



HAL
open science

Les interactions micro-méiofaune/microalgues des biofilms d'eau douce lors de tests écotoxicologiques en milieu aquatique sur supports immergés

Julie Neury-Ormanni

► **To cite this version:**

Julie Neury-Ormanni. Les interactions micro-méiofaune/microalgues des biofilms d'eau douce lors de tests écotoxicologiques en milieu aquatique sur supports immergés. Sciences de l'environnement. 2014. hal-02602567

HAL Id: hal-02602567

<https://hal.inrae.fr/hal-02602567>

Submitted on 16 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.

Les interactions micro- méiofaune/microalgues des biofilms d'eau douce lors de tests écotoxicologiques en milieu aquatique sur supports immergés

Julie Neury-Ormanni



Juin 2014

Master SPE-écologie 1^{ère} année

Tuteurs :

Jacky Vedrenne, Soizic Morin

Remerciements

Je remercie Monsieur Eric Rochard et Madame Juliette Rosebery pour m'avoir accueillie à Irstea au sein de l'équipe CARMA.

Je remercie mes maîtres de stage Jacky Vedrenne et Soizic Morin pour leur encadrement et les occasions qu'ils m'ont données de pouvoir mettre en pratique mes acquis et de les améliorer.

Enfin, je remercie tout le personnel de l'équipe ainsi que les stagiaires que j'ai plaisir à côtoyer lors de la pause-café !

Table des matières

1. Introduction :	3
2. Présentation de l'Institut de recherche :	3
3. Les objectifs du stage :	5
3.1. Intérêt pour les interactions micro-méiofaune/microalgues des biofilms d'eau douce :	5
3.2. Les acteurs français sur le domaine :	6
3.3. Les responsabilités du stagiaire :	7
4. De la mise en culture à l'observation :	7
4.1. Matériel et méthodes :	7
4.1.1. Sélection des individus :	7
4.1.2. Mise en culture :	7
4.1.3. Intérêt de la mise en culture :	8
4.2. Observation au microscope optique :	8
4.3. Résultats des observations :	9
5. De la bibliographie à la synthèse :	9
5.1. Organisation des recherches bibliographiques :	9
5.2. Résultats des recherches bibliographiques :	10
5.3. Les limites de l'étude :	14
6. Conclusion :	15

1. Introduction :

Le biofilm est un environnement complexe composé de bactéries, cyanobactéries, de champignons, de microalgues, de protozoaires et de petits métazoaires. Donlan et Costerton l'ont défini comme étant une communauté sessile d'origine microbienne, caractérisée par des cellules attachées à un substrat, une interface ou entre-elles, noyées dans une matrice de polymères extracellulaires. Il se forme dans l'eau selon les vitesses de courants, l'intensité lumineuse et les caractéristiques physico-chimiques de l'eau et représente un habitat refuge idéal pour la micro-méiofaune associée [1].

La micro-méiofaune des biofilms est très diversifiée. On y retrouve des organismes allant de 0,2 μm pour les bactéries jusqu'à 2000 μm pour les rotifères ou les nématodes. Le groupe de microalgues dominant est celui des diatomées mais les algues filamenteuses (cyanophycées, chlorophycées) y sont aussi présentes en grande quantité [2]. Les hétérotrophes flagellés, les ciliés et les amébiens (amibes et thécamoebiens) sont les protozoaires les plus régulièrement retrouvés dans ce type de milieu [3]. En effet, les bactéries, les exopolymères saccharidiques dissous et les microalgues sont des ressources riches en éléments nutritifs utiles aux protozoaires et petits métazoaires [4]. Ainsi, de nombreuses interactions ont lieu entre ces différents taxons suivant leurs besoins écologiques (habitat, nourriture ...).

Nous pouvons dès à présent nous interroger sur les types d'interactions qui existent entre les organismes de la micro-méiofaune et le microphytobenthos. L'objectif de cette étude est d'estimer l'impact direct et indirect du broutage sur les producteurs primaires en présence de toxiques (plus particulièrement les pesticides) lors de tests d'écotoxicologie.

Les organismes mixotrophes comme quelques thécamoebiens ou ciliés (*Vorticella* sp., *Prorodon* sp.) sont capables d'acquérir de manière héréditaire ou par un mécanisme de reconnaissance dans le milieu environnant un endosymbiote algal (zoochlorelles, chloroplastes...) et de l'incorporer [5, 6]. Les rotifères et les nématodes sont d'incontestables brouteurs du microphytobenthos [2]. Cependant, la part du broutage par les protozoaires sur les communautés algales est reconnue mais peu étudiée au contraire de celle sur les bactéries [7].

Ainsi, nous allons voir les moyens utilisés pour mettre cette étude en place à travers les observations de culture de micro-méiofaune de Jacky Vedrenne et les données bibliographiques.

2. Présentation de l'Institut de recherche :

Irstea (Institut national de Recherche en Sciences et Technologies pour l'Environnement et l'Agriculture) est un institut public, dont les travaux sont organisés scientifiquement selon douze

thèmes de recherche répartis parmi trois domaines : l'Eau, les Territoires et les Ecotechnologies. Il existe neuf implantations nationales.

L'Irstea de Bordeaux se situe dans la zone d'activité de Cestas-Gazinet. Trois secteurs d'activité sont couverts par Irstea : la recherche, l'appui aux politiques publiques et l'expertise, s'inscrivant dans les deux domaines suivant :

- La gestion de l'eau et le fonctionnement des milieux aquatiques
- L'interface entre l'eau et la gestion des territoires.

En collaboration avec de multiples laboratoires publics français tels le CNRS, l'INRA, l'IFREMER, ou européens, des entreprises ou des bureaux d'études privés, les chercheurs et ingénieurs sont aussi amenés à travailler avec les étudiants de l'Université de Bordeaux ou de grandes écoles.

Le personnel de l'institut de Bordeaux compte environ 120 personnes dont la moitié est composée d'ingénieurs-chercheurs et accueille environ 40 stagiaires chaque année. Les membres sont répartis, selon leur spécialité, dans les deux unités de recherches suivantes :

- Ecosystèmes aquatiques et changements globaux (EABX)
- Environnement, territoires et infrastructures (ETBX)

Etant affiliée à l'équipe CARMA de l'unité EABX, je vais vous présenter cette dernière dans son contexte général.

La directive cadre européenne sur l'eau (DCE) traduit l'objectif de mettre à disposition des protocoles standardisés d'acquisition de données pour tous les « éléments de qualité biologique » identifiés dans la directive (phytoplancton, macrophytes et phytobenthos, invertébrés, poissons) pour l'ensemble des « masses d'eau » (cours d'eau, plans d'eau, eaux de transition et eaux littorales). L'équipe CARMA participe à ce programme et envoie ces travaux au Ministère de l'Environnement, l'ONEMA, les agences de l'eau et différents opérateurs publics et privés concernés par la surveillance et la gestion des milieux aquatiques.

Animée par Juliette Rosebery, l'équipe CARMA entreprend des travaux de recherche dans le cadre du thème BELCA, cherchant à identifier et prédire les réponses biologiques et écologiques aux contaminations d'origine anthropique du milieu aquatique par des approches d'écotoxicologie et de bio-indication.

Les communautés végétales aquatiques sont étudiées puis traduites en outils de bio-indication utiles à la surveillance, au diagnostic d'état écologique et à la gestion corrective des milieux

aquatiques. Des programmes expérimentaux sont régulièrement mis en place, évaluant les risques et les effets toxiques de micropolluants (métaux lourds, pesticides...) à partir du compartiment microalgal. Des expériences sont menées en laboratoire, particulièrement sur les effets des pesticides agricoles.

3. Les objectifs du stage :

L'ensemble des activités du stagiaire est présenté dans l'offre en Annexe 1.

3.1. Intérêt pour les interactions micro-méiofaune/microalgues des biofilms d'eau douce :

Les diatomées sont des bio-indicateurs très étudiées de l'état de la qualité des eaux, qui dominent généralement la biomasse algale du biofilm (ou périphyton) de rivière. De par leur composition spécifique, leur morphologie, leur locomotion ou leur vitesse de déplacement, elles permettent de diagnostiquer la présence de toxiques (métaux lourds, pesticides, médicaments...). Par exemple, les diatomées peuvent se déformer en présence de métaux lourds tels le Cadmium, le Zinc ou le Cuivre (Cf Annexe 2). Elles sont fortement influencées par l'acidité de l'eau, la présence de nutriments (particulièrement l'azote et le phosphore), de matière organique, une faible oxygénation des eaux ou une très forte intensité lumineuse. En tant que producteur primaire, elles se trouvent affectées de manière directe par les facteurs physiques et chimiques de l'eau. Leur frustule en silice facilite leur conservation et leur identification. De plus l'échantillonnage est peu coûteux et simple.

Soizic Morin, chargée de recherche en écotoxicologie sur le thème de l'impact des contaminants toxiques (métaux, pesticides, médicaments) retrouvés dans les cours d'eau (urbains, industriels, agricoles) au niveau du biofilm algal (biomasse, répartition spatiale et spécifique, physiologie, photosynthèse), s'est posée la question des effets indirects des contaminants sur la communauté algale pouvant résulter des interactions entre les organismes au sein du biofilm (protozoaires, petits métazoaires). Jacky Vedrenne référent national sur la thématique des protozoaires et métazoaires des boues de station d'épuration, fin 2013, a rejoint Soizic dans ce projet de recherche innovant.

Cette étude est menée dans le but de quantifier dans un premier temps les biais qui pourraient être dus au broutage des micro-organismes, puis analyser l'évolution des impacts des polluants sur le réseau trophique du biofilm et observer leur impact indirect sur les producteurs primaires via les consommateurs

Au préalable, afin d'estimer l'impact des protozoaires au sein des biofilms, un premier comptage a été effectué par Jacky Vedrenne sur les échantillons provenant de l'amont et de l'aval du ruisseau de Bourg et de la rivière de Leyre (Cf Annexe 3) et transcrit sous forme de diagrammes (Cf Fig 1 et 2

ci-dessous). On remarque que les diatomées et les protozoaires sont co-dominants dans ces deux milieux. La part que représente les interactions entre ces organismes, comme le broutage, peuvent être non-négligeable et suscite l'intérêt quant à la diffusion des toxiques au niveau de cet écosystème aquatique.

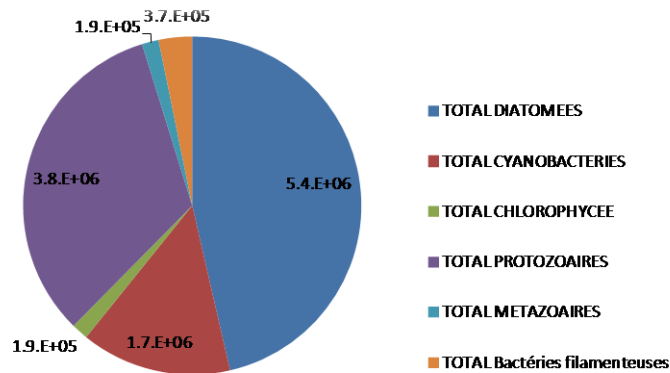


Fig 1 : Densité moyenne en individu par litre d'eau douce des organismes des biofilms du ruisseau s'écoulant en amont et en aval du ruisseau de Bourg

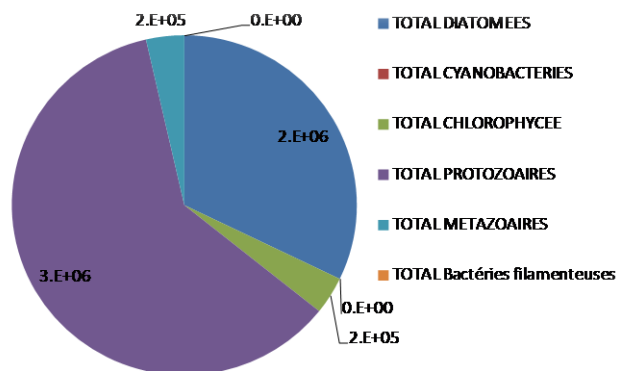


Fig 2 : Densité moyenne en individus par litres d'eau douce des organismes des biofilms en amont et en aval de la Leyre

3.2. Les acteurs français sur le domaine :

Actuellement, peu de recherches ont été menées sur les interactions des protistes dans les biofilms des eaux douces. En effet, les études sont plus souvent tournées vers les protistes marins comme au LIENSs à La Rochelle ou au CNRS à la station biologique de Roscoff. Le rôle des protistes dans divers écosystèmes sont aussi abordés au CNRS de Clermont Ferrand dans l'unité Génome et Environnement. D'ailleurs, il existe un Groupement des Protistologues de Langue Française (GPLF), regroupant des chercheurs de France et du Maghreb. Leurs études, autant d'un point de vue biologique qu'expérimental, peuvent être utiles aux travaux envisagés par Soizic Morin et Jacky Vedrenne (Cf Annexe 4).

3.3. Les responsabilités du stagiaire :

Au sein de cette étude, le rôle du stagiaire se situe à l'origine du projet, et vise à l'élaboration d'un inventaire bibliographique visant à rassembler le maximum de connaissances concernant les communautés des protozoaires et des petits métazoaires, leurs interactions dans le biofilm ou à l'interface eau-biofilm ainsi que leurs actions sur le compartiment microalgal. Ce dernier devra aussi réaliser une synthèse de l'inventaire des prédateurs et proies répertoriés en précisant les conditions expérimentales et les interactions, ainsi que des fiches descriptives des prédateurs inventoriés (Cf Annexe 1).

4. De la mise en culture à l'observation :

4.1. Matériel et méthodes :

4.1.1. Sélection des individus :

Aude Gandon, une thésarde qui travaille sur la bioaccumulation des pesticides dans le biofilm, a mis en place des lames de biofilm dans un aquarium à partir d'un inoculum de la Leyre. C'est dans cet aquarium que Jacky Vedrenne a prélevé des échantillons afin d'observer, déterminer et sélectionner les individus à mettre en culture. Ces échantillons ont été observés à l'aide d'une loupe binoculaire et d'un microscope optique. Par la suite, les individus sélectionnés ont été capturés à l'aide d'une seringue ou d'une pompe péristaltique dans des cellules de décantation puis mis en culture dans différents milieux.

4.1.2. Mise en culture :

Les milieux de culture qui suivent ont été adaptés à partir de ceux utilisés en aquariophilie. En effet, ces milieux sont utilisés par exemple pour la mise en culture de paramécies, de rotifères servant d'alimentation à certains poissons en aquarium, ils sont peu coûteux.

Un milieu de culture favorable au développement des diatomées a été ajouté dans certaines cultures (milieu DAUTA) afin de favoriser leur développement. Ce milieu est fréquemment utilisé à Irstea. (Cf Annexe 5).

Sept milieux de culture différents sont donc mis en place : 1) Riz, 2) Ebly, 3) Salade, 4) Herbe, 5) Salade + DAUTA, 6) Herbe + DAUTA, 7) Riz + DAUTA

En Annexe 6 est présenté le protocole de décoction des solutions de mise en culture.

4.1.3. Intérêt de la mise en culture :

Cette mise en culture n'est pas une représentation précise de la biocénose d'un biofilm puisque la plupart des individus ont été sélectionnés et séparés. Cependant, elle permet d'observer l'évolution et la succession de certaines espèces et de déterminer le milieu de culture le plus approprié (cf tableau 1)

Tableau 1 : Milieux de culture et répartition des individus sélectionnés

Référence de la culture	Sélection initiale
ABDH1	Culture brut + DAUTA dans HERBE
ARS1	Leucane Monostyla (Rotifère) dans SALADE
ARE1	Leucane Monostyla dans EBLY
ARR1	Leucane Monostyla dans RIZ
ANH1	Nématode dans HERBE
ABDS1	Culture brute + DAUTA dans SALADE
ABDR1	Culture brute + DAUTA dans RIZ
APE1	Protozoaire indéterminé dans EBLY

De plus, ces milieux serviront à expérimenter les comptages possibles de la micro-méiofaune via un cytomètre à flux couplé à un microscope photonique acquis par Irstea en 2014 (Flowcam : Fluid Imaging).

Très utilisé dans la détermination et le comptage du phytoplancton océanique, le Flowcam est le premier appareil d'analyse automatique de particules usant de l'imagerie numérique pour mesurer la taille et la forme de particules microscopiques dans un milieu liquide. Le but ici est de voir, selon les calibrages réalisables, les espèces qui peuvent être perçues et comptées par cet appareil (Cf Annexe 7).

4.2. Observation au microscope optique :

Tous les dix jours, une observation à l'état frais (sans coloration) de chacun des huit Erlenmeyers est effectuée. L'échantillon prélevé à l'aide d'une pipette, à raison d'une goutte, est déposé sur une lame en verre et recouvert d'une lamelle.

Les observations sont faites par le biais d'un microscope optique équipé d'une caméra relié à un ordinateur. Ainsi, grâce au logiciel d'acquisition d'image Archimède (Microvision) des photos et des séquences vidéo sont enregistrées, il permet également de mesurer les organismes (Cf Annexe 8).

L'aspect général de la culture, l'identification des taxons micro-méiofaune présents, les changements de population sont notés et le pH de la culture est suivi.

En complément de ces observations certains de ces échantillons sont analysés au Flowcam.

4.3. Résultats des observations :

Sur le tableau 2 ci-dessous, on remarque que la diversité spécifique des milieux ARS1, ARR1 et ABDS1 est beaucoup plus faible que pour les autres milieux de culture. On peut donc s'interroger sur l'efficacité préservatrice de ces milieux. Les milieux ABDH1, ARE1 et ANH1 semblent être plus propices au développement de la micro-méiofaune. Néanmoins, ces observations donnent une idée sur les microorganismes susceptibles d'être retrouvés dans les biofilms d'eau douce (des individus enkystés pouvaient être présents à l'ensemencement). Ainsi, elles peuvent servir de support pour les recherches bibliographiques (cf tableau2).

Tableau 2 : Tableau récapitulatif des individus les plus souvent rencontrés dans les différents milieux de culture

Milieu de culture	Zoo micro-méiofaune	Phyto micro-méiofaune
ABDH1	Flagellés, <i>Chilodonella uncinata</i> , <i>Colpoda</i> sp., amibes, hétérotriches, <i>Prorodon</i> sp., <i>Aspidisca costata</i> , <i>Leucona monostyla</i> (Rotifères)	Chlorophycées, diatomées
ARS1	<i>Bodo</i> sp.	Chlorophycées
ARE1	<i>Monas</i> sp., <i>Bodo</i> sp., amibes, <i>Aspidisca costata</i> , <i>Colpoda</i> sp.	Cyanobactéries, diatomées, Entosiphon sp. (phytoflagellés)
ARR1	Flagellés, amibes, <i>Bodo</i> sp.	Chlorophycées, diatomées
ANH1	<i>Colpoda</i> sp., <i>Microthorax</i> sp., <i>Vorticella</i> sp., <i>Bodo</i> sp., <i>Monosiga</i> sp., nématodes	Diatomées, cyanobactéries, chlorophycées
ABDS1	<i>Chilodonella uncinata</i> , flagellés	Diatomées, chlorophycées
ABDR1	Flagellés, biflagellés, <i>Chilodonella uncinata</i> , <i>Aspidisca costata</i> , hétérotriche, amibes	Diatomées, chlorophycées, cyanobactéries
APE1	<i>Monas</i> sp., <i>Bodo</i> sp., amibes	Diatomées, cyanobactéries

5. De la bibliographie à la synthèse :

5.1. Organisation des recherches bibliographiques :

La première étape de l'élaboration d'un inventaire bibliographique est la mise en forme d'une problématique servant à cibler plus précisément les publications scientifiques. La problématique peut être résumée de la façon suivante : **Quelles sont les interactions qui ont lieu au sein des biofilms entre les différents organismes présents ? (Mode de vie, d'alimentation des protozoaires et petits métazoaires).**

Suite à cela, divers mots clés ont été listés, toujours dans le but de préciser le thème de recherche, très rapidement je me suis aperçue qu'il fallait faire des recherches sur des termes Anglais, les publications françaises étant assez rares :

meiofauna – metazoan – nematode – protozoa – microphagous – browsing – grazing – freshwater – rotifer – prey – predators – mixotrophy – diatoms – food webs – ciliate – flagellate – amoeba – symbiosis - microbial loop - biofilm/periphyton – feeding – bacteria – biodiversity – sarcodina - functional group.

Ces mots clés sont ensuite associés les uns avec les autres selon les informations recherchées et servent à trouver des publications scientifiques ou des ouvrages via des sites tels Scopus, Sciences direct, Web of science, Google scholar ou Nature.

Les références bibliographiques sont exportées et sauvegardées sur le logiciel Endnote. Ce dernier facilite la mise en page bibliographique et permet d'étudier plus rapidement les PDF associés aux références grâce à la possibilité d'y inclure des annotations ou de surligner.

5.2. Résultats des recherches bibliographiques :

Afin de déterminer les mots clés les plus redondants parmi les nombreuses publications étudiées, une analyse bibliométrique a été effectuée à l'aide du site Wordle. En rentrant tous les titres sur <http://www.wordle.net>, on obtient la figure suivante :



Fig 3 : Illustration présentant les mots clés reliés à l'inventaire bibliographique

Cette dernière nous démontre les mots clés les plus pertinents quant aux interactions micro-méiofauniques des biofilms d'eau douce. L'illustration ci-dessus est intéressante d'un point de vue visuel. En effet, les mots les plus utilisés ressortent bien.

Au commencement du 21^{ème} siècle, on remarque cependant une perte d'intérêt quant à l'étude des protozoaires. En effet, les ouvrages les plus descriptifs en termes de morphologie et d'écologie sont les plus anciens tels *Etude sur les infusoires d'eau douce* écrit par E. Penard en 1922, *Protozoology fifth edition* de Richard R. Kudo publié en 1971 ou le *Précis de Protistologie* de P. De Puytorac datant de 1987. Ce désintérêt est sûrement lié à la petite taille des organismes étudiés qui complique leur identification en plus de leur importante richesse spécifique et à la complexité de leurs interactions intra et interspécifiques. D'ailleurs, la majeure partie des recherches menées sur le

biofilm étaient soit ciblées sur les écosystèmes marins, soit sur les interactions des macroinvertébrés, soit sur le broutage des bactéries.

Au début, les recherches bibliographiques ont été ciblées plus particulièrement sur les protozoaires ciliés, les sarcodines et les hétérotrophes flagellés. En effet, les observations microscopiques réalisées indiquent que ces trois groupes représentent les taxons de protozoaires les plus présents au niveau des biofilms étudiés.

Tableau 3 : Tableau présentant l'écologie de trois groupes de protozoaires : ciliés, sarcodines et hétérotrophes flagellés [8].

	Ciliés	Sarcodines	Hétérotrophes flagellés
Sous-groupe		amibes nues, thécamoebiens, héliozoaires	
Taille	<20µm à 2000µm	Très variable 10-20µm à 200µm	2-20µm
Régime alimentaire	Bactéries, algues unicellulaires, cyanobactéries filamenteuses, autres protozoaires, occasionnellement rotifères et microzooplancton.	Bactéries, Algues suivant la taille, rotifères, ciliés, champignons, autres amibes.	Bactéries en suspension.
Habitat	En suspension ou attaché à la surface. Sédiments.	Associé à la surface ou au sédiment pour les héliozoaires. Au biofilm pour les Amibes.	Associé à la surface et au sédiment.
Mode de capture des proies	Raptorial feeders (simple apical mouth or « Hoover ») ; Filter-feeders (filtres à mailles fines dans les péritriches pour capturer les bactéries); Diffusion-feeders (tentacules collantes)	Pour les amibes, le pseudopode casse la paroi cellulaire de la proie. Pour les héliozoaires c'est l'axopode qui casse la paroi puis ingestion.	Filter-feeders ; Diffusion-feeders.
Abondance	Abondant dans les sédiments sauf « diffusion feeders »	Plus abondant dans les sols	

Par la suite, nous avons décidé d'utiliser dans ce rapport le terme de micro-méiofaune pour désigner l'ensemble des consommateurs primaires et secondaires auxquels nous nous intéressons puisque la taille des organismes observés est comprise entre 2 µm et 2 mm (lames de biofilm du pilote d'Aude Gandon, des échantillons de la Leyre, de Bourg et de Pontails).

Les trois groupes présentés ci-dessus possèdent des caractéristiques morphologiques diverses qui influent sur leur écologie (habitat, régime alimentaire, mode de capture de proie). Les taxons

observés par Jacky Vedrenne sur les lames de verre colonisées par le biofilm semblent être similaires à ceux que l'on retrouve en épuration des eaux : ciliés, sarcodines, hétérotrophes flagellé [8]. Il est donc intéressant de comprendre certains critères généraux afin de déterminer l'ampleur de l'impact de leur broutage sur la biomasse algale.

Les taux d'ingestions exprimés dans le tableau 4 sont tirés de l'ouvrage *Algal Ecology : Freshwater Benthic ecosystems* de R. Jan Stevenson [2]. Les taux en rouge seront utiles à l'avenir pour évaluer l'impact des brouteurs sur la communauté algale.

Mc Cormick, en étudiant la sélection des protistes herbivores et leur impact sur l'assemblage benthique algal, a déterminé qu'en absence de prédateurs de ces protistes herbivores, les ciliés *Chilodonella* sp. et *Trithigmostoma cucullulus* et l'amibe *pelomyxa* sp. consomment 19% de la production algale journalière contre 1% lorsque l'abondance en prédateur est élevée. Les taux d'ingestion sont calculés avec la densité de protozoaires herbivores dans le substrat, le nombre moyen d'algues contenues dans chaque protozoaire et le taux de digestion estimé à $0.2 \text{ diatoms} \cdot \text{h}^{-1}$ [9]. Le biovolume algal est plus faible quand l'abondance en macrobrouteurs (*Goniobasis* sp. et *Stenonema* sp.) est élevé. En effet, lorsque la densité en macrobrouteurs diminue, les algues filamenteuses se font plus rares bien que les diatomées continuent à dominer le milieu.

Borchardt et Bott ont étudié le broutage par la méiofaune en utilisant des proies algales et bactériennes fluorescentes. Deux morphotypes de rotifères ont servi à l'expérience. Le taux d'algivorie du morphotype « a » était de 0 et celui du morphotype « b », de 13,5. Cependant, le taux d'ingestion moyen s'élève à 0,13, on peut supposer que le morphotype « a » était plutôt bactérivore et dominait le milieu. Le taux d'ingestion de diatomées par les nématodes est de 0 alors que les nématodes sont des brouteurs algivores. Cette erreur peut être liée à la succession saisonnière de la diversité spécifique [10]. En effet, le ruisseau de Piedmont accueille des nématodes qu'en Aout et leur densité y est plutôt faible [11].

Le tableau 4 se complètera au fur et à mesure des recherches bibliographiques. Les taux d'ingestion des diatomées par la micro-méiofaune sont de bons indices concernant l'impact du broutage. Grâce à ses multiples données, nous pourrions estimer le pourcentage de proies assimilées par la micro-méiofaune.

Tableau 4: Tableau présentant les taux d'ingestion de diatomées et de bactéries par la micro-méiofaune [9, 11, 18, 19]

Brouteur	Habitat	Méthode	diatomées. cm ⁻² .h ⁻¹	diatomées. p* ⁻¹ .h ⁻¹	Bacteria. p* ⁻¹ .h ⁻¹	Autres informations	Auteurs
<i>Ensemble :</i> <i>Chilodonella</i> sp + <i>Trithigmostoma</i> <i>cucullulus</i> + <i>pelomyxa</i> sp (Sarcodines)	Canaux expérimentaux	Ingestion de taxons natifs + macrobrouteurs absents	4400	5 (p* = ciliés)	/	0,1% of algal standing crop (SC) ; 19% productivité algale journalière (P)	McCormick (1991)
		Ingestion de taxons natifs + densité moyenne de macrobrouteurs	4640	6 (p* = ciliés)	/	environ 0,1% algal SC bioValgal = 6.10 ⁸ µm ³ .cm ⁻²	
		Ingestion de taxons natifs + densité importante de macrobrouteurs	150	3 (p* = ciliés)	/	environ 0,1% algal SC ; 1% P bioValgal = 1.10 ⁸ µm ³ .cm ⁻²	
<i>Prorodon</i> sp	Estran, port de Boston	Ingestion de coliformes marqués par fluorescence	/	/	704 (p* = ciliés)	/	Epstein and Shiaris (1992)
Microflagellés (<i>Bodo</i> sp, <i>Monas</i> sp, <i>Oikomonas</i> sp)	Etang de la toundra Arctique	Analyse du contenu des vacuoles alimentaires	/	/	/	Ingestion d'environ 43%de microflagellateS C.d ⁻¹ , environ 8% de bacterial SC.d ⁻¹	Fenchel (1975)
Rotifères	Argile blanche des ruisseaux	Ingestion de diatomées (FLD) ou bactéries (FLB) marquées par fluorescence	/	0,13, moyenne de deux morphotypes (a=0 ; b=13,5) (p* = rotifères)	237 - 2125 (p* = rotifères)	Intervalle de moyenne de 5 expériences	Borchardt et Bott (1995)
Nématodes	Argile blanche des ruisseaux	FLD ou FLB		0 (p* = nématodes)	6 - 320 (p* = nématodes)	Intervalle de moyenne de 5 expériences	Borchardt et Bott (1995)
Méiofaune	Argile blanche des ruisseaux	Changement de densité		3-37 (p* = animaux)	3513 - 8981 (p* = animaux)	Les ciliés et les rotifères sont co-dominants	Borchardt et Bott (1995)

p* = prédateur

Les informations tirées des multiples publications scientifiques et des observations de Jacky Vedrenne au microscope optique, ont permis d'élaborer une ébauche de réseaux trophiques des biofilms d'eau douce. De même que le tableau 4, ce réseau sera complété petit à petit plus précisément à l'échelle du genre ou de l'espèce [6, 12-15].

On remarque des relations trophiques plus ou moins importantes entre les différents niveaux. Les hétérotrophes se nourrissent essentiellement de bactéries mais peuvent avoir à ingérer du phytoplancton selon les besoins que leur confère leur niche écologique [4, 14]. Les mixotrophes

sont souvent en symbiose avec des microalgues symbiotiques comme *Vorticella* sp. qui héberge *Chlorella* sp. pour synthétiser sa propre matière organique [16]. Les ciliés et les sarcodines sont cannibales et ont un régime alimentaire très diversifié. Selon leur taille ou leur morphologie, ils peuvent s'attaquer à des organismes plus gros tels les rotifères ou les nématodes. C'est le cas du thécamoebien *Nebela* sp. se nourrissant du nématode *Ironus* sp. [17].

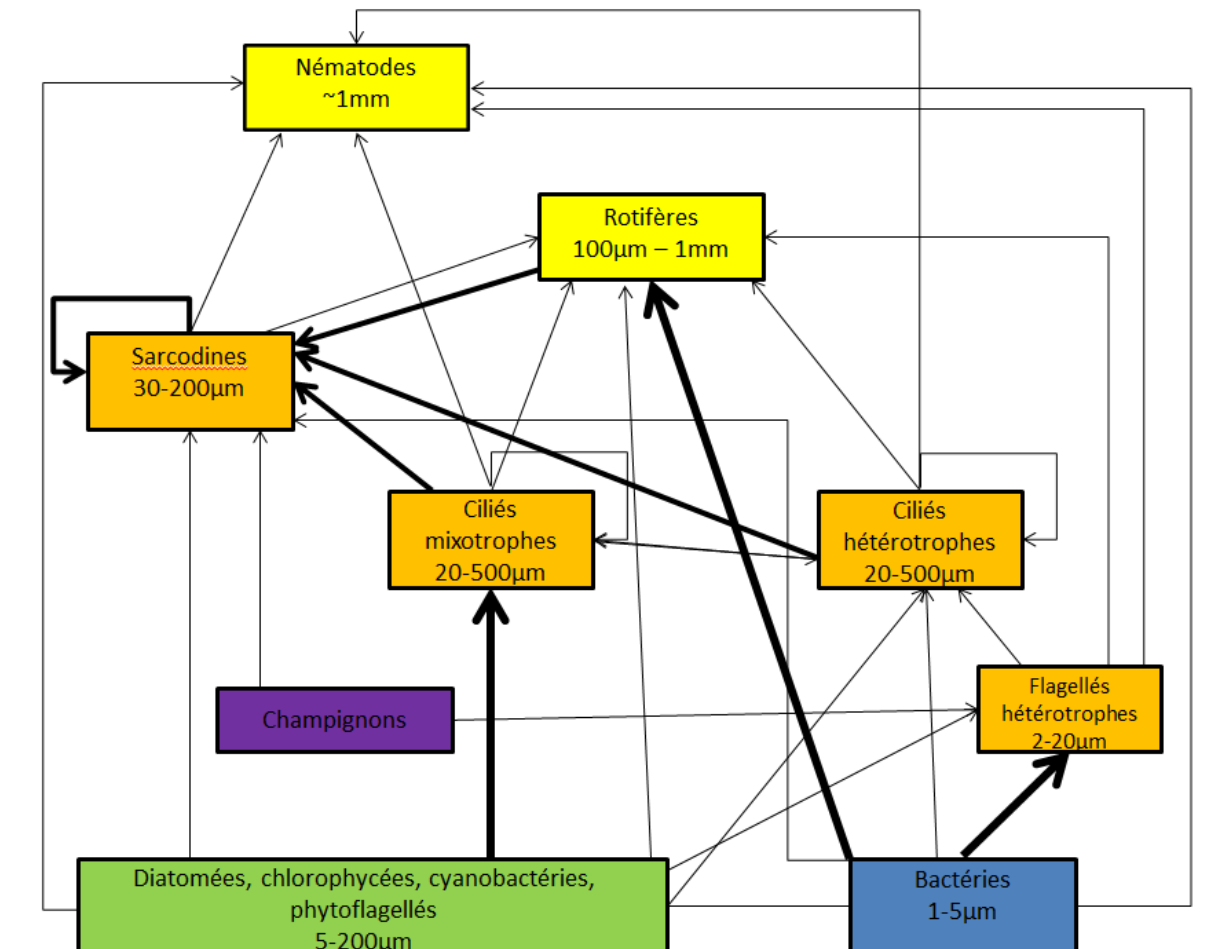


Fig 4 : Réseau trophique des biofilms d'eau douce

5.3. Les limites de l'étude :

En 2004, selon Jacqueline Dawn Parry, seulement 80 publications concernaient les protozoaires des biofilms dont 38% ne faisait que mentionner leur présence ou leur rôle en tant qu'hôte d'agents pathogènes. Cette pénurie en information pourrait être due au manque de technique de détermination du taux de broutage des protozoaires sur des proies fixées ou libres ou encore aux mystères et à la complexité de la boucle microbienne [7]. Aujourd'hui, la plupart des publications concernant les protozoaires ciblent plus particulièrement ceux des écosystèmes marins.

La micro-méiofaune que nous souhaitons observer peut mesurer $2\mu\text{m}$ à $2000\mu\text{m}$. L'estimation du taux de broutage demande donc un matériel très précis, capable d'observer des éléments de très petites tailles. Le comptage et l'identification des différentes espèces au microscope optique pourraient prendre beaucoup de temps. En effet, de nombreux flagellés très rapides et très mobiles sont difficiles à identifier et les cils des ciliés sont plus ou moins visibles. Cependant, le Flowcam Fluid Imaging, normalement utilisé pour le comptage des microalgues, est en période d'essai sur les protozoaires.

Enfin, la mise en culture de micro-méiofaune sélectionnée est complexe. Dans les cultures mises en route par Jacky Vedrenne, on retrouve de multiples espèces qui apparaissent ou disparaissent une fois sur l'autre toutefois certaines cultures semblent se stabiliser. Les biofilms sont des milieux difficiles à représenter artificiellement et les espèces sont plus ou moins sensibles aux conditions en laboratoire. Certaines peuvent s'enkyster pendant des semaines et réapparaître au bout de quelques semaines. Les cultures les plus appropriées ne sont pas faciles à sélectionner.

6. Conclusion :

Les observations effectuées sur les lames de biofilm et les publications scientifiques ont révélé de nombreuses interactions trophiques entre les organismes micro-méiofauniques et le microphytobenthos. Nous avons décidé de ne pas prendre en compte les relations bactériennes de la boucle microbienne puisque c'est le domaine de l'Irstea de Lyon; ni celles faisant intervenir les oligochètes, cladocères, copépodes ou les larves d'insectes et de poissons car ces individus sont très peu présents sur les lames immergés. De plus, l'activité de broutage des microalgues par les protozoaires et petits métazoaires (rotifères, nématodes..) semble non-négligeable même si les études à ce propos sont plutôt rares. Il serait donc intéressant de pouvoir l'estimer par des méthodes rapides et peu coûteuses.

Les méthodes les plus utilisées sont les marquages fluorescents des proies, suivis d'un comptage au microscope [9, 11, 18, 19]. Irstea a investi dans un nouveau matériel d'imagerie numérique, le Flowcam Fluid Imaging. Le Flowcam peut observer des individus allant de $2\mu\text{m}$ à $2000\mu\text{m}$ dans un fluide liquide. Il possède les capacités d'un cytomètre en flux, d'un microscope et d'un détecteur de fluorescence. Cet appareil permet le suivi du microplancton, l'identification de bioindicateurs et l'étude des variations à court terme, d'un organisme spécifique (Annexe 9).

Ainsi, ce matériel pourrait nous permettre d'estimer le taux de broutage de la micro-méiofaune sur les producteurs primaires.

Bibliographie

1. DeAngelis, D.L., et al., *Modelling nutrient-periphyton dynamics in streams: the importance of transient storage zones*. Ecological Modelling, 1995. **80**(2–3): p. 149-160.
2. Jan Stevenson, R., M.L. Bothwell, and R.L. Lowe, *Algal ecology: freshwater benthic ecosystems*. 1996, San Diego: Academic press. 753 p.
3. Dragesco, J., *Les protozoaires*, in *Fiore et faune aquatiques de l'Afrique Sahelo-Soudanienne*. 1980, ORSTOM: Paris. p. 153-192.
4. Porter, K.G., et al., *Protozoa in Planktonic Food Webs*^{1,2}. The Journal of Protozoology, 1985. **32**(3): p. 409-415.
5. Gilbert, D., et al., *Le régime alimentaire des Thécamoebiens (Protista, Sarcodina)*. L'Année Biologique, 2000. **39**(2): p. 57-68.
6. SANDERS, R.W. and S.A. WICKHAM, *Planktonic protozoa and metazoa: predation, food quality and population control*. 1993.
7. Dawn Parry, J., *Protozoan grazing of Freshwater Biofilms*, in *Advances in applied microbiology*. 2004, Elsevier. p. 167-196.
8. Finlay, B.J. and G.F. Esteban, *Freshwater protozoa: biodiversity and ecological function*. Biodiversity & Conservation, 1998. **7**(9): p. 1163-1186.
9. McCormick, P.V., *Lotic Protistan Herbivore Selectivity and Its Potential Impact on Benthic Algal Assemblages*. Journal of the North American Benthological Society, 1991. **10**(3): p. 238-250.
10. Majdi, N., *La méiofaune du biofilm épilithique de rivière dynamique et interactions trophiques*, ed. M. Tackx and E. Buffan-Dubau. 2012, Toulouse: Université Paul Sabatier, Toulouse 3.
11. Borchardt, M.A. and T.L. Bott, *Meiofaunal Grazing of Bacteria and Algae in a Piedmont Stream*. Journal of the North American Benthological Society, 1995. **14**(2): p. 278-298.
12. Amblard, C., et al., *Écologie microbienne en milieu aquatique : des virus aux protozoaires*. Revue des sciences de l'eau, 1998. **11**: p. 145.
13. Esteban, G.F., T. Fenchel, and B.J. Finlay, *Mixotrophy in Ciliates*. Protist, 2010. **161**(5): p. 621-641.
14. Finlay, B.J., et al., *On the abundance and distribution of protozoa and their food in a productive freshwater pond*. Eur J Protistol, 1988. **23**(3): p. 205-17.
15. Pratt, J.R. and J. Cairns, *Functional Groups in the Protozoa: Roles in Differing Ecosystems*^{1,2}. The Journal of Protozoology, 1985. **32**(3): p. 415-423.
16. Gomaa, F., et al., *One Alga to Rule them All: Unrelated Mixotrophic Testate Amoebae (Amoebozoa, Rhizaria and Stramenopiles) Share the Same Symbiont (Trebouxiophyceae)*. Protist, 2014. **165**(2): p. 161-76.
17. Yeates, G. and W. Foissner, *Testate amoebae as predators of nematodes*. Biology and Fertility of Soils, 1995. **20**(1): p. 1-7.
18. Epstein, S.S. and M.P. Shiaris, *RATES OF MICROBENTHIC AND MEIOBENTHIC BACTERIVORY IN A TEMPERATE MUDDY TIDAL FLAT COMMUNITY*. Applied and Environmental Microbiology, 1992. **58**(8): p. 2426-2431.
19. Fenchel, T., *The Quantitative Importance of the Benthic Microfauna of an Arctic Tundra Pond*. Hydrobiologia, 1975. **46**(4): p. 445-464.

Webographie

- A. Irstea-Bordeaux, <http://www.irstea.fr/linstitut/nos-centres/bordeaux>
- B. ENS-Lyons, <http://acces.ens-lyon.fr/evolution/biodiversite/dossiers-thematiques/biosurveillance-et-bioindicateurs/les-diatomees-bio-indicatrices-de-la-qualite-des-cours-d2019eau/>

ANNEXES

Sommaire annexes

Annexe 1 : Offre de stage.....	19
Annexe 2 : Anomalie des diatomées.....	20
Annexe 3 : Localisation Bourg, Pontails, Leyre.....	20
Annexe 4 : Les acteurs français en protistologie.....	21
Annexe 5 : Composition du DAUTA.....	22
Annexe 6 : Protocole de décoction.....	23
Annexe 7 : Le Flowcam.....	24
Annexe 8 : Photographies Archimède.....	25
Annexe 9 : Le Flowcam et les communautés protistes planctoniques.....	26

Annexe 1 : Offre de stage

Laboratoire : Irstea, Groupement de Bordeaux, Unité de Recherche « écosystèmes aquatiques et changements globaux », 50 avenue de Verdun, 33612 Gazinet-Cestas

Accessible en transports en commun (train ligne TER Bordeaux-Arcachon, bus CUB n°4 et 23)

Directeur du laboratoire : Eric ROCHARD - E-mail : eric.rochard@irstea.fr

Equipe de recherche : Équipe CARMA (Contaminants anthropiques et réponses des milieux aquatiques)

Responsable de l'équipe : Juliette Rosebery

Encadrants du stage :

Jacky Vedrenne Tél : 05 57 89 01 96 E-mail : jacky.vedrenne@irstea.fr	Soizic Morin Tél : 05 57 89 27 26 E-mail : soizic.morin@irstea.fr
--	--

Titre du sujet :

Inventaire bibliographique des interactions entre la microfaune (protozoaires, métazoaires) et les algues des biofilms lors des tests d'écotoxicologie en milieu aquatique sur supports immergés.

Sujet :

L'équipe CARMA de l'unité EABX du centre Irstea de Bordeaux réalise des recherches en écotoxicologie dans le milieu aquatique par la caractérisation des effets biologiques des toxiques (principalement pesticides) sur des communautés modèles (algues et biofilms, sur des supports immergés) et la contribution à une meilleure connaissance des phénomènes biologiques et physico-chimiques qui expliquent ces effets.

Pour cela des descripteurs globaux structurels (croissance, quantité de chlorophylle, structure spécifique des communautés) et fonctionnels (activité photosynthétique, activités enzymatiques antioxydantes) peuvent être utilisés tant in situ qu'en conditions contrôlées de laboratoire. Les impacts toxiques mesurés sur les microalgues sont généralement attribués à un effet direct du (des) contaminants sur la composante algale. Ce type d'interprétation ne prend pas en compte les effets indirects pouvant résulter des interactions entre organismes (consommation des microalgues par la microfaune benthique, par exemple).

Afin de mieux interpréter l'évolution des descripteurs, ce stage doit permettre d'établir un état des connaissances (par une étude bibliographique) des interactions entre : la communauté des protozoaires (et éventuellement la communauté des métazoaires) et les algues (par exemple par le broutage, ...) dans le biofilm (ou à l'interface eau/biofilm). Un inventaire des prédateurs et proies répertoriés sera réalisé, en estimant si possible le ratio proie/prédateur.

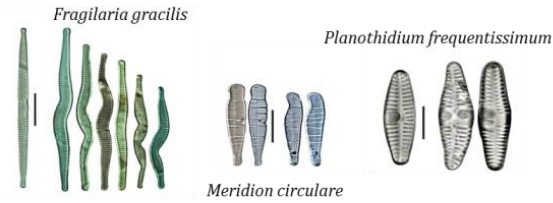
Activités :

Sous la responsabilité des personnes en charge des tests d'écotoxicologie, le stagiaire devra :

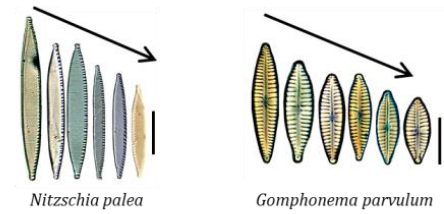
- Réaliser une étude bibliographie sur les interactions protozoaires (et métazoaires éventuellement) / microalgues et biofilms sur support immergés et les méthodes utilisées pour les évaluer.
- Réaliser une synthèse de l'inventaire des prédateurs et proies répertoriés en précisant les conditions expérimentales et les interactions sous un tableur (ou base de donnée).
- Réaliser des fiches synthétiques de reconnaissance des prédateurs inventoriés.
- Estimer si possible le ratio proie/prédateur.
- Possibilité de participer à des expérimentations et des observations microscopiques

Annexe 2 : Anomalie des diatomées

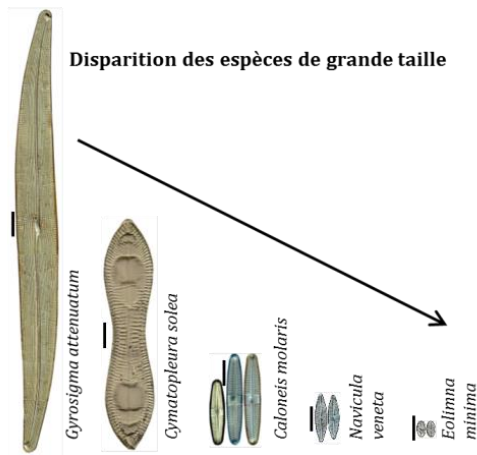
Apparition d'anomalies morphologiques (formes normales à gauche, et anormales à droite)



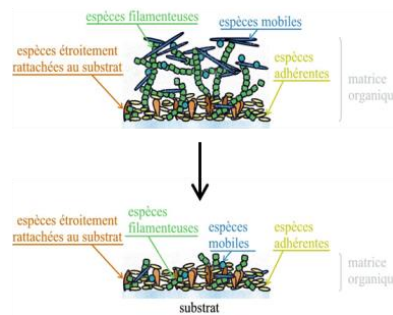
Diminution de taille au sein d'une espèce



Disparition des espèces de grande taille



Modification de l'architecture tridimensionnelle de la communauté



Barre d'échelle : 10 µm

Source : Irstea Bordeaux

Annexe 3 : Localisation Bourg, Pontails, Leyre



Annexe 4 : Les acteurs Français en protistologie

Noms	Thème de Recherche	Lieu de travail
Christian Amblard	Rôle de la biodiversité microbienne dans le fonctionnement des systèmes aquatiques	UMR CNRS 6023 Microorganisme : génome et environnement
Philippe Bouchard	Ecotoxicologie microbienne	UMR CNRS 6023 Microorganisme : génome et environnement
Geneviève Bricheux	Ecotoxicologie microbienne	UMR CNRS 6023 Microorganisme : génome et environnement
Valérie David	Diversité des protistes et stabilité des écosystèmes	UMR EPOC CNRS 5805 Université de Bordeaux
Marc Dellinger	Chargé de conservation des collections de ciliés	MNHN
Alain Dufour	Biofilms bactériens, activités anti-biofilms, interactions hôtes-parasites	LBCM Université de Bretagne Sud
Christine Dupuy	Réseau microbien plus particulièrement protistes hétérotrophes dans les écosystèmes côtiers en domaine pélagique et benthique + étude des protozoaires marins via le Flowcam	UMR LIENSs Université de La Rochelle
Isabelle Florent	Biodiversité et adaptation des microorganismes eucaryotes à leur environnement	MNHN
Philippe Grellier	Chargé de conservation des collections de protistes	MNHN
Laure Guillou	Protiste contre protiste : des parasites eucaryotes de microalgues toxiques	CNRS Station Biologique de Roscoff
Cédric Hubas	Responsable des collections de méiofaune (rotifères, gastrotriches , tardigrades, nématodes...)	MNHN
Doghri Ibtissem	Compréhension des interactions entre microorganismes au sein des biofilms en environnement marin	UMR LIENSs Université de La Rochelle
Hélène Montanié	Réseaux microbiens des vasières intertidales	UMR LIENSs Université de La Rochelle
Hervé Moreau	Génomique évolutive et environnementale du phytoplancton	UMR CNRS 7232 Université Pierre et Marie Curie
Pascaline Ory	Impact des virus et des protozoaires sur le compartiment bactérien planctonique	UMR LIENSs Université de La Rochelle
Sophie Sablé	Diversité bactérienne et interactions microbiennes au sein des biofilms marins	UMR LIENSs Université de La Rochelle
Télesphore Sime-Ngando	Virus et métabolisme microbien en milieu aquatique	UMR CNRS 6023 Microorganisme : génome et environnement
Colomban de Vargas	Dynamique de l'évolution du micro-plancton océanique	CNRS Station Biologique de Roscoff

Annexe 5 : Composition du DAUTA

COMPOSITION DU DAUTA POUR DIATOMÉES

Pour 1 litre de Dauta :

- 1 ml de $\text{FeSO}_4, 7 \text{H}_2\text{O}$ à 1 g/L
- 1 ml de NaHCO_3 , à 50 g/L
- 1 ml de Na_2CO_3 à 5 g/L
- 1 ml de $\text{MgSO}_4, 7 \text{H}_2\text{O}$ à 25 g/L
- 1 ml de $\text{CaCl}_2, 2 \text{H}_2\text{O}$ à 25 g/L
- 3,6 ml de $\text{Na}_2\text{SiO}_3, 9 \text{H}_2\text{O}$ à 28,42 g/L (soit environ 10 mg/L de Si)
- 1 ml de solution d'oligoéléments contenant :
 - $\text{ZnSO}_4, 7 \text{H}_2\text{O}$ à 20 mg/L
 - $\text{CuCl}_2, 2 \text{H}_2\text{O}$ à 20 mg/L
 - $\text{MnCl}_2, 4 \text{H}_2\text{O}$ à 400 mg/L
 - $\text{CoCl}_2, 2 \text{H}_2\text{O}$ à 10 mg/L
 - H_3BO_3 à 1 mg/L
 - Na_2MoO_4 à 35 mg/L
- 1 ml de KNO_3 , à 200 g/L
- 1 ml de K_2HPO_4 , à 25 g/L
- QSP 1 L d'eau distillée

Ajuster le pH à 7,5-8 avec HCl.

Annexe 6 : Protocole de décoction

Matériel:

- Bécher pyrex
- Bec benzène
- Eprouvette graduée
- Une petite grille ou passoire
- Erlen meyer 100mL
- Coton

Pour la culture :

- Eau évian
- Eau distillée
- Matière organique (riz, ebly, salade ou herbe desséchée)

Dans un premier temps, un mélange de 50mL d'eau d'Evian, 50mL d'eau distillée et de la matière organique bouillent dans un bécher pyrex durant 2 à 15 minutes de manière à solubiliser les nutriments et stériliser le milieu. La matière organique ajoutée correspond à 1 grain de riz, 1 grain d'ebly ou 0.5g de salade ou herbe desséchée suivant les milieux pour un volume de 100mL.

Cette solution est refroidie puis filtrée à l'aide d'une petite grille afin d'éliminer les grosses particules et déposée dans un erlen meyer de 100mL. On ajoute de l'aliment frais (riz, ebly, salade ou herbe) dans les mêmes quantités qu'à la première étape ci-dessus.

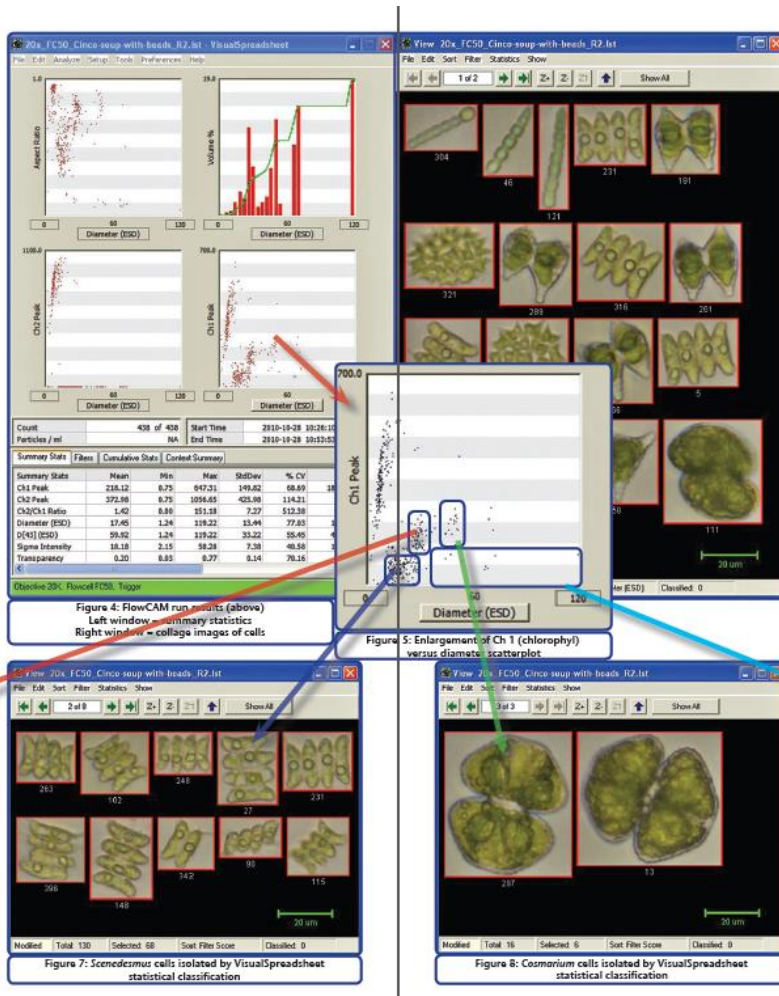
L'erlen meyer est bouché avec un coton puis incubé dans une enceinte thermostatée (16-23°C) alternant des périodes de jour et de nuit de douze heures chacune.

Tous les dix jours, le milieu de culture est renouvelé. Pour cela, la décoction précédente est préparée de nouveau. Suite à la filtration, elle est diluée au demi avec une solution de 50mL d'eau distillée et 50mL d'Evian. On élimine 50mL l'erlen meyer contenant la culture puis on ajoute la décoction jusqu'au trait de jauge (100mL) et de l'aliment frais. On rebouche avec un coton et on réincube dans la même enceinte.

Annexe 7 : Le flowcam



Vue générale du Flowcam

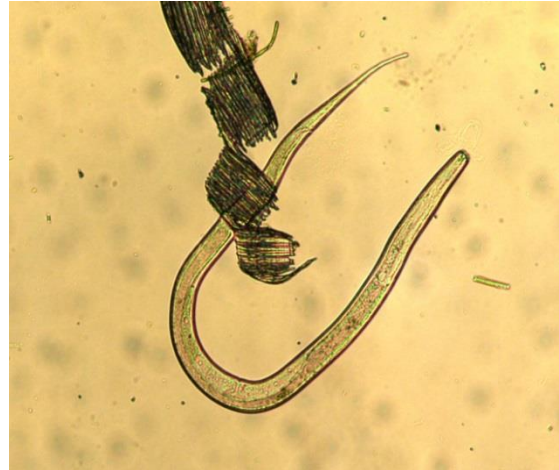


Les modalités du Flowcam

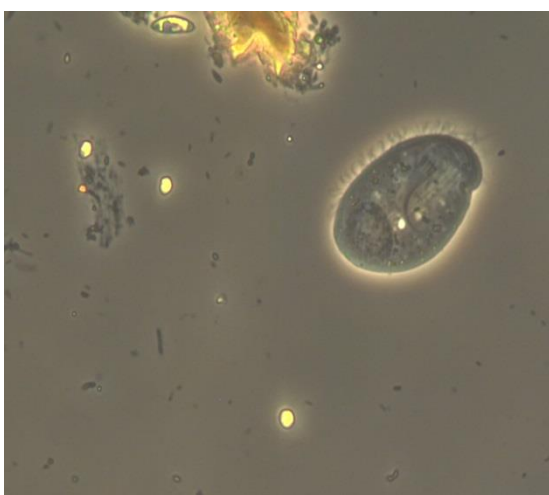
Annexe 8 : Photographies Archimède



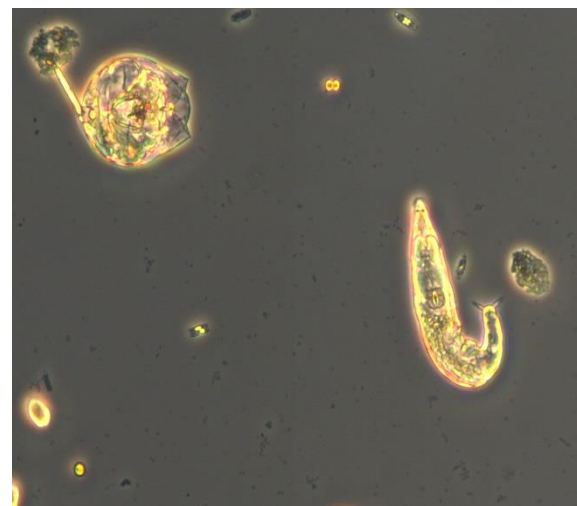
Amibe (Sarcodine) phagocytant des diatomées (x400, Cph)



Nématode (x50, BF)



Chilodonella sp. (Cilié) (x400, Cph)



Leucane monostyla et un digononta (x100,Cph)

Annexe 9 : Le flowcam et les communautés protistes planctoniques

Le FlowCAM, un outil pour étudier les communautés de protistes planctoniques: diversité, abondance, croissance et taux de broutage

Laureen Beaugéard^{1*}, Hélène Agogue¹, Jun Gong², Xiaoli Zhang², Christine Dupuy¹

1 UMR 7266, LIENSs, CNRS- Université de La Rochelle

2 Laboratory of Environmental Microbiology, Yantai, China

Dans un contexte de suivi des eaux côtières, il est essentiel d'étudier les compartiments planctoniques participant au réseau trophique, du pico-nano-microplancton jusqu'au mésozooplancton. Les méthodologies standards basées sur la microscopie et/ou sur des approches moléculaires sont souvent utilisées pour étudier les communautés planctoniques. Le FlowCAM est un outil permettant d'analyser rapidement un grand nombre de particules (2 μm à 2 mm) dans un flux liquide. Il regroupe ainsi les capacités d'un cytomètre en flux, d'un microscope et d'un détecteur de fluorescence (laser vert ou bleu). Il a été développé dans le but de caractériser les espèces planctoniques présentes dans les différents écosystèmes.

Notre étude reporte l'efficacité et les limites de détection du FlowCAM dans une étude de broutage des communautés planctoniques en juillet 2011 dans le Bassin de Marennes-Oléron. Les communautés planctoniques sont fractionnées par filtration sur une toile de nylon ou un filtre Nucleopore, < 200 μm , < 20 μm et < 2 μm et chaque fraction est incubée pendant 71h avec un prélèvement toutes les 12h. L'étude du picoplancton est effectuée en cytométrie en flux, le nanoplancton en microscopie à épifluorescence, les protistes au FlowCAM et en microscopie pour comparaison, et le microzooplancton métazoaires à la loupe binoculaire. Une bonne corrélation entre les comptages au microscope et ceux du FlowCAM a été trouvée pour les dinoflagellés et les diatomées (organismes de 15 à 100 μm). Les résultats pour les diatomées en chaîne ainsi que les ciliés seront discutés. Les taux de croissance du microplancton ainsi calculés sont du même ordre de grandeur avec les données du microscope et du FlowCAM. La structure et le fonctionnement du réseau trophique planctonique peuvent être ainsi déterminés.

En conclusion, le suivi des communautés planctoniques avec le FlowCAM est pour de nombreuses applications : (i) suivi du microplancton, (ii) identification de bioindicateurs (e.g. algues toxiques), (iii) étude des variations à court terme d'un organisme spécifique. Les limites du FlowCAM seront discutées et des voies de recherches seront évoquées.