



HAL
open science

Utilisation du biofilm comme indicateur fonctionnel pour la caractérisation et la surveillance des cours d'eau : développement et validation de dispositifs de détection et de mesure de la croissance de biofilms in situ (capteurs biofilms)

François Delmas, Frédéric Garabetian, Soizic Morin, V. Roubéix, A.C. Martins Azevedo, S. Bernardet, S. Boulêtreau, J.Y. Charcosset, E. Lyautey, S. Mastrorillo, et al.

► To cite this version:

François Delmas, Frédéric Garabetian, Soizic Morin, V. Roubéix, A.C. Martins Azevedo, et al.. Utilisation du biofilm comme indicateur fonctionnel pour la caractérisation et la surveillance des cours d'eau : développement et validation de dispositifs de détection et de mesure de la croissance de biofilms in situ (capteurs biofilms). [Rapport de recherche] Irstea. 2010, pp.180. hal-02594683

HAL Id: hal-02594683

<https://hal.inrae.fr/hal-02594683>

Submitted on 15 May 2020

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

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



**ACTION INTERREGIONALE AQUITAINE & MIDI-PYRENEES
RECHERCHE & TRANSFERT DE TECHNOLOGIE
A.O. 2006 et 2007**

Rapport sur le projet

SurF (Surveillance des cours d'eau par les bioFilms)

*Utilisation du biofilm comme indicateur fonctionnel pour la
caractérisation et la surveillance des cours d'eau :
développement et validation de dispositifs de détection et de
mesure de la croissance de biofilms in situ
(capteurs biofilms).*

achevé le 18 mars 2010, par :

F. Delmas¹ et F. Garabetian^{2,3}
Responsables scientifiques

Co-auteurs :

S. MORIN¹, V. ROUBEIX¹, A.-C. MARTINS – AZEVEDO¹

S. BERNARDET², S. BOULETREAU², J.-Y. CHARCOSSET², E. LYAUTEY², S. MASTRORILLO², C. PINEAU²



¹ : Unité de Recherche REBX, CEMAGREF, 50 avenue de Verdun, 33 612 Cestas cedex

² : EcoLab UMR 5245, Université Paul Sabatier, 118 route de Narbonne, 31 062 Toulouse cedex 9

³ : EPOC – Station Marine d'Arcachon, Université Bordeaux 1, 2 rue Jolyet, 33 160 Arcachon (*adresse actuelle*)

Plan

1. Contexte et participants	3
2. Représentativité de la surface de colonisation, incidence sur la taille du capteur	13
<i>Partenaires impliqués : ECOLAB, REBX/CEMAGREF</i>	
3. Mesure de l'épaisseur et de l'élasticité des biofilms de rivière par voltammétrie basée sur l'utilisation d'électrode disque plan tournant	45
<i>Partenaires impliqués : ECOLAB, REBX/CEMAGREF, OTE/IMFT, LISE</i>	
4. Electroactivité des biofilms de rivière : détection à l'échelle de la communauté et à l'échelle de populations bactériennes constitutives (isolats)	83
<i>Partenaires impliqués : ECOLAB, REBX/CEMAGREF, LGC</i>	
5. Détermination par fluorescence <i>in vivo</i> de l'abondance des grands groupes de microalgues constitutifs du biofilm	121
<i>Partenaire impliqué : REBX/CEMAGREF</i>	
6. Conclusions	171

1. Contexte et participants

1.1. Contexte et objectifs

Les milieux naturels subissent depuis plusieurs décennies une pression croissante des activités humaines qui perturbe leur intégrité et leur santé écologique. La recherche de communautés biologiques témoins de ces modifications qualitatives et quantitatives, chimiques et physiques des écosystèmes est une question qui se pose aux écologues et aux gestionnaires des milieux naturels dans l'optique d'un diagnostic de l'importance du « syndrome de l'Anthropocène » (5).

Pour les milieux aquatiques, la prise de conscience de la nécessité de ralentir, stopper, voire inverser cette dégradation a présidé à la mise en place de la directive cadre européenne sur l'eau (2000/60/CE) qui impose d'atteindre d'ici 2015 le « bon état écologique ». Le besoin sous-jacent de caractériser l'état des milieux et d'évaluer les efforts de réhabilitation des écosystèmes aquatiques suppose donc de disposer d'outils de diagnostic fiables et adaptés. Malgré l'antériorité et la fiabilité des connaissances déjà acquises sur l'eutrophisation des milieux aquatiques lenticques (lacs et cours d'eau calmes), des critères d'évaluation du niveau d'eutrophisation des cours d'eau à forte hydrodynamique font défaut (3). Le critère des nutriments proposé par certains auteurs (3) est loin d'être satisfaisant, comme l'un d'entre eux l'a lui-même en partie discuté ultérieurement (2). La réflexion que nous avons conduite sur ce thème à partir de l'exemple de la Garonne (4) rejoint celle de nombreux auteurs, ex. (6) : des indicateurs relatifs à de grandes fonctions de l'écosystème comme la production primaire ou la dégradation de la matière organique pourraient être pertinents pour la caractérisation et la surveillance des milieux aquatiques. Ces indicateurs, appelés indicateurs fonctionnels, fournissent en effet une mesure directe du fonctionnement -et donc de dysfonctionnements éventuels- de l'écosystème, et constituent une voie intéressante pour une évaluation de l'état écologique des cours d'eau.

De par ses caractéristiques structurelles et fonctionnelles et son rôle clé au sein des réseaux trophiques aquatiques, le biofilm épilithique (ou épilithon) possède un fort potentiel de bioindication. Cependant, avant de pouvoir utiliser en routine, à l'échelle d'un large réseau hydrographique, un biomonitoring opérationnel du statut écologique des rivières s'appuyant sur le biofilm, une étape préalable à maîtriser consiste en une standardisation et une automatisation de la mesure émanant de l'utilisation, en ligne, en continu et en temps réel de dispositifs de détection et de mesure de la croissance de biofilms en milieu naturel (capteurs à biofilms).

En appui aux projets développés par les équipes d'EcoLab - Toulouse et REBX/Cemagref Bordeaux, le présent projet, avait pour but d'aborder la question de la mesure des vitesses d'accrétion et/ou de la biomasse des biofilms en rivière s'appuyant sur des réponses de capteurs candidats. Le savoir-faire en matière de détection des biofilms de milieux industriels et/ou marins d'équipes d'ingénierie et génie électrochimique (LGC - Toulouse, LISE - Paris) du programme PNIR « Biofilms » du CNRS devait en effet permettre de répondre spécifiquement à ce besoin avec l'appui de l'équipe OTE/IMFT - Toulouse pour ce qui concerne les questions liées à l'écoulement et à l'hydrodynamique. Si l'objectif général reste d'appréhender la(les) réponse(s) des biofilms aux conditions environnementales dans la rivière, une étape intermédiaire devait être de qualifier la réponse des capteurs candidats aux caractéristiques de biofilms de rivière.

1.2. Démarche

Dans le but de qualifier la réponse de trois capteurs candidats (1) « capteur EDT - LISE », (2) « capteur type BIOX », (3) fluoroprobe, en fonction d'informations quantitatives et structurales des biofilms en rivière, un effort de caractérisation des communautés microbiennes de ces biofilms basé sur les approches de typage moléculaires actuelles (PCR-DGGE de l'ADNr16S, ARISA) et de détermination microscopique des communautés de micro-algues, a été mis en œuvre dans le cadre de ce projet.

Deux cours d'eau, la Garonne (31) et la Vézère (24), ont été retenus pour cette application préliminaire parce qu'ils représentent des situations hydrochimiques hydroécologiques différenciées : taille et biodiversité différentes de cours d'eau appartenant à deux hydroécorégions distinctes. Dans ces rivières, des tests de colonisation ont été réalisés afin de comparer la réponse des différents capteurs candidats et des supports artificiels plus classiquement utilisés en hydrobiologie comme des pavés de granit (Figure 1). D'autres essais ont été réalisés en canal de laboratoire à l'occasion d'expérimentations effectuées dans le cadre de programmes en collaboration avec l'équipe OTE de l'Institut de Mécanique des Fluides de Toulouse.

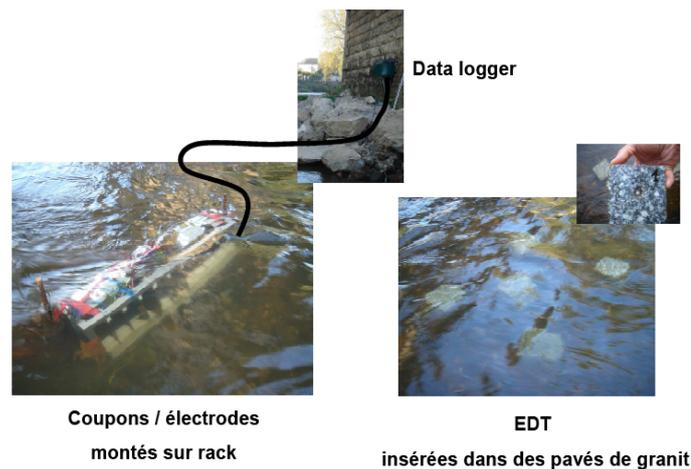


Figure 1 : Vues des coupons électrodes (capteur type Biox, LGC) et des électrodes à disque plan tournant (EDT) dans leur support dans la Vézère à Condat en novembre 2007.

En collaboration avec l'équipe REBX/Cemagref - Bordeaux, l'équipe d'EcoLab - Toulouse s'est chargée du choix des sites, de la réalisation des expérimentations et de la caractérisation des biofilms recueillis. Les équipes du LISE - Paris et du LGC - Toulouse ont fourni les capteurs candidats et ont assuré le transfert de compétences pour leur mise en œuvre sur le terrain et/ou au laboratoire. Notons que ce transfert de compétence permet aujourd'hui à l'équipe d'EcoLab - Toulouse d'effectuer des mesures de colonisation d'électrodes à disque plan tournant (EDT) par la méthode de voltammétrie de façon quasi autonome afin d'évoluer vers des possibilités d'utilisation en routine. Signalons enfin qu'une équipe du Laboratoire de Chimie et Microbiologie de l'Eau (UMR 6008) de l'Université de Poitiers travaille également sur la relation entre la qualité de l'eau et le développement des biofilms en milieu aquatique continental ; nous avons été amené à collaborer avec cette équipe (M. Bernard Parinet) dans le cadre du PNIR Biofilms.

1.3. Partenaires et participants

Equipe Ecolab - Toulouse, UMR 5245 CNRS / UPS / INPT

Université Paul Sabatier, bât. 4R3-b2, 118 route de Narbonne, 31062 Toulouse cedex

- F. GARABETIAN, MC UPS (PR Université Bordeaux 1 depuis septembre 2007), co-responsable du projet pour la partie Midi-Pyrénées,
- S. BERNARDET, Master 1 Microbiologie environnementale, Université de Pau et Pays de l'Adour, avril à juin 2008.
- S. BOULETTEAU, post-doctorante sur ressources propres,
- J.-Y. CHARCOSSET, CR CNRS,
- E. LYAUTEY, post-doctorante allocation Région Midi Pyrénées 2008-2009,
- S. MASTRORILLO, MC UPS,
- C. PINEAU, Master 1 Sciences de la Terre, Environnement, Ecologie, Univ. Bordeaux 1, avril à juin 2009.

Equipe REBX / Cemagref – Bordeaux

Groupement de Bordeaux, 50 avenue de Verdun, 33612 Cestas cedex

- F. DELMAS, IC GREF, co-responsable du projet pour la partie Aquitaine,
- S. MORIN, post-doctorante SURF soutenue par une allocation d'un an Région Aquitaine (intégrée au Cemagref via concours externe de Chargé de Recherches depuis février 2010)
- V. ROUBEIX, post doctorant Cemagref sur ressources propres.
- A. C. MARTINS – AZEVEDO, Master 2 Eau, Santé, Environnement, Université Victor Segalen Bordeaux 2, avril à septembre 2009

Equipe LGC – Toulouse, UMR 5503 - INP/ENSIACET – CNRS – UPS

Laboratoire de Génie Chimique, BP84234, Campus INP-ENSIACET, 4 allée Emile Monso, 31432 Toulouse cedex4

- A. BERGEL, DR CNRS,
- L. ETCHEVERRY, IE CNRS.

Equipe OTE / IMFT – Toulouse, INP/IMFT

Institut de Mécanique des Fluides, Allée du Professeur Camille Soula, 31400 Toulouse

- F. MOULIN, MC UPS,
- O. EIFF, (PR UPS),
- Y. PELTIER, Master 2 Hydrologie, Hydrochimie, Sol et Environnement, ENSHEEIT - Université Paul Sabatier 2006 - 2007.

Equipe LISE – Paris, UPR 15 CNRS

Laboratoire Interfaces et Systèmes Electrochimiques, Université Pierre et Marie Curie, 4 place Jussieu, 75252 Paris cedex 05

- B. TRIBOLLET, DR CNRS,
- J. GAMBY, CR CNRS.

1.4. Cas des PME/PMI régionales, partenaires de ce projet

NéoSENS S.A.

PROLOGUE - La Pyrénéenne, BP 2720, 31672 - LABEGE Cedex – France- www.neo-sens.com

- L. AURET, Directeur
- J. DESMAREST, Ingénieur Recherche & Développement

Au moment du dépôt du projet, la société s'est déclarée intéressée par le projet SurF dans les termes suivants : « NéoSENS dispose de prototypes de capteurs biofilms fonctionnant en ligne, en continu et en temps mais non adaptés aux milieux naturels. L'intérêt de NéoSENS est d'améliorer les performances de ces prototypes et de les valider in situ. Ceci ne pourra se faire sans la participation des laboratoires qui apportent leurs connaissances et savoir-faire dans ce domaine. La valorisation économique du projet bénéficiera du positionnement de NéoSENS sur la conception et la distribution de capteurs environnementaux.

L'objectif attendu est la commercialisation de ces capteurs par la Société NéoSENS (titre de propriété industrielle préalablement obtenu, dépôt de brevet, préparation, extension PCT), un élan vers l'ouverture à de nouveaux marchés. » (Extrait de la lettre de déclaration d'intention de Mme J Demarest, Ingénieur Recherche & Développement NéoSENS, jointe en annexe au projet déposé).

Mais notre volonté mutuelle de collaborer en vue d'un transfert de technologie s'est heurtée à la difficulté de financer la réalisation de prototypes. La Société NéoSENS ne pouvait financer ces équipements sur fond propres et n'était pas éligible pour obtenir, dans le cadre du projet SurF, des subventions par les structures d'aide à l'innovation pour les PME/PMI en Midi Pyrénées.

SOPEE

chez Mr Yves Joly, 6 Allée du Pic du Midi 64230 Sovagnon

Selon sa propre présentation, Sud Ouest Pisciculture Eco-Environnement est une éco-entreprise innovante à fort potentiel, un prestataire d'analyses laboratoires de qualité d'eau, une interface animée recherche fondamentale / appliquée, un bureau d'études pour collectivités et industriels, un partenaire de vulgarisation et de communication.

A l'initiation du projet, il n'a pas été possible d'identifier de compétence spécifique capteur biofilm portée par une PME implantée en Aquitaine, apport qui aurait été le plus pertinent pour soutenir une composante de base du programme (étude de l'intérêt de principes de capteurs innovants). SOPEE, qui se présentait comme un partenaire intéressé par le développement de l'environnement du capteur (plutôt environnement physique et logistique qu'environnement informatique permettant l'interprétation de signal dans son cas), devait interagir, dans une phase de réflexion, d'ingénierie et de conception envisagée à l'approche de la fin de projet et permettant de préfigurer l'instrumentation d'un réseau de surveillance. L'intérêt de cette phase orientée ingénierie et finalisation aurait été l'apport par le partenaire PME d'une plus-value et de solutions innovantes, tant au niveau d'un prototype que l'on teste qu'à celui de la petite série que l'on exploiterait dans le cadre de réseaux.

Cette phase conditionnée par l'avancée de la réflexion sur les technologies de détection des biofilms (qui a continué jusqu'à la dernière année du projet concernant l'étude de l'intérêt du principe de capteur optique fluoroprobe), n'était pas encore d'actualité en fin de projet et n'a pas pu aboutir.

1.5. Coordonnées des responsables scientifiques de ce projet

François DELMAS

Unité REBX

Cemagref – Groupement de Bordeaux

50, Avenue de Verdun, 33612 CESTAS CEDEX,

FRANCE

Phone : +33 5 57 89 08 47

Fax : +335 57 89 08 01

E-mail : francois.delmas@cemagref.fr

Frédéric GARABETIAN

EPOC UMR5805 OASU

Université Bordeaux 1

Station Marine d'Arcachon

2, rue Jolyet, 33120 ARCACHON, FRANCE

Phone : +33 5 56 22 39 09

Fax : +335 57 89 08 01

E-mail : f.garabetian@epoc.u-bordeaux1.fr

1.6. Rappel de la nature des dépenses soutenues par la Région Aquitaine dans le cadre de ce projet

Objet du soutien :

Programme SURF : Utilisation du biofilm comme indicateur fonctionnel pour la caractérisation et la surveillance des cours d'eau.

- *Convention d'Aide de 1^{ère} année N° 20061205009MP « Recherche-Fonctionnement »*, d'un montant accordé de 12 000 € (assiette éligible de 30 000 € TTC)
- *Convention N° 20061205009MP «Allocation Post-Doctorale de 12 mois »* d'un montant accordé de 36 000 €.
- *Convention d'Aide de 2^{ème} année N° 20071205001 MP* d'un montant de 20 261 €, ventilés en :
 - 19 945 € HT d'aide d'investissement (assiette éligible de 33 242 € H.T.).
 - 316 € TTC d'aide en fonctionnement (assiette éligible de 791 € TTC).

Éléments de phasage contractuel des réalisations :

Projet SURF initial :

- La proposition initiale de programme SURF a été déposée au CCRRDT Aquitaine (volet Inter-Régional) avant la date-butoir de l'Appel d'Offres, fixée au 15 Janvier 2006.
- Pour la partie de réalisations concernant l'Aquitaine, l'envoi des 2 conventions signées de 1^{ère} année (Convention de Recherche-Fonctionnement et Allocation de Post-doc) a été effectué par la Région Aquitaine en date du 08-01-2007 (enregistrement chrono arrivée au Cemagref le 10-01-2007). L'Article 2 de la convention fixait la durée de réalisation du programme visé dans le tableau récapitulatif (Tranche de Programme Année 1 et Allocation de Post-doc de 12 mois) dans un délai de 36 mois à partir de la date de signature (08-01-2010).

- La proposition de programme SURF-Année 2 a été déposée au CCRRDT Aquitaine avant la date-butoir du 15 Janvier 2007.

- La signature de la convention - Année 2 (N° 20071205001 MP) est datée du 30 mars 2009. Il était prévu à son article 9 une prise d'effet à compter de sa signature et une date de fin d'éligibilité des dépenses le 09-07-2010.

- En pratique, les réalisations et justificatifs concernant la réalisation de SURF/partie Aquitaine sont tous compris entre le 15 janvier 2007 (date anniversaire du dépôt de dossier initial, conventions signées tout juste reçues) et la fin 2009.

Nature des dépenses :

Les réalisations ont été les suivantes :

1) *Séjour Post-Doctoral* de Soizic MORIN à REBX (13 mois couverts par l'Allocation Région Aquitaine de 36 000 €, du 1^{er} décembre 2007 au 31 décembre 2008)

2) *Achat d'investissements* : L'achat d'un spectrofluorimètre Fluoroprobe bbe a été réalisé en 2007. Cet appareil a fait l'objet d'expérimentations de calibration et d'essais (sur le terrain, au laboratoire) notamment dans le cadre d'un travail de stage de Master 2 Pro ayant eu lieu d'Avril à Septembre 2009 (stage d'Anne-Cécile MARTINS-AVEDEZO).

Le prix d'achat réel de l'appareil ayant été moins élevé que selon le devis initial pour raisons de baisse de tarif et de négociation pré-achat avec le revendeur (environ 28 K€ au lieu de 33 K€ selon le devis), un équipement complémentaire a aussi été acheté au service du programme (caméra vidéo permettant la réalisation d'imagerie optique sur microscope, utilisée pour la prise de vues sur biofilms phototrophes et sur individus de diatomées de différentes espèces).

3) *Réalisations expérimentales du programme, valorisation des résultats et fonctionnement attaché* :

A) 3 cycles d'*expérimentation in situ de capteurs biofilms implantés dans des cours d'eau du Bassin Adour-Garonne* ont été réalisés :

- Cycle de croissance de biofilm dans la Garonne à l'Aouach du 24 Octobre au 28 Novembre 2006 à la charge d'ECOLAB Toulouse. Le Cemagref n'a pas participé à la partie expérimentale de terrain (convention pas encore signée et reçue). Par contre, les analyses taxinomiques diatomiques du biofilm conservé ont été réalisées au laboratoire de REBX (Cemagref Bordeaux) à compter du 25-01-2007.

- 2 cycles de croissance de biofilm sur la Vézère (Saillant, Condat) et la Garonne (L'Aouach, Gagnac) en fin d'automne 2007 avec participation Cemagref aux opérations de terrain et aux analyses biochimiques, taxinomiques et à des dénombrements densitaires sur les biofilms, à mettre en regard des résultats de capteurs.

B) 2 cycles d'expérimentations en **conditions contrôlées de laboratoire** ont été réalisées au printemps 2009 pour évaluer de façon combinée l'effet de la trophie et d'exposition à 2 pesticides (S-Métolachlore et Acétochlore) sur les biofilms phototrophes de rivières et étudier l'intérêt du capteur Fluoroprobe bbe (spectrofluorimètre utilisé en mode benthique) pour renseigner sur l'état quantitatif et qualitatif des biofilms exposés à ces différentes conditions.

- Essai Surf 2009-1 (22/04 au 11/05/2009): Exposition de biofilm diatomique au S-métolachlore en mésocosmes de laboratoire sous 2 conditions de trophie (oligotrophes, eutrophes)

- Essai Surf 2009-2 (03/06 au 24/06/2009): Exposition de biofilm diatomique à l'acétochlore en mésocosmes de laboratoire sous 2 conditions de trophie (oligotrophes, eutrophes)

Nota : Si ce capteur à principe « optique » s'est révélé très intéressant pour mesurer la croissance quantitative des biofilms, le renseignement des aspects qualitatifs (proportion des différents groupes algaux) s'est révélé nettement moins opérationnel sur la base de la calibration-constructeur et reste largement à optimiser par un travail de calibration spécifique nécessitant des mises en cultures d'algues en espèces pures et un temps conséquent pour la réalisation d'un programme complémentaire d'expérimentations en conditions contrôlées de laboratoire. Ce volet de développement non prévu au départ nécessite une poursuite des travaux expérimentaux ultérieure au programme SURF afin de pouvoir tirer le meilleur parti de ce capteur sur le plan de la qualité des assemblages algaux ou cyanobactériens photosynthétiques composant les biofilms (proportion de chaque groupe phototrophe).

C) Valorisation en Colloques et Congrès :

Concernant la partie de programme Aquitaine, la participation aux congrès suivants a été chargée sur le projet :

MORIN, S., BOULETREAU, S., LYAUTEY, E., GARABETIAN, F., DELMAS, F., COSTE, M. - 2008. Application de la théorie SLOSS (Single Large or Several Small) aux communautés périphtiques de deux cours d'eau : à superficie égale, est-il préférable d'échantillonner une grande réserve ou plusieurs petites? . 27ème Congrès de l'ADLaF, Dijon, 1-4 septembre 2008. *Oral Comm.*

ROUBEIX, V., MARTINS-AZEVEDO A.-C., MORIN, S., DELMAS, F. - 2009. Use of a fluorimetric probe for river periphyton quantitative and qualitative assessment: Tests and potential applications. Poster, 7th International Symposium "Use of Algae for Monitoring Rivers", Luxembourg, 23-25 nov 2009. *Poster + Oral presentation.*

2. Représentativité de la surface de colonisation, incidence sur la taille du capteur

2.1. Contexte et objectifs

La tendance en matière de capteurs est à la miniaturisation. Cette logique permettant de concevoir des dispositifs de suivis facilement manipulables et implantables était mise en avant par l'un des partenaires industriels de ce projet, la société NéoSENS SA. Prologue I, La Pyrénéenne, BP27201 31672 Labège cedex.

Cette tendance n'est cependant pas systématiquement compatible avec une autre exigence de la conception d'un capteur : celle qui consiste à définir une surface suffisamment représentative des hétérogénéités spatiales des biofilms résultant de la dimension des clusters de microorganismes, de leur composition en espèces par exemple. C'est un point que nous avons souhaité étudier sous l'angle de la question, classique en écologie, des relations aire – espèces.

Cette partie résulte plus particulièrement du travail de :

- Sophie Bernadet, dans le cadre de son stage en laboratoire du Master Microbiologie et biotechnologie pour l'environnement de l'Université de Pau et des Pays de l'Adour effectué en 2008 sous la responsabilité d'Emilie Lyautey, Post-doctorante EcoLab. Nous reproduisons ci-dessous son rapport de stage.
- Soizic Morin, dans le cadre de ses recherches postdoctorales au sein de l'équipe REBX Cemagref Bordeaux. Ce travail a donné lieu à une communication orale au 27^{ème} Colloque de l'Association des Diatomistes de Langue Française, Dijon, 1-4 septembre 2008.

2.2. Cas des bactéries

S Bernadet. Caractérisation des communautés bactériennes des biofilms de rivière. Rapport de stage de Master Microbiologie et biotechnologie pour l'environnement. Année 2007- 2008. Université de Pau et des Pays de l'Adour.

L'un de nos objectifs était de déterminer quelle surface minimale doit être échantillonnée pour être représentative de la diversité des communautés bactériennes des biofilms. Cette question renvoie à la problématique des SLoSS (*Single Large or Several Small* soit une seule grande surface ou plusieurs petites?) que se pose bon nombre d'écologistes dans le domaine de la conservation et de la sauvegarde des espèces en voie d'extinction (Järvinen, 1982 ; Burkey, 1997 ; Ovaskainen, 2002 ; Zhou & Wang, 2005) : faut-il privilégier une seule grande surface ou plusieurs petites?

Le but est de déterminer si une grande surface abrite plus d'espèces que plusieurs petites dont la somme des surfaces est égale à la grande. Ce sujet est largement appliqué dans la conservation des espèces végétales, et plusieurs auteurs ont recommandé une seule grande réserve pour protéger les populations menacées (Diamond, 1975 ; Anon, 1980).

Depuis, cette conclusion a été très contestée, notamment par la théorie des îles (Järvinen, 1982). En effet, le fait de disperser plusieurs petites réserves dans des milieux différents augmenterait le nombre d'espèces préservées puisque chacune de ces réserves bénéficierait d'une recolonisation spécifique par des espèces présentes dans leurs milieux respectifs. Chaque réserve possède donc des espèces qui lui sont spécifiques du fait de leur appartenance à un milieu qui leur est propre et qui diffère des autres. De par la recolonisation spécifique, le regroupement de l'ensemble des petites surfaces conduirait donc à une richesse plus importante que celle de la grande.

Dans notre cas, soumis aux mêmes conditions environnementales, petits coupons et grands coupons ne sont pas vraiment exposés à ce problème. La différence (s'il y en a une) concerne l'hétérogénéité du biofilm, influencée par la surface du coupon et la force du courant. En effet, les petits coupons vont plus subir l'érosion par le courant que les grands coupons. L'épaisseur du biofilm étant réduite, l'hétérogénéité sur les petits coupons est plus faible. On s'attend donc à des différences de composition des communautés entre petits et grands coupons. La question est de déterminer quelle surface doit être échantillonnée pour avoir un maximum de diversité microbienne, s'il vaut mieux prendre plusieurs petits coupons plutôt qu'un grand, et si oui, combien.

2.2.1 Matériel et méthodes

2.2.1.1. Sites d'étude :

Les prélèvements de biofilms épilithiques ont été effectués dans une rivière française, la Vézère. Elle prend sa source dans le Massif central en Corrèze et se jette dans la Dordogne à Limeuil. Son principal affluent est la Corrèze, leur confluence se situant dans la banlieue ouest de Brive-la-Gaillarde. Le premier site étudié, situé à Saillant-Vieux, à 20 km en amont de Brive-la-Gaillarde est considéré comme peu anthropisé alors que le deuxième situé à Condat-sur-Vézère, à 36 km en aval de Brive-la-Gaillarde est considéré comme très anthropisé.

2.2.1.2. Paramètres de la qualité de l'eau :

Les différentes formes d'azote (N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^-), de phosphore (PO_4^{3-} et phosphore total) et la silice (SiO_2) ont été mesurées selon les techniques colorimétriques manuelles ou à flux continu décrites dans APHA (1992).

Les ions majeurs (Cl^- , SO_4^{2-} , Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+}) ont été mesurés par chromatographie ionique haute performance (DIONEX 500).

Les matières en suspension (MES) ont été filtrées sur $0,45\mu\text{m}$ et obtenues par pesée après séchage.

2.2.1.3. Procédure d'échantillonnage et mesures de biomasse :

Les échantillons de biofilms épilithiques ont été collectés le 30 octobre 2007 en récupérant les 14 coupons en acier inoxydable (254 SMO : Stainless Steel Material) déposés dans la rivière à l'intérieur d'un rack 21 jours auparavant, et ce pour chacun des 2 sites étudiés (figures 1 et 2). Sur les 14 coupons étudiés pour chaque site, deux ont une surface de 0,02 m², les 12 autres font 0,005 m². La surface d'un grand coupon représente donc la somme de 4 petits.

Chaque coupon a été gratté à l'aide d'une lame de verre et lavé à l'eau milliQ stérile (filtration stérilisante). Le biofilm a été remis en suspension dans de l'eau milliQ stérile dans un volume final de 12 mL. Pour chaque échantillon, des aliquotes de 1,5 mL ont été prélevés pour les analyses de biologie moléculaire. Après centrifugation (12000 × g à 4 °C pendant 20 min), le surnageant a été retiré. Les 28 culots cellulaires ont ensuite été stockés à -80 °C.

La matière sèche (MS) et la matière sèche sans cendre (MSSC) du biofilm ont été mesurées sur 5 mL de suspension de biofilm homogénéisée par passage à l'homogénéisateur de tissu (Ultra thurax). La MS est obtenue par pesée du culot après centrifugation (20 min à 4500 × g) et séchage (6 h à 105 °C). La MSSC est calculée par pesée différentielle entre la masse sèche initiale et la masse de cendres résiduelles obtenues après calcination au four (6 h à 500 °C).

Le dosage de la chlorophylle *a* (Chl *a*) a été réalisé par analyse spectrophotométrique d'un extrait acétonique (acétone 90 %) réalisé sur un culot de 5 mL de suspension centrifugée (12000 × g, 20 min, 4 °C).

2.2.1.4. Nomenclature des échantillons :

Les échantillons ont été numérotés selon plusieurs critères :

- le site de prélèvement : S pour Saillant, C pour Condat.
- le temps de prélèvement : 1, 2 ou 3. Ici, le temps de prélèvements est t=3 (21 jours) pour tous les échantillons.
- la nature du support de développement du biofilm : le coupon utilisé pour cette étude est une électrode, codée E.
- le numéro de répliquats, allant de 1 à 16.

Ainsi, le répliquat noté C3E10 a été récupéré à Condat au temps 3, sur une électrode notée 10. C3E1 et C3E8 correspondent aux grandes électrodes.



Figure 1 : photographie d'un rack contenant les coupons en acier inoxydable déposé dans la Vézère (photographie S. Boulêtreau)



Figure 2 : photographie d'un coupon en acier inoxydable colonisé par du biofilm épilithique (photographie S. Boulêtreau)

2.2.1.5. Extraction d'ADN total :

L'extraction d'ADN a été réalisée sur les culots de biofilms obtenus par centrifugation. La biomasse des échantillons est comprise entre 0,2 et 36 mg de MS (voire <). L'extraction d'ADN a été effectuée en utilisant un kit Mobio « UltraClean™ Soil DNA Isolation kit » en suivant le protocole du fabricant. La quantité d'ADN extrait a été déterminée spectrophotométriquement par mesure de l'absorbance UV à 260nm avec un Nanodrop® ND-1000 Spectrophotometer. Pour certains échantillons, une quantification sur gel a également effectuée avec un marqueur de masse moléculaire (Biorad, Precision Molecular Mass Standard) et en utilisant le logiciel Bio1D. La qualité d'extraction a été vérifiée sur gel d'agarose 1 % pour tous les échantillons.

2.2.1.6. Amplification de l'ADNr16S :

La région variable de V3 à V5 du gène codant pour l'ARNr 16S (figure 3) a été amplifiée en utilisant des amorces universelles du domaine *Bacteria*, 341F (5'-CCT ACG GGA GGC AGC AG-3') et 907R (5'-CCG TCA ATT CMT TTG AGT TT-3') (Muyzer *et al.*, 1997). L'amorce 341F est prolongée par un GC-clamp à son extrémité 5' afin d'optimiser la migration des brins amplifiés sur le gel DGGE (Myers *et al.*, 1985 ; Muyzer & Smalla, 1998). Un taux d'ADN extrait (50 ng) défini par Lyautey *et al.* (2005) a été utilisé comme matrice pour la PCR. Le mélange réactionnel (50 µL) contient donc 50 ng d'ADN, 200 µM de chaque dNTP, 0,48 µM de chaque amorce, 2,5 mM de MgCl₂, 75 mM de Tris-HCl (pH 8.0), 3 mg mL⁻¹ de BSA et 2.5 U de GoTaq® DNA Polymerase (Promega).

Les amplifications ont été réalisées avec un thermocycleur Eppendorf Mastercycler selon le programme suivant : dénaturation initiale à 94 °C, 10 cycles Touchdown (dénaturation à 94 °C, hybridation de 65 à 55 °C, élongation à 72 °C) suivis de 20 cycles standards (dénaturation à 94 °C, hybridation à 55 °C, élongation à 72 °C) et d'une élongation finale à 72°C. Les concentrations d'ADN amplifiés ont été déterminées sur des gels d'agarose 1,65 % en utilisant un marqueur de masse moléculaire (Biorad, Precision Molecular Mass Standard) et le logiciel Bio1D.

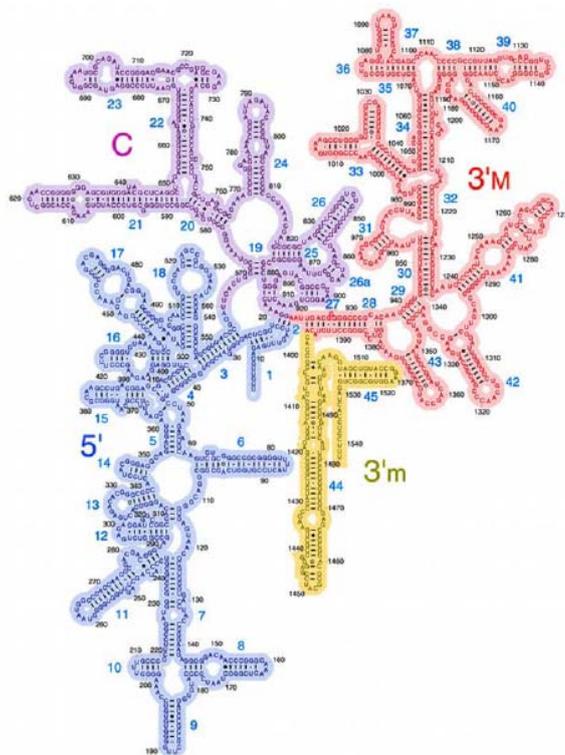


Figure 3 : structure secondaire de l'ARNr 16S de *T. thermophilus* avec ses domaines 5', central, 3' majeur et 3' mineur (d'après www.microbiologie.spectrosociences.com)

2.2.1.7. Analyse DGGE :

Une analyse DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) a été effectuée en utilisant un appareil D-Code Universal Mutation Detection System (BioRad) selon le protocole décrit par Muyzer et al. (1997). Environ 700 ng d'ADN amplifié ont été déposés sur gel d'acrylamide contenant un gradient de dénaturant (urée et formamide) de 35 à 70 % (100 % correspondant à 7M d'urée et 40 % de formamide déionisé).

Après migration (à 100 V pendant 18h à 60 °C), le gel a été coloré au SYBR Green I (SIGMA Aldrich) et visualisé sous UV. Une photo du gel a été prise en utilisant une caméra CCD et un logiciel Visiocapt (Vilber Lourmat). L'analyse d'image a été faite avec le logiciel Bio-1D (Vilber Lourmat).

Les profils DGGE obtenus ont été comparés à l'aide d'une matrice présence/absence des différentes bandes. A partir de cette matrice, le logiciel SPSS a permis de calculer l'indice de similarité de Jaccard $J = [c/(a+b-c)]$ entre deux échantillons, où a et b sont respectivement les nombres de bandes dans les échantillons A et B et c le nombre de bandes communes aux deux échantillons. La matrice de proximité a permis de calculer une matrice de distance (distance = 1 - (proximité)) et de tracer un graphe MDS (multidimensional scaling) d'après Araya *et al.* (2003).

Les abondances relatives ont été obtenues en calculant les aires sous les pics des bandes du gel de DGGE. A partir des abondances relatives et de la matrice de présence/absence, les indices de Simpson ($D = \sum pi^2$) et de Shannon-Wiener ($H = - \sum pi \ln pi$) ont été calculés pour chacun des échantillons, pi étant l'intensité relative de chaque bande.

2.2.1.8. Courbe d'accumulation de la richesse :

La courbe d'accumulation de la richesse des espèces pour le site de Condat a été obtenue à partir de la matrice de présence/absence et d'algorithmes décrits dans Colwell et al. (2004).

Le logiciel "EstimateS: Biodiversity estimation" (en libre accès sur <http://viceroy.eeb.uconn.edu/EstimateS>) donne, après 200 permutations, les valeurs moyennes de richesse cumulée et leurs intervalles de confiance à 95%.

La courbe d'accumulation de la richesse a été alors ajustée dans SigmaPlot au modèle de Mickaelis-Menten ($y = (V_{max} \times x)/(K + x)$) où S_{max} correspond à la richesse cumulée maximale, et K à la surface d'échantillon permettant d'obtenir 50% de la richesse maximale.

2.2.2 Résultats

2.2.2.1. Physico-chimie des sites étudiés :

Les 2 sites étudiés ont été choisis dans la Vézère pour leurs caractéristiques physico-chimiques contrastées (tableaux 1 et 2). Avant rejoindre Condat, la Vézère traverse donc une ville industrialisée à forte densité humaine et subit des apports anthropiques. Les teneurs en N-NO_3^- et N-NO_2^- sont significativement plus élevées à Condat qu'à Saillant, d'après le test de Mann-Whitney ($n = 6$, $P < 0,05$). Les concentrations en N-NH_4^+ , P-PO_4 , P total, Cl, SO_4 , Na, Mg et Ca sont marginalement plus élevées à Condat qu'à Saillant ($n = 6$, $0,05 < P < 0,1$). En revanche, les teneurs en MES, K et Chl *a* ne présentent pas de différences significatives entre les deux sites. Les caractéristiques physiques de la Vézère ne sont pas significativement différentes d'un site à l'autre ($n = 6$, $P > 0,1$) sauf pour la conductivité, plus importante en aval ($n = 6$, $P < 0,05$). La différence de composition chimique entre les deux sites témoigne bien d'une influence anthropique.

2.2.2.2. Caractérisation de la biomasse des deux sites :

Les quantités de MS mesurées à Saillant ($2,0 \pm 1,1 \text{ g m}^{-2}$ [moyenne \pm écart-type]) sont très significativement inférieures à celles mesurées à Condat ($6,7 \pm 4,7 \text{ g m}^{-2}$) (Test de Mann-Whitney, $n = 26$, $P < 0,01$). Les quantités de chlorophylle *a* mesurées à Saillant ($9,1 \pm 9,7 \text{ mg m}^{-2}$) sont significativement plus faibles qu'à Condat ($12,7 \pm 5,6 \text{ mg m}^{-2}$) (Test de Mann-Whitney, $n = 28$, $P < 0,05$). Ces valeurs traduisent donc une augmentation de la quantité de biomasse due à l'enrichissement de la rivière par les apports anthropiques.

2.2.2.3. Extraction et quantification d'ADN :

Après extraction, l'ADN extrait a été quantifié grâce à deux méthodes : par quantification avec un Nanodrop® ND-1000 Spectrophotometer et par quantification sur gel d'agarose 1% avec un marqueur de masse moléculaire (Biorad, Precision Molecular Mass Standard). Les résultats obtenus pour les deux quantifications sont présentés dans le tableau 3.

On peut voir que les quantités estimées par le nanodrop sont bien supérieures à celle calculées à partir du marqueur moléculaire du gel.

La première méthode consiste à déterminer la concentration en ADN à partir de la mesure de l'absorbance à 260 nm par un Nanodrop® ND-1000 Spectrophotometer de 2 μl d'échantillon d'ADN extrait. L'un des biais de cette méthode est que des composants absorbant à 260 nm autre que l'ADN sont susceptibles d'être présents dans l'échantillon une fois l'extraction finie. Il s'agit entre autre de la guanidine, composé présent dans deux des solutions du kit d'extraction (Bead Solution = solution de thiocyanate de guanidine ; Solution S3 = solution aqueuse d'hydrochloride de guanidine).

La guanidine ne se fixe pas à la colonne et est sensée être éluée avec S4, mais il est possible qu'il en reste une fois l'extraction finie. Les autres molécules pouvant interférer lors de la quantification au nanodrop sont les protéines. Bien que plusieurs étapes soient sensées les précipiter et les dénaturer, il est possible qu'à la fin de l'extraction des protéines soient toujours présentes dans l'extrait car liées aux molécules d'ADN. Aux produits interférant dans la quantification s'ajoutent les pigments photosynthétiques ainsi que les ARN, susceptibles d'être toujours présents dans le mélange puisqu'aucune RNase n'a été utilisée lors des étapes d'extraction. Le problème de cette méthode est donc que de nombreux composés peuvent interférer dans la quantification puisqu'il n'y a pas de détermination spécifique à l'ADN.

Face à ces biais, la méthode de quantification par des gels d'agarose paraît plus fiable. En effet, on se libère de la surestimation due à l'absorbance UV de la guanidine et des protéines puisqu'ici le marquage est spécifique à l'ADN. Le BET (Bromure d'éthidium) contenu dans le gel et le tampon de migration s'intercale entre les bases de l'ADN. Sa propriété de fluorescer sous excitation UV est intensifiée par l'hydrophobie de l'environnement. De plus, la migration sur gel d'agarose permet de bien séparer l'ADN des ARN ou autres molécules. Une photo du gel est alors réalisée (figure 4) avec une caméra CCD combinée au logiciel Visiocapt (Vilber Lourmat) avant d'être analysée par le logiciel Bio-1D (Vilber Lourmat). Cette quantification consiste à mesurer la fluorescence des bandes d'ADN extrait ainsi que celle du marqueur de masse moléculaire déposé sur le gel. Les fluorescences détectées pour chaque bande du marqueur étant associées à des quantités d'ADN connues, une droite étalon peut alors être tracée. A partir de l'équation de la droite et des mesures de fluorescence obtenues pour chaque échantillon, la quantité d'ADN de chaque échantillon peut être calculée. Cette quantification semble se rapprocher plus des quantités réellement extraites.

Les concentrations d'ADN extraites sont comprises entre 3,3 et 34,3 ng μL^{-1} selon la quantification au Nanodrop. Le rendement d'extraction pour chaque échantillon est donné dans le tableau 4 ci-contre.

Les quantités d'ADN extrait en fonction de la quantité de matière sèche MS (μg ADN mg^{-1} MS) pour les différents répliquats sont relativement proches. Par exemple, pour des quantités de MS allant du simple au triple (10 mg pour C3E6 et 3 mg pour C3E10), les quantités d'ADN récupérées sont semblables (de 0,5 à 0,6 μg). Il n'y a pas de saturation au niveau de la colonne avec l'augmentation de la quantité de MS. La quantité de MS n'a donc pas d'influence sur la quantité d'ADN extrait.

D'autre part, travaillant sur des répliquats, on s'attend à avoir les mêmes rendements d'extraction. Pour le site de Condat, les rendements varient de 0,06 à 1,24 μg ADN mg^{-1} MS et sont tous relativement proches. En revanche, pour le site de Saillant, les rendements sont très différents. Ils varient de 0,26 à 3,86 μg ADN mg^{-1} MS. Le problème vient probablement de la quantification par le Nanodrop (tableau 3). Pour les échantillons de Saillant, les différences de quantification entre le Nanodrop et les gels sont vraiment importantes.

Globalement, nos rendements d'extraction se retrouvent dans la même gamme que ceux obtenus lors d'une étude précédente sur des biofilms de la Garonne (Lyautey, comm. pers.).

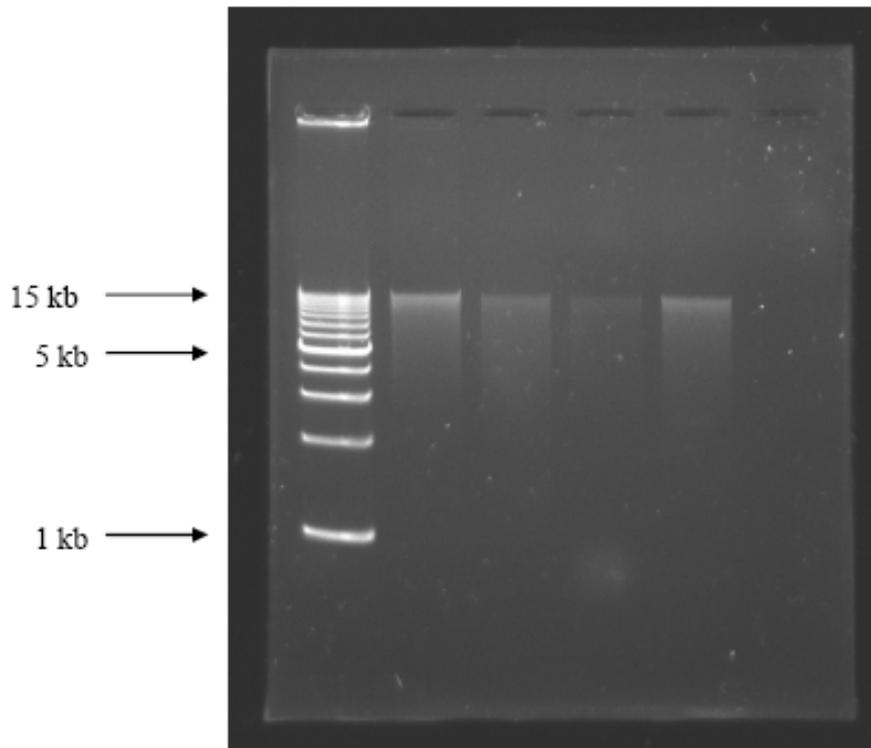


Figure 4 : photographie du gel d'agarose 1% obtenu pour l'extraction des échantillons C3E2 (piste 2), C3E3 (piste 3), C3E4 (piste 4) et C3E5 (piste 5). Le marqueur de taille est sur la piste 1.

2.2.2.4. Amplification de l'ADNr 16S :

La quantité d'ADN template pour la PCR n'a pas été fixée au hasard à 50 ng. En effet, il a été remarqué que la quantité d'ADN template pour la PCR influence le rendement d'amplification et la richesse obtenue en DGGE (Lyautey *et al.*, 2005). Ainsi, le nombre de bandes obtenues sur les profils de DGGE est optimal pour des quantités d'ADN substrat comprises entre 30 et 50 ng. De plus, une diminution exponentielle du rendement d'amplification est notable avec l'augmentation de la quantité d'ADN template. La principale cause est qu'en augmentant la quantité d'ADN template, on augmente aussi l'apport d'inhibiteurs de PCR (acides humiques par exemple).

De même que pour l'extraction, les amplifiats ont été quantifiés sur gel d'agarose 1,65% avec un marqueur de masse moléculaire et le logiciel Bio1D. Les aires des pics obtenus pour les bandes du marqueur (figure 5) sont calculées par le logiciel et sont chacune reliées à une quantité connue d'ADN. Une droite étalon peut alors être tracée (figure 5). Son équation nous permet à partir des aires calculées pour chaque pic des amplifiats de déterminer leurs concentrations en ADN.

Les rendements d'amplification (μg ADN amplifié / μg ADN template) pour les différents échantillons sont relativement proches (tableau 3). Ils varient de 53 à 81 μg ADN amplifié / μg ADN template. Pour l'échantillon S3E13, le rendement n'est que de 26 μg ADN amplifié / μg ADN template. L'extraction d'ADN pour cet échantillon est certainement mauvaise. Après extraction, il a été remarqué que l'extrait d'ADN était trouble en comparaison aux autres et la quantification au Nanodrop était anormalement élevée. Des inhibiteurs doivent encore être présents dans l'échantillon, ce qui entraîne un mauvais rendement d'amplification.

2.2.2.5. Analyse DGGE :

La quantité d'amplifiat déposée sur le gel DGGE est fixée à 700 ng afin d'optimiser les résultats. Cette quantité correspond au seuil de détection pour obtenir le maximum de bandes sur le gel DGGE (Lyautey *et al.*, 2005). Si l'on ne mettait que 400 ng, on ne détecterait que la moitié des bandes, soit celles correspondant aux bandes les plus intenses obtenues avec 700 ng d'amplifiat (effet seuil de détection).

Pour notre étude, nous avons décidé pour chaque site de regrouper aléatoirement les échantillons par quatre. On obtient donc 3 pools pour Condat et 3 pools pour Saillant. Les échantillons récupérés sur le site de Condat ont aussi migré individuellement afin de les comparer avec les pools de Condat et déterminer s'il existe un intérêt à regrouper les échantillons.

La photo du gel obtenue est montrée ci-contre (figure 6).

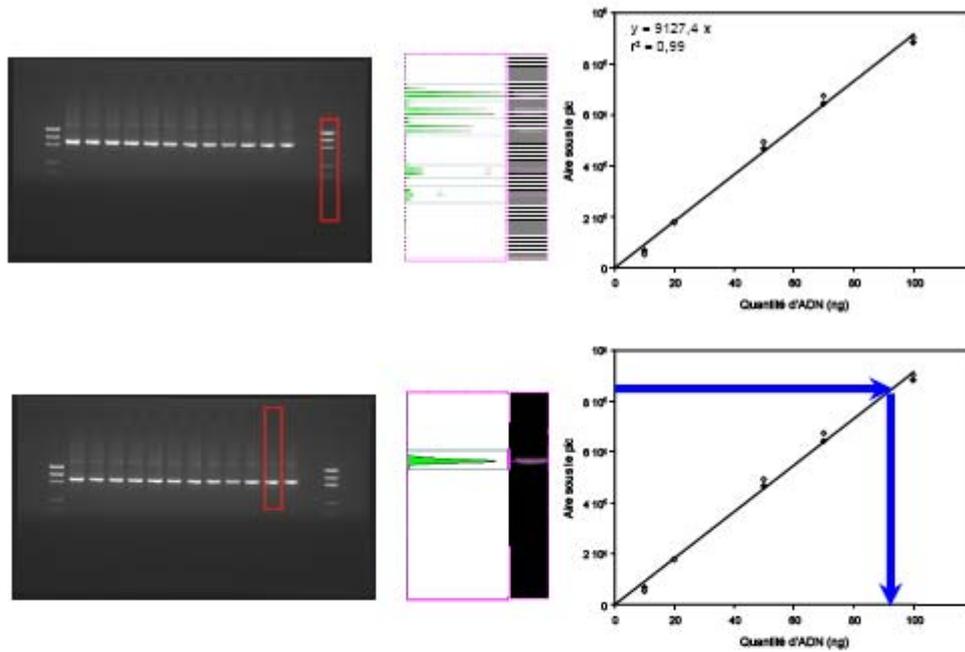


Figure 5 : Principe de la quantification de la quantité d'ADN sur gel d'agarose à l'aide du marqueur de masse moléculaire

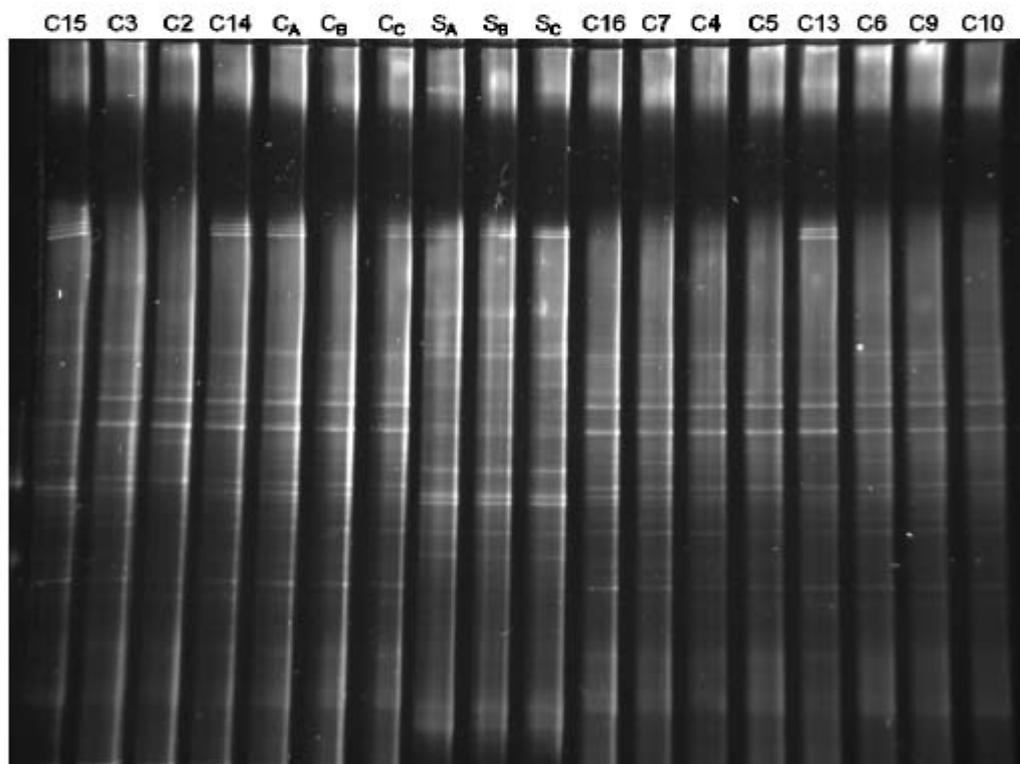


Figure 6 : image du gel de DGGE. Les noms des échantillons ont été réduits pour des raisons pratiques

2.2.2.5.1. Quelle taille minimale faut-il échantillonner pour obtenir le maximum de diversité ?

La courbe d'accumulation de richesse des espèces pour le site de Condat a été calculée à partir de l'algorithme Mao Tau. La courbe obtenue (figure 7) n'étant pas la même selon l'ordre de tirage des coupons, il est important de faire un grand nombre de tirages (ici 200 permutations) afin de calculer les coordonnées de la courbe moyenne et les intervalles de confiance à 95 % pour chaque point.

La richesse maximale théorique obtenue à partir du modèle de Mickaelis-Menten est de 34,4 OTUs. On considère que le maximum de richesse est atteint à 95% de la richesse maximale théorique. La surface à échantillonner est donc de 0,055 m², ce qui représente 11 coupons.

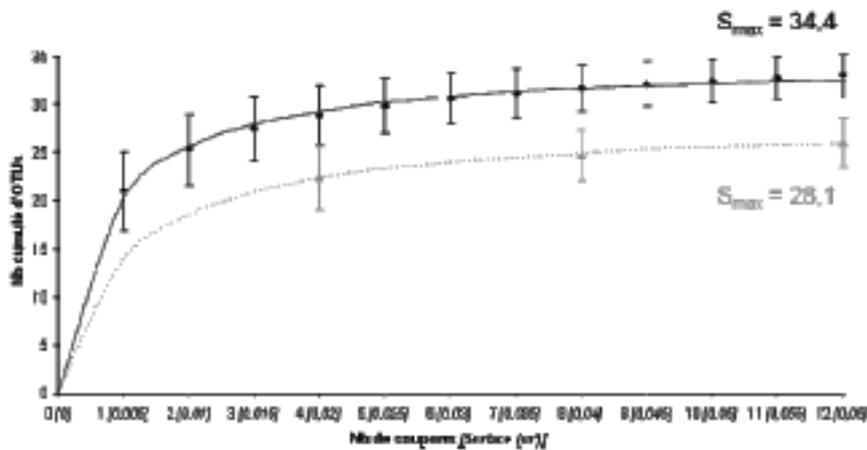


Figure 7 : courbe d'accumulation de la richesse

2.2.2.5.2. Existe-t-il un intérêt à regrouper les échantillons ?

L'analyse du gel DGGE a permis de mettre en évidence la présence de 33 bandes sur l'ensemble des pistes contenant les échantillons de Condat. Comme on peut le voir sur le tableau 4, le nombre de bandes par échantillon varie de 16 (échantillon C3E9) à 27 bandes (échantillon C3E7), la moyenne étant de 21 ± 3 bandes. Pour les pools de Condat, la moyenne est 22 bandes ± 1 et pour l'ensemble des 12 répliqués de Condat la moyenne est 21 ± 4 bandes. D'après le test de Mann-Whitney, la richesse spécifique entre les pools de Condat et l'ensemble des répliqués n'est pas différente ($P = 0,424$).

Si l'on compare la courbe de richesse cumulée obtenue pour les pools avec celle obtenue pour les répliqués individuels, on remarque que la richesse maximale (nombre cumulé d'OTUs maximum théorique) atteinte pour les répliqués pris individuellement est de 34,4 et n'est que de 28,1 pour les pools. On perd environ 19 % de la richesse spécifique en regroupant les répliqués.

L'analyse de la matrice de présence/absence nous permet de comparer la composition spécifique d'un pool avec celles des quatre répliquats qui le composent. Ainsi, on remarque par exemple que les profils des répliquats C3E15, C3E3, C3E2 et C3E14 sont proches de celui obtenu en les regroupant (CA). On a assez peu de perte d'information puisque pratiquement toutes les bandes présentes dans les répliquats se retrouvent dans le pool. On retrouve parfois même dans le pool une bande qui n'est présente que dans un seul des quatre répliquats, comme c'est le cas pour la bande B5. En revanche, dans certains cas, regrouper les échantillons nous fait perdre de l'information. Des bandes qui sont présentes dans trois des répliquats ne se retrouvent pas dans le pool. C'est le cas des bandes B34, B30 ou encore B31. Si l'on regarde l'ensemble des résultats, on remarque que 6 bandes sur les 43 ne se retrouvent pas dans les pools. Si l'on ne travaillait que sur les pools, on passerait à côté des informations apportées par ces bandes. Un graphe MDS a été tracé pour nous permettre d'analyser la composition spécifique des communautés bactériennes (figure 8). Cette représentation graphique présente chaque communauté bactérienne (ou chaque profil DGGE) par un point sur le graphique. Les changements dans la structure des communautés peuvent être visualisés et interprétés par les distances entre les points. Plus deux points sont proches, plus les profils DGGE sont similaires.

Nous avons préféré travailler sur un graphe MDS et non sur un dendrogramme car la construction du dendrogramme avec l'UPGMA fait perdre de l'information. En effet, une fois qu'il a comparé deux individus A et B, il va les regrouper dans un cluster et les considérer comme un seul et même individu pour continuer la comparaison avec C. Il donne ensuite le pourcentage de similarité entre C et le cluster A-B. De ce fait, on ne sait pas quel pourcentage de similarité possède C avec A et B séparément. Le dendrogramme n'est qu'à une dimension alors que le graphique MDS est à 2 dimensions. Il donne l'information perdue par le dendrogramme en représentant la similarité des échantillons par des distances. On remarque que les communautés des pools et de leurs répliquats respectifs se situent dans les mêmes zones du graphique, mais il est important de noter que des distances relativement importantes les séparent.

Regrouper les échantillons permet donc de garder une composition spécifique représentative de celle des répliquats pris individuellement. En revanche, la perte de richesse spécifique entre le pool et les répliquats n'est pas négligeable. Par conséquent, d'un point de vue écologique il serait préférable de travailler sur les répliquats individuellement, bien que regrouper les échantillons permette un gain de temps et d'argent.

2.2.2.5.3. Comparaison des communautés bactériennes entre l'amont et l'aval d'une agglomération :

D'après la matrice présence/absence, la moyenne du nombre de bandes pour les pools de Condat est de 22 ± 1 bandes et pour Saillant de 23 ± 1 bandes. La richesse spécifique entre les deux sites est donc comparable ($n = 6, P = 0,1$).

Si l'on compare les profils du gel de DGGE, on remarque que 14 bandes sont communes aux deux sites. Les communautés bactériennes entre l'amont et l'aval de Brive-la-Gaillarde possèdent donc des similitudes dans la composition spécifique. Toutefois, un contraste entre les deux sites est notable. En effet, on peut constater une spécificité pour chaque site puisque 11 bandes ne se retrouvent que dans les pools de Saillant, et 12 dans ceux de Condat.

Le graphe MDS (figure 9) nous permet aussi de comparer les compositions spécifiques des communautés bactériennes des deux sites. Deux clusters sont bien discernables sur le graphique, un regroupant les échantillons de Condat et l'autre ceux de Saillant. On peut voir que la communauté du pool CA est plus éloignée de celle de CB et CC. Avec le dendrogramme, on passe à côté de cette information. En revanche, pour Saillant, toutes les communautés sont très proches. Ces résultats nous indiquent que les communautés entre l'amont et l'aval de Brive-la-Gaillarde sont bien différenciables par leurs compositions spécifiques. Le niveau d'anthropisation jouerait donc bien un rôle dans la composition des communautés bactériennes des biofilms épilithiques.

La diversité des communautés bactériennes a pu être comparée entre l'amont et l'aval grâce aux indices de diversité de Simpson et de Shannon-Wiener. Tous deux prennent en compte la richesse spécifique et l'abondance relative des taxons d'une communauté. L'indice de Simpson représente la probabilité d'obtenir le même taxon lors de deux tirages consécutifs au hasard dans le même échantillon. Il est plutôt sensible aux abondances relatives. La diversité sera d'autant plus grande que la valeur de cet indice est proche de 0. Dans ce cas, la communauté est dite équilibrée, c'est-à-dire qu'elle présente peu d'espèces dominantes, beaucoup d'espèces rares et une quantité intermédiaire d'espèces moyennement abondantes. Inversement, plus cet indice s'approche de 1, plus la diversité est faible. La communauté possède peu d'espèces et est donc moins équilibrée. Pour l'indice de Shannon-Wiener qui est lui plutôt sensible à la richesse spécifique, la diversité est d'autant plus grande que la valeur de l'indice tend vers l'infini. La communauté sera dite déséquilibrée pour un indice de Shannon-Wiener proche de 0.

L'indice de Simpson est de $0,050 \pm 0,002$ pour Saillant et de $0,061 \pm 0,002$ pour Condat. En parallèle, l'indice de Shannon-Wiener est de $3,08 \pm 0,01$ pour Saillant et de $2,95 \pm 0,02$ pour Condat. D'après le test de Mann-Whitney, les valeurs pour l'indice de Simpson sont significativement différentes ($P < 0,05$) entre les deux sites et l'indice de Shannon est marginalement différent entre Saillant et Condat ($P = 0,05$). Les valeurs des indices de Simpson sont proches de 0 alors que celles de Shannon sont relativement élevées. La structure des communautés est donc équilibrée aussi bien en amont qu'en aval. Par ailleurs, ces indices de diversité nous permettent de dire que la diversité des communautés bactériennes est plus importante en amont qu'en aval de l'agglomération.

2.2.2.5.4. Limites de la PCR-DGGE :

Cette méthode de typage moléculaire n'est pas très qualifiée pour l'exhaustivité des résultats. L'interprétation des résultats doit se faire avec du recul à cause des nombreux biais de cette méthode.

Ces biais interviennent à plusieurs niveaux :

Au niveau de la richesse spécifique : les bandes que l'on détecte sur le gel ne correspondent qu'aux populations bactériennes dominantes du biofilm. Les populations minoritaires ne sont pas détectées car elles sont en dessous du seuil de détection qui est de 1% (Casamayor, 2000). De plus, l'affinité des primers avec l'ADN varie en fonction des espèces (plus ou moins de mismatch) (Schmalenberger *et al.*, 2001). Les espèces pour lesquelles le pourcentage d'hybridation est fort seront plus amplifiées que celles dont le pourcentage d'hybridation est faible. La richesse obtenue à partir du gel est donc biaisée et n'est représentative que des populations dominantes de la communauté.

- Au niveau de l'abondance relative : l'intensité des bandes observées ne reflète pas avec exactitude l'abondance relative des espèces à cause de l'inégalité d'amplification de la PCR. La PCR amplifie préférentiellement les populations fortement représentées dans la communauté bactérienne, au détriment des populations minoritaires (Wilson, 1997). De plus, dans les populations dominantes qui sont amplifiées, la PCR va fortement amplifier ce qui est abondant et donc le surestimer. Inversement, elle va faiblement amplifier ce qui est minoritaire et le sous-estimer.

- Au niveau du choix du marqueur génétique ADNr 16S : certaines espèces porteraient plusieurs opérons codant pour le gène de l'ARNr 16S. La séquence pouvant varier d'un opéron à un autre, pour un même organisme on détectera plusieurs bandes. Inversement, une seule bande peut correspondre à plusieurs organismes dont les fragments possèdent des propriétés électrophorétiques trop proches pour être séparés. De plus, la présence d'organismes phototrophes génère des interférences puisque l'ADNr 16S des plastes est détecté (théorie d'endosymbiose de L. Margulis, 1982).

Cependant, il a été montré que les intensités relatives des bandes d'un gel de DGGE respectent les ordres de grandeur. Si l'on contamine volontairement des biofilms avec des quantités connues d'*E. coli* (1 ou 10% de l'abondance totale des bactéries du biofilm), les analyses sur un gel de DGGE nous permettent de retrouver respectivement 5,4 et 8% de l'abondance relative de la communauté (Lyautey *et al.*, 2004). Par ailleurs, Nübel *et al.* (1999) ont montré que les indices de diversité sont comparables entre des analyses microscopiques et des analyses par PCR-DGGE.

2.2.3. Conclusion et perspectives :

L'analyse DGGE nous a permis de définir une taille minimale de 11 petits coupons (soit 0,055m²) à échantillonner sur ce type de support pour être représentatif de la diversité des communautés bactériennes des biofilms.

2.2.4. Références bibliographiques

- APHA (1992) Standard methods for the examination of water and wastewater, American Public Health Association, Washington DC
- Araya, R., Tani, K., Takagi, T., Yamaguchi, N. et Nasu, M. (2003) Bacterial activity and community composition in stream water and biofilm from an urban river determined by fluorescent *in situ* hybridization and DGGE analysis, *FEMS Microbiology Ecology* 43, 111-119
- Burkey, T.V. (1997) Metapopulation extinction in fragmented landscapes : using bacteria and protozoa communities as model ecosystems, *The American Naturalist* 150, 568-591
- Casamayor, E., Schafer, H., Baneras, L., Pedros-Alio, P. et Muyzer, G. (2000) Identification and spatio-temporal differences between microbial assemblages from two neighboring sulfurous lakes : comparison by microscopy and denaturing gradient gel electrophoresis, *Applied and Environmental Microbiology* 4, 338-348
- Colwell, R.K., Mao, C.X. et Chang, J. (2004) Interpolating, extrapolating, and comparing incidence-based species accumulation curves, *Ecology* 85, 2717-2727
- Costerton, W.J. et Stoodley, P. (2003) Microbial biofilms : protective niches in ancient and modern geomicrobiology. Dans : Krumbein, W.E., Paterson, D.M. et Zavarzin, G.A., *Fossil and recent biofilms. A natural history of life on Earth*, Kluwer Academic publishers, Dordrecht, preface.
- Cowan, M.M. et Fletcher, M. (1987) Rapid screening method for detection of bacterial mutants with altered adhesion abilities, *Journal of Microbiological Methods* 7 (4-5), 241-249
- Davies, D.G., Chakrabarty A.M. et Geesey, G.G. (1993) Exopolysaccharide production in biofilms : substratum activation of alginate gene expression by *Pseudomonas aeruginosa*, *Applied and Environmental Microbiology* 59 (4), 1181-1186
- Forney, L.J., Zhou, X. et Brown, C.J. (2004) Molecular microbial ecology : land of the one-eyed king, *Current Opinion in Microbiology* 7 (3), 210-220
- Gacesa, P. (1998) Bacterial alginate biosynthesis- recent progress and future prospects, *Microbiology* 144, 1133-1143
- Hoagland, K.D. et Peterson, C.G. (1990) Effects of light and wave disturbance on vertical zonation of attached microalgae in a large reservoir, *Journal of Phycology* 26, 450-457

- Järvinen, O. (1982) Conservation of endangered plant populations : single large or several small reserves ?, *Oikos* 38, 301-307
- Jefferson, K.K. (2004) What drives bacteria to produce a biofilm ?, *FEMS Microbiology Letters* 236, 163-173
- Keyhani, N.O. et Roseman, S. (1996) The chitin catabolic cascade in the marine bacterium *Vibrio furnissii*: Molecular cloning, isolation, and characterization of a periplasmic β -N-acetylglucosaminidase, *Journal of Biological Chemistry* 271 (52), 33425-33432
- Lock, M.A., Wallace, R.R., Costerton, J.W., Ventullo, R.M. et Charlton, S.E. (1984) River epilithon: toward a structural-functional model, *Oikos* 42 (1), 10-22
- Lyautey, E., Lacoste, B., Ten-Hage, L., Rols, J.L. et Garabetian, F. (2005) Analysis of bacterial diversity in river biofilms using 16 S rDNA PCR-DGGE : methodological settings and fingerprints interpretation, *Water Research* 39, 380-388
- Margulis, L. (1982) Symbiosis in cell evolution, Freeman, San Francisco
- Muyzer, G., Brinkhoff, T., Nuber, U., Santegoeds, C., Schafer, H. et Wawer, C. (1997) Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology. In : Molecular Microbial Ecology Manual
- Muyzer, G. et Smalla, K. (1998) Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology
- Myers, R.M., Fischer, S.G., Lerman, L.S. et Maniatis, T. (1985) Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis, 13 : 3131-3145
- Nübel, U., Garcia-Pichel, F., Kuhl, M. et Muyzer, G. (1999) Quantifying microbial diversity : morphotypes, 16S rRNA genes, and carotenoids of oxygenic phototrophs in microbial mats, *Applied and Environmental Microbiology* 65, 422-430
- O'Toole, G., Kaplan, H.B. et Kolter, R. (2000) Biofilm formation as microbial development, *Annual Review of Microbiology* 54, 49-79
- Ovaskainen, O. (2002) Long-term persistence of species and the SLOSS problem, *Journal of Theoretical Biology* 218, 419-433
- Prigent-Combaret, C., Vidal, O., Dorel, C. et Lejeune, P. (1999) Abiotic surface sensing and biofilm-dependent regulation of gene expression in *Escherichia coli*, *Journal of Bacteriology* 181, 5993-6002
- Shirtliff, M.E., Mader, J.T. et Camper, A.K. (2002) Molecular interactions in biofilms, *Chemistry and Biology* 9 (8), 859-871
- Stevenson, R.J., Bothwell, T.M. et Lowe, R.L. (1996) Algal Ecology – Freshwater benthic ecosystems, *Academic Press*
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D.G. et Costerton, J.W. (2002) Biofilms as complex differentiated communities, *Annual Review of Microbiology* 56, 187-209

- Tison, J., Park, Y.-S., Coste, M., Wasson, J.G., Ector, L., Rimet, F. et Delmas, F. (2005) Typology of diatom communities and the influence of hydro-ecoregions: A study on the French hydrosystem scale, *Water Research* 39 (14), 3177-3188
- Vannote, R.L., Minshall, G.W., Cummins, K.W., Sedell, J.R. et Cushing, C.E. (1980) The river continuum concept, *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 37 (1), 130-137
- Watnick, P. et Kolter, R. (2000) Biofilm, city of microbes, *Journal of Bacteriology* 182 (10), 2675-2679
- Wilson, I.G. (1997) Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification, *Applied and Environmental Microbiology* 63, 3741-3751
- Wimpenny, J., Manz, W. et Szewzyk, U. (2000) Heterogeneity in biofilms, *FEMS Microbiology Reviews* 24 (5), 661-671
- Zhou, S.R. et Wang, G. (2005) One large, several medium, or many small ?, *Ecological Modelling* 191, 513-520

Tableau 1 : caractéristiques chimiques des sites de Condat et Saillant mesurées à trois périodes

	Temps (jour)	MES (mg L ⁻¹)	N-NH ₄ ⁺ (mg L ⁻¹)	N-NO ₂ ⁻ (mg L ⁻¹)	N-NO ₃ ⁻ (mg L ⁻¹)	P-PO ₄ ³⁻ (mg L ⁻¹)	P total (mg L ⁻¹)	SiO ₂ (mg L ⁻¹)	COD (mg L ⁻¹)	Cl ⁻ (mg L ⁻¹)	SO ₄ ²⁻ (mg L ⁻¹)	Na ⁺ (mg L ⁻¹)	K ⁺ (mg L ⁻¹)	Mg ²⁺ (mg L ⁻¹)	Ca ²⁺ (mg L ⁻¹)	Chl. <i>a</i> (mg L ⁻¹)
Saillant	0	7,500	0,022	0,004	0,942	0,006	0,061	13,160	3,26	7,570	4,675	7,279	2,278	3,237	8,669	0,560
	6	4,200	0,012	0,001	1,044	0,009	0,034	13,290	3,26	8,777	5,965	7,569	2,111	3,407	8,663	nd
	21	4,200	0,005	0,004	1,227	0,008	0,030	12,640	3,23	6,141	2,788	7,109	1,830	3,032	8,285	3,933
	<i>moyenne</i>	<i>5,300</i>	<i>0,013</i>	<i>0,003</i>	<i>1,071</i>	<i>0,008</i>	<i>0,042</i>	<i>13,030</i>	<i>3,25</i>	<i>7,496</i>	<i>4,476</i>	<i>7,319</i>	<i>2,073</i>	<i>3,225</i>	<i>8,539</i>	<i>2,200</i>
	<i>ecart type</i>	<i>1,905</i>	<i>0,009</i>	<i>0,002</i>	<i>0,144</i>	<i>0,002</i>	<i>0,017</i>	<i>0,344</i>	<i>0,02</i>	<i>1,319</i>	<i>1,598</i>	<i>0,233</i>	<i>0,226</i>	<i>0,188</i>	<i>0,220</i>	<i>2,385</i>
Condat	0	13,600	0,024	0,007	0,730	0,021	0,215	11,340	2,90	11,932	10,148	11,292	2,615	4,820	19,826	4,143
	6	7,333	0,057	0,007	0,722	0,040	0,087	11,720	3,22	11,423	9,003	11,345	2,574	4,769	16,963	nd
	21	5,200	0,059	0,008	0,885	0,063	0,117	10,050	2,89	10,436	7,321	10,638	2,182	4,128	16,349	2,967
	<i>moyenne</i>	<i>8,711</i>	<i>0,047</i>	<i>0,007</i>	<i>0,779</i>	<i>0,041</i>	<i>0,140</i>	<i>11,037</i>	<i>3,00</i>	<i>11,264</i>	<i>8,824</i>	<i>11,092</i>	<i>2,457</i>	<i>4,572</i>	<i>17,713</i>	<i>3,600</i>
	<i>ecart type</i>	<i>4,366</i>	<i>0,020</i>	<i>0,001</i>	<i>0,092</i>	<i>0,021</i>	<i>0,067</i>	<i>0,875</i>	<i>0,18</i>	<i>0,761</i>	<i>1,422</i>	<i>0,394</i>	<i>0,239</i>	<i>0,386</i>	<i>1,855</i>	<i>0,832</i>
<i>P</i>		0,268	0,050	0,043	0,050	0,050	0,050	0,050	0,05	0,050	0,050	0,050	0,127	0,050	0,050	0,439

Tableau 2 : caractéristiques physiques des sites de Condat et Saillant mesurées à trois périodes

	Temps (jour)	Température (°C)	pH	Conductivité (µS cm ⁻¹)	Vitesse à 30cm (m s ⁻¹)	O ₂ (mg L ⁻¹)
Saillant	0	15,0	8,1	83	0,4	10,7
	6	12,3	7,6	82	0 à 0,2	10,7
	21	8,1	7,7	77	0,1 à 0,25	12,5
	<i>moyenne</i>	<i>11,8</i>	<i>7,8</i>	<i>81</i>		<i>11,3</i>
	<i>ecart type</i>	<i>3,5</i>	<i>0,3</i>	<i>3</i>		<i>1,0</i>
Condat	0	15,5	7,9	154	0,4	7,7
	6	12,7	7,5	138	0,3	9,7
	21	8,4	8,0	132	0,3	11,4
	<i>moyenne</i>	<i>12,2</i>	<i>7,8</i>	<i>141</i>	<i>0,3</i>	<i>9,6</i>
	<i>ecart type</i>	<i>3,6</i>	<i>0,3</i>	<i>11</i>	<i>0,0</i>	<i>1,9</i>
<i>P</i>		0,513	0,827	0,050	0,180	0,268

Tableau 3 : concentration d'ADN extrait mesurée par spectrophotométrie et sur gel d'agarose, quantités d'ADN et de matière sèche de l'échantillon extrait, rendement d'extraction, quantités d'ADN template pour la PCR et amplifié, et rendement d'amplification, présentés pour les 24 échantillons de biofilms épilithiques des coupons en acier inoxydable de la Vézère

échantillon	concentration d'ADN	concentration d'ADN	quantité d'ADN	MS de l'échantillon	rendement d'extraction	quantité d'ADN	quantité d'ADN	rendement amplification
	extrait ^a	extrait ^b	extrait ^c	extrait		template pour la PCR	amplifié	
	(ng μl^{-1})	(ng μl^{-1})	(μg)	(mg)	($\mu\text{g ADN mg}^{-1}$ MS)	(ng)	(ng)	
S3E2	13,5	6,3	0,68	0,8	0,90	50,0	3078	62
S3E3	23,8	3,8	1,19	0,8	1,46	50,0	3023	60
S3E4	11,6	5,2	0,58	1,7	0,34	49,9	2768	55
S3E5	14,4	7,0	0,72	2,3	0,32	50,4	3107	62
S3E6	23,1	7,0	1,16	1,9	0,60	50,8	2811	55
S3E7	28,6	2,6	1,43	0,8	1,91	57,2	3021	53
S3E9	8,7	3,3	0,43	0,2	2,35	49,9	3290	66
S3E10	10,2	4,4	0,51	1,9	0,26	50,5	3163	63
S3E13	34,3	1,6	3,09	0,8	3,86	68,6	1811	26
S3E14	7,0	1,5	0,35	0,5	0,70	50,2	2921	58
S3E15	6,4	1,4	0,32	1,2	0,26	50,2	3580	71
S3E16	5,9	2,5	0,30	0,9	0,34	49,7	2983	60
C3E2	25,6	-	1,28	9,3	0,14	51,2	4155	81
C3E3	13,1	-	0,65	5,5	0,12	49,4	3438	70
C3E4	9,2	-	0,46	3,5	0,13	49,7	3880	78
C3E5	17,7	-	0,89	4,7	0,19	49,6	3621	73
C3E6	12,2	-	0,61	9,8	0,06	48,8	3836	79
C3E7	6,8	-	0,34	1,7	0,20	50,3	3447	68
C3E9	3,4	-	0,17	1,8	0,09	49,5	3765	76
C3E10	10,8	-	0,54	3,3	0,17	49,7	3463	70
C3E13a	10,9	11,3	0,55	<	-	50,1	2890	58
C3E13b	5,9	5,3	0,30	<	-	-	-	-
C3E14	9,9	8,0	0,50	1,9	0,27	49,5	3671	74
C3E15	9,4	4,6	0,47	0,4	1,24	49,8	3857	77
C3E16	6,4	4,8	0,32	<	-	49,9	3664	73

^a concentration mesurée spectrophotométriquement (Nanodrop ND-1000)

^b concentration mesurée sur gel d'agarose

^c d'après les concentrations d'extrait mesurées au Nanodrop ND-1000

Tableau 4 : présence/absence des bandes obtenues en DOGE pour les 12 échantillons individuels des coupons de Condat et les 6 échantillons correspondant aux pools des échantillons individuels. La richesse spécifique (S) est indiquée.

	C3E15	C3E3	C3E2	C3E14	CA ^a	CB ^b	CC ^c	SA ^d	SB ^e	SC ^f	C3E16	C3E7	C3E4	C3E5	C3E13	C3E6	C3E9	C3E1
B1	x			x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		x	x		x
B2	x			x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		x	x		x
B3	x			x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		x	x		x
B4		x														x		
B5			x		x													
B6	x		x		x	x		x	x	x	x	x	x			x		
B7	x				x			x	x	x	x	x	x					
B8								x										
B9		x	x		x	x	x				x	x	x	x	x	x	x	x
B10								x	x	x								
B11	x	x	x	x	x	x	x				x	x	x	x	x	x	x	x
B12								x	x	x								
B13											x	x				x	x	x
B14								x	x	x								
B15	x	x	x	x	x	x	x				x	x	x	x	x	x	x	x
B16	x	x	x	x	x	x	x				x	x	x	x	x	x	x	x
B17	x	x	x	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
B18								x	x	x								
B19	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x			
B20								x	x	x								
B21	x	x	x	x	x	x	x				x	x	x	x	x	x	x	x
B22								x	x	x								
B23	x	x	x		x													
B24	x	x	x	x	x	x	x				x	x	x	x		x	x	x
B25	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		x			x
B26								x	x	x								
B27	x	x	x	x	x	x	x				x	x	x	x	x	x	x	x
B28	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
B29	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
B30	x																	
B31	x					x		x	x	x	x	x		x		x	x	x
B32	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
B33	x							x	x	x								
B34	x		x	x							x	x						
B35								x	x	x								
B36											x	x						
B37	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
B38		x	x	x	x	x	x								x	x	x	x
B39						x	x				x	x	x	x	x			
B40												x				x		
B41						x	x				x	x			x			
B42	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
B43								x	x	x								
S	14	18	19	19	23	23	21	24	24	23	26	27	21	18	19	25	16	20

a mélange des échantillons C3E15, C3E3, C3E2 et C3E14

b mélange des échantillons C3E16, C3E7, C3E4 et C3E5

c mélange des échantillons C3E13, C3E6, C3E9 et C3E1

d mélange des échantillons S3E2, S3E9, S3E14 et S3E6

e mélange des échantillons S3E4, S3E15, S3E16 et S3E3

f mélange des échantillons S3E5, S3E7, S3E10 et S3E13

2.2.5 Résultats complémentaires

L'analyse comparée des grands et petits coupons a été réalisée en changeant de technique de génotypage des communautés bactériennes. L'ARISA permet en effet de comparer simultanément un plus grand nombre d'échantillon que la DGGE. Huit petits coupons répliqués ont été comparés à 4 sous échantillons de 2 grands coupons (1 surface d'un grand coupon correspond à la surface de 4 petit coupons). Pour chacun des 4 sites étudiés, cette démarche a permis l'analyse d'un seul tenant (1 grand coupon) ou fragmentée (4 petits coupons) de la surface colonisée.

En ce qui concerne la richesse spécifique, la courbe de raréfaction (i.e. le nombre d'espèces cumulé en fonction de la surface échantillonnée) permet de déterminer le nombre maximum d'espèces par site et surtout la surface minimale qu'il convient d'échantillonner pour recueillir au moins 75 % de ces espèces (figure 10). Pour 3 des 4 sites testés, la surface minimale à échantillonner pour obtenir une richesse est comparable entre grands et petits coupons, autour d' $1/4 \text{ m}^2$.

Surface minimale à échantillonner

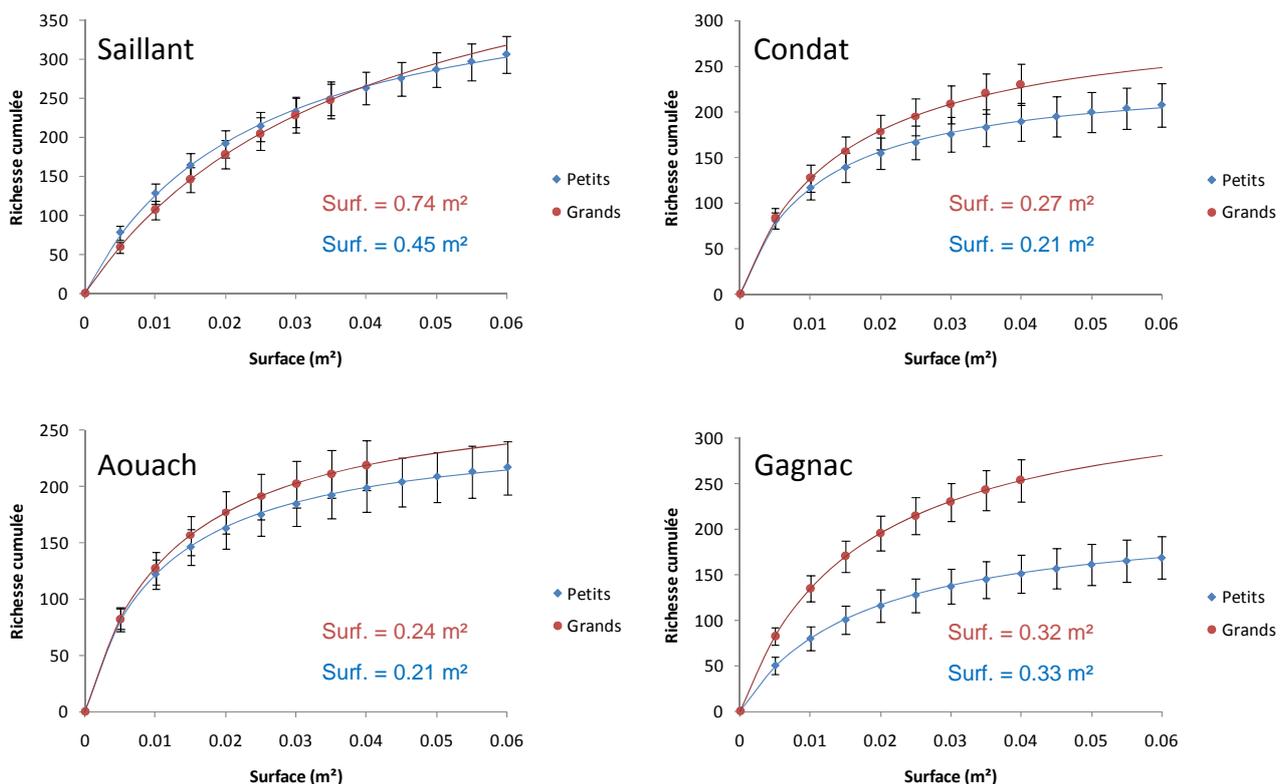


Figure 10. Courbes de raréfaction obtenues à partir de l'analyse ARISA de la composition des communautés bactériennes associées à des biofilms ayant colonisé des petits coupons, de surface S, et des grands coupons, de surface 4S, d'acier inoxydable.

Pour comparer la composition des communautés bactérienne des biofilms ayant colonisé les 2 types de support, une représentation en MDS des profils de présence / absence des différents ITS obtenus en ARISA a été retenue (figure 11). Chaque communauté est représentée par un figuré qui indique son origine, la taille du coupon étant symbolisée par la taille du figuré. Aucune tendance nette n'apparaît sur le graphe. Les communautés bactériennes des biofilms étudiés ne se différencient ni en fonction de leur origine (rivière, site), ni en fonction de la taille des coupons (petit ou grand) sur lesquels elles ont été recueillies.

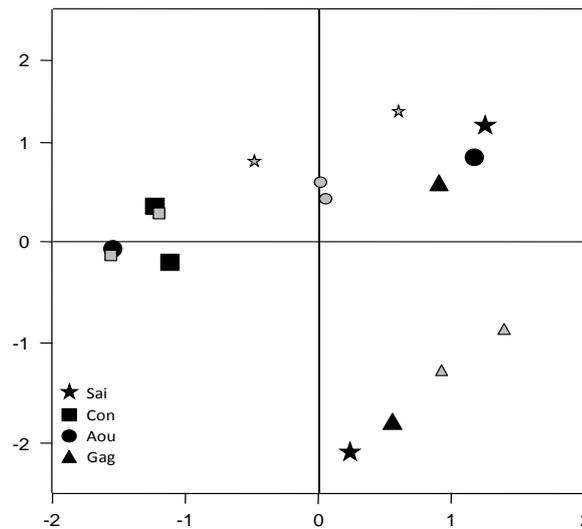


Figure 11. Représentation en MDS présentant les distances entre les communautés bactériennes (présence / absence déterminée par ARISA,) de différents échantillons de biofilms échantillonnés dans la Vézère (Con, Sai) ou dans la Garonne (Aou, Gag) sur des grands (figuré de grande dimension, noir) ou des petits (figuré de petite dimension, gris) coupons d'acier inoxydable.

2.3. Cas des diatomées

Morin, S., Boulêtreau, S., Lyautey, E., Garabétian, F., Delmas, F., Coste, M. 2008.
« Application de la théorie SLoSS (Single Large or Several Small) aux communautés périphytiques de deux cours d'eau : à superficie égale, est-il préférable d'échantillonner une grande réserve ou plusieurs petites ? ». 27ème Colloque de l'Association des Diatomistes de Langue Française, Dijon, 1-4 septembre 2008.

La théorie SLoSS (Diamond 1975) postule que la diversité spécifique d'une réserve de taille donnée sera plus importante pour un seul grand que pour plusieurs petits substrats. La comparaison des résultats obtenus sur les coupons inox des capteurs Biox (la surface d'un grand coupon équivalant à celle de 4 petits) nous a permis de tester cette hypothèse en l'appliquant aux biofilms périphytiques de la Vézère et de la Garonne.

2.3.1 Estimateurs quantitatifs de la biomasse algale

La caractérisation de la biomasse algale (pigments, nombre de diatomées / cm^2) indique effectivement une tendance à l'augmentation de la biomasse établie avec la surface de substrat disponible (Figure), en accord avec la théorie de Diamond.

Pour chaque paramètre suivi (chlorophylle, densités cellulaires) et chaque site, on observe une augmentation significative de la biomasse établie sur grands coupons, en comparaison avec les plus petites surfaces. Une seule exception à ces tendances est observée pour les densités de diatomées à Gagnac, cependant les différences entre petits et grands coupons ne sont ici pas significatives et n'indiquent par conséquent pas une inversion de la tendance.

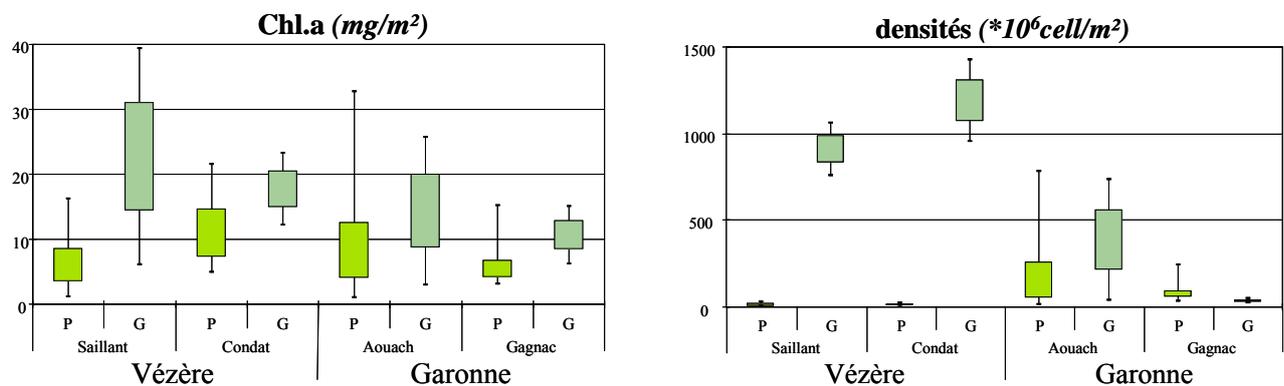


Figure 12. Caractéristiques de la biomasse algale collectée après 4 semaines de colonisation sur petits (P) coupons inox, de surface S, et grands (G) coupons, de surface 4S.

2.3.2 Estimateurs qualitatifs des communautés de diatomées

2.3.2.1. Richeur spécifique :

Si l'on s'intéresse plus particulièrement à la structure des communautés de diatomées, on observe en revanche que la richesse maximale théorique (~ 260 sur petits coupons, ~ 120 sur grands coupons) n'est pas atteinte, quels que soient le nombre, et la taille, des coupons. Ceci est lié à une forte proportion d'espèces rares, d'autant plus importante que les coupons sont petits (~ 70 espèces présentent une seule occurrence, ~ 30 seulement deux occurrences, sur petits coupons vs. ~ 50 espèces avec une seule occurrence sur grands coupons). Dans le cas de cet indicateur, l'utilisation de multiples petits substrats semble donc favoriser la caractérisation exhaustive de la diversité spécifique d'un site (Figure 1), alors que les communautés qui se développent sur grand coupons semblent plus stables, en raison de dominances plus marquées.

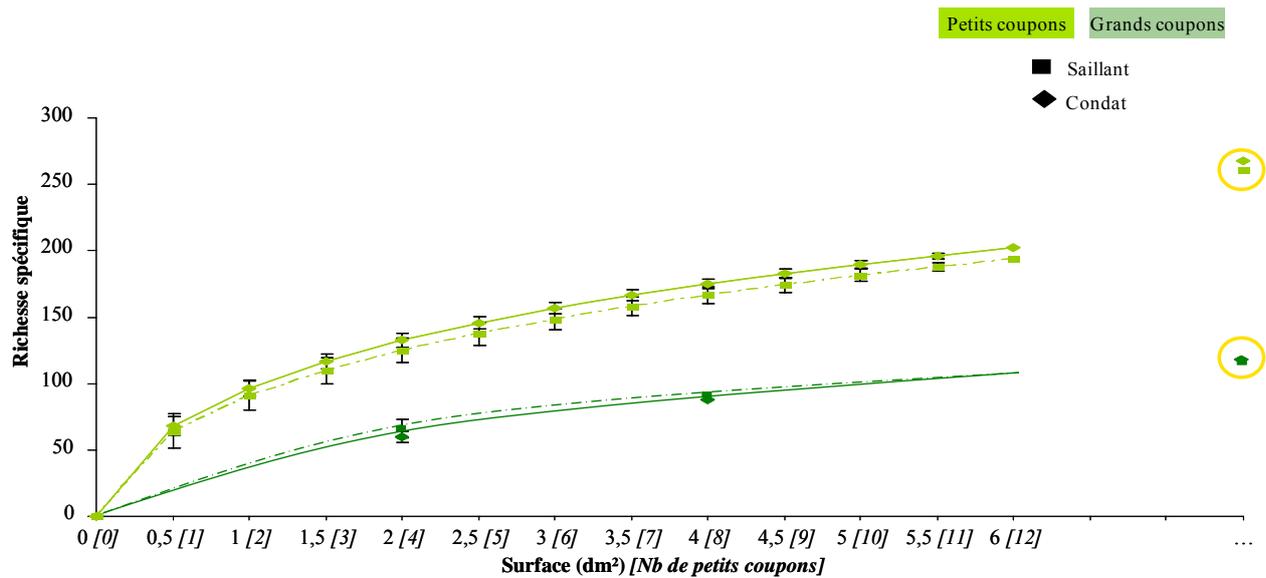


Figure 1 Courbes de raréfaction obtenues à partir de l'analyse de la composition diatomique des biofilms de la Vézère ayant colonisé des petits coupons, de surface S, et des grands coupons, de surface 4S, d'acier inoxydable.

La surface minimale à échantillonner, calculée d'après ces courbes, pour recueillir un minimum de 75% du nombre total théorique d'espèces, est comparable pour les deux sites. Il correspond à environ 6 dm² pour les petits coupons et 4 dm² pour les grands coupons.

2.3.2.2. Composition taxonomique des communautés :

Par ailleurs, la structure spécifique des communautés à un endroit donné peut être très différente selon la taille du substrat, comme on peut l'observer pour les échantillons issus d'aval de la Vézère (Figure ; sous-cluster correspondant aux communautés de Condat).

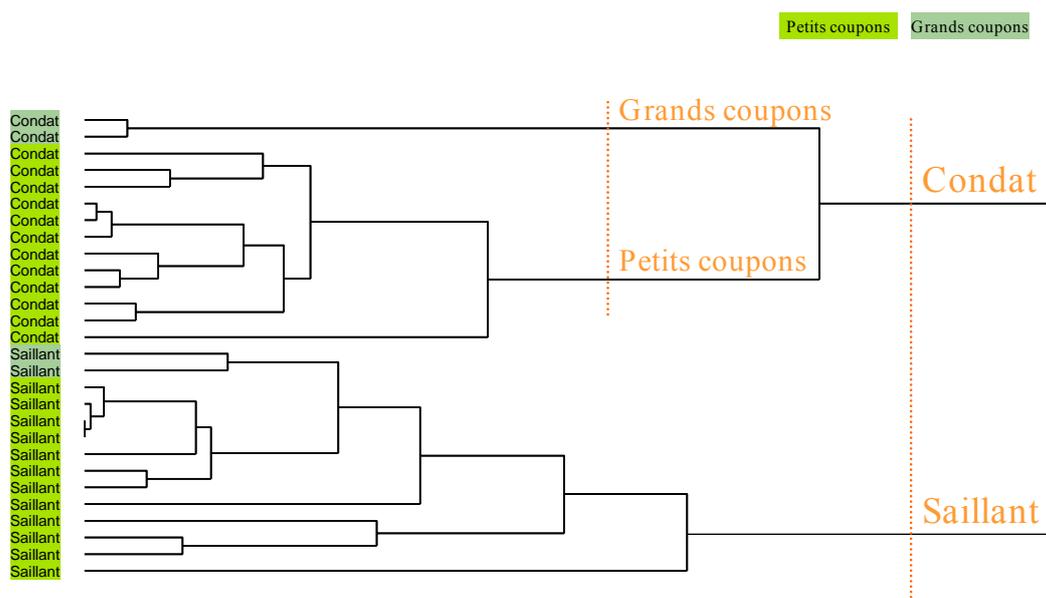


Figure 14. Classification Ascendante Hiérarchique basée du la structure spécifique des communautés.

L'étude plus précise des abondances relatives des espèces dominantes (Figure 15) permet d'observer plus spécifiquement les effets de la taille du substrat sur la proportion d'espèces établies. Sur grands coupons, les espèces mobiles (e.g. *Navicula lanceolata*) ou pédonculées (*Gomphonema* sp.) se développent préférentiellement, au détriment par exemple d'espèces prostrées, plus fortement adhérentes au substrat (telles que *Cocconeis placentula*).

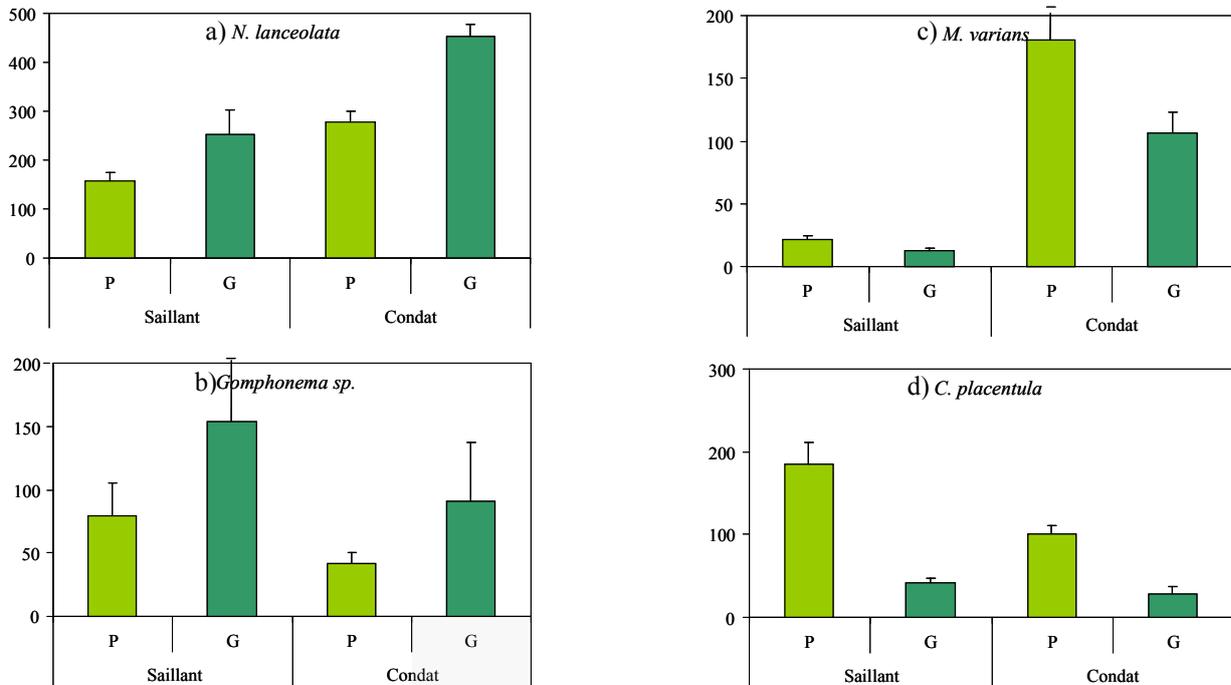


Figure 15. Abondances relatives (en %) des espèces dominantes sur les coupons inox. a-b) Taxons significativement plus abondants sur grands que sur petits coupons ; c-d) Taxons significativement moins abondants sur grands que sur petits coupons.

On observe par ailleurs un « effet site » qui peut, pour certaines espèces, être plus important que l'« effet taille du substrat ». Dans le cas des espèces d'*Achnantheidium* présentées en Figure 16, la diminution amont / aval de ces espèces de bonne qualité traduit une dégradation de l'état trophique de la Vézère entre Saillant et Condat, laquelle s'observe également via une chute de 1 à 2 points des notes d'indice diatomique (Indice Biologique Diatomées, Coste et al. 2009).

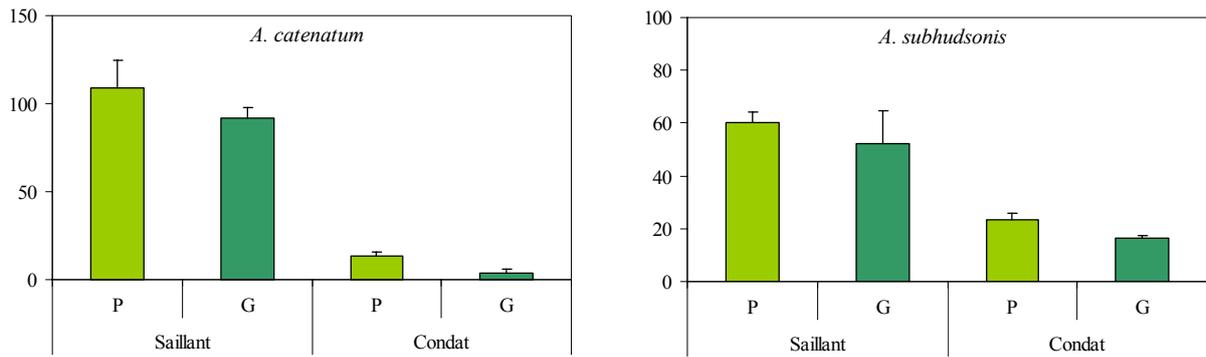


Figure 16. Abondances relatives (en %) des espèces sub-dominantes sur les coupons inox. Taxons plus influencés par le site d'origine que par la taille des substrats.

2.3.2.3. Architecture tridimensionnelle des communautés de diatomées :

Sur grands coupons, la communauté est constituée d'une plus grande proportion d'espèces érigées, à long pédoncule, ou filamenteuses (Figure 17), indiquant une cinétique de colonisation plus avancée que sur petits coupons.

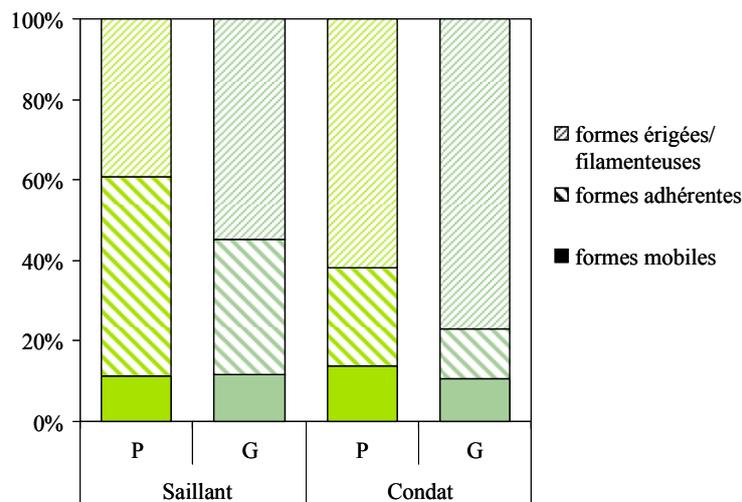


Figure 2. Abondances relatives des différents morphotypes de diatomées des biofilms de la Vézère ayant colonisé des petits (P) coupons, de surface S, et des grands (G) coupons, de surface 4S, d'acier inoxydable (d'après Passy 2007).

Or Eulin (1997) a montré pour les diatomées benthiques de la Garonne que la colonisation des substrats se fait par les bords du substrat (Figure 18), puis vers l'intérieur, d'abord par les petites espèces prostrées, puis en 3 dimensions. Ce qui plaiderait plutôt pour une cinétique plus rapide sur petits coupons. Les hypothèses alternatives qui pourraient donc expliquer ses résultats seraient (i) l'existence d'un ratio largeur du substrat / épaisseur maximale du biofilm, qui pourrait être en lien avec des variations de l'hydrodynamique à proximité des bords du substrat, par exemple, ou (ii) des

modifications du flux laminaire le long des lames, et dépendantes de la taille et de la forme des substrats.

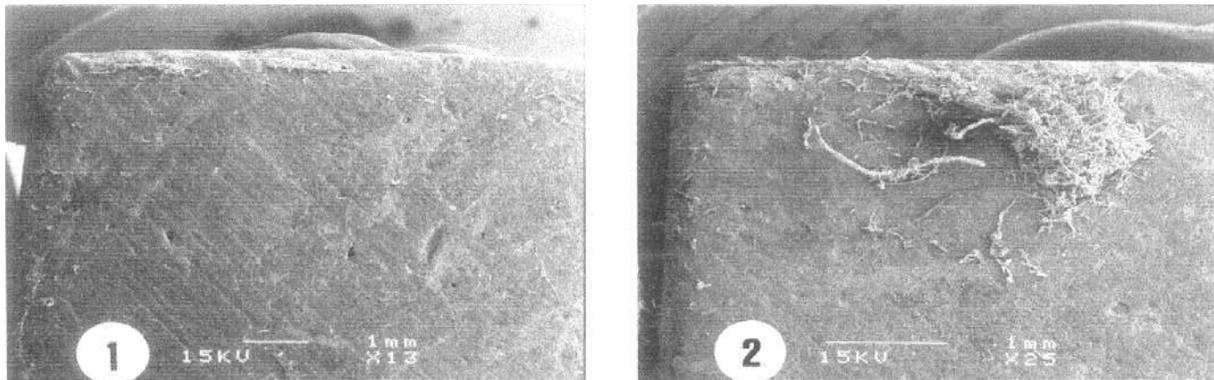


Figure 18. Colonisation de substrats par les diatomées après 24h d’immersion. Les premières zones colonisées sont en périphérie du substrat (tiré de Eulin, 1997).

Cette tendance à l’épaississement du biofilm d’atomique s’observe également de l’amont vers l’aval (Figure 17), probablement en lien avec un développement d’espèces érigées plus compétitrices pour les nutriments (Burkholder *et al.* 1990).

2.3.3 Conclusions

L’analyse taxonomique indique que, dans les cas des communautés diatomiques, un effort d’échantillonnage sur 0,1 m² serait largement suffisant à l’obtention d’une structure de communauté représentative de la diversité.

En résumé, et par rapport aux hypothèses énoncées dans la théorie des SLoSS, on observe :

- sur petits coupons (S), une densité algale réduite, et une structure de communautés très diversifiée et variable, composé d’espèces pionnières typiques de débuts de cinétiques de colonisation ;
- sur grands coupons (4S), une densité algale plus élevée, et des communautés à la structure plus stable mais moins diversifiées, largement dominées par des espèces à stratégie de colonisation plus tardive et assurant un développement en 3D du biofilm diatomique.

2.3.4 Références bibliographiques

Burkholder JM, Wetzel RG & Klomparens KL 1990. Direct comparison of phosphate uptake by adnate and loosely attached microalgae within an intact biofilm matrix. *Applied and Environmental Microbiology* 56(9):2882-2890

Coste M, Boutry S, Tison-Rosebery J, Delmas F 2009. Improvements of the Biological Diatom Index (BDI): Description and efficiency of the new version (BDI-2006). *Ecological Indicators* 9(4):621-650.

Diamond JM 1975. The island dilemma: Lessons of modern biogeographic studies for the design of natural reserves. *Biological Conservation* 7(2):129-146

Eulin A 1997. Les communautés de diatomées épilithiques de la Garonne. Répartition naturelle et étude expérimentale in situ de la dynamique de colonisation sur substrat artificiel. In *C.E.S.A.C.* Univ. Paul Sabatier, 248p. + annexes

Passy SI 2007. Diatom ecological guilds display distinct and predictable behavior along nutrient and disturbance gradients in running waters. *Aquatic Botany* 86(2):171-178

2.4. Conclusions, recommandations

A partir de l'analyse de la composition de deux communautés types des biofilms de rivière, nous avons montré que l'analyse cumulée de surfaces d'échantillonnages équivalentes révèle que la diversité des formes microbiennes (bactéries ou diatomées) intégrée est croissante. La diversité maximale est atteinte pour des surfaces échantillonnées plus petites pour les diatomées que pour les bactéries, de l'ordre respectivement de 0,1 et de 0,25 m².

Miniaturiser à l'excès un capteur à biofilm, en rivière, reviendrait à limiter la diversité des biofilms tests et donc à réduire la portée de l'indicateur fonctionnel proposé. Mais pour les mêmes raisons, réaliser un capteur de grande surface n'apparaît pas non plus satisfaisant.

Pour intégrer une diversité microbienne maximale, il conviendrait de multiplier des surfaces de capteur à planter simultanément en un site. Idéalement pour chaque site ces surfaces développées devraient représenter jusqu'à ¼ de m². Cela permettrait alors de mesurer la réponse fonctionnelle d'une variété de biofilms tests représentant la diversité maximale théorique en un site.

Par ailleurs, les diatomées constituent un excellent moyen de caractériser les communautés obtenues parce que l'autoécologie de certaines espèces est connue. L'étude des espèces présentes révèle une sélectivité de la taille de la surface du coupon sur le type d'assemblage obtenu : des assemblages très diversifiés, constitués de formes pionnières dans le cas des petits coupons, une diversité moindre associée à des formes indiquant un stade de maturation plus avancé du biofilm sur les grands coupons. Le choix de la surface n'est donc pas neutre puisqu'il conditionne la nature même des communautés microbiennes qui constitueront le biofilm.

Si la miniaturisation du dispositif de détection répond à des contraintes évidentes de manipulation, d'encombrement etc., elle ne satisfait pas nécessairement aux contraintes de représentativité des communautés de microorganismes que l'on souhaite étudier. Un compromis doit donc être recherché pour définir la taille idéale du capteur.

3. Mesure de l'épaisseur et de l'élasticité des biofilms de rivière par voltammétrie basée sur l'utilisation d'électrodes disque plan tournant

3.1. contexte et objectifs

La mesure voltammétrique de la diffusion d'un traceur électrochimique (FeCN_6^{3-}) au niveau de la surface d'une électrode à disque - plan tournant (EDT) permet la mesure de l'épaisseur de la barrière de diffusion liée à la colonisation de l'EDT par un biofilm (épaisseur). Cet essai de laboratoire permet une mesure discrète mais rapide, non destructive et sensible de la colonisation par un biofilm de l'EDT que l'on a immergée dans le milieu. C'est un principe de détection des biofilms qui a été proposé par Herbert-Guillou et al. *Electrochimica Acta* 45 (1999).

Pour mettre en jeu ce principe de détection des biofilms, nous avons établi par l'intermédiaire du PNIR Biofilms du CNRS une collaboration avec l'équipe (B Tribollet et J Gamby, LISE - Paris) qui en était l'auteur.

Pour prouver l'intérêt de l'application des électrodes à disque-plan tournant (EDT) pour caractériser l'architecture (structure tridimensionnelle : épaisseur et élasticité) d'un biofilm de rivière, nous avons envisagé une expérience visant à placer les EDT dans des conditions hydrodynamiques notablement différentes et caractérisées, au moins en théorie, par des différences de valeurs de Reynolds.

Une première application a été réalisée en canal de laboratoire dans le cadre du stage de Master mention « hydrologie hydrochimie sol et environnement » de Yann Peltier.

Une deuxième démarche consistait à produire des biofilms naturels (in situ) ayant des architectures différentes, en « jouant » sur :

- l'âge des biofilms : biofilms jeune/mature (après 7 et 21 jours de colonisation) ;
- les conditions hydrodynamiques qui règnent pendant la mise en place de ces biofilms (en générant 2 conditions contrastées sur le même site).

Pour pouvoir considérer que les autres facteurs susceptibles d'influencer l'architecture du biofilm sont identiques, nous avons choisi de travailler sur un site unique (une station de rivière) dans lequel nous avons généré artificiellement des conditions hydrodynamiques distinctes à l'aide d'un solide servant de support aux EDT. Les conditions d'écoulement résultant de la forme et des dimensions de ce solide ont été validées par nos collègues de l'IMFT. Le solide immergé dans la rivière est formé de deux cylindres creux en Plexiglas® transparent de diamètres respectifs de 20 et 10 cm associés l'un à l'autre par un tronçône convergent. Chaque section cylindrique (1 et 2) est équipée de 12 EDT dont le disque de platine affleure à la surface interne du cylindre. Dans chacune des sections, 6 EDT ont été prélevées après 7 et 21 jours de colonisation, puis analysées au laboratoire. Pour chaque EDT, la mesure de l'épaisseur par électrochimie a été complétée par l'estimation des densités bactériennes et algales

(diatomées) ainsi que du pourcentage de recouvrement par le biofilm de la surface du disque de platine. Lors de la mesure voltammétrique, l'analyse du signal électrochimique en fonction de la vitesse de rotation de l'EDT a permis d'attribuer à chaque EDT une valeur d'élasticité du biofilm présent à sa surface, l'élasticité pouvant être définie comme la capacité du biofilm à se réduire sous l'effet d'une contrainte hydrodynamique. Cette propriété mécanique du biofilm dépend de l'architecture de l'assemblage et, plus particulièrement du réseau plus ou moins développé de pores et de canaux en son sein. Le paramètre d'élasticité reflète donc plus généralement les capacités d'interaction et d'échanges du biofilm avec le milieu environnant.

3.2. application en canal de laboratoire

Y Peltier. Etude de l'influence de l'hydrodynamique (d'une rivière) sur le développement d'un biofilm épilithique. Rapport de stage de Master mention « hydrologie hydrochimie sol et environnement ». Année 2006 - 2007.

Université Paul Sabatier / INPT / ENSHEEIT.

3.2.1 Contexte général

Pour modéliser les hydrosystèmes de type Garonne (écosystème à biomasse fixée), et prédire le devenir de la biomasse ou la qualité des eaux, les chercheurs se concentrent actuellement sur la modélisation de l'acteur principal du continuum fluvial, le biofilm épilithique (de « épi », autour, et « lithos », la pierre). Les codes biologiques, en cours de développement, s'inspirent généralement d'une description de la dynamique du biofilm sous la forme d'une équation différentielle à une inconnue portant sur la biomasse (Saravia et al., 1998, Morgenroth et Wilderer, 2000). Différents processus (colonisation, croissance, érosion abrasion, détachement, broutage, etc...) sont alors modélisés par autant de termes dans l'équation d'évolution. Le rôle de l'hydrodynamique est généralement pris en compte dans les termes d'érosion et de détachement, mais bien souvent sous la forme d'une grandeur globale comme le débit moyen. Pour les fleuves de type Garonne, Uehlinger (Uehlinger et al., 1996) a par ailleurs proposé puis validé par des mesures de terrain une version simplifiée de cette équation d'évolution du biofilm épilithique, avec seulement un terme de croissance, un terme d'érosion, et un terme d'arrachage catastrophique lié aux crues. Le point faible de toutes ces descriptions est qu'elles utilisent des paramètres globaux et ne tiennent pas compte explicitement des interactions entre le biofilm et l'hydrodynamique près du fond. Pour améliorer ces modèles, il est nécessaire d'introduire des grandeurs plus locales tenant compte des processus pertinents, avant d'en paramétrer les effets à une plus grande échelle. Plusieurs études menées à l'IMFT (Godillot, 1998, Godillot et al., 2001, Fothi, 2003) ont ainsi montré que le terme d'arrachage du biofilm dépendait fortement des conditions hydrodynamiques locales (vitesse de frottement, rugosité hydraulique) et pas uniquement des

conditions globales (débits et tirants d'eau). La prise en compte du comportement de la couche limite au niveau de l'interface, notamment pour le terme d'arrachage et de mise en suspension, permet d'abandonner des paramétrisations globales au profit de grandeurs locales plus pertinentes. La colonisation, la croissance et la sénescence dépendent elles aussi de l'hydrodynamique, même si cette dépendance est rarement prise en compte de façon explicite dans les équations d'évolution du biofilm. Une variation du courant peu ainsi changer la composition taxonomique d'un biofilm (Ghosh et Gaur, 1998) avec une sélection taxonomique en fonction des conditions hydrodynamiques et de leur variabilité dans le temps. Cette sélection par les conditions hydrodynamique va également influencer la réponse du biofilm à un changement de régime hydraulique (Horn et al., 2003). Cet effet de l'« histoire » du biofilm sur ses caractéristiques est très souvent ignoré dans les équations décrivant sa dynamique. Réciproquement, pour la modélisation de l'hydrodynamique, une bonne description de l'évolution du biofilm est nécessaire dans la mesure où un effet rétroactif (Dodds et Biggs, 2002), (Nikora et al., 2002) peut se produire : la structure (filaments par exemple), la cohésion et l'épaisseur du biofilm peuvent contrôler la structure de la couche limite turbulente (rugosité hydraulique et hauteur de déplacement).

Dans bien des études, les protocoles expérimentaux proposés ne sont pas toujours suffisants pour donner des réponses catégoriques sur l'impact de l'hydrodynamique ou bien ne prennent en compte que des grandeurs globales (débit ou vitesse moyenne et même vitesses de surface dans des observations in situ) difficilement transposables. Ainsi, dans les expériences menées jusqu'à présent à l'IMFT, une seule condition hydrodynamique pouvait être testée à la fois (Fothi, 2003, Godillot et al., 2001). Du fait de la variabilité des autres paramètres (température, concentration en nutriments, nature exacte des espèces introduites au moment de l'ensemencement), il est très délicat de conclure sur les effets seuls de l'hydrodynamique. Il aurait fallu que chaque condition hydrodynamique donne lieu à plusieurs expériences identiques pour avoir une bonne représentation de ce point de fonctionnement, mais cela était techniquement impossible.

3.2.2 Stage et problématique

Le but de cette étude expérimentale était (1) de clarifier précisément le rôle de l'hydrodynamique seule dans la dynamique d'évolution du biofilm, puis (2) de déterminer comment le comportement du biofilm vis à vis d'un changement de conditions hydrodynamiques est corrélé aux conditions dans lesquelles il a poussé. Les expériences ont donc été effectuées dans un canal (« canal biologique ») adapté de manière à imposer des conditions hydrodynamiques différentes, mais avec exactement la même variation temporelle pour les autres paramètres expérimentaux (température, nutriments et lumière). Trois écoulements différents et donc trois types de croissance de biofilm épilithique ont été générés. Les explications du dimensionnement, ainsi que le protocole expérimental, sont exposés dans le chapitre 3, à la suite du chapitre 2 consacré à des rappels théoriques sur la modélisation de l'hydrodynamique et du biofilm. Dans le chapitre 4 les résultats de mesures de vitesses par PIV sont

présentés et discutés. Ces mesures ont été effectuées dans le canal biologique (session de mesure : fin mai – début juin), et le « canal d’arrachage » (session de mesure : fin mars) servant à caractériser le biofilm en fin d’expérience. Le chapitre 5 est consacré à la présentation des premières observations sur l’impact de l’hydrodynamique sur le développement d’un biofilm épilithique. Pour finir, la conclusion mettra en évidence les perspectives et les améliorations futures pour cette étude.

3.2.3 Dispositif et protocole expérimental

3.2.3.1 Dimensionnement du canal biologique

En raison de la non répétitivité des conditions expérimentales pour les études précédentes (Godillot, 1998, Fothi, 2003) (variation de température, de la lumière, de l’inoculum ...), il a été décidé que le canal biologique existant (tableau 1) serait modifié pour pouvoir créer trois conditions hydrodynamiques sur une même campagne de mesure.

Tableau 1 : caractéristiques principales du canal biologique avant dimensionnement

Caractéristiques géométriques	Hauteur max = 0,15 m
	Largeur = 0,49 m
	Longueur = 11,2 m
	Pente = 0,16 %
Débits admissibles	Débits Canal = 0 – 20 L/s
	Débits Garonne = 0 – 4000 L/h
Volume d’eau	Cuve avale # 2800 m ³
	Cuve amont #1200 m ³

Au cours du dimensionnement, nous avons donc réfléchi à l’installation de trois zones d’écoulements distinctes. Une pour un écoulement lent et relativement profond en amont, une autre pour un écoulement rapide et peu profond en aval, une dernière pour un écoulement intermédiaire aux deux précédents au centre du canal. La configuration contraposée n’a pas été envisagée, car le passage d’un écoulement rapide à un écoulement lent peut entraîner l’apparition d’un ressaut hydraulique qui aurait été fatal pour le biofilm.

Une fois la configuration établie, la difficulté se situe dans le choix des vitesses moyennes. Ce choix doit être en adéquation avec ce que l’on peut trouver dans la bibliographie, avec les spécificités souhaitées des écoulements et surtout, avec les dimensions du canal originel. Dans la littérature, les vitesses sont comprises entre 10 cm/s et 60 cm/s (Horner et Welch, 1981). Pour atteindre 10 cm/s dans le canal, la géométrie impose le tirant d’eau, ainsi que le débit. Dès lors le choix pour les autres

vitesses dans le canal est fixé. Pour atteindre des vitesses supérieures en aval, la conservation du débit commande une réduction de la section de passage de l'écoulement. Cette réduction ne peut se faire qu'au niveau de la largeur au miroir. Il faut donc installer un convergent (figure 5a). Pour ne pas trop réduire le nombre de substrats par largeur (7 substrats au minimum par largeur $B_{min} \approx 26\text{cm}$), l'installation de seuils longs (figure 5b) est nécessaire pour réduire la veine fluide et obtenir les bonnes vitesses.

Après discussion, les vitesses ont été fixées à 10 cm/s (amont), 25 cm/s (centre) et 40 cm/s (aval), pour un débit de 6 L/s par seconde en sortie de cuve amont. L'écart entre les vitesses est assez important pour que la croissance du biofilm soit différente d'une zone à l'autre.

Le cahier des charges établi, le dimensionnement géométrique a été effectué à l'aide des équations de St-Venant (2.14) et de frottement (2.19), résolues numériquement sous MATLAB en utilisant la fonction « ode113 » qui permet de résoudre les équations différentielles. Le code calcule ce qu'on appelle communément en hydraulique une « courbe de remous » où la variable de sortie est le tirant d'eau h (adaptation de (2.14)).

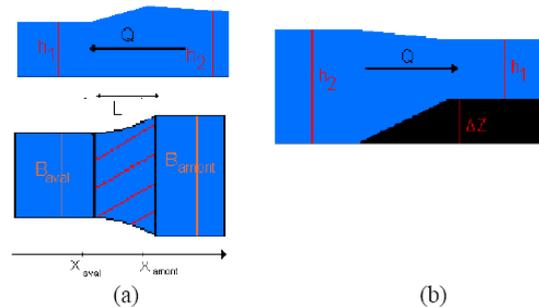


Figure 5 : différents types de convergents utilisés pour le dimensionnement

En se plaçant dans un référentiel dont l'origine correspond à l'aval (figure 6), en intervertissant les signes de I et J (repère indirect) et en combinant la conservation du débit avec (2.14), on obtient :

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{d\bar{U}S}{dx} = 0 \Leftrightarrow \frac{d\bar{U}}{dx} = -\frac{1}{S} \frac{dS}{dx} = -\frac{1}{Bh} \frac{dBh}{dx} \end{array} \right. \quad (3.1)$$

$$\Rightarrow \left\{ \begin{array}{l} \frac{dh}{dx} = \left[-\frac{\bar{U}}{gh} + 1 \right]^{-1} \cdot \left[\frac{\bar{U}}{gB} \frac{dB}{dx} + J - I \right] \end{array} \right. \quad (3.2)$$

Les pertes de charges J sont modélisées en utilisant le paramètre l (chapitre 2.3). On aboutit alors à (3.3).

$$J = \left[0.86 \ln \left(\frac{h-d}{k_s} \right) + 2.14 \right]^{-2} \cdot \frac{Q^2}{8gS^2 R_H} \quad (3.3)$$

Le paramètre s k est estimé à partir des tirants d'eau de l'année 2006 (Bercovitz, 2006) mesurés au temps zéro (avant peuplement) dans le même canal et sur les mêmes rugosités, pour une hauteur d'eau moyenne : $h = 12,3$ cm. En manipulant ces données, on trouve un coefficient de perte de charge de 0,0564 que l'on injecte dans (3.3) en fixant $d = 0.75k$; on estime alors k_s :

$$\frac{1}{\sqrt{0.0564}} = 0.86 \ln \left(\frac{0.123 - 0.75k}{k_s} \right) + 2.14 \Rightarrow k_s = 0.5k \quad (3.4)$$

Au final, on considère que la loi de frottement du canal à rugosités de 2 centimètres de haut, est :

$$\frac{1}{\sqrt{\lambda}} = 0.86 \ln \left(\frac{h - 0.75k}{0.5k} \right) + 2.14 \quad (3.5)$$

Cette loi (3.5) est valable pour de faibles variations (+/- 5 cm) du tirant d'eau de dimensionnement (12,3 cm). Le code de dimensionnement suit les règles suivantes : la condition aval dicte le sens d'intégration : de l'aval vers l'amont. On fixe alors un pas Dx et on résout à tous les pas (figure 6). Les hauteurs calculées aux pas $(n-1)$ sont les conditions limites des pas (n) . Les calculs sont effectués sur quatre zones aux caractéristiques distinctes ; entre chaque zone, des fonctions annexes sont ajoutées pour simuler le changement de la configuration géométrique.

Dans la zone une (amont) (figure 7), la vitesse est de 10 cm/s : elle est la spécification limitante

La zone deux est une zone de convergence. Elle permet de réduire progressivement la largeur du canal pour accélérer la vitesse. Elle est codée sous la forme suivante (notations sur figure 4a) :

$$B(x) = B_{aval} \exp \left(\ln \left(\frac{B_{amont}}{B_{aval}} \right) \left(\frac{x - x_{aval}}{x_{amont} - x_{aval}} \right) \right) \quad (3.8)$$

Dans la zone trois (centre), la vitesse à obtenir est de 0,25 cm/s, l'ajout d'un seuil long (marche) en plus du convergent garantit une diminution supplémentaire de la section de la veine fluide. Dans le code, ce seuil est modélisé sous la forme d'un saut de hauteur sans pertes de charge (marche petite devant la longueur du canal)

$$h_1 + \Delta Z + \frac{Q^2}{2gS_1^2} = h_2 + \frac{Q^2}{2gS_2^2} \quad (3.9)$$

La formule (3.9) est basée sur la conservation de l'énergie spécifique

Dans la zone quatre, la vitesse doit être 0,40 cm/s en sortie de la zone 3, un seuil long permet de réduire encore plus la section mouillée.

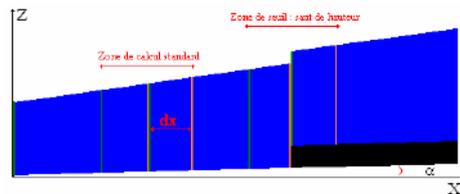


Figure 6 : schémas de résolution numérique des équations de St-venant. En vert, les conditions limites aval pour chaque pas de calcul, en orange les hauteurs d'eau calculée. La marche noire représente un seuil et engendre un saut des hauteurs d'eau dans le code

Le calcul de dimensionnement aboutit à la configuration suivante (figure 7) :

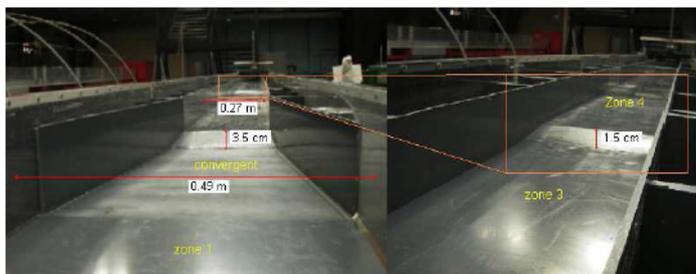


Figure 7 : Photos des différentes zones dimensionnées du canal biologique

Les hauteurs d'eau de fonctionnement les vitesses moyennes et les vitesses de frottement pour un débit amont de 6 L/s, en tout point du canal sont accessibles en sortie du code et tracés dans la figure 8.

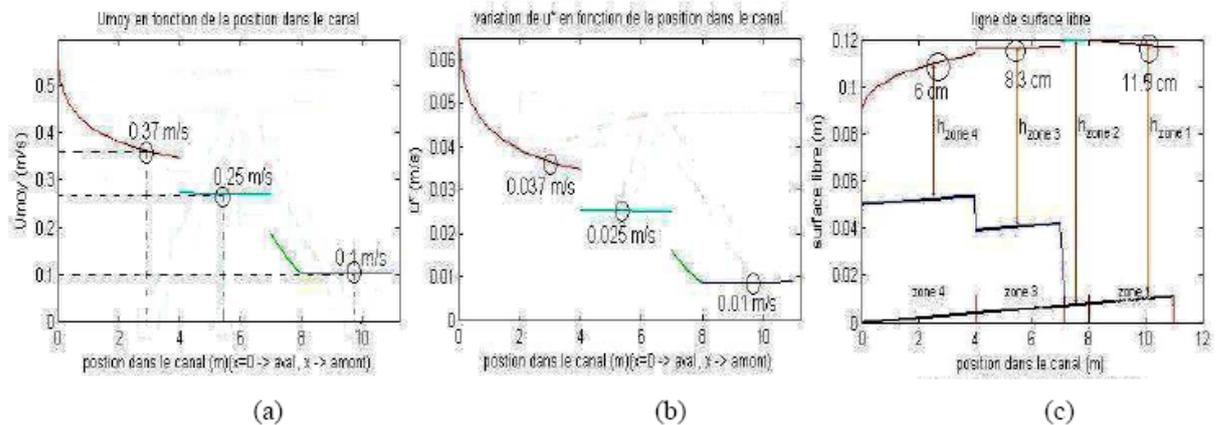


Figure 8 : résultats de dimensionnement du canal biologique pour un débit amont de 6 l/s ; (a) vitesses moyennes, (b) les vitesses de frottement. Les zones de sauts représentent les réductions de sections dans les différentes zones (rouge = zone 4, cyan = zone 3, vert = zone 2 convergente, bleu foncé = zone 1). (c) les lignes d'eau (rouge et cyan), le bleu foncé localise les seuils longs, le noir la pente du canal. Les cercles noirs O représentent les zones de mesures PIV (depuis l'aval : 3.15 m, 5.65 m et 10 m).

3.2.3.2 Mise en place du protocole expérimental

Pour assurer que l'hydrodynamique est la seule « variable » pouvant agir sur le biofilm. Nous avons contrôlé (au sens de fixé) le rôle de deux paramètres importants en biologie ; la lumière et l'apport en nutriments.

L'éclairage est assuré par une association de tubes au néon de 58 W émettant dans le bleu, le jaune et le orange et de tubes fluorescents horticoles ayant des pics d'émission dans le rouge (longueur d'onde favorables à la croissance des végétaux). Ces néons sont réunis par trois sur cinq chariots disposés tout le long du canal. Ils garantissent un éclairage maximal de 175 E (175 moles de photon par mètre carré et par seconde) au centre des néons, et de 100 E sur les bords ; cette fourchette d'éclairage nous autorise à penser que la photosynthèse ne sera pas un facteur limitant pour le développement des biofilms. En effet, au-delà de 100 E la photosynthèse est dite saturée (Bercovitz, 2006) : les processus de photoinhibition sont évités et il n'y a pas d'adaptation physiologique des cellules à une carence lumineuse. Pour nous rapprocher de la réalité, nous avons placé le canal sous une bâche noire pour limité l'intrusion de lumière extérieure et nous avons réglé les lumière en cycle jour/nuit 12h/12h (été).

Pour éviter l'anémie du biofilm, l'apport des nutriments est géré par une pompe supplémentaire qui récupère l'eau dans la Garonne. Cette eau est filtrée en trois fois (90 μ m, 20 μ m, 5 μ m) et est déversée dans la cuve avale du canal d'expérimentation. Quand le régime d'écoulement de la Garonne le permet (débits inférieurs à 300 m³/s), l'eau est tirée en permanence, on peut considérer qu'il y a saturation en nutriments.

Lors de crues (période de mars à juillet) où la turbidité est trop importante et que la filtration ne suffit pas, la pompe ne tourne plus en continue. Tous les deux jours pendant quatre heures, on remplit la cuve avec de l'eau filtrée pour renouveler les nutriments. Pour éviter l'asphyxie par les sédiments (particule d'argile $< 1\mu\text{m}$), on dilue pendant deux heures avec de l'eau de ville dégazée.

L'expérience se déroule en deux temps :

Au début, pendant une semaine à partir de l'inoculum (24/05/07) du biofilm de Garonne, le canal tourne en circuit fermé avec de l'eau de Garonne. La mise en circuit fermé permet de conserver l'inoculum dans l'eau ; il faut compter une semaine (dans nos conditions expérimentales) pour que le biofilm accroche les substrats dans le fond du canal.

Quand le biofilm semble être fermement accroché, on passe alors en circuit semi-ouvert et on amène en continue de l'eau de Garonne pour saturer l'eau en nutriments.

Au cours de ces deux phases, plusieurs protocoles de mesures ont été appliqués dans les trois zones de mesures :

Au niveau de l'hydrodynamique pour les deux phases expérimentale :

- Mesures des champs de vitesse à l'aide de la PIV (vélocimétrie par images de particules)
- Suivi journalier des grandeurs hydrodynamiques globales : débit et tirant d'eau

Au niveau de la biologie dans la première phase

- Suivi journalier par photographie de l'évolution du film
- 2 prélèvements d'eau : 1 avant l'inoculum et 1 après

Au niveau de la biologie dans la seconde phase

- Suivi journalier par photographie de l'évolution du film
- Prélèvement d'eau régulier
- Prélèvement de biofilm pour connaître la matière sèche sans et avec cendres
- mesure des épaisseurs à partir des électrodes disque plan tournant (EDT) préalablement implantées dans les hémisphères dans deux des zones de mesure (figure 9)

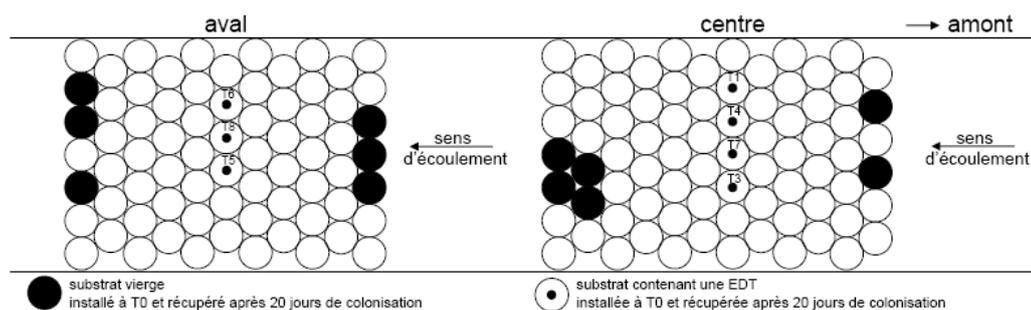


Figure 9. Représentation en plan de la veine d'écoulement et localisation de l'implantation des électrodes disque plan tournant au centre ($V = 27,9$ cm/s) et à l'aval ($V = 36,0$ cm/s).

3.2.4 Résultats de l'application préliminaire

Au bout de 20 jours, la biomasse des biofilms ayant colonisé les hémisphères vierges installés en même temps que les hémisphères abritant les EDT n'est pas significativement différente entre la zone au centre et celle plus à l'aval autour de 12 g par m^2 en matière sèche sans cendre (Figure 10).

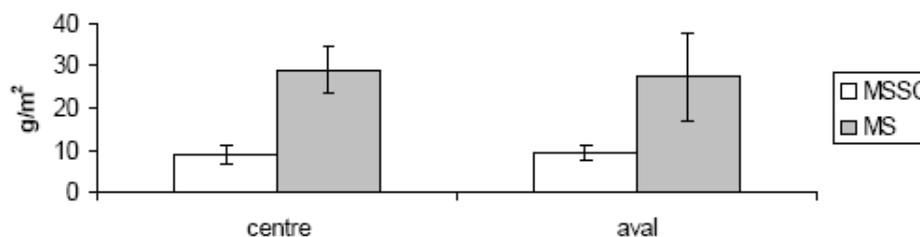


Figure 10. Biomasse en matière sèche (MS) et matière sèche sans cendre (MSSC) des biofilms ayant colonisé en 20 j les hémisphères dans 2 zones de mesure du canal.

L'examen visuel des biofilms ayant colonisé les hémisphères ne révèle pas non plus de différences (Figure 11). Par contre on constate la présence de structures signalant la présence de macro invertébrés qui creusent des tranchées dans le biofilm jusqu'à remettre à nu le matériau support.

En accord avec les observations précédentes, les épaisseurs mesurées par voltammétrie sont assez comparables entre les EDT T5 et T6 placées dans la zone aval et les électrodes T1 à T4 placées dans la zone amont.

Les valeurs obtenues, de l'ordre de quelques centaines de μm jusqu'à quelques mm semblaient cohérentes par rapport au type de biofilm étudié, souvent visibles macroscopiquement.

La variabilité des épaisseurs calculées d'une EDT à l'autre pouvait s'expliquer par les phénomènes de broutage par les macroinvertébrés, ou plus simplement par l'hétérogénéité naturelle de la colonisation par ce type de biofilm. En tous cas, ces fortes variabilités prêchaient pour la mise en œuvre d'un

nombre conséquent de réplicats pour pouvoir comparer des situations entre elles, dans le temps ou dans l'espace.

Etonnamment, alors que nous pensions maîtriser les conditions d'écoulement et donc les biofilms qui en résulteraient, les 2 zones de mesure du canal expérimental ne nous ont pas permis d'obtenir des biofilms d'épaisseur différentes. C'est la raison pour laquelle nous avons concentré nos travaux ultérieurs sur le développement d'un outil nous permettant de tester, en rivière, l'utilisation des EDT.

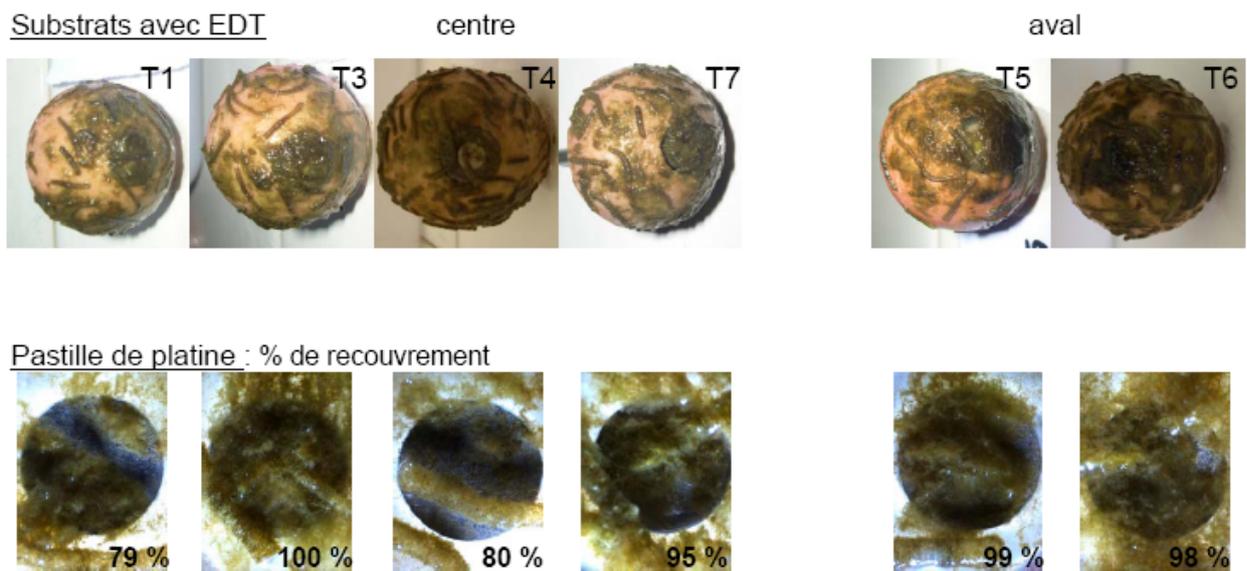


Figure 11. Vues directes des hémisphères colonisées (en haut) et vue grossissement 16x des EDT et pourcentage de recouvrement estimé par analyse d'image après numérisation (en bas).

Résultats : épaisseur à 500 et 100 trs/min

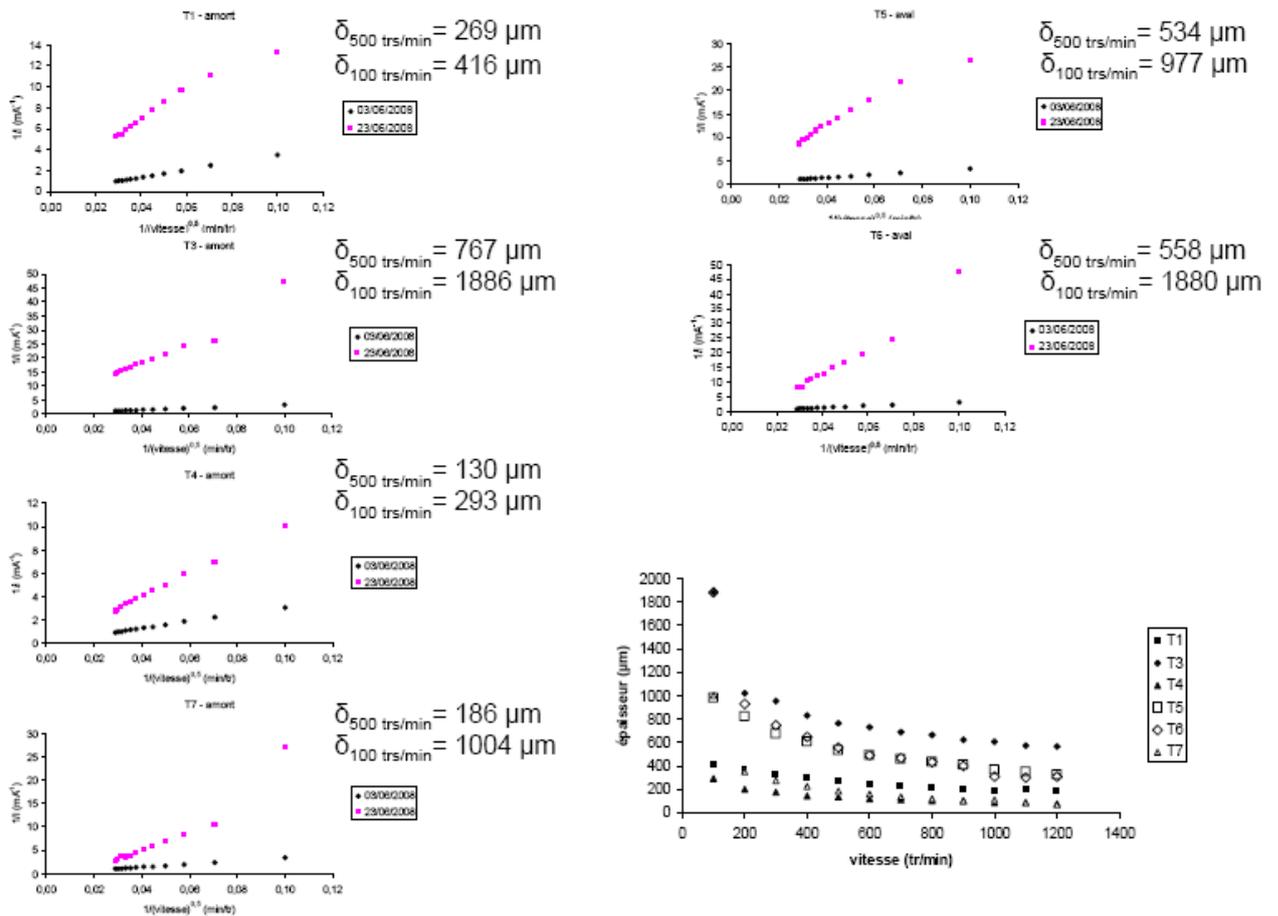


Figure 12. Relation entre l'intensité mesurée et la vitesse de rotation à t_0 (bleu) et à 20 j (rose) de colonisation des EDT et épaisseur calculée à 500 et 100 rpm.

3.3. application en rivière

Boulêtreau S., Charcosset J.-Y., Gamby J., Lyautey E., Mastrorillo S., Azémar F., Moulin F., Tribollet B. and F. Garabetian

Rotating disk electrodes to monitor river biofilm thickness and elasticity.

In preparation for submission to Water Research.

Title: Rotating disk electrodes to monitor river biofilm thickness and elasticity

Authors: Stéphanie Boulêtreau^{1,2*}, Jean-Yves Charcosset^{1,2}, Jean Gamby⁴, Emilie Lyautey^{1,2}, Sylvain Mastrorillo^{1,2}, Frédéric Azémar^{1,2}, Frédéric Moulin³, Bernard Tribollet⁴ and Frédéric Garabetian⁵

¹Université de Toulouse ; UPS, INP ; EcoLab (Laboratoire d'écologie fonctionnelle) ; 118 route de Narbonne, F-31062 Toulouse, France

²CNRS ; EcoLab ; F-31062 Toulouse, France

³Institut de Mécanique des Fluides de Toulouse, UMR 5502, Allée du Professeur Camille Soula, 31400 Toulouse, France

⁴Laboratoire Interfaces et Systèmes Electrochimiques LISE, UPR 15 du CNRS, Université Pierre et Marie Curie, 4 place Jussieu, 75252 Paris cedex 05, France

⁵Université de Bordeaux, EPOC - OASU, UMR 5805, Station Marine d'Arcachon, 2 rue du Professeur Jolyet, 33120 Arcachon, France

*Corresponding author:

Tel. +33 (0)5 61 55 73 48

Fax. +33 (0)5 61 55 60 96

Email: stephanie.bouletreau@cict.fr

Abstract

The present study assessed the relevance of an electrochemical method based on rotating disk electrode (RDE) to monitor river biofilm thickness and elasticity. An *in situ* colonisation experiment in the River Garonne (France) in August 2009 allowed to obtain natural river biofilms exhibiting differentiated physiognomy. A constricted pipe providing two contrasted flow conditions (about 0.1 and 0.45 m s⁻¹ in inflow and constricted sections respectively) and supporting 24 RDE was immersed in the river for 21 days. Biofilm thickness and elasticity ability were quantified using an electrochemical assay on 7 and 21 days old RDE-grown biofilms (t_7 and t_{21} , respectively). Biofilm thickness was affected by colonisation length and flow conditions, ranging from 36 ± 15 μm (mean \pm standard deviation, $n=6$) in the fast flow section at t_7 to 343 ± 137 μm ($n=3$) in the slow flow section at t_{21} . Comparing the electrochemical signal to stereomicroscopic estimates of biofilms thickness indicated that the method consistently allowed (i) to detect early biofilm colonisation in the river and (ii) to measure biofilm thickness of a few hundred μm . Biofilm elasticity, i.e. biofilm squeeze by hydrodynamic constraint, was significantly higher in the slow (1296 ± 478 $\mu\text{m rpm}^{1/2}$, $n=8$) than in the fast flow sections (786 ± 348 $\mu\text{m rpm}^{1/2}$, $n=11$) (Mann-Whitney U-test, $p = 0.032$). Diatom and bacterial density, and biofilm-covered RDE surface analyses (i) confirmed that microbial accrual resulted in biofilm formation on the RDE surface, and (ii) indicated that thickness and elasticity represent useful integrative parameters of biofilm physiognomy that could be measured on natural river assemblages using the proposed electrochemical method.

Keywords

Epilithon; periphyton; biofilm architecture; biofilm deformation; voltammetry; electrochemistry

1. Introduction

River epilithic biofilms are complex microbial consortia of algae, bacteria and other micro- and meso-organisms that develop on solid substrata (Lock, 1993). Embedded in a mucilage matrix of microbially generated biopolymers (*EPS: extracellular polymeric substances*), these aggregates have relatively high mechanical stability and cell density. River biofilm dynamics influences various instream processes such as primary production (Wetzel, 1975), river food web (Feminella and Hawkins, 1995), organic matter and nutrient cycling (Paul et al., 1991; Battin et al., 2003a; Teissier et al., 2007), and accumulation of contaminants such as pesticides (Dorigo et al., 2007) and toxic metals (Cheng et al., 2008; Thuy Dong et al., 2008).

Biofilm physiognomy (e.g. thickness, cohesion) is a trait of biofilm ecology mainly reflecting community maturation and resistance to current velocity either for monospecific biofilms (e.g. Mukherjee et al., 2008) or for complex river biofilms (Peterson, 1996). Physiognomy partly conditions biofilm functions affecting mass transfer between aggregate and bulk water and, thereby, is influencing e.g. the relative uptake of substrates differing in bioavailability (Battin et al., 2003b). In spite of its major interest, biofilm physiognomy characterisation is still a challenge since tools are very scarce, inconvenient to use on the field and somewhat semiquantitative. Among architectural parameters, thickness is the most integrative of volume, wet weight, number of species, etc. However river biofilm thickness is rarely measured and studies often intentionally used biomass as an indirect estimation of thickness (Dodds et al., 1999). Several destructive (scanning electron microscopy, cryoembedding) and nondestructive optical methods (light microscopy, scanner with an image acquisition system, a laser triangulation sensor, confocal laser scanning microscopy and two-photon excitation microscopy) are available to measure biofilm thickness (Paramonova et al., 2007). They are ideal tools for biofilm monitoring at the micrometer scale spatial resolution. Investigations on bacterial biofilms are also oriented towards nanoscopic spatial arrangement using a combination of confocal laser-scanning microscopy and atomic force microscopy (Schmid et al., 2008). These methods have several limitations: they are destructive, have restrictive application conditions (e.g. fluorescent bleaching), need elaborate setup and expertise, and are expensive. But, the main drawback for their application to river biofilm is the incompatibility between their observation scale and the centimetre or metre scale of biofilm development in rivers (e.g. on rock substrates such as pebbles). An optical method (Bakke and Olsson, 1986), punctually applied for river and estuarine biofilms (Sekar et al., 2002; Rao, 2003), determines biofilm thickness as the vertical sample displacement required to move the focal plane of the microscope from the water-biofilm interface to the biofilm-substratum interface. It needs however an estimation of the refractive index of the transparent film and can only be applied to biofilm thinner than 100 μm (Paramonova et al., 2007).

Herbert-Guillou et al. (1999) reported an electrochemical method based on the analysis of a tracer oxydation current on a rotating disk electrode (RDE) where biofilm has developed. This electrochemical technique was applied to detect very thin bacterial biofilms developed in sea and tap waters (Herbert-Guillou et al., 2000; Gamby et al., 2008). It can be applied since biofilm contains more than 95% of water and behaves as an inert porous layer with respect to mass transport (Characklis, 1990). This layer adds to the hydrodynamic diffusion

layer created by the RDE rotation and its thickness can be finally deduced from the difference between electrochemical measurements with and without biofilm on the RDE. Beside thickness measurement, Herbert-Guillou et al. (2000) showed that RDE method could be used to provide complementary information on biofilm functional properties relative to biofilm elasticity.

The aim of the study was (i) to transfer the use of the RDE method to estimate natural phototrophic biofilm thickness and elasticity and particularly, (ii) to improve the biofilm elasticity parameter calculation, (iii) to assess the relevance of thickness and biofilm elasticity measurements to differentiate contrasted river phototrophic biofilms and, (iv) to prove the suitability of this method for *in situ* experiment. We designed an experimental device to produce *in situ* 7-day and 21-day old biofilms in similar environmental conditions (nutrients, light, temperature, inoculum type, etc.) but flow conditions. This experimental design was performed according to Peterson (1996) that discriminated biofilm physiognomy according to algal community response to flow and biofilm age.

2. Material & Methods

2.1. Experimental design

2.1.1. Biofilm production device

An experimental pipe device for biofilm production was designed and scaled to provide two contrasted current velocity conditions within the same pipe, so that all factors affecting biofilm dynamics but flow could be considered similar. According to the volume continuity equation for an incompressible fluid, through a pipe constriction (from the section #1 of area A_1 to the section #2 of area A_2), (i) the fluid velocity increases and (ii) this increase in velocity (from v_1 to v_2) is set to the decrease in section area as follows: $\frac{v_2}{v_1} = \frac{A_1}{A_2}$.

The constricted pipe consisted in three main parts: an upstream first cylinder (section #1, slow flow) followed by a converging conical inlet (angle α_1) and a second downstream cylindrical throat (section #2, fast flow) (Figure 1.). The current velocity v_1 was determined by the local river current velocity and followed river flow variations during the whole experiment. The current velocity v_2 depends on v_1 value and on the ratio between diameters $\left(\frac{\Phi_2}{\Phi_1}\right)$. Diameter dimensions were chosen (i) to provide a quite easily handling structure, (ii)

to ensure relatively homogenous flow conditions in each section and (iii) to ensure a ratio $\frac{v_2}{v_1}$ around 4. Inlet

and throat diameters were set to 20 and 10 cm respectively. A diverging recovery part (angle α_2) followed by a third cylindrical throat (section #3; diameter $\Phi_3 = \Phi_1$) was added to the structure to ensure a straight exit stream. Convergence and divergence angles were chosen according to values minimising flow detachment and head loss in Venturi pipes: $\alpha_1 = 20^\circ$ and $\alpha_2 = 14^\circ$. Numerous formulas are found to estimate the entrance length (l_1) of cylindrical ducts i.e. the position beyond which flow is fully developed (Anselmet et al., 2009). Application of such formulas to the present flow conditions yield values of $\frac{l_1}{\Phi_1}$ between 20 and 30 leading to too long pipe

dimensions to be handled in the river. Entry and constricted section lengths were set to 3 and 4 times the

diameter, the total length l_t being therefore 171 cm. At RDE locations, viscous shear stress on the cylinder (and incidentally on biofilm) is around 10 times larger in the constricted than in the entry section, ensuring contrasted local flows at RDE surface.

The constricted pipe was made of 3-mm thick Plexiglas® to ensure light diffusion. Pipe sections for which diameter was smaller than Φ_l were surrounded with another 20-cm diameter Plexiglas® pipe to form a single continuous pipe and decrease detachment of the external flow around the pipe without disturbing light penetration.

2.1.2. *Experimental procedure*

Twelve RDE were incorporated at each downstream extremity of both sections of the apparatus (Figure 1.). RDE were labelled SF (for slow flow) or FF (for fast flow) according to the respective sections. In each section, the surface of 6 RDE per pipe side (right and left) was vertically positioned at the equator line to prevent particle sedimentation during the colonisation process. RDE were positioned next to each other to ensure homogeneous environmental conditions between replicates. They were maintained in order to arise to the pipe internal surface with nylon cable gland allowing an easy recovery.

The constricted pipe was immersed parallel to the water current at the bottom of the River Garonne at Aouach study site (01°18'00''E; 43°23'08''N). This site is a typical reach for biofilm development (Lyautey et al., 2005; Boulêtreau et al., 2006). During the low-water period (from July to October), the study river reach is characterised by a shallow (< 1.5 m), wide (100 m), and unshaded bed. Water exhibits low turbidity (< 30 NTU) and nutrient rich conditions (about 10 $\mu\text{g P L}^{-1}$ of soluble reactive phosphorus, 1 mg N L^{-1} of both ammonium and nitrates, and 1.5 mg C L^{-1} of dissolved organic carbon) favouring the development of a substantial biomass. The constricted pipe was maintained on the river bottom in a zone where the riverbed was flat and homogeneous (boulder rocks), shallow (water depth around 50 cm) and current velocity was slow (around 0.1 m s^{-1}). The experiment was performed on August 2009 during a low-flow period to experiment the most stable current velocities as possible and to enable biofilm accrual especially in the fast flow section. Data on daily mean flow were supplied by DIREN Midi-Pyrénées (gauging station: Portet-sur-Garonne) and mean current velocity was measured at the pipe entry using a FLO-MATE portable flowmeter (Model 2000, Marsh-McBirney, USA).

The device was immersed for 21 days, and six RDE per section were sampled after 7 (t_7) and 21 (t_{21}) days of colonisation. RDE labels were followed by 7 or 21 in accordance with the sampling time. Sampled RDE were kept in river water at 4°C in the dark during transport to the laboratory and measurements were performed within 5 h. At t_7 the 12 sampled RDE were replaced by stainless-steel cylinders of similar diameter.

2.2. Biofilm physiognomy measurements

2.2.1. *Electrochemical measurement principle*

The method consists in measuring the steady-state diffusion current on the RDE interface at a fixed potential and at a fixed rotation speed Ω without biofilm (t_0) and after biofilm development (t_7 and t_{21}). To impose this constant potential, a 3-electrode-system immersed in an electrochemical cell filled with a tracer solution and connected to a potentiostat was used: (i) RDE, the working metallic electrode on which biofilm develops; (ii) the reference electrode that controls the potential of the working electrode and (iii) the counter electrode that closes the electrical circuit and the overall current goes through. Diffusion current results in the oxidation of a reduced

species at the RDE-electrolyte interface. Without biofilm, diffusion current depends directly on the diffusion boundary layer thickness at the RDE-electrolyte interface. With RDE rotating at a constant rotation speed around its axis, the diffusion boundary layer thickness is maintained constant. Biofilm is considered as an inert porous layer with respect to mass transport since it contains more than 95% of water (Characklis, 1990). The biofilm is a layer of stagnant water on the RDE surface where the diffusion coefficient was shown to be the same as the water diffusion coefficient (L'Hostis et al., 1996). This layer adds to the hydrodynamic boundary layer one, inducing a decrease in diffusion current intensity.

2.2.2. Electrochemical measurement setting

The RDE was made of a 5-mm diameter platinum cylinder (electrical conductor) coated with a Teflon® cylinder (electrical insulator). The reference electrode was a saturated calomel electrode (SCE) (REF421, Radiometer Analytical, France). The counter electrode was a cylindrical grid of platinum immersed into the electrolyte solution that surrounded the working electrode. A 0.01M potassium ferrocyanide $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{2-}$ and ferricyanide $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ solution was used as tracer in 1M KCl. Ferrocyanide oxidation current intensity was measured at 0 V/SCE at which no water electrolysis and no oxygen reduction occur. Measurements were performed at 20°C.

In the laboratory, the RDE was mounted on a motor axis plugged using mercury contacts and was rotated by a DC motor system. The motor speed was controlled with a servo system and measured using a tachometer. Prior to diffusion current measurements, the equilibrium potential of the ferrocyanide/ferricyanide couple at the same concentration was measured between -0.240 and -0.236 V/SCE in accordance with the reference potential (-0.237 V/SCE). Diffusion current was then measured at the potential 0 V/SCE for each RDE rotation speed between 100 and 1200 rpm by steps of 100 rpm. Rotation speed was limited to 1200 rpm to prevent biofilm erosion. Before t_0 measurements, every RDE were polished using sandpaper (grade 1200) and cleaned with distilled water. After t_7 and t_{21} measurements, each RDE was individually conditioned into river water until further analyses.

Biofilm thickness δ (μm) was calculated from diffusion current intensity measurements with $(i(t))$ and without biofilm $(i(0))$ for each RDE rotation speed (Ω in rpm) as follows:

$$\delta = nFD C^* S \left[i(t)^{-1} - i(0)^{-1} \right] \times 10000 \quad (1)$$

with n is the number of electrons, F the Faraday constant (96485 C mol^{-1} or s A mol^{-1}), D the diffusion coefficient in both water and biofilm set to $6.8 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ at 20°C according to Deslouis et al. (1980), C^* the electroactive species concentration in the bulk solution ($0.00001 \text{ mol cm}^{-3}$), and S the active RDE area (0.196 cm^2) (Levich et al., 1962).

2.2.3. Image acquisition and analysis

For RDE biofilm cover estimations, stereomicroscopy (Olympus SZX10, $24 \times$ magnification) images of the wet colonised RDE surfaces were captured using an Olympus U-TV0.63XC camera (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) as TIFF files (1600 by 1200 pixels) and imported in Photoshop CS3 (Adobe Photoshop v 10.0.1) to be converted to binary images. RDE biofilm cover (surface %) was determined on the platinum surface as the ratio of the surface area covered by biofilm (black pixels) to the total surface area (sum of white and black pixels) with Image J 1.37v (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA).

For thickness estimation, stereomicroscopy (Leica MZ 12.5, 16 × magnification) images of a side view of each colonised RDE standing in water were captured using a Leica DFC320 camera (Leica Microsystems DI Cambridge). Several focal planes corresponding to various cross sections ((x, z)-planes in a (x, y, z) coordinate system) were visible on the picture thanks to the setting of an appropriate depth of field. The projected image of the various focal planes was converted to binary image after biofilm pixels selection. The maximal biofilm height (maximal z -coordinate of the (y, z)-plane) on each abscissa of the image (x -axis) was measured automatically in pixels using Image J. Conversion from pixel to μm was performed using a line scale standard. This gives the mean maximal biofilm thickness (mean z_{max}) of the whole colonised RDE surface ((x, y)-plane).

2.2.4. Cell numeration

After electrochemical measurements, RDE surface was scrapped with a sterile scalpel into 1 mL of filter-sterilized (0.2 μm pore-size filter) river water and preserved for storage at 4°C with the addition of 100 μL of neutralized formaldehyde to the biofilm suspension. Biofilm suspension was sonicated in an ultrasonic bath (Elmasonic S900H, Elma, South Orange, NJ) at 37 kHz (15 min) and vortexed (15 min) according to Buesing and Gessner (2002). For bacterial counts, 500 μL aliquot of the appropriate cell suspension dilution was stained with 200 μL DAPI (0.01 mg mL^{-1}) and collected by filtration on 0.2 μm pore-size black polycarbonate filters (Nuclepore, Whatman, Maidstone, UK) according to Garabetian et al. (1999). Counts were carried out on an Olympus BH2 RLFA microscope at 1250 × magnification and results were expressed as cell number per cm^2 . Diatom density in biofilm suspension was estimated directly (t_7) or after 5-fold dilution (t_{21}) using a Nageotte counting chamber, by counting the total number of diatoms in 30 fields (1.25 mL each, 0.5 mm depth), using light microscopy at 250 × magnification (Olympus BH2 RLFA).

2.2.5. Statistical analysis

Electrochemical parameters (biofilm thickness and elasticity) were deduced by statistical adjustment using Origin 8.1 SR1 (v8.1.13 88, OriginLab Corporation, Northampton, USA). Agreement between simulated and measured thickness was evaluated by χ^2 and R^2 application. The non-parametric Mann-Whitney U-test procedure was used to test for flow effects on biofilm thickness, biofilm elasticity, RDE biofilm cover, bacterial and diatom cell numbers. Correlation between biofilm physiognomy parameters were explored by using the Pearson r coefficient. All values are given as mean \pm standard deviation (SD). Statistical analyses were performed with SPSS 15.0 software for Windows, and were considered significant at $p \leq 0.05$

3. Results

3.1. Determination of biofilm thickness and elasticity

The reciprocal steady-state current intensity (mA^{-1}) was recorded vs the reciprocal square root of the RDE rotation speed ($\text{rpm}^{-0.5}$) in the Koutecky-Levich coordinates in the Figure 2. For each EDT, before (t_0) or after biofilm colonisation (t_7 or t_{21}), the current increased with the RDE rotation speed according to the Levich law (Levich, 1962). For a given rotation speed, the current decreased with biofilm formation (t_7 vs t_0 and t_{21} vs t_0). This decrease in the current intensity measured between t_0 and t_7 or t_{21} was significant and allowed thickness determination using equation (1) for 22 RDE over 24. Connecting issues were at the origin of the defects on 2

RDE (SF7#1 and FF21#16). For 22 RDE (and even the most colonised ones), minimal recorded current intensities (i.e. intensity measured at the minimal rotation speed of 100 rpm) were higher than several tens of μA suggesting that the measurement was relevant (see Appendix). The slope is higher for 21- than for 7-day old biofilms, and for slow than for fast flow grown biofilms. Biofilm thickness measured at each RDE rotation speed (Ω) was represented on Figure 3. The relationship between thickness and rotation speed can be analysed by considering the following law:

$$\delta = \frac{I}{(\delta_0)^{-1} + K\Omega^{0.5}} \quad (2)$$

δ_0 (μm) is biofilm thickness at zero RDE rotation speed and, in other words, the theoretical biofilm thickness without any particular hydrodynamic constraint. The coefficient K ($\mu\text{m}^{-1} \text{rpm}^{-1/2}$) relates the dependence of thickness with RDE rotation speed and was used to parameterise biofilm elasticity as $\frac{1}{K}$ ($\mu\text{m} \text{rpm}^{1/2}$).

Parameter values are resumed in the Table 1. The derivative of δ vs Ω may tend towards infinity when the rotation speed tends towards zero, then the accuracy on δ_0 cannot be good and the results of parameter fits could display unrealistic too large δ_0 for SF21#6, SF21#10 and SF21#12 (indicated using the infinity sign in the Table 1). Such unrealistic values led us to exclude the corresponding RDE results. The agreement between measured and simulated thicknesses is likely to show that the law is not valuable anymore for high rotation speed for which thickness decreases with rotation speed. At high rotation speeds, thickness decreased nevertheless, weak χ^2 values confirmed good fit quality for 19 out of 24 RDE that provided relevant δ_0 values comprised between 16 (μm) (after 7 colonisation days) and 501 μm (after 21 colonisation days). Electrochemically measured biofilm thicknesses were significantly correlated with stereomicroscopic estimates (Table 2). Electrochemical biofilm thickness estimates were 1.8-fold lower than stereomicroscopic estimates, ranging from 70 to 544 μm (Figure 4.).

3.2. *In situ* experimental settings

The RDE supporting device was designed to be immersed into the river ensuring both *in situ* environmental variability (algal and bacterial inoculum, light, temperature, nutrient, etc.) and two contrasted flow conditions. Flow velocity level in the pipe was controlled by natural temporal hydraulic changes in the river. Exception for days 5-6-7 when the daily mean flow peaked at 99 m^3 , the river experienced a period of quite stable and low flow ($64 \pm 10 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$) during the experiment, favouring biofilm development (unpresented data). While measurement on day 7 highlighted the above mentioned 3-day period of hydraulic disturbance, other discrete measurements on days 0 and 21 in the slow flow section (i.e. inlet of the pipe) showed quite similar flow velocity values around 0.11 m s^{-1} that correspond to one theoretical Reynolds number of 23000 (Table 3). According to the device dimensions, flow velocity and Reynolds number in the fast flow section can be calculated from the former data to be around 0.46 m s^{-1} and 46000 respectively.

3.3. Biofilm features

Diatom accrual contributed to biofilm formation on RDE. Diatom density increased during colonisation with 27×10^3 and 102×10^3 individuals per cm^2 in the slow flow section and with 8×10^3 and 33×10^3 individuals per cm^2 in the fast flow section on average at t_7 and t_{21} respectively (Figure 5a.). Consistently bacterial densities significantly (or quasi) increased during colonisation reaching 32×10^6 and 27×10^6 cells per cm^2 on average at t_{21} in the slow and fast flow sections respectively (Figure 5b.). Comparing the two sections, diatoms densities were significantly different whereas bacterial densities were not. Expectedly, RDE biofilm cover significantly increased between t_7 and t_{21} from 36 to 59% on average in the slow flow section and from 54 to 85% on average in the fast flow section (Figure 5e.).

Biofilm thickness significantly increased with time, means ranging from 97 to 343 μm in slow flow and from 36 to 72 μm in fast flow (Figure 5c.). Biofilm thickness was significantly affected by flow conditions at both times.

Significant (or quasi significant) changes in biofilm elasticity values $\left(\frac{1}{K}\right)$ occurred between t_7 and t_{21} and between flow conditions (Figure 5d.). Mean $\frac{1}{K}$ values were significantly higher in the slow ($1296 \mu\text{m rpm}^{1/2}$) than in the fast flow section ($786 \mu\text{m rpm}^{1/2}$) (Mann-Whitney U-test, $p=0.032$).

Electrochemical thickness measurements were significantly correlated with RDE biofilm cover, diatom and bacterial densities (Table 2). In addition, significant correlation was also observed between biofilm elasticity and other parameters except bacterial density.

4. Discussion

Ecologists agree to consider thickness increase as the driving force of biofilm structural and functional properties (Sabater and Amiraal, 2005), but, studies on river biofilms suffer from a lack of available tools to characterise biofilm physiognomy. The present study intended to assess the interest to use an electrochemical method based on rotating disk electrode to monitor river biofilm physiognomy. Two features of biofilm physiognomy were measured and evaluated: thickness and elasticity (such as defined in section 3.1.1.). We will address firstly the meaning of these two parameters, and, secondly, discuss their ability to evidence physiognomy differences in natural river biofilms.

Until now, the electrochemical method had allowed to measure very thin bacterial biofilms, between 0.9 and 3.5 μm of thickness in tap water (Gamby et al., 2008) and of 10- μm -thick in sea water (Herbert-Guillou et al., 1999). The rightness of the method can be questioned. The use of 1M KCl in the electrochemical assay could be expected to cause thickness underestimation due to EPS constriction. Indeed, Frank and Belfort (1997) reported conformational changes resulting in a 2-fold reduction of the hydrodynamic radius of anionic bacterial EPS exposed to increasing ionic strength simulated by increasing KCl concentrations from 0.001 to 0.5M. In the previous experiments, electrochemical estimates of biofilm thickness were validated by means of confocal laser scanning microscopy (L'Hostis, 1996). In the present study, stereomicroscopy looked more suitable than the former microscopic approach since it (i) can be readily applied on RDE support on fresh material without any processing (no staining, cryoembedding or cryosectioning), (ii) allows to simultaneously run electrochemical assay and stereomicroscopic image captures before conducting further destructive analysis such as

microorganism counts, and allows (iii) to analyse at once the whole colonised RDE surface. The protocol designed to estimate stereomicroscopic estimates assessed the mean maximal biofilm thickness giving the upper limit of biofilm thickness range. This statement combined with the expected thickness underestimation due to electrolyte ionic strength could also explain that stereomicroscopic thickness estimates were 2-fold higher than electrochemical thicknesses. Irrespective of the absolute thickness value, the agreement between electrochemical measurements and stereomicroscopic estimates of biofilm thickness confirmed the relevance of the electrochemical approach to valuably measure thicknesses ranging from a few μm to several hundreds of μm . The electrochemical method appeared suitable for studying biofilms containing not only prokaryotic but also eukaryotic microorganisms such as microphytobenthic algae, and particularly diatoms. Stacking of diatom cells whose size, typically larger than bacterial one, can be several ten μm would give a biofilm cluster of hundreds of μm in thicknesses. Our measurements are thus consistent with expected thicknesses for such biofilms.

The second parameter measurable by electrochemistry is biofilm elasticity. Initially Herbert-Guillou et al. (2000) found direct variation of bacterial biofilm thickness with electrode speed rotation, and this variation depended on biofilm development conditions. Therefore, they calculated biofilm deformation as the difference between electrochemical thickness at 100 rpm and thickness at a given rotation speed, and represented this latter as a function of electrode rotation speed. This simple dependence was not observed in the present study, probably because studied biofilms are also built by algae and inorganic particles. Adapted from Foret (2006) that demonstrated the dependence of electrochemical thickness with $k\Omega^{-0.5}$ in water circuit biofilms, another parameterisation of biofilm elasticity was proposed here using the coefficient K that relates dependence between thickness and $\Omega^{-0.5}$. Values of biofilm elasticity, displaying a wide range of magnitude from about 400 to 2400 $\mu\text{m rpm}^{1/2}$, quantify the extent to which biofilm can be reduced by hydrodynamics constraint. This original parameter of biofilm physiognomy resulted from the assessment of an empirical relationship between biofilm thickness and RDE rotation speed and the resulting elasticity values express the magnitude of the biofilm thickness variation due to increasing rotation speed. The values cannot be compared to existing data however.

The *in situ* experiment was designed to compare core biological parameters to electrochemical parameters on natural river biofilms. As time is one of the main drivers of biofilm structuring, biofilms were sampled at two stages of biofilm accrual pattern, colonisation and maturation. Successional changes driven by changes in benthic microalgal species strategies result in temporal changes in biofilm structure (McCormick and Stevenson, 1991; Biggs et al., 1998; Wellnitz and Brader, 2003). Successional processes were also reported for river biofilm bacterial communities (Jackson et al., 2001; Lyautey et al., 2005; Lear et al., 2008). In the studied section of the River Garonne, biofilm bacterial richness proved to increase from 0 to 7 days and decrease from 7 to 21 days (Lyautey et al., 2005), justifying the selected sampling times. The biofilm support material is known to influence biofilm community composition (Cattaneo and Amireault, 1992) and biofilms colonising RDE platinum may have exhibited distinctive taxonomic assemblages as compared to biofilms colonising river pebbles. No data on the composition of the assemblages were recorded in the present study. Only abundances of bacteria and diatoms were monitored, showing evidence of a microbial accrual on immersed RDE surfaces. Recovered densities were comparable to those previously observed in the River Garonne biofilms for diatoms, namely 10^5 - 10^7 individuals per cm^2 (Eulin, 1997) and bacteria, about 10^7 – 10^8 cell per cm^2 (Lyautey et al., 2010). Temporal evolution of microbial densities of RDE biofilms fitted with measured thickness enhancement. Interestingly, RDE biofilm cover increased with microbial densities and thickness suggesting that phototrophic river biofilms extend both

horizontally and vertically in accordance with the typical model of biofilm development from isolated column forming clusters to connected mushrooms (Costerton et al., 1987). The proposed electrochemical assay was recommended to detect and survey fouling of man-made devices in marine and drinking waters (Herbert-Guillou et al. 1999; Gamby et al., 2008). It would also allow to assess the early dynamics of river biofilm e.g. the kinetics in the very early stage of colonisation in time course experiments or the patchiness of early accrual zone in microscale experiments.

Another main driver of biofilm structuring is flow. The RDE supporting device was imagined on the pattern of one Venturi pipe immersed into the river ensuring both *in situ* environmental variability (algal and bacterial inoculum, light, temperature, nutrient, etc.) and two contrasted flow conditions. As intended, generated current velocities, 0.11 and 0.46 m s⁻¹, were in the velocity range that favours such biofilm development (Horner and Welch, 1981). Despite disturbed hydraulic conditions for a 3-day period, stable and low daily mean flows occurred during most of the experiment especially during the whole maturation period. During stable and low flow periods, typical Reynolds numbers (23000 and 46000) discriminated between optimal (Re near 22000) and suboptimal biofilm growth conditions (Re > 40000; Godillot et al., 2001). Consistently, higher diatom densities and biofilm thicknesses were found in the optimal flow section as compared to the other section. To our knowledge, only one study has quantified the effect of hydrodynamic on the thickness of stream microbial biofilms (Battin et al., 2003b): thicknesses deduced from confocal laser-scanning microscopy images of cryosections of biofilm were significantly higher for biofilms cultivated on ceramic coupons in the slow flow condition (0.065 m s⁻¹; Re = 1869) than in the fast flow condition (0.23 m s⁻¹; Re = 7559). The relationship between biofilm thickness and Reynolds number in the former and in the present study were consistent with Godillot et al. (2001) showing a maximum biofilm biomass for Re about 22000. As for biofilm elasticity in the present study, biofilms produced in the slow flow section exhibited higher elasticity value than biofilms produced in the fast flow section. Most of the microorganisms that formed river biofilm biovolume are fitted with cellular structures maintaining cellular shape (eg. bacterial cell walls, and diatom siliceous frustules). Biofilm elasticity most probably resulted rather from intercellular space reduction than from cells' constriction. Indeed biofilm elasticity as defined in the present study might thus refer to voids (pores and channels) within biofilm and/or the looseness of cell adhesion in biofilm. Biofilm elasticity could thus fit with the sinuosity index of Battin et al. (2003b). The multiplication of pores or voids within biofilm contributes to enlarge biofilm surface area within biofilm and therefore facilitates biofilm – water interactions and advective solute transport (De Beer et al., 1996). Such mechanical property is well studied in biofilm models used to design and evaluate performance of biofilm reactors (e.g. Picioreanu et al., 1998). Biofilm elasticity as defined in the present study could be considered as an integrative parameter of biofilm – water interaction ability in analogy with biofilm surface enlargement in studies of bacterial biofilms of industrial environments. For example, the reduction of biofilm – water interactions forming a barrier for advective solute transport could be an adaptative response of biofilm submitted to chemical stress. Indeed communities exposed to cadmium were primarily dominated by short stalked and ad-pressed diatom species whereas control communities were dominated by filamentous diatom species (Feurtet-Mazel et al. 2003). River biofilm physiognomy was also affected by chronic copper exposure through the growth of the chain-forming diatom *Melosira varians* changing from long filaments to short tufts (Barranguet et al., 2003). Such a qualitative observation could be quantified by measuring biofilm

elasticity using the proposed electrochemical method. This would allow to test the hypothesis according to which biofilm physiognomic properties would reflect community level biofilm fitness.

5. Conclusion

The present study showed the suitability of an electrochemical method based on rotating disk electrode to accurately monitor river biofilm thickness. The present results extended the application domain of the method previously developed for tapwater and seawater biofilms to complex biofilms mainly constructed by algae. The method appeared reliable to detect very thin biofilms but also to measure biofilm thickness of several hundred- μm . By analysing thickness evolution vs electrode rotation speed, the electrochemical method gives the possibility to calculate biofilm elasticity as an estimation of the extent to which biofilm is reduced by hydrodynamic constraint. This trait of biofilm physiognomy would relate to biofilm – water interactions. Very few studies have been conducted on the physical properties of river biofilms due in part to technical difficulties associated with such complex biofilms. The electrochemical method developed here combined rotating disk electrodes which can be immersed directly in the river, and an electrochemical assay requiring only a few minutes. This nondestructive method is compatible with further analyses on the same sample e.g. bacterial or algal counts, pigments or DNA extraction and analysis. Expanding the toolbox of biofilm characterisation techniques, the rotating disk electrode electrochemical method would provide original information on river biofilm physiognomy.

Acknowledgments

This work stems from the project SurF “*Surveillance des rivières par les biofilms*” funded by CNRS PNIR ”Biofilms”, Région Midi-Pyrénées and Région Aquitaine (*action interrégionale Aquitaine & Midi-Pyrénées*). The authors are grateful to H. Bouillard and C. Portier (EPOC - Station Marine d’Arcachon) for pipe manufacturing, to F. Moysé and F. Santoul for field assistance and to E. Salvo for diatom counts.

List of references

- Anselmet, F., Ternat, F., Amielh, M., Boiron, O., Boyer, P., Pietru, L., 2009. Axial development of the mean flow in the entrance region of turbulent pipe and duct flows. *Comptes Rendus Mécanique* 337, 573-584.
- Bakke, R., Olsson, P.Q., 1986. Biofilm thickness measurements by light microscopy. *Journal of Microbial Methods* 5, 93-98.
- Barranguet, C., Plans, M., van der Grinten, E., Sinke, J.J., Admiraal, W., 2002. Development of photosynthetic biofilms affected by dissolved and sorbed copper in a eutrophic river. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21(9), 1955-1965.
- Battin, T.J., Kaplan, L.A., Newbold, J.D., Hansen, C.M.E., 2003a. Contributions of microbial biofilms to ecosystem processes in stream ecosystems. *Nature* 426, 439-442.
- Battin, T.J., Kaplan, L.A., Newbold, J.D., Cheng, X., Hansen, C., 2003b. Effects of current velocity on the nascent architecture of stream microbial biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* 69(9), 5443-5452.

- Biggs, B.J.F., Goring, D.G., Nikora, V.I., 1998. Subsidy and stress responses of stream periphyton to gradients in water velocity as a function of community growth form. *Journal of Phycology* 34, 598-607.
- Boulêtreau, S., Garabétian, F., Sauvage, S. and Sanchez-Perez, J.M. (2006) Assessing the importance of a self-generated detachment process in river biofilm models. *Freshwater Biology* 51, 901-912.
- Buesing, N., Gessner, M.O., 2002. Comparison of detachment procedures for direct counts of bacteria associated with sediment particles, plant litter and epiphytic biofilms. *Aquatic Microbial Ecology* 27, 29-36.
- Cattaneo, A., Amireault, M.C., 1992. How artificial are artificial substrata for periphyton? *Journal of the North American Benthological Society* 11(2), 244-256.
- Characklis, W.G., 1990. In: Characklis, W. and Marshall, K.C. (eds), *Biofilms*, Wiley, New York.
- Cheng, J., Zhao, W., Liu, Y., Wu, C., Liu, C., Wang, W., 2008. Adsorption properties and gaseous mercury transformation rate of natural biofilm. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 81, 516-520.
- Costerton, J.W., Cheng, K.-J., Geesey, G.G., Ladd, T.I., Nickel, J.C., Dasgupta, M., Marrie, T.J., 1987. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annual Review of Microbiology* 41, 435-464.
- De Beer, D., Stoodley, P., Lewandowski, Z., 1996. Liquid flow and mass transport in heterogeneous biofilms. *Water Research* 30(11), 2761-2765.
- Deslouis, C., Tribollet, B., Viet, L., 1980. Local and overall mass transfer rates to a rotating disk in turbulent and transition flows. *Electrochimica Acta* 25, 1027-1032.
- Dodds, W.K., Biggs, B.J.F., Lowe, R.L., 1999. Photosynthesis-irradiance patterns in benthic microalgae: variations as a function of assemblage thickness and community structure. *Journal of Phycology* 35, 42-53.
- Dorigo, U., Leboulanger, C., Berard, A., Bouchez, A., Humbert, J.-F., Montuelle, B., 2007. Lotic biofilm community structure and pesticide tolerance along a contamination gradient in a vineyard area. *Aquatic Microbial Ecology* 50(1), 91-102.
- Eulin, A., 1997. Les communautés de diatomées épilithiques de la Garonne, PhD, Université Paul Sabatier, Toulouse, p. 248.
- Feminella, J.W., Hawkins, C.P., 1995. Interactions between stream herbivores and periphyton: a quantitative analysis of past experiments. *Journal of the North American Benthological Society* 14(4), 465-509.
- Feurtet-Mazel, A., Gold, C., Coste, M., Boudou, A., 2003. Study of periphytic diatoms communities exposed to metallic contamination through complementary field and laboratory experiments. *Journal de Physique IV* 107, 467-470.
- Foret, C., 2006. Maintien de la qualité des eaux dans les réseaux par des procédés innovants de traitement et de détection des biofilms, PhD, Université de Poitiers, p.
- Frank, B.P., Belfort, G. 1997. Intermolecular forces between extracellular polysaccharides measured using the atomic force microscope. *Langmuir* 13, 6234-6240.
- Gamby, J., Pailleret, A., Boucher Clodic, C., Pradier, M.-C., Tribollet, B., 2008. In situ detection and characterization of potable water biofilms on materials by microscopic, spectroscopic and electrochemistry methods. *Electrochimica Acta* 54, 66-73.
- Garabétian, F., Petit, M., Lavandier, P., 1999. Does storage affect epifluorescence microscopic counts of total bacterial in freshwater samples? *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences séries III. Sciences de la Vie* 322, 779-784.

- Godillot, R., Caussade, B., Améziane, T., Capblancq, J., 2001. Interplay between turbulence and periphyton in rough open-channel flow. *Journal of Hydraulic Research* 39(3), 227-239.
- Herbert-Guillou, D., Tribollet, B., Festy, D., Kiéné, L., 1999. In situ detection and characterization of biofilm in waters by electrochemical methods. *Electrochimica Acta* 45, 1067-1075.
- Herbert-Guillou, D., Tribollet, B., Festy, D., 2000. Influence of the hydrodynamics on the biofilm formation by mass transport analysis. *Bioelectrochemistry* 53, 119-125.
- Horner, R.R., Welch, E.B., 1981. Stream periphyton development in relation to current velocity and nutrients. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 38, 449-457.
- Jackson, C.R., Churchill, P.F., Roden, E., 2001. Successional changes in bacterial assemblage structure during epilithic biofilm development. *Ecology* 82(2), 555-566.
- Lear, G., Anderson, M.J., Smith, J.P., Boxen, K., Lewis, G.D., 2008. Spatial and temporal heterogeneity of the bacterial communities in stream epilithic biofilms. *FEMS Microbiol Ecol* 65, 463-473.
- Levich, V.G., 1962. *Physicochemical Hydrodynamics*. Prentice-Hall Scripta Technica, Englewood Cliffs, New Jersey.
- L'Hostis, E., 1996. *Détection et caractérisation de biofilms par méthodes électrochimiques*, PhD, Université Pierre et Marie Curie, Paris 6, p. 226.
- L'Hostis, E., Compère, C., Festy, D., Tribollet, B., Deslouis, C., 1996. Characterization of biofilms on gold in natural seawater by oxygen diffusion analysis. *Corrosion* 43, 4-10.
- Lock, M.A., 1993. *Aquatic microbiology - an ecological approach*. In: Ford, T.E. (ed), pp. 113-138, Blackwell Scientific Publications, Oxford, United Kingdom.
- Lyautey, E., Jackson, C.R., Cayrou, J., Rols, J.-L., Garabétian, F., 2005. Bacterial community succession in natural river biofilm assemblages. *Microbial Ecology* 50, 589-601.
- Lyautey, E., Boulêtreau, S., Madigou, E.Y., Garabetian, F., 2010. Viability of differentiated epilithic bacterial communities in the River Garonne (SW France).
- McCormick, P.V., Stevenson, R.J., 1991. Mechanisms of benthic algal succession in lotic environments. *Ecology* 5, 1835-1848.
- Mukherjee, P.K., Chand, D.V., Chandra, J., Anderson, J.M., Ghannoum, M.A., 2008. Shear stress modulated the thickness and architecture of *Candida albicans* biofilms in a phase-dependant manner. *Mycoses* 52, 440-446.
- Paramonova, E., de Jong, E.D., Krom, B.P., van der Mei, H.C., Busscher, H.J., Sharma, P.K., 2007. Low-load compression testing: a novel way of measuring biofilm thickness. *Applied and Environmental Microbiology* 73(21), 7023-7028.
- Paul, B.J., Duthie, H.C., Taylor, W.D., 1991. Nutrient cycling by biofilms in running waters of different nutrient status. *Journal of the North American Benthological Society* 10, 31-41.
- Peterson, C.G., 1996. *Algal Ecology: Freshwater Benthic Ecosystems*. In: Stevenson, R.J., Bothwell, M.L. and Lowe, R.L. (eds), pp. 375-403, Academic Press, San Diego.
- Picioreanu, C., van Loosdrecht, M.C.M., Heijnen, J.J., 1998. Mathematical modeling of biofilm structure with a hybrid differential-discrete cellular automaton approach. *Biotechnology and Bioengineering* 58, 101-116.
- Rao, T.S., 2003. Temporal variations in an estuarine biofilm: with emphasis on nitrate reduction *Estuarine and Coastal Shelf Science* 58, 67-75.

- Sabater, S., Admiraal, W., 2005. Periphyton: Ecology, Exploitation and Management. In: Azim, M.E. (ed), pp. 159-177.
- Schmid, T., Burkhard, J., Yeo, B.-S., Zhang, W., Zenobi, R., 2008. Towards chemical analysis of nanostructures in biofilms I: imaging of biological nanostructures. *Anal Bioanal Chem* 391, 1899-1905.
- Sekar, R., Nair, K.V.K., Rao, V.N.R., Venugopalan, V.P., 2002. Nutrient dynamics and successional changes in a lentic freshwater biofilm. *Freshwater Biology* 47, 1893-1907.
- Teissier, S., Torre, M., Delmas, F., Garabétian, F., 2007. Detailing biogeochemical N budgets in riverine epilithic biofilms. *Journal of the North American Benthological Society* 26(2), 178-190.
- Thuy Dong, T., Morin, S., Herlory, O., Feurtet-Mazel, A., Coste, M., Boudou, A., 2008. Seasonal effects of cadmium accumulation in periphytic diatom communities of freshwater biofilms. *Aquatic Toxicology* 90, 19-28.
- Wellnitz, T. and Brader, R.B., 2003. Mechanisms influencing community composition and succession in mountain stream periphyton: interactions between scouring history, grazing, and irradiance. *Journal of the North American Benthological Society* 22(4), 528-541.
- Wetzel, R.G., 1975. *River Ecology*. In: Whitton, B.A. (ed), Blackwell Sci. Publ., Oxford.

List of figures

Figure 1. Photographs and schematic representation of the experimental pipe device.

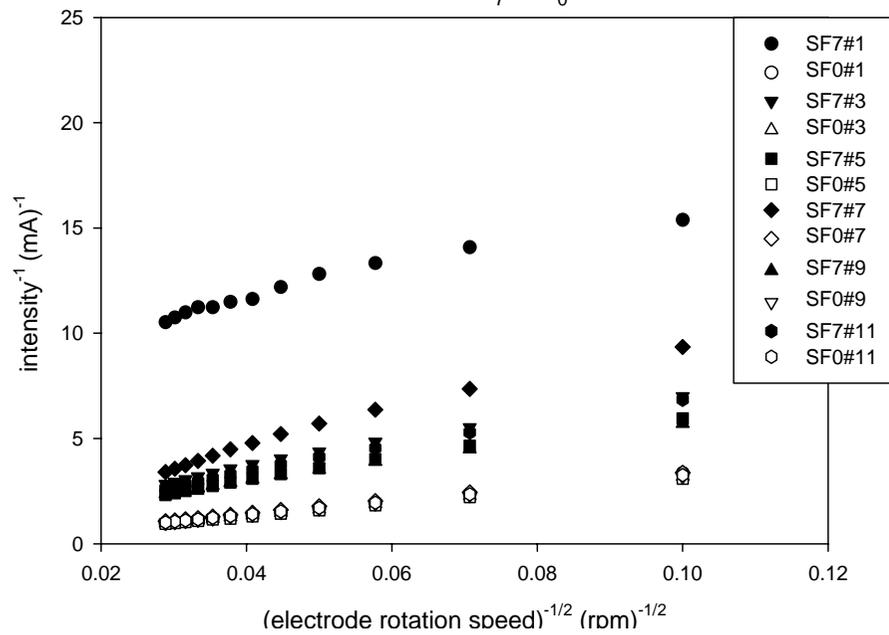
Figure 2. Inverse current intensity evolution with the electrode rotation speed measured on electrodes after different colonisation times (0 day, t_0 : closed symbols; 7 days, t_7 and 21 days, t_{21} : open symbols) in two flow sections (slow flow, SF and fast flow, FF) with the ferro-/ferricyanide tracer. Each symbol corresponds to one RDE.

Figure 3. Thickness evolution with the electrode rotation speed measured on electrodes after two colonisation times (7 days, closed symbols and 21 days, open symbols) in two flow conditions (slow flow, SF and fast flow, FF) with the ferrocyanide tracer. Each symbol corresponds to one RDE.

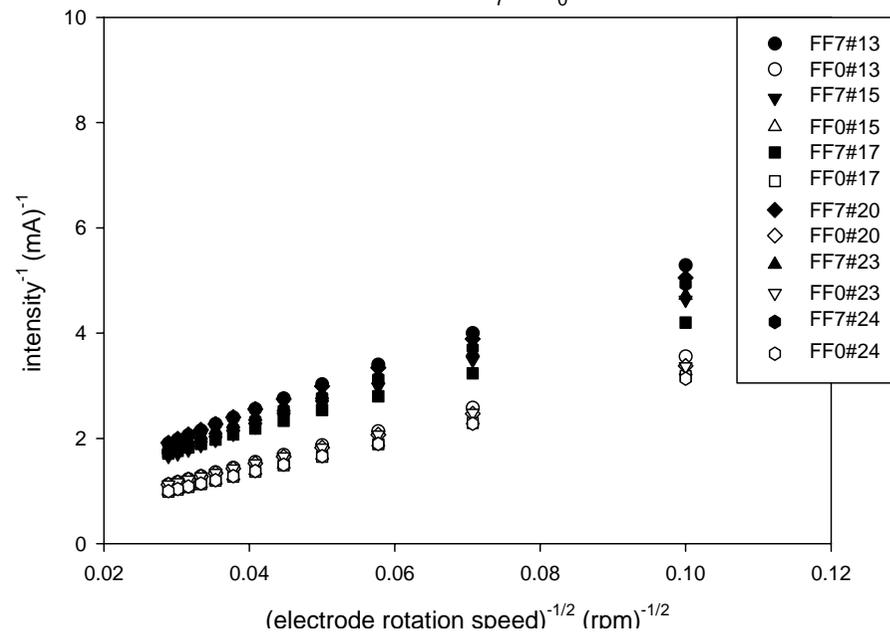
Figure 4. Relationship between electrochemical and stereomicroscopic measurements of biofilm thickness.

Figure 5. Effects of flow conditions (slow flow vs fast flow) and colonisation time (t_7 , black vertical bar vs t_{21} , grey vertical bar) on diatom density (a), bacterial density (b), biofilm cover (c), thickness (d) and elasticity (e).

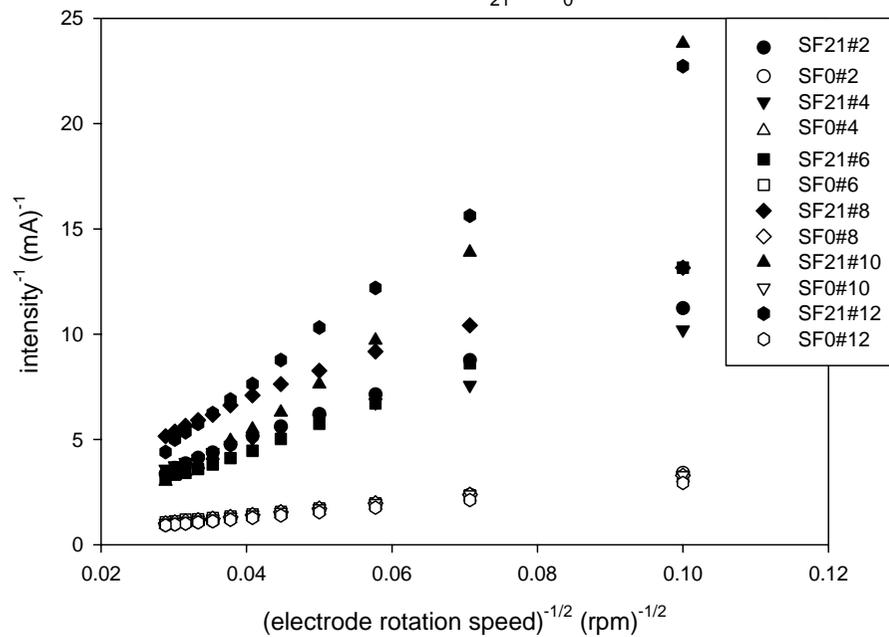
Slow flow t_7 vs t_0



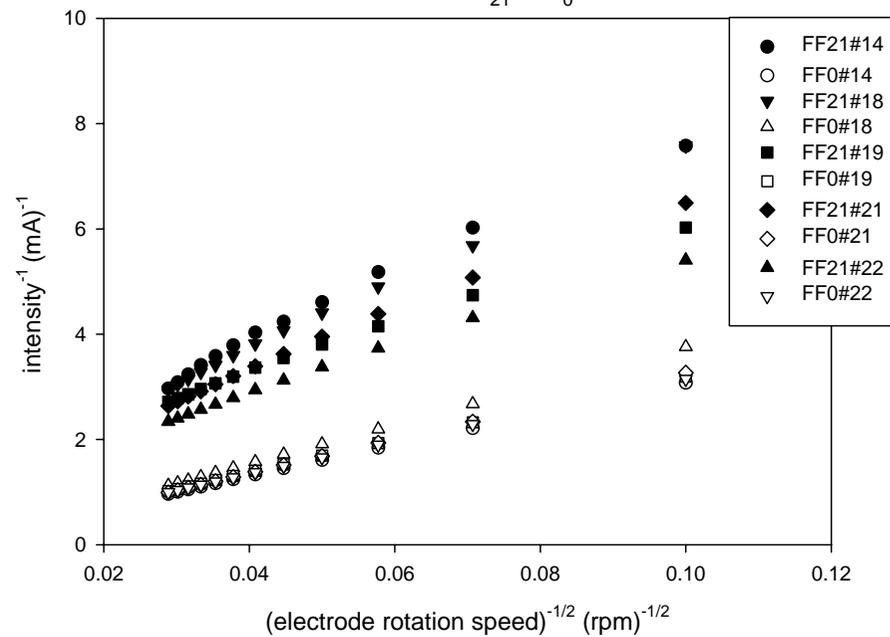
Fast flow t_7 vs t_0



Slow flow t_{21} vs t_0



Fast flow t_{21} vs t_0



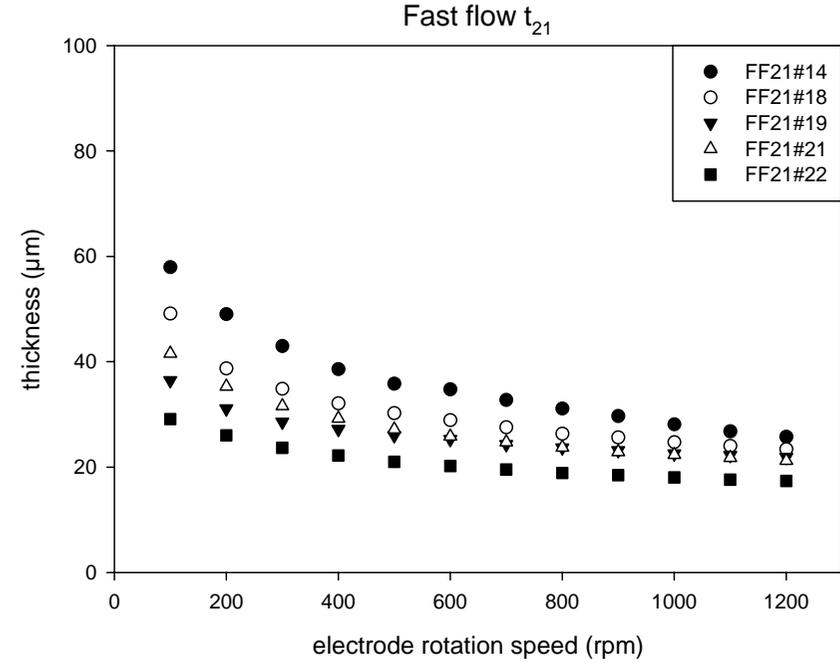
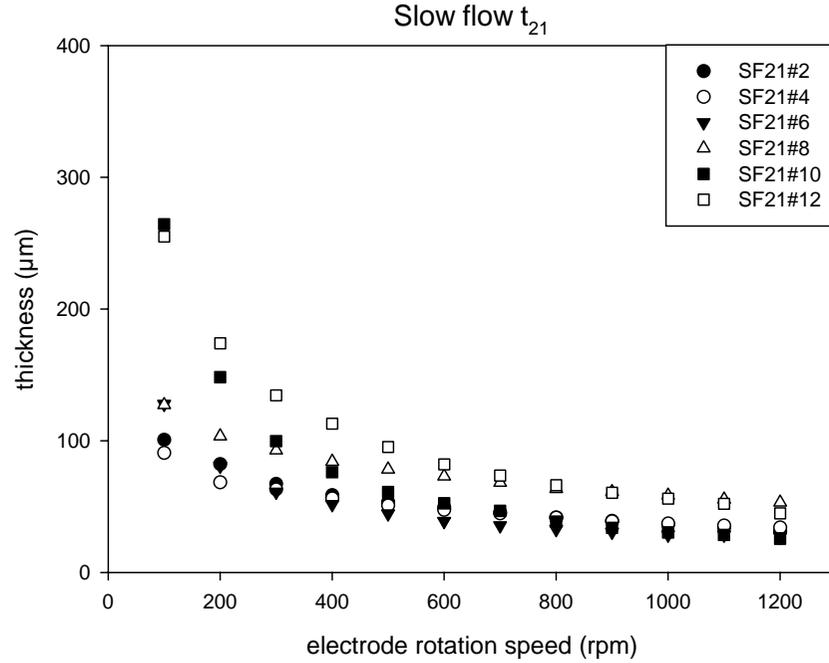
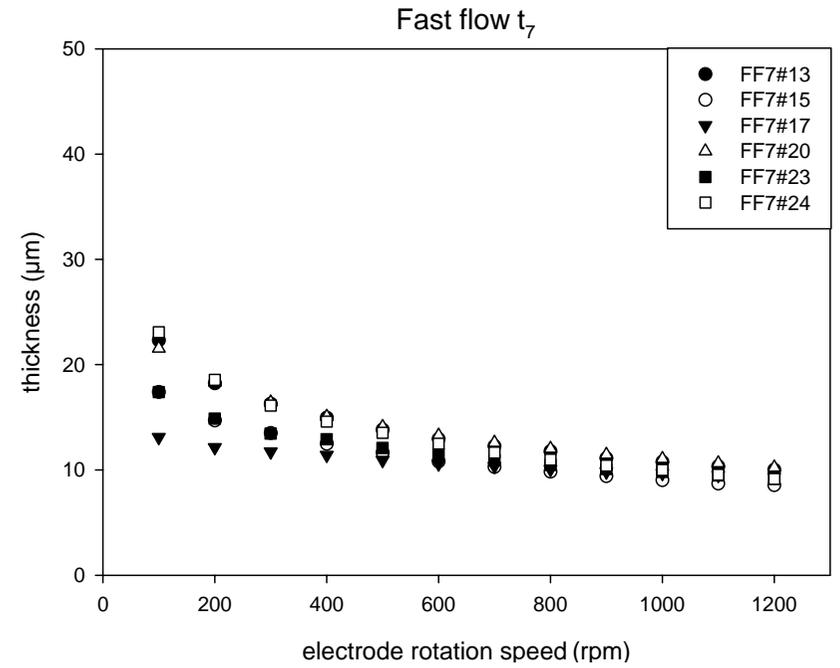
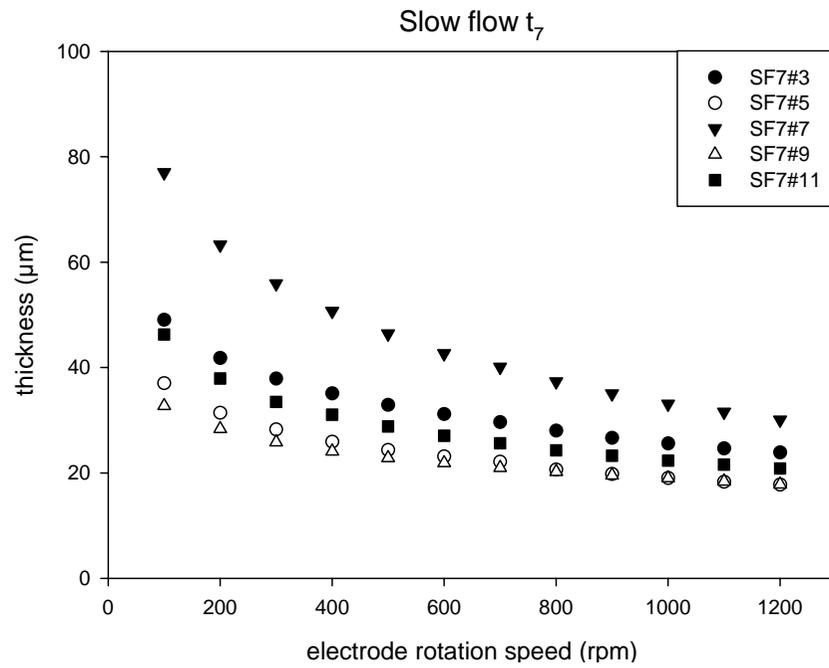
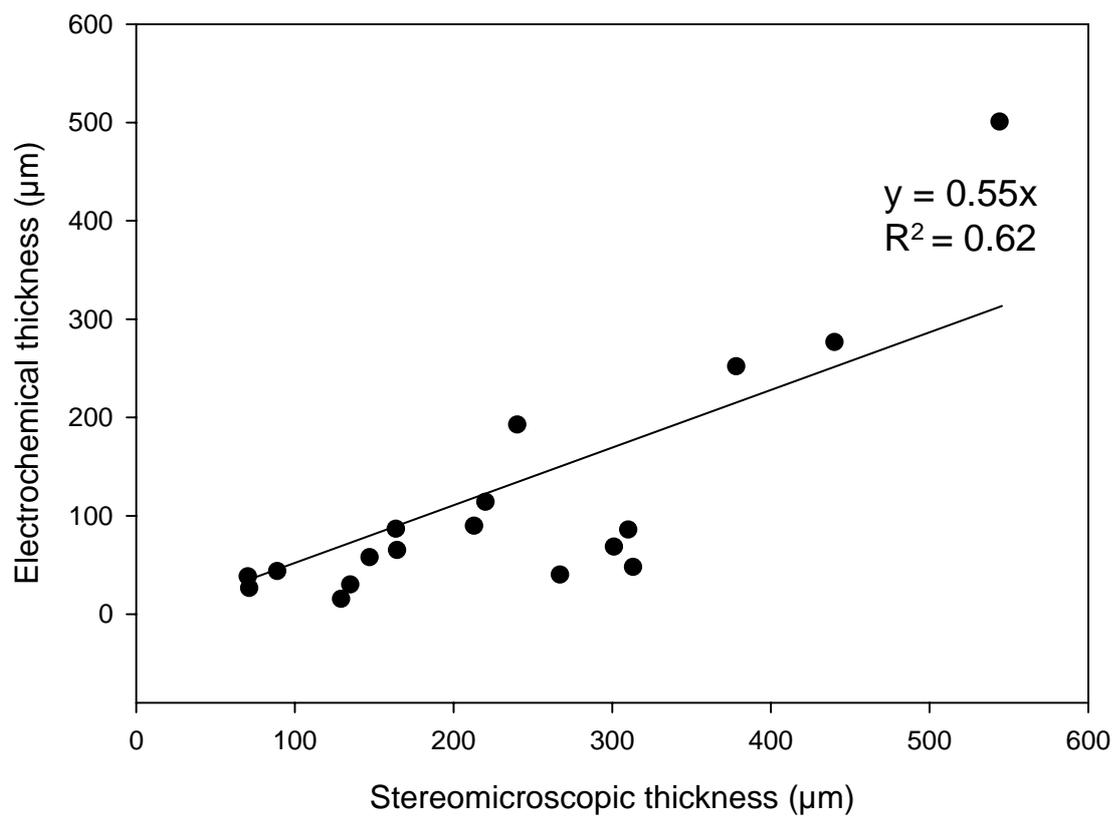


Figure 3.



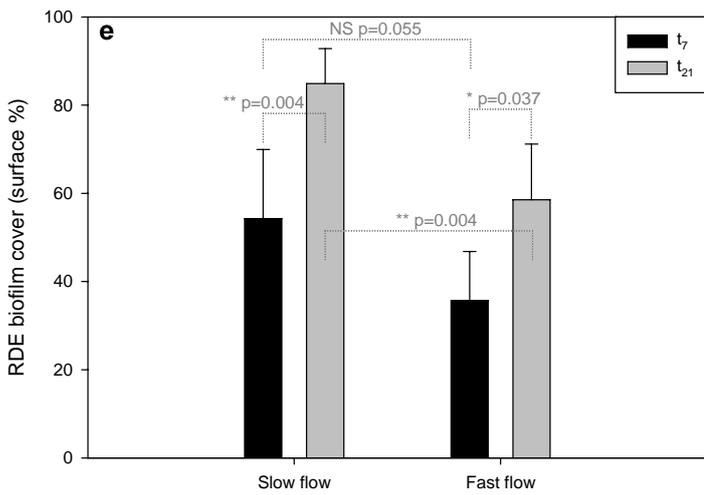
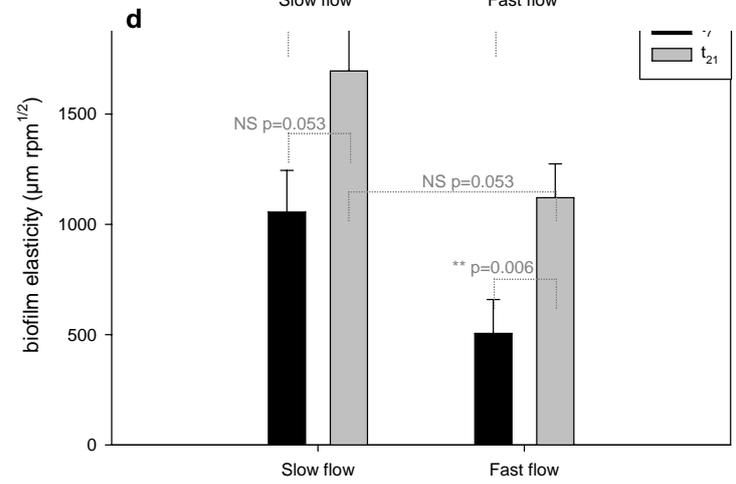
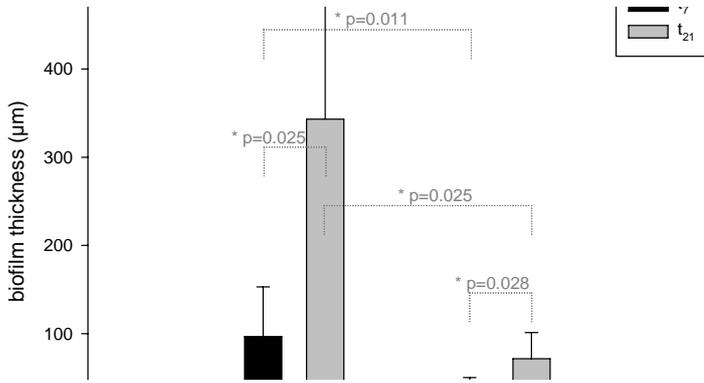
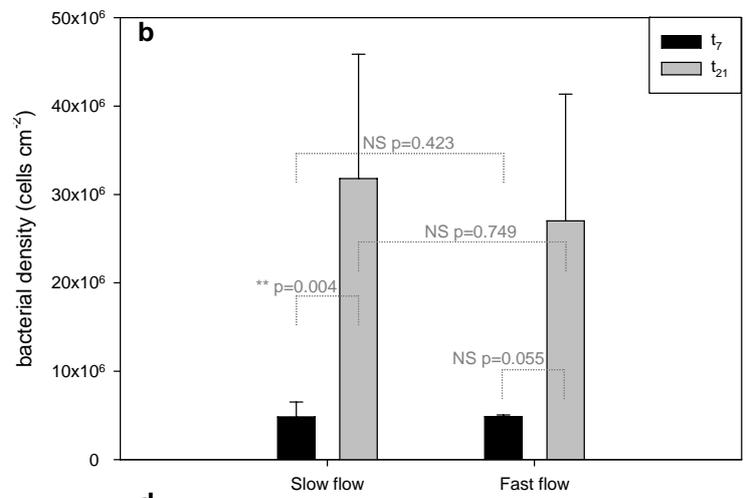
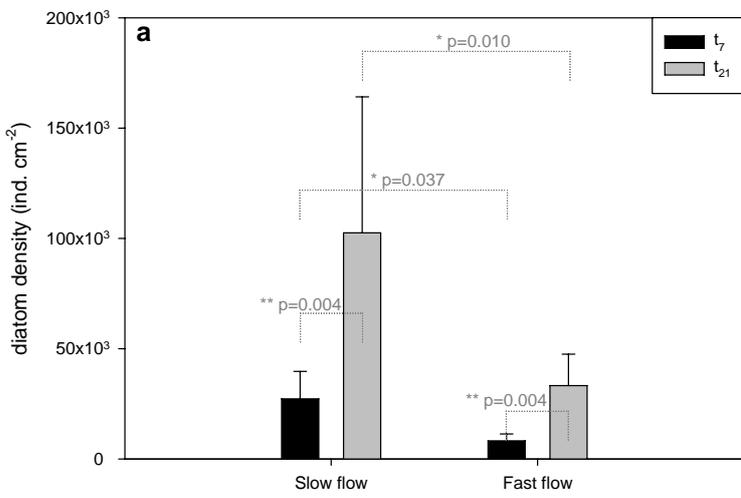


Table 1. Results of parameter fits (minimisation Chi-square): parameter values (mean \pm square deviation) and fit quality (χ^2 /degree of freedom; R^2) for each RDE.

	δ_0 (μm)	K ($\mu\text{m}^{-1} \text{rpm}^{-1/2}$)	$\frac{\chi_2}{dof}$	R^2
Slow flow t7				
SF7#3	87 \pm 2	0.00084 \pm 0.00001	0.13	0.9978
SF7#5	65 \pm 1	0.00116 \pm 0.00001	0.04	0.9987
SF7#7	193 \pm 13	0.00076 \pm 0.00002	1.52	0.9926
SF7#9	49 \pm 1	0.00103 \pm 0.00001	0.03	0.9986
SF7#11	90 \pm 1	0.00106 \pm 0.00001	0.04	0.9993
Fast flow t7				
FF7#13	44 \pm 1	0.00222 \pm 0.00002	0.01	0.9995
FF7#15	30 \pm 1	0.00241 \pm 0.00003	0.02	0.9978
FF7#17	16 \pm 0	0.00124 \pm 0.00002	0.00	0.9970
FF7#20	39 \pm 0	0.00203 \pm 0.00001	0.01	0.9995
FF7#23	27 \pm 0	0.00205 \pm 0.00003	0.02	0.9973
FF7#24	58 \pm 1	0.00260 \pm 0.00002	0.02	0.9991
Slow flow t21				
SF21#2	501 \pm 108	0.00077 \pm 0.00003	5.81	0.9869
SF21#4	252 \pm 18	0.00071 \pm 0.00002	1.70	0.9939
SF21#6	$+\infty^1$	0.00090 \pm 0.00004	58	0.9328
SF21#8	277 \pm 13	0.00042 \pm 0.00001	1.43	0.9971
SF21#10	$+\infty^1$	0.00053 \pm 0.00018	1222	0.7460
SF21#12	$+\infty^1$	0.00044 \pm 0.00002	265	0.9304
Fast flow t21				
FF21#14	114 \pm 3	0.00084 \pm 0.00001	0.26	0.9973
FF21#18	86 \pm 4	0.00094 \pm 0.00003	0.78	0.9861
FF21#19	48 \pm 2	0.00076 \pm 0.00003	0.40	0.9780
FF21#21	69 \pm 1	0.00097 \pm 0.00001	0.09	0.9976
FF21#22	40 \pm 1	0.00099 \pm 0.00002	0.07	0.9949

¹ $+\infty$ indicates an unrealistic too large thickness value.

Table 2. Correlation values (Pearson r coefficient) between biofilm physiognomy parameters. Stars indicate the significance level (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$).

Parameter	δ_0	1/K	Bacterial density	Diatom density	RDE biofilm cover	Stereomicroscopic thickness
δ_0	1.000	0.615**	0.480*	0.764***	0.680***	0.833***
1/K		1.000	0.428	0.696***	0.700***	0.781***
Bacterial density			1.000	0.533**	0.561**	0.646***
Diatom density				1.000	0.714***	0.755***
RDE biofilm cover					1.000	0.822***
Stereomicroscopic thickness						1.000

Table 3. Theoretical hydraulic characteristics in the slow and fast flow sections at t_0 (first day), t_7 (7 colonisation days) and t_{21} (21 colonisation days) estimated from measurements at the inlet of the pipe and pipe dimensions.

	Parameter	t_0	t_7	t_{21}
Slow flow	v ($m\ s^{-1}$)	0.11	0.30	0.12
	Re	22000	60000	24000
Fast flow	v ($m\ s^{-1}$)	0.44	1.20	0.48
	Re	44000	120000	48000

Appendix, supplementary data

	Fast flow t_7						Fast flow t_{21}							
	FF7#13	FF7#15	FF7#17	FF7#20	FF7#23	FF7#24	Mean \pm SD	FF21#14	FF21#16	FF21#18	FF21#19	FF21#21	FF21#22	Mean (\pm SD)
Electrochemical parameters														
Biofilm thickness δ_o (μm)	44	30	16	39	27	58	36 \pm 15	114	n.m.	86	48	69	40	72 \pm 30
Biofilm elasticity $1/K$ ($\mu\text{m rpm}^{1/2}$)	450	415	806	493	488	385	506 \pm 153	1189	n.m.	1065	1312	1029	1011	1121 \pm 128
Minimal measured intensity (μA)	189	216	238	198	212	203	-	132	n.m.	132	166	154	185	-
Other parameters														
Bacterial density (10^6 cells cm^{-2})	4.9	4.6	5.1	4.8	4.8	4.8	4.9 \pm 1.8	45.9	21.2	28.3	3.0	34.8	28.8	27.0 \pm 14.3
Diatom density (10^3 ind. cm^{-2})	6.9	9.4	13.6	8.2	7.1	4.2	8.2 \pm 3.2	20.0	18.1	35.6	28.3	41.5	55.8	33.3 \pm 14.2
RDE biofilm cover (surface %)	47.0	46.3	30.1	27.8	20.3	42.7	35.7 \pm 11.1	42.5	73.0	61.8	43.8	68.2	62.0	58.5 \pm 12.6
Stereomicroscopic thickness (μm)	89	135	129	70	71	147	107 \pm 34	220	273	310	313	301	267	281 \pm 35

	Slow flow t_7						Slow flow t_{21}							
	SF7#1	SF7#3	SF7#5	SF7#7	SF7#9	SF7#11	Mean \pm SD	SF21#2	SF21#4	SF21#6	SF21#8	SF21#10	SF21#12	Mean (\pm SD)
Electrochemical parameters														
Biofilm thickness δ_o (μm)	n.m.	87	65	193	49	90	97 \pm 56	501	252	n.m.	277	n.m.	n.m.	343 \pm 137
Biofilm elasticity $1/K$ ($\mu\text{m rpm}^{1/2}$)	n.m.	1185	862	1319	971	943	1056 \pm 189	1307	1409	n.m.	2372	n.m.	n.m.	1696 \pm 588
Minimal measured intensity (μA)	65	143	168	107	175	146	-	89	98	76	76	42	44	-
Other parameters														
Bacterial density (10^6 cells cm^{-2})	7.2	3.7	4.8	4.4	2.6	6.3	4.8 \pm 1.7	31.5	54.7	19.5	21.1	32.5	31.4	31.8 \pm 14.1
Diatom density (10^3 ind. cm^{-2})	29.7	42.4	24.2	36.3	6.2	24.5	27.2 \pm 12.5	76.6	72.8	51.8	52.1	173.3	188.3	107.6 \pm 67.5
RDE biofilm cover (surface %)	61.6	57.2	74.3	61.7	34.2	36.7	54.3 \pm 15.7	80.6	77.2	76.0	92.0	86.5	92.7	84.2 \pm 7.3
Stereomicroscopic thickness (μm)	207	164	164	240	n.m.	213	198 \pm 33	544	378	393	440	526	426	451 \pm 69

conclusions

La mesure voltammétrique de la diffusion d'un traceur électrochimique (FeCN_6^{3-}) au niveau de la surface d'une électrode à disque - plan tournant (EDT) permet la mesure de l'épaississement de la barrière de diffusion liée à la colonisation de l'EDT par un biofilm (épaisseur). Parce que cet essai de laboratoire permet une mesure discrète mais rapide, non destructive et sensible de la colonisation par un biofilm de l'EDT que l'on a immergée dans le milieu, c'est un des procédés qui nous est apparu le plus intéressant. En effet il permet d'enrichir l'éventail des techniques pour caractériser les biofilms de rivière en mesurant deux paramètres descripteurs de leur architecture : l'épaisseur et l'élasticité.

Une application en rivière a montré que :

- ces dispositifs pouvaient être mis en œuvre in situ
- s'avéraient suffisamment sensible pour détecter le développement de biofilm à 7 jours
- s'avéraient suffisamment reproductibles pour différencier des biofilms d'architectures différentes.

Les EDT ont été soumises à des vitesses moyennes d'environ 0,10 et 0,45 m/s correspondant à des Reynolds de 23000 (section 1) et 46000 (section 2) respectivement caractéristiques de conditions optimale et suboptimale pour la croissance du biofilm d'après Godillot et al. (2001).

Les biofilms prélevés ont des épaisseurs comprises entre 16 et 501 μm . Avec $189 \pm 153 \mu\text{m}$, l'épaisseur du biofilm (moyenne \pm écart-type) est significativement supérieure dans la section 1 contre $52 \pm 29 \mu\text{m}$ dans la section 2. Celle-ci augmente aussi significativement avec l'âge du biofilm, de $63 \pm 49 \mu\text{m}$ après 7 jours de colonisation à $173 \pm 160 \mu\text{m}$ après 21 jours de colonisation. L'élasticité du biofilm de la section 1 est significativement supérieure à celle du biofilm de la section 2, et plus particulièrement après 21 jours de colonisation.

D'après les résultats obtenus, la mesure ampérométrique est donc non seulement fiable pour détecter des biofilms de rivière très fins (10 μm) mais s'applique aussi à des biofilms complexes épais (plusieurs 100^{aines} de μm) constitués principalement d'algues. Cette application en rivière démontre la pertinence de la mesure voltammétrique pour décrire et suivre la réponse physiologique du biofilm sous l'effet de contraintes environnementales.

Même si on est encore loin d'un capteur automatique en ligne, un suivi de la dynamique des biofilms en rivière serait possible et surtout simplifié et normalisé grâce à l'emploi de tels dispositifs.

4 Electroactivité des biofilms de rivière : détection à l'échelle de la communauté et à l'échelle de populations bactériennes constitutives (isolats)

3.4. contexte et objectifs

Le principe électrochimique du capteur type Biox© a été présenté par Mollica & Cristiani, *Water Science and Technology* 47(2003) : 45–49.

Ce moyen de détection des biofilms est basé sur la capacité d'un biofilm de produire via la réduction aérobie de l'O₂ une dépolarisation de la cathode (généralement un coupon d'acier inoxydable). Si un courant constant est maintenu, alors la croissance du biofilm sur la cathode se traduit par une montée de potentiel ou bien si un potentiel constant est maintenu, alors l'intensité du courant augmente.

La conception du capteur repose alors sur un montage relativement simple (Figure 1).

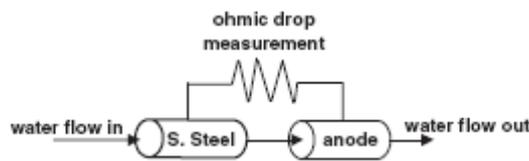


Figure 1. Schéma de principe du capteur Biox©. Un composant (ici un tube) en acier inox est relié à un autre composant en matériau moins noble (Fer) destiné à faire fonction d'anode. La mesure de potentiel est effectuée en continu. De Mollica et Cristiani [2003]

En eau de mer, il a été montré à partir d'un tel montage que la colonisation par des bactéries (Figure 2A) [de Mollica et Cristiani, 2003] :

- coïncidait, dans le temps, avec la montée de potentiel (Figure 2B),
- évoluait, durant la colonisation, d'un ordre de grandeur comme la montée de potentiel.

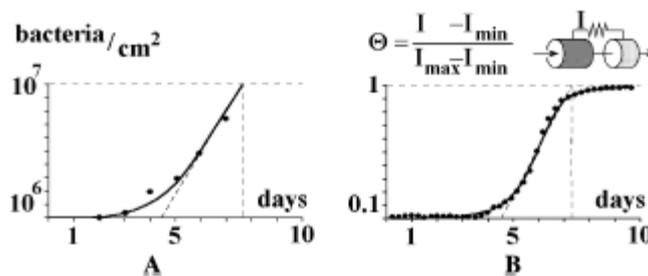


Figure 2. Evolution des densités bactériennes (mesurées par dénombrement en microscopie électronique à balayage) sur un tube d'acier inox témoin placé dans les mêmes conditions hydrauliques (.A) et évolution du signal (valeur normalisée) fourni par la sonde électrochimique (B). De Mollica et Cristiani [2003]

Une application dans le Pô (Italie), a montré que (Figure 3) :

- des signaux sont observables en rivière malgré la plus faible conductivité des eaux de rivière par rapport à l'eau de mer,
- ces signaux sont assez reproductibles,
- ils reproduisent des phases comparables à une séquence classique de l'installation des biofilms : succession de phases de latence puis de croissance.

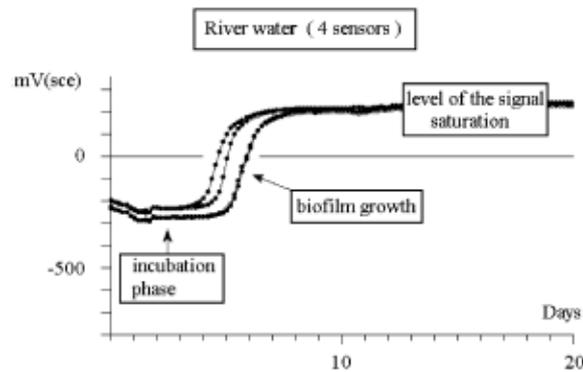


Figure 3. Signal détecté dans le Pô par 4 capteurs Biox©. De Mollica et Cristiani [2003]

Oui mais, qu'est-ce qui relie le signal observé au biofilm qui colonise l'électrode ?

Le signal observé sur le capteur est-il fonction des caractéristiques structurales du biofilm qui le colonise ?

3.5. application préliminaire

L'évolution du potentiel d'une électrode de travail (ET) a été suivi dans la rivière par rapport à une référence grâce à un dispositif expérimental développé par l'équipe du LGC - Toulouse. ET fait fonction de coupon exposé à la colonisation par un biofilm qui en modifie le potentiel comme dans le capteur Biox. Un essai a été réalisé dans la Garonne, dans le site Aouach, en novembre 2006. Plusieurs matériaux supports ont été testés. Des coupons en acier inox, inconel et cuivre ont été immergés dans la rivière pendant 21 jours. L'évolution du potentiel de chacun des coupons a été enregistrée puis les biofilms ayant colonisé les coupons ont été analysés du point de vue de leur biomasse et de la composition des communautés de diatomées et de bactéries les constituant (figure 4).

En 21 jours la colonisation est avérée sur tous les coupons (figure 4 a et b) et se manifeste par des montées de potentiel significatives autour de 1,5 V (figure 4.a).

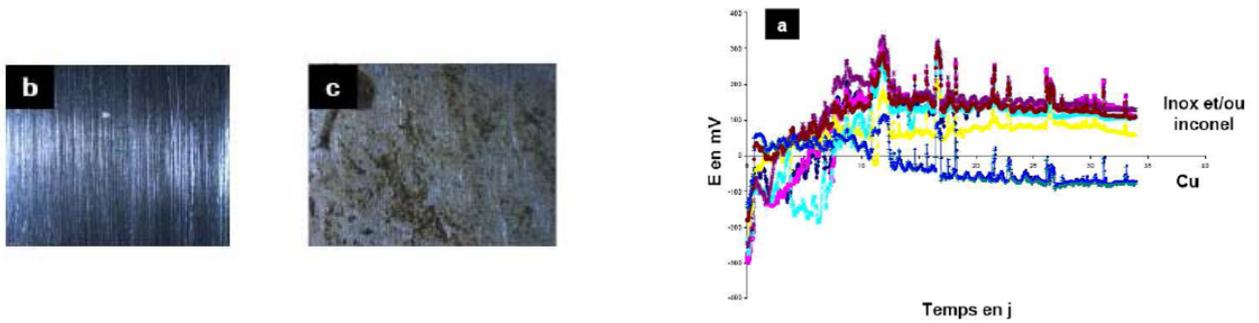


Figure 4. Vues de coupons en acier inox avant (b) et après 21 jours d’immersion dans la Garonne à l’Aouach en novembre 2006 (c). Evolution du potentiel mesuré pour chaque coupon en inox (4 coupons), inconel (2 coupons) ou cuivre (2 coupons) utilisé comme électrode de travail par rapport à une électrode de référence.

Les biomasses obtenues sur ces coupons sont dans l’ensemble comparables d’un coupon à l’autre et bien inférieures à celles présentes sur les galets parallèlement prélevés (figure 5). Le rapport Chlorophylle / Matière Sèche indique une faible proportion de microorganismes photosynthétiques par rapport à des biofilms matures prélevés sur les galets. Les coupons en cuivre se distinguent des autres par des valeurs de montée de potentiel plus faibles (figure 4a) associées à des valeurs de biomasse également plus faibles, en particulier pour ce qui concerne la chlorophylle ou le contenu en ADN (figure 5).

Quel que soit le paramètre, aucune différence entre matériaux n’est observée (test de Mann & Whitney) (figure 6). Ce constat semble plutôt lié au nombre insuffisant de répliquats (2 pour l’inconel et le cuivre) nécessaires pour valider statistiquement des réponses. Le cuivre présente en effet une signature de colonisation très différenciée par rapport aux deux autres matériaux, en particulier pour les deux descripteurs plus « biologiques » que sont l’ADN et la chlorophylle.

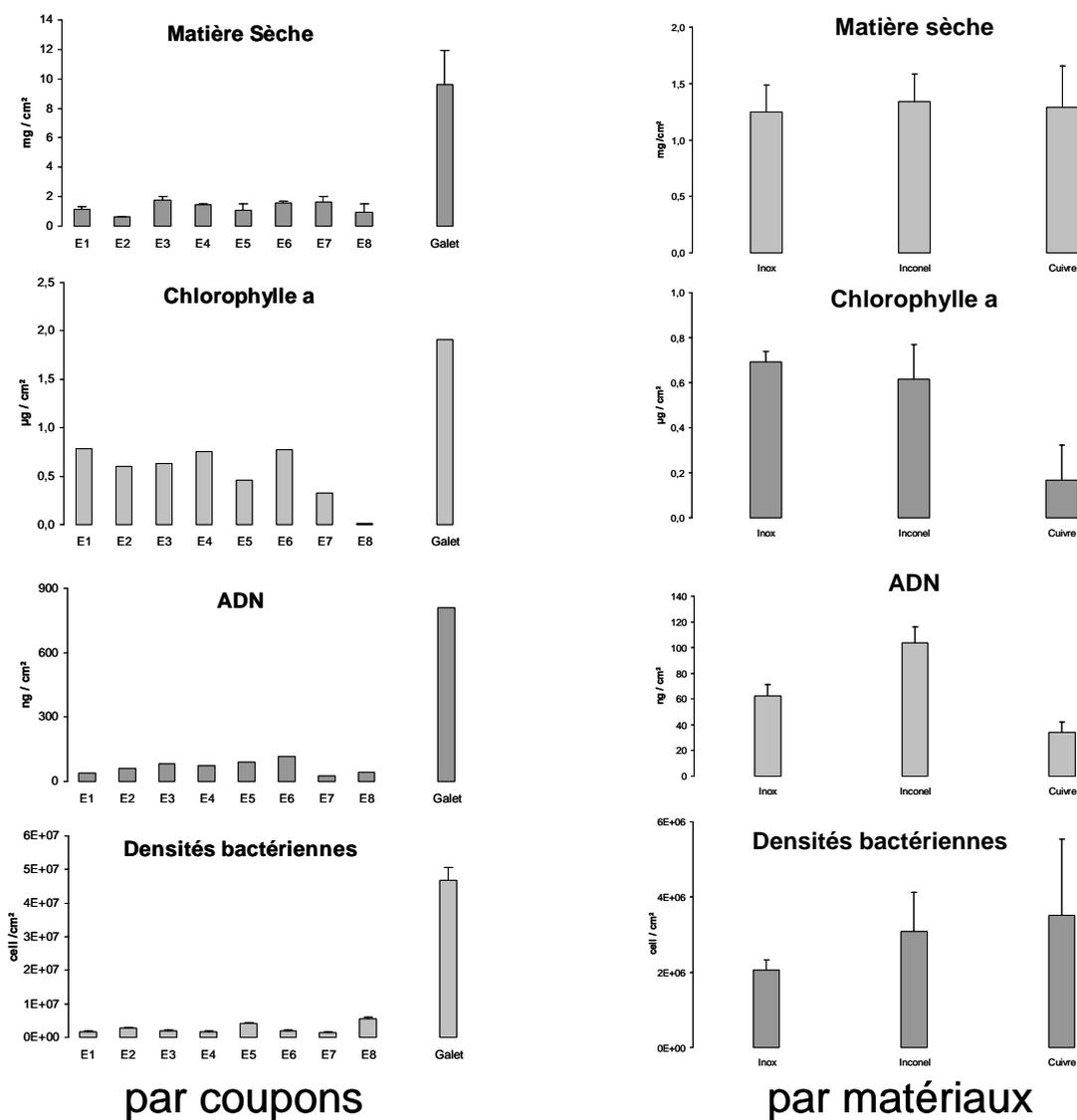


Figure 5. Valeurs moyennes (\pm écart type) des biomasses, concentrations en chlorophylle et ADN et densités bactériennes associées aux biofilms recueillis après 21 jours d'immersion dans la Garonne à L'Aouach en novembre 2006 sur différents matériaux supports. Acier inox E1 à E4 ; inconel E5, E6 et cuivre E7, E8.

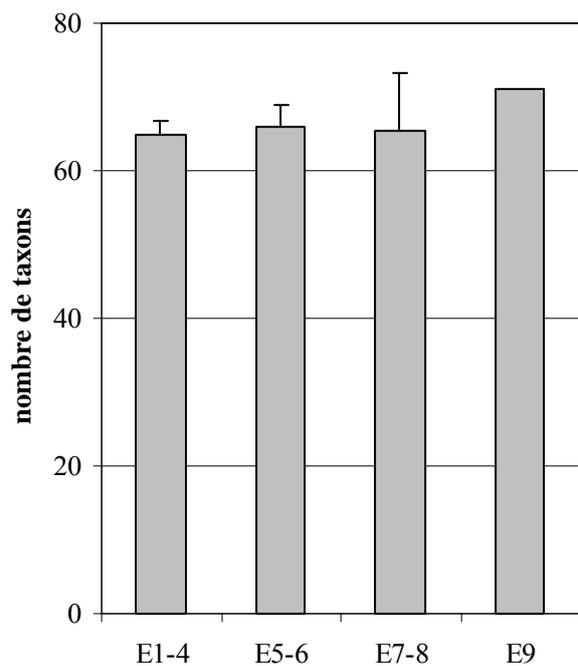


Figure 6. Richesse spécifique selon le matériau support. Acier inox E1-4 ; Inconel E5-6 ; cuivre E7-8 ; Galet de la rivière E9

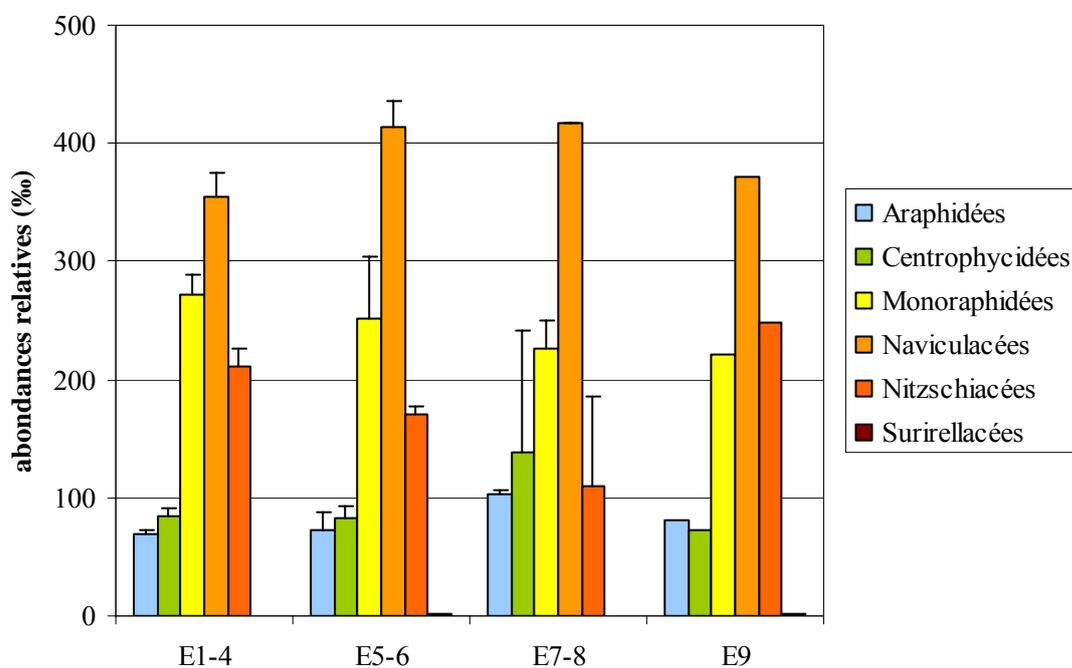


Figure 7. Répartition des espèces de diatomées par famille selon le matériau support. Acier inox E1-4 ; Inconel E5-6 ; cuivre E7-8 ; Galet de la rivière E9

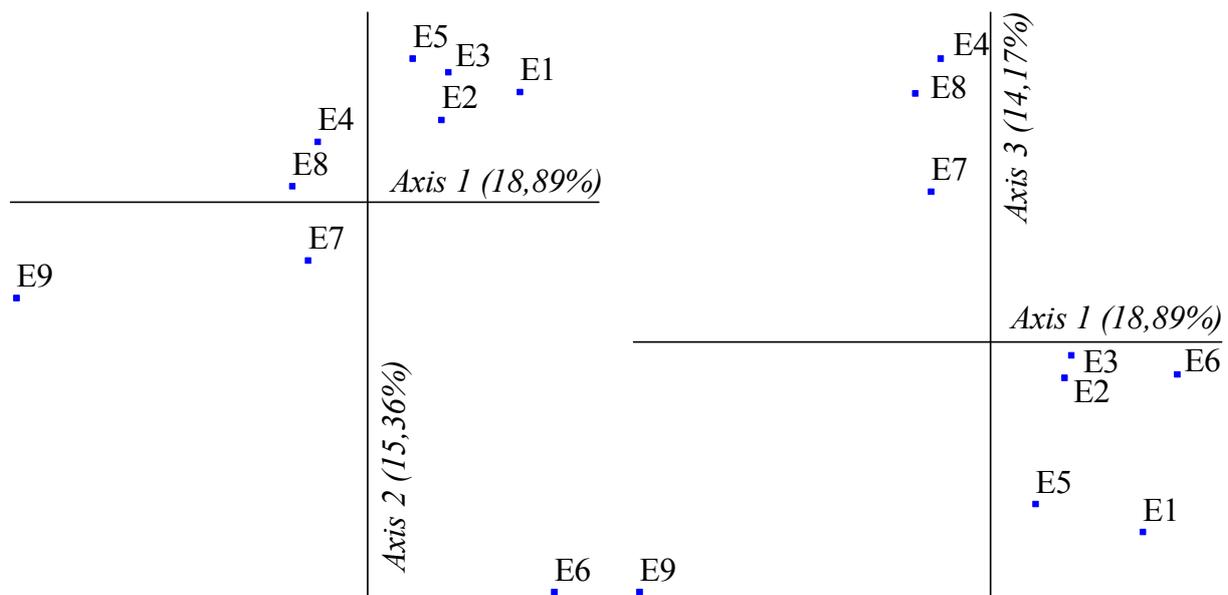


Figure 8. ACP réalisée sur les 151 espèces identifiées dans les plans (Axe1, Axe2) et (Axe1, Axe3). Variances totales expliquées respectives : 34,25 % et 33,06 %.

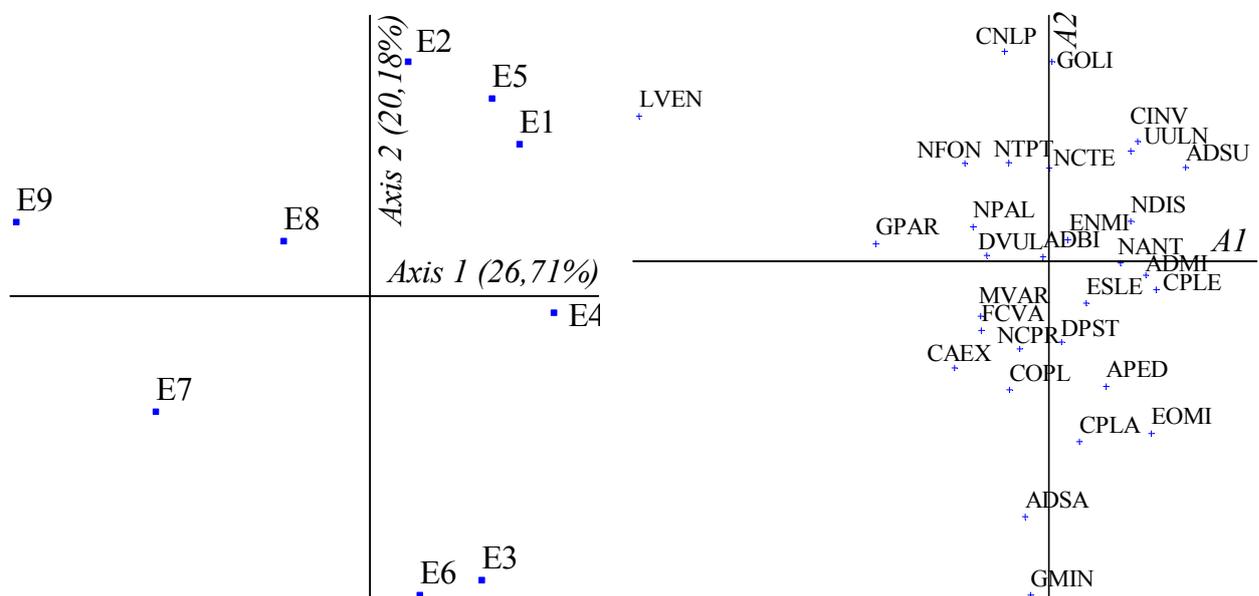


Figure 9. ACP réalisée sur les espèces représentant plus de 1 % de l'abondance relative (n=30) dans le plan (Axe1, Axe2). Variance totale expliquée : 46,89 %.

ADBI : *Achnanthydium biasolettianum*, ADMI : *A. minutissimum*, ADSA : *A. saprophila*, ADSU : *A. subatomus*, APED : *Amphora pediculus*, CPLA : *Cocconeis placentula* var. *placentula*, CPLE : *C. placentula* var. *euglypta*, COPL : *C. pseudolineata*, CINV : *Cyclostephanos invisitatus*, CAEX : *Cymbella excisa* var. *excisa*, CNLP : *Cymbella neoleptoceros* var. *neoleptoceros*, DVUL : *Diatoma vulgare*, DPST : *Discostella pseudostelligera*, ENMI : *Encyonema minutum*, ESLE : *E. silesiacum*, EOMI : *Eolimna minima*, FCVA : *Fragilaria capucina* var. *vaucheriae*, GMIN : *Gomphonema minutum* f. *minutum*, GOLI : *Gomphonema olivaceum* var. *olivaceum*, GPAR : *Gomphonema parvulum* var. *parvulum* f. *parvulum*, LVEN : *Luticola ventricosa*, MVAR : *Melosira varians*, NANT : *Navicula antonii*, NCPR : *N. capitatoradiata*, NCTE : *N. cryptotenella*, NTPT : *N. tripunctata*, NFON : *Nitzschia fonticola*, NPAL : *N. palea*, UULN : *Ulnaria ulna*.

Tableau 1 : Espèces dominantes (n=10) pour chaque type de matériau support (en gras, espèces déjà identifiées comme tolérantes ou indifférentes au stress métallique).

E1-4	E5-6	E7-8	E9
<i>Encyonema minutum</i> (13,3%)	<i>Encyonema minutum</i> (14,8%)	<i>Encyonema minutum</i> (16,4%)	<i>Achnantheidium biasolettianum</i> (13,6%)
<i>Achnantheidium biasolettianum</i> (13,1%)	<i>Achnantheidium biasolettianum</i> (13,1%)	<i>Achnantheidium biasolettianum</i> (12,1%)	<i>Nitzschia fonticola</i> (12,2%)
<i>Nitzschia dissipata</i> (13,7%)	<i>Nitzschia dissipata</i> (11,7%)	<i>Melosira varians</i> (11,4%)	<i>Nitzschia dissipata</i> (7,9%)
<i>Melosira varians</i> (5,7%)	<i>Melosira varians</i> (6,0%)	<i>Diatoma vulgare</i> (6,5%)	<i>Encyonema minutum</i> (6,6%)
<i>Achnantheidium minutissimum</i> (5,5%)	<i>Diatoma vulgare</i>	<i>Navicula tripunctata</i>	<i>Melosira varians</i> (6,3%)
<i>Nitzschia fonticola</i>	<i>Navicula tripunctata</i>	<i>Nitzschia dissipata</i>	<i>Luticola ventricosa</i> (5,9%)
<i>Navicula tripunctata</i>	<i>Achnantheidium minutissimum</i>	<i>Nitzschia fonticola</i>	<i>Diatoma vulgare</i> (5,4%)
<i>Cocconeis placentula</i>	<i>Nitzschia fonticola</i>	<i>Achnantheidium minutissimum</i>	<i>Navicula tripunctata</i> (5,4%)
<i>Diatoma vulgare</i>	<i>Gomphonema minutum</i>	<i>Navicula capitatoradiata</i>	<i>Navicula cryptotenella</i>
<i>Navicula cryptotenella</i>	<i>Cocconeis placentula</i>	<i>Cocconeis placentula</i>	<i>Gomphonema parvulum</i>

Si la richesse spécifique des diatomées est légèrement plus élevée sur substrat naturel, aucune différence significative (test Mann-Whitney) n'est observée entre matériaux supports (Figure 8). La répartition des taxons par familles est comparable quel que soit le type de support, avec cependant une représentation plus importante des Nitzschiacées sur substrats naturels (liée à l'abondance relative élevée de *Nitzschia fonticola*) (Figure 4). L'axe 1 de l'ACP (Figure 8) discrimine les échantillons prélevés sur substrat naturel et sur supports artificiels. Les valeurs négatives de l'axe 1 (E9) sont corrélées avec la présence de *Mayamaea atomus* var. *permitis* (0,7 %), et d'espèces minoritaires telles que *Achnanthes curtissima*, *Cymbella aspera*, *Eolimna subminuscula*, *Meridion circulare* var. *circulare*, *Navicula symmetrica*, *Nitzschia dissipatoides*, *N. hantzschiana* et *N. inconspicua*. Selon l'axe 2, E6 se distingue des autres échantillons collectés sur substrat artificiels par une présence accrue d'espèces minoritaires telles que *Achnanthes subhudsonis*, *Cyclotella kuetzingiana* var. *planetophora*, *Diatoma mesodon*, *Ellerbeckia arenaria*, *Mayamaea atomus*, *Pseudostaurosira parasitica* var. *subconstricta*, *Surirella tenera* et, dans une moindre mesure, de *Fragilaria capucina* var. *capitellata* et *Reimeria uniseriata*. L'axe 3 discrimine nettement les échantillons E5-E6 (regroupés avec les échantillons E1 à E3) et E7-E8 (avec E4), caractérisés respectivement par des espèces

minoritaires : *Cocconeis pediculus* ou *Caloneis bacillum* d'une part, et *Gomphonema truncatum*, *Cyclotella ocellata* et *Diploneis oblongella* d'autre part. La discrimination entre matériaux supports est essentiellement liée à la présence d'espèces faiblement représentées (et celle ou non de *Luticola ventricosa*, caractéristique du substrat « galets », voir aussi Figure 9). La proportion élevée de *Luticola ventricosa* (Figure 6) sur substrat naturel discrimine l'échantillon E9 des autres le long de l'axe 1. La structure des assemblages des échantillons E7-8 est néanmoins relativement proche des communautés de E9. Dans le demi-plan des valeurs positives de l'axe 1, on trouve 3 sous groupes : E4 (corrélé avec des abondances plus importantes de *Achnanthydium minutissimum*, *Cocconeis placentula* var. *euglypta* et *Navicula antonii*), E3/E6 (*Achnanthydium saprophila*, *Amphora pediculus*, *Cocconeis placentula* var. *placentula*, *Eolimna minima* et *Gomphonema minutum*) et E1/E2/E5 (*Achnanthydium subatomus*, *Cyclostephanos invisitatus*, *Gomphonema olivaceum* et *Ulnaria ulna*).

La composition spécifique en termes d'espèces dominantes est très proche d'un matériau support à l'autre (Tableau 1). Si l'on considère seulement les abondances relatives supérieures à 5 %, on note que *Achnanthydium biasoletianum*, *Encyonema minutum* et *Melosira varians* sont représentées dans tous les échantillons. Certains taxons sont communs aux échantillons E1 à E6 et E9 (*Nitzschia dissipata*), E7 à E9 (*Diatoma vulgare*) alors que d'autres taxons sont abondants pour seulement l'un des types de matériau support : *Nitzschia fonticola* et *Navicula tripunctata* (E9, substrat naturel) ou *Achnanthydium minutissimum* (E1-4, coupons inox). L'espèce *Nitzschia fonticola*, parmi les plus représentées sur substrat « galets » (12,2 %), n'est présente qu'en faibles quantités sur les autres types de supports (4,9 % sur coupons inox, 3,1 % sur coupons inconel, 4,2 % sur coupons cuivre). De même *Luticola ventricosa* (5,9 % sur galets) est recensée à moins de 0,2 % dans les prélèvements sur substrats artificiels.

Les communautés échantillonnées sur galets sont assez différentes en termes de structure des communautés prélevées sur substrats artificiels, qui sont également variables selon le matériau choisi (voir aussi Sekar et al. 2004). Il serait approprié de sélectionner un type de substrat artificiel inerte et suffisamment utilisé pour autoriser des comparaisons (e.g. lames de verre).

Le nombre de réplicats (2 pour les coupons d'inconel et de cuivre, 1 seul pour le substrat galet) est insuffisant pour autoriser un traitement statistique des données, d'autant que la variabilité naturelle sur substrat galet n'est pas évaluée et est susceptible d'être encore plus importante que sur substrats immergés pendant une durée connue (notamment par la présence de communautés antérieures à l'immersion des coupons, échantillonnées également).

La plupart des espèces identifiées ici ont déjà été observées en conditions de stress métallique, ce qui ne permet pas de détecter un éventuel effet sélectif des coupons (de cuivre notamment) sur la structure de la communauté.

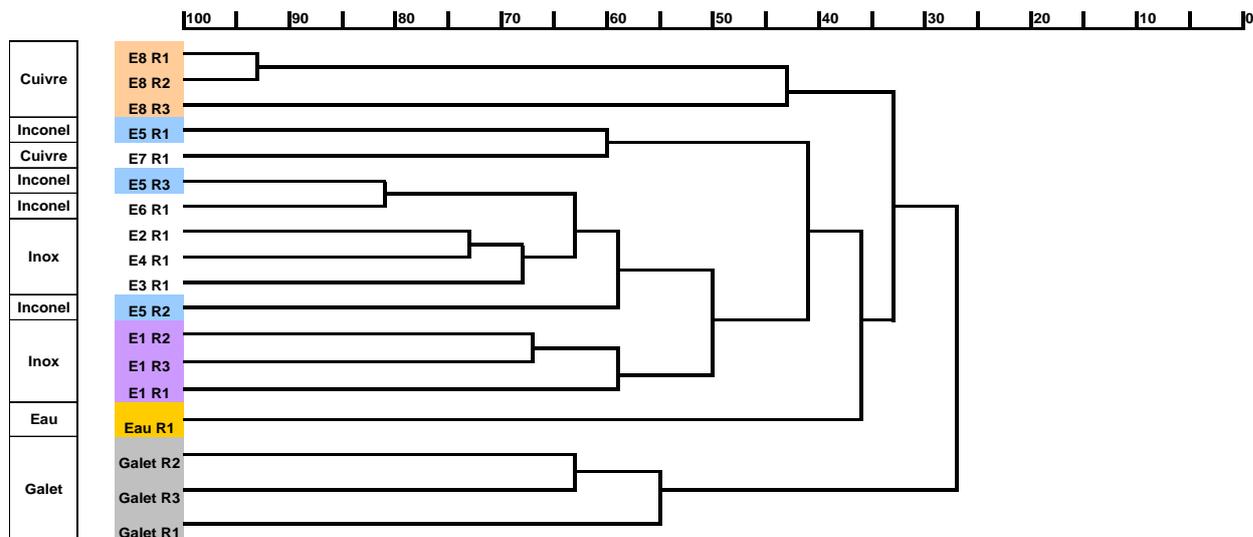


Figure 10. Similarité de Jaccard entre les profils de bande (DGGE) des communautés bactériennes recueillies sur les différents coupons.

Pour les communautés bactériennes analysées en DGGE, l'hétérogénéité entre répliquats est acceptable à partir de 60 % de similarité (Figure 10). L'échantillon E5-#1 présente un profil atypique sur le gel par rapport aux deux autres répliquats du même coupon mais c'est le seul cas présentant un niveau de similarité anormal entre répliquats. La DGGE confirme que les communautés échantillonnées sur les galets et en suspension dans l'eau (échantillon pris à l'Aouach le dernier jour de l'expérimentation) sont nettement différentes de celles qui ont colonisé les coupons (<40 % de similarité). Concernant les coupons, les communautés qui se sont développées sur le cuivre (E7 et E8) sont également assez différentes de celles qui ont colonisé l'inconel ou l'inox. Est-ce un effet lié à la colonisation ? A la vitesse de colonisation (communautés précoces) ? A la sélectivité du matériau ? En revanche, l'inox et l'inconel ne semblent avoir « sélectionné » de communautés différentes (>60 % de similarité dans le cluster qui réunit les coupons inox E1 à E4 et inconel E6 et E2 des répliquats du E5).

La comparaison des deux coupons de cuivre avec les six autres coupons testés indique :

- une montée de potentiel plus faible,
- une colonisation moins marquée, inhibée ou ralentie par le matériau,
- une colonisation par des biofilms constitués de taxon diatomiques similaires mais de communautés bactériennes différentes, sans doute sélectionnées par le matériau.

L'utilisation d'un support inhibiteur comme le cuivre représente vraisemblablement un moyen de manipuler la colonisation (intensité ou type de communauté) et donc, de moduler l'activité électrochimique observée (montée de potentiel).

Si cette explication se confirmait, alors cela signifierait que la montée de potentiel dépend non seulement de l'intensité de la colonisation (vitesse d'accrétion) mais du type de communauté se développant sur le coupon.

3.6. application en rivière

C Pineau. Caractérisation phénotypique d'isolats bactériens issus de biofilms de rivière électroactifs. Rapport de stage de Master Sciences de la terre et environnement, écologie. Année 2008- 2009.

Université Bordeaux I.

Dans le cadre du projet SurF (Surveillance des cours d'eau par les bioFilms), des enregistrements de la variation du potentiel d'électrodes de coupons métalliques au cours de leur colonisation par un biofilm ont été réalisés *in situ* dans la Garonne en 2006 et 2007. Les montées de potentiel significatives (>150 mV) qui ont été observées au cours de ces expérimentations suggèrent une électroactivité de ces assemblages (Figure 1a, ci dessus).

Formulant l'hypothèse selon laquelle l'électroactivité du biofilm pouvait être liée à la présence de souches bactériennes électroactives au sein de l'assemblage, l'équipe EcoLab s'est alors intéressée à la composante bactérienne de ces biofilms épilithiques, en collaboration avec le Laboratoire de Génie Chimique et le Laboratoire de Bactériologie, Virologie de l'UFR Sciences Pharmaceutiques de l'Université Paul Sabatier. Une approche par culture a permis d'isoler et d'identifier par séquençage de l'ARNr 16S des bactéries de ces biofilms, afin de tester leur électroactivité par voltammétrie cyclique selon un bioessai développé par Parot (2007). La caractérisation de ces souches par l'analyse de certains de leurs caractères phénotypiques (Gram, morphologie, activité enzymatique, profil biochimique) a été réalisée lors de ce stage pour compléter l'étude de ces isolats.

4.3.1. Synthèse bibliographique

L'électroactivité a été démontrée chez des bactéries Ferri-réductrices, telles que *Geobacter sulfureducens* et *Shewanella oneidensis*, l'interaction entre ces bactéries et leur support se faisant *via* des protéines de la membrane externe et/ou des cytochromes périplasmiques (Gralnick et Newman, 2007). Des études plus récentes ont émis l'hypothèse que l'interaction pourrait être due à la présence de pilis conducteurs, les *nanowires* (Gorby et *al.*, 2006).

L'électroactivité est un transfert d'électrons de la bactérie à la surface minérale à proximité. Cet échange est parfois associé à une respiration extracellulaire, l'accepteur terminal de la chaîne d'électrons respiratoire étant ce support. La respiration extracellulaire pourrait être due à quatre mécanismes (Gralnick et Newman, 2007):

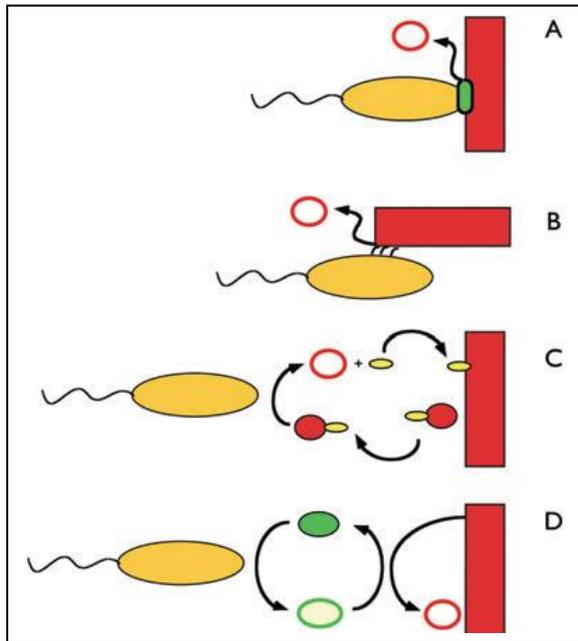


Figure 1. Quatre stratégies potentielles de respiration extracellulaire

- A : La présence d'une protéine, (en vert) à la surface membranaire de la cellule (en jaune), un contact direct permet le transfert d'électrons de la cellule au substrat (en rouge). L'oxydation libère un composé réduit (cercle rouge),
- B : Des *nanowires* font un pont entre la cellule et le substrat permettent le transfert direct d'électrons,
- C : Le transport d'électron se fait indirectement grâce à un chélateur (petits ovaux jaunes),
- D : Le transfert d'électron est catalysé par un transporteur d'électron (en vert, disque : forme réduite ; cercle : forme oxydé).

La catalase pourrait être un acteur de l'oxydation du substrat. En effet, elle implique la présence du groupement Fe(IV)=O qui est hautement oxydant (figure 1D). La cytochrome-c oxydase indique la présence du cytochrome-c du complexe IV de la chaîne respiratoire qui permet le transfert d'électrons de l'intérieur vers l'extérieur de la cellule (figure 1A).

En milieu naturel, l'électroactivité des biofilms a d'abord été découverte dans des eaux insalubres ou dans les sédiments marins (Tender et *al.*, 2002). Il a été récemment observé que des communautés microbiennes naturelles pouvaient coloniser des électrodes coupons et produire une montée du potentiel d'électrodes dans des mangroves (Parot, 2007), l'eau potable (Dulon et *al.*, 2007), des cours d'eau (Garabetian, 2009) ou enfouies dans du compost (Parot, 2007 ; Dulon et *al.*, 2007). Deux secteurs sont amenés à utiliser l'électroactivité : la détection pour l'évaluation des

risques liés à la présence des biofilms et l'évaluation de la qualité des cours d'eau et les énergies renouvelables :

1. La détection des biofilms à l'aide de capteur tel que le capteur BIOX® a été proposée pour évaluer les risques de salissure en mer (navires, plateformes pétrolières,...), dans les réseaux d'adduction d'eau potable ou dans les systèmes aéro-réfrigérants au sein desquels le développement de biofilms est nuisible et/ou représente un risque de santé publique. Mais ces capteurs pourraient également être utilisés dans une démarche d'évaluation de la qualité des cours d'eau, car les biofilms possèdent des caractéristiques structurales et fonctionnelles qui en font un excellent candidat à la bioindication (Garabetian 2009).

2. L'application la plus connue de l'électroactivité des biofilms est la biopile microbienne ou *Microbial Fuel Cell* (MFC), elle est le moteur principal des recherches portant sur la capacité de ces agrégats à créer de l'énergie électrique. C'est pourquoi, une importante partie des études est centrée sur la recherche de souches toujours plus électroactives, avec un meilleur rendement (Gorby et al., 2006 ; Logan et Regan, 2006). La connaissance des mécanismes moléculaires impliqués dans l'électroactivité est nécessaire pour optimiser le transport d'électrons (Logan, 2009). A l'heure actuelle, la MFC la plus efficace, composée d'une anode et d'une cathode 14 fois plus large, aurait atteint une puissance électrique de $6,9 \text{ W m}^{-2}$ (Logan, 2009). Cependant, la qualité du support joue aussi un rôle dans la puissance maximale pouvant être atteinte. Un pré-traitement de l'anode ($700 \text{ }^\circ\text{C}$ + gaz d'ammoniac) pourrait augmenter l'adhésion des bactéries à la surface de l'électrode, augmentant ainsi le rendement de la MFC par augmentation du transfert d'électrons entre la bactérie et l'électrode (Logan, 2009).

4.3.2. Matériels et méthodes

4.3.2.1. Matériel biologique

Les isolats bactériens étudiés proviennent de biofilms épilithiques électroactifs de deux cours d'eau, la Vézère et la Garonne, appartenant à deux hydroécotones différentes. Les échantillons ont été prélevés sur trois sites : l'Aouach (Garonne), Condat et Saillant (Vézère) le 30 septembre 2008 et le 1^{er} octobre 2008.

Les bactéries hétérotrophes cultivables de ces biofilms ont été isolées par culture en aérobie à $20 \text{ }^\circ\text{C}$. Différents milieux de culture gélosés (Milieu nutritif ordinaire et Tryptone Soja (TS)) utilisés à concentration normale et dilués 10 fois ont permis de diversifier les conditions nutritives de culture afin de diversifier les microorganismes isolés.

Afin d'éliminer les redondances, un criblage par RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) a été réalisé sur les 710 isolats recueillis. Sur ce lot, 81 isolats ont été sélectionnés et séquencés (ARNr 16S). L'analyse phylogénétique des séquences (alignement, recherche du plus proche voisin dans la base de données RDP [*Ribosomal Database Project, release 10*])

<http://rdp.cme.msu.edu/>) a permis de rechercher des homologues avec des taxons existants. Une homologie supérieure à 97 % avec un taxon « connu » a été obtenue pour 75 isolats.

L'électroactivité de 32 isolats ainsi identifiés a été testée par voltammétrie cyclique : vingt et un isolats seraient électroactifs et 9 ne le seraient pas. Toutes ces opérations ont été effectuées antérieurement dans le cadre du programme SurF. Dans la présente étude, la présence de catalase, d'oxydase ainsi que le type respiratoire, fermentaire ou dénitrifiant ont systématiquement été recherchés pour ces isolats. Pour 15 de ces isolats suspectés d'appartenir à des espèces pathogènes pour l'Homme ou les animaux aquatiques, une identification par l'approche classique, morphologie et Gram, profil biochimique par galerie API, a été effectuée.

4.3.2.2. Milieux de culture et tests de caractérisation phénotypiques

Milieux

Tous les tests ont été réalisés sur des cultures fraîches (24 à 48h) en conditions aseptiques obtenues à partir de différents milieux (Tableau 1). Trente neuf isolats sur 75 ont été analysés.

Tableau 1. Types de milieu de culture utilisés

Milieux	TS (Tryptone Soy)		VF (Viande-Foie)	
	Bouillon	Gélose	Sans nitrate	Avec nitrate
Utilisations	Culture en masse	Isolement et repiquage	Métabolisme respiratoire aérobie ou fermentaire	Métabolisme respiratoire aérobie ou fermentaire et dénitrification
Caractéristiques	Riche- Non sélectif	Riche - Non sélectif	En tube pour avoir un gradient d'oxygène	En tube pour avoir un gradient d'oxygène
Référence	BioMérieux-51019	BioMérieux-51044	BioRad-64564	BioRad-64564 (VF) Sigma P-6162

Test oxydase

L'utilisation d'un kit oxydase (Bio-Rad - Disks 53832) permet en microbiologie diagnostique d'orienter l'identification d'un bacille à gram négatif avec un fort pouvoir de discrimination. Une réponse positive serait liée à la cytochrome-c oxydase du complexe IV de la chaîne respiratoire, enzyme absente chez certaines bactéries aéro-anaérobies ou anaérobies qui possèdent pourtant une chaîne respiratoire complète. Dans une utilisation un peu détournée de ce test, nous souhaitons tester le lien entre la présence de cette enzyme et l'électroactivité d'une souche.

Test catalase

La catalase est une enzyme catalysant la réaction suivante : $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$. La présence de bulles (dégagement d' O_2) lors du contact entre les bactéries et une solution d'eau oxygénée à 3%

(Gifrer) indique une réaction positive. Cette capacité permet aux bactéries de dégrader des espèces réactives de l'oxygène, nocives, qui se forment en milieu oxygéné. Elle implique aussi la possibilité d'oxyder des composés grâce au groupement Fe(IV)=O, composé hautement oxydant. Nous souhaitons tester le lien entre la présence de cette enzyme et l'électroactivité d'une souche.

Morphologie et Gram

La morphologie cellulaire et le Gram de chaque isolat ont été déterminés par microscopie optique ($\times 1250$, objectif Oil, Olympus-BH2-RFC) en utilisant un kit de réactif (BioMerieux-55542, 55545, 55546, 55548). Dans l'optique de constituer une base de données de ces isolats (souchier), nous avons pris des clichés grâce à une caméra (Olympus-ColorView-U-PMTVC) montée sur le microscope et un logiciel de prise de vue et traitement d'images (Analysis®).

Tests biochimiques

Vingt six isolats ont été caractérisés par cette approche. Deux types de galeries de tests biochimiques (API 20, BioMerieux) ont été utilisées : pour les entérobactéries (E) (9 isolats) et les non-entérobactéries (NE) (17 isolats). Après ensemencement suivant les recommandations du fabricant, les galeries ont été mises à incuber de 24h (pour les E) à 48h (pour les NE).

4.3.3. Résultats

Trente neuf isolats ont été caractérisés. Hormis la caractérisation morphologique et le Gram, deux types de tests ont été effectués : identification par galerie API (possible, au laboratoire, uniquement pour des bacilles gram négatif) ou tests d'activités enzymatiques (catalase, oxydase) impliquées dans des transformations rédox de l'O₂.

a. Identification phénotypique par galerie API

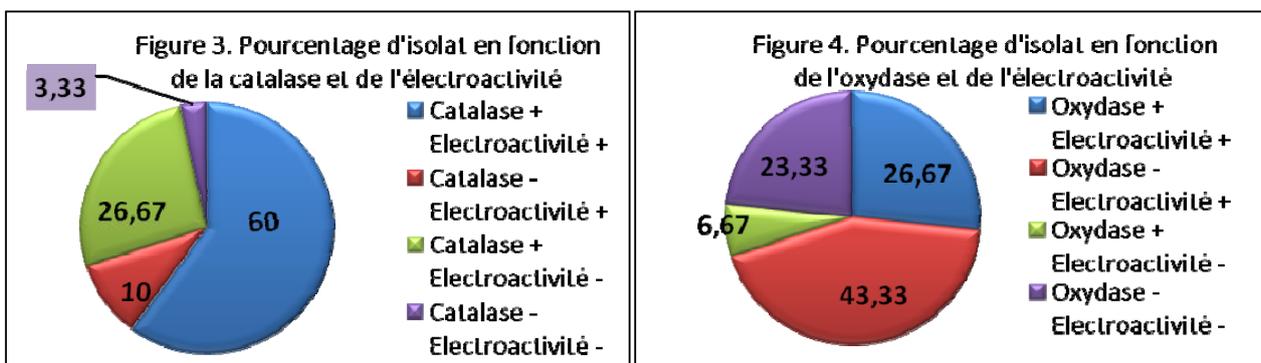
Pour vingt six isolats caractérisés comme des bacilles à Gram négatif, un test oxydase nous a permis d'orienter le choix d'une galerie d'identification pour Entérobactéries (oxydase -) ou Non Entérobactéries (oxydase +).

Les caractéristiques phénotypiques déterminées ont été regroupées et comparées avec les données recueillies dans le *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Tableau 3). Pour 5 isolats (*Aeromonas sobria*, *Morganella morganii*, *Pseudomonas fluorescens*, *Aeromonas hydrophila*, *Acinetobacter johnsonii*) nous confirmerions l'identification à l'espèce obtenue par séquençage de l'ADNr 16S, pour 2 (isolat n°1 et 13) l'identification au genre (*Citrobacter et Myroides*) et pour 2 isolats l'identification à la famille (isolat n° 2 et 41). Enfin pour 11 isolats aucune correspondance, n'a été trouvée.

Caractéristiques enzymatiques des isolats testés pour leur électroactivité

Pour 30 isolats dont l'électroactivité a été testée des tests oxydase et catalase ont été effectués pour relier ces activités enzymatiques et la réponse électroactive de ces isolats.

Sur 21 isolats électroactifs, 18 ont répondu positivement au test de la catalase, 3 négativement. Sur 9 isolats non-électroactifs un seul isolat s'est avéré catalase négatif et 8 catalase positifs (Figure 3). Le test de l'oxydase a montré que 13 isolats des 21 isolats électroactifs s'avéraient oxydase négative (Figure 4). Parmi les 9 isolats non électroactifs, 2 ont été notés oxydase positifs et 7 négatifs.



4.3.4. Discussion

4.3.4.1 Identification biochimique par galerie API

Les profils biochimiques API que nous avons obtenus au cours de ce travail correspondraient aux taxons identifiés par séquençage de l'ARNr 16S dans moins de la moitié des 26 cas testés. La notion d'espèce moléculaire procaryote est définie par un pourcentage d'homologie supérieur à 97 % entre la séquence d'ADNr 16S analysée et la séquence de référence (*Bergey's manual of Systematic Bacteriology*). Parmi les 81 isolats étudiés, 75 répondaient à ce critère ce qui suggérait une fiabilité relative de l'identification phylogénétique qui avait été conduite. Dans ce travail, l'analyse des profils API révélait de très bonnes homologies, jusqu'à 99,9%, avec les souches type des taxons concernés. On ne peut exclure que des erreurs aient entaché les résultats obtenus par l'une ou l'autre de ces approches. Néanmoins, certains auteurs suggèrent que le passage dans l'environnement de souches comme *Listeria monocytogenes* modifie leur caractéristiques phénotypiques au point que les profils biochimique diffèrent notablement de ceux des souches types (Paillard et al., 2003). La variabilité de la réponse phénotypique d'isolats environnementaux pourrait expliquer certaines divergences obtenues entre les deux méthodes d'identification.

4.3.4.2. Caractéristiques enzymatiques des isolats testés pour leur électroactivité

Divers milieux peuvent générer des biofilms électroactifs (Dulon et al. 2007) au sein desquels on peut isoler un éventail de souches dites électroactives *via* un bioessai testant la réponse en voltammétrie cyclique d'une électrode colonisée par un biofilm de la souche à tester (Parot, 2007). Dans la mesure où des biofilms de rivière s'avéraient électroactifs, on s'attendait à ce que des bactéries isolées de ces biofilms le soient. Effectivement 2/3 des isolats testés seraient électroactifs. Ils appartiennent à différents groupes bactériens Gram-positifs (24) ou Gram-négatifs (8). Les réponses que nous avons obtenues aux tests enzymatiques de l'oxydase et de la catalase reflètent une sélection de souches majoritairement aérobies (conditions d'isolement). Une hypothèse était que l'expression d'oxydases membranaires ou périplasmiques puissent expliquer cette électroactivité (Parot, 2007 ; Gralnik et Newman, 2007). Dans notre étude 13 des 21 isolats électroactifs exprimeraient la cytochrome-c oxydase. Or certaines souches négatives pour ce test peuvent néanmoins présenter des chaînes respiratoires complètes. De telles souches notées oxydase-négatives seraient susceptibles de catalyser la réduction de l'oxygène et donc être jugées électroactives par voltammétrie cyclique. La catalase est également une enzyme capable de catalyser une réaction d'échange d'électron entre l'oxygène et l'électrode support. Ainsi 10 des 13 isolats électroactifs et oxydase négative, seraient catalase-positifs. L'isolat n°5, *Aeromonas sharmans*, répondrait négativement aux deux tests, il serait pourtant très électroactif. Ceci prouverait que dans un lot d'isolats environnementaux, ces deux enzymes ne sont pas les seules causes possibles de l'électroactivité d'une souche (Figure 2). La libération d'une enzyme, la présence d'un transporteur d'électron particulièrement efficace ou même l'expression de pili conducteurs d'électron sont des caractéristiques qui permettent à une bactérie de catalyser le transfert d'électron vers l'électrode et qui n'ont pas été testées dans ce travail.

4.3.5. Conclusions et perspectives

La caractérisation phénotypique, les analyses enzymatiques réalisées en fin de processus, ne permettent pas encore de savoir quelles interactions cellule-support sont impliquées dans le pouvoir électroactifs de ces isolats. Cependant, nous avons vu que la présence de la catalase ou l'oxydase ne justifiait pas à elle seule l'électroactivité de toutes les souches provenant d'un biofilm électroactif. Il serait intéressant pour l'isolat 5, *Aeromonas sharmans*, qui semblerait être particulièrement électroactif d'utiliser d'autres techniques (SEM et STM, par exemple, Gorby et al., 2007) pour savoir s'il présente des nanowires.

E. Lyautey, A. De Almeida, L. Etcheverry, S. Morin, S. Boulêtreau, J.Y. Charcosset, M.L. Délia, F. M. Bergé, F. Delmas, A. Berge land F. Garabétian
Electroactivity of river biofilms and inhabiting cultivable bacteria.
In preparation for submission to Aquatic Microbial Ecology.

Electroactivity of river biofilms and inhabiting cultivable bacteria

Short title: Electrochemically active epilithic bacteria

Authors:

E. Lyautey¹, S. Boulêtreau¹, J.Y. Charcosset¹

F. Garabétian^{2*}

A. De Almeida³, M. Bergé³

S. Morin⁴, F. Delmas⁴

M.L. Délia⁵, L. Etcheverry⁵, A. Bergel⁵

Affiliations:

¹ Laboratoire d'Ecologie Fonctionnelle, UMR 5245 CNRS – UPS – INPT, Université Paul Sabatier, 118 route de Narbonne, F-31062 Toulouse, France

² Université Bordeaux, UMR5805, Bordeaux, F-3300, France

³ Laboratoire de Bactériologie, Virologie, UFR Sciences Pharmaceutiques, Université Paul Sabatier, 35 chemin des Maraîchers, F-31062 Toulouse, France

⁴ Groupement CEMAGREF Bordeaux, UR REQUE, Gazinet, F-33612 Cestas, France

⁵ Laboratoire de Génie Chimique CNRS – INPT, 5 rue Paulin Talabot, BP 1301, F-31106 Toulouse, France

* Corresponding author: E-mail: f.garabetian@epoc.u-bordeaux1.fr

Introduction

Biofilm assembled microorganisms are characterized by a variety of properties out of which electroactivity, the ability to catalyze electron transfers between cells and their solid substrata (reference). This property was first demonstrated for marine or soil bacteria (arguments A. Bergel, reference), where some ferri-reducing bacteria such as *Geobacter sulfurreducens* or *Shewanella oneidensis* are capable of directly interacting with their solid substrata through periplasmic cytochromes or membrane proteins (reference). But to date, only one study revealed similar properties for continental hydrosystem bacteria (reference). It was also recently considered that electroactivity could be related with the occurrence of bacterial geopili called nanowires (reference). Aside from its academic importance, biofilm bacterial cell electroactivity has many implications for industrial and environmental domains (i.e. biocorrosion, microbial fuel cells, biofilm detection; references).

In river hydrosystems, typical microorganism assemblages are epilithic biofilms colonizing the interface between river bed substrates and water column (Biggs 1995). In streams and rivers, sessile biomass development is dependent of hydrodynamics, light and geomorphology (Wetzel 1983). River epilithic biofilms are complex microbial communities composed of algae, bacteria and other micro-organisms (Lock 1993), with algae accounting for more than 30% of total biomass (Peterson 1996). At the section scale, epilithic biofilm is a key compartment involved in river functioning with implications in primary production (Dodds 2006), trophic web (Schmid-Araya and Schmid 2000), nutrient transient storage (Battin et al. 2003), element recycling processes (Romani et al. 2004, Teissier et al. 2007), auto-epuration (Sabater et al. 2002, Teissier et al. 2007), and pollutants biodegradation (Lawrence et al. 2001, Sabater et al. 2007).

Epilithic microbial community structure is temporally dynamic, following succession processes, both for algal (Biggs et al. 1998, Stevenson et al. 1991, Wellnitz & Brader 2003) and bacterial communities (Jackson et al 2001, Jackson 2003, Lyautey et al. 2005). At the spatial scale, a study comparing epilithic diatom community structure from 836 sites distributed throughout French hydrosystems demonstrated that community structure exhibited regional trends, allowing the definition of several hydro-ecoregions (Tison et al. 2005). The specific objectives of the study were to: (i) assess *in situ* electroactivity of epilithic biofilm assemblages during colonization experiments, (ii) characterize the diatomic and bacterial community structure of river epilithic assemblages grown on various metallic substrata and assess the relationship between community structure and *in situ* electrochemical potentials,

and (iii) screen epilithic bacterial isolates from different hydro-ecoregions to determine their individual electrochemical activity.

Material and Methods

Study sites. Epilithic biofilms were analyzed and collected at two study sites, located in the Garonne watershed (Southwestern France) on the Vézère River (Dordogne, France) and the Garonne River (Haute-Garonne, France) proper. For the Vézère River, study site is located at Saillant (site S), 20 km upstream of Brive-la-Gaillarde. At this site, the river is 20 m wide, and the water depth on the pebble reach is around 50 cm. For the Garonne River, study site is located at l'Aouach (site U1 as described in [Lyautey et al. 2003](#)), 30 km upstream of Toulouse agglomeration. At this site, the river is 60 m wide, and the water depth is about 1 m on the pebble reach.

Community level monitoring of electrochemical epilithic biofilm. *In situ* monitoring of epilithic biofilms was carried out at site U1 in years 2006 and 2007. Metallic slides ($25 \times 100 \times 1$ mm) corresponding both to the colonization supports and to the working electrodes were maintained in a vertical position, parallel to the flow on the river bottom (0.5 m depth) using a stainless steel rack. The potentials of the working electrodes were monitored with reference to an iron reference electrode using a multichannel datalogger (Modèle, Marque, Pays). For the 2006 experiment, working electrodes were made of stainless steel ($n = 4$) and copper ($n = 2$) and were immersed in the river for 35 days. For the 2007 experiment, working electrodes were made of stainless steel ($n = 4$) and copper ($n = 2$) and were immersed for 18 days. For both experiment, the equipped rack was located next of the river bank to limit the length of the wires connecting electrodes and datalogger.

Biofilm collection and biomass measurements. Epilithic biofilms grown both on natural (pebbles) and artificial (metallic slides described above) were collected. Natural epilithic biofilms were sampled on September 30, 2008 at site U1, and on October 1, 2008 at site S. Nine colonized pebbles were collected at each site, and were kept in sterile bags at 4°C during transport to the laboratory. Artificial epilithic biofilms were collected in November 2006 and November 2007, and transported to the laboratory within coolers. Biofilm conditioning was initiated within 6 h of sampling. Epilithic biofilms were aseptically removed from their substrata using a toothbrush (treated with 1N NaOH) and suspended in 0.2 μm filter-sterilized water. For pebbles, the colonized (scoured) surface was covered with a layer of aluminium foil of known mass per surface unit and the area was calculated from the mass

of foil. A portion of the biofilm suspension was homogenized using a tissue homogenizer (Ultra-Turrax T25, Janke & Kunkel, Staufen, Germany) and a vortex. Dry mass (DM) and ash free dry mass (AFDM) were determined as follows: a known-volume aliquot of homogenized biofilm suspension was centrifuged ($2,300 \times g$, 20 min, RT) and the pellet was dried at 105°C before weighing for DM quantification. The dry pellet was then ashed at 550°C for 6 h and weighed to determine the organic matter content (AFDM).

Bacterial community composition analysis. Bacterial community composition analysis was carried out on epilithic biofilms grown on natural and artificial substrata. DNA extraction was carried out on aliquots (50 mg DM for biofilms grown on pebbles and from 0.1 to 15.6 mg DM for biofilms grown on metallic slides) of the biofilm suspension using Mobio UltraClean Soil DNA Isolation kits according to the manufacturer's protocol. Bacterial community composition was studied using a 16S-based PCR-DGGE approach (as described in [Lyautey et al. 2005](#)) for biofilms grown on metallic electrodes in year 2006. For biofilms grown on metallic electrodes in 2007 and for natural biofilms collected in 2008, bacterial community composition was assessed using Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (ARISA), as follows; PCR amplification of the 16Sr DNA - 23S rDNA intergenic spacer was carried out using 5'FAM labelled S-D-Bact-1522-B-S-20 forward primer and L-D-Bact-132-a-A-18 reverse primer ([Normand et al. 1996](#)). The final reaction mix (25 μl) consisted of $1 \times$ PCR buffer (Promega, Charbonnières, France), 1.5 mM MgCl_2 , 0.3 mg mL^{-1} bovine serum albumine, 5% DMSO, 200 μM of each deoxynucleoside triphosphate (Eurogentec, Seraing, Belgium), 0.5 μM each of forward and reverse primers (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), 0.25U of *Taq* polymerase (Promega) and 50 ng of DNA extract. Amplification was performed with Mastercycler thermocycler instrument (Eppendorf, Le Pecq, France) as follows: after an initial denaturation at 94°C for 5 min, 35 cycles of denaturation (94°C , 1 min), annealing (55°C , 1 min) and extension (72°C , 1 min) were performed, followed by a final extension (72°C , 10 min). Amplification products were quantified on 1.65% gel agarose using Mass Ruler Express DNA Ladder, LR forward (Fermentas, Saint Rémy les Chevreuses, France) and diluted to a final concentration of 10 ng μl^{-1} . Finally, 2 μl of diluted product was mixed with 0.5 μl GeneScan 1200 LIZ internal size standard (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France), and 9 μl Hi-Di formamide (Applied Biosystems), and the mixture was denatured at 95°C for 3 min. Fragments were discriminated using an ABI 3100 automated sequencer (Plateau de génomique, IFR 150, Toulouse, France) and resulting electropherograms analysed using the Applied Biosystems Peak Scanner software. Peaks contributing $< 0.1\%$ of the total amplified DNA (as determined by relative fluorescence

intensity) were eliminated from profiles as being indistinguishable from baseline noise (Hewson and Fuhrman 2004). Peaks were scored as present or absent from ARISA analysis. Similarity between profiles was computed from the Jaccard similarity index ($J = c / (a + b - c)$) where a, the number of bands found only in sample A, b, the number of bands found only in sample B and c, the number of bands shared between samples A and B).

Algal community composition analysis. Algal community composition was studied on epilithic biofilms collected from metallic substrata in 2006 and 2007.

Isolation of bacterial strains from epilithic biofilms. Bacterial strains were isolated from epilithic biofilms grown on natural substrata and collected in 2008 at sites U1 and S. The cultivable portion of epilithic bacteria was assessed either using direct plating or following enrichment. For the direct plating approach, 100- μ L portions of serial dilutions of the biofilm suspensions were inoculated on full strength Tryptone Soy Agar (TSA; Sigma-Aldrich, Lyon, France), 10 times diluted TSA, full strength Nutrient Agar (NA; Sigma-Aldrich) and 10 times diluted NA. Plates were incubated aerobically for 5 days at 20°C. Colonies were picked up and subsequently streaked on the corresponding agar medium (3 times) in order to obtain well isolated colonies. For the enrichment approach, 5-mL portions of the biofilm suspensions were inoculated into 45 mL of full strength Tryptone Soy Broth (TSB; Sigma-Aldrich), 10 times diluted TSB, full strength Nutrient Broth (NB; Sigma-Aldrich) and 10 times diluted NB, and incubated aerobically for 10 days at 20°C under agitation (50 rpm). One hundred- μ L portions of enrichments were subsequently plated onto the corresponding agar media and incubated aerobically for 5 days at 20°C. Colonies were then isolated using the same protocol as described above. Isolated colonies were inoculated into sterile 96-well microtiter plates containing 100 μ l well⁻¹ of the broth corresponding to the media used for isolation, and incubated 24 to 48 h at 20°C. Sterile glycerol was then added to each well at a final concentration of 20% (vol/vol), and the plates were stored at -80°C.

PCR-RFLP typing and 16S rDNA sequencing of bacterial strains from epilithic biofilms. The epilithic bacterial collection (n = 246 strains for site U1, and n = 225 strains for site S) was characterized by *Hae*III restriction fragment length polymorphism (RFLP) carried out on the 16S rDNA fragment. Briefly, cell suspension of the isolates were prepared by inoculating 100 μ L of fresh broth (according to the one used for isolation) per well in a sterile 96-well microtiter plate with frozen stock culture. Cells were grown statically at 20°C for 24h and centrifuged at 2500 \times g for 25 min (Heraeus Multifuge, Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France). The cells were resuspended in 100 μ L sterile 100 mM Tris-HCl, and lysed using a heat-shock procedure where they were incubated for 10 min at 98°C, and

subsequently incubated at 4°C for 3 min. The cell lysates were centrifuged at 4100 × g for 10 min, and the supernatants were used as template for the PCR amplification of the 16S rDNA gene. The final reaction mix (25 µl) consisted of 1× PCR buffer (Promega), 1.5 mM MgCl₂, 0.3 mg mL⁻¹ bovine serum albumine, 200 µM of each deoxynucleoside triphosphate (Eurogentec), 0.5 µM each of forward and reverse primers 27F and 1492R (Invitrogen; Lane 1991), 1.25U of *Taq* polymerase (Promega) and 5 µl of lysate supernatant as template. Amplification was performed with Mastercycler thermocycler instrument (Eppendorf) as follows: after an initial denaturation at 95°C for 4 min, 35 cycles of denaturation (94°C, 1 min), annealing (55°C, 1 min) and extension (72°C, 2 min) were performed, followed by a final extension (72°C, 15 min). For each bacterial strain, 1 µg of amplified DNA was digested using 5U of *Hae*III enzyme (Promega) for 4h at 37°C. PCR-RFLP fragments were separated by electrophoresis (2h30, 100V) on a 3% agarose gel (Sigma-Aldrich). Gels were stained with ethidium bromide and images were captured as 16-bit TIFF images, using CCD camera and Biocapt Software (Vilbert Lourmat, Marne-la-Vallée, France). Normalization of gel images and assignment of PCR-RFLP fingerprints to isolates were done with the BioNumerics software package (version 5; Applied Maths, Kortrijk, Belgium). The assignment of strains to different clusters was performed by calculating the similarity coefficients with the curve-based Pearson similarity coefficient. Similarity trees were generated using the unweighted-pair group method using average linkage. PCR-RFLP clusters were initially assigned using the software and the final assignments were determined on the basis of careful visual inspection.

Sequencing of the amplified 16S rDNA products was carried out by Macrogen (Korea) using primers 27F and 1492 R. About 900 bases were read per run, and sequences were assembled using Chromas Pro Software (Technelysium Pty Ltd, Tewantin, Australia). Sequence analysis and phylogenetic trees construction were done using the Ribosomal Database Project release 10, update 12 (Cole et al. 2009). Sequences were aligned using the RDP aligner and the phylogenetic tree was constructed using the Tree Builder tool. The phylogenetic tree was imported into the online UniFrac interface (Lozupone & Knight 2005, Lozupone et al. 2006) to specifically test for differences among the two sites diversity based on phylogenetic relationships. A total number of 45 partial 16S rDNA sequences have been deposited in the GenBank sequence database under accession numbers GQ398331 to GC398375.

Cyclic voltammetry. A subset of 32 strains chosen from the 45 that were sequenced was chosen to be tested in cyclic voltammetry to assess their capacity to reduce oxygen.

Epilithic bacterial isolates were cultivated in liquid TSB medium at 20°C. Cultures of 60 mL in 100 mL flasks were stirred continuously with a Teflon-coated magnetic stir bar (150 rpm). After 24 h of growth, the cells were harvested by centrifugation (3400 g, 10min, 4°C, Heraeus Multifuge). The cells were centrifuged two times, the supernatant being taken off each time and the pellet resuspended in 2 mL potassium phosphate (K_2HPO_4/KH_2PO_4) 0.1M buffered at pH 7.0. The final solution formed the working bacterial cell suspension. The cell concentration in the final working suspension was measured from the optical density (OD) at 600 nm with a UV-visible spectrophotometer (Uvi Light XT5, Secomam, Alès, France). Cyclic voltammograms were performed at 100 mV/s at ambient temperature with a multipotentiostat (VMP2 Bio-Logic SA, France). A three-electrode system was used in a 100 mL becher with a saturated calomel electrode (SCE) as reference and a platinum wire (0.5 mm diameter) as counter electrode. A glassy carbon (GC) rods (V25, 3 × 150 mm, Carbone Lorraine, France) was used as working electrodes, and was inserted in insulating resin to obtain disk electrodes of 3 mm diameter. The electrodes were polished with abrasive discs (LAM-PLAN, France) before each electrochemical experiment. The potential scan started from the open circuit potential and progressed towards the upper limit, in the range - 1.00 to 0.70 V/SCE. The standard CV procedure was composed of 4 steps set in the electrochemical cell without moving the electrodes: (i) CV1 was performed in 30 mL sodium phosphate buffer (NaH_2PO_4) 0.1 M at pH 7.5, (ii) CV2 was performed directly after addition of the adequate volume of bacterial cell suspension in the buffer solution to obtain a working OD of 0.8, (iii) the electrode was kept in the bacterial cell suspension, stirred with a Teflon coated magnetic stirrer, for 1 to 3 hrs before (iv) CV3 was recorded. In order to compare the effectiveness of the catalysis of oxygen reduction among the different experiments, the potential shift was measured at a constant value of the current, arbitrarily chosen at -6 μA , for all voltammograms.

Phenotypic characterization of bacterial strains used for cyclic voltammetry. The 32 bacterial strains tested in cyclic voltammetry were phenotypically characterized (Gram staining, catalase and oxidase).

Results

Biomass, diatoms and bacterial community structure of epilithic biofilms grown on metallic electrodes. Epilithic biomass of biofilm grown on stainless steel and copper coupons in 2006 and 2007 was characterized using DM and chl. *a* content (Fig. 1). In 2006, epilithic biomass recorded on stainless steel and copper electrodes were not significantly different when expressed as DM (average \pm SD) (1.25 ± 0.48 and 1.29 ± 0.52 mg cm⁻² for stainless steel and copper electrodes, respectively; Mann-Whitney test, $P = 0.93$), but were significantly different when expressed as Chl. *a* (1.31 ± 0.20 and 0.27 ± 0.36 μ g cm⁻² for stainless steel and copper electrodes, respectively; Mann-Whitney test, $P < 0.01$). A trend was also observed between metallic substrata in 2007, with no significant difference observed for DM (1.15 ± 0.56 and 0.22 ± 0.21 mg cm⁻² for stainless steel and copper electrodes, respectively; Mann-Whitney test, $P = 0.09$), and a marginally significant difference observed for Chl. *a* (4.29 ± 1.67 and 0.45 ± 0.04 μ g cm⁻² for stainless steel and copper electrodes, respectively; Mann-Whitney test, $P = 0.054$).

Diatom community composition analysis was carried out on biofilms grown on the two different metallic substrata in 2006 and 2007. Richness (S) ranged between 60 and 71 species in 2006 (65 species on average both on stainless steel and copper electrodes) and between 38 and 45 species in 2007 (41 species on average both on stainless steel and copper electrodes). Two-dimension MDS representation of community composition allowed discriminating diatom communities based on the year of sampling rather than on the metallic substrata used (Fig. 2a). Average similarities for communities within a same year were of 52% and 57% for 2006 and 2007, respectively. Between years, similarities were only of 38%. Average similarities for communities from the same metallic substrata were of 47% and 43% for stainless steel and copper, respectively, whereas between metallic substrata, similarities were of 44%..

Bacterial community composition analysis was carried out on biofilms grown on the two different metallic substrata in 2006 using DGGE and in 2007 using ARISA. In 2006, richness (S) ranged between 26 and 36 OTU's (29 and 31 OTU's on stainless steel and copper electrodes, respectively). Two-dimension MDS representation of bacterial community composition in 2006 allowed discriminating bacterial communities based on the metallic substrata used (data not shown). Average similarities for communities from the same metallic substrata were of 60% and 43% for stainless steel and copper, respectively, whereas between metallic substrata, similarities were only of 39%. In 2007, richness (S) ranged between 57 and

99 OTU's (81 and 74 OTU's on stainless steel and copper electrodes, respectively). Two-dimension MDS representation of bacterial community composition in 2006 allowed discriminating bacterial communities based on the metallic substrata used (Fig. 2b). Average similarities for communities from the same metallic substrata were of 32% and 58% for stainless steel and copper, respectively, whereas between metallic substrata, similarities were only of 35%.

Electrochemical epilithic biofilm monitoring. *In situ* monitoring of epilithic biofilm electrochemical potential was carried out at site U1 during a 35-day colonization experiment in 2006 and a 18-day colonization experiment in 2007. For both experiments, significant increases of the potential were observed during the first 10 days of colonization (Fig. 3). After 10 days of development, the signals monitored for epilithic biofilm grown either on copper or stainless steel electrodes remained substantially constant, irrespective of the year. In 2006, after 10 days of development, different electrochemical potentials were registered on copper and stainless steel coupons, with copper-grown biofilms exhibiting lower potentials (around -70 mV) than stainless steel-grown biofilms (around +120 mV). In 2007, after 10 days of development, electrochemical potentials reached a plateau both on stainless steel and copper electrodes, but unlike year 2006, no difference was observed between stainless steel-grown (ranging between +30 and +100 mV depending on the replicate) and copper-grown biofilms (around +60 mV) potentials.

Molecular-based and culture-based epilithic bacterial diversity. Molecular-based bacterial diversity was assessed for sites U1 and S communities using ARISA. A total of 147 different peaks were detected for both samples ranging from 200 to 671 bp (Fig. 4). Site U1 community exhibited 97 peaks from 200 to 653 bp, and site S community exhibited 97 peaks ranging from 200 to 671 bp. The similarity between the 2 communities, as calculated using Jaccard similarity index was of 25.2%.

Direct-plating and enrichment culture-based approaches allowed isolating a total of 246 and 225 bacterial strains for l'Aouach and Saillant epilithic communities, respectively. Based on *Hae*III PCR-RFLP analyses, these strains were further discriminated into 16 and 35 ribotypes for l'Aouach and Saillant epilithic communities, respectively. The nearly full 16S rDNA gene (~ 1400 bases) of representative bacterial strains from these 51 ribotypes was sequenced. Phylogenetic analyses were performed on the 45 good quality sequences (15 for l'Aouach and 30 for Saillant). Eleven and 6 sequences were related to the gram-positive *Actinobacteria* and *Firmicutes*, respectively. Four sequences were related to *Bacteroidetes*, and 6, 4 and 14 sequences were related to α -, β -, and γ -*Proteobacteria* (Fig. 5). The pairwise

UniFrac significance test probability for the site U1 and site D communities was 0.73 indicating that there was only a suggestive ($P < 0.1$) difference between the two sites bacterial communities.

Electrochemical activity study of epilithic bacterial strains. A total of 32 strains (chosen to represent a maximal phylogenetic diversity out of the 45 strains for which a sequence has been obtained) was selected to study their capacity to catalyze the oxygen reduction using cyclic voltammetry (see voltammograms examples, Fig. 6). The values obtained for the shift of potential, peak amplitude and peak potential are indicated for all bacterial isolates in Table 1, along with their gram, catalase and oxidase properties. Seven isolates yielded to negative results indicating that they were not able to catalyze oxygen reductions. The 25 remaining isolates were able to reduce oxygen reduction with varying catalytic effect. For these isolates, bacterial cells catalyzed the oxygen reduction with a shift of potential ranging from 0.06 to 0.23 V at $-6 \mu\text{A}$ ($N = 25$). Four isolates had however only small catalytic effects, inducing potential shifts, but no clear peak was observed for them. The cathodic peaks had peak potentials ranging from -0.36 to -0.76 V/SCE and amplitudes ranging from -9.5 to $-19.4 \mu\text{A}$ ($N = 21$). No difference was observed for shift of potential, peak potential and peak amplitude value distributions between gram-negative and gram-positive bacterial isolates (Mann-Whitney test, $P > 0.05$ in all cases), between catalase-negative and catalase-positive bacterial isolates (Mann-Whitney test, $P > 0.05$ in all cases), or between oxidase-negative and oxidase-positive bacterial isolates (Mann-Whitney test, $P > 0.05$ in all cases).

Discussion

- Electroactivity of bacterial communities or populations was demonstrated for marine or soil environments, but so far, to our knowledge, no studies demonstrated it for continental aquatic assemblages. Bacterial strain electroactivity involves at the cellular scale
- Comparing copper to inox indicates that diatomic communities should not be involve in the observed response (similar communities but different potential).
- Vezere communities shelter electroactive strain as well
- Aouach, well known study site where the biofilm dynamics (colonisation rate, bacterial and diatom community diversity, etc.) has previously been documented (Lyautey et al 2005 ; Bouletreau et al. 2007 ; Leflaive et al 2009, Lyautey et al. 2010)

- 2 year monitoring of potential in situ ; 2 sites sampled for electroactive bacteria that correspond to communities from differentiated french hydroecoregion.

Notion de respiration extracellulaire. Prend une dimension particulière lorsque la bactérie est en biofilm. Les bactéries qui ont une respiration extracellulaire qui mobilise des interactions redox susceptibles de générer des courants électriques lorsqu'elles sont au contact de supports adaptés. Historique, *Geobacter* et *Shewanella* sur les aspects de biocorrosion (« respirent le metal solide »).

La catalyse de la réduction de l'oxygène directement dans le milieu entraîne la libération d'électrons donc génère un courant électrique. Les applications de ces propriétés étant la détection de biofilms et les « microbial fuel cell »

Reprendre les données / arguments de Dulong et de Parrot.

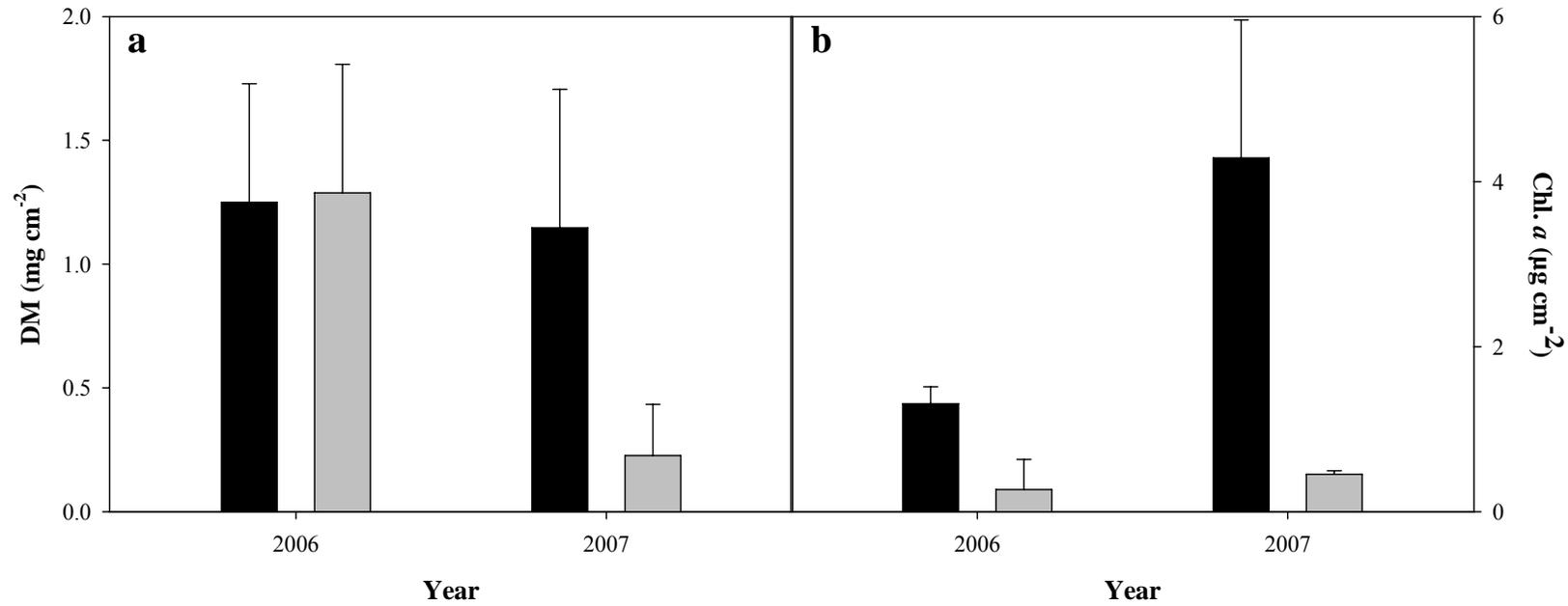
Nous avons étudié deux niveaux différents, la communauté et la population, et aux deux niveaux nous observons une possibilité d'action électrochimique. Ceci confirme des travaux précédents sur d'autres types de biofilms : ces assemblages sont des communautés électroactives à partir desquelles il est possible d'isoler des souches qui présentent ces propriétés.

Sur le plan de la communauté, au cours de deux années successives, sur le site amont Garonne, nous avons pu montrer que le consortium est électroactif. Des résultats similaires ont été obtenus sur un site aval de la Garonne (data not shown). Discuter de la généralisation de ce type de mesures.

Au niveau de la structure des communautés, les communautés bactériennes épilithiques des deux sites sont différentes sur le plan molecular-based, car ce sont deux hydroécorigions différentes, et ceci confirme les résultats qui ont pu être obtenus sur les communautés diatomiques. Sur le plan culture-based la différence n'est pas significative, sûrement car ce sont des cultivables et que les conditions de culture que nous avons utilisées ne sont pas trop contraignantes et que donc on ressort pour les deux sites les grands groupes phylogénétiques. Cependant la collection de souches est assez diversifiée.

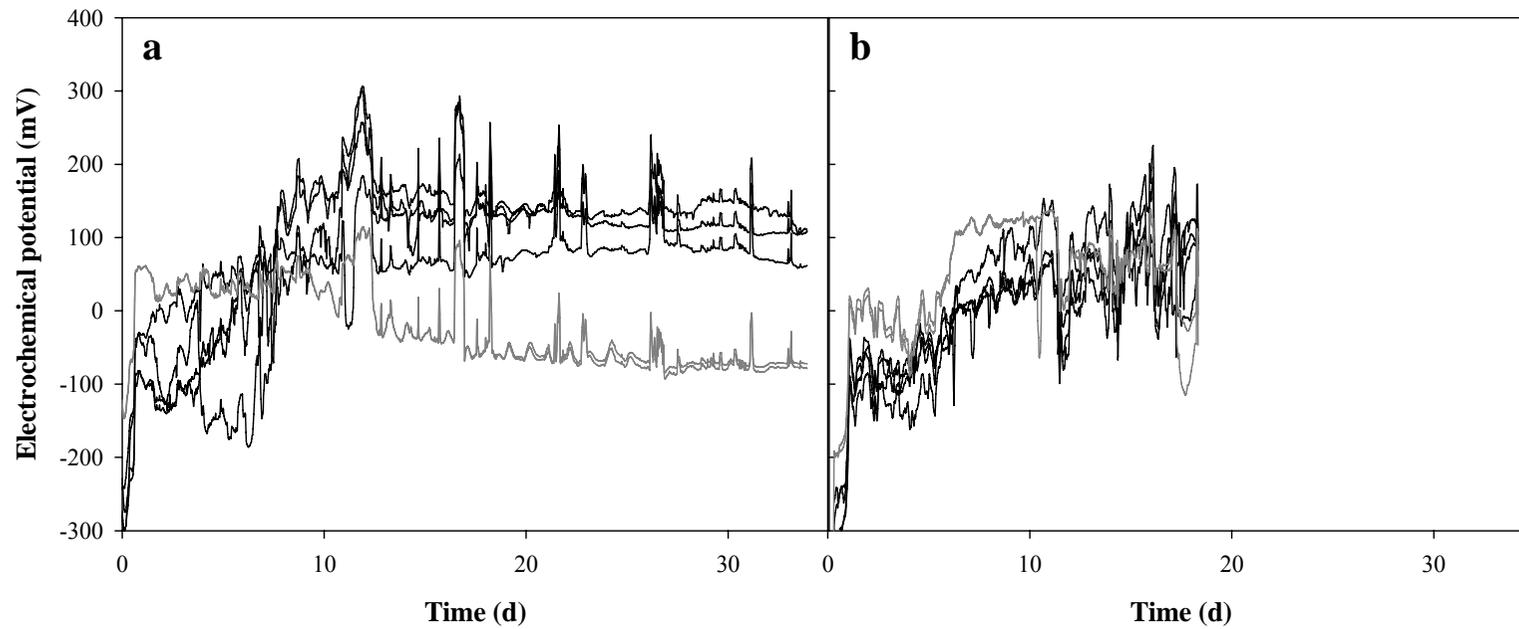
Au niveau des souches électroactives, discuter des mécanismes, dire que trouvé un peu partout. Préciser que des études ont montré le potentiel électroactif de cyanobactéries dans ce type d'assemblages. Discuter des potentiels électroactifs de nos souches comparées à d'autres souches dans d'autres environnements.

1 **Figure 1.** Representation of epilithic a) dry mass (DM) and b) chlorophyll *a* (Chl. *a*) for biofilms grown on stainless steel (black bars) and copper
2 (grey bar) electrodes during 35 and 18 days in 2006 and 2007, respectively.



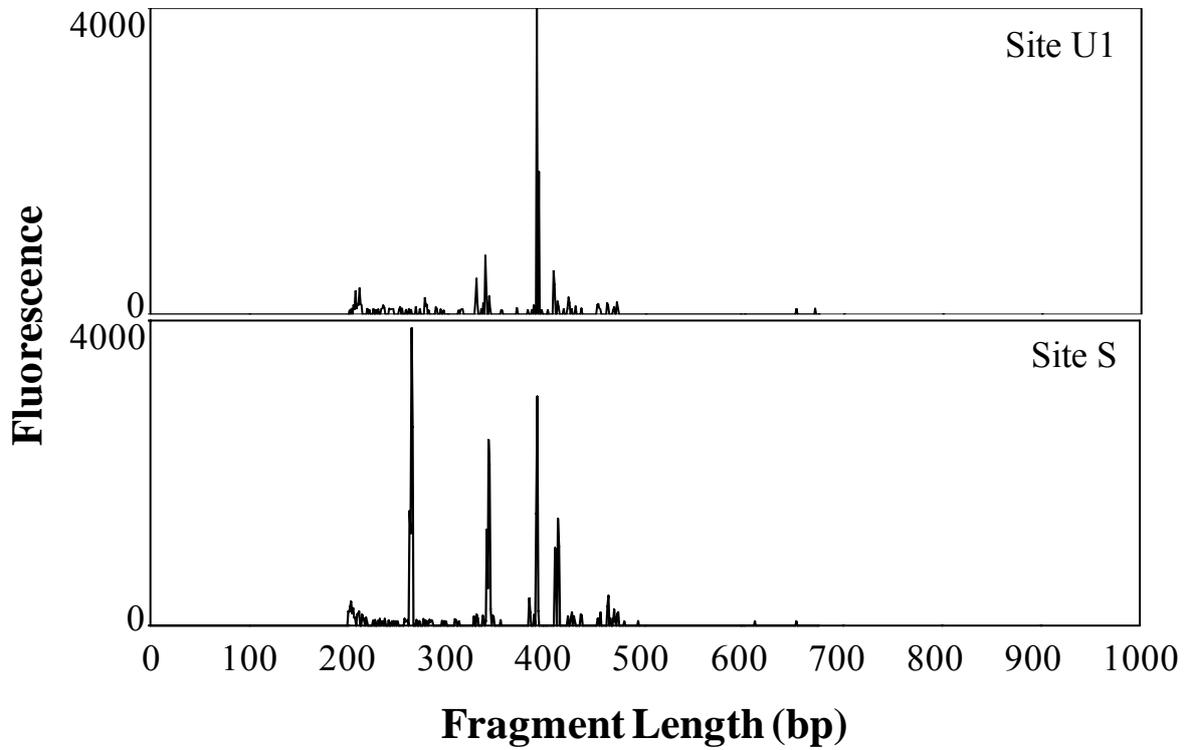
3

4 **Figure 3.** Signal trends of the electrochemical probes monitored during two *in situ* colonization experiments at site U1 during a) 35 days in 2006
5 on 4 stainless steel replicate electrodes (black lines) and 2 replicate copper electrodes (grey lines), and b) 18 days in 2007 on 4 stainless steel
6 replicate electrodes (black lines) and 2 replicate copper electrodes (grey lines).



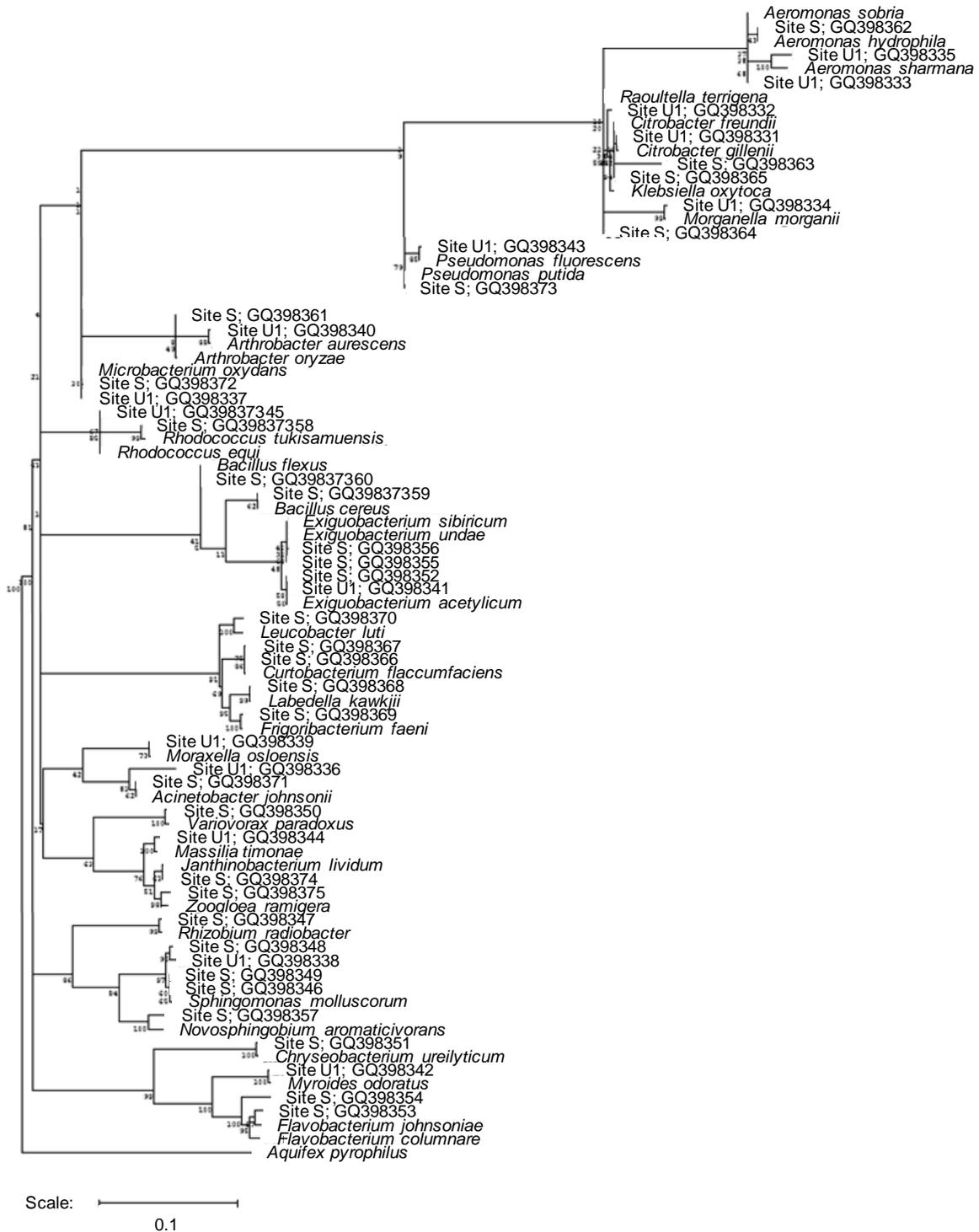
7

8 **Figure 4.** Comparison of bacterial ARISA profiles from epilithic biofilm sampled from sites
9 S and U1. Data are peak height (fluorescence; Y axes) and fragment length (nucleotide base
10 pairs; X axes), with profiles of both samples overlaid onto the same axis.

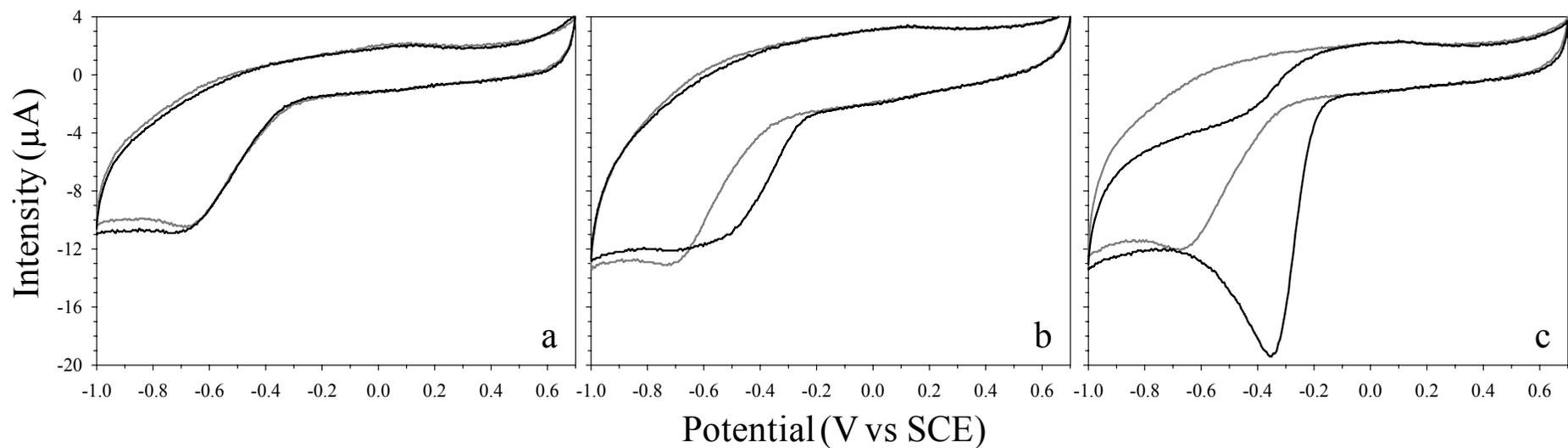


11

12 **Figure 5.** Phylogenetic tree for the 45 16S rDNA sequences obtained from bacteria isolated
 13 from sites U1 and S. The tree was obtained using neighbor-joining with *Aquifex pyrophilus* as
 14 the outgroup.



16 **Figure 6.** Cyclic voltammograms obtained for a) a negative bacterial isolate (Site U1; GQ398344), b) a moderately positive bacterial isolate (Site
17 S; GQ398350), and c) a positive bacterial isolate (Site U1; GQ398335). Grey curves correspond to voltammograms obtained before cells
18 injections, and black curves to voltammograms obtained after 3 h (a) and 1 h (b and c) of contact between the electrode and the bacterial
19 suspension. Glassy carbon electrode, scan rate 100 mV/s.



20

Table 1. Accession number, site of origin, nearest relative identified based on 16S rRNA genes sequence analysis (with % of similarity), and results of Gram staining, catalase and oxidase tests, for the 32 bacterial strains tested in cyclic voltammetry. Shift of potential, peak amplitude and peak potential were obtained from the cyclic voltammetry experiments, using a 1-h contact time or a 3-h contact time (*).

Accession number	Site	Nearest relative (% similarity)	Gram	Catalase	Oxidase	Shift of potential (V)	Peak amplitude (μA)	Peak potential (V/SCE)
GQ398331	U1	<i>Citrobacter gillenii</i> (99.8)	-	+	-	0.15	-12.9	-0.48
GQ398332	U1	<i>Klebsiella oxytoca</i> (99.0)	-	+	-	0.22	-10.6	-0.49
GQ398333	U1	<i>Aeromonas sobria</i> (100)	-	-	+	0.12	-9.5	-0.49
GQ398334	U1	<i>Morganella morganii</i> (99.6)	-	+	-	0.18	-12.4	-0.54
GQ398335	U1	<i>Aeromonas sharmana</i> (97.4)	-	-	-	0.23	-19.4	-0.36
GQ398336	U1	<i>Acinetobacter johnsonii</i> (96.2)	-	+	-	0.09*	-11.6*	-0.61*
GQ398337	U1	<i>Microbacterium oxydans</i> (100)	-	+	+	0.06*	‡	‡
GQ398338	U1	<i>Sphingomonas molluscorum</i> (98.6)	+/-	+	-	0.12	-10.4	-0.50
GQ398339	U1	<i>Moraxella osloensis</i> (99.9)	-	-	+	0.13*	‡	‡
GQ398340	U1	<i>Arthrobacter aurescens</i> (99.8)	-	+	-	0.11	-13.3	-0.46
GQ398341	U1	<i>Exiguobacterium acetylicum</i> (99.9)	-	+	-	0.16	-13.3	-0.49
GQ398342	U1	<i>Myroides odoratus</i> (99.5)	-	+	-	negative*	negative*	negative*
GQ398343	U1	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (99.8)	-	+	+	0.14	-14.6	-0.47
GQ398344	U1	<i>Massilia timonae</i> (99.5)	-	-	+	negative*	negative*	negative*
GQ398345	U1	<i>Rhodococcus equi</i> (100)	+	-	+	0.09*	-11.3*	-0.64*

GQ398347	S	<i>Rhizobium radiobacter</i> (99.6)	-	+	-	0.10*	‡	‡
GQ398350	S	<i>Variovorax paradoxus</i> (99.6)	-	+	+	0.14	-11.3	-0.54
GQ398351	S	<i>Chryseobacterium ureilyticum</i> (99.5)	+	+	-	0.13	-11.3	-0.51
GQ398353	S	<i>Flavobacterium johnsoniae</i> (99.0)	-	+	+	0.06*	-12.5*	-0.76*
GQ398355	S	<i>Exiguobacterium sibiricum</i> (99.9)	-	+	+	0.14	-10.5	-0.50
GQ398356	S	<i>Exiguobacterium undae</i> (99.7)	-	+	+	0.13	-12.6	-0.42
GQ398357	S	<i>Novosphingobium aromaticivorans</i> (97.7)	-	+	+	negative*	negative*	negative*
GQ398359	S	<i>Bacillus cereus</i> (99.9)	+	+	-	negative*	negative*	negative*
GQ398360	S	<i>Bacillus flexus</i> (100)	-	+	-	0.11	‡	‡
GQ398364	S	<i>Raoultella terrigena</i> (100)	-	+	-	0.12	-10.8	-0.54
GQ398367	S	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> (99.8)	+	+	-	negative*	negative*	negative*
GQ398368	S	<i>Labedella kawkjii</i> (99.8)	+	+	-	negative*	negative*	negative*
GQ398369	S	<i>Frigoribacterium faeni</i> (99.5)	+	+	-	0.20*	-14.5*	-0.48*
GQ398370	S	<i>Leucobacter luti</i> (98.7)	-	+	-	negative*	negative*	negative*
GQ398373	S	<i>Pseudomonas putida</i> (100)	+	+	+	0.22	-14.5	-0.45
GQ398374	S	<i>Janthinobacterium lividum</i> (99.9)	-	+	+	0.18	-11.9	-0.52
GQ398375	S	<i>Zoogloea ramigera</i> (98.7)	-	+	+	0.13*	-11.0*	-0.52*

‡ Small catalytic effect observed but no clear peak.

3.7. conclusions

Le développement de biofilms sur les coupons s'est traduit par une montée de potentiel qui confirmerait que les biofilms de rivière ont une activité catalytique de l'oxygène qui permettrait de les détecter.

Nous n'avons pas pu comparer avec suffisamment de rigueur, des biofilms de biomasse différentes afin de voir si la montée de potentiel était liée à la nature des microorganismes constituant le biofilm ou bien si elle était liée à la biomasse ou aux densités de microorganismes présents sur le coupon.

Une démarche initiée par Alain Bergel lors de l'essai préliminaire nous semble pourtant particulièrement intéressante : celle d'utiliser simultanément des coupons d'un matériau réputé « neutre » pour la colonisation ou l'activité microbienne et des coupons d'un matériau réputé « inhibiteur ». En effet en utilisant du Cuivre comme matériau support, nous avons pu observer des montées de potentiel plus faibles associées à des biomasses plus réduites constituées de communautés bactériennes sensiblement modifiées. Ce résultat très préliminaire (et jamais reproduit par manque de temps et de moyens) nous semble très prometteur car il montrerait s'il était confirmé qu'il y a un lien entre structure des biofilm et activité catalytique telle qu'elle est enregistrée par le suivi de potentiel.

5. Détermination par fluorescence *in vivo*
de l'abondance des grands groupes de
microalgues constitutifs du biofilm

A.-C. Martins-Azevedo. Mise au point méthodologique de l'application d'une sonde fluorimétrique (le fluoroprobe) sur des biofilms épilithiques. Rapport de stage de Master Eau – Santé – Environnement / Qualité Des Ecosystèmes Aquatiques. Année 2009. Université Victor Segalen.

Ce travail a été repris et présenté dans :

***V. Roubeix, A.-C. Martins-Azevedo, S. Morin and F. Delmas 2009.
«Use of a fluorimetric probe for river periphyton quantitative and qualitative assessment : Tests and potential applications ». 7th International Symposium « Use of Algae for Monitoring Rivers », Luxembourg, 23-25 nov 2009***

L'utilisation de la fluorescence a permis la naissance d'appareils (PhytoPAM, FluoroProbe,...) capables d'estimer la quantité de chlorophylle *a*, l'état photosynthétique des organismes et la proportion de certains groupes algaux selon leurs propriétés fluorométriques dans les systèmes aquatiques (comme les plans d'eau). Certaines de ces méthodes utilisant la fluorescence ont été adaptées aux phytobenthos (biofilms se développant sur des substrats aquatiques).

Ainsi, l'étude des biofilms, au niveau qualitatif et quantitatif peut être réalisée de façon simple et rapide avec ces appareils qui réalisent des mesures instantanées. C'est le cas de la sonde fluorométrique Fluoroprobe (bbe Moldaenke) qui possède un adaptateur benthique permettant des mesures sur biofilms ayant colonisé différents substrats (sable, pierre,...). Cette étude vise donc à évaluer le potentiel de cette sonde en mode benthique (l'évaluation de son potentiel en mode planctonique à déjà été réalisée) et à mettre au point un protocole d'utilisation (mise au point de la sonde, calibrages si nécessaires). Afin d'évaluer son aptitude à fournir des résultats corrects, ces derniers ont été comparés à des résultats provenant de méthodes classiques de laboratoire (dosage de la chlorophylle par spectrophotométrie, comptage des algues au microscope). Cette étude s'est essentiellement déroulée sur des expériences en laboratoire (canaux dynamiques, culture d'algues) et sur quelques mesures *in situ*.

Après avoir décrit le fonctionnement de la sonde, un paragraphe sera consacré au mode opératoire qui a été créé et à la description des expériences sur lesquelles la sonde a été mise en application. Enfin, l'évaluation de la sonde sera faite en deux parties consacrées à la fiabilité des mesures données

par l'appareil d'une part et aux applications que l'on peut faire de la sonde d'autre part. Enfin, une conclusion nous amènera à décrire les avantages de la sonde mais aussi ses limites.

I. La sonde fluorimétrique : FluoroProbe bbe

1) Principe de fonctionnement

La sonde fluorimétrique Fluoroprobe, de la marque bbe Moldaenke (Allemagne), est un instrument de mesure de la quantité totale de chlorophylle *a* permettant une estimation de la photosynthèse et la détermination des différents groupes phototrophes (différents groupes algaux et cyanobactéries) présents, grâce à la détection de la fluorescence émise par les cellules végétales lors de la photosynthèse.



Figure 3: La sonde fluorimétrique à gauche : en mode planctonique (FluoroProbe) et à droite : la sonde avec l'adaptateur benthique.

b.

La détection de la fluorescence des algues dépend essentiellement de la présence des pigments chlorophylliens. Ces pigments sont présents dans tous le règne végétal, cependant il en existe plusieurs sortes selon les groupes algaux: chlorophylle *a*, *b*, *c* et *d*. Par ailleurs, d'autres pigments existent et sont caractéristiques de certains groupes d'algues. Il est possible de différencier des groupes d'algues par leur spectre d'excitation de fluorescence (figure 4).

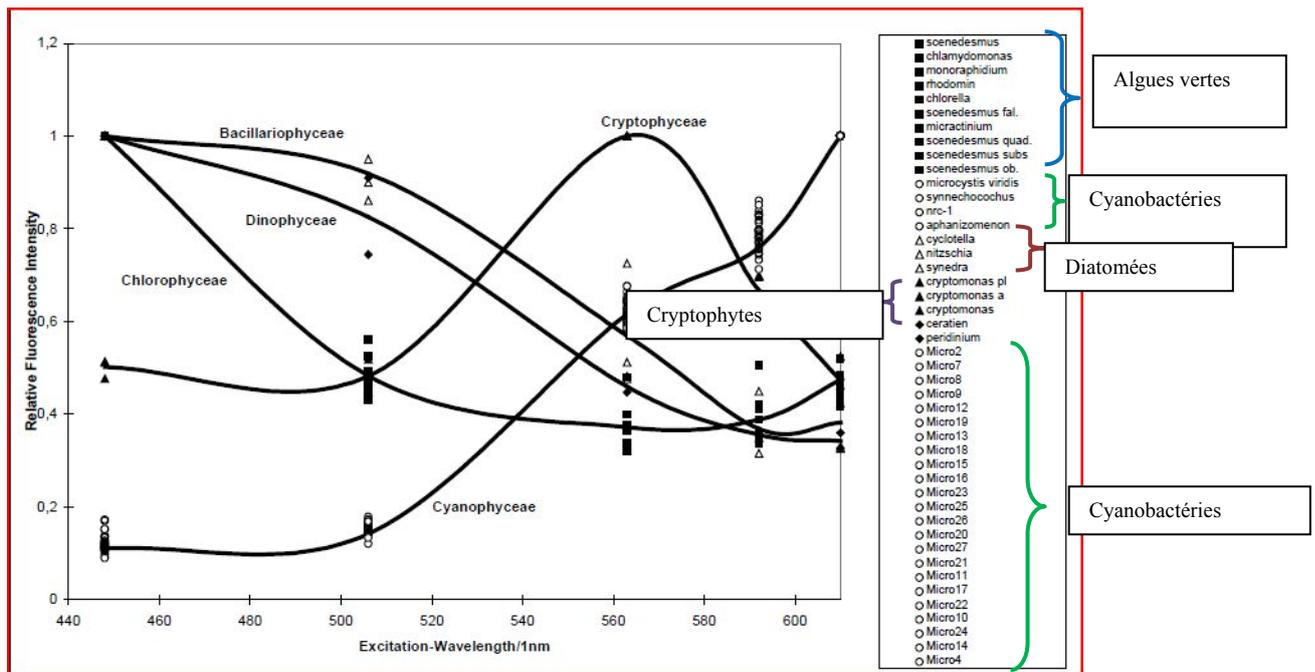


Figure 4: "Empreintes digitales" de fluorescence des différents groupes algaux.

Les différentes classes d'algues sont d'abord mesurées séparément pour calibrer l'instrument. Les spectres mesurés, ou les empreintes digitales, sont alors stockés dans le FluoroProbe.

Les pigments des cellules d'algues percevant ce rayon émettent une fluorescence, proportionnelle à leur densité et à la distribution des pigments. Cette fluorescence est alors quantifiée par la sonde. Pour différencier les différents types d'algues, le Fluoroprobe a la possibilité d'émettre à six longueurs d'ondes différentes grâce à 6 LED¹ (370 nm, 470 nm, 525 nm, 570 nm, 590 nm et 610 nm). Ainsi, grâce aux spectres préenregistrés dans l'appareil, la sonde pourra distinguer les groupes algaux en fonction de la quantité de fluorescence réémise pour chaque longueur d'excitation (pour chaque LED).

Les valeurs sont exprimées en équivalent de chlorophylle *a*, en µg par litre d'échantillon. Les résultats de la sonde peuvent être exploités grâce à un logiciel fourni.

Les groupes présentés ci-dessous correspondent aux groupes initialement calibrés dans l'appareil, il est donc possible de calibrer l'appareil (à l'aide de cultures pures) avec d'autres groupes algaux. Dans cette étude, les paramètres de base de la sonde ont été testés, aucun calibrage concernant les algues n'a été réalisé.

- Les Algues vertes ou Chlorophycées:

Cette classe d'algues est la plus répandue et est constituée d'un grand nombre d'espèces, présentant pour la majorité des chloroplastes. Le maximum de fluorescence produit par ces algues a lieu lors de l'excitation par la LED émettant à 470nm. Ce sont les pigments de type chlorophylles *a* et *b* qui produisent cette fluorescence.

¹ Light- Emitting- Diode

- Les Cyanobactéries:

Elles font parties d'une sous-classe de bactéries, ce sont donc des procaryotes autotrophes, sans véritable noyau, ni plaste. Leur couleur peut varier puisqu'elles possèdent de la chlorophylle et d'autres pigments. Le pic de fluorescence émis par les cyanobactéries se situe à 610nm. Le pigment émetteur est la phycocyanine.

- Les Diatomées:

Ce sont des micro-algues présentes dans tous les milieux aquatiques avec une préférence pour les eaux froides et les périodes printanières. Elles sont enveloppées par un squelette externe siliceux, appelé frustule. Les diatomées peuvent être de type planctoniques (libres) ou épilithiques (fixées sur des substrats naturels, type rocher); constituant majeur du phytoplancton, elles jouent donc un rôle très important dans la production de biomasse primaire (elles sont à la base des réseaux trophiques). Pour ce groupe, le maximum de fluorescence est émis à 525nm par la présence de chlorophylle *a*, *c* et d'autres pigments (carotènes,...).

- Les Cryptophytes:

Ce sont des algues flagellées en forme de haricot, retrouvées dans de nombreux habitats et formant une partie importante du nanoplancton. Leurs chloroplastes peuvent être vert olive, parfois rougeâtre ou bleue. Les algues de ce groupe contiennent un pigment responsable du pic de fluorescence à 570nm, la phycoérythrine (aussi présente chez certaines cyanobactéries).

- Les Substances Jaunes (substances humiques):

Une des LED de la sonde, celle émettant à 370nm permet de détecter les « substances jaunes », ce sont les particules ne correspondant pas à des algues mais qui émettent tout de même une fluorescence. Ces particules sont exclues du calcul de concentration de chlorophylle *a*.

2) Domaine d'application de la sonde FluoroProbe bbe

Jusqu'à présent, la sonde a été utilisée principalement en plans d'eau (mode planctonique). En effet, de par sa capacité à déterminer la quantité de chlorophylle *a* présente et à quantifier certains groupes algaux, elle permet par exemple de suivre la distribution verticale de certaines espèces de cyanobactéries toxiques (Leboulanger et al, 2002) qui sont parfois responsables d'efflorescences² dans les plans d'eau.

² Forte croissance de certaines algues et cyanobactéries dans des conditions environnementales particulières

Cette utilisation de la sonde semble particulièrement intéressante lorsque les plans d'eau reçoivent des activités de pêche, de baignade,... En effet, les algues toxiques pouvant menacer la santé des animaux et des hommes, il est nécessaire de savoir surveiller et alerter les populations en cas de blooms d'algues potentiellement dangereuses. De plus, quelques études (Beutler, Wiltshire et al. 2002) ont permis de mettre en évidence le réel potentiel de cette sonde à suivre la croissance de certaines algues, remplaçant et/ou à s'ajoutant ainsi aux méthodes de laboratoires très souvent longues et fastidieuses.

3) Objectifs: Développer l'application en mode Benthique

La sonde permet une seconde utilisation. Un adaptateur benthique est fourni avec l'appareil, permettant de réaliser des mesures de chlorophylle *a* sur divers substrats (mode benthique) et la détection des mêmes groupes algaux que pour le mode planctonique. Cependant étant encore très peu utilisé, peu d'études ont été faites (Aberle, Beutler et al. 2006) sur les réelles capacités de l'appareil utilisé selon ce mode.

Cette étude a donc pour objectif principal d'évaluer le mode benthique au travers de mesures effectuées lors de différentes expériences afin d'étudier la cohérence des résultats fournis avec ceux de méthodes classiquement utilisées (dosage de la chlorophylle *a* par spectrophotométrie UV-visible, comptage au microscope,...). De plus, ceci permettra par la suite de déterminer les différentes applications possibles pour cette sonde en mode benthique. C'est donc un travail de comparaisons de résultats entre plusieurs méthodes.

La première partie de cette étude a consisté à se familiariser avec l'appareil et le logiciel et de créer un mode opératoire (concernant le mode benthique) afin de pouvoir être utilisé facilement par d'autres agents du Cemagref de Bordeaux. Ensuite, la sonde a été testée dans différentes conditions (tests en laboratoire essentiellement et tests *in situ*) afin d'évaluer d'une part son potentiel de quantification de la chlorophylle *a* totale, et d'autre part sa faculté de discrimination des groupes algaux.

II. Méthodes

1) Mode opératoire pour une mesure en mode benthique

Il était nécessaire de créer un mode opératoire pour effectuer des mesures en mode benthique. En effet, les mesures ne se réalisent pas de la même façon que pour le mode planctonique (où la sonde est entièrement immergée dans de l'eau). Ainsi, à la suite de plusieurs utilisations, une procédure standard a pu être déterminée au cours de mon stage et correspond à la procédure qui a été utilisée durant toute cette étude. Un mode opératoire détaillé a donc été créé (voir annexe 4) afin

que d'autres agents du Cemagref puissent s'en servir. Les mesures ayant été réalisées dans cette étude ce sont généralement faites sur des lames de verre .

Mesures au BenthofluoroProbe³ :

Pour réaliser une mesure, un bac gris permettant de déposer la lame de verre a été utilisé. Un embout de mesure est nécessaire afin de mettre la fibre optique en contact avec le substrat, ainsi l'embout de mesure rouge (figure 3) a été utilisé durant toute cette étude.

Afin d'effectuer les mesures sur le substrat voulu, il est préférable, pour des expériences en laboratoire, d'effectuer un « Blanc » de l'appareil. Une lame de verre vierge (parfaitement nettoyée, sans biofilms à la surface) est déposée dans le bac gris et recouverte d'eau déminéralisée. Ensuite la fonction du logiciel permettant de réaliser un « blanc » est activée et une série de 10 mesures sur cette lame de verre vierge est effectuée. Ce « blanc » permet d'enlever un éventuel « bruit de fond » provoqué par le substrat. Les valeurs obtenus sont ensuite enregistré dans l'appareil et serviront au calcul de la densité de chlorophylle *a*.

La sonde est donc prête à effectuer les mesures sur les substrats colonisés. La lame est placée dans le bac (sans eau déminéralisée) et le logiciel lance les mesures. Nous avons choisi de faire systématiquement dix répliquats de mesures afin d'en évaluer la reproductibilité. Selon les objectifs de l'expérience, ces mesures ont pu être effectuées sur une face du substrat ou sur les deux faces. Une mesure est effectuée toutes les sept secondes avec un affichage instantané des résultats.

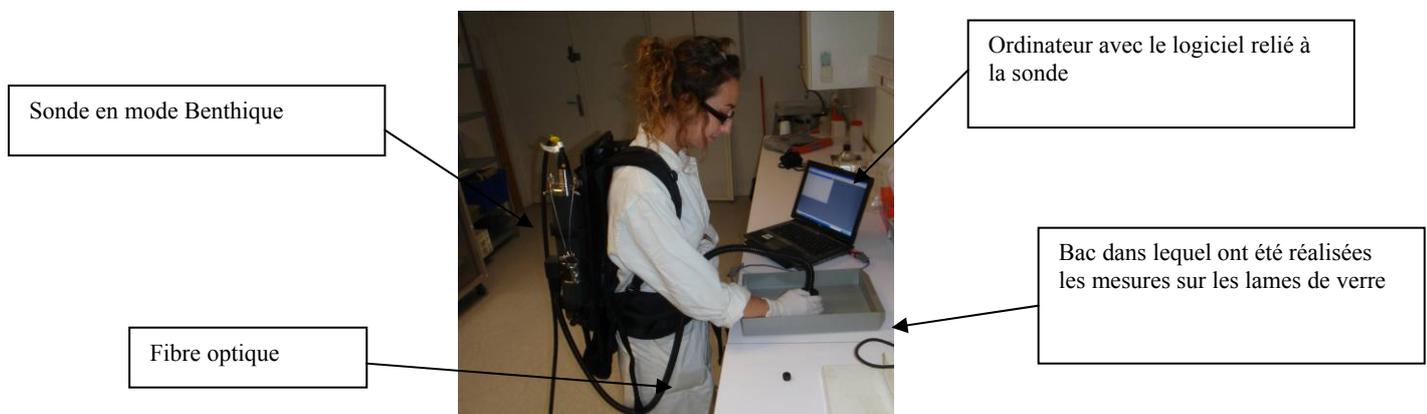
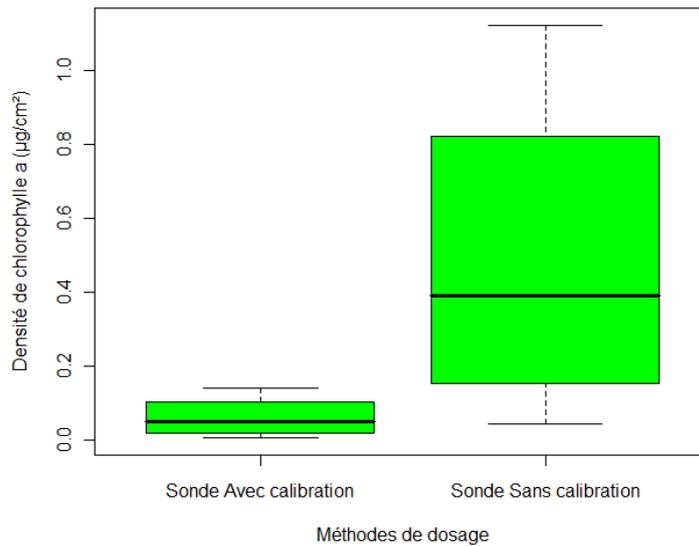


Figure 5: Réalisation d'une mesure sur une lame de verre au BenthofluoroProbe.

Le mode benthique de la sonde a été testé en majorité sur des lames de verre.

³ Appellation de la sonde en mode benthique



Graph 1: Précision des mesures (provenant d'une expérience de culture d'algues en laboratoire) selon la calibration du substrat ou non de la sonde en mode benthique.

De plus sachant que le substrat joue un rôle important (graphe 1) dans la réémission de fluorescence, il était nécessaire d'effectuer cette calibration afin de contrôler le niveau d'erreur. En effet, la distribution des valeurs est beaucoup moins homogène lorsque la sonde n'est pas calibrée au niveau du substrat.

Création d'un nouveau profil de substrat :

Cette calibration du substrat peut se réaliser après avoir effectué les mesures en mode normal (procédure décrite ci-dessus). En effet, les nouveaux paramètres calculés pour le substrat peuvent être rentré ensuite et les résultats obtenus seront recalculés.

Les propriétés de fluorescence d'un substrat sont définies selon certains coefficients (qui seront utilisés dans l'algorithme afin de calculer la densité de chlorophylle). Seul un certain type de coefficient a besoin d'être calculé.

Pour calculer de nouveaux coefficients correspondant au substrat sur lequel les mesures vont être faites, il faut réaliser des mesures sur le substrat vierge (dépourvu de biofilm ; dans cette étude : sur une lame de verre vierge ou sur un coupon vierge). Pour cela, suivre la procédure expliquée ci-dessus. Ensuite, les valeurs brutes de fluorescence pour chaque LED sont utilisées afin de calculer (avec la formule ci-dessous) le nouveau coefficient pour chaque longueur d'onde.

$$\frac{0.45}{X_i} \times 2.4$$

Xi : moyenne des valeurs obtenues pour une LED donnée ; 2,4 = mesure d'ans l'air/mesure sur le sable de mer (=valeur de standardisation) ;
.045 = valeur technique (fournie par le fabricant)

Une fois les coefficients calculés, ils doivent être rentré dans le logiciel et les résultats de densité de chlorophylle seront automatiquement recalculés à partir de ces nouveaux paramètres.

2) Procédure pour contrôle en mode planctonique

Les mesures faites en mode benthique durant toute cette étude, ont parfois pu être comparées à des mesures réalisées en mode planctonique. Ceci a permis d'évaluer lequel de ces deux modes est le plus apte à fournir des résultats corrects concernant l'étude des biofilms. Le mode opératoire détaillé de la sonde en mode planctonique à déjà été créé (Becker A., 2008) et sera donc présenté en annexe 4. Cependant, le mode planctonique est utilisé ici pour des biofilms et non en plans d'eau, le protocole a donc été adapté à l'utilisation qui en est faite dans cette étude.

Les biofilms présents à la surface du substrat ont été grattés (après avoir été mesurés en mode benthique) et mis en suspension dans 100 ml d'eau de source (achetée dans le commerce). Ces 100 ml ont du être dilués afin d'obtenir un volume suffisant (soit 2,11 litres) pour que la sonde soit complètement immergée dans un bécher de 5 litres. Un agitateur magnétique a été placé sous le bécher afin d'avoir un mouvement de l'eau et une série de dix mesures a été réalisée pour chaque échantillon. Ceci représente donc une autre façon d'analyser les biofilms épilithiques. Les résultats en mode planctonique étant donnés en $\mu\text{g/L}$, ils ont été convertis (avec la surface du substrat colonisé par le biofilm) afin de pouvoir comparer avec le mode benthique (qui fournit directement les valeurs en $\mu\text{g/cm}^2$).

3) Contrôle au spectrophotomètre

Les mesures au benthofluoroprobe et au fluoroprobe⁴ au niveau de la quantité de chlorophylle *a* présente dans le biofilm ont pu généralement être comparés à un dosage par spectrophotométrie UV-visible. Le dosage de la spectrophotométrie se fait selon un protocole défini par la norme NF T 90-117 : « Dosage de la chlorophylle *a* et d'un indice phéopigments. Méthode par spectrophotométrie d'absorption moléculaire. »

En effet, la plupart des lames de verre utilisées dans cette étude ont été grattées afin de récupérer le biofilm présent dessus et mis en suspension dans 100 ou 200 ml d'eau de source (achetée dans le commerce). Une certaine quantité (40, 45 ou 95 ml de cette suspension) a été filtrée sur un filtre GF-F Whatman. Ce filtre a ensuite subi une extraction à l'acétone dans un bac à ultra-sons, ce qui permet de lyser les cellules qui libèrent alors leurs pigments. L'extrait est alors filtré sur un filtre GF-F Whatman et récupéré pour être ensuite analysé par le spectrophotomètre (à double faisceau ; PERKIN-ELMER Lambda 2). Le

⁴ Appellation du mode planctonique de la sonde

volume de solvant utilisé est noté et servira tout comme le volume d'eau filtrée, aux calculs de concentrations en chlorophylle *a*. Ce calcul se fait à l'aide de la formule de Lorenzen (1967, voir annexe 2). Les résultats obtenus étant en µg/L, ils ont été convertis en µg/cm² (à l'aide de la surface colonisée de la lame de verre).

Pour chaque échantillon, donc pour chaque lame de verre, une mesure de l'absorbance est réalisée à différente longueur d'ondes. Une mesure est aussi effectuée après acidification de l'échantillon afin de déterminer la phéophitine *a* et les autres produits de dégradations de la chlorophylle *a*.

4) Expériences avec la sonde fluorimétrique

a) Mesures In Situ

La sonde FluoroProbe est avant tout une sonde de terrain, il était donc normal de réaliser des mesures *in situ*. Les paramètres initiaux (profil de substrat sur lequel les mesures sont effectuées) de la sonde ont ainsi pu être testés.

Les mesures in situ ont été réalisées sur quatre stations situées dans les coteaux aquitains (Figures 6 et 7):

- Deux sites situés sur la Gèze ont fait l'objet de mesures : Organ (amont) et Peyret (aval)
- Un site situé sur la Save: Montmaurin (amont)
- Un autre site situé sur le Sousson: Daréous (aval)

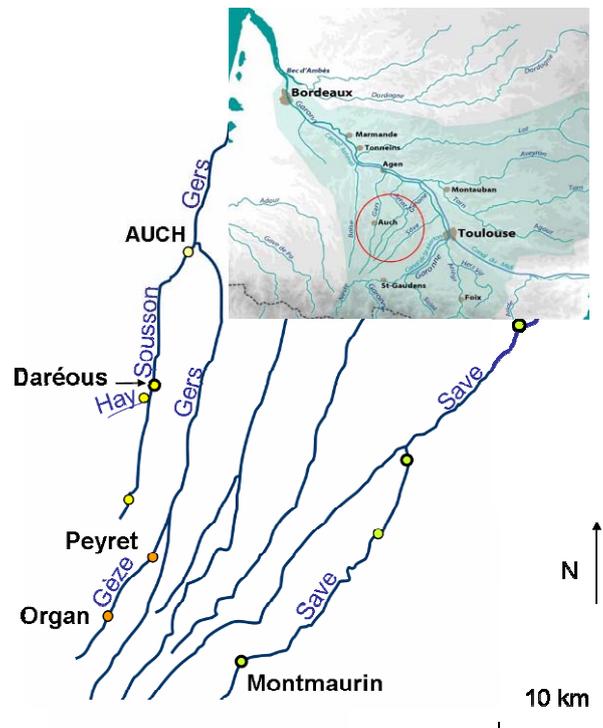


Figure 6: Localisation des différentes stations de terrain sur lesquelles ont été effectuées des mesures au BenthofluoroProbe.



Figure 7: Photographies: à gauche, la station d'Organ (La Gèze), au milieu, la station de Montmaurin (La Save) et à droite, la station de Daréous (le Sousson).

L'eutrophisation des cours d'eau, est un phénomène d'enrichissement trophique des eaux, qui résulte d'apports excessifs en nutriments, susceptibles de modifier la structure et le fonctionnement des biocénoses aquatiques. Parmi ces dernières, les biofilms phototrophes, représentent un compartiment biologique susceptible de biointégrer le niveau de trophie des cours d'eau.

Ainsi, ces tests sur le terrain ont permis de voir si la sonde, au travers de la concentration en chlorophylle *a* des biofilms épilithiques, pouvait détecter des différences entre ces stations et ainsi caractériser leur niveau trophique. En effet, à l'aide de données récoltées lors d'une campagne de terrain, en particulier des données concernant la teneur de l'eau en nutriments (phosphore, azote,...), les stations choisies ont pu être caractérisées en fonction du niveau trophique de l'eau. Il était donc intéressant de comparer les résultats obtenus avec la sonde avec les connaissances acquises sur les stations.

Pour ce faire et afin d'utiliser les paramètres initiaux des mesures sur des cailloux provenant du fond des rivières respectives ont été réalisées.

b) Mesures en laboratoire

c. b.1) Expériences en microcosmes

b.1.1) Expériences réalisées dans les locaux du Cemagref de Bordeaux

Pour effectuer une mise au point de la sonde, cette dernière a été testée sur des expériences réalisées en laboratoire. Ces expérimentations avaient pour principal objectif l'étude d'effets possible d'herbicides ainsi que de différents niveaux de concentration en nutriments dans l'eau sur la croissance de biofilms épilithiques et plus particulièrement sur les diatomées composant à environ 80% les biofilms (COUPRIE S., 2009). Ces tests en laboratoire ont permis de se familiariser avec l'appareil et son logiciel et de mettre en place un protocole d'utilisation (décrit dans la première partie) le plus adapté possible aux expériences en laboratoire.

Cette étude vise aussi à déterminer les capacités de la sonde à donner des résultats comparables à ceux pouvant être fournis par des méthodes de laboratoire, tant au niveau du dosage de la chlorophylle *a* que de la distinction des groupes algaux. C'est pour cela que les résultats obtenus par la sonde ont été comparés à ceux trouvés lors de ces expériences. Lors de ces tests, il a été possible de voir si le BenthofluoroProbe était capable de déceler des différences entre les niveaux trophiques de l'eau (augmentation ou diminution de la quantité de chlorophylle *a*).

Mise en place de l'expérience : Une expérience en microcosmes a été menée afin de tester deux niveaux trophiques différents : oligotrophe ou eutrophe. Pour réaliser cette expérience, des aquariums (tableaux 1) ont été utilisés et remplis avec de l'eau provenant d'une rivière oligotrophe (la Gèze (65)).

Des pompes ont été installées dans chaque aquarium afin de recréer au mieux les conditions hydrodynamiques de la rivière et des portoirs pouvant contenir 6 lames de verre ont été placés au milieu des aquariums de manière à ce que les lames de verre soit suffisamment immergées. Des lames supplémentaires ont été rajoutées et fixées aux parois des aquariums afin de réaliser des mesures au BenthofluoroProbe tous les jours (ces lames n'ont pas fait l'objet de comparaison). Les aquariums ont reçu une photopériode de 16h>8h de jour. Les concentrations en pesticides et en nutriments étaient contrôlées (afin d'ajuster les concentrations pour garder toujours le même niveau trophique de l'eau). L'expérience a duré 3 semaines. Les aquariums ont été inoculés avec des biofilms naturels (mis en suspension dans de l'eau) provenant de la même rivière où l'eau a été prélevée pour les aquariums.

Aquarium (numéro et nom)	Concentration en Herbicide (S-Métolachlore)	Niveau trophique de l'eau	Nombre de lames de verre (contenues dans le portoir)	Nombre de lames supplémentaires pour les mesures au BenthofluoroProbe (fixées aux parois)
1 > Oa	0 µg/L	Oligotrophe	6	2
2 > Ob	0 µg/L	Eutrophe	6	2

Tableau 1: Descriptif des aquariums utilisés pour la première expérience en canaux dynamiques.



Figure 8: Dispositif de l'Expérience en canaux expérimentaux : l'aquarium du premier plan est en condition oligotrophe et l'aquarium en second plan est en condition eutrophe.

d. b.2) Culture d'algues en laboratoire

Une des interrogations concernant la sonde en mode benthique était de savoir si elle fournissait des indications correctes sur la présence des groupes algaux prédéfinis dans les calibrages initiaux (cyanobactéries, algues vertes, cryptophytes et diatomées). Afin de répondre à cette question une culture d'algues a été réalisée en laboratoire mettant en jeu deux groupes algaux avec une seule espèce de diatomée : *Surirella angustata* et une seule espèce d'algue verte : *Scenedesmus quadricauda*. Cette culture permet aussi de comparer les résultats fournis par la sonde avec ceux obtenus par le dosage en laboratoire en ce qui concerne la chlorophylle *a* totale. De plus des comptages au microscope inversé des deux espèces d'algues ont permis de réaliser une comparaison qualitative avec les résultats obtenus par la sonde pour la distinction des groupes algaux.

Mise en place de la culture (matériels) :

Récipient	Eau	Algues utilisées	Ajout de nutriments	Agitateur magnétique	Substrats
Aquarium en verre fermé par un couvercle en plexiglas laissant passer la lumière	5 litres provenant d'une rivière oligotrophe : La Gèze ; eau préalablement filtrée deux fois	<i>Surirella angustata</i> (diatomée) + <i>Scenedesmus quadricauda</i> (algue verte)	OUI (voir annexe 1)	Oui, placé sous l'aquarium	8 lames de verres

Tableau 2: Récapitulatif du matériel utilisé pour la culture réalisée.

Les 8 lames de verres ont été échantillonnées tous les jours (sauf pendant le weekend). Outre le grattage du biofilm développé pour effectuer un dosage de la chlorophylle *a* selon la Norme NF-T 90-117, le biofilm développé sur les lames a fait l'objet de trois mesures différentes (i) mesure au BenthofluoroProbe, (ii) mesure à la sonde en mode planctonique et (iii) des dénombrements des deux espèces d'algues cultivées au microscope inversé. Il a donc été possible d'établir une cinétique de colonisation des différents groupes d'algues dans le temps et selon les trois méthodes comparées.

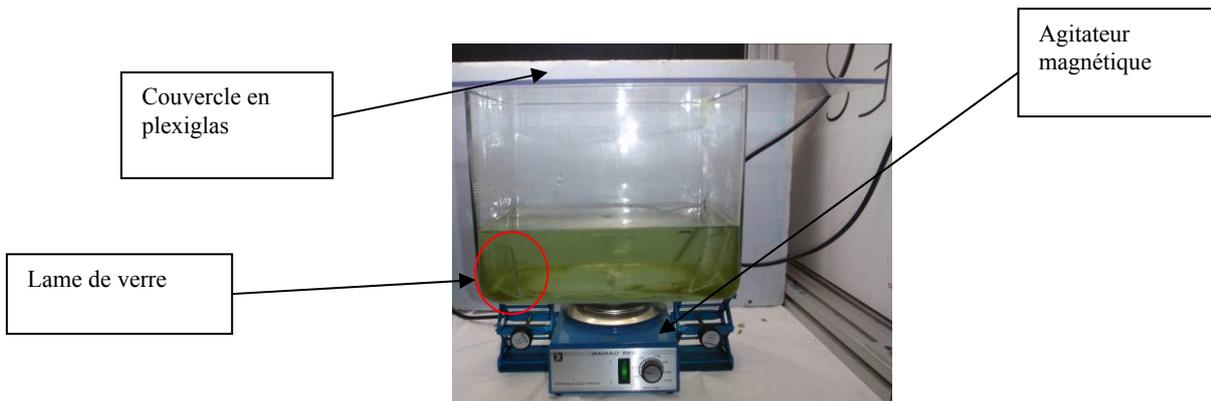


Figure 9: Photo du dispositif de la culture d'algues.

Pour effectuer un comptage des algues vertes et des diatomées présentes dans la culture au microscope (figure 12), 3 ml du pilulier a servi à réaliser des lames de sédimentations (figure 11). Le comptage s'est effectué au microscope inversé, en comptant la lame entière (tous les champs) ou (lorsqu'il y a beaucoup d'algues présentes) en comptant un champ sur deux. Lors de ces comptages, seules les cellules vivantes, remplies de chlorophylle ont été prises en comptes. En effet, une cellule morte, dépourvue de pigment chlorophyllien, n'a pas d'effet sur la fluorescence détectée par la sonde.

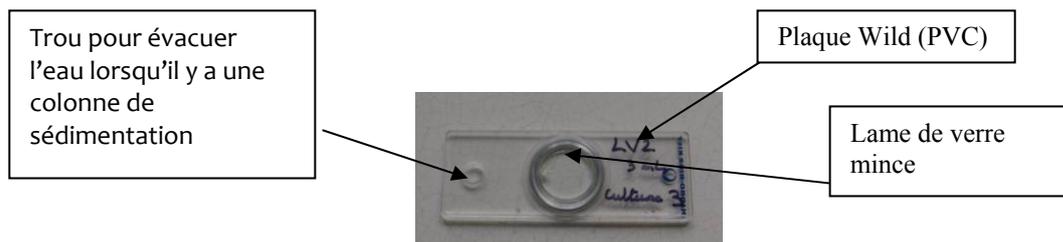


Figure 10: Exemple d'une lame de sédimentation contenant 3 ml d'un pilulier échantillonné lors de la troisième culture d'algues.



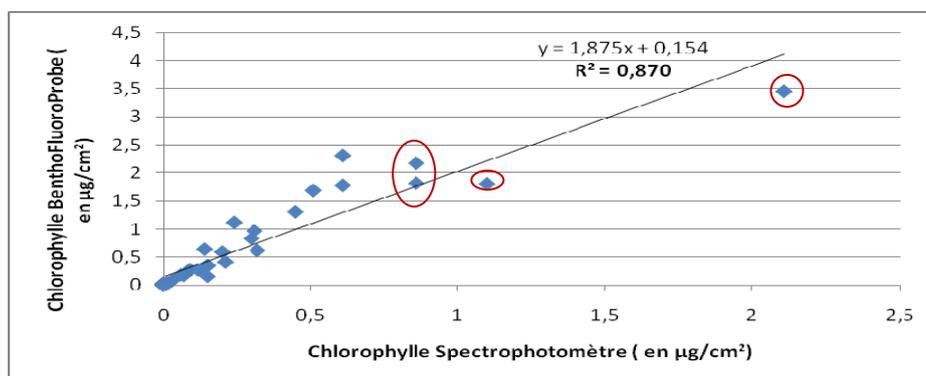
Figure 11: Microscope inversé utilisé pour effectuer les comptages.

III. Tests de la sonde

1) Fiabilité des mesures de chlorophylle *a*

Afin d'estimer l'aptitude de l'appareil à déterminer une concentration en chlorophylle *a* correcte et sa gamme d'usage permettant une estimation fiable, nous avons comparé les résultats obtenus par la sonde avec des résultats provenant d'un dosage de chlorophylle *a* par spectrophotométrie UV-visible (NF T 90-117) en laboratoire (technique de référence ayant fait ses preuves et encore largement utilisée). Outre le fait d'effectuer des mesures instantanées et non destructives, qui représente un avantage important par rapport aux méthodes de laboratoire, la sonde peut être calibrée sur plusieurs aspects : calibration au niveau de la chlorophylle *a* totale, calibration des groupes algaux et création de profils de substrats (substrat sur lequel est effectué la mesure). Dans cette étude, seule une calibration du substrat (inévitabile, car fortement influente sur la fluorescence ré-émergente) a été utilisée, car cette étude vise à évaluer les performances de la sonde avec les paramètres de base fournis par le constructeur.

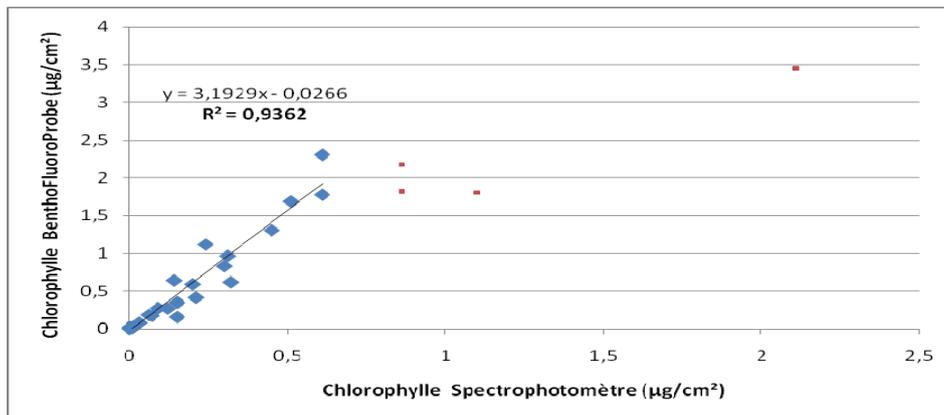
Les courbes de concentrations de la chlorophylle *a* (celles obtenues avec la sonde avec sa calibration et celles obtenues avec le spectrophotomètre) suivent des profils relatifs comparables. Les deux méthodes semblent donc décrire les mêmes tendances en ce qui concerne l'évolution de la chlorophylle *a* présente dans les biofilms notamment pour des concentrations de chlorophylle *a* comprises entre 0.005 µg/cm² (graphe 3) et 2,7 µg/cm² (graphe 2).



Grphe 2: Régression linéaire des valeurs obtenues par le BenthofluoroProbe et des valeurs obtenues par la méthode de référence spectrophotométrique de l'expérience en microcosmes.

Le graphe 4 présente tous les résultats obtenus, dans cette expérience en canaux dynamique, pour chaque lame de verre échantillonnée (toutes modalités confondues). D'après ce graphe, une relation d'assez bonne qualité (cf R² global obtenu sur un ajustement linéaire) existe entre les valeurs obtenues au BenthofluoroProbe et les valeurs de référence (obtenues par la méthode spectrophotométrique). Cependant, cette relation semble diverger de la linéarité pour les fortes valeurs de biomasse, ce qui signifie que la sonde appréhende une autre réalité que la mesure de référence par analyse spectrophotométrique au laboratoire. Il y a une explication logique à cela : quelle que soit la biomasse de biofilm par unité de surface, l'analyse de laboratoire quantifie la totalité de la chlorophylle *a* contenue dans le biofilm (extraite par l'acétone). Par contre, la sonde fluorimétrique rencontre une contrainte technique. Lorsque le biofilm

s'épaissit, il y a en même temps atténuation de l'impulsion lumineuse d'excitation dans la profondeur du biofilm et perte de réflectance du substrat, ce qui altère la réponse de fluorescence ré-émergente. Il y a donc là une limitation technique d'utilisation de ce type d'appareil en cas de mesure sur biofilms épais. Dans ce cas, ce qui est mesuré peut rendre compte d'un état des colonies de surface du biofilm, mais est beaucoup moins représentatif de son état et de son bilan global.



Graph 3: Régression linéaire (sans les valeurs extrêmes) des valeurs obtenues par le Benthofluorimètre et des valeurs obtenues par la méthode de référence spectrophotométrique de l'expérience en microcosmes.

Sur le plan de l'étude de la relation quantitative entre les 2 techniques, lorsque les plus fortes valeurs de biomasse données par ces 2 techniques sont enlevées (valeurs au-dessus desquelles on sort du domaine de linéarité, correspondant aux points qui sont entourés sur le graphe 4), nous obtenons un ajustement plus linéaire, matérialisé par un R² sensiblement plus proche de 1 (0,936), et une pente de relation plus élevée (cf graphe 5). Ceci permet de mieux approcher le domaine de linéarité entre les 2 techniques, donc le domaine dans lequel une relation de conversion quantitative linéaire entre les 2 techniques peut s'appliquer (courbe d'intercalibration).

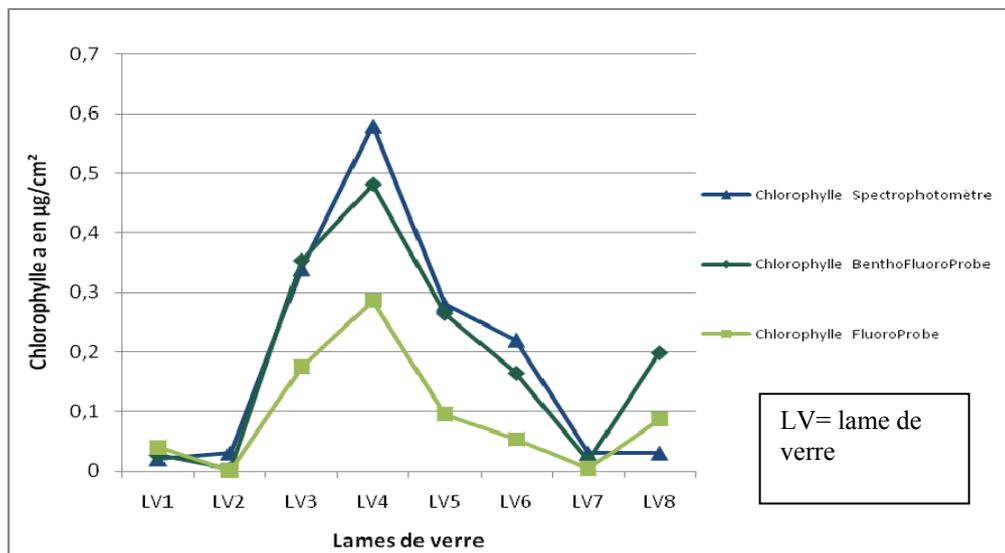
La gamme de valeurs dans laquelle il est possible de convertir les valeurs de benthofluorimètre en valeur de dosage spectrophotométrique va donc, en première approche, de 0 à 2 µg/cm² (valeurs benthofluorimètre), ce qui donne des valeurs plus réelles de Chlorophyll a allant de 0 à 0,7 µg/cm² (valeurs de dosage spectrophotométrique de référence).

Cette interprétation faite sur l'assise expérimentale de mon stage mériterait d'être consolidée par d'autres résultats expérimentaux en plus grand nombre permettant notamment :

- d'acquérir plus de valeurs dans le domaine des faibles biomasses, afin de voir si la régression linéaire passe par l'origine,
- d'acquérir plus de valeurs dans le domaine des fortes biomasses, afin de voir si, dans un certain domaine dépassant le domaine de linéarité défini, il est possible de tracer une relation solide, non linéaire et avec coefficient d'atténuation (augmentation de la gamme de biomasse ou une

utilisation quantitative du benthofluoroprobe serait possible), plus généralement, de vérifier que l'ajustement linéaire proposé au graphe 5 se vérifie avec des biofilms phytobenthiques de natures différentes

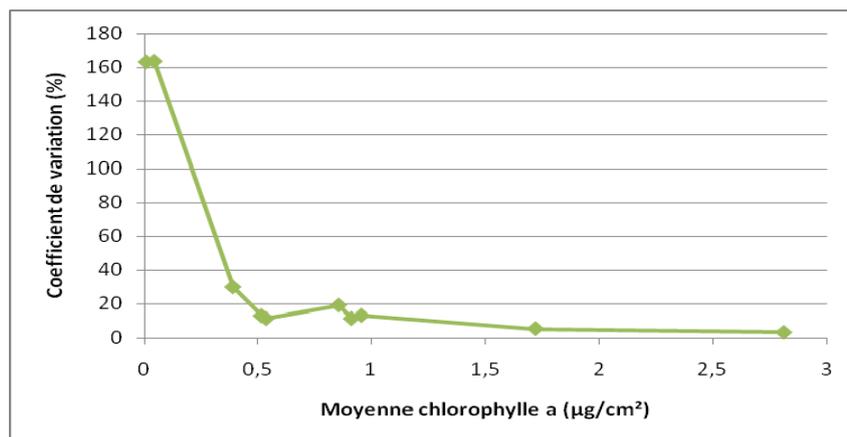
La sonde possède deux modes de fonctionnement, le mode benthique (mode qui est testé dans cette étude) et le mode planctonique . Cette étude est axée essentiellement sur le mode benthique, cependant il apparaissait intéressant de comparer ces deux modes : mode benthique et mode planctonique en utilisant le biofilm remis en suspension dans un volume d'eau standard permettant d'immerger complètement la sonde (2,11 litres) et en utilisant les paramètres de base du mode planctonique.



Graph 4: Courbe de la densité de chlorophylle a (culture d'algues) selon deux méthodes de dosage : par une sonde fluorimétrique en mode benthique avec calibration et en mode planctonique et par une méthode spectrophotométrique de laboratoire.

Les valeurs fournies par le FluoroProbe (mode benthique) sont comprises entre 0.05 et 0.49 µg/cm² alors que les valeurs obtenues au spectrophotomètre sont comprises entre 0.01 et 0.59 µg/cm² (graphe 7). Les valeurs fournies par la sonde sont proches de celles données par la méthode spectrophotométrique. D'après le garphe bis, nous sommes encore dans la gamme de quantité de biomasse par unité de surface pour laquelle la relation dosage spectrophotométrique-fluorescence (Benthofluoroprobe) est linéaire.

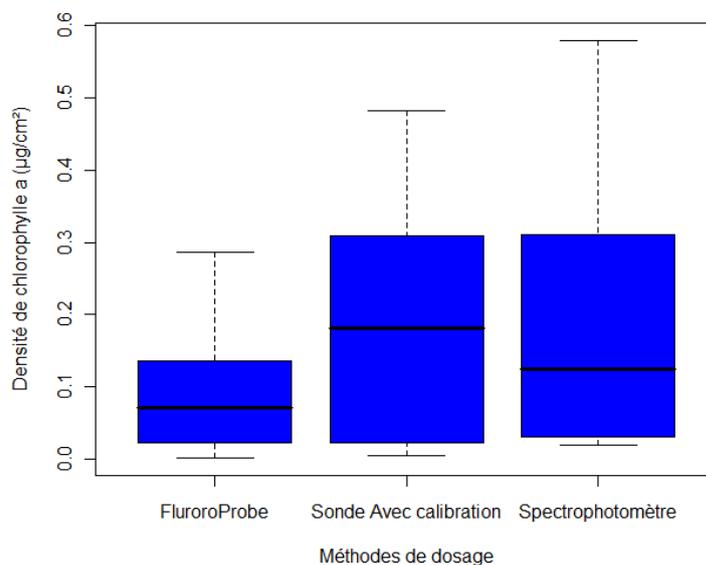
Par ailleurs, les courbes de densité de la chlorophylle a (celles obtenues avec la sonde et celles obtenues avec le spectrophotomètre) ont généralement le meme profil (sauf pour la dernière lame de verre : LV8). Les deux méthodes semblent donc décrire les mêmes tendances en ce qui concerne l'évolution de la chlorophylle a présente dans les biofilms. Ces résultats appuient les observations faites pour les graphes précédents , d'un point de vue qualitatif, les mesures données par le Benthofluoroprobe (mode benthique du FluoroProbe) sont donc correctes.



Graph 6: Coefficients de variation des mesures effectuées sur les 8 lames de verre de la culture d'algues à l'aide de la sonde en mode planctonique.

L'étude des coefficients de variation pour chaque série de 10 mesures effectuées montre que ces coefficients diminuent lorsque la quantité de chlorophylle *a* mesurée augmente (graphes 8 et 9). Cette tendance est aussi bien observée pour les résultats obtenus avec la sonde en mode benthique qu'avec la sonde en mode planctonique.

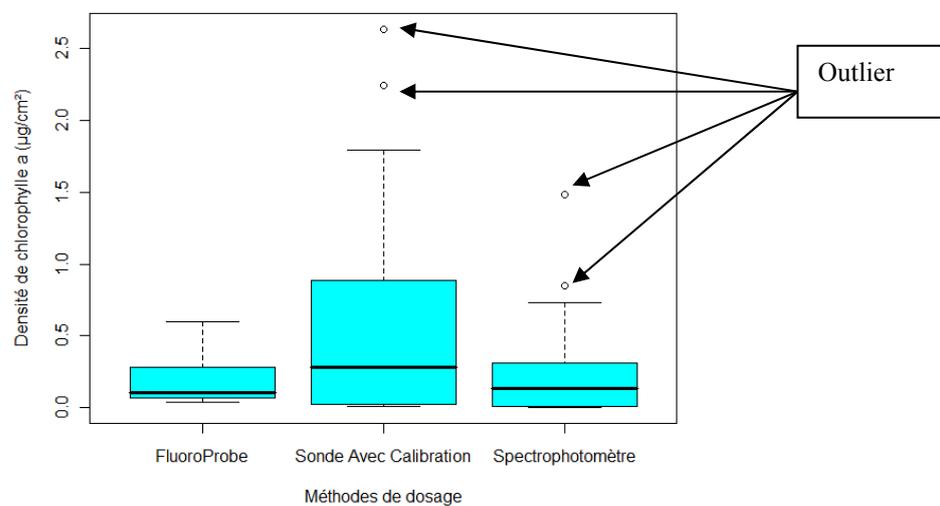
Un coefficient de variation permet d'apprécier l'homogénéité d'une distribution. Une valeur de coefficient de variation inférieure à 15% traduit une très bonne homogénéité de la distribution. Dans cette étude, nous cherchions à savoir si le mode benthique de la sonde permettait de réaliser des mesures aux résultats identiques sur un même endroit. C'est donc dans l'optique de déterminer le caractère « répétable » ou non de la mesure de la sonde, que des séries de dix mesures (au même endroit) ont été réalisées pour chaque mesure réalisée dans cette étude.



Graphe 7: « Boîtes à Moustaches » concernant les valeurs obtenues sur les 8 lames de verre pour l'expérience de cultures d'algues.

Sur cette expérience (culture d'algues), le graphe 10 montre que la sonde en mode planctonique semble rendre compte de biomasse plus faible, l'explication tenant au rendement fluorimétrique réduit en cas de culture benthique resuspendue. D'après ces « boîtes à moustaches », les valeurs les plus proches de celles fournies par la méthode de laboratoire de référence sont celles obtenues avec le BenthofluoroProbe.

Le graphe ci-dessous présente les résultats obtenus lors de l'expérience en canaux dynamiques, expérience décrite aux pages 21 et 22.



Graphe 8: « Boîtes à Moustaches = boxplot » des méthodes de dosage de la chlorophylle a pour l'expérience en canaux dynamiques.

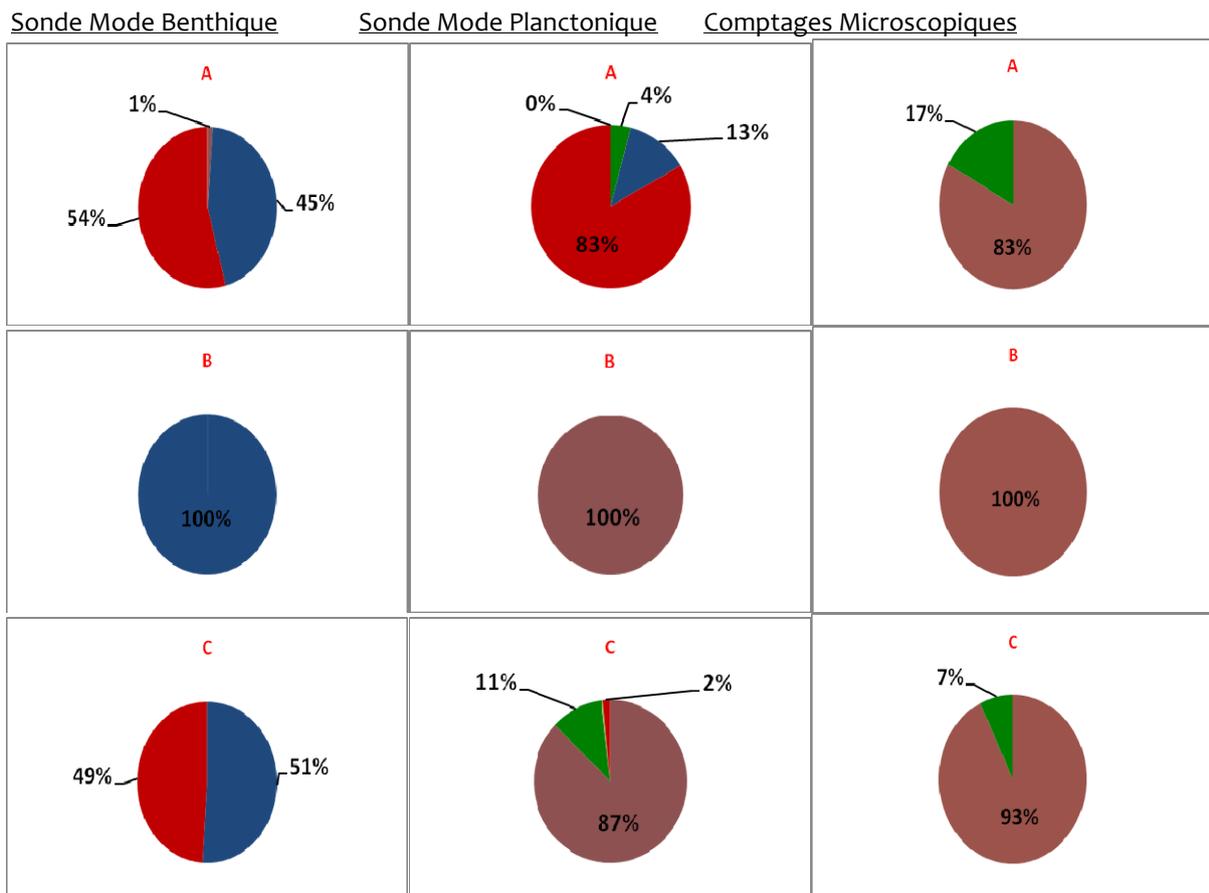
En revanche, sur ce graphe (graphe 11), avec calibration de l'appareil, la sonde BenthofluoroProbe donne des valeurs de biomasse par unité de surface plus fortes que le spectrophotomètre. Ce problème d'unité incorrecte peut être corrigé par la régression présente au graphe bis (dans le domaine de linéarité de relation entre spectrophotomètre et BenthofluoroProbe). Dans cette expérience, le mode planctonique de la sonde (FluoroProbe) donne les valeurs les plus comparables à la méthode de référence (spectrophotomètre).

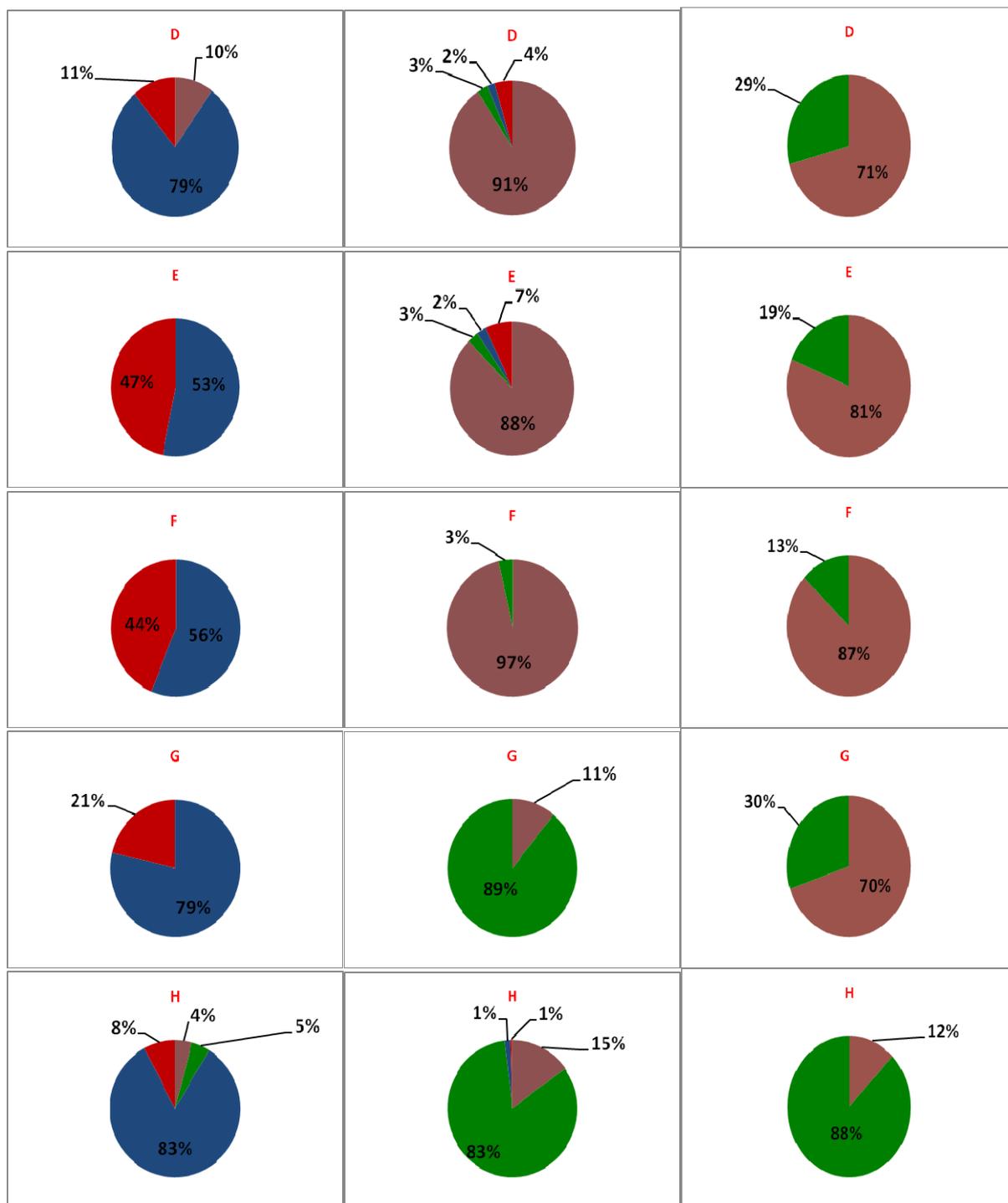
De plus, des valeurs aberrantes sont visibles sur ces deux graphes tant au niveau des résultats fournis par la sonde que ceux fournis par la méthode de dosage en laboratoire (valeurs « outlier⁵ » sortant des moustaches des boxplots). Ce qui laisse à penser que quelque soit la méthode utilisée pour doser la chlorophylle a, diverses natures d'erreurs et d'imprécisions (de manipulation, de conservation, de dosage,...) peuvent intervenir.

⁵ Valeur numérique éloignée du reste des données

2) Discrimination des groupes d'algues

Pour vérifier si le calibrage sur substrat de la sonde concernant les groupes algaux détectables est fiable, une culture d'algues (décrite aux pages 24 et 25) comprenant seulement deux groupes algaux (avec pour chacun une seule espèce) ont été réalisées. En plus du dosage de la chlorophylle *a* (par spectrophotométrie UV-visible) présente dans les biofilms colonisant les lames de verre de cette culture, des comptages algaux ont été fait au microscope inversé. Cependant, la sonde fournit une quantité d'algues (appartenant à un des quatre groupes calibrés de base) en fonction de la chlorophylle *a* attribuée à ce groupe, et les comptages ne fournissent qu'un nombre de cellule. Or une cellule n'équivaut pas à une unité de chlorophylle *a* ; en effet une cellule peut contenir plus ou moins de chlorophylle, ceci est fonction de plusieurs paramètres tel que le volume de la cellule, son état physiologique, l'intensité lumineuse que la cellule a pu recevoir,... Nous n'avons donc pu réaliser qu'une comparaison qualitative des proportions d'algues, en utilisant le biovolume des deux espèces d'algues obtenu à partir des comptages. Une comparaison de la composition algale de chaque lame de verre en fonction du mode de fonctionnement de la sonde (i) mode benthique avec la calibration du substrat « lame de verre » et (ii) mode planctonique).





Légende : Iatomées (brown), Vertes (green), Cyanobactéries (blue), Cryptophytes (red)
 A = lame de verre n°1 ; B = lame de verre n°2 ; C = lame de verre n°3 ; D = lame de verre n°4 ; E = lame de verre n°5 ; F = lame de verre n°6 ; G = lame de verre n°7 ; H = lame de verre n°8.

Graph 9: Composition algale des biofilms présents sur les 8 lames de verre donnée par la sonde en mode benthique, par la sonde en mode planctonique et par les comptages.

Huit lames de verre ont été observées après un gradient de temps de colonisation 12 jours (non linéaire, parfois tous les jours ou tous les deux jours).

D'après la sonde en mode benthique (graphe 12 : première colonne), seuls les groupes des cyanobactéries et des cryptophytes sont retrouvés de façon majoritaire sur les 8 lames de verre, excepté sur les lames 4 et 8 où des diatomées et des algues vertes ont été détectées par la sonde mais en faible quantité.

Le graphe 12 (deuxième colonne) présente la composition algale détectée par la sonde en mode planctonique. Cette composition est nettement différente de celle observée en mode benthique et de celle déterminée par les comptages au microscope. Les groupes des diatomées et des algues vertes sont retrouvés sur la plupart des lames de verre (en quantité variable). Les cryptophytes sont observées en quantité importante (83%) sur la lame de verre 1 et en faible quantité sur les lames 4 et 5 (4% et 7%). Sur la lame 2 seul des diatomées ont été détectées par l'appareil. Selon cette composition algale, un remplacement des diatomées par les algues vertes semble être observé au cours du temps. Les algues vertes passent de 3% (sur la première lame de verre) à 83% sur la dernière lame. Les diatomées, elles passent de 91% sur la lame 1 à 15% sur la lame 8.

D'après les observations microscopiques (graphe 12 : dernière colonne), seuls des diatomées et des algues vertes (figure 13) ont été observées ; ce qui coïncide bien avec l'inoculum de départ de l'aquarium (seul une algue verte et une diatomée ont été ajoutées à l'eau de l'aquarium). Ces deux groupes algaux sont retrouvés en quantités différentes selon les lames de verre. Cependant, une nette augmentation des algues vertes est constatée au cours du temps (17% d'algues vertes et 83% de diatomées sur la lame n° 1 et 88% d'algues vertes et 12% de diatomées sur la dernière lame de verre). Un remplacement de *Surirella angustata* (diatomée) par *Scenedesmus quadricauda* (algue verte) est observé.

Cependant lors de cette culture d'algues, les comptages au microscope et la sonde en mode planctonique ont montré une tendance intéressante : un remplacement des diatomées par les algues vertes. Ce remplacement peut être expliqué. En effet, le milieu de culture dans lequel les algues se sont développées est composé des nutriments essentiels à leur croissance. La silice, faisant partie de ces nutriments est utilisée exclusivement par les diatomées (leur frustule étant composée de silice). Ainsi, une fois que la totalité de la silice présente dans le milieu de culture a été utilisée par les diatomées, ces dernières ont vu leur croissance ralentir, laissant la place à la croissance des algues vertes (qui n'ont pas besoin de silice).

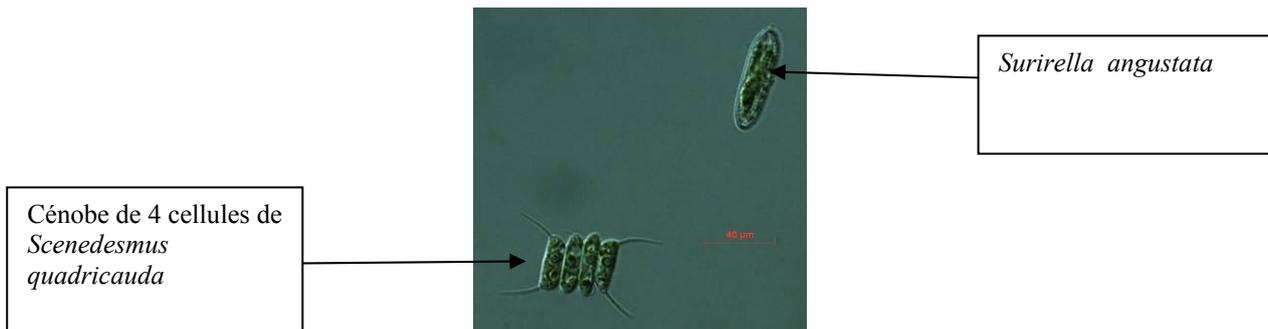


Figure 12: Photographie prise à partir d'échantillon formolé de la culture n°2.

3) Conclusion des tests

Les différences observées dans cette étude, entre les résultats obtenus avec la sonde et ceux obtenus avec le spectrophotomètre peuvent s'expliquer par les propriétés de fluorescence du substrat sur lequel sont effectuées les mesures. Cela peut donc interférer dans le sens d'une surestimation des valeurs de chlorophylle *a* obtenue. Une calibration du substrat, permet de définir ces propriétés et ainsi de corriger l'algorithme utilisé pour le calcul de la chlorophylle *a*. Or sur les expériences réalisées, une calibration du substrat permet de diminuer l'ordre de grandeur de la chlorophylle mais ne fournit toujours pas des valeurs sensiblement proches de celles obtenues avec une méthode de laboratoire. Il semblerait comme la montré l'étude de Aberle.N et al (2006), que le calibrage initial de la sonde concernant la chlorophylle *a* totale ne soit pas optimal.

Le mode planctonique de l'appareil a fait l'objet de quelques études. L'une d'elle avait déjà fait le constat de ce qui a à nouveau été observé dans cette étude, à savoir que les valeurs de chlorophylle *a* déterminées par la sonde sont inférieures aux valeurs obtenues par la même méthode de dosage de la chlorophylle *a* utilisée dans cette étude (Becker.A, 2008).

Cependant, les méthodes de dosage de la chlorophylle *a* (spectrophotométrie et sonde fluorimétrique) reposent toutes deux sur des principes différents, il est donc difficile d'évaluer la justesse de chaque méthode par rapport à la réalité. La méthode de laboratoire bénéficie d'une norme française et peut servir de référence dans sa gamme de validité. Cependant, la sonde détecte de faibles valeurs de chlorophylle en dessous du seuil de quantification de la méthode spectrophotométrique.

Quel que soit le mode de fonctionnement de la sonde (mode benthique et planctonique), il apparaît nécessaire d'effectuer une calibration de la chlorophylle *a* à partir d'échantillons de concentration connue afin d'améliorer la valeur quantitative de la mesure de la sonde (par rapport à la méthode de référence spectrophotométrique).

Selon les résultats obtenus, les coefficients de variations calculés diminuent avec une augmentation de la chlorophylle *a* et semblent se rapprocher d'une valeur de 15%. Le BenthofluoroProbe

donne donc bien des résultats « répétables » et d'autant plus fiables que la concentration en chlorophylle *a* tend à augmenter. Cette constatation est aussi faite concernant le mode planctonique (FluoroProbe) de l'appareil.

Concernant la discrimination des groupes algaux, ce qui a été constaté avec la culture d'algues présenté est que ni le mode benthique de l'appareil, ni le mode planctonique, ne fournissent la bonne composition algale des biofilms colonisant les lames de verre. En effet, le mode benthique et le mode planctonique de la sonde fluorimétrique détectent des groupes algaux qui sont absents de la culture ayant été réalisé.

Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer les résultats obtenus :

(i) La sonde fluorimétrique : FluoroProbe bbe, a été fabriquée dans le but de réaliser des suivis d'efflorescences d'algues toxiques en plans d'eau (= mode planctonique). Ainsi, elle a été initialement calibrée avec des espèces d'algues rencontrées essentiellement en plans d'eau (algues libres). Ceci peut expliquer, la difficulté de distinguer des algues qui sont majoritairement des algues fixées (composant les biofilms) et qui ne correspondent généralement pas aux espèces retrouvées en plans d'eau. Or la sonde va chercher à classer ces algues en fonction de leur émission, dans le groupe qui correspondra le mieux d'après la fluorescence émise. Ce groupe peut être très éloigné de celui auquel appartient cette algue. Il se pose alors le problème de la reconnaissance de ces algues n'appartenant pas aux quatre groupes discriminés (Becker A., 2008).

(ii) Il est aussi possible que le type de substrat (naturel ou non) intervienne dans cette distinction des algues. En effet, chaque substrat possède des propriétés de fluorescence et de réflectance qui lui sont propres. Or, une calibration du substrat dans cette étude n'a pas réellement permis d'obtenir de meilleurs résultats concernant la distinction des groupes algaux. Le substrat sur lequel la plupart des mesures ont été effectuées dans cette étude est du verre. Le verre étant transparent, cela a pu interférer dans la réémission de la fluorescence détectée par la sonde et ainsi induire des erreurs d'interprétation.

(iii) L'épaisseur du biofilm colonisant les lames de verre peut aussi être à l'origine de cette mauvaise distinction des algues. En effet, plus le biofilm sera épais, moins la lumière émise par la sonde pénétrera et moins de fluorescence (ou une fluorescence différente de la réalité) sera réémise, ce qui induira des erreurs. Cette hypothèse a déjà été émise dans une étude concernant la sonde en mode benthique (Aberle N., et al, 2006) et cette hypothèse est aussi valable pour tenter d'expliquer les différences de valeurs de chlorophylle *a* obtenue avec la sonde et celle fournie par le spectrophotomètre.

La sonde offre la possibilité de calibrer les groupes algaux pouvant être détectés. Ainsi, en fonction de l'utilisation qu'il en est fait (mode planctonique ou mode benthique), il apparait nécessaire d'effectuer

une calibration de la sonde en fonction des espèces qui seront potentiellement rencontrées lors des mesures ou au moins des groupes algaux benthiques qui seront rencontrés.

IV. Application de la sonde

Effet du niveau trophique

Lors de la récolte des biofilms naturels servant aux expériences en microcosmes, des mesures au BenthofluoroProbe ont été réalisées sur des biofilms naturels en place dans les cours d'eau (mesures in situ décrites dans la partie II.4).a. aux pages 19 et 20). En effet, la sonde possède l'avantage de pouvoir être facilement utilisable sur le terrain. Ainsi, nous avons donc voulu tester si ses fonctions (paramètres de bases : profil de substrat « pierre ») permettaient de déceler des différences au niveau de la concentration en chlorophylle *a* présente dans les biofilms épilithiques en fonction du niveau trophique de l'eau.

Le niveau trophique d'un hydrosystème peut être défini comme le degré d'enrichissement en nutriments de l'eau et conditionner la quantité de biomasse végétale produite. Cependant, ces dernières décennies est apparu un phénomène pourtant naturel mais étant accéléré par les activités anthropiques : l'eutrophisation des milieux aquatiques.

« **L'eutrophisation** est un phénomène d'enrichissement des eaux continentales ou littorales en sels minéraux nutritifs (phosphates, nitrates,...) résultats de phénomènes naturels. Il en résulte une prolifération d'algues et de plantes supérieures aquatiques qui conduit à une désoxygénation des couches profondes des eaux » (Ramade F., 1993). Une distinction est faite entre le phénomène d'eutrophisation naturel et le phénomène d'enrichissement du aux activités humaines, appelé alors « dystrophisation d'un hydrosystème ».

Ainsi, les outils d'évaluation du statut trophique des milieux aquatiques d'eau douce (nécessaires afin de caractériser l'état d'un milieu) portent en particulier sur :

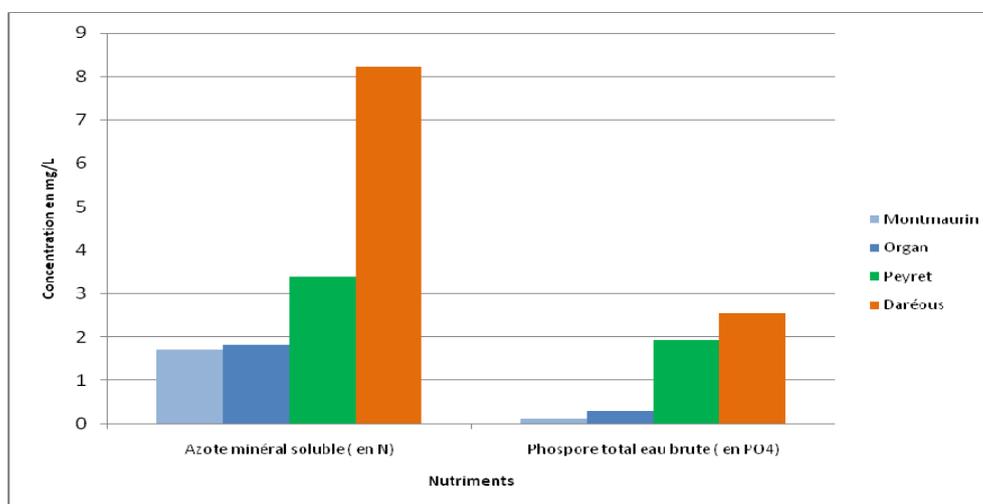
- La **teneur en phosphore** de la colonne d'eau, car c'est l'élément phosphore qui est reconnu comme étant le facteur limitant de la croissance des algues en eaux douces ;
- **L'étude du comportement phytoplanctonique** (Othoniel.C, 2006).
- Selon les grilles du SEQ, d'autres paramètres peuvent identifier ou expliquer l'état d'eutrophisation.

ALTERATION	PARAMETRES MESURES
Matières phosphorées	PO_4^{3-} Phosphore total
Nitrates	NO_3^-
Matières azotées	NH_4^+ N_x NO_2^-

} = Causes

Figure 13: Paramètres utilisés dans le cadre de l'évaluation de l'état d'eutrophisation des milieux aquatiques d'eau douce.

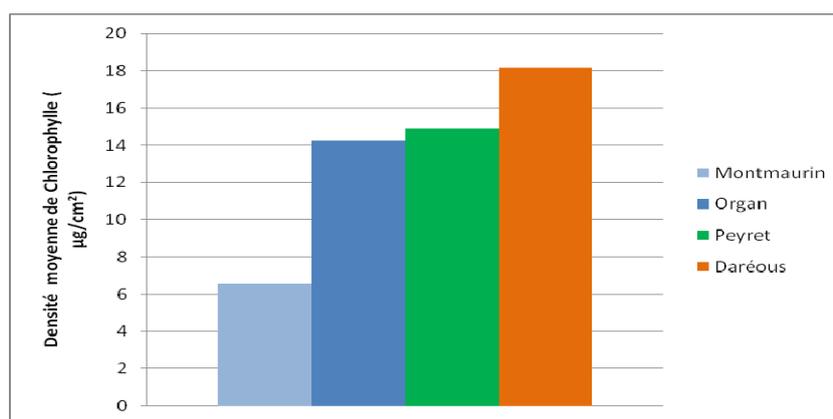
A l'aide des données récupérées de cette campagne de terrain, les niveaux de trophie des eaux de quatre stations de terrain ont été caractérisés en fonction de leurs concentrations en nutriments (graphe 14).



Graphe 10: Caractérisation du niveau trophique de quatre stations différentes selon la concentration en nutriments.

Un milieu eutrophe est un milieu riche en éléments nutritifs (essentiellement azote et phosphore) avec ou sans effets négatifs, contrairement à un milieu oligotrophe nettement plus pauvre en nutriments. Deux stations apparaissent comme étant des stations eutrophe : Daréous (sur la rivière Sousson) et Peyret (sur la rivière La Gèze). En effet, elles possèdent les plus fortes concentrations en azote minéral soluble, en PO_4 et en phosphore total. Les deux autres stations : Organ (sur la Gèze) et Montmaurin (sur la Save) sont plutôt caractéristiques de milieux oligotrophes (elles sont pauvres en azote et en phosphore).

Le graphe 15 présente les résultats d'estimation de la biomasse en place obtenus à la suite des mesures effectuées au Benthofluoroprobe sur les cailloux de chaque station.



Graphe 11: Densité moyenne de chlorophyll a totale pour les quatre stations.

Les stations ayant les plus fortes densités en chlorophyll a sont Daréous et Peyret. Montmaurin étant la plus faible station au niveau de la quantité de chlorophyll (graphe 15).

Les éléments nutritifs (essentiels au développement des algues) influent donc sur la croissance des végétaux. C'est le compartiment algal (algues libres et fixées) qui est le principal compartiment impliqué dans les phénomènes d'eutrophisation. Sous l'effet d'une augmentation massive des concentrations en nutriments au sein d'un milieu aquatique (= milieu eutrophe), un développement excessif des communautés algales peut être observé. Ce développement excessif d'algues, entraîne entre autre une augmentation de la concentration en chlorophylle *a* (dans la colonne et d'eau et dans les biofilms) (Othoniel C., 2006).

Les stations eutrophes présentent généralement un développement algal plus important, ainsi les stations Daréous et Peyret (qui sont bien des stations eutrophes au niveau de la concentration en nutriments) semblent plus riches au niveau de la production algale que les stations Organ et Montmaurin qui sont des stations oligotrophes.

Remarque : Othoniel (2006) a montré que le paramètre le plus influencé par l'eutrophisation est la croissance instantanée des biofilms en phase active de croissance . Sur des biofilms plus âgés portés par les substrats naturels, d'autres variables (hydrodynamique, éclaircissement, température, broutage, bullage) peuvent conditionner une sélection, une abrasion ou une sénescence plus ou moins rapide. Cette liaison entre niveau de nutriment et biomasse en place est donc forte sur biofilm jeune colonisant des substrats naturels ou artificiels, elle se dégrade sur des biofilms plus ou moins âgés ayant subi différents facteurs de forçages.

Dans notre expérience, le gradient général de trophie des stations est bien restitué par les mesures au Benthofluoroprobe. Par contre, du fait de l'historique non maîtrisés des biofilms, les densités moyennes de chlorophylle *a* d'Organ et de Peyret rendent imparfaitement compte du gradient d'enrichissement en nutriments révélés par les analyses d'eau.

Globalement, la sonde fournit donc bien des résultats cohérents et attendus par rapport au gradient de niveau trophique des stations déterminé à l'aide de la concentration en nutriments.

Intérêt de la sonde

La sonde en mode benthique possède donc la capacité de réaliser des suivis réguliers de la croissance de biofilms sans détruire le matériel biologique, permettant des suivis dynamiques du même matériel et apportant de précieuses informations de manière instantanée et simple. Selon les situations, elle rend relativement bien compte (biofilms jeunes) ou avec une atténuation (biofilms épais) de la biomasse en place par rapport à la technique de référence.

Elle est plus sensible que la méthode de référence au niveau des basses concentrations (seuil de quantification abaissé). Elle donne une réponse en général surévaluée par rapport à la technique de référence (chlorophylle *a* totale/unité de surface), réponse qui peut être calibrée au moyen d'une courbe de régression pour recalculer des valeurs comparables à celles de la technique spectrophotométrique (voir

Grphe 5 page 28) . Il existe une régression linéaire de très bonne qualité dans le domaine 0 à $0,7\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Par contre, pour des valeurs de biomasses supérieures à ce plafond (biofilms trop épais), on sort du domaine de linéarité de réponse entre ces 2 techniques et la technique spectrophotométrique sera celle donnant les résultats les plus fiables.

L'utilisation de la sonde sur les biofilms épilithiques peut aussi renseigner sur certaines conditions de forçage environnemental.

1) De longue date, le compartiment du biofilm a été largement reconnu comme pouvant être utilisé dans les démarches d'évaluation de la **qualité générale de l'eau**. En effet, le biofilm possède des caractéristiques lui permettant d'être efficace en termes de bioindication :

- son ubiquité
- sa sensibilité aux modifications environnementales, y compris à de faibles variations
- son faible temps de génération
- la possibilité de le quantifier facilement de manière fiable et reproductible.

C'est ce qui a présidé à la création d'indices diatomiques capables de rendre compte de la qualité générale des milieux aquatiques (IPS, Coste 1982, IBD Coste & al 1996, IBD 2006 Coste & al 2008).

2) D'autre part, la détermination de la chlorophylle *a* présente dans les biofilms peut être un paramètre aidant à renseigner le niveau trophique de l'eau ou le **statut trophique du cours d'eau**. Cependant, de nombreux auteurs ont travaillé sur les corrélations entre les quantités de biofilm trouvées dans les rivières sur substrats naturels et les charges en nutriments de l'eau (Biggs B.J.F. et al, 1989) soulignant souvent l'efficacité relative de ce type de relation.

(Othoniel C., 2006) a montré que le biofilm pouvait être un maillon plus intéressant pour rendre compte du statut trophique si l'on s'intéressait, non pas à la biomasse en place, mais plus particulièrement à sa vitesse de croissance. Le biofilm est davantage sensible aux conditions externes du milieu et révèle mieux l'enrichissement trophique lorsqu'il est jeune, fin et en phase de croissance active. Il y a donc là un cadre d'utilisation particulièrement intéressant : le BenthofluoroProbe permet de s'intéresser à la vitesse de croissance des biofilms en cours d'eau pour le diagnostics de l'eutrophisation, sous réserve d'être utilisé sur biofilms jeunes ne provoquant pas encore une atténuation de l'excitation de la sonde par l'acquisition d'une épaisseur excessive (valeur de biomasse inférieure ou égale à $0,7\mu\text{g}/\text{cm}^2$), voir graphe bis. De plus, dans l'optique de cet usage, cet appareil a fait la preuve de sa sensibilité pour détecter de faibles biomasses (résultats plus sensibles que ceux de la méthode spectrophotométrique).

La sonde fluorimétrique fournit des mesures et des tendances généralement très proches de celle indiquées par la méthode spectrophotométrique (qui est largement utilisée). La sonde semble donc être un

appareil de mesure complémentaire, fournissant des informations qui peuvent s'avérer particulièrement intéressantes pour des suivis dynamiques, puisque les mesures sont non destructrices. Elle peut fournir des informations de monitoring au jour le jour qui pourront être complétés ensuite par des analyses plus approfondies sur le biofilm mesuré (allant d'analyses chimiques ou biochimiques globales à des descripteurs plus fins des communautés en place).

Par contre, dans l'état, l'information qualitative sur les groupes d'algues en présence n'est pas fiable, dans le cas des algues benthiques que nous avons rencontrées dans nos cycles expérimentaux. L'appareil devrait être ré-étalonné avec des signatures spectrales propres aux communautés algales benthiques présentes dans le contexte biogéographique de notre pays. Des travaux ultérieurs seront probablement entrepris dans ce sens.

CONCLUSION

Dans cette étude, la sonde fluorimétrique : FluoroProbe, bbe et son adaptateur benthique ont été testés. Afin de mettre au point un protocole d'utilisation, les tests se sont essentiellement déroulés en laboratoire. Ainsi, la fiabilité de la sonde et de son adaptateur a été déterminée en comparant les résultats obtenus avec ceux fournis par des méthodes de laboratoire (technique spectrophotométrique, classiquement utilisée et servant de référence).

Le FluoroProbe est un appareil utilisant la fluorescence des pigments algaux afin de quantifier la chlorophylle *a* et de déterminer la proportion relative de quatre groupes d'algues. La sonde possède aussi deux modes de fonctionnement : un mode planctonique (adapté aux plans d'eau où la sonde est entièrement immergeable) et un mode benthique (mesures relatives aux biofilms algaux ayant colonisé divers substrats, à l'aide d'une fibre optique). Le mode planctonique ayant déjà été étudié à plusieurs reprises (l'appareil a été en premier lieu conçu pour ce type d'usage), il était intéressant de se pencher sur le mode benthique. En effet, la mise en place de la DCE entraîne la nécessité de développer des outils de diagnostic de l'état des milieux aquatiques. Bon nombre d'outils ont été développés depuis ces dix dernières années et certains utilisent des organismes bio-indicateurs. Parmi ces organismes, nous pouvons citer les diatomées (algues brunes, composant majeur des biofilms épilithiques) utilisées pour leur capacité bio-intégratrice des conditions environnementales. La sonde BenthofluoroProbe (mode benthique) permettant de réaliser des mesures sur divers substrats où se développent des biofilms phytobenthiques, il était intéressant d'évaluer le potentiel de cet appareil à étudier les biofilms (quantité de chlorophylle *a*, composition algale).

Au vu des résultats que nous avons obtenus dans cette étude, nous pouvons en conclure que la sonde et son adaptateur benthique possède certains avantages non négligeables, mais qu'elle possède aussi des limites dont certaines ont pu être précisées.

Avantages

Ainsi, la sonde permet de réaliser des mesures sans détruire le matériel biologique présent sur les substrats, de manière simple et rapide (mesures instantanées). Elle renseigne sur la quantité de chlorophylle *a* présente au sein des biofilms. La sonde peut donc être utilisée pour effectuer des suivis réguliers de la croissance des biofilms épilithiques et pour détecter des variations de cette concentration ou quantité de chlorophylle *a* par unité de surface selon les conditions environnementales. En effet, même si les résultats ont présenté une nette surestimation de la quantité de chlorophylle *a* (ou sous estimation dans le cas du mode planctonique), la sonde détecte sensiblement les mêmes variations et tendances que la méthode spectrophotométrique. Une première courbe de calibration de la relation Benthofluoroprobe-technique spectrophotométrique de référence a pu être produite, elle sera à affiner avec plus de données dans plus de gammes de valeurs. Une gamme de linéarité de cette relation a pu être cernée, avec un excellent R^2 . La sonde peut donc être complémentaire des autres méthodes qui sont souvent destructrices, longues et fastidieuses. Elle est performante dans les faibles valeurs de biomasse, au contraire de la technique de référence (dont le seuil de quantification est de $0,1 \mu\text{g Chl.a/cm}^2$).

Limites

Le principe de fonctionnement de l'appareil (excitation lumineuse, puis mesure de l'émission de fluorescence ré émergente) rencontre une difficulté technique en cas de biofilms épais : atténuation de la pénétration de l'excitation lumineuse occasionnant un défaut de linéarité dans la courbe concentration en Chl*a* (analyse de référence au spectrophotomètre) - réponse fluorescente (mesure du BenthofluoroProbe).

La gamme de valeurs valides dans laquelle peut être utilisé le BenthofluoroProbe a été précisée (0 à $0,7 \mu\text{g/cm}^2$).

Concernant la distinction des groupes algaux, les résultats de l'étalonnage d'usine ne sont pas convaincants. En effet, les expériences réalisées ont permis de constater que le calibrage de base de l'appareil, concernant les groupes algaux définis initialement, n'était pas adapté au mode benthique (il ne semble pas adapté à la réponse spectrale des groupes algaux composant nos biofilms). De plus, la possibilité de calibrer l'appareil au niveau du substrat n'a pas réellement apporté une optimisation de ces résultats d'abondance relative des différents groupes algaux. Il faudra donc probablement ré-étalonner cet appareil à partir de flores contrôlées de biofilms phytobenthiques appartenant à notre contexte biogéographique

L'utilisation de la sonde FluoroProbe bbe, et son adaptateur benthique ne peut pas remplacer les méthodes classiquement utilisées dans l'étude des biofilms épilithiques. Elle permet cependant de réaliser des observations et de fournir des informations qui permettront de prendre des décisions concernant des analyses plus fines. Afin de pouvoir envisager l'utilisation de la sonde comme une aide au diagnostic de

l'état d'un milieu, il est nécessaire de réaliser d'autres études. Déterminer la fiabilité de l'appareil avec des calibrages adaptés à l'utilisation qui en sera faite et approfondir les possibilités de calibration du substrat.

Références Bibliographiques

Références citées :

Aberle N., Beutler M., Moldaenke C. & Wiltshire K.H., 2006. "Spectral fingerprinting" for specific algal groups on sediments *in situ*: a new sensor." *Arch. Hydrobiology*, 167 (1-4), pp. 575-592.

Becker A., 2008. "Mise au point et application *in situ* d'une sonde fluorimétrique." Rapport de stage de licence professionnelle « Mesure de la qualité des milieux », IUT du Limousin. 50 p.

Beutler, M., K. H. Wiltshire, et al. (2002). "A fluorometric method for the differentiation of algal populations *in vivo* and *in situ*." *Photosynthesis Research* **72**, pp. 39- 53.

Biggs B.J.F., 1996. "Patterns in benthic algae of streams". In *Algal Ecology - Freshwater Benthic Ecosystems*, R.J. Stevenson, M.L. Bothwell & R.L. Lowe (eds), San Diego, Academic Press, pp. 31-56

Leboulanger C., Dorigo U., Jacquet S., Le Berre B., Paolini G., Humbert J.F., 2002. « Application of a submersible spectrofluorometer for rapid monitoring of freshwater cyanobacterial blooms : a case study. » *Aquatic Microbial Ecology*, vol.30, pp.83-89

Lorenzen C.J., 1967. "Determination of chlorophyll and pheopigments: spectrophotometric equations". *Limnology and Oceanography*, 12, pp. 343-346

Othoniel C., 2006. « La croissance du biofilm photosynthétique : un indicateur du statut trophique des rivières ? » Thèse de doctorat de Biogéochimie de l'environnement, Université de Bordeaux 1, 305 p.

Strickland J.D.H., Parsons T.R., 1998. "A practical handbook of seawater analysis". *Pigments analysis*.

Autres références non citées :

Denest T., Pinelli E., Coste M., Silvestre J., Mazella N., Madigou C., Delmas F., 2009. « Sensitivity of freshwater periphytic diatoms to agricultural herbicides ». *Aquatic toxicology*, AQTOX- 2539, 7 p.

Hartig P., Wolfstein K., Lippemeier S., Colijn F., 1998. « Photosynthetic activity of natural microphytobenthos populations measured by fluorescence (PAM) and ¹⁴C-tracer methods : a comparison . » *Marine Ecology Progress Series*, vol.166, pp.53-62.

Sabater S., 2009. "Diatoms". *Encyclopedia of Inland Waters*, vol.1, pp.149-156.

Schmitt-Jansen M., Altenburger R., 2005. "Toxic effects of isoproturon on periphyton communities – a microcosm study". *Estuarine Coastal and Shelf Science*, pp. 539-545

Udo N., Geffke T., Balasubramanian R., Popenbrock J., Braune M., Scheerbaum D., 2003. "Effects of the herbicide Metazachlor on phytoplankton and periphyton communities in outdoor mesocosms". *Acta. Hydrochim. Hydrobiol.*, pp. 482-490

Annexe1

Milieu WC (ou de Woods Hole)

Guillard et Lorenzen (1972) Yellow-green algae with chlorophyllide c. *Journal Of Phycology* 8:10-14

Ce milieu a aussi été utilisé pour l'expérience en canaux dynamiques (testant le S-Métolachlore) mais les volumes ajoutés dans les aquariums ne correspondent pas à ceux décrit dans ce tableau.

Ce tableau correspond aux volumes de nutriments utilisés pour la culture des deux algues (algue verte et diatomée).

	Concentration en g/L	Volume ajouté dans l'aquarium
Macronutriments		
K_2HPO_4	8.71	5 ml
$NaNO_3$	68.01	5 ml
$Na_2SiO_3, 9H_2O$	28.42	5 ml
$NaHCO_3$	12.6	5 ml
$CaCl_2, 2H_2O$	36.76	5 ml
$MgSO_4, 7H_2O$	36.97	5 ml
Micronutriments		
Na_2EDTA	4.36	5 ml
$FeCl_3, 6H_2O$	3.15	5 ml
$CuSO_4, 5H_2O$	0.01	5 ml
$ZnSO_4, 7H_2O$	0.022	5 ml
$CoCl_2, 6H_2O$	0.01	5 ml
$MnCl_2, 4H_2O$	0.18	5 ml
$Na_2MoO_4, 2H_2O$	0.0006	5 ml
H_3BO_3	1	5 ml
Vitamines		
Thiamine.HCL	0.1	5 ml
Biotine	0.0005	5 ml
B12	0.0005	5 ml

Annexe 2

Le calcul de la concentration en chlorophylle *a* à été déterminée à partir de la formule de Lorenzen (1967) selon l'absorbance mesurée au spectrophotomètre :

$$C_{hia} = [27 ((\lambda_{665} - \lambda_{750}) - (\lambda_{a665} - \lambda_{a750})) * v] / l * V$$

λ = Absorbance mesurée à différentes longueur d'ondes : 665 nm, 750nm

a= échantillon acidifié

v= Volume de solvant (ici acétone)

l= Longueur de la cuve de mesure (ici 1cm)

V= Volume d'eau filtrée

Annexe 3

Cette annexe présente le mode opératoire détaillé de la sonde fluorimétrique (mode planctonique et mode benthique) utilisé par les agents du Cemagref de Bordeaux.

1) OBJET

Ce mode opératoire a pour but de décrire de manière succincte l'utilisation de la sonde Fluoroprobe de la marque bbe – Moldenke et du logiciel fourni.

2) DOMAINE D'APPLICATION

Ce document s'adresse aux permanents et non permanents de l'équipe hydrobiologie qui sont amenés à faire des mesures de chlorophylle et de la proportion des groupes algaux présents dans un plan d'eau. Suivant le contexte l'utilisation pourra se faire à l'intérieur de l'enceinte du groupement de Bordeaux ou *in situ* à l'extérieur du groupement.

3) LES REFERENTIELS

 Pour les caractéristiques supplémentaires du matériel :

bbe Fluoroprobe - User manual version 1.9 E7, 08/07

4) DEFINITIONS

Algue : Organisme végétal principalement aquatique, souvent de taille microscopique qui ne possède ni racines, ni fleurs, ni graines mais qui est capable de produire de la matière organique par photosynthèse. C'est un producteur primaire.

Chlorophylle : Pigment vert des végétaux permettant la photosynthèse.

Chlorophycée : Ce sont principalement des algues vertes d'eau douce qui peuvent être unicellulaires, coloniales ou filamenteuses.

Cryptophyte : Algue unicellulaire et flagellé, incolore, rouge ou bleue.

Cyanobactérie : Bactérie photosynthétique contenant de la chlorophylle et d'autres pigments tels que la phycocyanine de coloration bleue-verte ou rougeâtre. Plusieurs espèces sont toxiques (microcystines,...)

Diatomée : Microalgue unicellulaires planctonique de couleur brune dont la membrane est entourée d'une coque siliceuse.

Mode Opératoire : Document décrivant la manière spécifiée de réaliser une ou des opérations techniques lors de la réalisation d'un essai.

Substances jaunes : particules qui ne sont pas des algues mais qui émettent tout de même une fluorescence.

5) LES ABREVIATIONS UTILISEES

D.Q.D, Délégué Qualité d'une Unité

N.F, Norme Française.

QEBX, Unité Qualité des Eaux du Groupement de Bordeaux

D.M.U. Délégué Métrologie de l'Unité.

LC Laboratoire de chimie de QEBX.

6) DESCRIPTION DU SYTEME

6.1) INTRODUCTION

La Fluoroprobe est un instrument de terrain utilisée pour l'analyse des milieux aquatiques. Elle mesure les différents paramètres suivants :

- la profondeur;
- la température ;
- la transmission ;
- la concentration en chlorophylle a totale reflétant ainsi la quantité d'algues présentes dans le milieu ;

Rappel : La chlorophylle a est la seule présente chez tous les végétaux.

- la proportion des différents groupes algaux cités ci dessous :

Les algues vertes ou chlorophycées ;
Les cyanobactéries ;
Les diatomées ;
Les cryptophytes ;
Les substances jaunes.

6.2) PRINCIPE DE FONCTIONNEMENT

Le principe de fonctionnement est le suivant : la sonde émet un rayon lumineux grâce à des LED et cela à six longueurs d'ondes différentes (370 nm, 470 nm, 525 nm, 570 nm, 590 nm et 610 nm). Les pigments contenues dans les algues (chlorophylle : a,b, c et d) sont alors excités et émettent une fluorescence, proportionnelle à leur densité et à la distribution des pigments. Cette fluorescence est alors quantifiée par la sonde et est donc, spécifique à un groupe algal.

6.3) MATERIEL

Le système est composé :

- d'une sonde de mesure « la Fluoroprobe » ;
- d'un CD de configuration des paramètres de mesures « Parameter TS 17-10 » ;
- d'un CD de configuration port USB « USB TO RS-485 » ;
- d'un chargeur ;
- d'une prise secteur ;
- de câbles terrain: 20m, 100m ;
- d'un câble laboratoire ;
- d'un câble raccord USB ;
- d'un adaptateur benthique ;
- d'un sac support.

6.4) PREMIERE UTILISATION

- Installer sur l'ordinateur de terrain le logiciel permettant de piloter l'appareil (dossier zip intitulé «InstallFluoroprobe»).

Remarque : A chaque ouverture du logiciel, une fenêtre apparaîtra pendant quelques secondes et indiquera la version du logiciel. Penser à télécharger les mises à jour.

- Installer le « CD USB TO RS-485 » afin de définir sur quel port USB la sonde sera branchée. Ce port sera identique pour les prochaines utilisations.
- Ensuite, brancher l'appareil à l'ordinateur à l'aide du *câble raccord USB* et du *câble laboratoire*. Ouvrir le logiciel, aller dans le menu « Probe » puis sélectionner « Setup Port ». Cela peut aussi bien être le port 1 que le port 8, ne pas hésiter à tester les ports jusqu'au message « Probe is ready ».

6.5) MISE EN CHARGE

Avant chaque campagne de terrain, il faut recharger la batterie de la sonde. Pour cela :

- Relier la fluoroprobe au chargeur à l'aide du *câble laboratoire*. Puis brancher l'ensemble sur le secteur.

Remarque: Lors de la mise en charge, il est possible que la diode verte s'allume dès le branchement du chargeur sur le secteur même si la batterie n'est pas chargée. Dans ce cas elle s'éteint au bout de quelques minutes, et la charge s'effectue. Pour éviter un problème de charge, avant utilisation brancher au moins ¼ d'heure pour vérifier que la diode verte reste bien allumée.

7) MESURE EN MODE « PLANCTONIQUE »

7.1) TELECHARGEMENT DES PARAMETRES DE MESURE

Pour utiliser la fluoroprobe en mode « colonne d'eau », il faut récupérer au préalable les paramètres de mesure sur le CD fourni « Parameter TS 17-10 ». Cette opération peut être effectuée avant votre départ.

Relier la fluoroprobe à l'ordinateur à l'aide du *câble laboratoire* et du *câble raccord USB*. A l'ouverture du fichier, sélectionner le dossier « TS 17-10 calib 091107 ». Le logiciel s'ouvre, les paramètres sont visibles dans l'onglet « common parameters ». Cliquer sur « Send » pour envoyer les paramètres à la sonde.

L'opération est alors finie. Débrancher l'appareil.

7.2) MONTAGE ET CONFIGURATION DE L'APPAREIL

Faire le montage de l'appareil comme défini ci-dessous :

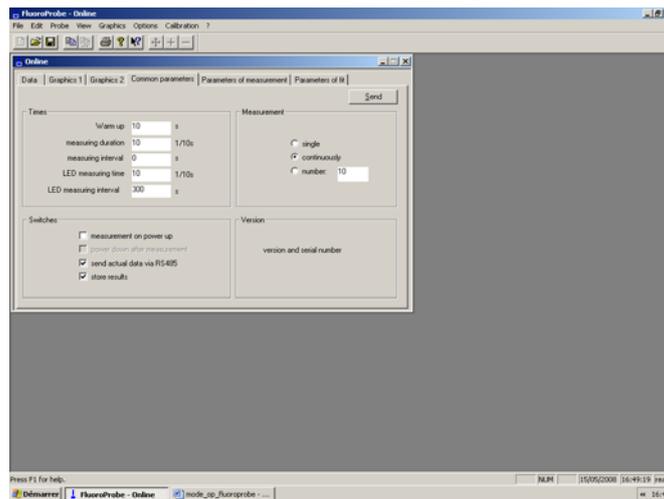
- Selon la profondeur du milieu étudié, relier la sonde au câble adéquat : 20 m ou 100m. Graisser la connexion pour garantir l'étanchéité.
- Relier le câble à la connexion USB ;
- Brancher la connexion USB à l'ordinateur.

Ensuite, récupérer les paramètres de mesure de la façon suivante :

- Ouvrir le logiciel
- dans le menu cliquer sur « Probe »
- puis sur « Get data / parameters »
- une boîte de dialogue s'affiche, cliquer sur « parameters only ».

Il est également possible de récupérer les paramètres de la précédente campagne dans le cas où les mesures étaient réalisées également en mode planctonique. Le téléchargement des paramètres de mesures n'est alors pas nécessaire.

Enfin, effectuer les ajustements nécessaires dans la fenêtre « Common parameters » selon les indications ci-dessous et cliquer sur « Send ».



Times : Attention ! Seul le paramètre « measuring interval » peut être modifié ! Les autres sont des configurations de l'appareil et ne doivent pas être changées.

Measurement : Définir le mode de mesure souhaité (simple, en continu ou un nombre défini)

Switches :

Cocher la ligne « send actual data via RS485 », cette fonction permet d'envoyer les données vers l'ordinateur,

Cocher « store result » pour stocker les données dans la sonde.

7.3) ETALONNAGE DE LA PRESSION

SELECTIONNER / ACTIONNER	Affichage	Remarques
Probe		En cas d'oubli il est possible de rentrer ce paramètre après avoir consulté les données météorologiques du jour. Les résultats seront automatiquement recalculés.
Set air pressure	Boîte de dialogue affichant la pression atmosphérique	
Apply		

7.4) CALIBRATION DES OFFSETS

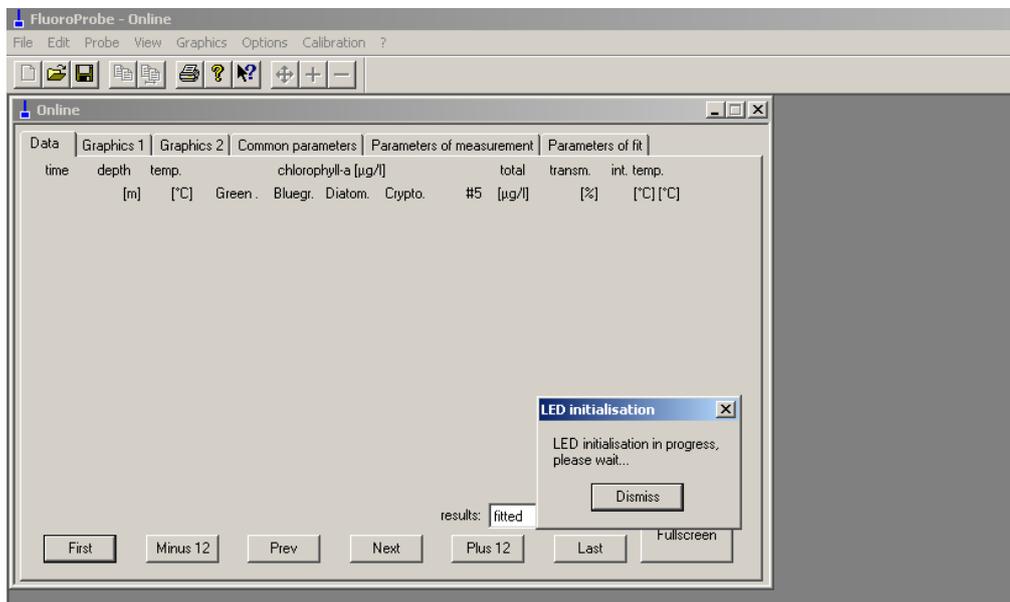
- Plonger la sonde dans de l'eau déminéralisée.
- Dans le menu « Calibration », sélectionner « Offsets distilled ».S'il y a des données enregistrées dans la sonde, un avertissement (« warning ») s'affiche : en effet le recalibrage entraîne un nouveau calcul des anciens résultats. Cliquer sur OK pour continuer.
- Une boîte de dialogue s'affiche, cliquez sur « Start ».
- Un avertissement (bug du logiciel) s'affiche : cliquer sur OK pour continuer.

La sonde effectue 10 mesures. Une fois terminée, cliquer sur « Apply » pour prendre en compte les nouvelles valeurs.

La sonde est maintenant prête pour effectuer les mesures.

7.5) REALISATION DES MESURES

Après avoir plongé la sonde dans l'eau, appuyez sur la touche F5 du clavier ou passer par le menu : « Probe » puis « Start measurement ». La fenêtre ci-dessous apparaît. **Attention : ne pas cliquer sur Dismiss.**



Vous pouvez visualiser les mesures via l'onglet « Data », ainsi que par les onglets « Graphics 1 » et « Graphics 2 » qui tracent des courbes en temps réel.

Pour arrêter les mesures, appuyer sur la touche F6 ou passez par le menu : « Probe » puis « stop measurement »

Pour reprendre les mesures, passez par le menu « Probe » puis « continue measurement » (pas de raccourci clavier)

Une fois les mesures effectuées, enregistrer les données obtenues.

8) MESURE EN MODE « BENTHIQUE »

L'adaptateur Benthofluoroprobe permet d'utiliser la Fluoroprobe pour des mesures sur substrats benthiques.

Attention : ne pas plier le câble de l'adaptateur, risque de briser la fibre optique

8.1) TELECHARGEMENT DES PARAMETRES DE MESURES

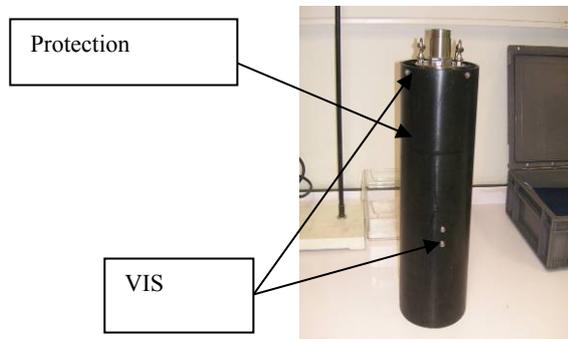
Pour utiliser la fluoroprobe en mode « benthique », il faut récupérer au préalable les paramètres de mesure sur le CD fourni « Parameter TS 17-10 ». La fluoroprobe doit être reliée à l'ordinateur.

A l'ouverture du fichier Sélectionner, le dossier « BF 17-10 kalib 161107 ». Le logiciel s'ouvre, les paramètres sont visibles dans l'onglet « common parameters ». Cliquer sur « Send » pour envoyer les paramètres à la sonde.

8.2) MONTAGE ET CONFIGURATION DE L'APPAREIL

Faire le montage de l'appareil comme défini ci-dessous :

- A l'aide d'un tournevis cruciforme (non fourni), dévisser les 8 vis et retirer la protection (attention aux rondelles).

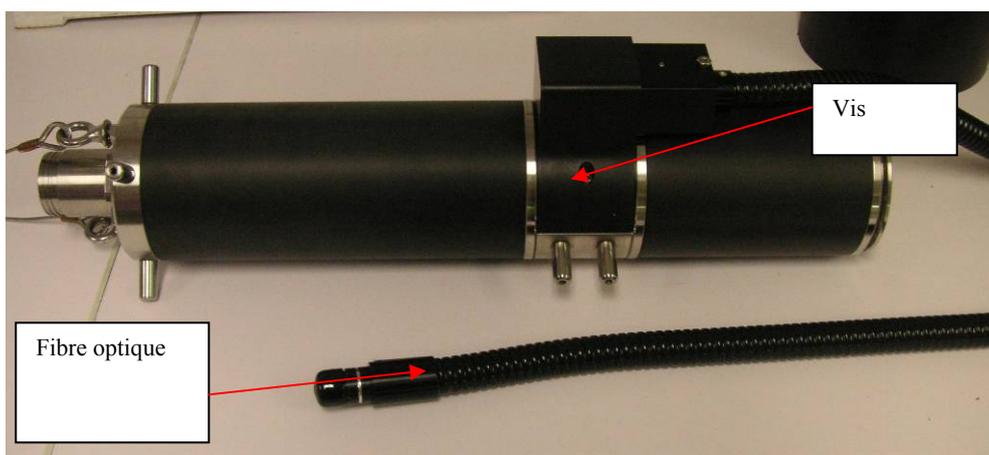


Fluoroprobe avec protection.



Fluoroprobe sans protection

- Insérer l'adaptateur benthique dans l'orifice, câble vers le bas, et le fixer avec 2 vis et le tournevis fournis.
Cf. photo ci-dessous.



- Enfin, fixer sur la fibre optique l'embout qui permettra de mettre en contact l'appareil avec le substrat lors des mesures. Il existe deux types d'embouts qui sont à choisir en fonction de l'éclairage :

- Embout en mousse rouge ; plutôt utilisé en milieu obscur



- Embout noir en plastique ; plutôt utilisé en milieu ensoleillé



Ensuite récupérer les paramètres. Pour cela :

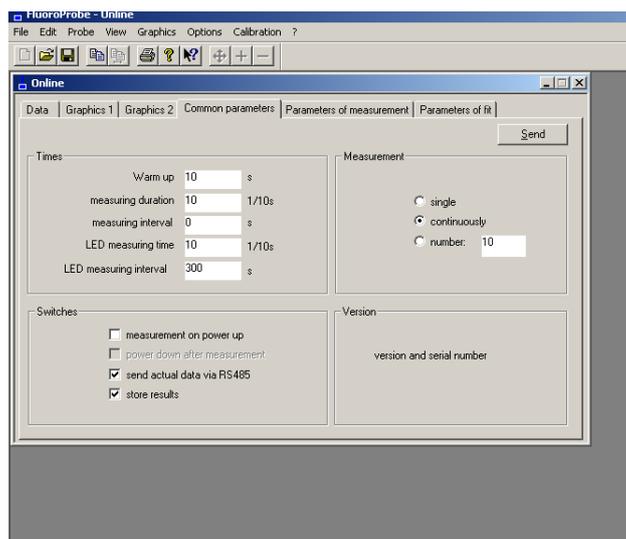
Ouvrir le logiciel.

-Dans le menu cliquer sur « Probe ».

-Puis sur « Get data / parameters ».

-Une boîte de dialogue s'affiche, cliquer sur « parameters only »,

Enfin, effectuer les ajustements nécessaires dans la fenêtre « Common parameters » selon les indications ci-dessous et cliquer sur « Send ».



Times : Attention ! Seul le paramètre « measuring interval » peut être modifié ! Les autres sont des configurations de l'appareil et ne doivent pas être changées.

Measurement : Définir le mode de mesure souhaité (simple, en continu ou un nombre défini)

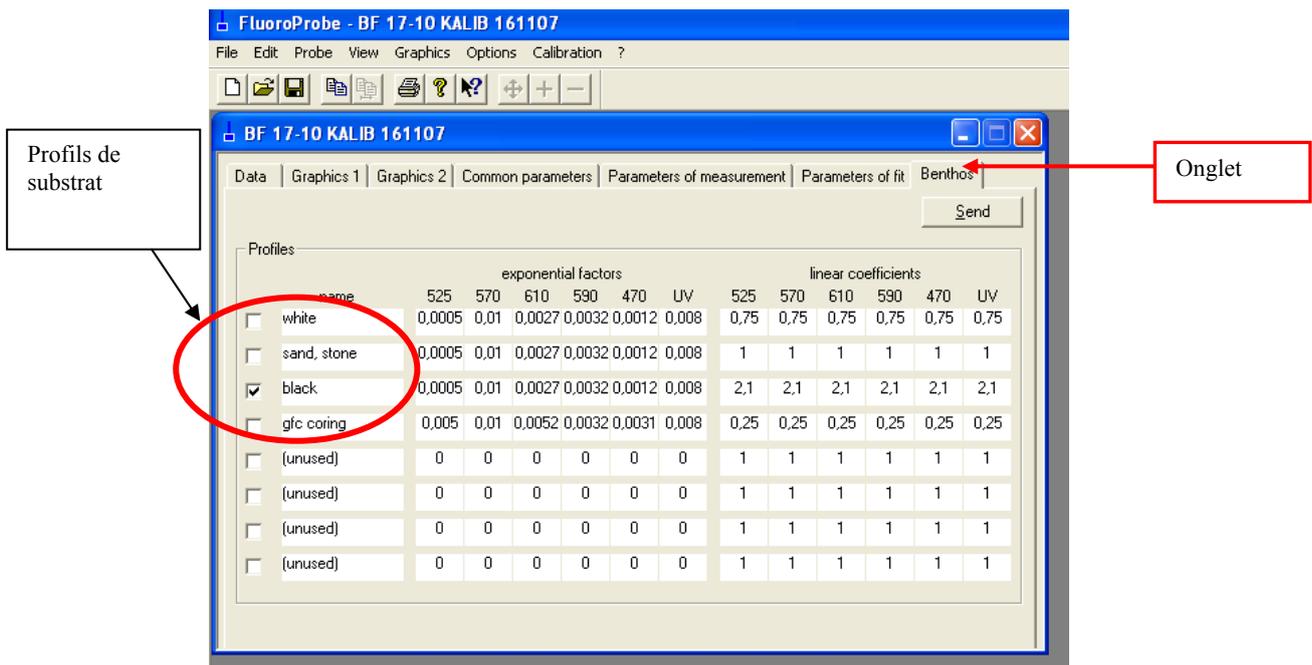
Switches :

Cocher la ligne « send actual data via RS485 », cette fonction permet d'envoyer les données vers l'ordinateur,

Cocher « store result » pour stocker les données dans la sonde.

8.3) SELECTION DU MODE BENTHIQUE ET DU TYPE DE SUBSTRAT

Dans le menu « Option » et sélectionner la ligne « Benthos ». Un onglet « benthos » apparait comme ci-dessous. Ouvrir cet onglet et sélectionner le type de substrat.



Différents types de substrats sont déjà définis :

-« white »

-« stand, stone » pour le sable et la pierre (couramment utilisé car les plus rencontrés en milieu naturel)

-« black »

-« gfc coring » pour les mesure sur filtre GF /C (porosité 1,2 µm)

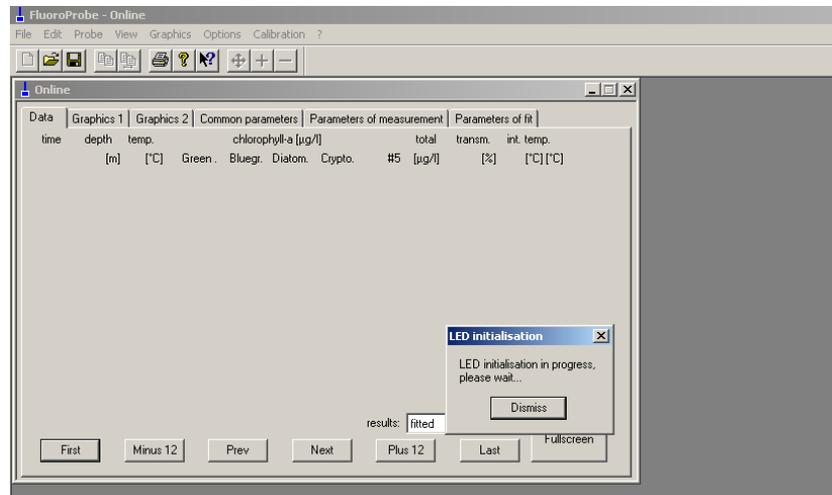
Si aucun des profils ne correspond au substrat présent, un nouveau profil est à définir. Pour cela, passer directement la partie 8.5 « Création d'un nouveau profil de substrat ». Sinon passer à la partie suivante.

Attention : Ce type d'opération reste cependant exceptionnel et est à utiliser dans le cas d'expériences en laboratoire (et non terrain) sur substrat particulier.

8.4) REALISATION DES MESURES

Mettre l'embout en contact avec le substrat. Dans le cas de mesures effectuées en laboratoire, il est conseillé de faire un « Blanc » sur un substrat vierge (dépourvu de biofilm). Pour cela procéder comme décrit dans la partie 7.4. Cependant, cette procédure est à adapter ; il faut que le substrat soit recouvert d'eau déminéralisée et ensuite utiliser l'embout de mesure et effectuer ce blanc.

Appuyez sur la touche F5 du clavier ou passer par le menu : « Probe » puis « Start measurement ». La fenêtre ci-dessous apparaît. **Attention : ne pas cliquer sur Dismiss.**



Vous pouvez visualiser les mesures via l'onglet « Data », ainsi que par les onglets «Graphics 1» et « Graphics 2 » qui tracent des courbes en temps réel.

Pour arrêter les mesures, appuyer sur la touche F6 ou passez par le menu : « Probe » puis « stop measurement »

Pour reprendre les mesures, passez par le menu « Probe » puis « continue measurement » (pas de raccourci clavier)

Une fois les mesure effectuer, enregistrer les données obtenues.

8.5) CREATION NOUVEAU PROFIL « SUBSTRAT »

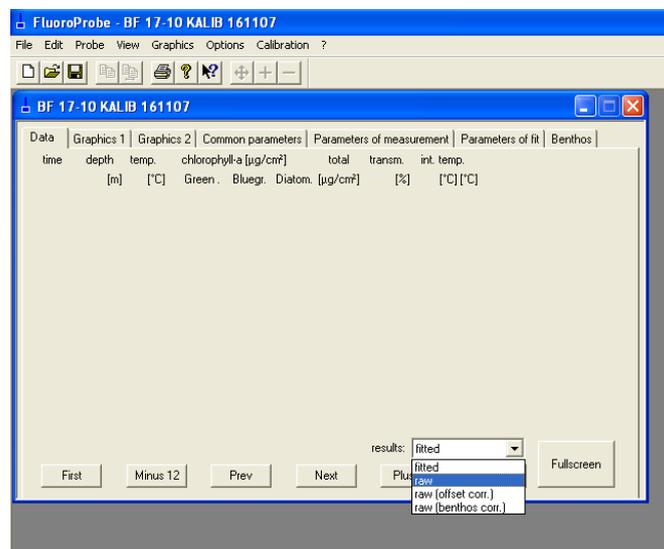
- **Calcul des coefficients linéaires pour le nouveau substrat :**

Ces coefficients sont visibles sur l'onglet benthos. cf. ci-dessous :

Profiles	name	exponential factors						linear coefficients					
		525	570	610	590	470	UV	525	570	610	590	470	UV
<input type="checkbox"/>	white	0,0005	0,01	0,0027	0,0032	0,0012	0,008	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75
<input type="checkbox"/>	sand, stone	0,0005	0,01	0,0027	0,0032	0,0012	0,008	1	1	1	1	1	1
<input checked="" type="checkbox"/>	black	0,0005	0,01	0,0027	0,0032	0,0012	0,008	2,1	2,1	2,1	2,1	2,1	2,1
<input type="checkbox"/>	gfc coring	0,005	0,01	0,0052	0,0032	0,0031	0,008	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
<input type="checkbox"/>	[unused]	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
<input type="checkbox"/>	[unused]	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
<input type="checkbox"/>	[unused]	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
<input type="checkbox"/>	[unused]	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1

Pour calculer ces coefficients, il faut réaliser des mesures sur le substrat vierge (dépourvu de biofilm). Pour cela, suivre la procédure expliquée ci-dessous :

- Dans l'onglet Benthos sélectionner le substrat « stand, stone ».
- Définir les paramètres de mesures et les envoyer à la sonde (cf. partie concernée dans le paragraphe 8.2).
- Ensuite, aller dans l'onglet « Data » et choisir dans le menu déroulant « Result » l'option « raw » (cf. ci-dessous). Ainsi les résultats de sorties seront bruts, on visualisera la fluorescence perçue pour chaque LED.



Lancer les mesures : cf. partie 8.4

Calculer la moyenne des résultats sur chacune des 6 LED puis appliquer la formule suivante afin d'obtenir le coefficient linéaire de chaque LED :

$$\frac{0.45}{X_i} \times 2.4$$

X_i : moyenne des valeurs obtenues pour une LED donnée

Retourner dans l'onglet « Benthos ». Sélectionner une nouvelle *ligne* « *unused* » et rentrer les nouveaux coefficients obtenus :

Pour les facteurs exponentiels « exponential factor » situés dans la matrice de gauche reprendre les mêmes que ceux du profil « Sand, stone ».

Pour les facteurs exponentiels « linear coefficient » situés dans la matrice de droite inscrire les nouveaux coefficients calculés.

- **Lecture des résultats pour le nouveau substrat**

Une fois les coefficients saisis, sélectionner le nouveau profil

Retourner sur l'onglet « Data » (les mesures que vous venez d'effectuer sont encore affichées) et choisir dans le menu déroulant Result l'option « fitted ». Vous obtenez ainsi les données de chlorophylle et des différents groupes algaux pour le nouveau substrat.

9) DEMONTAGE DE LA SONDÉ

Remarque : ce symbole n'est pas présent :



Pour déconnecter l'appareil, débrancher simplement de l'ordinateur le câble USB.

Remonter l'appareil comme défini ci-dessous :

- Retirer l'embout de la fibre optique.
- Désinstaller l'adaptateur benthique de l'orifice.
- Remettre la protection.

10) EXPLOITATION DES DONNÉES

Ouvrir le fichier, cliquer sur « Edit » puis « copy » et choisir « Excel ».

6. Conclusions

L'objectif de ce travail était de promouvoir un nouvel indicateur fonctionnel, au service de l'évaluation de la qualité des cours d'eau. Selon Young, Townsend et Matthei (2004), un indicateur fonctionnel est une mesure de l'intensité d'un processus écosystémique utilisée comme un indicateur de l'état de santé de cet écosystème⁶. Nos travaux antérieurs suggéraient que la vitesse d'accrétion des biofilms phototrophes en rivière, est un bon candidat indicateur fonctionnel (Garabetian et al. 2005).

La « Surveillance des cours d'eau par les bioFilms » consisterait donc à exploiter le lien qui existe entre les propriétés de la rivière, dont la qualité de l'eau, et le développement des biofilms, comme reflet de la production primaire benthique (Figure 1). Elle vise à s'affranchir de la contrainte de mesure et nécessite pour cela une part d'automatisation. Pour cela, trois niveaux d'intégration devraient être satisfaits. Premièrement, être capable de détecter les biofilms et de quantifier l'importance de leur développement au cours du temps. Deuxièmement intégrer ce moyen de détection dans un dispositif permettant, d'une part, d'implanter le détecteur dans la rivière et, d'autre part, de standardiser les conditions de la mesure du signal détecté. Enfin le troisième niveau concerne le choix des sites d'intérêt pour l'implantation des dispositifs de mesure, choix qui conditionne la pertinence du réseau de surveillance.

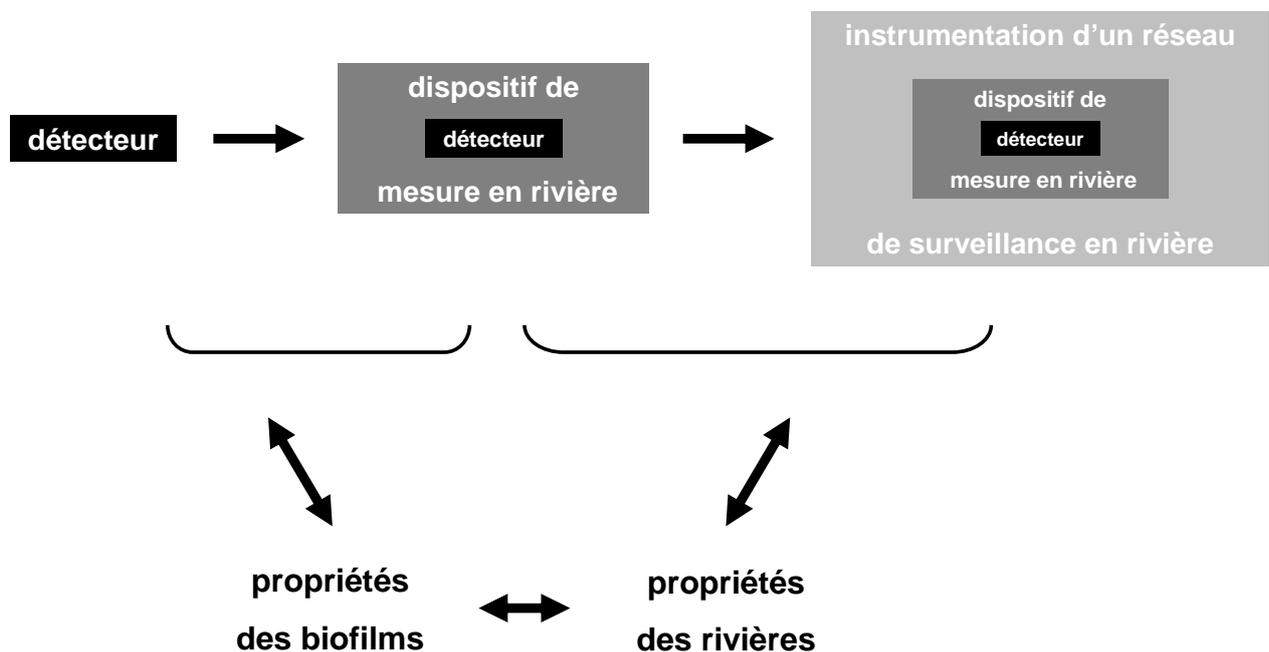


Figure 1. Les niveaux d'intégration à développer pour la Surveillance des cours d'eau par les bioFilms (SurF)

Si l'objectif général reste d'appréhender la(les) réponse(s) des biofilms aux conditions environnementales dans la rivière, une étape intermédiaire devait être de qualifier la réponse des capteurs candidats aux caractéristiques de biofilms de rivière.

⁶ a measure of the rate of an ecosystem process that can be used to indicate ecosystem health.

Dans ce cadre, avec l'appui de la cellule d'animation d'ECOBAG, les équipes d'EcoLab - Toulouse et REBX/Cemagref – Bordeaux, ont mobilisé au sein du projet SurF, le savoir-faire en matière de détection des biofilms de milieux industriels et/ou marins d'équipes d'ingénierie et génie électrochimique (LGC - Toulouse, LISE - Paris) du programme PNIR « Biofilms » du CNRS avec l'appui de l'équipe OTE/IMFT – Toulouse pour ce qui concerne les questions liées à l'écoulement et à l'hydrodynamique. Jusque-là, nous n'avions pas eu connaissance d'étude ayant porté sur la mise au point d'outils de détection des biofilms phototrophes de rivière. Or c'est le premier niveau d'intégration (figure 1), c'est-à-dire celui qui conditionne le reste du développement. C'est la raison pour laquelle notre groupe s'est concentré sur cette question dans le cadre de SurF.

Dans le but de qualifier la réponse de trois candidats détecteurs (1) mesure électrochimique par EDT – voltammétrie, LISE - Paris, (2) mesure électrochimique par suivi de potentiel sur coupons métalliques utilisés comme électrode de travail, LGC - Toulouse (3) mesure de fluorescence in vivo par sonde, bbe FluoroProbe, adaptés aux caractéristiques quantitatives et structurelles des biofilms en rivière, un effort de caractérisation des communautés microbiennes de ces biofilms basé sur les approches de typage moléculaires actuelles (PCR-DGGE de l'ADNr16S, ARISA), pour la composante bactérienne, et de détermination microscopique des communautés de micro-algues, a été mis en œuvre pour ce projet.

Deux cours d'eau, la Garonne (31) et la Vézère (24), ont été retenus pour des tests de colonisation parce qu'ils représentent des situations hydrochimiques hydroécologiques différenciées : taille et biodiversité différentes de cours d'eau appartenant à deux hydroécorigions distinctes. D'autres essais ont été réalisés en canal de laboratoire à l'occasion d'expérimentations effectuées dans le cadre de programmes en collaboration avec l'équipe OTE/IMFT - Toulouse.

Nous pouvons conclure que les trois principes de capteurs que nous avons expérimenté s'avèrent intéressants (Tableau 1). Comme nous le détaillons dans les chapitres de ce rapport, chacune de ces approches permet de relier un signal à des propriétés des biofilms que nous souhaitons étudier. Il convient toutefois de signaler que le lien entre biomasse de biofilm et signal reste à établir pour la méthode de suivi de potentiel. Des trois approches testées, c'est pourtant celle qui, technologiquement parlant, serait la plus adaptée pour instrumenter un réseau de capteur en ligne en continu et en temps réel.

Ce n'est pourtant pas la méthode que nous mettrions en avant. Sans doute parce que nous sommes toujours dans une phase exploratoire où la capacité d'automatisation du dispositif, son coût de fabrication en petite série sont moins importants que sa simplicité de mise en œuvre et sa précision.

Sur ce plan l'EDT – voltammétrie et le FluoroProbe sont des approches qui sont de véritables outils de recherche. Les informations qu'elles permettent d'acquérir, de façon non intrusive, sur des assemblages naturels sont tout à fait inédites. Les résultats préliminaires que nous avons acquis en développant ces techniques sont originaux et nous avons entrepris les démarches pour les valoriser sous forme d'articles dans les revues internationales de notre domaine.

Concernant le principe optique mis en œuvre par le Fluoroprobe utilisé en mode benthique (équipement devenu disponible en 2^{ème} partie du projet), 2 types d'informations étaient a priori intéressantes pour pouvoir éclairer la détection et la mesure de l'eutrophisation des cours d'eau (et aussi la mesure d'éventuels impacts toxiques) :

1) la mesure de la Chlorophylle a, censée représenter la quantité de biomasse accrue. De ce côté, les résultats procurés par ce principe de capteur ont été tout-à fait à la hauteur de nos espérances. Cette méthode de mesure, plus sensible que la méthode spectrophotométrique de référence, permet de mesurer des vitesses de croissance sur des biofilms jeunes et même très jeunes, permettant une mesure très intéressante de l'installation du biofilm à des stades peu bruités par des facteurs interférents (érosion hydrodynamique, broutage et bioturbation, limitation de croissance par contrainte générée par l'épaississement du biofilm sur la loi de diffusion des nutriments en son sein, échange nécessaire à sa croissance). D'autre part, les résultats produits ont permis de valider une loi de conversion entre mesure de référence (dosage au spectrophotomètre) et mesure spectrofluorimétrique, avec un domaine de linéarité dans lequel cette relation est validée et facilement utilisable.

2) l'évaluation plus qualitative de la nature des peuplements de micro-organismes phototrophes présents. Cette information reliée aux conditions abiotiques (dont nutriments) et peut-être aussi aux pollutions toxiques ayant cours dans la rivière serait probablement porteuse d'informations très intéressantes sur le degré d'eutrophisation in situ, par exemple par la proportion respective de diatomées, d'algues vertes, de cyanobactéries ayant cours dans les biofilms en fonction des teneurs en nutriments et d'autres descripteurs (vitesse du courant, intensité lumineuse, température de la colonne d'eau etc...). Malheureusement, lors de la dernière année du programme (2009), qui était aussi la première année d'expérimentation de ce capteur, il est apparu que les signatures spectrales des groupes phototrophes données par le constructeur étaient incorrectes pour nos conditions biogéographiques et de rivières, ne permettant pas d'obtenir des informations fiables sur les proportions relatives de ces groupes et d'arriver tout au bout de la réflexion sur l'intérêt de ce capteur. En 2010, soit après la fin du projet SurF, un travail de calibration spécifique du benthofluoroprobe basé sur des cultures et des assemblages de cultures monospécifiques d'organismes phototrophes débute dans l'équipe REBX/Cemagref

pour rendre fiable l'interprétation de la réponse spectrale. Ce travail mobilisera probablement 1 à 2 années supplémentaires.

Au bilan, le principe de capteur optique présent dans le Fluoroprobe est donc tout-à-fait porteur pour notre objectif de diagnose in situ de l'eutrophisation. Il donne une information quantitative sur la biomasse (via la quantification de la Chlorophylle a) qui peut tout-à-fait être mise en relation avec une technique standardisée de mesure de référence. Mais le volet mobilisant les réponses spectrales pour une meilleure compréhension du degré d'altération et de la réponse des groupes phototrophes est encore à développer. D'autre part, le principe optique du capteur est tout-à-fait porteur, mais l'appareil tel qu'utilisé est un capteur environné non voué à être maintenu en poste fixe (équipement trop coûteux pour être dédié à de la mesure sur un lieu unique). Une fois la calibration spectrale effectuée et validée en bonne correspondance avec les microflore de nos cours d'eau, il faudrait réaliser un travail d'ingénierie destiné à simplifier, dépouiller du superflu et rendre moins coûteux le dispositif. C'est à ce stade de développement précompétitif qu'il faudrait aussi automatiser la réalisation de cycles de croissance et de mesure, avec un dispositif (type balai essuie-glace) permettant de produire des mesures en continu sur des cycles renouvelés de croissance à des stades précoces du biofilm.

Tableau 1. Comparatif des trois principes de détection des biofilms testés

	lien biofilm - signal	automatisation	utilisation in situ	coût pour réseau
EDT - voltammétrie	+++	0	++	++
Suivi de potentiel	++	+++	+++	+++
Fluorescence	+++	+	++	+++ ou +

+++ : très intéressant ++ : intéressant + : peu intéressant 0 : sans objet

Etablir un lien entre les propriétés des biofilms (biomasse, micro-organismes présents, etc.) et différents principes de détection a représenté une part importante de nos recherches dans le cadre du projet SurF. La partie expérimentale compile les travaux de 4 étudiant(e)s de Master et une partie de l'activité de 3 chercheurs post doctorants. Ces recherches incluait une part de pluridisciplinarité pour s'approprier des techniques issues de l'électrochimie qui se combinaient à des approches de biologie et d'écologie (identification des microorganismes et expérimentations en laboratoire ou en milieu naturel).

Intégrer un moyen de détection quel qu'il soit dans un dispositif permettant d'implanter ce « détecteur » dans la rivière constituait un autre objectif de ce projet. Ce niveau d'intégration-là est particulièrement important pour pouvoir déconvoluer les liens entre propriétés des biofilms et propriétés de la rivière et, finalement pour standardiser les conditions de la mesure du signal détecté.

Différents facteurs environnementaux sont susceptibles d'influencer la dynamique de croissance du biofilm ; les principaux sont la lumière, la vitesse du courant, la qualité de l'eau et la prédation. L'objet de la surveillance envisagée dans ce projet est la qualité de l'eau. Au sens large la qualité que l'on cherche à apprécier concerne les apports trophiques (eutrophisation) et toxiques (contaminants). Pour mettre en évidence les effets d'un seul de ces facteurs, il faut pouvoir supprimer l'action des autres facteurs. C'est le rôle que pourrait jouer un dispositif permettant d'implanter les capteurs dans le milieu.

Par exemple, nous avons choisi de travailler sur la conception d'un dispositif qui devait servir de support aux électrodes de l'EDT – voltammétrie afin de valider l'intérêt de cette approche pour caractériser des biofilms d'architecture différentes. Nous avons donc conçu un système de type Venturi, implantable dans la rivière, dont le dimensionnement a été validé par nos collègues de l'équipe OTE/IMFT – Toulouse (Figure 2). Ce dispositif permet de générer artificiellement des conditions hydrodynamiques (Reynolds) contrastée en un site unique (une station de rivière). Les électrodes étant orientées de la même manière et dans la même veine d'eau (échelle décimétrique du solide - support), on peut alors considérer que les conditions d'ensemencement, de nutriments, de lumière sont identiques pour toutes les EDT.

Ce type d'approche nous semble devoir être développé et préféré à l'utilisation de canaux de laboratoire dans certains cas. De tels dispositifs permettent en effet, d'aborder un niveau d'expérimentation qui intègre une part de variabilité naturelle qui peut faire défaut dans les approches de laboratoire tout en autorisant la manipulation d'une variable de contrôle que l'on cherche à évaluer.

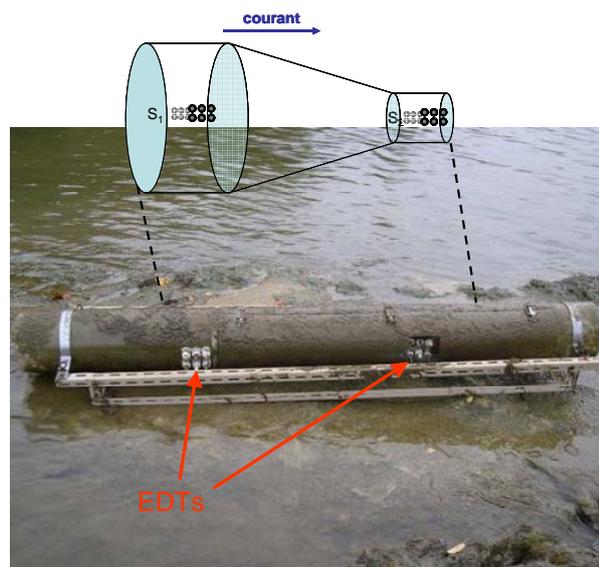


Figure 2. Troncône à biofilms. (Photo S. Boulêtreau)

Les biofilms de rivière constituent un modèle de biofilms original intégrant une forte composante de microorganismes photosynthétiques. Comme d'autres, ce modèle a permis d'explorer les propriétés des biofilms (dynamique de colonisation, relation avec l'hydrodynamique, ...) et doit continuer à alimenter les recherches actuelles sur les biofilms et les organismes qui les composent (électro-activité, ...). Leur étude peut s'enrichir des techniques développées pour d'autres biofilms (capteurs, mesure d'épaisseur) comme nous l'avons constaté dans le cadre de ce projet. Pour plusieurs raisons, ces biofilms peuvent représenter des outils d'évaluation de la qualité de la rivière et d'aide à la décision en matière de gestion. Par exemple, au cours de leur développement, à l'interface entre l'eau et le lit de la rivière, ces biofilms intègrent des flux d'eau et d'éléments dissous importants. Dans le cas de contaminants toxiques organosolubles, leur accumulation peut notamment se produire dans la matrice d'exopolymères extracellulaires. Les microorganismes du biofilm sont alors localement exposés à des concentrations plus fortes en toxiques. La mise en œuvre de descripteurs, comme la présence d'individus déformés par l'action tératogène du toxique, permet une détection précoce de la présence de toxiques dans un système aquatique.

Au niveau des populations, les espèces de diatomées, organismes constitutifs du biofilm à un endroit donné reflètent la qualité du milieu. Des indices (IPS, DAIPo, ...) basés sur la composition de l'assemblage de diatomées permettent d'évaluer cette qualité de façon relativement représentative d'un cours d'eau à l'autre. A l'échelle du biofilm enfin, les flux d'éléments dissous, nutritifs ou contaminants, ont un impact sur la vitesse de colonisation du support. La mesure de cette vitesse d'accrétion peut donc constituer un indicateur de la qualité du milieu signalant certaines atteintes au milieu comme l'eutrophisation ou une contamination. Ceci justifie la recherche de moyens de détection automatisés du développement de ces biofilms qui sont à la fois témoins et acteurs du fonctionnement de la rivière, afin de progresser vers l'acquisition d'un outil de surveillance de l'état de santé des rivières.

Achevé à Bordeaux le 18 mars 2010.

Version 2 révisée et complétée le 20-12-2010