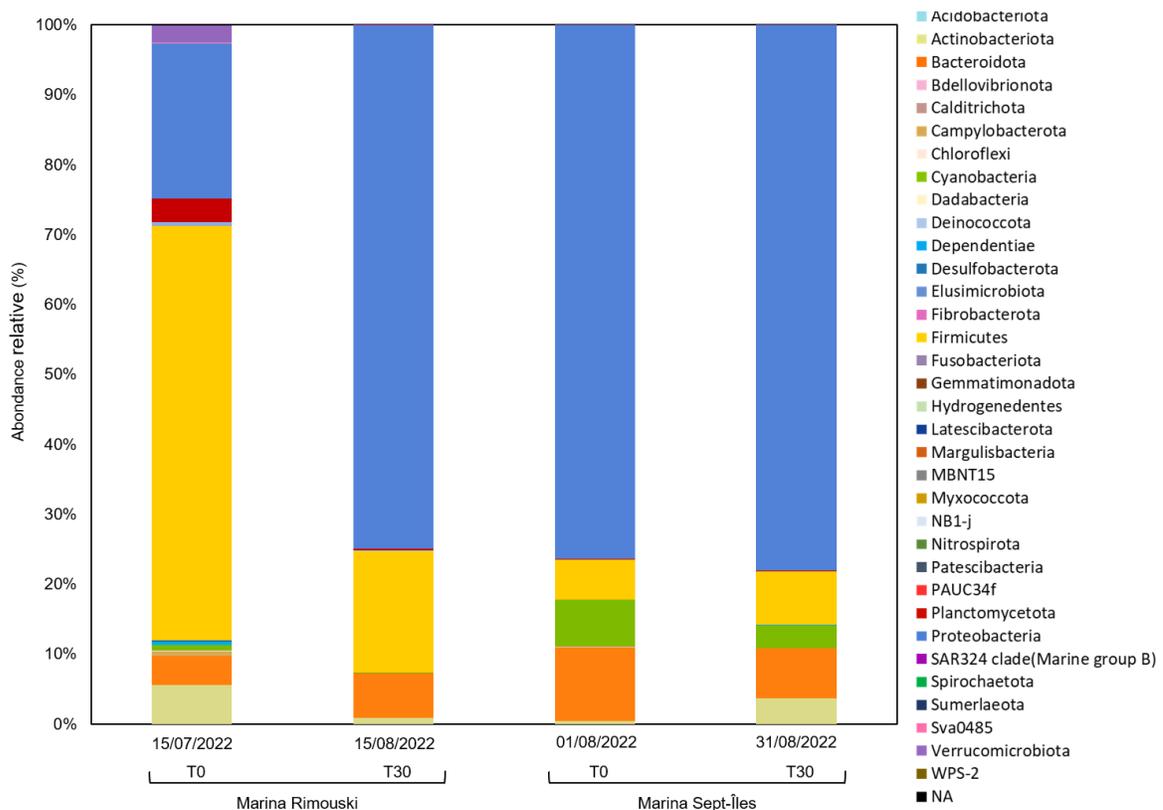


Figure 16. Abondance relative (%) des ASV obtenus par séquençage Illumina de l'ARN16S et après traitement sur DADA2 et assignation taxonomique avec SILVA138 au niveau des phyla. La diversité des communautés bactériennes a été déterminée au premier jour (T0) et au dernier jour (T30) des sites d'immersion.

b) *DIVERSITE DES COMMUNAUTES EUCARYOTES DES SITES D'IMMERSION*

De mi-juillet à mi-août, le supergroupe Obazoa était majoritaire dans la colonne d'eau de Rimouski (T0 : 98,9%, T30 : 99,6%, Figure 17). À la marina de Sept-Îles, la communauté eucaryote retrouvée dans la colonne d'eau était constituée majoritairement du supergroupe Obozoa (T0 : 55,6%, T30 : 79,4%) et TSAR (T0 : 36,5%, T30 : 19,2%, Figure 17). Les supergroupes minoritaires étaient Cryptista (T0 : 4%, T30 : 0,4%) et Archaeplastida (T0 : 3%, T30 : 0,4%, Figure 17).

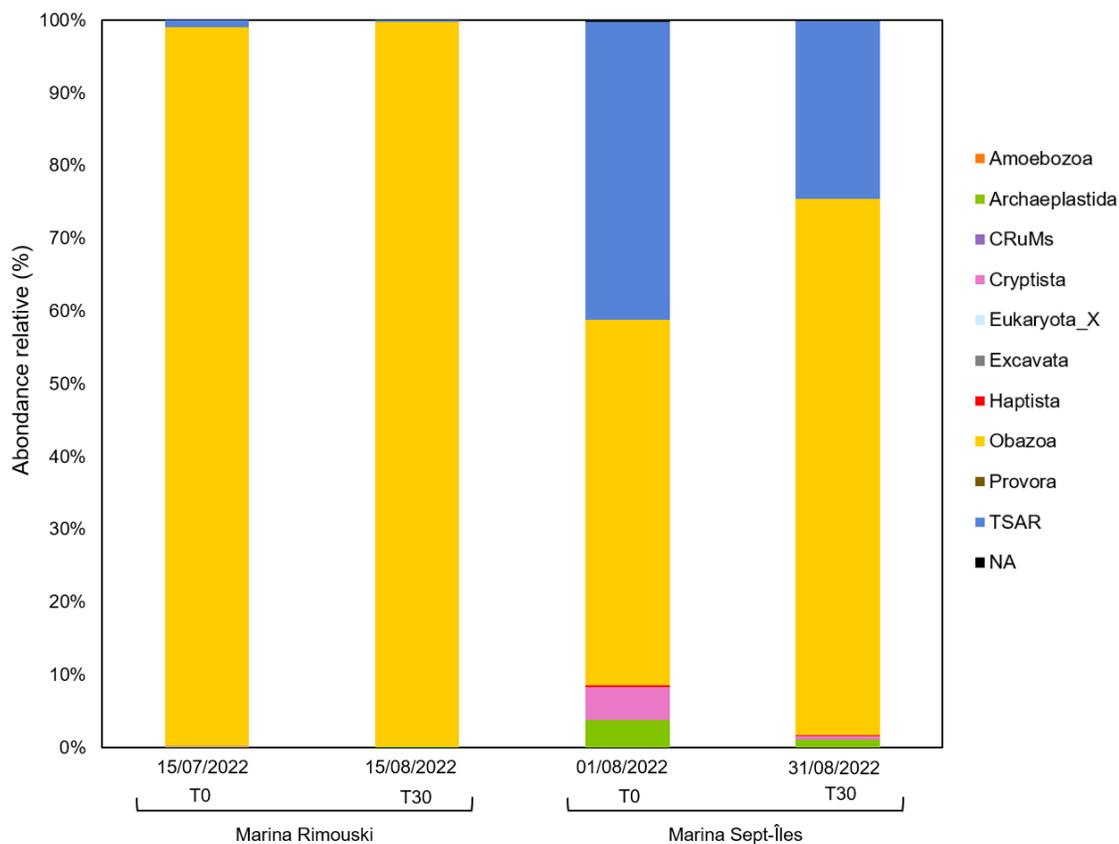


Figure 17. Abondance relative (%) des ASV obtenus par séquençage Illumina de l'ARN18S et après traitement sur DADA2 et assignation taxonomique par PR<sup>2</sup> au niveau des supergroupes. La diversité des communautés eucaryotes a été déterminée au premier jour (T0) et au dernier jour (T30) des sites d'immersion.

## 2.3.2 Abondance des microorganismes dans différents biofilms formés sur les revêtements

### 2.3.2.1 Abondance des microorganismes hétérotrophes dans les biofilms

Après un mois d'immersion à la marina de Rimouski (T1), les abondances bactériennes moyennes mesurées étaient de  $3,6 \times 10^6$  cellules/mL dans les biofilms provenant du revêtement N2, de  $4,6 \times 10^6$  cellules/mL dans ceux ayant colonisé le revêtement M2, et de  $5,5 \times 10^6$  cellules/mL sur le témoin PVC (T1, Figure 18A). Il n'y avait aucune différence significative en termes d'abondance entre les différents revêtements après immersion *in situ* à Rimouski ( $df = 2$ ,  $F = 0,73$ ,  $p\text{-value} > 0,05$ , ANOVA). Après transplantation à Sept-Îles (T2), les abondances des cellules dans les biofilms s'étant développés sur les revêtements antifouling ont en moyenne légèrement diminué par rapport à T1 (N2 :  $3,4 \times 10^6$  cellules/mL, M2 :  $1,6 \times 10^6$  cellules/mL), contrairement au témoin PVC ( $32 \times 10^6$  cellules/mL) où un des triplicatas présentait une abondance très élevée de microorganismes hétérotrophes (T2, Figure 18A). Ces abondances étaient significativement différentes entre les revêtements ( $df = 2$ ,  $\chi^2 = 6,4$ ,  $p\text{-value} < 0,05$ , Kruskal-Wallis), notamment entre le témoin PVC et le revêtement M2 ( $p\text{-value} < 0,05$ , Dunn test). Après immersion contrôlée de 15 jours à Sept-Îles (T3), l'abondance moyenne de microorganismes hétérotrophes mesurée sur les revêtements antifouling expérimentaux était plus faible (N2 :  $1,6 \times 10^6$  cellules/mL, M2 :  $2,7 \times 10^6$  cellules/mL) que celle retrouvée sur les coupons de PVC ( $18,2 \times 10^6$  cellules/mL, Figure 18A). Les abondances moyennes n'étaient pas significativement différentes entre les biofilms des trois revêtements à T3 ( $df = 2$ ,  $F = 0,2$ ,  $p\text{-value} > 0,05$ , ANOVA). Au cours de cette transplantation, il n'y avait aucune différence significative de l'abondance moyenne de microorganismes hétérotrophes entre les trois temps, que ce soit pour PVC ( $df = 2$ ,  $F = 1,4$ ,  $p\text{-value} > 0,05$ , ANOVA), N2 ( $df = 2$ ,  $F = 1,2$ ,  $p\text{-value} > 0,05$ , ANOVA) et M2 ( $df = 2$ ,  $\chi^2 = 1,9$ ,  $p\text{-value} > 0,05$ , Kruskal-Wallis).

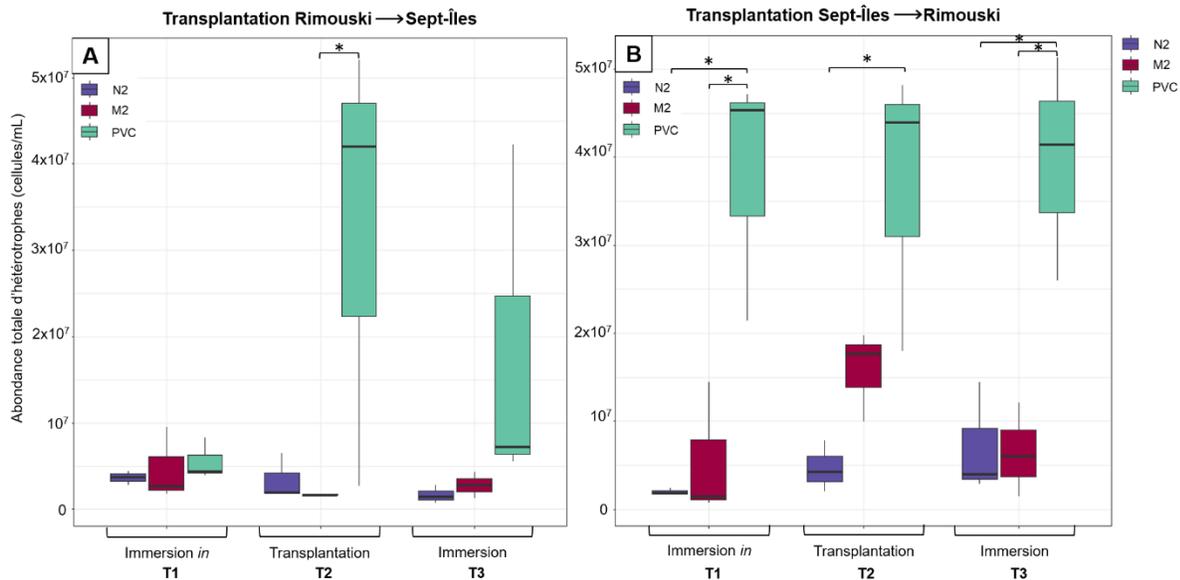


Figure 18. Abondance totale moyenne (cellules/mL) des espèces microbiennes hétérotrophes des biofilms formés sur les différents revêtements après 1 mois d’immersion (T1), après transplantation (T2) et après 15 jours d’immersion contrôlée (T3) lors de la transplantation Rimouski-Sept-Îles (A) et Sept-Îles-Rimouski (B). \* Différences statistiques entre les revêtements (p-value < 0,05).

Après un mois d’immersion en conditions naturelles à la marina de Sept-Îles, les abondances moyennes des microorganismes hétérotrophes mesurées étaient de  $3,7 \times 10^7$  cellules/mL pour les biofilms formés sur les témoins PVC, et de  $1,9 \times 10^6$  cellules/mL et  $5,5 \times 10^6$  cellules/mL pour ceux formés respectivement sur les revêtements N2 et M2 (T1, Figure 18B). Ces abondances étaient significativement différentes selon le type de revêtement (df = 2, F = 14, p-value < 0,05, ANOVA), plus précisément entre le PVC et le revêtement N2 et entre le PVC et le revêtement M2 (p-value < 0,05, test de Tukey). Après transplantation à Rimouski (T2), l’abondance moyenne des microorganismes hétérotrophes dans les biofilms formés sur les revêtements antifouling a augmenté (N2 :  $4,6 \times 10^6$  cellules/mL, M2 :  $1,5 \times 10^7$  cellules/mL), contrairement au témoin PVC dont l’abondance est restée stable ( $3,7 \times 10^7$  cellules/mL, Figure 18B). Il y avait une différence significative entre les abondances moyennes selon les revêtements (df = 2, F = 7,8, p-value < 0,05, ANOVA), notamment entre le PVC et N2 (p-value < 0,05, Tukey). Après immersion contrôlée de 15 jours à Rimouski, les biofilms formés sur les revêtements

N2 et M2 présentaient une abondance moyenne similaire (N2 :  $7 \times 10^6$  cellules/mL, M2 :  $6,5 \times 10^6$  cellules/mL), inférieure à celle du PVC ( $3,9 \times 10^7$  cellules/mL) qui est demeurée plus ou moins similaires au trois périodes de la transplantation (T3 Figure 18B). L'abondance moyenne de microorganismes hétérotrophes était différente significativement selon les biofilms des différents revêtements ( $df = 2$ ,  $F = 13,8$ ,  $p\text{-value} < 0,05$ , ANOVA), notamment entre les coupons PVC et le revêtement N2, et entre le PVC et le revêtement M2 ( $p\text{-value} < 0,05$ , Tukey). Au cours de cette transplantation, il n'y avait aucune différence significative de l'abondance moyenne de microorganismes hétérotrophes entre les trois étapes, que ce soit pour le PVC ( $df = 2$ ,  $F = 0,03$ ,  $p\text{-value} > 0,05$ , ANOVA), N2 ( $df = 2$ ,  $F = 1,5$ ,  $p\text{-value} > 0,05$ , ANOVA) et M2 ( $df = 2$ ,  $F = 2,5$ ,  $p\text{-value} > 0,05$ , ANOVA).

#### 2.3.2.2 Abondance des microorganismes autotrophes dans les biofilms

Après un mois d'immersion naturelle à Rimouski, l'abondance des microorganismes autotrophes était plus élevée sur les coupons PVC ( $2 \times 10^6$  cellules/mL) et le revêtement M2 ( $1 \times 10^6$  cellules/mL), que sur le revêtement N2 ( $4,2 \times 10^4$  cellules/mL, T1 Figure 19A). Ces abondances à T1 ne présentaient toutefois pas de différences significatives entre ces différents revêtements ( $df = 2$ ,  $\chi^2 = 4,3$ ,  $p\text{-value} > 0,05$ , Kruskal-Wallis). Après transplantation (T2), une diminution des abondances a été observée sur l'ensemble des revêtements (N2 :  $8,3 \times 10^4$  cellules/mL, M2 :  $6 \times 10^4$  cellules/mL) et témoin PVC ( $5,3 \times 10^5$  cellules/mL, T2 Figure 19A). Il n'y avait pas de différence significative entre les abondances moyennes observées sur les différents revêtements ( $df = 2$ ,  $\chi^2 = 5,2$ ,  $p\text{-value} > 0,05$ , Kruskal-Wallis). Après 15 jours d'immersion contrôlée à Sept-Îles (T3), les abondances moyennes de microorganismes autotrophes mesurées étaient de  $6,2 \times 10^5$  cellules/mL pour le PVC, de  $3,8 \times 10^4$  cellules/mL pour N2 et de  $2,8 \times 10^4$  cellules/mL pour M2 (T3, Figure 19A). Les abondances moyennes de microorganismes autotrophes n'étaient pas significativement différentes selon le type de revêtements ( $df = 2$ ,  $\chi^2 = 5,6$ ,  $p\text{-value} > 0,05$ , Kruskal-Wallis). Au cours de la transplantation Rimouski – Sept-Îles, il n'y avait aucune différence significative de l'abondance moyenne de microorganismes autotrophes entre les trois temps,

que ce soit pour le PVC ( $df = 2$ ,  $F = 1,7$ ,  $p\text{-value} > 0,05$ , ANOVA), N2 ( $df = 2$ ,  $F = 1,2$ ,  $p\text{-value} > 0,05$ , ANOVA) et M2 ( $df = 2$ ,  $\chi^2 = 4,3$ ,  $p\text{-value} > 0,05$ , Kruskal-Wallis).

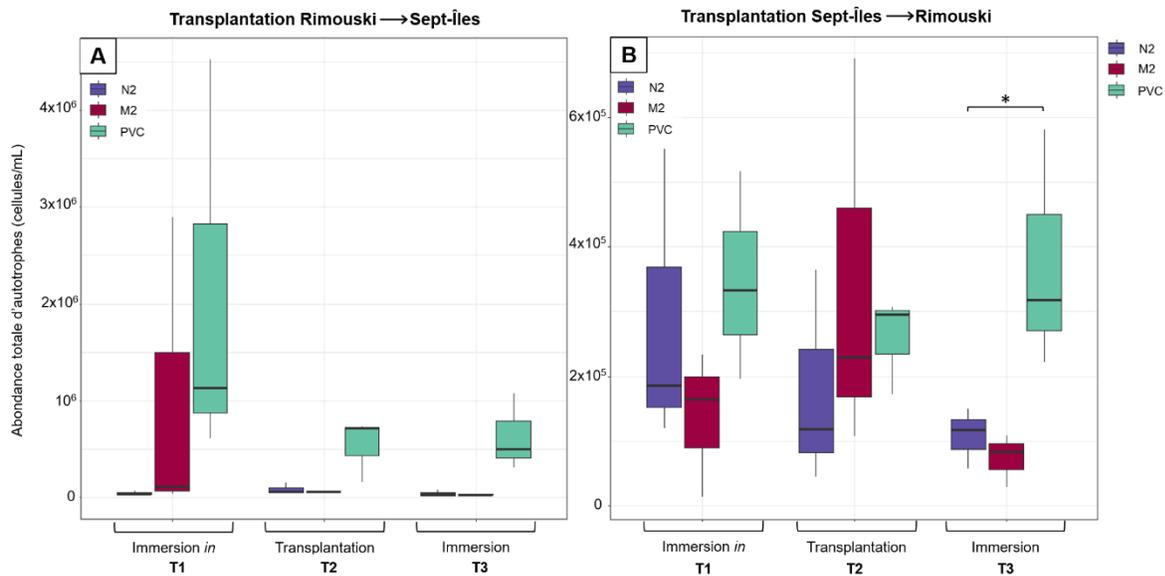


Figure 19. Abondance totale moyenne (cellules/mL) des espèces microbiennes autotrophes des biofilms sur les différents revêtements après 1 mois d'immersion (T1), après transplantation (T2) et après 15 jours d'immersion contrôlée (T3) lors de la transplantation Rimouski-Sept-Îles (A) et Sept-Îles-Rimouski (B). \* Différences statistiques entre les revêtements ( $p\text{-value} < 0,05$ ).

Après un mois d'immersion à Sept-Îles (T1), l'abondance mesurée dans les biofilms formées sur le revêtement M2 ( $1,3 \times 10^5$  cellules/mL) était plus faible que celles observées sur le revêtement N2 ( $2,8 \times 10^5$  cellules/mL) et le témoin PVC ( $3,4 \times 10^5$  cellules/mL, T1 Figure 19B), sans pour autant présenter de différences significatives entre elles ( $df = 2$ ,  $F = 1,14$ ,  $p\text{-value} > 0,05$ , ANOVA). Après transplantation (T2), les abondances moyennes a peu varié sur l'ensemble des revêtements (PVC :  $2,5 \times 10^5$  cellules/mL, N2 :  $1,7 \times 10^5$  cellules/mL, M2 :  $3,4 \times 10^5$  cellules/mL, T2 Figure 19B). Il n'y avait aucune différence significative entre les revêtements antifouling et le PVC ( $df = 2$ ,  $F = 0,5$ ,  $p\text{-value} > 0,05$ , ANOVA). À la fin de l'immersion contrôlée de 15 jours à Rimouski (T3), l'abondance moyenne de microorganismes autotrophes dans les biofilms formés sur les revêtements antifouling a diminué (N2 :  $10 \times 10^4$  cellules/mL, M2 :  $7,2 \times 10^4$  cellules/mL), contrairement à celle du PVC qui est restée constante ( $3,7 \times 10^5$  cellules/mL, T3 Figure 19B). Une

différence significative des abondances moyennes a été observée selon les revêtements (df = 2, F = 6,3, p-value < 0,05, ANOVA), notamment entre le PVC et M2 (p-value < 0,05, test de Tukey). Au cours de la transplantation Sept-Îles-Rimouski, il n'y avait aucune différence significative en termes d'abondance moyenne entre les trois temps, que ce soit pour PVC (df =2, F = 0,5, p-value > 0,05, ANOVA), N2 (df = 2, F = 0,8, p-value > 0,05, ANOVA) et M2 (df = 2, F = 1,6, p-value > 0,05, ANOVA).

### **2.3.3 Diversité des microorganismes dans les biofilms formés sur les différents revêtements**

Note : Les échantillons récoltés après un mois d'immersion ayant été conservés dans un stabilisant de l'ADN contrairement aux autres échantillons, ils n'ont pas été utilisés pour répondre à la problématique de ce mémoire.

#### **2.3.3.1 Diversité des espèces procaryotes dans les biofilms**

En moyenne, les indices de diversité de Shannon mesurés sur les biofilms formés lors de la transplantation Rimouski-Sept-Îles (indice de diversité de Shannon = 4,9) étaient plus faibles que ceux mesurés dans les biofilms formés lors de la transplantation Sept-Îles-Rimouski (indice de diversité de Shannon = 5,9, Figure 20). La même tendance a été observée avec les indices de Chao1 entre les échantillons de biofilms des deux transplantations (Rimouski-Sept-Îles : indice de Chao1 = 1500, Sept-Îles-Rimouski : indice de Chao1 = 3500, Figure 20). Les échantillons de biofilms formés sur les revêtements lors de la transplantation Sept-Îles-Rimouski présentaient une plus grande richesse d'espèces spécifiques réparties au sein de la communauté. Des phyla communs ont été observés sur l'ensemble des échantillons sur les deux transplantations. Le phylum Proteobacteria était majoritaire sur tous les échantillons de biofilms confondus des deux transplantations, avec une abondance relative comprise entre 40,4 et 85,6% pour la transplantation Rimouski-Sept-Îles (Ri-SI, Figure 21A), et une abondance relative comprise entre 37,1 et 67% pour la transplantation Sept-Îles-Rimouski (SI-Ri, Figure 21B). Les autres phyla majoritaires communs sur les deux transplantations étaient les Bacteroidota (Ri-SI : 2,9 à 24,6%, SI-Ri :

9,2 à 31,2%), Cyanobacteria (Ri-SI : 2,9 à 24,5%, SI-Ri : 9,1 à 31,2%), Firmicutes (Ri-SI : < 1 à 15,5%, SI-Ri : < 1 à 6,6%, Figure 21). D'autres phyla ont été retrouvés sur l'ensemble des échantillons de la transplantation Sept-Îles-Rimouski, dont Planctomycetota (1,5 à 9,6%) Verrumicrobiota (1,1 à 6,6%), Desulfobacterota (0,3 à 0,8%) et Bdellovibrionota (0,5 à 1,1%, Figure 21B). De même qu'au niveau phylum, une plus grande richesse et équitabilité des familles bactériennes a été retrouvée dans les échantillons de biofilms issus de la transplantation Sept-Îles-Rimouski (Figure 22).

Lors de la transplantation Rimouski-Sept-Îles, un contraste dans les valeurs des indices de diversité de Shannon a été observé entre les biofilms récupérés à T2 (indice de diversité de Shannon moyen = 4) et ceux à T3 (indice de diversité de Shannon moyen = 5,5, Figure 20). La richesse spécifique des espèces bactériennes dans les biofilms formés sur les différents revêtements a augmenté à T3 (Figure 20). D'après la Figure 21, le phylum Planctomycetota était présent en plus grande proportion dans les biofilms formés sur les trois revêtements (En moyenne : N2 : 5%, M2 : 10,3%, PVC 10,6%, T3 Figure 21A). Il en va de même pour les phyla Verrumicrobiota (En moyenne : N2 : 0,9%, M2 : 0,8%, PVC : 4,1%), Bdellovibrionota (En moyenne : N2 : 1,1%, M2 : 0,9%, PVC : 1,5%), Myxococcota (En moyenne : N2 : 0,9%, M2 : 0,8%, PVC : 1,4%) et Desulfobacterota (En moyenne : N2 : 0,8%, M2 : 0,8%, PVC : 0,8%, T3 Figure 21A). Les phyla Bacteroidota et Firmicutes, déjà présents en minorité sur les échantillons de biofilms à T2, ont également augmenté après immersion contrôlée à Sept-Îles (Bacteroidota : N2 : 9%, M2 : 9,6%, PVC : 22%, Firmicutes : N2 : 9,3%, M2 : 5,6%, PVC : 3%, T3 Figure 21A). Cette différence de composition entre les biofilms récupérés après les deux temps d'échantillonnage sur cette transplantation était également visible au niveau de la famille bactérienne (Figure 22). Notamment, la famille des *Pseudoalteromonadaceae*, était présente dans tous les biofilms après immersion *in situ* à Rimouski puis transplantation (N2 : 41,6%, M2 : 46%, PVC : 23%), et a fortement diminué en proportion après immersion contrôlée (< 1%, Figure 22A). Au contraire, la famille des *Rodhobacteraceae*, dont l'abondance était en moyenne inférieure à 5% sur l'ensemble des échantillons à T2, a augmenté après immersion contrôlée à Sept-Îles sur les différents revêtements (N2 : 23,5%, M2 : 20,6%, PVC : 17,1%, Figure 22A).

La diversité globale des échantillons de biofilms formés sur les différents revêtements lors de la transplantation Sept-Îles-Rimouski était dans l'ensemble relativement stable d'après les abondances relatives des phyla (Figure 21B), et les indices de diversité de Shannon (Figure 20). La proportion du phylum Myxococcota a augmenté uniquement sur les biofilms récupérés après immersion contrôlée lors de la transplantation Sept-Îles-Rimouski (N2 : 0,9%, M2 : 0,6%, PVC : 1,1%, T2 Figure 21B). La richesse spécifique (indice de Chqo1) des biofilms récupérés sur tous revêtements confondus, après immersion contrôlée à Rimouski, était sensiblement plus faible qu'après immersion *in situ* à Sept-Îles et transplantation (Figure 20). Un changement dans la composition des familles bactériennes a été observé quel que soit le revêtement, entre les deux temps d'échantillonnage sur la transplantation Sept-Îles-Rimouski (Figure 22B). Après immersion contrôlée à Rimouski, la proportion des familles *Pseudoalteromonadaceae* et *Rubritaleaceae* a diminué sur tous les revêtements (< 1%, T3 Figure 22B). Au contraire, la proportion de la famille des *Cyclobacteriaceae* a augmenté légèrement à T3 (> 1%, Figure 22B).

Un test ANOSIM à facteurs combinés (type de revêtements, transplantation et temps d'échantillonnage) a été appliqué à ces données, et a montré une séparation significative des échantillons de biofilms au niveau de la composition bactérienne selon les facteurs de l'étude ( $R = 0,93$ ,  $p\text{-value} < 0,05$ ). La représentation graphique NMDS révèle quatre groupes de biofilms distincts dont la composition est similaire (Figure 23). Les échantillons sont répartis selon le temps d'échantillonnage et la transplantation. Les échantillons de biofilms entre les deux temps d'échantillonnage de la transplantation Rimouski-Sept-Îles sont davantage séparés spatialement que ceux de la transplantation Sept-Îles-Rimouski.

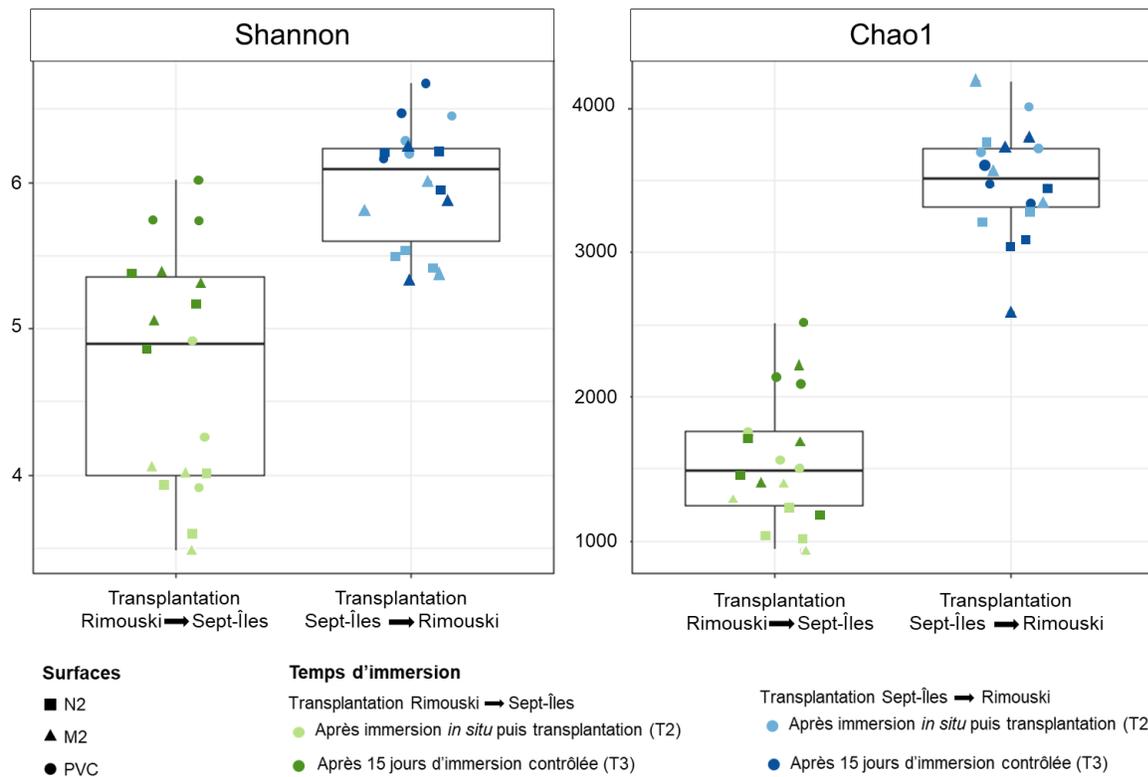


Figure 20. Indices de diversité de Shannon et de Chao1 pour les espèces microbiennes (16S) composant les biofilms formés sur PVC et les revêtements N2 et M2 après transplantation et immersion contrôlée entre Rimouski et Sept-Îles.

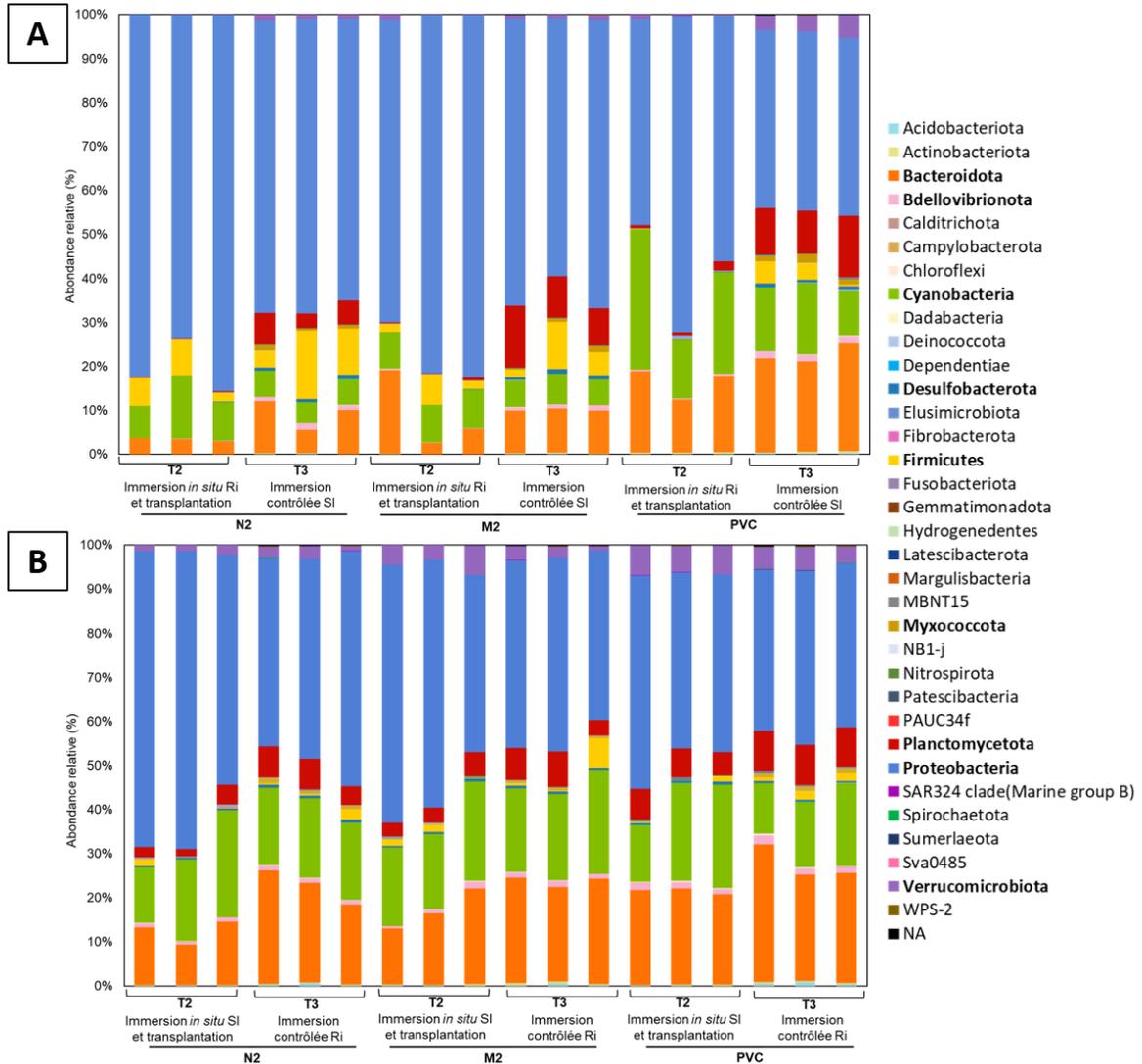


Figure 21. Abondance relative (%) des phyla retrouvés au sein des ASV obtenus par séquençage Illumina de l'ADNr16S et après traitement sur DADA2. L'assignation taxonomique a été réalisée à partir de la base de données SILVA138. La diversité des communautés procaryotes des revêtements N2, M2 et PVC a été déterminée après transplantation et immersion contrôlée sur la transplantation Rimouski-Sept-Îles (A) et Sept-Îles-Rimouski (B). Le groupe NA représente les séquences bactériennes dont l'assignation taxonomique a échoué. En gras sont représentés les phyla majoritaires retrouvés au sein des biofilms.

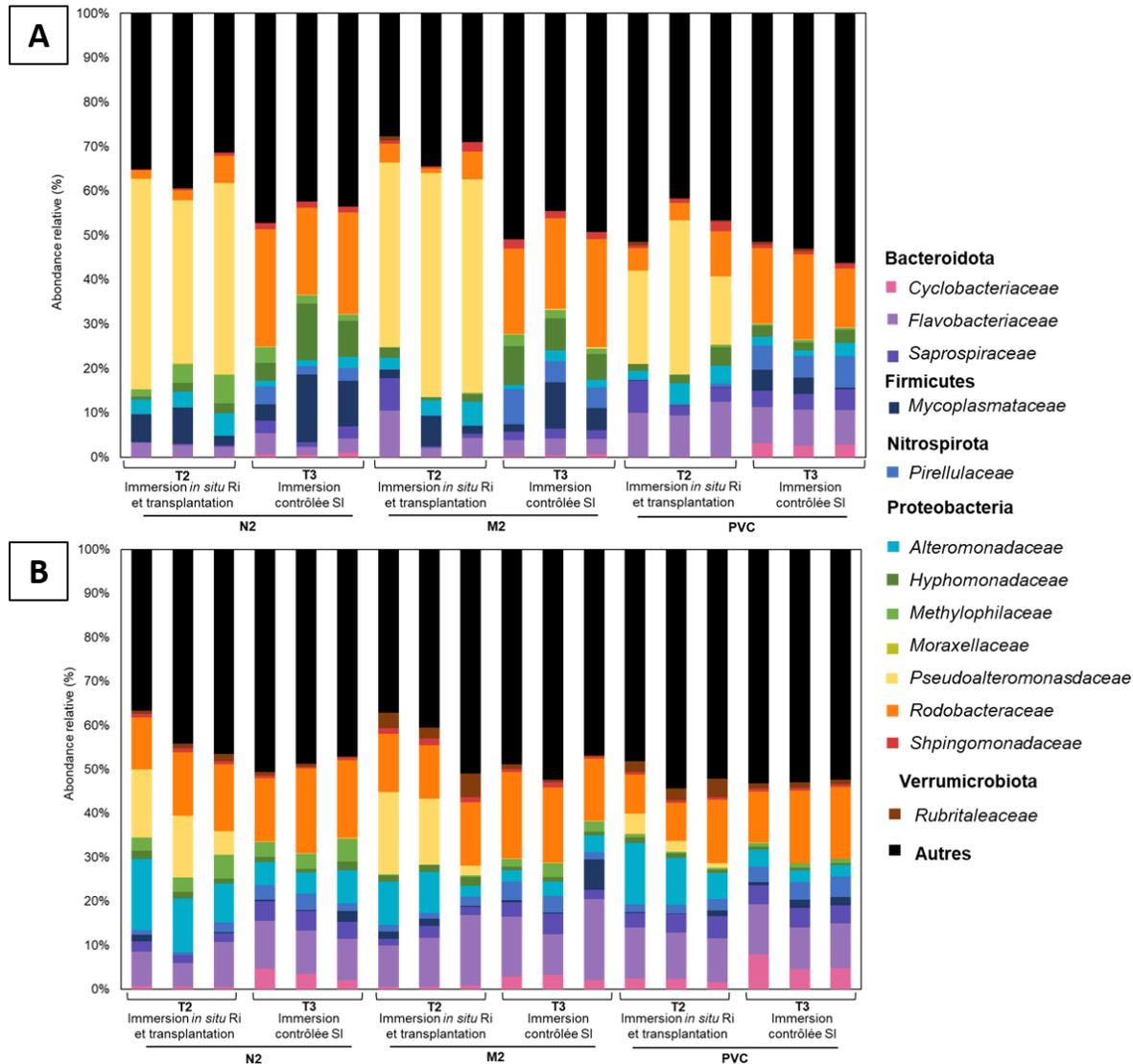


Figure 22. Abondance relative (%) des familles retrouvées au sein des ASV obtenus par séquençage Illumina de l'ADNr16S et après traitement sur DADA2. L'assignation taxonomique a été réalisée à partir de la base de données SILVA138. La diversité des communautés procaryotes des revêtements N2, M2 et PVC a été déterminée après transplantation et immersion contrôlée sur la transplantation Rimouski-Sept-Îles (A) et Sept-Îles-Rimouski (B). Les 13 familles bactériennes majoritaires sur l'ensemble des échantillons de biofilms sont représentées. Les autres familles et les séquences bactériennes dont l'assignation taxonomique a échoué sont dans le groupe Autres.

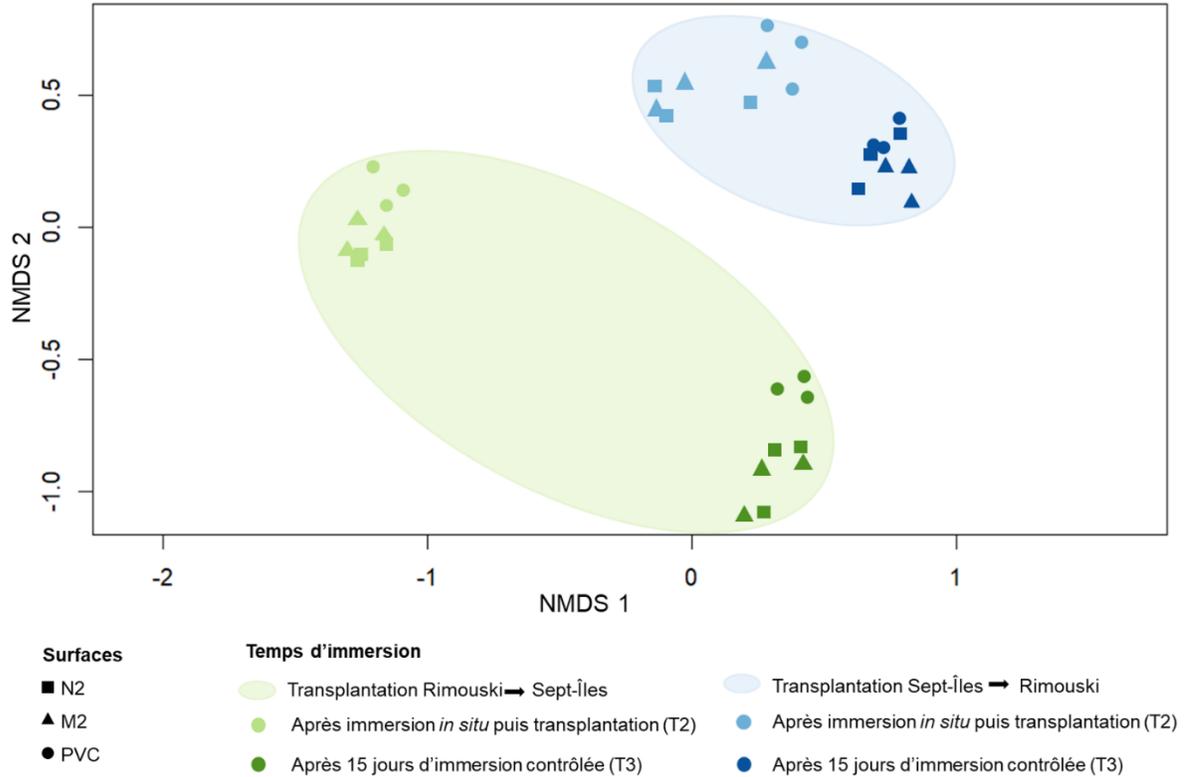


Figure 23. Représentation NMDS (Non-metric MultiDimensional Scaling) avec la distance de Bray-Curtis, appliqué aux échantillons de biofilms 16S des revêtements après transplantation (T2) et immersion contrôlée (T3) sur les différentes transplantations entre Rimouski et Sept-Îles

### 2.3.3.2 Diversité des espèces eucaryotes dans les biofilms

En moyenne, les indices de Shannon et de Chao1 mesurés sur les biofilms formés lors de la transplantation Rimouski-Sept-Îles (indice de diversité de Shannon = 2,8, indice de Chao1 = 375) étaient plus faibles que ceux des biofilms formés lors de la transplantation Sept-Îles-Rimouski (moyenne indice de diversité de Shannon = 4,6, indice de Chao1 = 1100, Figure 24). Les échantillons de biofilms issus de la transplantation Sept-Îles-Rimouski présentaient une plus grande richesse d'espèces eucaryotes dans leur composition que ce soit au niveau du supergroupe ou de la subdivision (Figure 25 et Figure 26). L'ensemble des échantillons des deux transplantations présentaient les deux mêmes supergroupes majoritaires : TSAR et Obazoa (Figure 25). Sur la transplantation Rimouski-Sept-Îles, l'abondance relative du supergroupe TSAR était comprise entre 30 et 97,2%, celle de Obazoa

entre 3,1 et 46,1% sur l'ensemble des échantillons (Figure 25A). Sur la transplantation Sept-Îles-Rimouski, l'abondance relative du supergroupe TSAR était comprise entre 40,2 et 88,4%, celle de Obozoa entre 6,5 et 68,6% sur l'ensemble des échantillons (Figure 25B). D'autres supergroupes ont été observés sur l'ensemble des échantillons de la transplantation Sept-Îles-Rimouski, dont Archeplastida (1,4 à 3,8%) et Haptista (0,1 à 3,1%, Figure 25B et Figure 26B). Au niveau des subdivisions, il a été retrouvé en majorité sur les deux transplantations Gyrista (Ri-SI : 8,3 à 81,5%, SI-Ri : 19,9 à 55,5%), Ciliophora (Ri-SI : 2 à 77%, SI-Ri : 1,5 à 32%) et Metazoa (Ri-SI : 2,4 à 66,6%, SI-Ri : 2,6 à 48,4%, Figure 26). Cercozoa (SI-Ri : 1,9 à 6,7%) et Bygira (SI-Ri : 1,8 à 17%) étaient communs également sur l'ensemble des deux transplantations, et en plus grandes proportions sur celle de Sept-Îles-Rimouski (Figure 26B). Une plus grande diversité de subdivisions a été observée dans l'ensemble des échantillons de la transplantation Sept-Îles-Rimouski, notamment dont les subdivisions Chlorophyta (< 1% à 5,1%) et Fungi (< 1%).

Lors de la transplantation Rimouski-Sept-Îles, une tendance à un contraste dans les valeurs d'indices de Shannon a été observée entre les biofilms récupérés sur PVC (indice de Shannon moyen = 3,3) et ceux des revêtements antifouling (indice de Shannon moyen = 2,8, Figure 24). Le supergroupe TSAR était majoritaire dans l'ensemble des biofilms formés sur les trois revêtements de la transplantation (En moyenne : N2 : 88,6% ; M2 : 69,6%, PVC : 81%, Figure 25A). Il en va de même avec le supergroupe Obazoa (En moyenne : N2 : 9,3%, M2 : 25,8%, PVC : 14,5%, Figure 25A). À T3, une faible augmentation des supergroupes Amoebozoa et Archaeplastida a été observée sur les témoins PVC (< 1%, Figure 25A). Les différences de composition des biofilms des trois revêtements étaient visibles au niveau des subdivisions entre les échantillons après l'immersion *in situ* à Rimouski puis transplantation (T2) et ceux après immersion contrôlée à Sept-Îles (T3, Figure 26A). Notamment, la subdivision Gyrista, majoritaire sur tous les revêtements à T2 (En moyenne : N2 : 63%, M2 : 48%, PVC : 71%), a diminué à T3 (En moyenne : N2 : 16,3%, M2 : 18,3%, PVC : 36,6%, Figure 26A). Au contraire, sur tous les revêtements confondus, la subdivision Ciliophora était inférieurs à 1 % à T2, et a augmenté à T3 (En moyenne : N2 : 70,6%, M2 : 58,3%, PVC : 31,6%, Figure 26B). De même, mais de manière moins marquée, la subdivision Cercozoa

qui était inférieure à 1% à T2, a augmenté également après immersion contrôlée à Sept-Îles (En moyenne : N2 : 1,2%, M2 : 1,2%, PVC : 3%, Figure 26B).

La diversité globale des biofilms formés sur les différents revêtements de la transplantation Sept-Îles-Rimouski était dans l'ensemble relativement stable d'après les indices de diversité de Shannon et de Chao1 (Figure 24). Une variation des abondances relatives n'a pas été observée que ce soit au niveau des supergroupes ou des subdivisions majoritaires entre les biofilms après transplantations (T2) et après immersion contrôlée à Rimouski (T3, Figure 25B et 26B).

Un test ANOSIM à facteurs combinés (type de revêtements, transplantation et temps d'échantillonnage) a été appliqué à ces données, montrant une séparation significative des échantillons de biofilms au niveau de la composition eucaryote selon les facteurs de l'étude ( $R = 0,9$ ,  $p\text{-value} < 0,05$ ). D'après la représentation graphique NMDS, il a été mis en évidence quatre groupes de biofilms distincts dont la composition est similaire (Figure 27). Les échantillons sont répartis selon le temps d'échantillonnage et la transplantation. Les échantillons de biofilms entre les deux temps d'échantillonnage de la transplantation Rimouski-Sept-Îles sont plus séparés spatialement que ceux de la transplantation Sept-Îles-Rimouski. Les biofilms formés sur les surfaces PVC lors de la transplantation Rimouski-Sept-Îles sont également plus éloignés du reste de leur groupe que ce soit après immersion *in situ* ou immersion contrôlée (Figure 27).

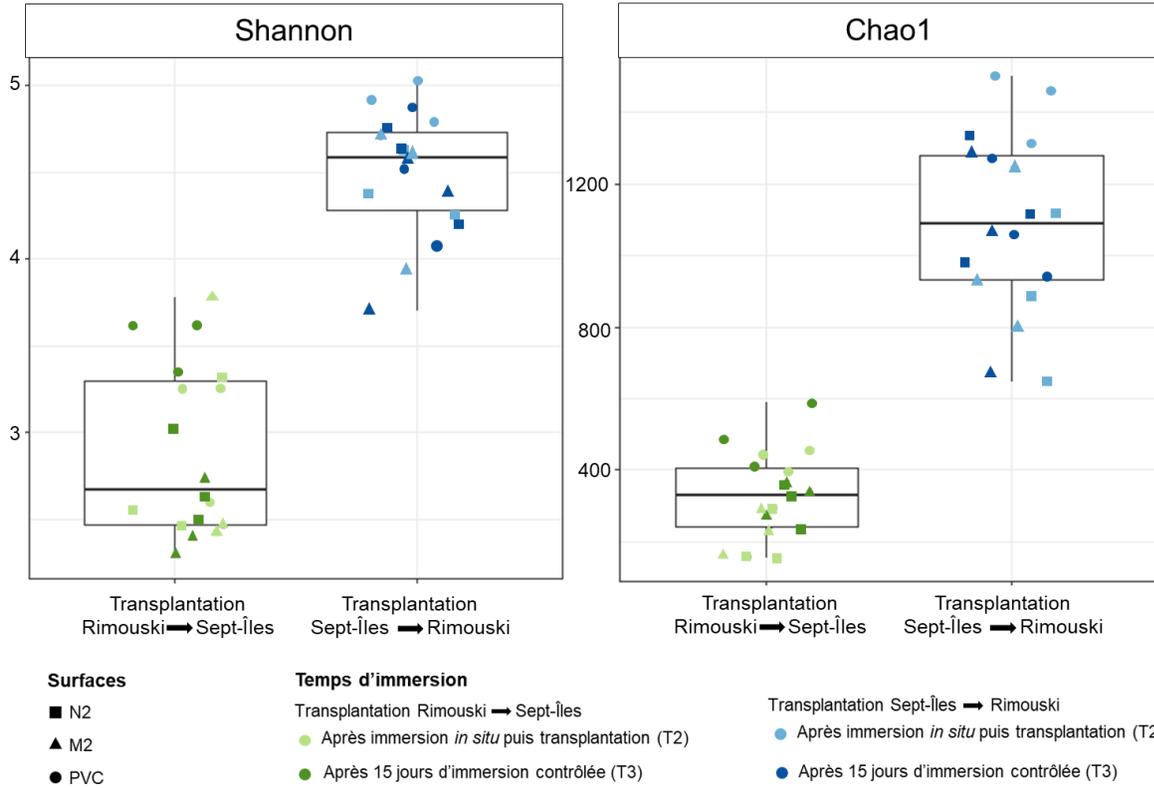


Figure 24. Indices de diversité de Shannon et de Chaos1 pour les espèces microbiennes (18S) composant les biofilms formés sur PVC et les revêtements N2 et M2 après transplantation et immersion contrôlée entre Rimouski et Sept-Îles.

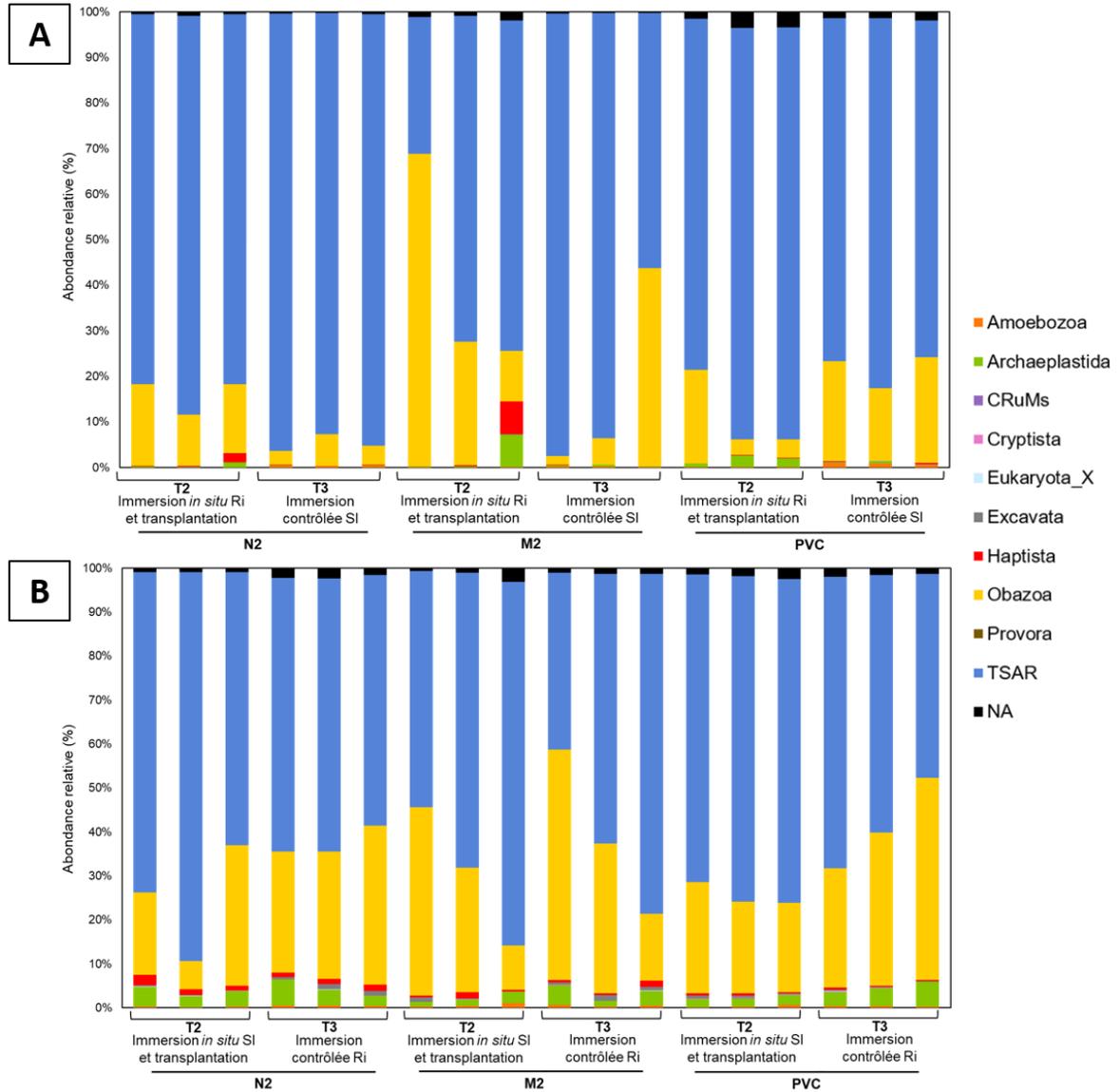


Figure 25. Abondance relative (%) des supergroupes retrouvés au sein des ASV obtenus par séquençage Illumina de l'ADNr18S et après traitement sur DADA2. L'assignation taxonomique a été réalisée à partir de la base de données PR<sup>2</sup>. La diversité des communautés eucaryotes des revêtements N2, M2 et PVC a été déterminée après transplantation et immersion contrôlée sur la transplantation Rimouski-Sept-Îles (A) et Sept-Îles-Rimouski (B). Le groupe NA représente les séquences eucaryotes dont l'assignation taxonomique a échoué.

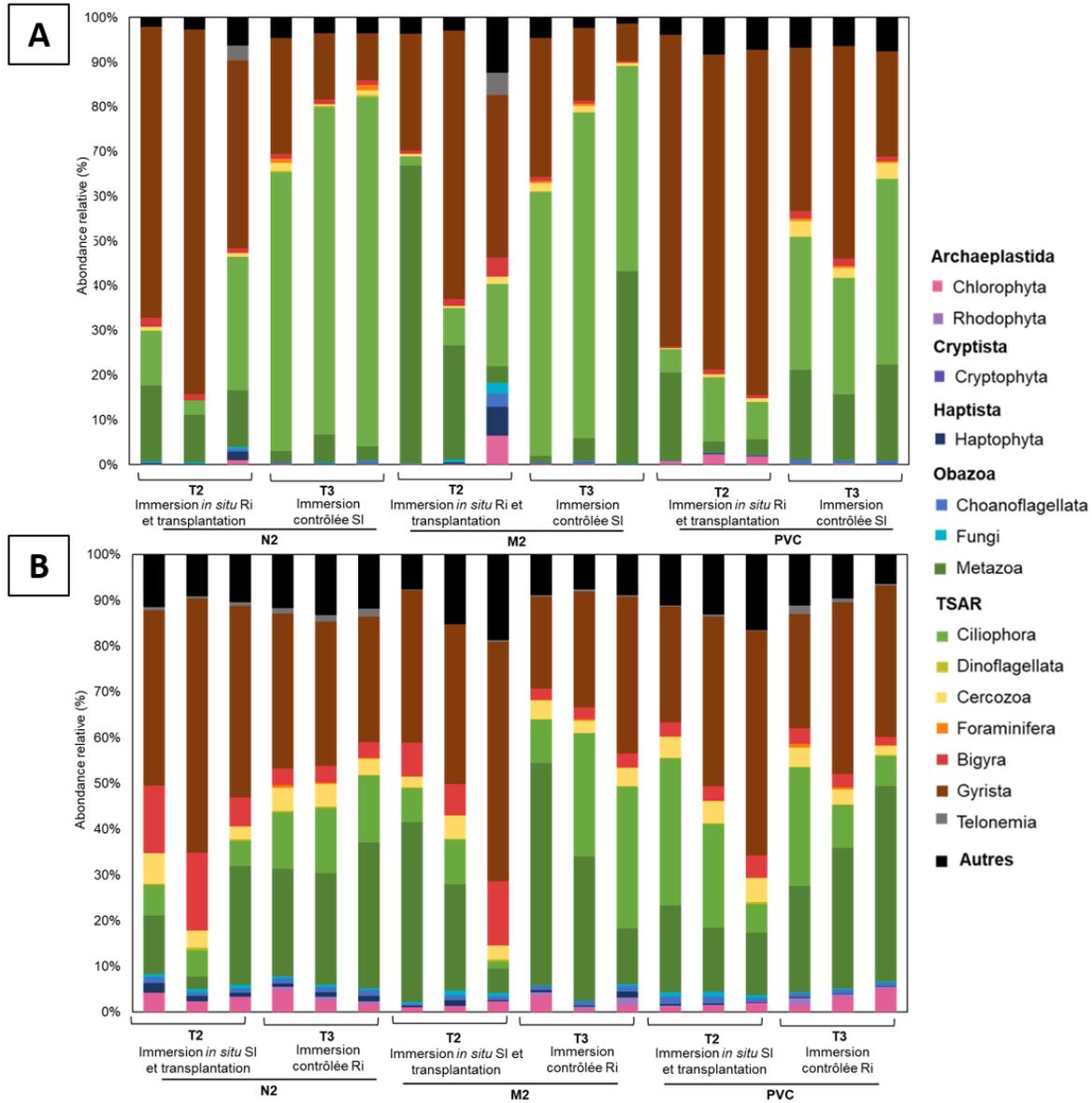


Figure 26. Abondance relative (%) des subdivisions retrouvées au sein des ASV obtenus par séquençage Illumina de l'ADNr18S et après traitement sur DADA2. L'assignation taxonomique a été réalisée à partir de la base de données PR<sup>2</sup>. La diversité des communautés eucaryotes des revêtements N2, M2 et PVC a été déterminée après transplantation et immersion contrôlée sur la transplantation Rimouski-Sept-Îles (A) et Sept-Îles-Rimouski (B). Les 13 subdivisions des organismes eucaryotes majoritaires dans l'ensemble des échantillons de biofilms sont représentées. Les autres subdivisions et séquences eucaryotes dont l'assignation taxonomique a échoué sont dans le groupe Autres.

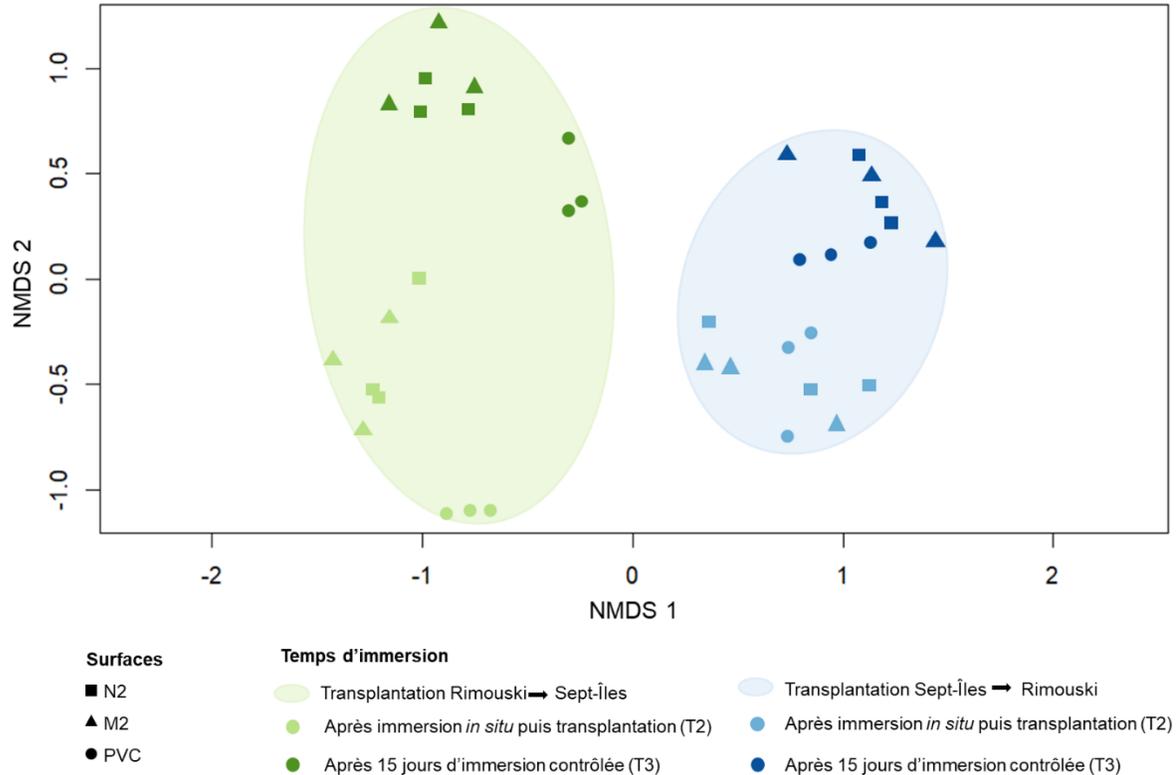


Figure 27. Représentation NMDS (Non-metric MultiDimensional Scaling) avec la distance de Jaccard, appliqué aux échantillons de biofilms 18S des revêtements après transplantation (T2) et immersion contrôlée (T3) sur les différentes transplantations entre Rimouski et Sept-Îles.

## 2.4 DISCUSSION

### 2.4.1 Caractérisation des sites d'immersions

#### 2.4.1.1 Abondance microbienne dans la colonne d'eau des sites d'immersion

Les bactéries High Nucleic Acid (HNA) sont des cellules présentant une forte concentration d'acide nucléique (Poulin 2008). Elles étaient majoritaires à la marina de Rimouski (79 à 83%), et également à Sept-Îles dans une moindre mesure (62 à 55%) au cours de l'immersion. La proportion de HNA dans les colonnes d'eau est influencée par différents facteurs environnementaux, en particulier les concentrations en azote et la biomasse de phytoplancton (Poulin 2008). Les immersions ont été réalisées durant la saison estivale sur

les sites, à la fin de la période de productivité primaire (bloom phytoplanctonique) à Rimouski, et au milieu de cette période à Sept-Îles (Dufour et Quillet 2007). Au début des immersions, les concentrations en nutriments, et les microorganismes autotrophes étaient plus abondantes à la marina de Rimouski qu'à Sept-Îles (Tableau 8 et Figure 15), influençant potentiellement la proportion de bactéries HNA retrouvées (Poulin 2008). Les bactéries Low Nucleic Acid (LNA), ayant une plus faible concentration d'acide nucléique, étaient en plus grande proportion à la marina de Sept-Îles comparativement à Rimouski. Ce sous-groupe bactérien aurait pu être favorisé dans des eaux moins productives, avec une plus faible disponibilité en azote tel qu'au site de Sept-Îles comparativement à Rimouski (Zubkov et al. 2001). Selon cette hypothèse, les bactéries HNA ne seraient pas nécessairement les plus actives à Sept-Îles, milieu ayant une plus faible disponibilité en nutriments qu'à Rimouski.

#### 2.4.1.2 Diversité microbienne des sites d'immersion

À Rimouski, en mi-juillet, le phylum Firmicutes était majoritaire dans la colonne d'eau (59,3%), dont les familles *Bacillaceae* et *Mycoplasmataceae*. Les bactéries appartenant aux *Bacillaceae* sont connues pour intervenir dans la dégradation de la matière organique, ou encore les cycles biogéochimiques des éléments nutritifs de l'environnement marin (Mandic-Mulec et al. 2015). Cependant, la présence des *Mycoplasmataceae* n'est pas encore bien connue dans les milieux marins (Razin et al. 1998). À la mi-août, une diminution de la majorité des phyla diversité a été observée sur le site de Rimouski, sauf le phylum Proteobacteria qui est redevenu prédominant (74,6%). Les Proteobacteria sont les plus répandues dans les environnements marins, où certaines espèces bactériennes de ce phylum sont impliquées dans différents processus biogéochimiques dans les océans ; tels que la dégradation de la matière organique par exemple (González et al. 2000). Concernant les communautés eucaryotes, le supergroupe Obazoa, regroupant les opisthokontes (animaux, champignons, autres unicellulaires) et également des flagellés hétérotrophes, était majoritaire dans la colonne d'eau de la marina de Rimouski tout au long de l'immersion (98,9 à 99,6%) (Burki et al. 2020).

À la marina de Sept-Îles, la proportion des différentes communautés procaryotes et eucaryotes était plus stable sur l'ensemble du mois d'immersion au mois d'août avec une dominance du phylum Proteobacteria (76,2 à 77,9%). Contrairement aux eaux de Rimouski, le phylum des Cyanobacteria était plus abondant dans les eaux de Sept-Îles (3,3 à 6,7%). De même, le supergroupe TSAR dont les eucaryotes phytoplanctoniques, était plus abondant dans la colonne d'eau de Sept-Îles qu'à Rimouski (19,2 à 36,5%). Il est possible que la forte période de productivité primaire durant l'immersion, couplée à une température anormalement élevée, ait influencé leur présence (Trombetta et al. 2019).

## **2.4.2 Formation de biofilm sur les différents revêtements**

### 2.4.2.1 Sur la transplantation Rimouski-Sept-Îles

#### a) *APRES IMMERSION IN SITU A RIMOUSKI*

Les abondances des microorganismes hétérotrophes et autotrophes retrouvées dans les biofilms formés sur les deux revêtements antifouling et les témoins PVC ne présentaient pas de différences significatives à la fin des immersion *in situ*. À Rimouski, le mouillage a été immergé pendant le mois de juin, supposément un mois après le premier bloom phytoplanctonique (Dufour *et al.* 2010). Il est possible que cette immersion tardive dans des eaux moins productives ait limité à une colonisation sur les différentes surfaces (Diaz Villanueva et al. 2011; Hellio et Yebra 2009). De plus, les conditions d'immersions statiques de cette étude n'ont pas permis de mettre en évidence l'efficacité fouling-release maximale des revêtements antifouling N2 et M2 sur les abondances des microorganismes hétérotrophes et autotrophes. Néanmoins, il est intéressant de remettre en contexte ces résultats, en vue d'une utilisation potentielle de ces revêtements antifouling dans la navigation de plaisance. Ces conditions statiques d'immersion simulent des bateaux de plaisance restant à quai pendant un mois durant la saison estivale au Québec. Ainsi, ces abondances de microorganismes hétérotrophes et autotrophes sur les revêtements antifouling dans notre

étude représenteraient le maximum de colonisation dans le cas où ils seraient appliqués sur un navire restant moins d'un mois à quai.

b) *APRES TRANSPLANTATION VERS SEPT-ÎLES*

Après transplantation à Sept-Îles, une légère diminution de l'abondance bactérienne a été observée sur les surfaces des revêtements antifouling. En effet, lors de la transplantation des plaques de revêtement entre les deux sites, l'utilisation de l'eau du site naturel d'immersion a permis de ne pas inclure d'autres facteurs d'influence, tels qu'un stress induit par le changement de la composition chimique du milieu. C'est uniquement le facteur physique du transport qui a été une source potentielle de stress, l'objectif étant de simuler l'hydrodynamisme des bateaux en mouvement. Le transport aurait ainsi favorisé le décrochement et donc une diminution des microorganismes hétérotrophes ayant adhéré sur la surface des FRC (Lejars et al. 2012). Cette diminution d'abondance des hétérotrophes observée n'était pas significative dans notre étude, mais il était néanmoins attendu de l'observer car les surfaces FRC ont une capacité d'auto-nettoyage suite à un stress hydrodynamique (Lejars et al. 2012). Cassé et Swain (2006) ont mis en évidence cette diminution d'abondance de microorganismes colonisant les surfaces de FRC exempt de biocides après une immersion dynamique. Les biofilms sont des systèmes dynamiques, dont la structure et la composition sont influencées par les changements environnementaux, ce qui expliquerait la diminution de microorganismes autotrophes sur le PVC (Salta et al. 2013). Un changement d'environnement implique également une modification de la communauté des espèces hétérotrophes et autotrophes du biofilm. Les microorganismes autotrophes étant recrutés sur la surface après l'adhésion des microorganismes hétérotrophes et la transplantation ayant été de courte durée, les espèces microbiennes autotrophes étaient moins abondantes sur la surface PVC (Salta *et al.* 2013).

Après transport jusqu'à Sept-Îles, la composition bactérienne n'était pas significativement différentes entre les biofilms formés sur les trois revêtements. De plus, l'ensemble des biofilms présentait une richesse et une répartition de la diversité bactérienne

sensiblement similaire. Ceci peut être expliqué du fait que les revêtements FRC expérimentaux sont dépourvus de produits biocides, n'empêchant donc pas totalement la colonisation naturelle des surfaces par les microorganismes pionnières dans la formation de biofilm (Lejars et al. 2012). En effet, les mêmes phyla majoritaires étaient ainsi retrouvés dans l'ensemble des biofilms : Proteobacteria, Bacteroidota et Cyanobacteria après transplantation. Les Proteobacteria et Bacteroidota sont des phyla connus pour être majoritaires dans les biofilms marins quelles que soient les conditions environnementales, et sont également pionniers dans la colonisation des surfaces immergées (Antunes et al. 2020; Dang et al. 2008; Jones et al. 2007; Liu et al. 2015b). Le phylum Cyanobacteria est retrouvé en fortes proportions au sein des biofilms dans les eaux de surfaces (Schnurr et Allen 2015). Le mouillage a été immergé à 1m de profondeur, durant la saison estivale où l'eau de surface est plus chaude, ce qui a possiblement favorisé la présence du phylum Cyanobacteria au sein des biofilms des différents revêtements. Il est toutefois possible que les FRC favorisent une sélection de communautés plus adhérentes sur leur surface, suite à leur effet fouling-release en diminuant l'abondance des microorganismes hétérotrophes. En effet, au sein des biofilms formés sur les revêtements antifouling N2 et M2, la famille des *Pseudoalteromonadaceae* (Proteobacteria) dont le genre *Pseudoalteromonas*, a été retrouvée en plus grande proportion qu'au sein des biofilms formés sur les témoins PVC après transplantation. Cette prédominance notable au sein des biofilms développés sur les FRC est possiblement liée à leur forte capacité d'adhérence sur les surfaces par la libération de divers biocomposés, et également par leur aptitude à la compétition pour l'acquisition en nutriments (Bowman 2007; Holmström et Kjelleberg 1999). De même, le phylum Firmicutes, plus précisément, la famille *Mycoplasmataceae* avec le genre *Mycoplasma* spp., a été retrouvée en plus grande proportion sur les revêtements antifouling N2 et M2 que sur le PVC après transplantation à Sept-Îles (T2). La présence de *Mycoplasma* spp. dans les biofilms marins est peu décrite dans la littérature (Razin et al. 1998). L'étude de Antunes et al. (2020), effectuée au Portugal suggère que la proximité du site d'étude avec des zones d'activités anthropiques pourrait expliquer la présence de ces bactéries dans les biofilms. La densité de la population québécoise le long des côtes de l'estuaire du Saint-Laurent combinée à la forte activité agricole de la région du

Bas-Saint-Laurent pourraient être à l'origine de la présence du genre *Mycoplasma* spp. dans nos biofilms (Plan d'action Saint-Laurent 2017). De plus, les bactéries du genre *Mycoplasma* spp. sont connues pour produire une grande quantité d'EPS, les rendant très compétitives et adhérentes sur les surfaces (Razin et al. 1998). Il se pourrait également que tout comme *Pseudoalteromonas* spp., leur plus forte proportion résulte de leur capacité à se maintenir sur la surface malgré l'efficacité des FRC à décrocher des bactéries suite au transport.

Concernant la composition de la communauté eucaryote des biofilms, aucune différence significative n'a été observée entre les revêtements. De plus, les indices de diversité estimés suggèrent une communauté peu riche en espèces et peu diversifiée. En effet, sur l'ensemble des trois revêtements, c'est le supergroupe TSAR (composé des groupes Telomenia, Stramenophila, Alveolata et Rhizaria) notamment la subdivision des Gyrista qui était majoritaire dans les biofilms (Burki et al. 2020). Au sein de cette subdivision, la classe *Bacillariophyceae*, était en grande proportion. Ces *Bacillariophyceae* sont des diatomées pennales souvent retrouvées dans les biofilms formés en eaux froides (Lürling et al. 2012). La forte proportion de diatomées mesurée sur la peinture N2 concorde avec les observations faites par microscopie confocale à balayage laser. Les analyses de diversité ont permis de montrer qu'au sein de ces biofilms formés après transplantation, la majorité des diatomées appartenait au genre *Haslea* spp. Les diatomées du genre *Amphora* spp. et *Navicula* spp. étaient également retrouvées en plus faible proportion sur les trois revêtements. L'étude de Pelletier et al. (2009) a déjà référencé la présence d'*Amphora* spp. et *Navicula* spp. au sein de biofilm formé sur une surface enduite d'un revêtement FRC sans biocides, suite à une immersion de plusieurs mois à Rimouski. Il est possible que l'effet fouling-release des revêtements ait favorisé le maintien de ces diatomées plus adhésives sur leurs surfaces durant le transport, la présence d'*Amphora* spp. ayant déjà été retrouvée sur une surface FRC après immersion dynamique (Cassé et Swain 2006).

### c) APRES IMMERSION CONTROLEE A SEPT-ÎLES

Après 15 jours d'immersion contrôlée à Sept-Îles, une augmentation quoique non significative de l'abondance de microorganismes hétérotrophes, a été observée notamment sur la surface PVC. Ceci suggère une possible recolonisation bactérienne par les microorganismes du milieu de Sept-Îles sur le biofilm déjà formé suite à l'immersion naturelle à Rimouski.

Les analyses statistiques de similarité (ANOSIM) de la diversité bactérienne montrent une différence de la composition des biofilms entre ceux après immersion contrôlée à Sept-Îles et ceux après immersion naturelle à Rimouski et transplantation. De plus, les indices de Shannon et de Chao1 de l'ensemble des biofilms ont également augmenté après immersion contrôlée à Sept-Îles, ce qui indique une plus grande richesse d'espèces bactériennes et une meilleure répartition de ces dernières dans les biofilms. Ainsi, la recolonisation des différents revêtements par les microorganismes de l'environnement de Sept-Îles après immersion contrôlée, a possiblement induit une diminution de la proportion de la famille *Pseudoalteromonadaceae* qui prédominait sur les trois revêtements après transplantation. Sur l'ensemble des biofilms formés sur tous revêtements confondus, une augmentation des phyla, Verrumicrobiota, Bdellovibrionota, Myxococcota et Desulfobacterota a également été observée après immersion contrôlée. Ces phyla sont composés de bactéries sulfato-réductrices, telles que Desulfobacterota, Myxococcota et Planctomycetota (Langwig et al. 2022; Muwawa et al. 2021; Wakai et al. 2022). Au sein du phylum Planctomycetota, les bactéries sulfato-réductrices de la famille *Pirellulaceae* ont été retrouvées (Muwawa et al. 2021). Les biofilms sont des systèmes dynamiques influencés par les paramètres environnementaux. Il est possible que les paramètres environnementaux de la baie de Sept-Îles aient favorisé un changement de la composition des biofilms de l'ensemble des revêtements après transfert. Des relevés environnementaux ont montré la présence de métaux traces dans la baie de Sept-Îles (Carrière 2018). L'évaluation de la qualité des eaux effectuée par l'Institut Nordique de Recherche en Environnement et en Santé du Travail (INREST) a notamment mis en évidence de fortes concentrations en métaux traces, notamment en

chrome, cuivre et zinc sur les sites d'échantillonnage (Carrière 2018). Il a déjà été démontré que les métaux traces retrouvés dans les environnements côtiers influençaient la composition du biofilm en faveur de bactéries pouvant métaboliser les métaux (Corcoll et al. 2018). La famille *Rodhobacteraceae* (Proteobacteria) était ainsi devenue majoritaire au sein des biofilms, et la proportion de la famille *Cyclobacteriaceae* (Bacteroidota) avait augmenté sur les trois revêtements après immersion contrôlée à Sept-Îles. Ces deux familles bactériennes sont souvent retrouvées dans des biofilms formés sur des surfaces métalliques et sont impliquées dans des processus de biocorrosion des surfaces (Moura et al. 2018; Shulga et al. 2022). Également, une augmentation de la famille *Shingomonadaceae* (Proteobacteria), des bactéries retrouvées dans des environnements contaminés par le cuivre, et résistantes aux métaux lourds a été observées sur l'ensemble des biofilms à T3 (Balkwill et al. 2006; Vilchez et al. 2007). Si ces résultats de diversité suggèrent une recolonisation sur tous les revêtements, les abondances de microorganismes hétérotrophes mesurées sur les FRC N2 et M2 sont restées plus faibles que celles observées sur les témoins PVC. Les revêtements seraient potentiellement efficaces pour limiter cette nouvelle colonisation bactérienne, sans pour autant empêcher le changement de la composition du biofilm.

Par ailleurs, les résultats de la diversité eucaryotes semblent montrer que ce changement de la communauté bactérienne aurait possiblement influencé celle des eucaryotes du biofilm. La proportion de Gyrista a diminué sur l'ensemble des revêtements après transplantation à Sept-Îles. Il est reconnu que les bactéries interagissent et influencent la composition des diatomées au sein d'un biofilm (Khandeparker et al. 2013; Patil et Anil 2005). De plus, les diatomées étant sensibles aux variations environnementales, telles que la luminosité, la disponibilité en nutriments ou encore la présence de contaminants (Falkowski et Raven 2013). Il est possible que les concentrations en métaux présent dans l'environnement ou hypothétiquement dans le film conditionneur, aient induit cette diminution en ne sélectionnant que les diatomées adaptées (Anderson et al. 2003). Au contraire, le supergroupe Ciliophora avait augmenté en abondance sur l'ensemble des biofilms après immersion contrôlée dans l'eau de Sept-Îles. Cette augmentation d'abondance pourrait être la conséquence d'un changement de diversité au sein du biofilm en faveur

d'organismes eucaryotes adaptés à l'environnement de Sept-Îles. En effet, les organismes composant le biofouling sont fortement influencés par le milieu environnant (Lejars et al. 2012).

#### 2.4.2.2 Transplantation Sept-Îles-Rimouski

##### a) *APRES IMMERSION IN SITU A SEPT-ÎLES*

Après un mois d'immersion à Sept-Îles, l'abondance de microorganismes hétérotrophes retrouvée sur la surface PVC présentait une faible différence significative avec celles des revêtements antifouling. De même, les abondances des microorganismes autotrophes mesurées sur l'ensemble des surfaces étaient relativement proches. La température de l'eau de surface mesurée à la marina de Sept-Îles durant le mois d'immersion en août 2022 était plus chaude que les normales de saisons, avec une moyenne de 18°C au lieu de 10°C (Carrière 2018). Cette augmentation de température aurait possiblement favorisé une plus forte productivité microbienne, et induit un fort phénomène de biofouling tel qu'observé sur l'ensemble des revêtements lors de la sortie du mouillage (Lejars et al. 2012). Cette forte colonisation, supérieure à ce qui était attendue, ne permet pas de montrer une efficacité des revêtements antifouling pour limiter l'abondance de microorganismes à coloniser la surface. De plus, il est à rappeler que le mouillage à Sept-Îles était également en conditions statiques, soit des conditions non optimales d'utilisation de ces revêtements.

##### b) *APRES TRANSPLANTATION A RIMOUSKI*

Après transplantation à Rimouski, l'abondance des microorganismes hétérotrophes a très peu varié sur les différents revêtements antifouling N2, M2 et le témoin PVC. Ceci suggère qu'il y aurait un maintien des communautés hétérotrophes sur les trois revêtements après transplantation. De plus, il semblerait que la capacité antifouling des revêtements pour favoriser le décrochage des microorganismes, tel qu'il a été observé sur la transplantation Rimouski-Sept-Îles, ne soit pas aussi efficace sur cette transplantation. Les mesures de

diversité n'ont pas montré de différence significative de la composition bactérienne entre les biofilms formés sur les trois revêtements après transplantation. Les indices de diversité suggèrent que les biofilms des différents revêtements présentent une grande richesse et une diversité d'espèces bactériennes élevée sur cette transplantation. Sur les trois revêtements, les bactéries sulfato-réductrices Bacteroidota, Desulfobacterota, Myxococcota et Planctomycetota étaient parmi les phyla majoritaires (Doghri et al. 2015; Langwig et al. 2022; Muwawa et al. 2021; Wakai et al. 2022). Comme énoncé dans la partie 2.4.2.1, la présence métaux traces retrouvée dans la baie de Sept-Îles a possiblement influencé la composition du biofilm des trois revêtements en faveur de bactéries ayant la capacité de métaboliser ces métaux (Carrière 2018; Corcoll et al. 2018). Il était notamment retrouvé dans l'ensemble des biofilms la famille *Rodhobacteraceae* (Proteobacteria), la famille *Cyclobacteriaceae* (Bacteroidota), et la famille des *Shingomonadaceae* (Proteobacteria), qui sont des bactéries associées à des processus de biocorrosion de surface ou retrouvées dans des milieux à fortes concentrations en métaux lourds (Balkwill et al. 2006; Moura et al. 2018; Shulga et al. 2022; Vilchez et al. 2007). De plus, l'immersion en milieu naturel à la marina de Sept-Îles s'est déroulée au cours d'un bloom phytoplanctonique, avec des températures plus élevées que les normales de saison (Carrière 2018). Cette condition a possiblement favorisé la plus grande proportion du phylum Planctomycetota, et de la famille *Flavobacteriaceae* (Bacteroidota), dans l'ensemble des biofilms après immersion naturel à Sept-Îles. Ces bactéries sont retrouvées lors des blooms phytoplanctoniques et dégradent les matériaux organiques provenant du phytoplancton, participant ainsi à la maturation du biofilm (Alejandre-Colomo et al. 2021; Buchan et al. 2014; Lage et Bondoso 2014).

De même que pour les procaryotes, l'ensemble des biofilms formés lors de la transplantation Sept-Îles-Rimouski présentaient une grande richesse et de diversité d'espèces eucaryotes. Le supergroupe Gyrista était majoritaire sur l'ensemble des biofilms formés sur les trois revêtements après transplantation, avec une plus grande diversité des classes de diatomées *Bacillariophyceae*, *Dictophyceae* et *Mediophyceae*. Les diatomées du genre *Achnantes* spp., *Licmophora* spp., *Navicula* spp., et *Nitzschia* spp. dominaient en abondance au sein des biofilms des trois revêtements. La présence de ces diatomées est connue sur les

surfaces métalliques, notamment sur des revêtements antifouling au cuivre (Anderson et al. 2003). La présence de ces diatomées serait potentiellement influencées par l'établissement d'un film conditionneur riche en métaux, lors de l'immersion en milieu naturelle à Sept-Îles.

c) *APRES IMMERSION CONTROLEE A RIMOUSKI*

Après 15 jours d'immersion contrôlée à Rimouski, l'abondance des microorganismes hétérotrophes a très peu varié sur l'ensemble des revêtements. Ainsi, les abondances des microorganismes hétérotrophes des trois revêtements sont restées constantes tout le long de la transplantation. Cela vient appuyer l'hypothèse selon laquelle il y aurait au sein des biofilms formés initialement à Sept-Îles une communauté bactérienne cohésive capable de se maintenir sur la surface après 15 jours d'immersion dans un environnement ayant des paramètres environnementaux différents de ceux du site d'origine. De plus, les indices de diversité sur l'ensemble des revêtements étaient en moyenne similaires à ceux calculés après transfert, ce qui indique un maintien de la richesse d'espèces bactériennes dans l'ensemble des biofilms formés.

Les analyses statistiques n'ont montré aucune différence significative dans la composition des communautés bactériennes entre les différents revêtements. Les mêmes phyla majoritaires tels que Proteobacteria, Bacteroidota, Cyanobacteria, Planctomycetota, Verrumicrobiota, Desulfobacterota et Bdellovibrionota étaient retrouvés dans l'ensemble des biofilms. Une hypothèse expliquant le maintien de ces communautés sur la surface des trois revêtements serait que les communautés de Sept-Îles possèderaient des stratégies d'adaptation pour se maintenir dans un nouvel environnement. En effet, les communautés bactériennes de Sept-Îles proviennent d'un environnement particulier, avec de fortes concentrations en métaux et dont les températures sont en générale plus basse que sur le site de Rimouski. Pour survivre dans de tels environnements, il est nécessaire pour les bactéries de développer ou posséder des stratégies adaptatives telles que la capacité de métaboliser les métaux (Yin et al. 2019). Une autre stratégie connue chez les bactéries adaptées aux fortes concentrations de métaux est l'augmentation de production de substance exopolysaccharide

(EPS). Les EPS sécrétées permettent de créer des liaisons avec les composés métalliques de l'environnement et ainsi former une barrière de protection pour la bactérie (Mathivanan et al. 2021). De plus, les EPS jouent un rôle important pour l'adhésion des bactéries et autres microorganismes sur la surface immergée, et participent grandement à la croissance du biofilm (O'Toole et al. 2000; Stoodley et al. 2002). Les espèces bactériennes composant le biofilm issu de l'immersion à Sept-Îles possèderaient la capacité de forte production d'EPS en réponse aux concentrations de métaux du milieu initial. Ainsi, elles seraient fortement liées à la surface au point de continuer à la coloniser au bout de 15 jours d'immersion dans un nouvel environnement.

Une faible diminution de l'abondance des microorganismes autotrophes a été observée après 15 jours d'immersion contrôlée sur les revêtements antifouling. Le changement d'environnement en plus de l'activité fouling-release de ces revêtements ont peut-être impacté l'adhésion des microorganismes autotrophes en termes d'abondance. Cependant, peu de variation de la composition des espèces eucaryotes a été observée de manière générale sur l'ensemble des revêtements. Ce sont notamment les diatomées de la classe *Bacillariophyceae* qui étaient présentes en plus grande proportion dans l'ensemble des biofilms après immersion contrôlée, dont notamment les genres *Achnantes* spp., *Licmophora* spp., *Navicula* spp., et *Nitzchia* spp. déjà retrouvés juste après transplantation sur l'ensemble des biofilms. Elles sont connues pour avoir une bonne adhérence sur les surfaces, et ont été référencées dans la littérature pour faire partie des microorganismes formant des biofilms problématiques à grande échelle (Molino et Wetherbee 2008). La communauté bactérienne cohésive, couplée aux diatomées fortement adhérentes sur les différents revêtements, a possiblement favorisé le maintien des autres organismes eucaryotes, et donc de l'ensemble du biofouling sur la surface dans un nouvel environnement (Salta et al. 2013).

### **2.4.3 Risque de transfert par l'utilisation de nouveaux revêtements antifouling**

Les résultats d'abondance et de diversité procaryotes semblent suggérer qu'il existerait un risque de transfert d'espèces microbiennes par l'utilisation de nouveaux revêtements

antifouling entre les sites de Rimouski et de Sept-Îles, tous deux appartenant au même système estuaire et golfe du Saint-Laurent. Ces sites des caractéristiques environnementales différentes, notamment en termes de concentrations de métaux traces dans la colonne d'eau qui seraient à l'origine de ce risque (Carrière 2018).

Dans un contexte où un bateau de plaisance ayant passé un mois à quai à Rimouski, se rend à Sept-Îles et reste 15 jours à quai, le biofilm formé ne semble pas persister sur la surface sur l'ensemble des revêtements. Ce sont les microorganismes de l'environnement de Sept-Îles, caractéristiques à ce milieu, qui colonisent à nouveau les surfaces des revêtements. Il est possible que les microorganismes composant le biofilm formé à Rimouski ne soient pas adaptés pour survivre dans le nouvel environnement de Sept-Îles. Pour survivre à un environnement riche en métaux, les bactéries ont en effet besoin de développer des stratégies adaptatives, comme par exemple une acclimatation métabolique (Yin et al. 2019). Les microorganismes de Sept-Îles semblent posséder un fort pouvoir adhérent pour se fixer sur une surface déjà colonisée par un biofilm. Toutefois, les revêtements semblent efficaces pour limiter cette recolonisation en terme d'abondance au bout de 15 jours en conditions statiques, dans les pires conditions d'immersion.

Ce risque de transfert d'espèces microbiennes allochtones potentiellement invasive avec l'utilisation de ces FRC expérimentaux serait à sens unique, lors d'une navigation de Sept-Îles vers Rimouski. Les microorganismes procaryotes composant le biofilm formé à Sept-Îles semblent posséder un fort pouvoir adhérent sur la surface, possiblement lié à leur adaptation pour survivre dans leur environnement initial, et leur permettant ainsi de continuer à coloniser leur surface dans un nouveau milieu (Anderson et al. 2003; Yin et al. 2019). Une hypothèse serait que les bactéries ayant une forte adaptation environnementale, serait plus apte à survivre dans de nouveaux milieux lors d'un transfert. Dans le cas des bactéries de Sept-Îles, cette adaptation serait potentiellement leur capacité à produire beaucoup d'EPS, et ainsi être fortement adhérente sur la surface (O'Toole et al. 2000; Stoodley et al. 2002). Cette particularité, couplée au trafic maritime intense présent dans le port de Sept-Îles, pourrait potentiellement favoriser un risque de propagation dans le cas où des microorganismes

présenteraient un potentiel invasif lié à leurs adaptations. En effet, la mondialisation du transport maritime combinée à la colonisation biologique des coques de navires sont susceptibles de favoriser le phénomène d'invasion d'espèces en permettant le transfert d'espèces vers de nouvelles destinations (Piola et al. 2009). De plus, le risque de transfert d'espèces invasives chez les microorganismes constituant les biofilms est encore peu caractérisé (Sweat et al. 2017). Avec le réchauffement climatique favorisant l'expansion biologique vers les pôles géographiques, de nouveaux biotopes sont susceptibles de devenir propices à l'établissement de certaines espèces envahissantes, tels que l'estuaire du Saint-Laurent (Parmesan et Yohe 2003). Dans ce contexte de changement climatique, la persistance du biofilm formé sur les FRC couplé à ce fort trafic à Sept-Îles pourrait amplifier ce risque de transfert d'espèces potentiellement invasives par l'utilisation de nouveaux revêtements antifouling (Anderson et al. 2003).

## **2.5 CONCLUSIONS**

Les analyses d'abondance et de diversité microbienne ont permis tout d'abord de caractériser et de comparer les biofilms formés sur les revêtements FRC et les témoins PVC, au cours des deux transplantations. De manière générale au cours de notre étude, peu de différences ont été observées entre les biofilms formés sur les revêtements FRC et le témoin PVC, que ce soit en termes d'abondance ou de diversité microbienne. Si les conditions statiques de l'étude n'ont pas permis de valoriser l'efficacité des FRC, les résultats de l'étude ont permis d'émettre des hypothèses quant à la capacité de sélection de communautés adhérentes sur les surfaces des FRC après transfert.

Une comparaison de la composition du biofilm des différents revêtements a ensuite été effectuée au cours des deux transplantations entre les sites. Il est intéressant de constater qu'il a été possible d'observer entre les sites des différences au niveau du phyla et des familles microbiennes, que ce soit au niveau des procaryotes et des eucaryotes, sans pour autant se rendre jusqu'à l'espèce. Ceci peut sous-entendre une différence importante entre les biofilms formés sur les revêtements à Rimouski et ceux de Sept-Îles, possiblement influencée par la

différence de concentrations en métaux dans la colonne d'eau entre les deux sites. Après immersion naturelle et contrôlée à Sept-Îles, les biofilms des différents revêtements étaient majoritairement composés de bactéries sulfato-réductrices.

Enfin, le risque de transfert d'espèces microbiennes allochtones potentiellement invasives par l'utilisation de nouveaux FRC a ensuite été évalué entre les marinas de Rimouski et de Sept-Îles. Dans le cas d'une navigation allant de Rimouski à Sept-Îles, les résultats suggèrent que ce risque serait limité. Le biofilm formé à Rimouski ne semble pas être adapté à survivre dans les conditions environnementales de Sept-Îles, quel que soit le revêtement utilisé. Les microorganismes de l'environnement de Sept-Îles, colonisent à nouveau les différentes surfaces des revêtements déjà colonisée par un biofilm. Mais au bout de 15 jours, les revêtements semblent efficaces pour limiter cette recolonisation en terme d'abondance durant une immersion statique, c'est-à-dire les pires conditions d'immersion. Cependant, il y aurait potentiellement un risque de transfert d'espèces microbiennes allochtones avec l'utilisation de ces FRC expérimentaux lors d'une navigation de Sept-Îles vers Rimouski. Les microorganismes procaryotes composant le biofilm formé à Sept-Îles semblent posséder un fort pouvoir adhérent sur la surface, leur permettant de continuer à coloniser leur surface dans un nouveau milieu. Avec le fort trafic maritime du port de Sept-Îles, cette particularité du biofilm pourrait potentiellement favoriser un risque de propagation dans le cas où des microorganismes présenteraient un potentiel invasif. Il semble donc nécessaire de faire des études plus approfondies pour identifier les microorganismes pouvant être transmis pour l'utilisation de ces revêtements et définir leur un potentiel invasif.

Ainsi, les résultats de notre étude mettent en lumière la complexité de l'évaluation du risque de transfert d'espèces microbiennes allochtones potentiellement invasives par l'utilisation de revêtements exempts de produits biocides. Ce risque peut être dans un sens de navigation précis, mais également entre sites d'un même système, tel qu'observé au niveau de l'estuaire et golfe du Saint-Laurent de notre étude. Des études approfondies de ce risque lié à l'utilisation des revêtements de nouvelle génération sont à développer dans une optique de leur potentielle commercialisation et utilisation dans la navigation.



## CONCLUSION GÉNÉRALE

Ce projet de Maitrise est le fruit de la collaboration France-Québec dans le secteur maritime financé conjointement par ANR et FRQNT. La volonté de ce projet PAINTS est de développer des revêtements sans biocides efficaces répondant aux normes environnementales, et d'évaluer leur potentiel d'utilisation dans des environnements marins contrastés. L'objectif à long terme étant de mettre en place de nouveaux comportements respectueux de l'environnement dans une optique de transition socio-écologique de la navigation maritime à l'échelle globale. Ainsi, les études de l'efficacité et le risque de transfert d'espèces microbiennes allochtones potentiellement invasives ont également été réalisés sur les sites partenaires du projet (Lorient, Toulon, la Réunion), présentant des conditions environnementales différentes du Québec (tempéré et tropical).

Le premier objectif de ce projet de maîtrise était de déterminer l'efficacité de nouveaux revêtements antifouling exempts de produits biocides dans un milieu estuarien froid. Une immersion de six mois en milieu naturel à Rimouski a permis de montrer l'efficacité de deux de ces revêtements, malgré les conditions statiques d'immersion. Selon nos résultats, une seule application de ces deux revêtements a été aussi efficace que le revêtement commercial pour limiter la formation de biofouling sur un bateau restant à quai au cours de la saison estivale. L'utilisation de ce nouveau type de revêtement pourrait être suffisamment efficace pour limiter la formation de biofouling dans des milieux où la colonisation de surface immergée est moins prononcée. Cependant, le coût de ces nouveaux revêtements, jusqu'à quatre fois supérieur aux revêtements classiques, pourrait représenter un frein à leur utilisation pour la population.

Afin d'approfondir cette étude en milieux froids, il serait intéressant de réaliser à nouveau des tests d'immersion en milieu naturel de ces revêtements, mais en condition dynamique au lieu de statique. Ceci permettrait d'explorer plus en détail l'efficacité de ce type de revêtement en milieu froid, tout en simulant des navigations de longues durées telles que la navigation maritime.

Le deuxième objectif était de caractériser le microfouling formé sur les revêtements FRC expérimentaux et un témoin PVC, puis d'évaluer le risque de transfert d'espèces microbiennes allochtones par leur utilisation. Pour ce faire, une approche combinant l'analyse de l'abondance et de la diversité des biofilms formés sur les revêtements a été utilisée, accompagnée d'un processus de transplantation entre Rimouski et Sept-Îles. Dans notre étude, les conditions d'immersion n'ont pas permis de montrer l'efficacité des revêtements pour limiter l'abondance des espèces microbiennes hétérotrophes et autotrophes, en comparaison du témoin PVC lors des transplantations. Cependant, ces résultats couplés à ceux de diversité ont permis de nuancer l'interprétation. Les résultats de diversité ont permis de mettre en évidence des changements de la composition du microfouling sur l'ensemble des revêtements au cours des transplantations. Aucune différence majeure n'a été retrouvée dans la composition du microfouling entre les trois revêtements. Il y aurait cependant une tendance des FRC à sélectionner des communautés plus adhérentes sur leurs surfaces lors de l'étape du transfert vers le site receveur, et ainsi représenter un risque de transfert d'espèces invasives. Les deux analyses ont permis de mettre en évidence que le risque de transfert d'espèces microbiennes allochtones potentiellement invasives est différent selon le sens de transfert entre les sites, malgré leur proximité au sein du Saint-Laurent. Le risque serait minime dans le cas d'une navigation de Rimouski vers Sept-Îles, les biofilms formés initialement ne s'étant pas maintenus sur les surfaces après 15 jours d'immersion contrôlée à Sept-Îles. En revanche, dans le cas d'une navigation de Sept-Îles vers Rimouski, les communautés microbiennes composant les biofilms sur les revêtements antifouling présenteraient une forte adaptation face aux changements de conditions environnementales, en plus d'une forte capacité d'adhésion sur les surfaces. Le maintien de cette communauté microbienne pourrait ainsi potentiellement induire celui du macrofouling et ainsi favoriser un risque de transfert d'espèces potentiellement invasives. Ces résultats soulignent l'importance de continuer de coupler ces deux types d'analyses pour une meilleure compréhension de la dynamique des biofilms sur les surfaces immergées à la suite des variations environnementales. Toutefois, une limite de notre étude est que les analyses d'abondance et de diversité ont été réalisées sur des biofilms différents entre les deux

analyses, et non sur un biofilm formé sur un même coupon. Les biofilms étant des systèmes dynamiques, une forte variabilité en termes d'abondance et de diversité a été observée au sein de notre étude entre les triplicatas. Ainsi, une amélioration de cette étude serait de réaliser ce même type d'expérience, mais en réalisant les analyses d'abondance et de diversité sur des échantillons provenant du même biofilm.

Cette étude a permis de mettre en évidence la difficulté de développer de nouveaux revêtements sans biocides efficaces dans des milieux contrastés. Les résultats du risque de transfert ont notamment permis de montrer que la dynamique et le maintien du microfouling sur les surfaces était différent selon le sens de transplantation, même au sein d'un même environnement tel que le système estuaire golfe du Saint-Laurent. Il est nécessaire à l'avenir de poursuivre ce type d'étude en couplant les analyses de diversité et d'abondance au sein des biofilms et du biofouling, afin d'améliorer notre compréhension de la formation et la dynamique des biofilms/biofouling formés sur des surfaces immergées, suite aux variations environnementales. Ceci permettant, sur le long terme, de mieux prévenir le risque de transfert d'espèces invasives par l'utilisation de nouveaux revêtements plus respectueux de l'environnement, potentiellement à l'échelle mondiale.



## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abe, Y., Polyakov, P., Skali-Lami, S., and Francius, G. 2011. Elasticity and physico-chemical properties during drinking water biofilm formation. *Biofouling* 27: 739-750.
- Alejandre-Colomo, C., Francis, B., Viver, T., Harder, J., Fuchs, B. M., Rossello-Mora, R., and Amann, R. 2021. Cultivable *Winogradskyella* species are genomically distinct from the sympatric abundant candidate species. *ISME Commun* 1: 51.
- Amara, I, Miled, W, Slama, R.B, and Ladhari, N. 2018. Antifouling processes and toxicity effects of antifouling paints on marine environment. A review. *Environmental toxicology and pharmacology* 57: 115-130.
- Anderson, C.; Altar, M.; Callow, M.; Candries, M.; Milne, A.; and Townsin, R. 2003. The development of foul-release coatings for seagoing vessels. In *Proceedings of the Institute of Marine Engineering, Sciences and Technology. Part B, Journal of Marine Design and Operations* B4: 11-23.
- Antizar-Ladislao, B. 2008. Environmental levels, toxicity and human exposure to tributyltin (TBT)-contaminated marine environment. a review. *b\_antizar@hotmail.com. Environment international* 34: 292-308.
- Antunes, J. T., Sousa, A. G. G., Azevedo, J., Rego, A., Leao, P. N., and Vasconcelos, V. 2020. Distinct Temporal Succession of Bacterial Communities in Early Marine Biofilms in a Portuguese Atlantic Port. *Front Microbiol* 11: 1938.
- Araújo, Carlos A. S., Belzile, Claude, Tremblay, Jean-Éric, and Bélanger, Simon. 2022. Environmental niches and seasonal succession of phytoplankton assemblages in a subarctic coastal bay: Applications to remote sensing estimates. *Frontiers in Marine Science* 9.
- Bailey, S.A, Brown, L, Campbell, M.L, Canning-Clode, J, Carlton, James T, Castro, N, Chainho, P, Chan, F.T, Creed, J.C, and Curd, A. 2020. Trends in the detection of aquatic non-indigenous species across global marine, estuarine and freshwater ecosystems: A 50-year perspective. *Diversity and Distributions* 26: 1780-1797.
- Bakker, D.P, Busscher, H.J, van Zanten, J, de Vries, J, Klijnstra, J.W, and van der Mei, H.C. 2004. Multiple linear regression analysis of bacterial deposition to polyurethane coatings after conditioning film formation in the marine environment. *Microbiology* 150: 1779-1784.
- Balkwill, D.L.; Fredrickson, J.K.; and Romine, M.F. . 2006. *Sphingomonas* and related genera, p. 605-629. *The Prokaryotes*. Springer, New York, NY.
- Battin, T. J., Kaplan, L. A., Newbold, J. D., Cheng, X., and Hansen, C. 2003. Effects of current velocity on the nascent architecture of stream microbial biofilms. *Appl Environ Microbiol* 69: 5443-5452.
- Beech, I.B., Sunner, J.A., and Hiraoka, K. 2005. Microbe-surface interactions in biofouling and biocorrosion processes. *International microbiology* 8: 157-168.
- Belzile, C., Brugel, S., Nozais, C., Gratton, Y., and Demers, S. 2008. Variations of the abundance and nucleic acid content of heterotrophic bacteria in Beaufort Shelf waters during winter and spring. *Journal of Marine Systems* 74: 946-956.

- Berne, C., Ducret, A., Hardy, G. G., and Brun, Y. V. 2015. Adhesins involved in attachment to abiotic surfaces by Gram-negative bacteria. *Microbial biofilms*: 163-199.
- Bhosle, N. B. 2004. Chemical and molecular characterization of biofilm on metal surfaces. National Institute of Oceanography, Goa.
- Bowman, J. P. 2007. Bioactive Compound Synthetic Capacity and Ecological Significance of Marine Bacterial Genus *Pseudoalteromonas*. *Mar. Drugs* 5: 220-241.
- Buchan, A., LeCleir, G. R., Gulvik, C. A., and Gonzalez, J. M. 2014. Master recyclers: features and functions of bacteria associated with phytoplankton blooms. *Nat Rev Microbiol* 12: 686-698.
- Burki, F., Roger, A. J., Brown, M. W., and Simpson, A. G. B. 2020. The New Tree of Eukaryotes. *Trends Ecol Evol* 35: 43-55.
- Callahan, B. J., Wong, J., Heiner, C., Oh, S., Theriot, C. M., Gulati, A. S., McGill, S. K., and Dougherty, M. K. 2019. High-throughput amplicon sequencing of the full-length 16S rRNA gene with single-nucleotide resolution. *Nucleic Acids Res* 47: e103.
- Callahan, B.J, McMurdie, P.J, Rosen, M.J, Han, A.W, Johnson, A.J, and Holmes, S.P. 2016. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods* 13: 581-583.
- Callow, M.E, and Callow, J.A. 2002. Marine biofouling: a sticky problem. *Biologist* 49: 1-5.
- Camps, M., Barani, A., Gregori, G., Bouchez, A., Le Berre, B., Bressy, C., Blache, Y., and Briand, J. F. 2014. Antifouling coatings influence both abundance and community structure of colonizing biofilms: a case study in the Northwestern Mediterranean Sea. *Appl Environ Microbiol* 80: 4821-4831.
- Carrière, J. 2018. Observatoire Environnemental de la baie de Sept-Îles. Institut Nordique de Recherche en Environnement et en Santé au Travail.
- Cassé, Franck, and Swain, Geoffrey W. 2006. The development of microfouling on four commercial antifouling coatings under static and dynamic immersion. *International Biodeterioration & Biodegradation* 57: 179-185.
- CCFAM, Canadian Council of Fisheries and Aquaculture. 2004. A Canadian action plan to address the threat of aquatic invasives species.
- Chan, F.T, Ogilvie, D, Sylvester, F, and Bailey, S.A. 2022. Ship biofouling as a vector for non-indigenous aquatic species to Canadian arctic coastal ecosystems: A survey and modeling-based assessment. *Frontiers in Marine Science* 9: 808055.
- Chao, A. 1984. Nonparametric estimation of the number of classes in a population. *Scandinavian Journal of Statistics*: 265-270.
- Chion, C., Turgeon, S., Cantin, G., Michaud, R., Ménard, N., Lesage, V., Parrott, L., Beaufils, P., Clermont, Y., and Gravel, C. 2018. A voluntary conservation agreement reduces the risks of lethal collisions between ships and whales in the St. Lawrence Estuary (Québec, Canada): From co-construction to monitoring compliance and assessing effectiveness. *PLoS One* 13: e0202560.
- Clarke, K. R. 1993. Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. *Australian Journal of Ecology* 18: 117-143.
- Conrad, J.C. 2012. Physics of bacterial near-surface motility using flagella and type IV pili : Implications for biofilm formation. *Research in Microbiology* 163: 619-629.

- Conseil du Saint-Laurent. 2017. Les espèces aquatiques envahissantes - Plan de Gestion Intégrée Régional du Conseil du Sain-Laurent.
- Corcoll, N., Yang, J., Backhaus, T., Zhang, X., and Eriksson, K. M. 2018. Copper Affects Composition and Functioning of Microbial Communities in Marine Biofilms at Environmentally Relevant Concentrations. *Front Microbiol* 9: 3248.
- Dafforn, K.A, Lewis, J.A, and Johnston, E.L. 2011. Antifouling strategies: History and regulation, ecological impacts and mitigation. *Marine pollution bulletin* 62: 453-465.
- Dang, H., Li, T., Chen, M., and Huang, G. 2008. Cross-ocean distribution of Rhodobacterales bacteria as primary surface colonizers in temperate coastal marine waters. *Appl Environ Microbiol* 74: 52-60.
- Darbyson, E., Locke, A., Hanson, J.M., and Willison, J.M. 2009. Marine boating habits and the potential for spread of invasive species in the Gulf of St. Lawrence. *Aquatic Invasions* 4: 87-94.
- Debroas, D., Mone, A., and Ter Halle, A. 2017. Plastics in the North Atlantic garbage patch: A boat-microbe for hitchhikers and plastic degraders. *Sci Total Environ* 599-600: 1222-1232.
- Demirel, Y.K, Turan, O, and Incecik, A. 2017. Predicting the effect of biofouling on ship resistance using CFD. *Applied ocean research* 62: 100-118.
- Desjardins, C., and canadien de consultation Scientifique, Secrétariat. 2018. Évaluation de la vulnérabilité de composantes biologiques du Saint-Laurent aux déversements d'hydrocarbures provenant de navires. *Pêches et océans Canada, Secrétariat canadien de consultation scientifique.*
- Diagne, C, Leroy, B, Vaissière, A-C, Gozlan, R.E, Roiz, D, Jarić, I, Salles, J-M, Bradshaw, C.JA, and Courchamp, F. 2021. High and rising economic costs of biological invasions worldwide. *Nature* 592: 571-576.
- Diaz Villanueva, V., Font, J., Schwartz, T., and Romani, A. M. 2011. Biofilm formation at warming temperature: acceleration of microbial colonization and microbial interactive effects. *Biofouling* 27: 59-71.
- Doghri, I., Rodrigues, S., Bazire, A., Dufour, A., Akbar, D., Sopena, V., Sable, S., and Lanneluc, I. 2015. Marine bacteria from the French Atlantic coast displaying high forming-biofilm abilities and different biofilm 3D architectures. *BMC Microbiol* 15: 231.
- Dohler, G. 2007. Les marées dans les eaux du Canada. Service hydrographique du Canada. Ministère des Pêches et des Océans.
- Donlan, R.M. 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging infectious diseases* 8: 881.
- Drake, D. A. R., Bradie, J. N., Ogilvie, D., Casas-Monroy, O., and Bailey, S.A. . 2020. Efficacité de l'échange d'eau de ballast plus traitement comme mécanisme pour réduire l'introduction et l'établissement d'espèces aquatiques envahissantes dans les ports canadiens. *Secrétariat canadien de consultation scientifique du MPO* vii: 65.
- Dufour, R. 2007. Estuary and Gulf of St. Lawrence marine ecosystem overview and assessment report. Fisheries and Oceans Canada, Maurice-Lamontagne Institut.
- Dufour, R., Benoît, H., Castonguay, M., Chassé, J., Devine, L., Galbraith, P., Harvey, M., Larouche, P., Lessard, S., and Petrie, B. 2010. Ecosystem status and trends report:

- Estuary and Gulf of St. Lawrence ecozone. DFO Can. Sci. Advis. Sec. Res. Doc 30: 193.
- Dufour, R., and Quillet, P. 2007. Rapport d'aperçu et d'évaluation de l'écosystème marin de l'estuaire et du golfe du Saint-Laurent. Regional Science Branch, Fisheries and Oceans Canada, Maurice Lamontagne ....
- Dzierzewicz, Z, Cwalina, B, Chodurek, E, and Wilczok, T. 1997. The relationship between microbial metabolic activity and biocorrosion of carbon steel. *Research in Microbiology* 148: 785-793.
- Falkowski, P. G., and Raven, J. A. 2013. *Aquatic photosynthesis*, Princeton University Press ed.
- Faria, Sara I., Teixeira-Santos, Rita, Gomes, Luciana C., Silva, Elisabete R., Morais, João, Vasconcelos, Vítor, and Mergulhão, Filipe J. M. 2020. Experimental Assessment of the Performance of Two Marine Coatings to Curb Biofilm Formation of Microfoulers. *Coatings* 10.
- Finlay, J.A.; Callow, M.E.; Linnea, K.I.; Lopez, G.P.; and Callow, J.A. 2002. The Influence of Surface Wettability on the Adhesion Strength of Settled Spores of the Green Alga *Enteromorpha* and the Diatom *Amphora*. *Integrative and Comparative Biology* 42: 1116-1122.
- Flemming, H-C. 1996. Biofouling and microbiologically influenced corrosion (MIC)- an economical and technical overview. *Microbial deterioration of materials*.
- Flemming, H. C., and Wingender, J. 2010. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* 8: 623-633.
- Galbraith, P.S., Chassé, J., Caverhill, C., Nicot, P., Gilbert, D., Lefavre, D., and Lafleur, C. 2019. Conditions océanographiques physiques dans le golfe du Saint-Laurent en 2018. *Secr. can. de consult. sci. du MPO Doc. de rech.* 2019/046: 83.
- Galil, B. S., and Occhipinti-Ambrogi, A. 2004. A uniform terminology on bioinvasions: a chimera or an operative tool? *Marine pollution bulletin* 49: 688-694.
- Gast, R.J., Dennett, M.R., and Caron, D.A. 2004. Characterization of protistan assemblages in the Ross Sea, Antarctica, by denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 2028-2037.
- Girden, E.R;. 1992. *ANOVA : Repeated measures*. Sage.
- González, J. C., Simó, R.;, Massana, R.;, Covert, J. S.;, Casamayor, E. O.;, Pedrós-Alió, C.;, and Moran, M. A. 2000. Bacterial Community Structure Associated with a Dimethylsulfoniopropionate-Producing North Atlantic Algal Bloom. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 4237-4246.
- Gouvernement du Canada. 2024. À propos des espèces aquatiques envahissantes.
- Guillou, L., Bachar, D., Audic, S., Bass, D., Berney, C., Bittner, L., Boutte, C., Burgaud, G., de Vargas, C., Decelle, J., Del Campo, J., Dolan, J. R., Dunthorn, M., Edvardsen, B., Holzmann, M., Kooistra, W. H., Lara, E., Le Bescot, N., Logares, R., Mahe, F., Massana, R., Montresor, M., Morard, R., Not, F., Pawlowski, J., Probert, I., Sauvadet, A. L., Siano, R., Stoeck, T., Vaultot, D., Zimmermann, P., and Christen, R. 2013. The Protist Ribosomal Reference database (PR2): a catalog of unicellular eukaryote small sub-unit rRNA sequences with curated taxonomy. *Nucleic Acids Res* 41: D597-604.

- Hader, D.P., Banaszak, A.T., Villafane, V.E., Narvarte, M.A., Gonzalez, R.A., and Helbling, E.W. 2020. Anthropogenic pollution of aquatic ecosystems: Emerging problems with global implications. *Sci Total Environ* 713: 136586.
- Halpern, B.S., Walbridge, S., Selkoe, K.A., Kappel, C.V., Micheli, F., d'Agrosa, C., Bruno, J.F., Casey, K.S., Ebert, C., and Fox, H.E. 2008. A global map of human impact on marine ecosystems. *Science* 319: 948-952.
- Hellio, C., Maréchal, J-P, Da Gama, B.A.P, Pereira, R.C, and Clare, A.S. 2009. Natural marine products with antifouling activities, p. 572-622. *Advances in marine antifouling coatings and technologies*. Elsevier.
- Hellio, C, and Yebra, D. 2009. *Advances in marine antifouling coatings and technologies*. Elsevier.
- Hempel. 2016. Product Data HEMPASIL X3+ 87500. Hempel Editor.
- Hewitt, C.L, Gollasch, S, and Minchin, D. 2009. The vessel as a vector–biofouling, ballast water and sediments, p. 117-131. *Biological invasions in marine ecosystems: Ecological, management, and geographic perspectives*. Springer.
- Heydorn, A, Nielsen, A.T, Hentzer, M, Sternberg, C, Givskov, M, Ersbøll, B.K, and Molin, S. 2000. Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. *Microbiology* 146: 2395-2407.
- Hoagland, K.D. 1993. Diatom extracellular polymeric substances : Function, fine structure, chemistry, and physiology. *J. Phycol* 29: 537-566.
- Holmström, C., and Kjelleberg, S. 1999. MiniReview : Marine *Pseudoalteromonas* species are associated with higher organisms and produce biologically active extracellular agents. *FEMS Microbiology Ecology* 30: 285 - 293.
- Hwang, G, Liang, J, Kang, S, Tong, M, and Liu, Y. 2013. The role of conditioning film formation in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 adhesion to inert surfaces in aquatic environments. *Biochemical engineering journal* 76: 90-98.
- IMO. 2022. Preliminary results : Impact of ship' Biofouling on Greenhouse Gas Emissions.
- IMO, IMO. 2001. International convention on the control of harmful anti-fouling systems on ships. Entry into force: 17 September 2008, AFS/CONF/26.
- Jackson, J.B., Kirby, M.X., Berger, W.H., Bjorndal, K.A., Botsford, L.W., Bourque, B.J., Bradbury, R.H., Cooke, R., Erlandson, J., Estes, J.A., Hughes, T.P., Kidwell, S., Lange, C.B., Lenihan, H.S., Pandolfi, J.M., Peterson, C.H., Steneck, R.S., Tegner, M.J., and Warner, R.R. 2001. Historical overfishing and the recent collapse of coastal ecosystems. *Science* 293: 629-637.
- Jin, Huichao, Wang, Jianfu, Tian, Limei, Gao, Mingyao, Zhao, Jie, and Ren, Luquan. 2022. Recent advances in emerging integrated antifouling and anticorrosion coatings. *Materials & Design* 213.
- Jones, P. R., Cottrell, M. T., Kirchman, D. L., and Dexter, S. C. 2007. Bacterial community structure of biofilms on artificial surfaces in an estuary. *Microb Ecol* 53: 153-162.
- Kennish, M.J. 2019. *Ecology of estuaries: volume 2: biological aspects*. CRC press.
- Khandeparker, L., D'Costa, P.M., Anil, A.C., and Sawant, S.S. 2013. Interactions of bacteria with diatoms: influence on natural marine biofilms. *Marine Ecology* 35: 233-248.

- Konstantinou, I.K, and Albanis, T.A. 2004. Worldwide occurrence and effects of antifouling paint booster biocides in the aquatic environment: A review. *Environment international* 30: 235-248.
- Kruskall, W.H., and Wallis, W.A. 1952. Use of Ranks in One-Criterion Variance Analysis. *Journal of the American Statistical Association* 47: 583-621.
- Lage, O. M., and Bondoso, J.: 2014. Planctomycetes and macroalgae, a striking association. *Front Microbiol* 5: 267.
- Langwig, M. V., De Anda, V., Dombrowski, N., Seitz, K. W., Rambo, I. M., Greening, C., Teske, A. P., and Baker, B. J. 2022. Large-scale protein level comparison of Deltaproteobacteria reveals cohesive metabolic groups. *ISME J* 16: 307-320.
- Legendre, P., and Legendre, L. 2012. *Numerical ecology*. Elsevier.
- Legislature, Washington State. 2011. Session Law: Senate Bill 5436.
- Lejars, M, Margailan, A, and Bressy, C. 2012. Fouling release coatings : A nontoxic alternative to biocidal antifouling coatings. *Chemical reviews* 112: 4347-4390.
- Liu, H, Fu, C, Gu, T, Zhang, G, Lv, Y, Wang, H, and Liu, H. 2015a. Corrosion behavior of carbon steel in the presence of sulfate reducing bacteria and iron oxidizing bacteria cultured in oilfield produced water. *Corrosion Science* 100: 484-495.
- Liu, J., Liu, X., Wang, M., Qiao, Y., Zheng, Y., and Zhang, X. H. 2015b. Bacterial and archaeal communities in sediments of the north Chinese marginal seas. *Microb Ecol* 70: 105-117.
- Liu, Zhihao, Zheng, Xiangyu, Zhang, Haiwei, Li, Wenyao, Jiang, Rijia, and Zhou, Xing. 2022. Review on formation of biofouling in the marine environment and functionalization of new marine antifouling coatings. *Journal of Materials Science* 57: 18221-18242.
- Lürling, M., Eshetu, F., Faassen, E.J., Kosten, S., and Huszar, V.L.M. 2012. Comparison of cyanobacterial and green algal growth rates at different temperatures. *Freshwater Biology* 58: 552-559.
- Mandic-Mulec, I., Stefanic, P., and van Elsas, J. D. 2015. Ecology of Bacillaceae. *Microbiol Spectr* 3: TBS-0017-2013.
- Mathivanan, K., Chandirika, J. U., Vinothkanna, A., Yin, H., Liu, X., and Meng, D. 2021. Bacterial adaptive strategies to cope with metal toxicity in the contaminated environment - A review. *Ecotoxicol Environ Saf* 226: 112863.
- McDougald, D, Rice, S.A, Barraud, N, Steinberg, P.D, and Kjelleberg, S. 2012. Should we stay or should we go: Mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. *Nature Reviews Microbiology* 10: 39-50.
- McKindsey, C. W., Landry, T., O'Beirn, F. X., and Davies, I. M. 2007. Bivalve aquaculture and exotic species: a review of ecological considerations and management issues. *Journal of Shellfish Research* 26: 281-294.
- Meinesz, A., De Vaugelas, J., Hesse, B., and Mari, X. 1993. Spread of the introduced tropical green alga *Caulerpa taxifolia* in northern Mediterranean waters. *Journal of applied Phycology* 5: 141-147.
- Minchin, D, and Gollasch, S. 2003. Fouling and ships' hulls: How changing circumstances and spawning events may result in the spread of exotic species. *Biofouling* 19: 111-122.

- Molino, P. J., and Wetherbee, R. 2008. The biology of biofouling diatoms and their role in the development of microbial slimes. *Biofouling* 24: 365-379.
- Moura, V., Ribeiro, I., Moriggi, P., Capao, A., Salles, C., Bitati, S., and Procopio, L. 2018. The influence of surface microbial diversity and succession on microbiologically influenced corrosion of steel in a simulated marine environment. *Arch Microbiol* 200: 1447-1456.
- MPO, Pêches et Océans Canada, and Secrétariat canadien des avis scientifiques. 2022. Avis scientifique sur l'encrassement biologique des navires comme vecteur des introductions d'espèces non indigènes au Canada.
- Muwawa, E. M., Obieze, C. C., Makonde, H. M., Jefwa, J. M., Kahindi, J. H. P., and Khasa, D. P. 2021. 16S rRNA gene amplicon-based metagenomic analysis of bacterial communities in the rhizospheres of selected mangrove species from Mida Creek and Gazi Bay, Kenya. *PLoS One* 16: e0248485.
- Nakanishi, E.Y., Palacios, J.H., Godbout, S., and Fournel, S. 2021. Interaction between biofilm formation, surface material and cleanability considering different materials used in pig facilities—an overview. *Sustainability* 13: 5836.
- O'Toole, G, Kaplan, H.B, and Kolter, R. 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annual Reviews in Microbiology* 54: 49-79.
- Oehlmann, J, Stroben, E, and Fioroni, P.P. 1991. The morphological expression of imposex in *Nucella lapillus* (Linnaeus) (Gastropoda: Muricidae). *Journal of Molluscan Studies* 57: 375-390.
- OGSL. 2024. Observatoire globale du Saint-Laurent. Conditions Maritimes.
- Oursel, B., Garnier, C., Durrieu, G., Mounier, S., Omanovic, D., and Lucas, Y. 2013. Dynamics and fates of trace metals chronically input in a Mediterranean coastal zone impacted by a large urban area. *Mar Pollut Bull* 69: 137-149.
- Parada, A.E., Needham, D.M., and Fuhrman, J.A. 2016. Every base matters: assessing small subunit rRNA primers for marine microbiomes with mock communities, time series and global field samples. *Environ Microbiol* 18: 1403-1414.
- Parmesan, C., and Yohe, G. 2003. A globally coherent fingerprint of climate change impacts across natural systems. *Nature* 42.
- Patil, J. S., and Anil, A. C. 2005. Biofilm diatom community structure: influence of temporal and substratum variability. *Biofouling* 21: 189-206.
- Paul, E., Ochoa, J. C., Pechaud, Y., Liu, Y., and Line, A. 2012. Effect of shear stress and growth conditions on detachment and physical properties of biofilms. *Water Res* 46: 5499-5508.
- Pelletier, E., Bonnet, C., and Lemarchand, K. 2009. Biofouling growth in cold estuarine waters and evaluation of some chitosan and copper anti-fouling paints. *Int J Mol Sci* 10: 3209-3223.
- Pernet, F., Tremblay, R., and Bourget, E. 2003. Settlement success, spatial pattern and behavior of mussel larvae *Mytilus spp.* in experimental 'downwelling' systems of varying velocity and turbulence. *Marine Ecology Progress Series* 260: 125-140.
- Petrie, B., Toulany, B., and Garrett, C. 1988. The transport of water, heat and salt through the Strait of Belle Isle. *Atmosphere-Ocean* 26: 234-251.

- Piola, R.F, Dafforn, K.A, and Johnston, E.L. 2009. The influence of antifouling practices on marine invasions. *Biofouling* 25: 633-644.
- Plan d'action Saint-Laurent. 2017. La navigation sur le Saint-Laurent : un écho du passé, une voie d'avenir., p. 33. *In* C. T. Canada. and P. d. a. S.-L.-. (Canada) [eds.].
- Port de Sept-Îles. 2023. Affaires du port de Sept-Îles.
- Poulin, M. 2008. Cycle Biogéochimique de l'azote dans l'estuaire du Saint-Laurent : Rôle des marais côtiers. Université du Québec à Rimouski.
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., and Glockner, F. O. 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res* 41: D590-596.
- Razin, S.; Yogev, D.; and Naot, Y.; 1998. Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas. *Microbiol Mol Biol* 62: 1094-1156.
- Romeu, M. J., and Mergulhao, F. 2023. Development of Antifouling Strategies for Marine Applications. *Microorganisms* 11.
- Salta, M., Wharton, J. A., Blache, Y., Stokes, K. R., and Briand, J. F. 2013. Marine biofilms on artificial surfaces: structure and dynamics. *Environ Microbiol* 15: 2879-2893.
- Schneider, C.A., Rasband, W.S., and Eliceiri, K.W. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9: 671-675.
- Schnurr, Peter J., and Allen, D. Grant. 2015. Factors affecting algae biofilm growth and lipid production: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 52: 418-429.
- Schultz, M.P, Bendick, J.A, Holm, E.R, and Hertel, W.M. 2011. Economic impact of biofouling on a naval surface ship. *Biofouling* 27: 87-98.
- Schultz, M.P. 2007. Effects of coating roughness and biofouling on ship resistance and powering. *Biofouling* 23: 331-341.
- Shapiro, S.S, and Wilk, M.B. 1965. An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika* 52: 591-611.
- Shulga, N., Abramov, S., Klyukina, A., Ryazantsev, K., and Gavrilov, S. 2022. Fast-growing Arctic Fe-Mn deposits from the Kara Sea as the refuges for cosmopolitan marine microorganisms. *Sci Rep* 12: 21967.
- Silva, E.R., Tulcidas, A.V., Ferreira, O., Bayon, R., Igartua, A., Mendoza, G., Mergulhao, F.J.M., Faria, S.I., Gomes, L.C., Carvalho, S., and Bordado, J.C.M. 2021. Assessment of the environmental compatibility and antifouling performance of an innovative biocidal and foul-release multifunctional marine coating. *Environ Res* 198: 111219.
- Simard, N., Faye, S., and Bérubé, I. 2024. Évaluation spatio-temporelle (2006-2022) de l'état de la situation des espèces aquatiques envahissantes marines au Québec. *Rapport technique canadien des sciences halieutiques et aquatiques* vii: 71.
- Simberloff, D., and Rejmánek, M. 2011. *Encyclopedia of biological invasions*. Univ of California Press.
- Smith, J.C.; and Callow, J.A.; 2006. *Biological Adhesives*. Springer.
- Stoodley, P, Sauer, K, Davies, D.G, and Costerton, J.W. 2002. Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Reviews in Microbiology* 56: 187-209.
- Sweat, L.H., Swain, G.W., Hunsucker, K.Z., and Johnson, K.B. 2017. Transported biofilms and their influence on subsequent macrofouling colonization. *Biofouling* 33: 433-449.

- Taylor, G.T, Zheng, D, Lee, M, Troy, P.J, Gyananath, G, and Sharma, S.K. 1997. Influence of surface properties on accumulation of conditioning films and marine bacteria on substrata exposed to oligotrophic waters. *Biofouling* 11: 31-57.
- Transport Canada. 2019. Gestion de l'eau de ballast.
- Tremblay, Y.D.N., Hathroubi, S., and Jacques, M. 2014. Les biofilms bactériens: leur importance en santé animale et en santé publique. *Canadian Journal of Veterinary Research* 78: 110-116.
- Trombetta, T., Vidussi, F., Mas, S., Parin, D., Simier, M., and Mostajir, B. 2019. Water temperature drives phytoplankton blooms in coastal waters. *PLoS One* 14: e0214933.
- Valery, L., Fritz, H., Lefeuvre, J. C., and Simberloff, D. 2009. Invasive species can also be native. *Trends Ecol Evol* 24: 585; author reply 586.
- Van de Peer, Y, De Rijk, P, Wuyts, J, Winkelmans, T, and De Wachter, R. 2000. The European small subunit ribosomal RNA database. *Nucleic acids research* 28: 175-176.
- Vasselon, V, Domaizon, I, Rimet, F, Kahlert, M, and Bouchez, A. 2017. Application of high-throughput sequencing (HTS) metabarcoding to diatom biomonitoring: Do DNA extraction methods matter? *Freshwater Science* 36: 162-177.
- Vilchez, R., Pozo, C., Gomez, M. A., Rodelas, B., and Gonzalez-Lopez, J. 2007. Dominance of sphingomonads in a copper-exposed biofilm community for groundwater treatment. *Microbiology (Reading)* 153: 325-337.
- Vorregaard, M. 2008. Comstat2-a modern 3D image analysis environment for biofilms. Technical University of Denmark, DTU, DK-2800 Kgs. Lyngby, Denmark.
- Wakai, S., Eno, N., Mizukami, H., Sunaba, T., Miyana, K., and Miyano, Y. 2022. Microbiologically influenced corrosion of stainless steel independent of sulfate-reducing bacteria. *Front Microbiol* 13: 982047.
- Yebra, D.M, Kiil, S, and 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.
- Yilmaz, P., Parfrey, L. W., Yarza, P., Gerken, J., Pruesse, E., Quast, C., Schweer, T., Peplies, J., Ludwig, W., and Glockner, F. O. 2014. The SILVA and "All-species Living Tree Project (LTP)" taxonomic frameworks. *Nucleic Acids Res* 42: D643-648.
- Yin, K., Wang, Q., Lv, M., and Chen, L. 2019. Microorganism remediation strategies towards heavy metals. *Chemical Engineering Journal* 360: 1553-1563.
- Zubkov, M. V., Fuchs, B. M., Burkill, P. H., and Amann, R. 2001. Comparison of cellular and biomass specific activities of dominant bacterioplankton groups in stratified waters of the Celtic Sea. *Appl Environ Microbiol* 67: 5210-5218.



