

Progetto - Projet

GEREMIA - Gestione dei reflui per il miglioramento delle acque portuali



Autorità di Sistema Portuale
del Mar Ligure Orientale
Porti di La Spezia e
Marina di Carrara



ATTIVITA' T2.2: Definizione e applicazione dei piani di monitoraggio dei bacini

ACTIVITÉ T2.2: Définition et mise en œuvre des plans de surveillance des bassins

PRODOTTO T2.2.4 : Rapporto sulla tossicità biologica dovuta al rilascio di rame da parte delle vernici navali

PRODUIT T2.2.4: Rapport sur la toxicité biologique due aux rejets de cuivre des peintures de navires

Partner responsabile - Partner responsable: Université de Toulon

Nome del prodotto	Redatto da:	Verificato da:	Validato da:
T2.2.5. Rapporto sulla tossicità biologica dovuta al rilascio di rame da parte delle vernici navali	Véronique Lenoble (UTLN)	Laura Cutroneo, Marco Capello (UNIGE)	Giovanni Besio (UNIGE)

Descrizione del Prodotto: Sono state eseguite specifiche misure di tossicità chimica dovuta al possibile rilascio di rame da parte di vernici navali.

Description du livrable: Des mesures spécifiques de toxicité biologique ont été effectuées en raison du possible dégagement de cuivre des peintures de navires.

Sintesi

Il lavoro presentato nel deliverable T2.2.4 sul rilascio di rame e zinco dalle vernici antivegetative sommerse è stato condotto insieme a uno studio sulla tossicità sui microrganismi. I risultati del salting-out sono mostrati qui per facilitare la comprensione dei risultati di tossicità ottenuti.

Synthèse

Le travail présenté dans le livrable T2.2.4 portant sur le relargage du cuivre et du zinc à partir de peintures antifouling immergées a été mené conjointement avec une étude de la toxicité sur les micro-organismes. Les résultats de relargage sont remontrés ici afin de faciliter la compréhension des résultats de toxicité obtenus.

Index

1. Introduction	1
2. Prélèvements	4
3. Peintures utilisées	6
4. Dispositif expérimental	8
5. Méthode analytique: cytométrie en flux	9
6. Cinétique de relargage du cuivre	10
7. Cinétique de relargage du zinc	13
8. Etude des micro-organismes	15
9. Conclusion	19

Indice

1. Introduzione	20
2. Campioni	23
3. Vernici utilizzate	25
4. Dispositivo sperimentale	27
5. Metodo analitico: citometria a flusso	28
6. Cinetica di rilascio del rame	29
7. Cinetica di rilascio dello zinco	32
8. Studio dei microrganismi	34
9. Conclusione	38
Bibliographie - Bibliografia	39

1. Introduction

Le biofouling apparaît rapidement sur toute structure immergée dans l'eau de mer, comme les coques des navires, et se déroule en plusieurs étapes (**Figure 1**), telles que définies par (**Wahl, 1989**) et (**Compère & Quiniou, 2009**). Premièrement, les molécules organiques (protéines, substances humiques, lipides, etc) et inorganiques (sels, silice) s'adsorbent sur la surface immergée selon une cinétique qui dépend des conditions de salinité, de température, de pH et de la lumière. Elle est généralement de l'ordre de la dizaine de minutes (**Azemar et al., 2015**). Tous ces éléments forment le film primaire (ou film conditionnant) qui va modifier les propriétés physico-chimiques de la surface concernée et ainsi faciliter la colonisation de cette dernière par les bactéries (**Compère & Quiniou, 2009**). Celles-ci adhèrent de manière temporaire au bout de quelques minutes, puis de façon permanente quelques heures plus tard, lorsque les bactéries ont sécrété suffisamment de substance polymérique extracellulaire (EPS). Entre quelques jours et quelques mois, des champignons, microalgues et protozoaires s'attachent aux EPS pour former le biofilm. Finalement, les macro-organismes viennent adhérer au biofilm et forment les biosalissures (**Compère & Quiniou, 2009**).

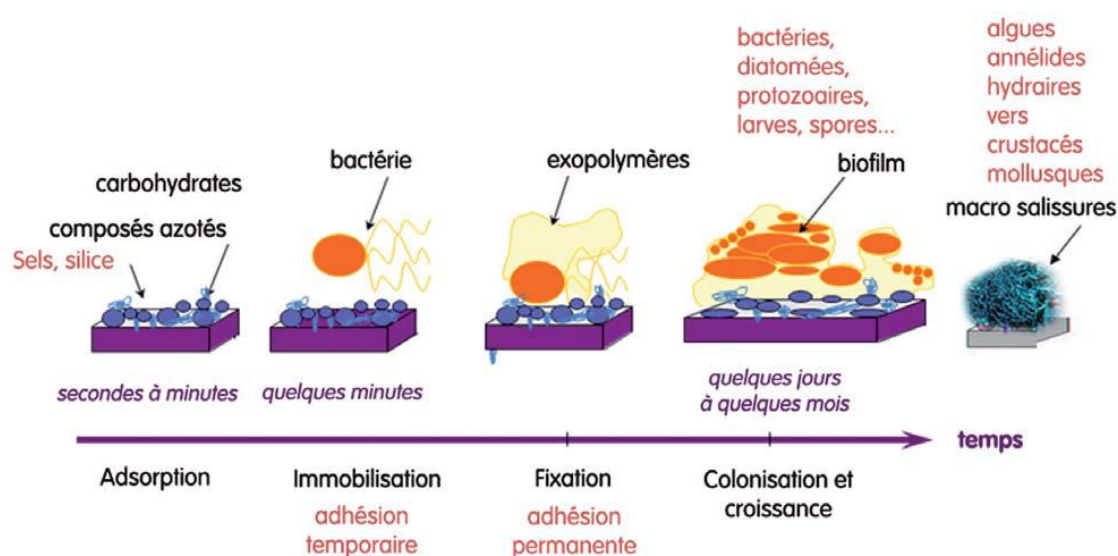


Figure 1 : Les principales étapes du biofouling (**Compère & Quiniou, 2009**).

Les peintures antifouling peuvent être différenciées selon leur mode de libération du biocide. On distingue trois modes d'action distincts : les peintures à matrice dure, à matrice soluble ou à matrice autopolissante (**Almeida et al., 2007**). Leur mode de relargage des biocides a été schématisé dans la **Figure 2**.

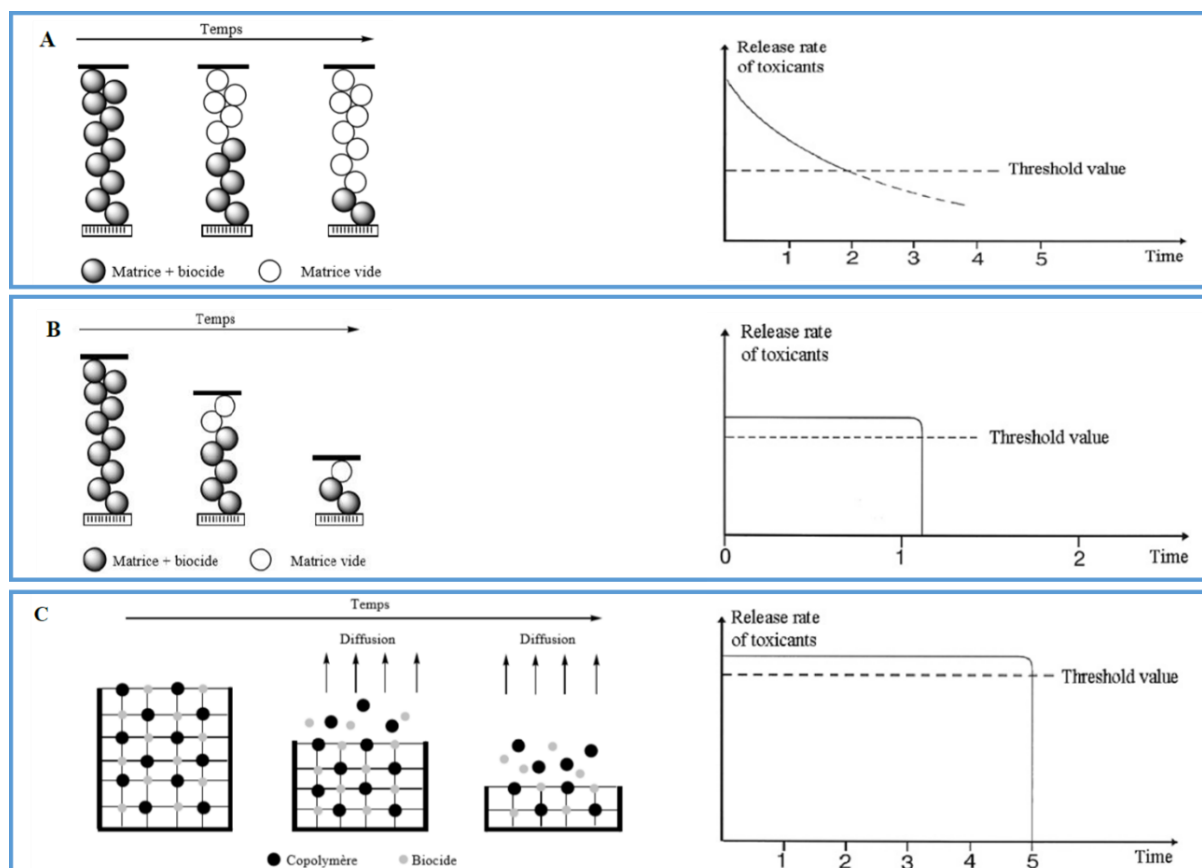


Figure 2 : Les trois principaux types de peintures antifouling utilisées depuis le milieu du 20^e siècle ainsi que leur taux de relargage des biocides en fonction du temps. A. Matrice dure ; B. Matrice soluble ; C. Matrice autopolissante. (**Jellali, 2008**), (**Almeida et al., 2007**)

Les peintures à matrice dure (**Figure 2.A**) se caractérisent par une matrice polymère insoluble qui ne s'érode pas dans l'eau de mer, contenant un biocide et des pigments solubles (**Yebra et al., 2004**). Le pigment se dissout peu à peu au contact de l'eau de mer et crée des pores qui permettent au biocide de diffuser jusqu'à la surface de la peinture (**Yebra et al., 2004**), (**Almeida et al., 2007**). Au bout d'un certain temps, l'ion

biocide doit diffuser à travers une couche d'une épaisseur trop grande pour pouvoir maintenir un taux de relargage suffisant afin assumer son rôle d'antifouling. Même si ces peintures sont résistantes aux craquelures et à la photo-oxydation lorsqu'elles sont exposées à l'air libre, leurs durées de vie extrêmement courtes est responsable de la diminution de leur utilisation (**Yebra et al., 2004**).

Les peintures à matrice soluble (**Figure 2.B**) ont été développées pour compenser la perte d'efficacité des peintures à matrice dure. Elles sont constituées d'un liant résineux incorporant des pigments toxiques. Le principe de base est le même que pour les peintures à matrice dure, à savoir la libération du biocide par les pores créés par l'eau de mer, à l'exception que la matrice se dissout progressivement dans l'eau de mer pour diminuer l'épaisseur de la couche de diffusion (**Almeida et al., 2007; Yebra et al., 2004**). Cela a pour effet de prolonger l'action biocide, mais entraîne plusieurs désavantages. Tout d'abord, il faut que le navire soit en mouvement pour dissoudre efficacement la matrice. A l'arrêt, le pouvoir antifouling est donc moins grand (**Almeida et al., 2007**). De plus, la résine ne peut pas empêcher l'eau de mer de pénétrer à l'intérieur de la matrice, ce qui peut former des bouchons de sels et ainsi bloquer les pores permettant la diffusion du biocide (**Almeida et al., 2007**). Par ailleurs, l'érosion constante de la peinture fait qu'elle doit être réappliquée tous les 12 à 18 mois au maximum. Enfin, ces peintures sont sensibles à la photo-oxydation lorsqu'elles sont hors de l'eau (lors de la maintenance du navire par exemple) (**Yebra et al., 2004**).

Les peintures à matrice autopolissantes, les plus récentes (**Figure 2.C**), sont constituées d'un liant polymère insoluble dans l'eau et d'un pigment toxique (**Almeida et al., 2007**). Le pigment se retrouve séparé de la matrice polymère suite à un mécanisme d'hydrolyse lente entraînant la dissolution des deux agents. Le biocide va ainsi être libéré petit à petit, le polymère de surface va s'éroder, et une nouvelle couche active va alors émerger. Ce mode d'action augmente grandement la durée de vie de la peinture et permet un relargage constant du biocide (**Compère & Quiniou, 2009**).

Malgré leur mode d'action différent, ces peintures utilisent en majorité le cuivre comme biocide, qui fait partie des éléments traces métalliques (ETM). Les ETM sont des métaux ou métalloïdes présents dans le milieu marin à des concentrations très faibles et sous différentes formes chimiques (**Lead and Wilkinson, 2006**). Certains de ces éléments sont essentiels à la vie, dont le cuivre, mais peuvent se révéler toxiques selon leur concentration et leur forme chimique (**Sunda and Huntsman, 1988**). En effet, pendant longtemps, la toxicité d'un métal a été liée uniquement à la concentration de l'ion libre considéré, que l'on pensait être la seule espèce réactive à la membrane des cellules (modèle de l'ion libre en solution) (**Papp, 2011**). Cependant, certains complexes métalliques se sont révélés capables d'engendrer eux aussi une réponse biologique (**Papp, 2011**). Ces complexes peuvent être formés par l'intermédiaire de ligands présents dans l'environnement et parfois de ligands appartenant à un organisme vivant (modèle du ligand biotique) (**Papp, 2011**). A l'inverse, d'autres complexes présents dans l'environnement tendent à diminuer la toxicité des ETM (**Lorenzo et al., 2002**). Contrairement à d'autres polluants comme les hydrocarbures, les ETM ne sont pas biodégradables et s'accumulent dans les sédiments, ce qui peut poser des problèmes de toxicité lors de leur remise en suspension (**Papp, 2011**). Certains métaux comme le mercure peuvent même être bioaccumulés voire biomagnifiés et impacter toute la chaîne trophique, allant jusqu'à poser des problèmes de santé humaine (**Miramand et al., 2006**). Pour toutes ces raisons, il est important d'étudier le comportement des métaux en milieu marin. Le cuivre et le zinc étant les biocides principaux des peintures antifouling, cette étude s'est penchée plus précisément sur ces éléments.

2. Prélèvements

Afin d'étudier le relargage en Cu et en Zn par les peintures antifouling, des plaques en polycarbonate recouvertes de peinture antifouling ont été immergées dans de l'eau de

mer dans des mésocosmes. Plusieurs prélèvements ont été effectués dans la Rade de Toulon, située au nord-ouest de la Méditerranée. Elle est divisée en deux parties séparées par une digue. La petite Rade à l'ouest de la digue est anthropisée et le renouvellement des eaux est faible (**Dufresne et al., 2014**). Du fait des activités humaines dans cette zone (port civil et militaire), les rejets en métaux sont importants et ces derniers s'accumulent à la fois dans les eaux de surface et les sédiments (**Tessier et al., 2011**). La grande Rade, à l'est de la digue, est semi fermée et ses eaux sont renouvelées par échange constant avec la Méditerranée (**Rossi, 2008**). Cependant, elle subit aussi des apports en ETM venant de la petite rade, qui peuvent augmenter en période de mistral (**Dufresne et al., 2014**).

Les prélèvements d'eau de mer (un par peinture) ont été effectués dans la grande rade (**Figure 3**) à l'aide d'une pompe en téflon à poussée d'azote Asti dont les tuyaux en téflon ont préalablement été rincés trois fois à l'eau milli-Q, une fois avec HNO₃ 10% (Merck, pro-analysis) puis trois fois à l'eau Milli-Q. Ce protocole de rinçage a également été utilisé pour tout le matériel utilisé dans cette étude. Pour chaque prélèvement, les teneurs initiales en Cu, Zn, et COD ainsi que l'abondance du phytoplancton et des procaryotes hétérotrophes ont été mesurées. L'eau de mer a été utilisée telle quelle dans les expériences, immédiatement après prélèvement.

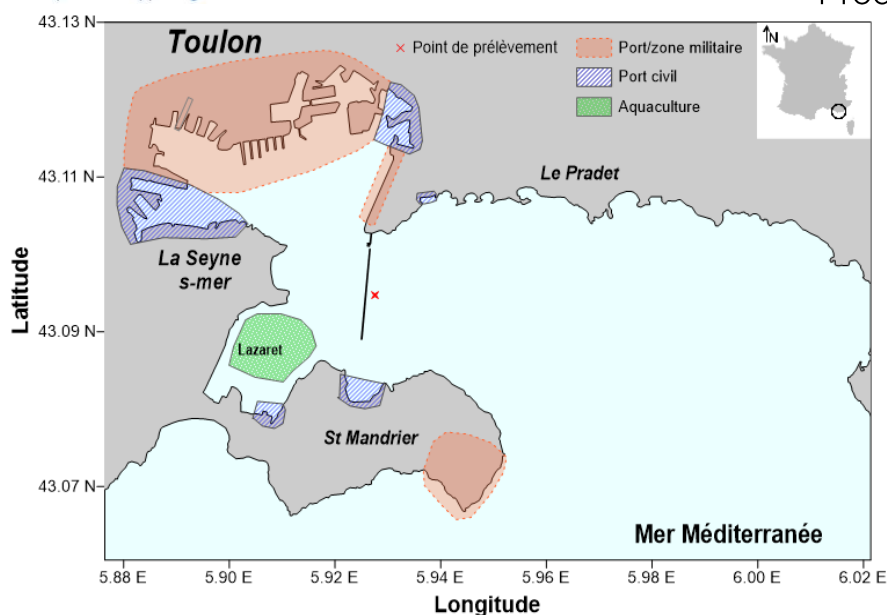


Figure 3 : Carte de la rade de Toulon, ainsi que ses principales zones d'activité. La croix rouge représente le point de prélèvement choisi pour les expérimentations en mésocosme.

3. Peintures utilisées

Trois peintures antifouling de la marque Hempel™ ont été utilisées : une peinture à matrice autopolissante (AP), une peinture à matrice dure (MD) et une peinture à matrice soluble (MS). Les formulations des trois peintures sont récapitulées dans le **Tableau 1**. Ce tableau est également disponible sous forme de rabat à la fin du rapport. Il est conseillé de le garder sous les yeux car il y sera souvent fait référence.

L'intérêt d'utiliser ces trois peintures est de comparer les effets du mode de relargage et de la formulation sur les concentrations en métaux, leur spéciation, le type de composés organiques relargués et leur toxicité vis-à-vis des micro-organismes. Du fait du mode opératoire relativement court par rapport à la durée de vie des peintures, on peut convenir que les peintures AP et MS ont des modes de relargage semblables (**Figure 2**) mais une formulation différente en terme de composés biocides, ainsi qu'en terme de concentrations en cuivre, environ deux fois plus élevée pour la peinture MS

si on considère le milieu des intervalles de concentration (**Tableau 1**). Ces deux peintures vont permettre de comparer l'effet de la formulation. A l'inverse, les peintures AP et MD possèdent un mode de relargage différent (**Figure 2**) et seront considérées comme ayant des concentrations en thiocyanate de cuivre équivalentes (**Tableau 1**) ce qui va permettre de comparer les effets du mode de relargage uniquement.

Tableau 1 : Récapitulatif des composés contenus dans les peintures Hempel™ utilisées lors des expérimentations de la présente étude. Données obtenues sur les fiches fournisseur.

	Thiocyanate de cuivre (%)	Oxyde de cuivre (%)	Oxyde de zinc (%)	Pyrrhione de zinc (%)
Peinture AP	10 à 25		5 à 10	1 à 3
Peinture MD	10 à 25		5 à 10	1 à 3
Peinture MS		25 à 50	10 à 25	

Plusieurs plaques de polycarbonate ont été découpées puis lavées dans un bain d'acide nitrique 10% (Merck, pro-analysis) avant d'être peintes. Pour pouvoir limiter le biais inhérent à l'application de la peinture, celles-ci ont été appliquées sur une surface identique (6.30 cm²) à l'aide d'un aérographe Tamiya. Une dilution d'environ 85/15 peinture/diluant en volume a été nécessaire pour assurer la bonne pulvérisation des produits. Six plaques par peintures ont été peintes puis séchées pendant 24h sous hotte aspirante.

4. Dispositif expérimental

Pour chaque peinture, les plaques ont été placées dans trois mésocosmes (triplicats analytiques) en HDPE (High Density PolyEthylène) contenant 20L d'eau de mer fraîchement prélevée, et également dans trois mésocosmes enrichis avec une teneur de 20mg.L^{-1} en acides humiques (humic acid sodium salt®, ref H16752-100G, Aldrich®), sous agitation douce (**Figure 4**). Le choix s'est porté sur les acides humiques car ils sont un constituant des substances humiques. Les substances humiques sont des résidus de matière organiques capable de résister à la dégradation de la matière végétale et sont capables de contrôler la biodisponibilité de certains métaux (Ondrasek et al., 2018). Six mésocosmes de contrôle de 1L (HDPE) ont également été préparés et étudiés pendant la même durée de temps, mais sans plaque de peinture afin de suivre le devenir des micro-organismes.

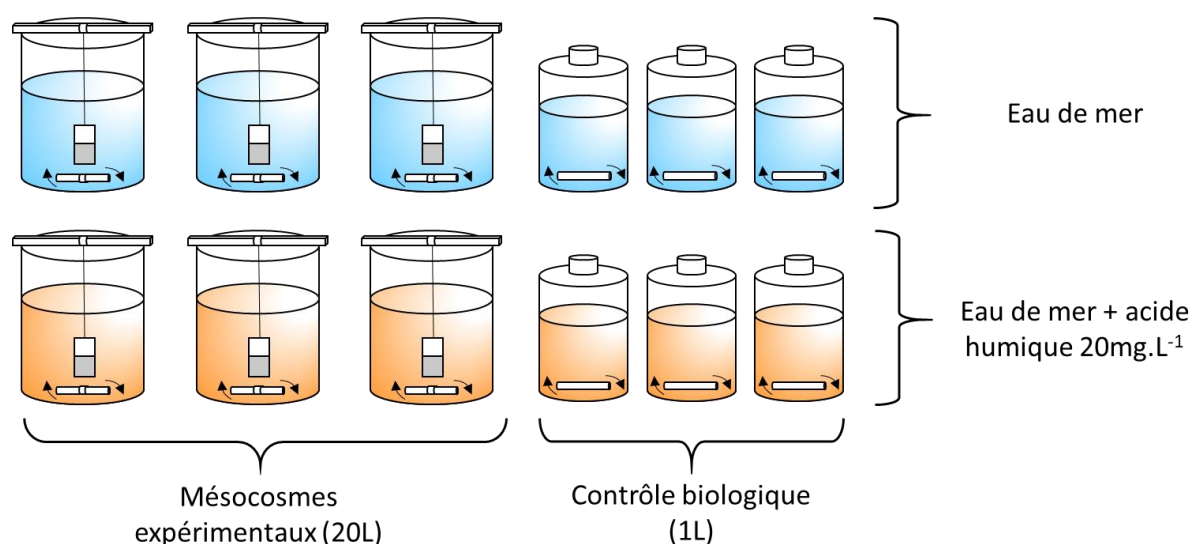


Figure 4 : Dispositif expérimental utilisé pour chaque peinture étudiée

Des prélèvements ont ensuite été réalisés à différentes cinétiques (**Figure 5**). Il a été choisi de prélever à quelques cinétiques courtes (1h, 3h, 7h et 24h) puis à des cinétiques

plus longues (48h, 1 semaine (168h), 2 semaines (336h)) dans le but d'observer le relargage de biocide par les peintures sur une durée temporelle longue. De plus, pour chaque peinture, un mésocosme contenant une plaque peinte et de l'eau de mer non dopée en matière organique a été conservé pour effectuer des prélèvements toutes les semaines pendant 12 semaines.

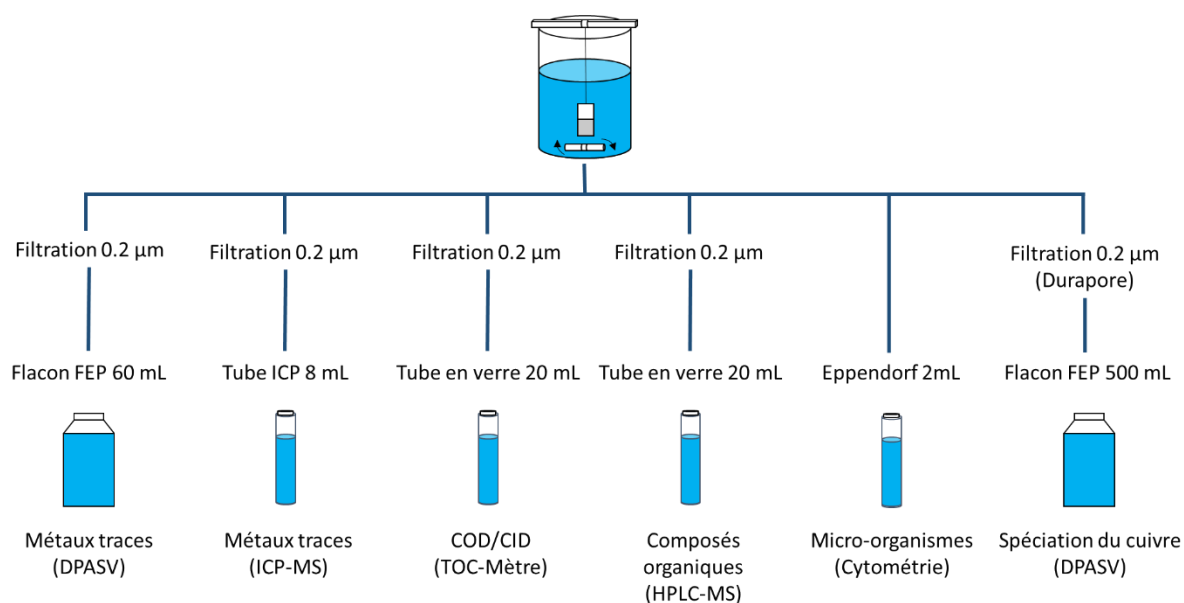


Figure 5 : Récapitulatif des différents échantillonnages effectués pour chaque mésocosme de 20L et pour chaque peinture étudiée.

5. Méthode analytique: cytométrie en flux

La cytométrie en flux consiste en l'analyse optique des particules via un fluide entraînant celles-ci devant un faisceau laser. Le principe est d'étudier les propriétés de diffusion et de fluorescence naturelle ou induite (via l'addition d'un marqueur) des micro-organismes.

Lors de chaque prélèvement, 1 mL d'échantillon a été fixé avec 10 µL de glutaraldehyde (Microscopy). Après 10 minutes d'incubation à l'abri de la lumière, les échantillons ont été conservés à -60°C. L'analyse des échantillons a été effectuée avec un cytomètre en

flux Accuri C6 FlowCytometer C.Sampler™ en utilisant le logiciel d'acquisition BD C.Sampler™. Deux types d'analyses ont été pratiquées : celle des procaryotes hétérotrophes et celle du phytoplancton. Pour l'analyse des procaryotes hétérotrophes, 100µL d'échantillon ont été mélangés à une solution filtrée à 0.2µm de NaCl 38g.L⁻¹ à laquelle 2µL de marqueur SyberGreen 0.01M a été ajouté, suivi d'une incubation de 10 minutes. Ils ont ensuite été discriminés en comptant uniquement les particules de petite taille, avec un niveau de complexité faible et ayant une fluorescence uniquement due au SyberGreen. L'analyse du phytoplancton a été effectuée sans préparation préalable en utilisant 250µL d'échantillon. Il a ensuite été discriminé en comptant uniquement les particules fluoresçant dans le rouge de la phycoérythrine (**Cabrol et al., 2017**).

6. Cinétique de relargage du cuivre

Les concentrations en cuivre dissout (**Figure 6**) augmentent au cours du temps quel que soit la peinture (AP, MD, MS) ou le milieu contenu dans les mésocosmes. Les concentrations maximales relarguées sont de l'ordre de 2000 nM dans l'eau de mer et de 600 nM dans l'eau de mer enrichie en acides humiques. Les mésocosmes étant protégés des poussières atmosphériques, il est possible d'assimiler cette augmentation uniquement au relargage de cuivre par les peintures antifouling.

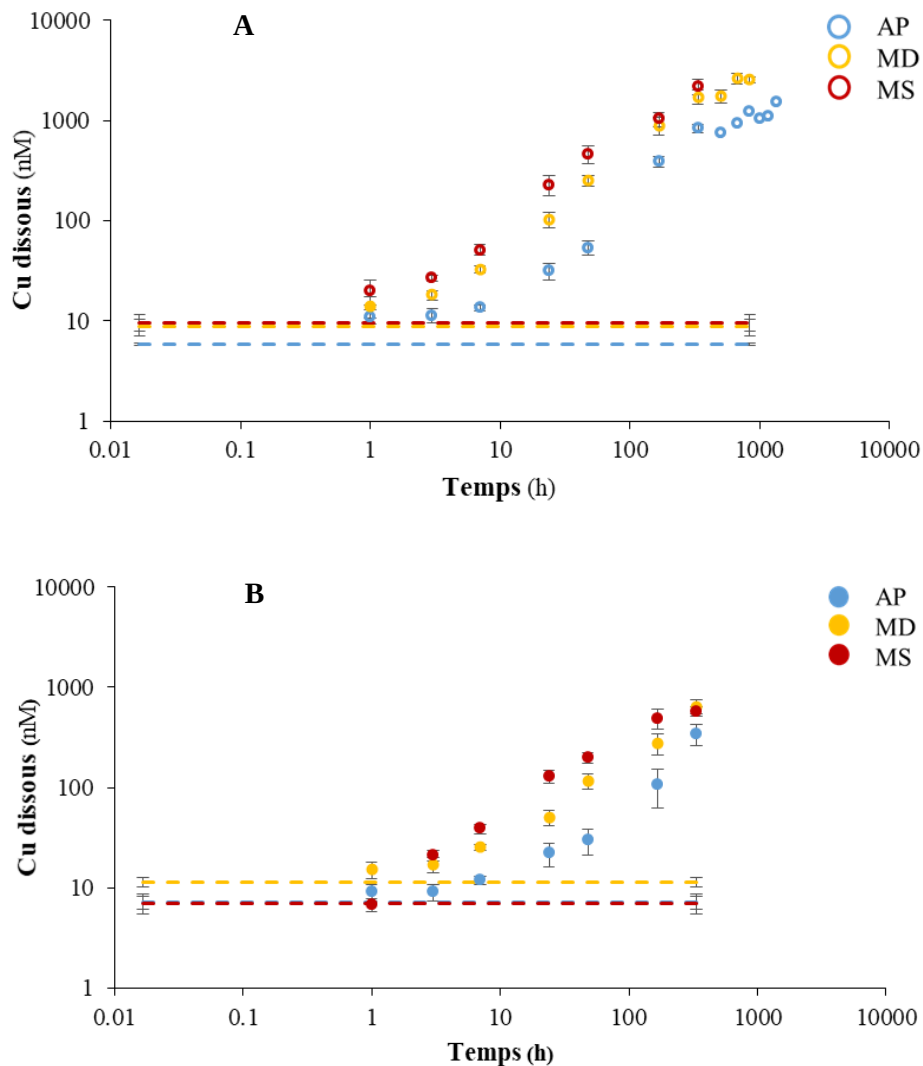


Figure 6 : concentrations en cuivre dissout au cours du temps dans les mésocosmes d'eau de mer (6.A) enrichie en acides humiques (6.B). Les traits pointillés représentent les concentrations en cuivre dissout avant l'ajout des plaques de peinture. En bleu : peinture autopolissante. En jaune : peinture à matrice dure. En rouge : peinture à matrice soluble.

Dans l'eau de mer (**Figure 6.A**), la peinture autopolissante (AP) relargue moins de cuivre que les peintures à matrice dure (MD) et soluble (MS). En effet au bout de deux semaines, le facteur d'enrichissement (**Equation 1**) en cuivre dans l'eau de mer est de 150 pour AP contre 200 et 230 pour MS et MD.

$$(1) \quad F_i = \frac{[M]_i}{[M]_0}$$

Avec :

- F_i le facteur d'enrichissement au temps i .
- $[M]_i$ et $[M]_0$ les concentrations en métal au temps i et dans l'eau de mer initiale.

Cette tendance a déjà été observée dans des expériences de relargage préliminaires (**Pagès, 2018**). Les peintures ayant une formulation proche (même forme de cuivre et même quantité, **Tableau 1**), à savoir AP et MD, ont un facteur d'enrichissement différent, ce qui suggère une influence du mode de fonctionnement sur le relargage de cuivre. Les peintures ayant un mode de relargage similaire (AP et MS) mais des formulations différentes en terme de composés et de quantité ont également des facteurs d'enrichissement différents. Ceci laisse à penser que la formulation a également une influence. Cependant, il a été considéré une concentration dans la peinture deux fois plus importante pour MS que pour AP alors que le rapport entre leurs facteurs d'enrichissement n'est que de 1.33. Ainsi, soit (1) l'hypothèse d'un mode d'action similaire sur une courte durée est erronée, soit (2) le rapport des concentrations réelles dans les peintures n'est pas de 2. Afin de discriminer cette dernière hypothèse, trois plaques supplémentaires par peinture ont été peintes de la même façon que celles ayant servi aux expérimentations de cette étude. La peinture sera ensuite grattée et minéralisée pour analyse des métaux totaux.

Dans l'eau de mer enrichie en acides humiques (Figure 6.B), les concentrations en cuivre suivent les mêmes tendances que dans l'eau de mer, mais avec une amplitude moins importante (600 nM au maximum de concentration contre 2000 nM dans l'eau de mer). Les facteurs d'enrichissement à deux semaines sont de 50 pour AP, 60 pour MD et 80 pour MS (contre respectivement 150, 200 et 230 sans acides humiques). Les concentrations en carbone organique dissout (COD) (Figure 7) peuvent nous renseigner

sur ce phénomène. Dans les mésocosmes d'eau de mer, celles-ci restent stables (Figure 7.A) du début de l'expérimentation jusqu'à 2 semaines (336h). A partir de 2 semaines, la concentration augmente légèrement dans les mésocosmes contenant AP et MD et cette tendance est également observable pour les prélèvements après 2 semaines.

7. Cinétique de relargage du zinc

Tout comme le cuivre, les concentrations en zinc dissout (**Figure 7**) augmentent au cours du temps quel que soit la peinture (AP, MD, MS) ou le milieu contenu dans les mésocosmes, avec des concentrations maximum de l'ordre 2000 nM dans l'eau de mer et 1900 nM dans l'eau de mer enrichie en acides humiques.

Dans l'eau de mer (**Figure 7.A**), les valeurs de concentration en zinc dissout pour la peinture AP sont anormalement élevées à une semaine (168h) et deux semaines (336h). Cela peut s'expliquer par une contamination en zinc, les expériences n'étant pas réalisées en salle blanche. Les comparaisons entre les peintures se feront donc à 48h au lieu de deux semaines. A 48h, les facteurs d'enrichissement en zinc sont de 17 ± 3 pour AP, 26 ± 6 pour MD et 15 ± 3 pour MS. Ces facteurs n'étant pas significativement différents, il n'est pas possible de conclure sur l'influence du mode de relargage et de la composition de la peinture sur les concentrations en zinc.

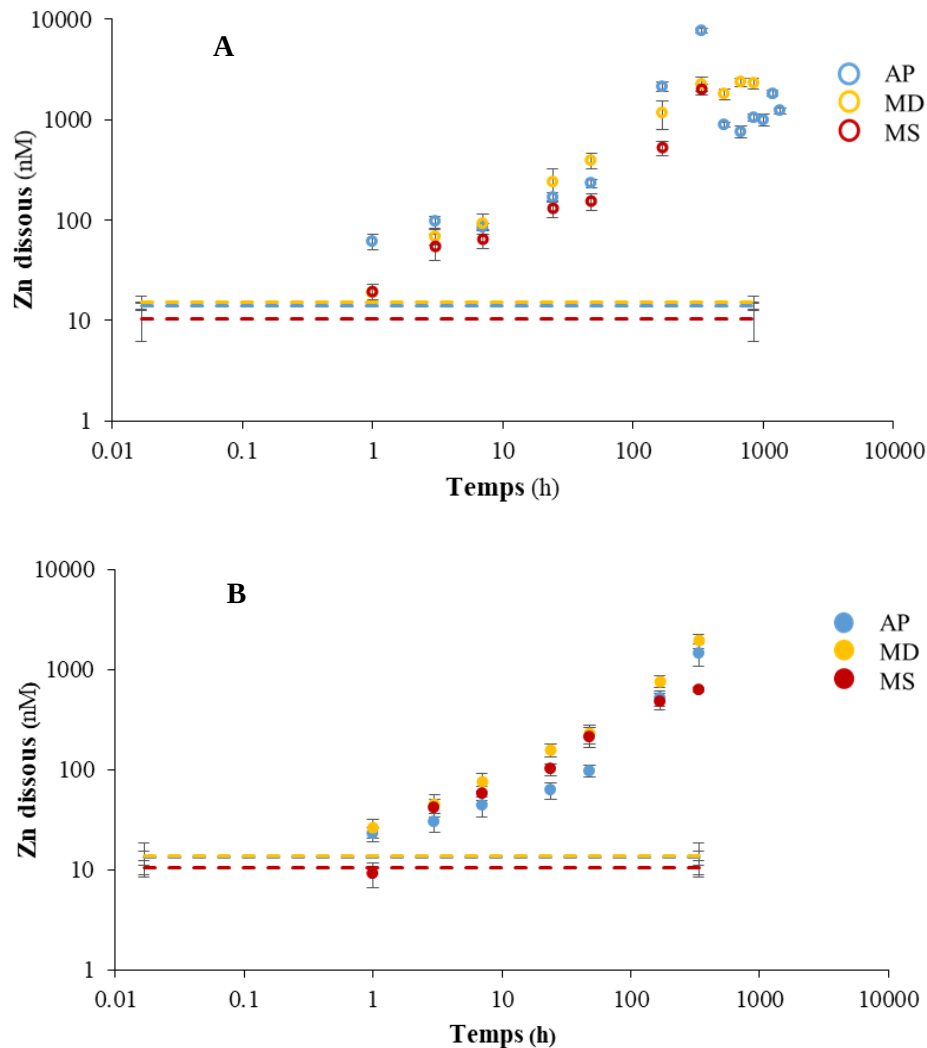


Figure 7 : concentrations en zinc dissout au cours du temps dans les mésocosmes d'eau de mer (8.A) enrichie en acides humiques (8.B). Les traits pointillés représentent les concentrations en zinc avant l'ajout des plaques de peinture. En bleu : peinture autopolissante. En jaune : peinture à matrice dure. En rouge : peinture à matrice soluble.

Dans l'eau de mer enrichie en acides humiques (**Figure 7.B**), la plaque de peinture AP a relargué moins de zinc (facteur d'enrichissement de 7 contre 17). Le relargage des peintures MD et MS ne semblent pas avoir été affecté (facteurs d'enrichissement de 16 et 20 contre 26 et 15 dans l'eau de mer). Les hypothèses avancées pour les concentrations en cuivre ne sont donc pas valables pour le zinc car le relargage ne

semble pas perturbé par l'ajout de matière organique. Néanmoins, cela permet d'éliminer l'hypothèse de la formation d'un film de matière organique sur les plaques qui empêcherait le relargage des métaux car cela impacterait le cuivre et le zinc de la même manière.

8. Etude des micro-organismes

Dans les conditions de contrôle (**Figure 8**), la population en phytoplancton décroît fortement et tombe quasiment à zéro au bout d'une semaine, que ce soit dans l'eau de mer ou l'eau de mer enrichie en acides humique (**Figure 8.A**). Cela indique que les conditions expérimentales n'étaient pas adaptées pour la croissance du phytoplancton, notamment les conditions d'éclairement. Les populations en présence de peinture sont tombées à zéro individu au bout d'une semaine. Il n'a donc pas été possible de différencier l'effet des conditions expérimentales et des peintures sur le phytoplancton. La population en procaryotes hétérotrophes (**Figure 8.B**) varie peu tout au long de l'expérience, que ce soit dans les contrôles en eau de mer ou eau de mer enrichie en acides humiques. De plus, les densités de population dans eau de mer ne semblent pas significativement différentes des populations présentes dans l'eau de mer enrichie en acides humiques (**Figure 8.B**) suggérant que ces derniers ne sont pas utilisés par les bactéries.

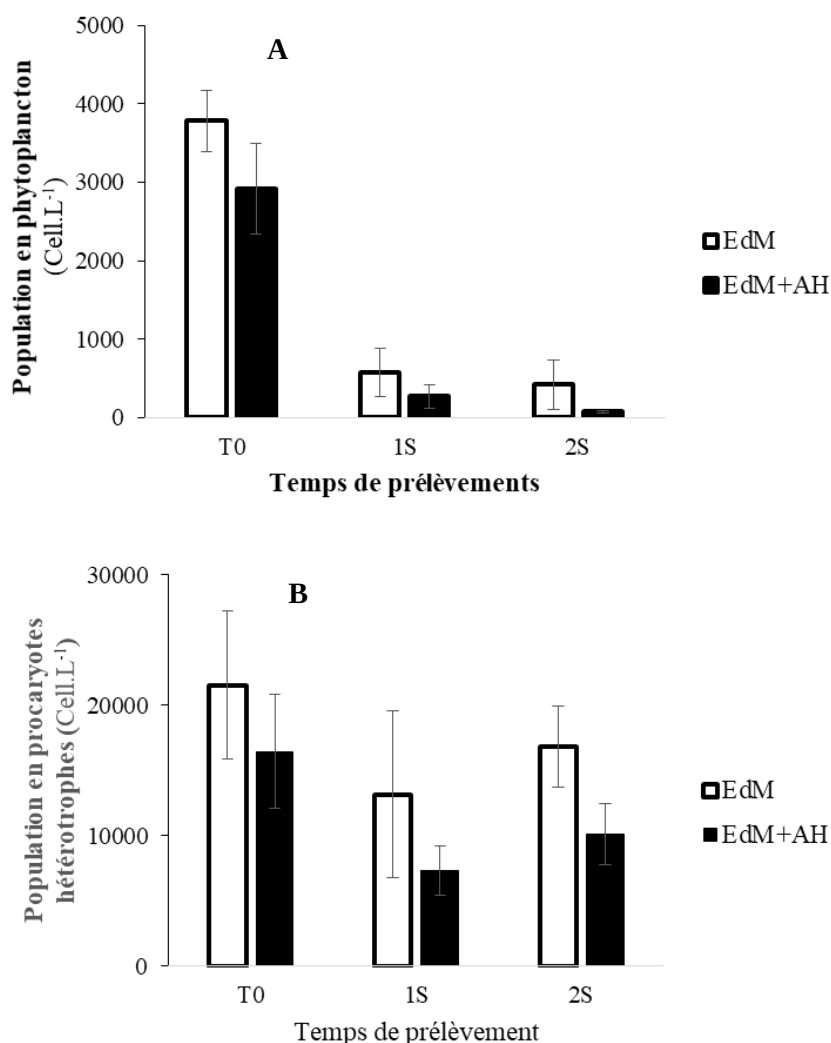


Figure 8 : Population des mésocosmes de contrôle en phytoplancton (13.A) et en procaryotes hétérotrophes (13.B). En blanc : Mésocosmes contenant l'eau de mer ; En noir : mésocosmes contenant l'eau de mer enrichie en acides humiques. Les populations ont été calculées en faisant la moyenne des populations dans les mésocosmes de contrôle de toutes les peintures pour chaque temps (n=9).

Afin d'étudier les variations de population en procaryotes hétérotrophes par rapport aux contrôles un facteur d'enrichissement E a été calculé pour chaque peinture et chaque pas de temps (**Equation 3**) puis reporté dans la **Figure 9**.

$$(2) \quad E_i = \frac{P_i}{p_i}$$

Avec :

- E_i le facteur d'enrichissement à un pas de temps i d'une population dans un mésocosme avec peinture par rapport au mésocosme de contrôle au même temps i .
- P_i la population en procaryotes hétérotrophes dans un mésocosme avec peinture au pas de temps i .
- p_i la population en procaryotes hétérotrophes dans le mésocosme de contrôle au pas de temps i .

Que ce soit dans l'eau de mer (**Figure 9.A**) ou l'eau de mer enrichie en acides humiques (**Figure 9.B**), la croissance des populations en contact avec les peintures autopolissante (AP) et à matrice soluble (MS) n'est pas stimulée par ces dernières ($E \approx 1$ tout au long de l'expérience). Pour les procaryotes hétérotrophes en contact avec MD dans l'eau de mer, $E = 4.4 \pm 1.3$ à une semaine et $E = 3.3 \pm 0.7$ à deux semaines. Pour les procaryotes hétérotrophes en contact avec MD dans l'eau de mer enrichie en acides humique, $E = 5.3 \pm 0.4$ à une semaine et $E = 11.0 \pm 1.1$ à deux semaines. La croissance des populations en contact avec la peinture à matrice dure (MD) semble donc stimulée par cette dernière, potentiellement par le relargage de composés favorables à la croissance de ces procaryotes. La croissance plus importante à deux semaines en présence d'acides humiques est probablement due aux concentrations en métaux plus faibles dans ce milieu (**Figure 6** ; **Figure 7**), qui sont donc moins susceptibles d'être toxiques. Cependant, ce comportement n'est pas observable pour les populations en contact avec les autres peintures, ce qui démontre que l'effet des peintures sur les micro-organismes n'est pas seulement dû aux concentrations en métaux relargués.

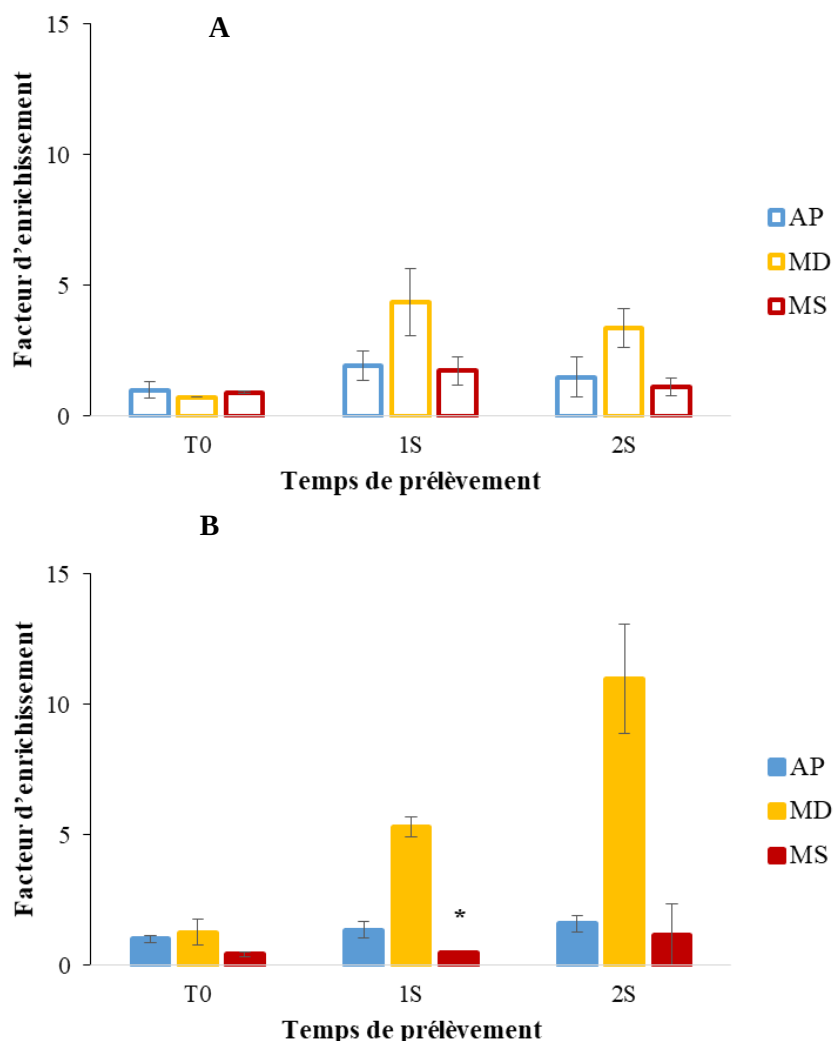


Figure 9 : Facteurs d'enrichissement en procaryotes hetérotrophes au temps initial, après une semaine et après 2 semaines pour les trois peintures dans les mésocosmes contenant les plaques de peinture et l'eau de mer (14.A) et l'eau de mer enrichie en acides humiques (14.B).
 $F > 1$: stimulation de la croissance par la peinture ; $F = 1$: pas d'effet observable de la peinture ;
 $F < 1$: effet toxique de la peinture. Les valeurs surmontées d'un astérisque sont celles dont l'écart type est trop important pour être fiable.

En effet, à deux semaines, la concentration en cuivre dans les mésocosmes contenant AP est plus faible que celle dans les mésocosmes contenant MD. La toxicité d'un métal dépendant de sa concentration, il devrait y avoir plus de croissance des procaryotes

hétérotrophes dans les mésocosmes contenant AP, ce qui n'est pas le cas. Les peintures AP et MD possèdent des formulations proches (**Tableau 1**) et des modes de relargage différents (**Figure 2**), avec une libération du biocide par hydrolyse et dispersion de la matrice polymère pour AP et diffusion du biocide dans les pores de la peinture pour MD. La peinture autopolissante relargue alors potentiellement plus de composés qui pourraient se révéler toxiques, comme les groupements thiocyanate. Ces résultats indiquent une influence du mode de relargage sur la toxicité des peintures antifouling.

9. Conclusion

L'étude des micro-organismes a révélé que les conditions expérimentales n'étaient pas adaptées au phytoplancton, nous empêchant de conclure quant à l'effet des peintures sur ceux-ci. Si cela est possible, il faudrait effectuer les prochaines expériences dans une salle climatique reproduisant un cycle jour nuit avec un bon éclairage. L'étude des procaryotes hétérotrophes a cependant permis de récolter des informations sur l'influence du mode de relargage des peintures sur leur toxicité. De, plus, quelques approximations ont été faites pour la rédaction de ce mémoire en conséquence des écarts-types relativement grands liés à la biologie. Une étude statistique plus poussée type ANOVA devrait permettre d'y voir plus clair.

1. Introduzione

Il biofouling appare rapidamente su qualsiasi struttura immersa in acqua di mare, come gli scafi delle navi, e si verifica in diverse fasi (Figura 1), come definito da Wahl, 1989 e Compère & Quiniou, 2009. In primo luogo, le molecole organiche (proteine, sostanze umiche, lipidi, ecc.) e inorganiche (sali, silice) si adsorbono sulla superficie sommersa secondo una cinetica che dipende da salinità, temperatura, pH e condizioni di luce. È generalmente dell'ordine di dieci minuti (Azemar et al., 2015). Tutti questi elementi formano il film primario (o film di condizionamento) che modificherà le proprietà fisico-chimiche della superficie interessata e faciliterà così la sua colonizzazione da parte dei batteri (Compère & Quiniou, 2009). I batteri aderiscono temporaneamente dopo qualche minuto, poi permanentemente qualche ora dopo, quando i batteri hanno secreto abbastanza sostanza polimerica extracellulare (EPS). Dopo qualche giorno e qualche mese, funghi, microalghe e protozoi si attaccano all'EPS per formare il biofilm. Infine, i macro-organismi aderiscono al biofilm e formano il biofouling (Compère & Quiniou, 2009).

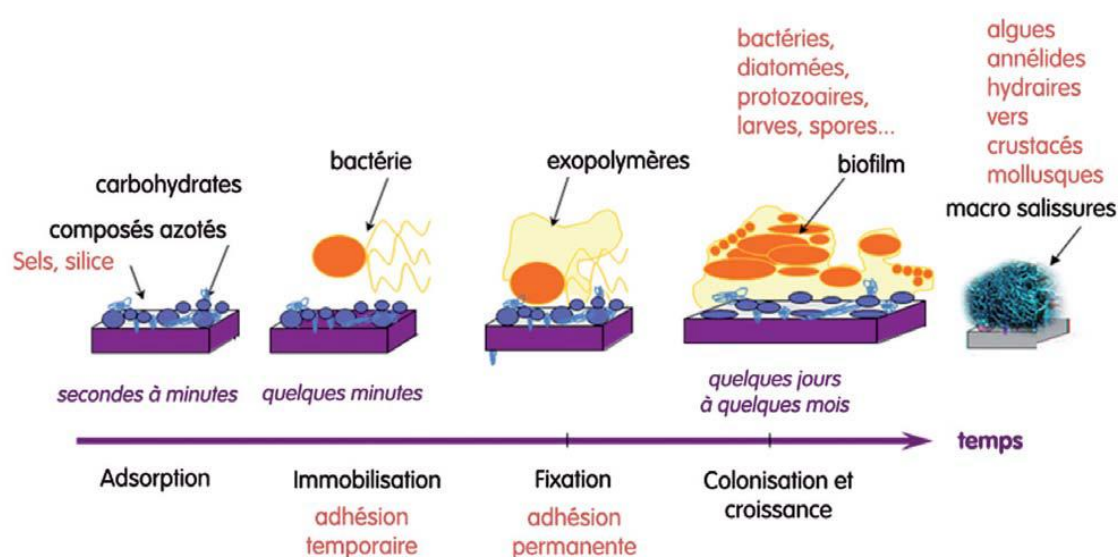


Figura 1: Le fasi principali del biofouling (Compère & Quiniou, 2009).

Le vernici antivegetative possono essere differenziate in base al modo in cui rilasciano il biocida. Esistono tre modalità d'azione distinte: vernici a matrice dura, a matrice solubile o a matrice autolucidante (Almeida et al., 2007). Il loro modo di rilascio del biocida è stato schematizzato nella figura 2.

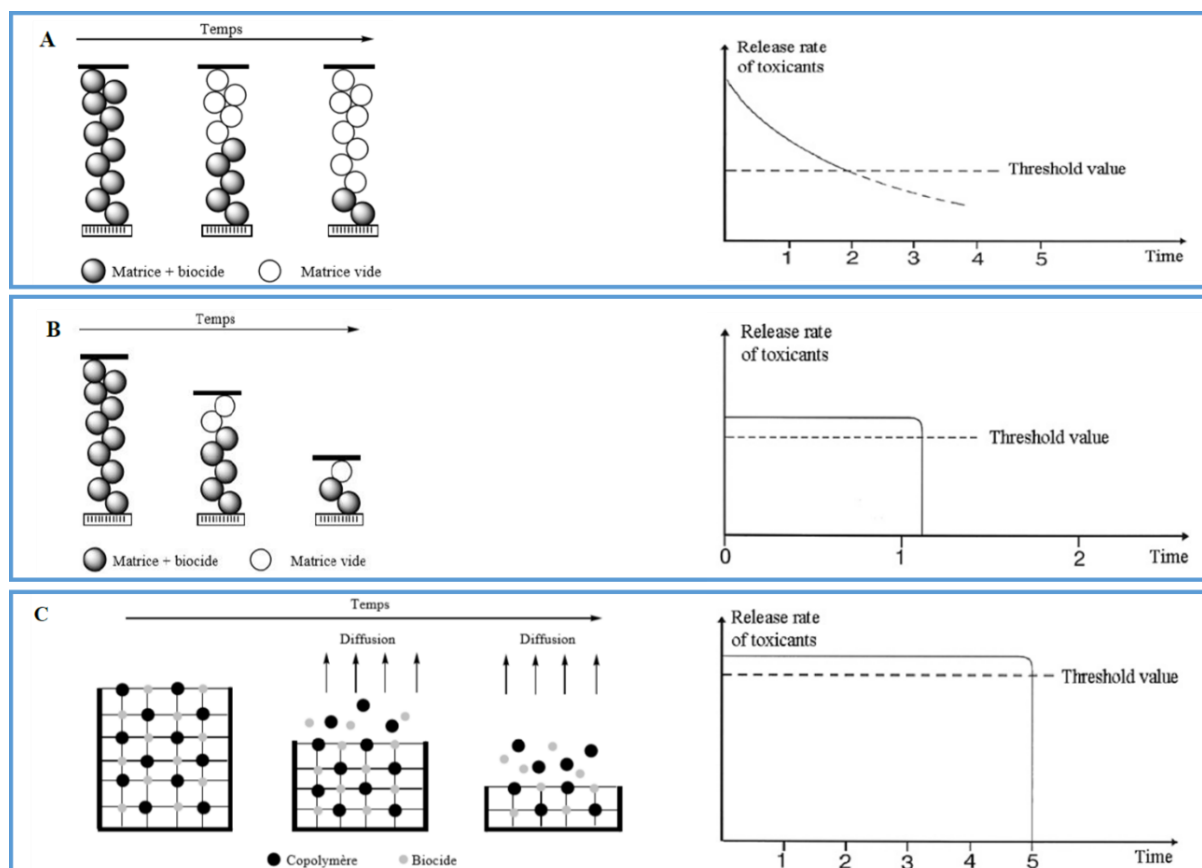


Figura 2: I tre principali tipi di vernici antivegetative utilizzate dalla metà del 20° secolo e il loro tasso di rilascio di biocidi in funzione del tempo. A. Matrice dura; B. Matrice solubile; C. Matrice autolucidante. (Jellali, 2008), (Almeida et al., 2007)

Le vernici a matrice dura (Figura 2.A) sono caratterizzate da una matrice polimerica insolubile che non si erode in acqua di mare, contenente un biocida e pigmenti solubili (Yebra et al., 2004). Il pigmento si dissolve gradualmente a contatto con l'acqua di mare e crea pori che permettono al biocida di diffondersi sulla superficie della vernice (Yebra

et al., 2004), (Almeida et al., 2007). Dopo un certo tempo, lo ione biocida deve diffondersi attraverso uno strato troppo spesso per poter mantenere un tasso di rilascio sufficiente a svolgere il suo ruolo di agente antivegetativo. Anche se queste vernici sono resistenti alla screpolatura e alla foto-ossidazione quando sono esposte all'aria aperta, la loro durata di vita estremamente breve è responsabile della diminuzione del loro uso (Yebra et al., 2004).

Le vernici a matrice solubile (Figura 2.B) sono state sviluppate per compensare la perdita di efficienza delle vernici a matrice dura. Sono costituiti da un legante resinoso che incorpora pigmenti tossici. Il principio di base è lo stesso delle vernici a matrice dura, cioè il rilascio del biocida dai pori creati dall'acqua di mare, tranne che la matrice si dissolve gradualmente nell'acqua di mare per ridurre lo spessore dello strato di diffusione (Almeida et al., 2007; Yebra et al., 2004). Questo ha l'effetto di prolungare l'azione biocida, ma ha diversi svantaggi. In primo luogo, la nave deve essere in movimento per dissolvere efficacemente la matrice. A riposo, il potere antifouling è quindi minore (Almeida et al., 2007). Inoltre, la resina non può impedire all'acqua di mare di penetrare all'interno della matrice, che può formare tappi di sale e quindi bloccare i pori permettendo la diffusione del biocida (Almeida et al., 2007). Inoltre, l'erosione costante della vernice significa che deve essere riapplicata ogni 12-18 mesi al massimo. Infine, queste vernici sono sensibili alla foto-ossidazione quando sono fuori dall'acqua (durante la manutenzione delle navi per esempio) (Yebra et al., 2004).

Le più recenti vernici a matrice autolucidanti (Figura 2.C) consistono in un legante polimerico insolubile in acqua e un pigmento tossico (Almeida et al., 2007). Il pigmento si separa dalla matrice polimerica seguendo un lento meccanismo di idrolisi che porta alla dissoluzione dei due agenti. Il biocida sarà così rilasciato gradualmente, il polimero superficiale si eroderà e un nuovo strato attivo emergerà. Questa modalità d'azione aumenta notevolmente la vita della vernice e permette un rilascio costante del biocida (Compère & Quiniou, 2009).

Nonostante la loro diversa modalità d'azione, queste vernici utilizzano per lo più il rame come biocida, che fa parte degli elementi metallici in traccia (MTE). Gli MTE sono metalli o metalloidi presenti nell'ambiente marino in concentrazioni molto basse e in diverse forme chimiche (Lead e Wilkinson, 2006). Alcuni di questi elementi sono essenziali per la vita, come il rame, ma possono essere tossici a seconda della loro concentrazione e forma chimica (Sunda e Huntsman, 1988). Infatti, per molto tempo, la tossicità di un metallo è stata legata esclusivamente alla concentrazione dello ione libero considerato, che si pensava fosse l'unica specie reattiva alla membrana cellulare (modello dello ione libero in soluzione) (Papp, 2011). Tuttavia, alcuni composti metallici hanno dimostrato di essere in grado di suscitare anche una risposta biologica (Papp, 2011). Questi composti possono essere formati attraverso ligandi presenti nell'ambiente e talvolta ligandi appartenenti a un organismo vivente (modello di ligando biotico) (Papp, 2011). Al contrario, altri composti presenti nell'ambiente tendono a diminuire la tossicità degli MTE (Lorenzo et al., 2002). A differenza di altri inquinanti come gli idrocarburi, gli MTE non sono biodegradabili e si accumulano nei sedimenti, il che può causare problemi di tossicità quando vengono risospesi (Papp, 2011). Alcuni metalli come il mercurio possono anche bioaccumularsi o addirittura biomagnificarsi e avere un impatto sull'intera catena alimentare, causando anche problemi di salute umana (Miramand et al., 2006). Per tutte queste ragioni, è importante studiare il comportamento dei metalli nell'ambiente marino. Poiché il rame e lo zinco sono i principali biocidi nelle vernici antivegetative, questo studio si è concentrato più specificamente su questi elementi.

2. Campioni

Per studiare il rilascio di Cu e Zn dalle vernici antivegetative, piastre di policarbonato ricoperte di vernice antivegetativa sono state immerse in acqua di mare in mesocosmi. Diversi campioni sono stati presi dal Porto di Tolone, situato nel Mediterraneo nord-

occidentale. Il Porto diviso in due parti separate da una diga. La Piccola Rada a ovest della diga è antropizzata e il rinnovo delle acque è basso (Dufresne et al., 2014). A causa delle attività umane in questa zona (porto civile e militare), gli scarichi di metalli sono significativi e i metalli si accumulano sia nelle acque superficiali che nei sedimenti (Tessier et al., 2011). La Grande Rada, a est del frangiflutti, è semichiusa e le sue acque sono rinnovate da uno scambio costante con il Mediterraneo (Rossi, 2008). Tuttavia, è anche soggetto alle immissioni di MTE dalla Piccola Rada, che possono aumentare durante il periodo di Mistral (Dufresne et al., 2014).

Il campionamento dell'acqua di mare (uno per quadro) è stato effettuato nella rada grande (Figura 3) utilizzando una pompa in teflon con spinta di azoto Asti, i cui tubi in teflon sono stati precedentemente sciacquati tre volte con acqua milli-Q, una volta con HNO₃ 10% (Merck, pro-analisi) poi tre volte con acqua Milli-Q. Questo protocollo di risciacquo è stato utilizzato anche per tutte le attrezzature utilizzate in questo studio. Per ogni campione, sono stati misurati i contenuti iniziali di Cu, Zn e DOC e l'abbondanza di fitoplancton e procarioti eterotrofi. L'acqua di mare è stata utilizzata come tale negli esperimenti immediatamente dopo il campionamento.

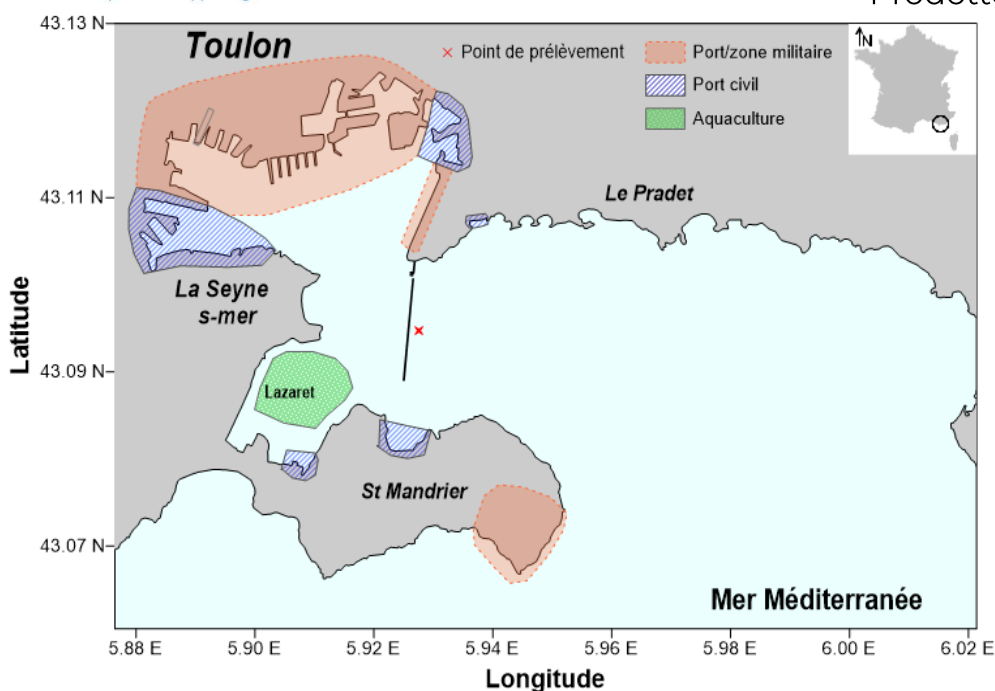


Figura 3: Mappa del porto di Tolone e delle sue principali zone di attività. La croce rossa rappresenta il punto di campionamento scelto per gli esperimenti del mesocosmo.

3. Vernici utilizzate

Sono state utilizzate tre vernici antivegetative del marchio HempelTM : una vernice a matrice autolucidante (AP), una vernice a matrice dura (MD) e una vernice a matrice solubile (MS). Le formulazioni delle tre vernici sono riassunte nella Tabella 1. Questa tabella è anche disponibile sotto forma di aletta alla fine del rapporto. È consigliabile tenerlo davanti a sé perché vi si farà riferimento spesso.

Tabella 1: Riassunto dei composti contenuti nelle vernici HempelTM utilizzate negli esperimenti di questo studio. Dati ottenuti dalle schede tecniche dei fornitori.

	Tiocianato di rame (%)	Ossido di rame (%)	Ossido di zinco (%)	Zinco piritione (%)
vernice AP	10 - 25		5 - 10	1 - 3
vernice MD	10 - 25		5 - 10	1 - 3
vernice MS		25 - 50	10 - 25	

L'interesse di utilizzare queste tre vernici è quello di confrontare gli effetti della modalità di rilascio e la formulazione sulle concentrazioni di metalli, la loro speciazione, il tipo di composti organici rilasciati e la loro tossicità per i microrganismi. A causa della modalità di funzionamento relativamente breve in relazione alla vita utile delle vernici, si può concordare che le vernici AP e MS hanno modalità di rilascio simili (Figura 2) ma una formulazione diversa in termini di composti biocidi, così come in termini di concentrazioni di rame, che sono circa il doppio per la vernice MS quando si considera la metà degli intervalli di concentrazione (Tabella 1). Queste due vernici permetteranno di confrontare l'effetto della formulazione. Al contrario, le vernici AP e MS hanno una diversa modalità di rilascio (Figura 2) e saranno considerate come aventi concentrazioni di tiocianato di rame equivalenti (Tabella 1), il che permetterà di confrontare gli effetti della sola modalità di rilascio.

Diverse lastre di policarbonato sono state tagliate e poi lavate in un bagno di acido nitrico al 10% (Merck, pro-analisi) prima di essere dipinte. Per limitare le distorsioni inerenti all'applicazione della vernice, sono stati applicati su una superficie identica (6,30 cm²) utilizzando un aerografo Tamiya. Una diluizione di circa 85/15 vernice/diluente in volume era necessaria per garantire la corretta spruzzatura dei

prodotti. Sei patch per vernice sono state dipinte e poi asciugate per 24 ore sotto una cappa aspirante.

4. Dispositivo sperimentale

Per ogni vernice, le piastre sono state poste in tre mesocosmi (triplicati analitici) di HDPE (High Density PolyEthylene) contenenti 20 L di acqua di mare appena raccolta, e anche in tre mesocosmi arricchiti con 20 mg L⁻¹ di acidi umici (sale di sodio di acido umico[®], rif H16752-100G, Aldrich[®]), sotto leggera agitazione (Figura 4). Gli acidi umici sono stati scelti perché sono un costituente delle sostanze umiche. Le sostanze umiche sono residui di materia organica in grado di resistere alla degradazione della materia vegetale e sono in grado di controllare la biodisponibilità di alcuni metalli (Ondrasek et al., 2018). Sei mesocosmi di controllo da 1 L (HDPE) sono stati anche preparati e studiati nello stesso periodo di tempo, ma senza piastre di vernice, per monitorare il destino dei microrganismi.

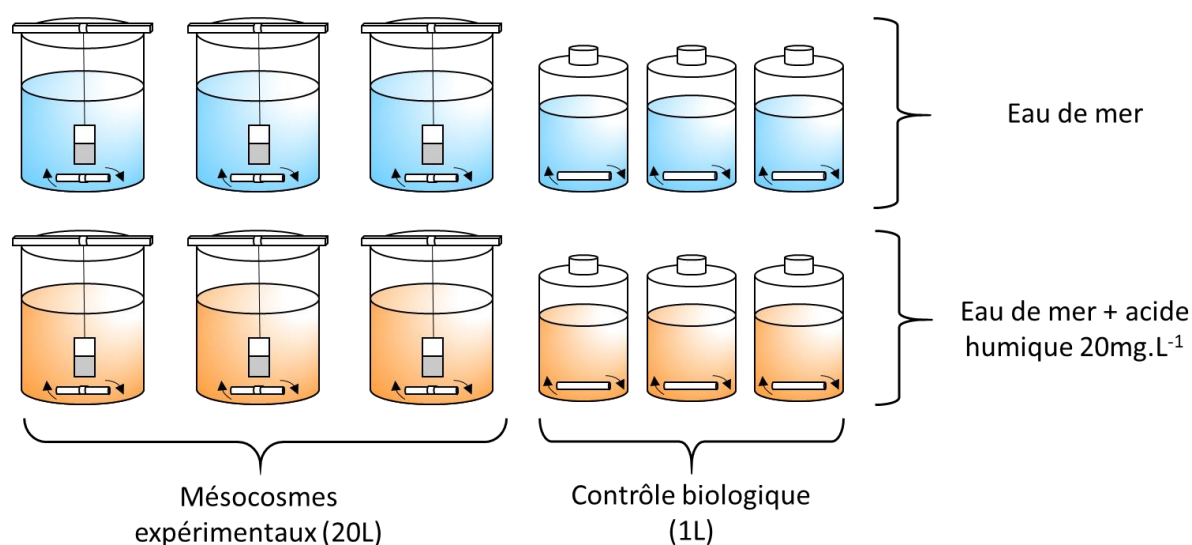


Figura 4: Dispositivo sperimentale utilizzato per ogni vernice studiata

I campioni sono stati poi presi a diverse cinetiche (Figura 5). Si è scelto di campionare ad alcune cinetiche brevi (1 h, 3 h, 7 h e 24 h) e poi a cinetiche più lunghe (48 h, 1 settimana (168 h), 2 settimane (336 h)) per osservare il rilascio del biocida dalle vernici per un lungo periodo di tempo. Inoltre, per ogni vernice, un mesocosmo contenente una piastra dipinta e acqua di mare non drogata con materia organica è stato tenuto per il campionamento ogni settimana per 12 settimane.

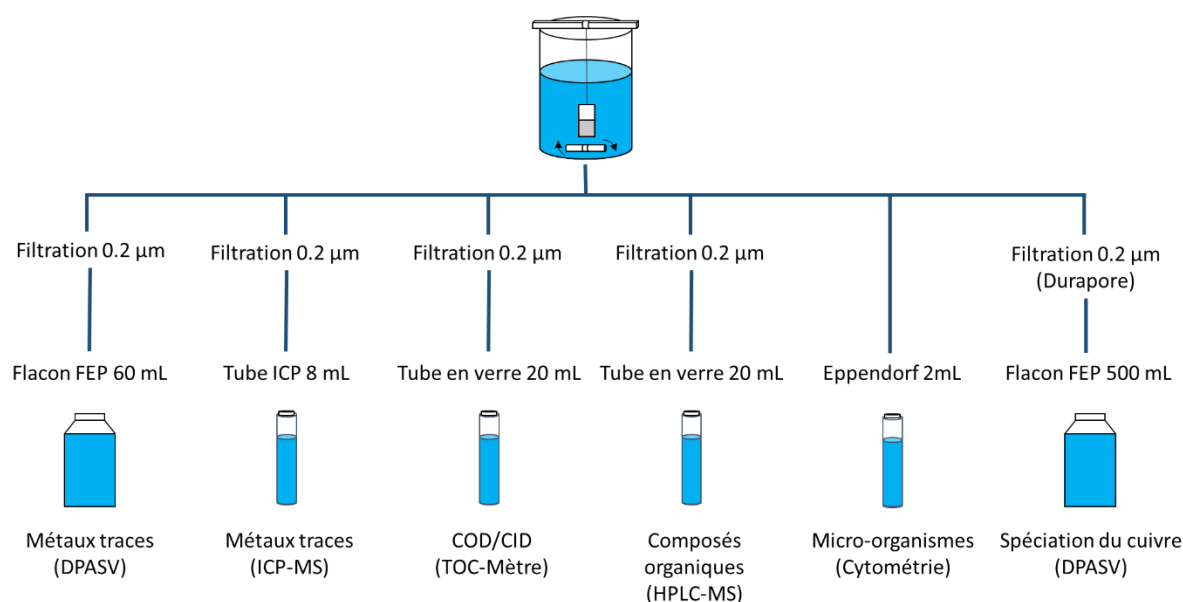


Figura 5: Riassunto dei diversi campionamenti effettuati per ogni mesocosmo da 20L e per ogni vernice studiata.

5. Metodo analitico: citometria a flusso

La citometria a flusso consiste nell'analisi ottica delle particelle attraverso un fluido che le guida davanti a un raggio laser. Il principio è quello di studiare le proprietà di diffusione e di fluorescenza naturale o indotta (tramite l'aggiunta di un marcatore) dei microrganismi.

Per ogni campione, 1 mL di campione è stato fissato con 10 μ L di glutaraldeide (microscopia). Dopo 10 minuti di incubazione al buio, i campioni sono stati conservati a -60°C. L'analisi dei campioni è stata eseguita con un Accuri C6 FlowCytometer C.SamplerTM utilizzando il software di acquisizione BD C.SamplerTM. Sono stati eseguiti due tipi di analisi: quella dei procarioti eterotrofi e quella del fitoplancton. Per l'analisi dei procarioti eterotrofi, 100 μ L di campione sono stati mescolati con una soluzione filtrata da 0.2 μ m di 38 g L⁻¹ NaCl a cui sono stati aggiunti 2 μ L di marker SyberGreen 0.01M, seguito da un'incubazione di 10 minuti. Sono stati poi discriminati contando solo le particelle piccole, con un basso livello di complessità e una fluorescenza dovuta solo al SyberGreen. L'analisi del fitoplancton è stata eseguita senza preparazione preliminare utilizzando 250 μ L di campione. È stato poi discriminato contando solo le particelle che fluorescono nel rosso della ficoeritrina (Cabrol et al., 2017).

6. Cinetica di rilascio del rame

Le concentrazioni di rame disciolto (Figura 6) aumentano nel tempo indipendentemente dalla vernice (AP, MD, MS) o dal mezzo contenuto nei mesocosmi. Le concentrazioni massime rilasciate sono dell'ordine di 2000 nM in acqua di mare e 600 nM in acqua di mare arricchita con acido umico. Poiché i mesocosmi sono protetti dalla polvere atmosferica, è possibile assimilare questo aumento solo al rilascio di rame dalle vernici antivegetative.

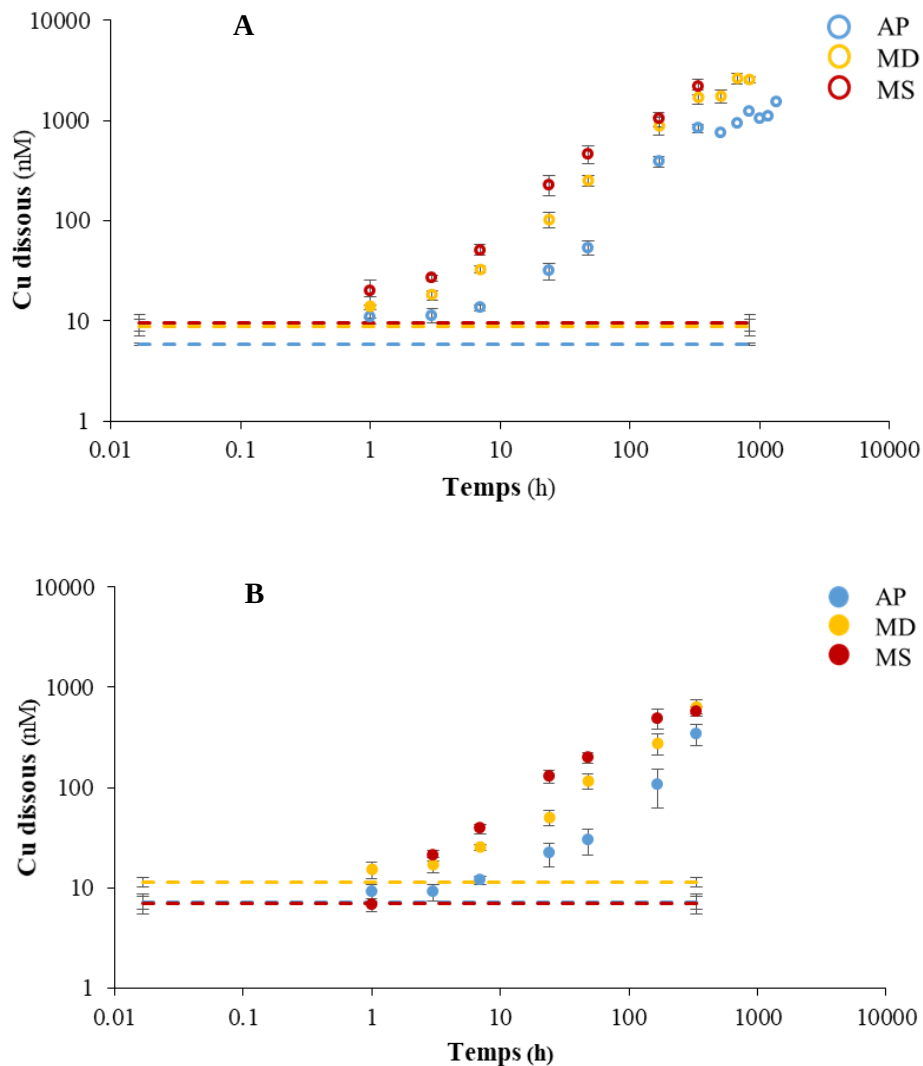


Figura 6: Concentrazioni di rame disciolto nel tempo in mesocosmi di acqua di mare (6.A) arricchiti in acidi umici (6.B). Le linee tratteggiate rappresentano le concentrazioni di rame disciolto prima dell'aggiunta delle piastre di vernice. In blu: vernice autolucidante. In giallo: vernice a matrice dura. In rosso: vernice a matrice solubile.

In acqua di mare (Figura 6.A), la vernice autolucidante (AP) rilascia meno rame delle vernici a matrice dura (HM) e solubile (SM). Infatti, dopo due settimane, il fattore di arricchimento (Equazione 1) per il rame in acqua di mare è 150 per AP contro 200 e 230 per HM e HM.

$$(1) \quad F_i = \frac{[M]_i}{[M]_0}$$

Con:

- F_i il fattore di arricchimento al tempo i .
- $[M]_i$ e $[M]_0$ le concentrazioni di metallo al tempo i e nell'acqua di mare iniziale.

Questa tendenza è già stata osservata in esperimenti preliminari di rilascio (Pagès, 2018). Le vernici con una formulazione simile (stessa forma e quantità di rame, Tabella 1), cioè AP e MD, hanno un fattore di arricchimento diverso, suggerendo un'influenza del modo di funzionamento sul rilascio di rame. Le vernici con una modalità di rilascio simile (AP e MS) ma formulazioni diverse in termini di composti e quantità hanno anche diversi fattori di arricchimento. Questo suggerisce che anche la formulazione ha un'influenza. Tuttavia, è stato considerato che la concentrazione nella vernice è due volte più alta per MS che per AP, mentre il rapporto tra i loro fattori di arricchimento è solo 1,33. Quindi, o (1) l'ipotesi di una modalità d'azione simile per un breve periodo di tempo è errata, o (2) il rapporto delle concentrazioni effettive nelle vernici non è 2. Per discriminare quest'ultima ipotesi, tre piastre aggiuntive per vernice sono state dipinte nello stesso modo di quelle utilizzate negli esperimenti di questo studio. La vernice è stata poi raschiata e mineralizzata per l'analisi del metallo totale.

In acqua di mare arricchita di acidi umici (Figura 6.B), le concentrazioni di rame seguono le stesse tendenze dell'acqua di mare, ma con un'ampiezza minore (concentrazione massima 600 nM contro 2000 nM in acqua di mare). I fattori di arricchimento a due settimane sono 50 per AP, 60 per MD e 80 per MS (rispetto a 150, 200 e 230 senza acidi umici, rispettivamente). Le concentrazioni di carbonio organico disciolto (DOC) (Figura 7) possono fornire informazioni su questo fenomeno. Nei mesocosmi di acqua di mare, questi rimangono stabili (Figura 7.A) dall'inizio dell'esperimento fino a 2 settimane (336h). A partire da 2 settimane, la concentrazione aumenta leggermente nei

mesocosmi contenenti AP e MD e questa tendenza è osservabile anche per i campioni prelevati dopo 2 settimane.

7. Cinetica di rilascio dello zinco

Come il rame, le concentrazioni di zinco dissolte (Figura 7) aumentano nel tempo indipendentemente dalla vernice (AP, MD, MS) o dal mezzo contenuto nei mesocosmi, con concentrazioni massime dell'ordine di 2000 nM in acqua di mare e 1900 nM in acqua di mare arricchita in acidi umici.

In acqua di mare (Figura 7.A), i valori di concentrazione di zinco dissolto per la vernice AP sono anormalmente alti a una settimana (168h) e a due settimane (336h). Questo può essere spiegato dalla contaminazione da zinco, dato che gli esperimenti non sono stati eseguiti in una camera bianca. I confronti tra le vernici saranno quindi fatti a 48h invece che a due settimane. A 48 h, i fattori di arricchimento di zinco sono 17 ± 3 per AP, 26 ± 6 per MD e 15 ± 3 per MS. Poiché questi fattori non sono significativamente diversi, non è possibile concludere sull'influenza della modalità di rilascio e la composizione della vernice sulle concentrazioni di zinco.

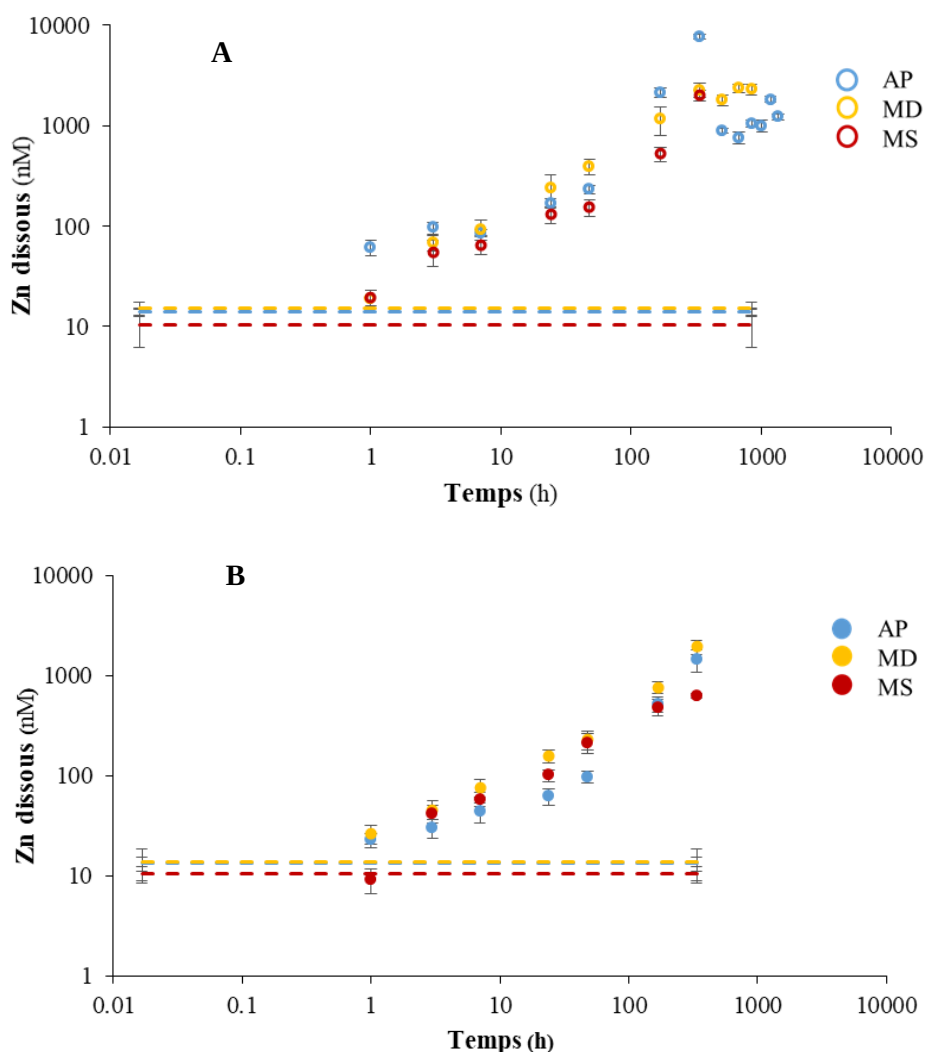


Figura 7: Concentrazioni di zinco disciolto nel tempo in mesocosmi di acqua di mare (8.A) arricchiti in acidi umici (8.B). Le linee tratteggiate rappresentano le concentrazioni di zinco prima dell'aggiunta delle piastre di vernice. In blu: vernice autolucidante. In giallo: vernice a matrice dura. In rosso: vernice a matrice solubile.

In acqua di mare arricchita con acidi umici (Figura 7.B), la piastra di vernice AP ha rilasciato meno zinco (fattore di arricchimento di 7 contro 17). Il rilascio di vernici MD e MS non sembra essere influenzato (fattori di arricchimento di 16 e 20 contro 26 e 15 in acqua di mare). Le ipotesi fatte per le concentrazioni di rame non sono quindi valide per lo zinco, poiché la lisciviazione non sembra essere influenzata dall'aggiunta di

materia organica. Tuttavia, questo elimina l'ipotesi della formazione di una pellicola di materia organica sulle piastre che impedirebbe la liberazione dei metalli, poiché impatterebbe rame e zinco allo stesso modo.

8. Studio dei microrganismi

In condizioni di controllo (Figura 8), la popolazione di fitoplancton diminuisce bruscamente e scende a quasi zero dopo una settimana, sia in acqua di mare che in acqua di mare arricchita di acido umico (Figura 8.A). Questo indica che le condizioni sperimentali non erano adatte alla crescita del fitoplancton, specialmente le condizioni di illuminazione. Le popolazioni in presenza di vernice sono scese a zero individui dopo una settimana. Non è stato quindi possibile differenziare l'effetto delle condizioni sperimentali e della vernice sul fitoplancton. La popolazione di procarioti eterotrofi (Figura 8.B) è variata poco durante l'esperimento, sia in acqua marina che in acqua marina arricchita di acidi umici. Inoltre, le densità delle popolazioni nell'acqua di mare non sembrano essere significativamente diverse dalle popolazioni presenti nell'acqua di mare arricchita con acido umico (Figura 8.B), suggerendo che queste ultime non sono utilizzate dai batteri.

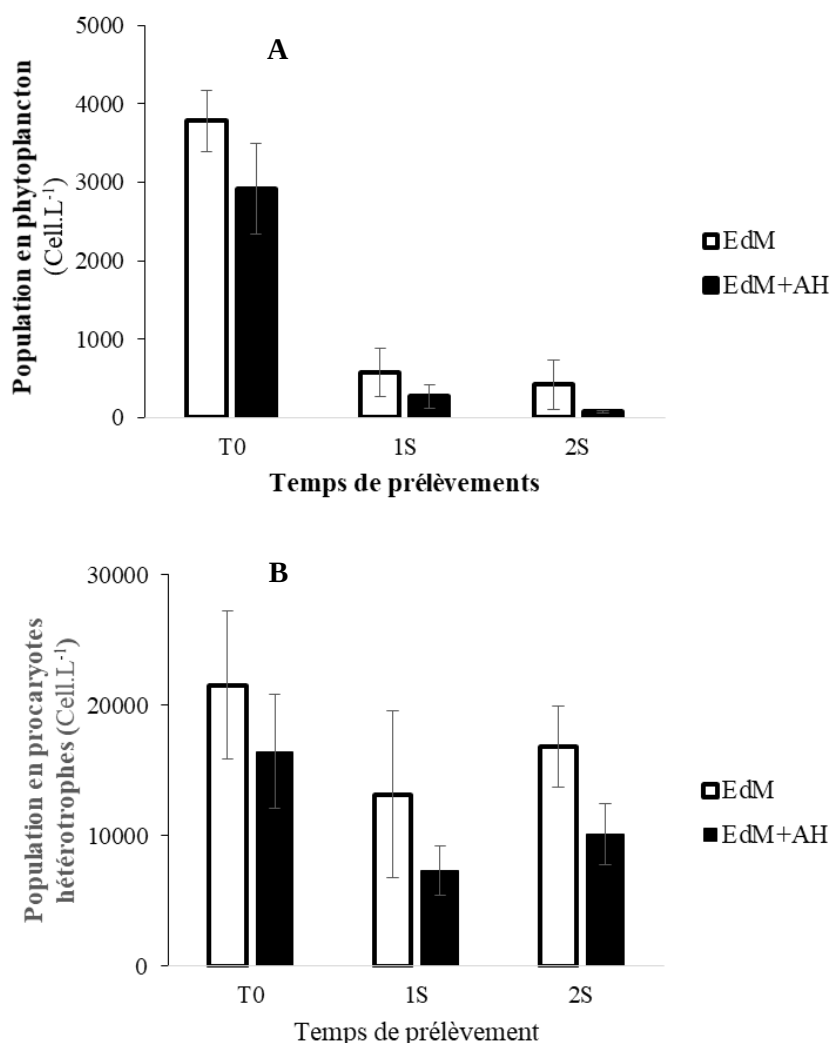


Figura 8: Popolazione dei mesocosmi di controllo in fitoplancton (13.A) e procarioti eterotrofi (13.B). In bianco: Mesocosmi contenenti acqua di mare; In nero: Mesocosmi contenenti acqua di mare arricchita in acidi umici. Le popolazioni sono state calcolate facendo la media delle popolazioni nei mesocosmi di controllo di tutte le vernici per ogni periodo di tempo (n=9).

Al fine di studiare le variazioni di popolazione nei procarioti eterotrofi rispetto ai controlli, un fattore di arricchimento E è stato calcolato per ogni vernice e passo temporale (Equazione 3) e riportato nella Figura 9.

$$(2) \quad E_i = \frac{P_i}{p_i}$$

Con:

- E_i il fattore di arricchimento alla fase temporale i di una popolazione in un mesocosmo con vernice rispetto al mesocosmo di controllo alla fase temporale i .
- P_i la popolazione di procarioti eterotrofi in un mesocosmo con pittura al passo temporale i .
- p_i la popolazione di procarioti eterotrofi nel mesocosmo di controllo alla fase temporale i .

Sia in acqua di mare (Figura 9.A) che in acqua di mare arricchita in acidi umici (Figura 9.B), la crescita delle popolazioni in contatto con vernici autopulenti (AP) e a matrice solubile (SM) non è stimolata da queste ultime ($E \approx 1$ per tutto l'esperimento). Per i procarioti eterotrofi in contatto con MD in acqua di mare, $E = 4,4 \pm 1,3$ a una settimana e $E = 3,3 \pm 0,7$ a due settimane. Per i procarioti eterotrofi in contatto con MD in acqua di mare arricchita di acido umico, $E = 5,3 \pm 0,4$ a una settimana ed $E = 11,0 \pm 1,1$ a due settimane. La crescita delle popolazioni in contatto con la vernice a matrice dura (HM) sembra quindi essere stimolata da quest'ultima, potenzialmente dal rilascio di composti favorevoli alla crescita di questi procarioti. La maggiore crescita a due settimane in presenza di acidi umici è probabilmente dovuto alle concentrazioni più basse di metalli in questo mezzo (Figura 6; Figura 7), che sono quindi meno probabilità di essere tossici. Tuttavia, questo comportamento non è osservabile per le popolazioni in contatto con altre vernici, dimostrando che l'effetto delle vernici sui microrganismi non è solo dovuto alle concentrazioni di metalli rilasciati.

Infatti, a due settimane, la concentrazione di rame nei mesocosmi contenenti AP è inferiore a quella dei mesocosmi contenenti MD. Poiché la tossicità di un metallo dipende dalla sua concentrazione, ci dovrebbe essere più crescita di procarioti eterotrofi in mesocosmi contenenti AP, che non è il caso. Le vernici AP e MD hanno formulazioni simili (Tabella 1) e diverse modalità di rilascio (Figura 2), con rilascio del

biocida per idrolisi e dispersione della matrice polimerica AP e diffusione del biocida nei pori della vernice MD. La vernice autolucidante rilascia poi potenzialmente altri composti che potrebbero essere tossici, come i gruppi tiocianati. Questi risultati indicano un'influenza del metodo di rilascio sulla tossicità delle vernici antivegetative.

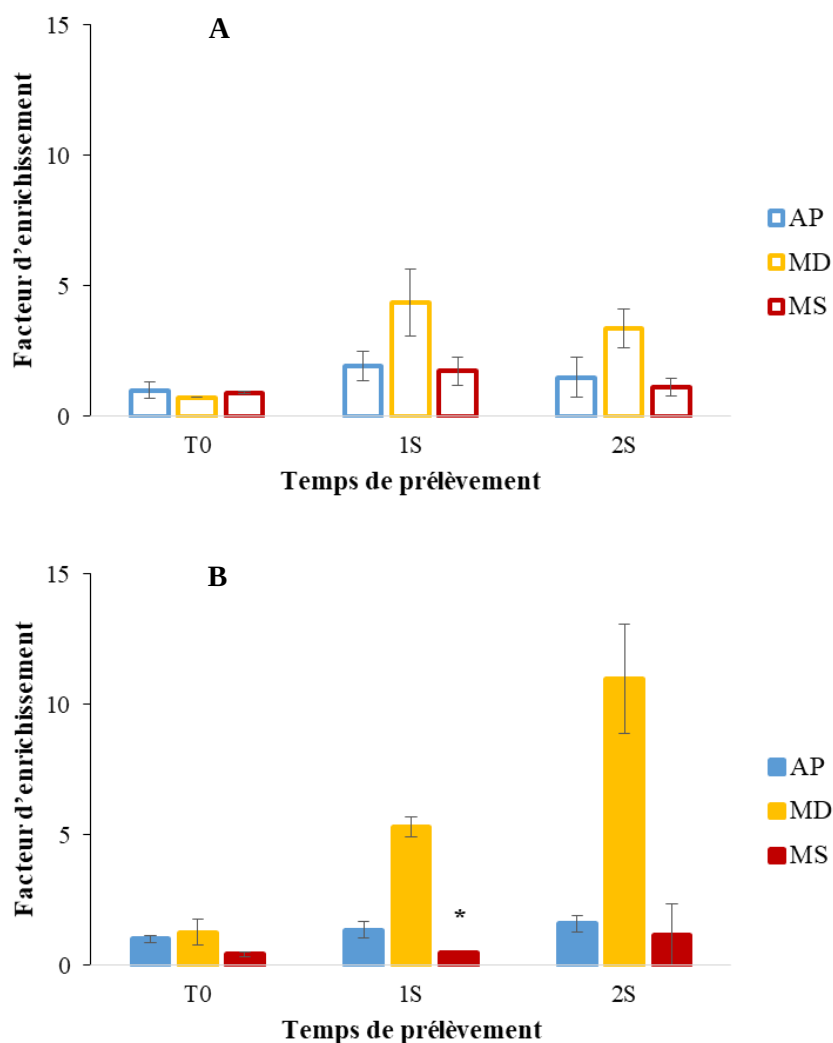


Figura 9: Fattori di arricchimento dei procarioti eterotrofi al momento iniziale, dopo una settimana e dopo 2 settimane per le tre vernici nei mesocosmi contenenti le piastre di vernice e acqua di mare (14.A) e acqua di mare arricchita in acidi umici (14.B). $F > 1$: stimolazione della crescita da parte della vernice; $F = 1$: nessun effetto osservabile della vernice; $F < 1$: effetto tossico della vernice. I valori contrassegnati da un asterisco sono quelli per i quali la deviazione standard è troppo grande per essere affidabile.

9. Conclusione

Lo studio dei microrganismi ha rivelato che le condizioni sperimentali non erano adatte al fitoplancton, impedendoci di concludere sull'effetto delle vernici su di loro. Se questo è possibile, i prossimi esperimenti dovrebbero essere effettuati in una stanza climatica che riproduca un ciclo giorno/notte con una buona illuminazione. Lo studio dei procarioti eterotrofi, tuttavia, ha fornito informazioni sull'influenza del modo in cui le vernici vengono rilasciate sulla loro tossicità. Inoltre, alcune approssimazioni sono state fatte per la stesura di questo documento come conseguenza delle deviazioni standard relativamente grandi relative alla biologia. Uno studio statistico più dettagliato del tipo ANOVA dovrebbe far luce su questo problema.

Bibliographie - Bibliografia

- Almeida, E., Diamantino, T.C., de Sousa, O., 2007. Marine paints: The particular case of antifouling paints. *Progress in Organic Coatings* 59, 2–20.
- Alzieu, C., Thibaud, Y., Heral, M., & Boutier, B., 1980. Evaluation des risques dus à l'emploi des peintures anti-salissures dans les zones conchylicoles. *Rev. Trav. Inst STPM*, 44, 301-348.
- Azemar, F., Faÿ, F., Réhel, K., & Linossier, I., 2015. Development of hybrid antifouling paints. *Progress in Organic Coatings*, 87, 10-19.
- Boxall, A.B.A., Comber, S.D., Conrad, A.U., Howcroft, J., Zaman, N., 2000. Inputs, Monitoring and Fate Modelling of Antifouling Biocides in UK Estuaries. *Marine Pollution Bulletin* 40, 898–905.
- Bryan, G. W., Gibbs, P. E., Hummerstone, L. G., & Burt, G. R., 1986. The decline of the gastropod *Nucella lapillus* around south-west England: evidence for the effect of tributyltin from antifouling paints. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 66(3), 611-640.
- Cabrol, L., Quéméneur, M., Misson, B., 2017. Inhibitory effects of sodium azide on microbial growth in experimental resuspension of marine sediment. *Journal of Microbiological Methods* 133, 62–65
- Compère, C., & Quiniou, F., 2009. La chimie à l'assaut des biosalissures. In *La Chimie et La Mer*. (p. 207). EDP Sciences
- Desaunay, A., 2011. Etude et modélisation de la biosorption des métaux par les bactéries. Application au transfert du cadmium et du zinc, seuls ou en mélange par *Escherichia coli* et *Cupriavidus metallidurans* en colonnes de sable d'Hostun 249.
- Dufresne, C., Duffa, C., Rey, V., 2014. Wind-forced circulation model and water exchanges through the channel in the Bay of Toulon. *Ocean Dynamics* 64, 209–224.
- Féron, D., Compère, C., Dupont, I., & Magot, M., 2002. Biodétérioration des matériaux métalliques ou biocorrosion. Béranger G, et Mazille H (eds) *Corrosion des métaux et alliages*. Lavoisier, Paris, 385-405.

Jellali, R., 2008. Elaboration de revêtements antifouling par photoréticulation d'oligoisoprènes fonctionnalisés: étude de leurs activités antibactériennes, antifongiques et antialgales (Doctoral dissertation, Le Mans).

Lavoie, M., Campbell, P.G.C., Fortin, C., 2016. Importance de mieux connaître les mécanismes de transport des métaux pour la prédiction de l'accumulation et de la toxicité des métaux dissous chez le phytoplancton : récentes avancées et défis pour le développement du modèle du ligand biotique. *Revue des sciences de l'eau* 29, 119.

Lead, J.R., Wilkinson, K.J., 2006. Aquatic Colloids and Nanoparticles: Current Knowledge and Future Trends. *Environmental Chemistry* 3, 159.

Lorenzo, J. I., Nieto, O., & Beiras, R., 2002. Effect of humic acids on speciation and toxicity of copper to *Paracentrotus lividus* larvae in seawater. *Aquatic Toxicology*, 58(1-2), 27-41.

Miramand, P., Bustamante, P., Bentley, D., Kouéta, N., 2006. Variation of heavy metal concentrations (Ag, Cd, Co, Cu, Fe, Pb, V, and Zn) during the life cycle of the common cuttlefish *Sepia officinalis*. *Science of The Total Environment* 361, 132-143.

Omanović, D., Branica, M., 2003. Pseudopolarography of trace metals. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 543, 83-92.

Omanović, D., Garnier, C., Pižeta, I., 2015. ProMCC: An all-in-one tool for trace metal complexation studies. *Marine Chemistry* 173, 25-39.

Ondrasek, G., Rengel, Z., & Romic, D. (2018). Humic acids decrease uptake and distribution of trace metals, but not the growth of radish exposed to cadmium toxicity. *Ecotoxicology and environmental safety*, 151, 55-61.

Oursel, B., Garnier, C., Zebracki, M., Durrieu, G., Pairaud, I., Omanović, D., Cossa, D., Lucas, Y., 2014. Flood inputs in a Mediterranean coastal zone impacted by a large urban area: Dynamic and fate of trace metals. *Marine Chemistry* 167, 44-56.

Papp, R., 2011. Les propriétés environnementales des éléments traces. Particularités et conséquences pour l'analyse de risque. Collège National d'Experts en Environnement de l'Industrie Chimique.

Pradhan, A., Gerald, P., Seena, S., Pascoal, C., Cássio, F., 2016. Humic acid can mitigate the toxicity of small copper oxide nanoparticles to microbial decomposers and leaf decomposition in streams. *Freshwater Biology* 61, 2197–2210.

Rossi, N., 2008. Écologie des communautés planctoniques méditerranéennes et étude des métaux lourds (Cuivre, Plomb, Cadmium) dans différents compartiments de deux écosystèmes côtiers (Toulon, France) (Doctoral dissertation, Université du Sud Toulon Var).

Schultz, M.P., 2007. Effects of coating roughness and biofouling on ship resistance and powering. *Biofouling* 23, 331–341.

Soroldoni, S., Martins, S.E., Castro, I.B., Pinho, G.L.L., 2018. Potential ecotoxicity of metals leached from antifouling paint particles under different salinities. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 148, 447–452.

Souza, C., Majuste, D., Dantas, M. S. S., & Ciminelli, V. S. T., 2018. Effect of zinc ion on copper speciation and adsorption on activated carbon. *Hydrometallurgy*, 176, 78–86.

Sugimura, Y., Suzuki, Y., 1988. A high-temperature catalytic oxidation method for the determination of non-volatile dissolved organic carbon in seawater by direct injection of a liquid sample. *Marine Chemistry* 24, 105–131.

Sunda, W.G., Huntsman, S.A., 1988. Effect of sunlight on redox cycles of manganese in the southwestern Sargasso Sea. *Deep Sea Research Part A. Oceanographic Research Papers* 35, 1297–1317.

Tessier, E., Garnier, C., Mullot, J.-U., Lenoble, V., Arnaud, M., Raynaud, M., Mounier, S., 2011. Study of the spatial and historical distribution of sediment inorganic contamination in the Toulon bay (France). *Marine Pollution Bulletin* 62, 2075–2086.

Wahl, M., 1989. Marine epibiosis. I. Fouling and antifouling: some basic aspects. *Marine Ecology Progress Series* 58, 175–189.

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

Ytreberg, E., Karlsson, J., Eklund, B., 2010. Comparison of toxicity and release rates of Cu and Zn from anti-fouling paints leached in natural and artificial brackish seawater. Science of The Total Environment 408, 2459–2466.

Zitoun, R., Clearwater, S.J., Hassler, C., Thompson, K.J., Albert, A., Sander, S.G., 2019. Copper toxicity top blue mussel embryos (*Mytilus galloprovincialis*). Science of The Total Environment 653, 300–314.