



HAL
open science

Développement d'un indice de production primaire dans les plans d'eau par l'analyse du périphyton à l'aide d'une sonde fluorimétrique benthique : la BenthosTorch

P. Angleviel

► To cite this version:

P. Angleviel. Développement d'un indice de production primaire dans les plans d'eau par l'analyse du périphyton à l'aide d'une sonde fluorimétrique benthique : la BenthosTorch. Sciences de l'environnement. 2015. hal-02602969

HAL Id: hal-02602969

<https://hal.inrae.fr/hal-02602969v1>

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.

ECOLE POLYTECHNIQUE UNIVERSITAIRE DE MONTPELLIER

Stage de fin d'études
Département Sciences et Technologies de l'Eau

ANNEE 2014-2015

*Développement d'un indice de production primaire dans
les plans d'eau par l'analyse du périphyton à l'aide
d'une sonde fluorimétrique benthique : la BenthoTorch*



Institut national de recherche
en sciences et technologies
pour l'environnement et l'agriculture



ANGLEVIEL Pascale

BAUDOIN Jean-marc & ROUBEIX Vincent

BEC Béatrice



ECOLE POLYTECHNIQUE UNIVERSITAIRE DE MONTPELLIER
UNIVERSITE MONTPELLIER II SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC
Place Eugène Bataillon 34095 MONTPELLIER CEDEX 5
Tél. : 04 67 14 31 60 – Fax : 04 67 14 45 14
E-mail : scola@polytech.univ-montp2.fr



RESUME

La Directive Cadre Européenne (DCE) sur l'eau impose d'évaluer l'état écologique des écosystèmes aquatiques continentaux, notamment lacustres, et de mettre en œuvre des mesures de restauration pour les systèmes dégradés. Il est donc nécessaire de caractériser l'état écologique des plans d'eau. Pour cela, il faut à la fois décrire la structure des communautés aquatiques et le fonctionnement de l'écosystème. De nombreux indices structurels de populations aquatiques (invertébrés, diatomées et poissons) ont déjà été mis en place. Il est donc devenu indispensable de développer des indices fonctionnels pour faire un suivi environnemental complet.

Au pôle Onema-Irstea d'Hydroécologie des Plans d'eau, des recherches sur la mise en place d'un indice de la décomposition de la matière organique sont actuellement en cours. Mais pour avoir une caractérisation plus complète du fonctionnement d'un plan d'eau, il faudrait étudier en même temps les deux processus fondamentaux de décomposition et de production primaire de la matière organique. Ainsi l'objectif de ce stage est d'étudier la production primaire d'un lac par l'intermédiaire du périphyton.

La dynamique de croissance du périphyton peut permettre d'évaluer l'état de santé d'un plan d'eau. Ainsi la croissance des microalgues a été suivie sur des substrats artificiels, installés dans des milieux aquatiques différents, à l'aide d'une sonde fluorimétrique, la BenthosTorch. La sonde est capable de mesurer la concentration algale grâce à la fluorescence *in vivo* des pigments contenus dans les chloroplastes. Trois groupes algaux pourront être quantifiés en fonction de leur intensité de fluorescence: les cyanobactéries, les diatomées et les algues vertes. Les tests sur la sonde et les données récoltées pourront ensuite dans l'avenir permettre d'élaborer un indice de production primaire.

Mots-clés : Périphyton – Fluorimétrie *in vivo* – Indice fonctionnel

ABSTRACT

The European Water Framework Directive (WFD) needed to assess the ecological status of water ecosystems, including lakes, and implement restoration measures for degraded systems. It is therefore necessary to characterize the ecological status of lakes. For this it is necessary both to describe the structure of aquatic communities and ecosystem functioning. Many structural indicators of aquatic populations (invertebrates, fish and diatoms) have already been implemented. It has therefore become essential to develop functional indices to make a complete environmental monitoring.

In Onema-pole Irstea Hydroecology of Water, researches on the development of an index of decomposition of organic matter are ongoing. However, in order to get a characterization of the functioning of a lake, the two fundamental processes of decomposition and primary production of organic matter should be assessed in the same time. Thus, the objective of this internship is to study the primary production of a lake through periphyton.

The growth dynamic of periphyton can help to assess the health status of a water body. So the growth of microalgae was followed on artificial substrates placed in different aquatic backgrounds with a fluorimetric probe, the BenthosTorch. The probe is able to measure the concentration of algae through *in vivo* fluorescence of pigments in chloroplasts. Three algal groups can be quantified based on their fluorescence intensity: cyanobacteria, diatoms and green algae. The tests on the probe and the data collected will help in future to develop an index of primary production.

Key words : Periphyton –*In vivo* fluorimetry – Index functional

REMERCIEMENT

Cette page est dédiée aux nombreux remerciements que j'aimerais pouvoir exprimer pour les personnes qui m'ont permis de mener à bien ce stage au pôle HYAX d'Irstea.

Je tiens à remercier dans un premier temps mes tuteurs : Mr Jean-Marc BAUDOIN et Mr Vincent ROUBEIX à Irstea d'Aix-en-Provence et Mme Béatrice BEC, professeur à Polytech Montpellier. Tous trois ont pris le temps de pouvoir répondre à mes nombreuses interrogations et m'ont suivi au cours de ces 6 mois de stage. Je voudrais témoigner plus particulièrement toute ma reconnaissance à Vincent pour cette expérience enrichissante et pleine d'intérêt, et pour sa gentillesse et sa confiance pour mener à bien ce projet. Grâce à lui j'ai énormément appris et j'ai eu envie d'utiliser des logiciels et protocoles que je trouve essentiel quand on veut travailler dans le suivi environnemental.

Je voudrais aussi remercier mon collègue de bureau, Julien DUBLON, sans qui c'est 6 mois n'aurait pas été pareil, grâce à lui j'ai pu me mettre dans l'ambiance « Nouvelle-Calédonie » dès mon arrivée avec ses cartes postales et ses chansons.

Tiphaine PEROUX, la super bricoleuse, qui a eu la patience de m'aider à la construction des substrats artificiels et en m'amenant sur le terrain. MERCI.

Fantine MERE et Elsa MURET, les deux stagiaires avec qui nous partageons notre quotidien de stagiaires, de véritable « triplète ». Merci particulièrement à Fantine pour sa patience pour mes questions sur R ou Arcmap, et Elsa pour la prise en main du spectrophotomètre. Dans l'équipe des stagiaires, n'oublions pas Guillaume et François-Xavier (FX).

Virginie, *alias* Nine, pour les randonnées lors des pauses midis à la découverte des plantes provençales. J'ai pu retravailler mon cardio grâce à toi, donc c'est de tout mon cœur que je te remercie.

Dans l'équipe d'HYAX, je voudrais remercier particulièrement, pour la campagne de prélèvement DREAM : Adrien MOREL, Gait, Xavier, Tiphaine et Nine. Ensuite lors de ces mois de stage j'ai eu de très intéressantes discussions avec Medhi et Yann (« Coucou Yann ! »), effectué d'autres campagnes de terrain avec Céline et Delphine. Je n'ai jamais cru qu'un jour je passerais des coups de pinceau sur des feuilles de chêne, merci Céline. Ange est sa gentillesse.

Je voudrais aussi remercier toutes les personnes de l'équipe de recherche d'Irstea qui ont assisté à ma répétition et qui ont pu me donner leurs précieux conseils et me permettre de m'améliorer : Fabien, Anthony, Nathalie, Samuel.

En plus de l'équipe d'HYAX, j'ai eu la chance aussi de pouvoir discuter avec des personnes d'autres secteurs (chimie des sols et hydrologie) comme Yves, Anthony et Fostine grâce à eux nos pauses midis furent plus intéressantes sous le soleil sudiste.

Malheureusement je n'ai pas pu citer tout le monde mais l'ensemble des personnes présentes lors de ces 6 mois que ce soit sur le terrain ou dans les laboratoires, je leur dis un GRAND MERCI.

GLOSSAIRE

DCE : Directive Cadre sur l'Eau

Cyano : Cyanobactérie

Diatoms : Diatomées

Green Algae : Algues vertes

LED : Diode électroluminescente (*Light-Emitting Diode*)

DESCRIPTION DE L'ENTREPRISE

Le **Cemagref**, Centre national du machinisme agricole, du génie rural et des Eaux et Forêts, est né en 1981 de la fusion du Centre technique du GREF (CTGREF) et du Centre national d'études et d'expérimentations du machinisme agricole (CNEEMA). Trente ans après sa création, le Cemagref affirme son positionnement au cœur de la recherche environnementale en France sur les questions de l'eau, de la gestion des risques environnementaux, des technologies vertes et de l'aménagement durable du territoire. Mais malgré ces approches pluridisciplinaires qui caractérisaient toute sa force et son originalité, ce centre souffrait d'un manque de notoriété. Une démarche participative a donc été engagée au sein du Cemagref pour dégager les éléments clés de son positionnement (missions, vocations, valeurs, ambitions, ...) et réfléchir à une nouvelle identité.

En Novembre 2011, le Cemagref est devenu **l'Irstea, Institut national de Recherche en Sciences et Technologies pour l'Environnement et l'Agriculture**, afin de faire coïncider son nom avec la réalité actuelle de ses recherches. Elles ont évolué des problèmes de mécanisation et d'aménagement rural vers les questions agro-environnementales. Irstea est donc devenu un centre de recherche scientifique dont l'objectif est de produire des solutions concrètes à des problèmes environnementaux ou agricoles. Cet institut a hérité du modèle de recherche du Cemagref, avec la volonté de le renforcer et de le développer. De plus, cet institut montre la particularité d'associer chercheurs et ingénieurs dans une démarche scientifique intégrant de multiples disciplines (informatiques, mathématiques, sciences économiques, humaines et sociale) et des expérimentations de laboratoire ou de terrain.

L'Irstea a pour ambition de devenir un leader français et un acteur européen majeur de la recherche environnementale pour 2020. La stratégie de l'institut est donc construite pour relever trois défis scientifiques:

- ❖ concevoir des méthodes et outils pour définir, comprendre et agir sur la qualité environnementale.
- ❖ déterminer les ressources naturelles des territoires, pour avoir une approche multisectorielle et une gestion adaptative.
- ❖ élargir l'approche des risques, par l'étude de la viabilité des systèmes environnementaux.

Le budget annuel 2013 de cet institut est de 116 millions d'euros, dont 27% de ressources propres. Le centre accueille 1604 collaborateurs répartis dans neuf centres dont trois départements de recherche : eaux, écotechnologies et territoires. 30% des recherches effectuées sont liés aux changements globaux, notamment climatiques, et les 70% restant portent sur les questions liées aux eaux continentales. Les équipes se composent de chercheurs, d'ingénieurs, de doctorants, de post-doctorants, ainsi que des techniciens et des administratifs.

Le centre d'Aix-en-Provence où j'ai effectué mon stage, est implanté au Tholonet, à proximité d'Aix-en-Provence, où il regroupe 80 permanents, dont 42 ingénieurs et chercheurs. Ce centre est focalisé sur les risques naturels et la vulnérabilité des écosystèmes. Des recherches sont réalisées en appui aux politiques publiques et en partenariat avec des acteurs socio-économiques. Ces acteurs sont dans le domaine des risques de gestion des écosystèmes terrestres et aquatiques, et les risques de certains ouvrages, équipements et technologies en interaction avec ces écosystèmes (barrages, digues, systèmes d'irrigation, centrales nucléaires). Les disciplines mise en œuvre sont l'écologie, la mécanique, le génie civil, la statistique et l'hydrologie. Le centre d'Aix-en-Provence se divise de 3 unités de recherche : Hydrobiologie (HYAX), Ouvrages hydrauliques et hydrologie (OHAX) et Ecosystèmes méditerranéens et risques (EMAX).

Dans mon cas, je faisais partie de **l'unité de recherche d'hydrobiologie HYAX**. Cette unité étudie les hydrosystèmes continentaux, cours d'eau et plans d'eau et leurs communautés animales (macrofaune

benthique et ichtyofaune en particulier). Ses activités se portent sur l'identification et la description de la dynamique des espèces et des peuplements, et l'explication du fonctionnement des hydrosystèmes en particulier lacustre, sous contraintes anthropiques. L'unité développe des connaissances visant à évaluer les conséquences de pressions hydromorphologiques, chimiques ou biologiques sur les processus structurant les peuplements et soutenant le fonctionnement des systèmes. De plus, elle porte une attention particulière à l'impact de l'augmentation de la température sur les systèmes étudiés.

Leurs recherches s'appuient sur des données collectées dans le cadre de suivis hydrobiologiques permanents et des données nationales et européennes collectées dans le cadre des réseaux d'observation des plans d'eau. Mais les données proviennent aussi des expérimentations sur sites et en mésocosmes. Le schéma représente les pressions pouvant modifier ou dégrader les écosystèmes aquatiques.

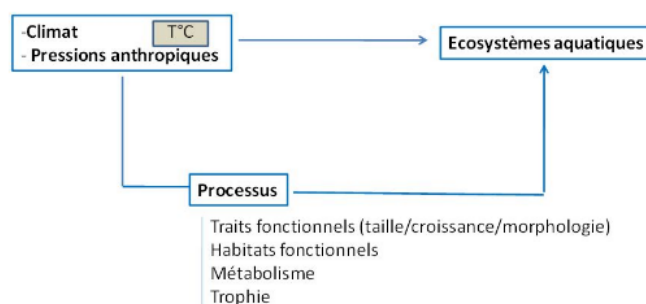


Schéma bilan des pressions étudiées (source: <http://www.irstea.fr/hyax>)

Pour réaliser ses objectifs l'UR bénéficie sur le site de deux fourgons, de deux véhicules tout-terrain et de quatre bateaux sur remorques, en plus du matériel d'acquisition de données *in situ*, d'échantillonnage d'invertébrés, de télémétrie et de divers équipement permettant le prélèvement d'échantillons d'eau, de sédiments et de mesures. Sur le site, on trouve aussi une structure expérimentale permettant l'élevage de poissons en conditions contrôlées de températures et ainsi que deux laboratoires équipés pour la détermination des invertébrés et la réalisation d'analyses biologiques sur l'ichtyofaune.

Depuis 2008, l'Onema, Office national de l'eau et des milieux aquatiques et l'Irstea forment un partenariat scientifique. Leur priorité de 2013 à 2015, est la réduction des impacts sur les milieux aquatiques et la restauration de leurs fonctionnalités, en s'inscrivant de surcroît dans le cadre de la Directive Cadre européenne sur l'Eau. Ce partenariat a permis la création de 3 pôles Onema-Irstea d'études et de recherche : Hydroécologie des cours d'eau à Lyon, Ecohydraulique et continuité écologique à Toulouse et Hydroécologie des plans d'eau à Aix-en-Provence. Cette collaboration a été engagée pour répondre plus efficacement aux attentes du Ministère de l'Ecologie, du développement durable et de l'énergie.

Ainsi l'équipe du **pôle Onema-Irstea d'Hydroécologie des plans d'eaux** contribue au développement de méthodes et outils pour la réalisation de diagnostics écologiques et la restauration des plans d'eau, en incluant la réflexion les contraintes climatiques. L'objectif finalisé principal est le développement de protocoles, d'indicateurs et de modèles permettant une évaluation pleinement fonctionnelle de l'état et des trajectoires des écosystèmes, dans le contexte des changements globaux (en particulier climat et habitat) et de la mise en oeuvre de mesures de restauration, renaturation, ou création d'écosystèmes (notamment dans le cadre de mesures compensatoires). L'enjeu est d'apporter les connaissances et les données nécessaires à une meilleure évaluation des services écosystémiques et à la compréhension du rôle de la biodiversité dans leur accomplissement.

Cette structure propose, comme dans les deux autres pôles, la proximité des experts d'Irstea, qui a pour vocation à mener des recherches finalisées, et les ingénieurs de l'Onema qui accompagne la mise en oeuvre de la politique publique de l'Eau en France. Cette association permet de fournir un appui scientifique et technique nécessaire à la gestion durable et l'étude des écosystèmes aquatiques.

SOMMAIRE

Contenu

INTRODUCTION	1
I. Le périphyton, un bioindicateur.....	2
II. Matériel et méthode	3
A. La BenthosTorch.....	3
1) Rappel sur la photosynthèse	3
2) Description du matériel (MOLDAENKE, 2014).....	4
3) Le principe de fonctionnement	5
4) La calibration.....	6
5) Description des tests préalables.....	7
B. Protocole expérimental de suivi de la production primaire	13
1) Les Objectifs.....	13
2) Descriptions des milieux expérimentaux.....	14
3) Description des étapes de construction des substrats artificiels	14
4) Suivis des caractéristiques physico-chimiques des milieux	16
5) Comparaison avec l'observation microscopique	16
III. Résultats des suivis.....	17
A. Suivi en laboratoire (Δt en jours).....	17
B. Suivi en bassin expérimental (Δt en jours)	19
1) Caractérisation de la flore algales.....	19
2) Premier suivi.....	19
3) Deuxième suivi.....	21
C. Suivi <i>In situ</i> du lac du Bimont (Δt en semaines et en mois).....	22
1) Effet de la proximité de la rive	23
2) Variabilité sur le substrat.....	24
3) Croissance du périphyton	24
IV. Etude de l'influence de la température sur le périphyton	26
A. Protocole expérimental	26
B. Résultats	26
CONCLUSION	28

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Récapitulatif des pigments présents dans les différents groupes algaux et la longueur d'onde d'excitation responsable du maximum de fluorescence.	6
Tableau 2: Tests qualitatifs sur des échantillons <i>in situ</i> de la Cause (13 février 2015).....	9
Tableau 3: Informations sur les individus utilisés pour les tests de la BenthosTorch.....	9
Tableau 4: Exemples de tests qualitatifs sur des échantillons de cultures pures dans des disques de calibration blanc (avril 2015, moyennes et écarts-types)	10
Tableau 5 : Comparaison des données de la BenthosTorch et des dosages par spectrophotométrie en chlorophylle-a (juin à juillet 2015).....	12
Tableau 6: Calendrier du suivi de la croissance des biofilms sur les substrats artificiels localisés à deux stations (RIVE et LARGE) du lac du Bimont	23
Tableau 7: Exemple d'analyse de phytoplancton dans le lac du Bimont (2 avril 2015)	24
Tableau 8 : Caractéristiques physico-chimique des mésocosmes à $t = 0$	26

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Les différentes phases du cycle de développement d'un biofilm (<i>d'après Biggs B.J.F., 1996</i>) et des photographies de périphyton (<i>source : http://host119.yakama.com & http://news.science360.gov</i>) 2	2
Figure 2: Schéma simplifié de la chaîne de réactions de la photosynthèse (<i>source : http://www.fluorimetrie.com/emission-de-fluorescence.html</i>)..... 4	4
Figure 3: Photographies de la BenthosTorch (<i>source: Manuel d'utilisation</i>) 5	5
Figure 4: Photographie de la tête sensorielle de face (<i>source: Manuel d'utilisation de la BenthosTorch</i>)..... 5	5
Figure 5 : Les spectres d'absorptions des pigments permettant la distinction entre les différents groupes microphytiques (<i>source : http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/Photosynthese-cours/04-pigments.htm</i>)..... 6	6
Figure 6 : Les représentations de la dispersion des valeurs présent en 5 réplicats pour chaque groupe microphytique..... 8	8
Figure 7 : Régression linéaire (1:1) des valeurs de BenthosTorch en fonction des valeurs de spectrophotométrie 13	13
Figure 8 : Schéma et photographies de l'installation des substrats artificiels ©Angleviel & Peroux 15	15
Figure 9: Photographies des substrats artificiels pour le lac du Bimont et le bassin expérimental & de l'enregistreur Hobo en place ©Angleviel & Peroux 16	16
Figure 10: Photographies de diatomées fixées, <i>Melosira</i> , en reproduction (auxospore) ©Angleviel..... 16	16
Figure 11: Schéma pour le dénombrement des cellules (<i>source: http://biotech.spip.ac-rouen.fr/IMG/pdf/TPnumerationcellulaire.pdf</i>) 17	17
Figure 12: Suivis de la croissance au cours du temps en laboratoire de la diatomée NPAL et de l'algue verte (AV) dans une boîte de Pétri. 18	18
Figure 13: Photographies lors des manipulations pour les suivis en bassin expérimental ©Angleviel 19	19
Figure 14: Suivi de la croissance du biofilm dans le bassin expérimental sur 32 jours (mars/avril 2015)..... 20	20
Figure 15: Comparaison des données de la BenthosTorch et celles du décompte à la lame de Malassez pour la concentration totale du biofilm & une photographie de la lame de Malassez ©Angleviel..... 21	21
Figure 16: Suivi de la croissance du biofilm dans le bassin expérimental sur 33 jours (réplicat Avril/Mai 2015)..... 22	22

Figure 17: Histogrammes des moyennes de concentrations des différentes classes algales, mesurées sur les 9 points de mesures à la BenthosTorch (de février à juin 2015). <i>Différence significatives entre les deux plaques pour les deux périodes de croissance (2 avril : $t(26) = 1,19.10^{-5}$ & 6 mai : $t(26) = 5,08.10^{-4}$; H_0 rejetée $p\text{-value} < 0,05$)</i>	23
Figure 18: Graphiques de l'évolution des moyennes de concentrations des microalgues sur les plaques au cours du temps pour les deux stations de mesures sur Bimont (fin février / début juin 2015).....	25
Figure 19 : Graphiques avec une échelle logarithmique du suivi de la croissance du périphyton dans deux milieux contrôlés (chaud 28-30 °C et froid 20-22 °C) sur 18 jours.....	27
Figure 20: Photographies des deux biofilms à différentes températures ©Angleviel.....	27

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1: Protocole de terrain synthétique pour l'utilisation de la BenthosTorch.....	I
Annexe 2: L'attestation de calibration de la BenthosTorch fournit par la société Moldaenke.....	IV
Annexe 3: Tableaux des données utilisées pour la vérification de la stabilité de la BenthosTorch (26 février 2015).....	V
Annexe 4: Récapitulatif des tests qualitatifs sur cultures pures de microalgues (avril/mai 2015)	VI
Annexe 5: Histogrammes des dilutions, pour comparer les données théoriques et les données de la BenthosTorch (avril 2015).....	VII
Annexe 6: Etapes pour les mesures de chlorophylle avec le spectrophotomètre	VIII
Annexe 7: Tableaux des résultats pour comparer les mesures à la BenthosTorch et les mesures par dosage spectrophotométrique	IX
Annexe 8 : Plan et photographie du bassin expérimental sur le site d'Irstea Aix-en-Provence.....	X
Annexe 9: Carte du lac du Bimont avec les coordonnées des stations RIVE et LARGE et photographies.....	XI
Annexe 10: Schéma et photographies du substrat artificiel en polycarbonate © <i>Angleviel</i>	XII
Annexe 11 : Inventaire de la flore algale du bassin expérimental et quelques photographies des microalgues observées © <i>Angleviel</i>	XIII
Annexe 12: Graphiques des données prélevées avec le dispositif dans le bassin expérimental et l'enregistreur Hobo	XIV
Annexe 13: Exemple des schémas de la variabilité de la composition du périphyton sur les plaques expérimentales de Bimont au bout d'un mois de croissance (avril 2015).....	XVI

INTRODUCTION

La DCE a fixé un objectif ambitieux pour la préservation et la restauration de l'état des eaux superficielles et souterraines. Celui d'atteindre d'ici 2015 le « bon état » de l'ensemble des masses d'eau, pour la métropole comme pour les départements d'Outre-mer. Pour réaliser cet objectif, il faut être capable de caractériser l'état écologique du plan d'eau en question, en déterminant à la fois la structure des communautés aquatiques et le fonctionnement de l'écosystème.

Les indices biologiques décrivant la structure des écosystèmes aquatiques ont largement été développés depuis le véritable essor de la bio indication en France dans les années 70 : l'IBGN, l'IBD, l'IBMR, l'IPR¹. Par contre, la détermination de ces indices ne s'appuie que sur un seul aspect d'un plan d'eau, sa structure biologique. C'est pour cela qu'il est essentiel de nos jours de développer des indices fonctionnels, se rapportant aux processus écosystémiques de ces mêmes plans d'eau. Ces indices devraient être particulièrement utiles en complément des indices biologiques pour évaluer, par exemple, les conséquences de restaurations écologiques ou encore pour mesurer les effets du réchauffement climatique. Ils pourront aussi renseigner sur la capacité des hydrosystèmes à rendre certains services écosystémiques.

Des recherches sont actuellement en cours, au sein du pôle Onema-Irstea d'Hydroécologie des plans d'eaux, pour mettre au point un indice de décomposition de la matière organique et des méthodes de suivi du métabolisme global de ces écosystèmes via l'évaluation des flux de dioxyde de carbone, de méthane et d'oxygène. L'objectif de ce stage est de rajouter à ces recherches une étude de la production primaire (synthèse de matière organique à partir de matière minérale), pour avoir une vue d'ensemble du fonctionnement d'un plan d'eau à un temps donné.

Si les producteurs primaires constituent, dans leur ensemble, le niveau trophique le plus intensément étudié dans les écosystèmes aquatiques, la majorité des mesures concerne seulement la productivité primaire de la zone pélagique (Capblanc, 1973). Mais grâce aux avancées technologiques, de nos jours il est maintenant possible d'estimer la biomasse du phytobenthos. Ces biomasses sont estimées indirectement grâce aux pigments photosynthétiques contenus dans les chloroplastes des cellules végétales. Les études se portent en particulier sur la chlorophylle-a car c'est un pigment présent chez les toutes algues eucaryotes et les cyanobactéries. La chlorophylle-a est très généralement considérée comme un bon indicateur de la biomasse végétale. De plus, elle présente l'avantage de pouvoir être dosée rapidement (Kim & Travers, 1995). Ainsi, au cours de ce stage, la production primaire sera caractérisée par le suivi de la colonisation du biofilm phototrophe, le périphyton, sur des substrats artificiels. Ce suivi sera effectué à l'aide d'une sonde fluorimétrique : la BenthosTorch, qui mesure les concentrations algales sur une surface à partir de la fluorescence *in vivo* des pigments.

Donc après une familiarisation avec le fonctionnement de la nouvelle sonde et l'exécution de plusieurs tests de mesures avec celle-ci, il fut possible de concevoir un protocole expérimental. Il implique l'installation de substrats artificiels dans des plans d'eau (naturels et artificiels), pour pouvoir faire un suivi de leur colonisation. Les mesures ont été faites à l'aide de la BenthosTorch, avec un contrôle au microscope de la qualité (grands groupes microalgues) et de la quantité (densité de cellules).

Les données récoltées et les hypothèses proposées devront permettre d'élaborer un indice de production primaire dans le futur, qu'on pourrait associer avec l'indice de décomposition de la matière organique, pour caractériser au mieux le fonctionnement des plans d'eau.

¹ IBGN : Indice Biologique Global Normalisé / IBD : Indice Biologique Diatomées / IBMR : Indice Biologique Macrophytique en Rivière / IPR : Indice Poissons Rivière

I. Le périphyton, un bioindicateur

Il existe trois grands groupes d'algues aquatiques : le phytoplancton (microalgues pélagiques), le périphyton (microalgues benthiques) et les macroalgues multicellulaires. Dans le phytoplancton et le périphyton on retrouve les mêmes grandes classes de microalgues : diatomées, algues vertes, dinoflagellés et euglènes, ainsi qu'un groupe de bactérie photosynthétique, les cyanobactéries. Par contre, le périphyton se différencie du phytoplancton par sa diversité et surtout par la formation d'un biofilm (mousse) se développant sur les fonds littoraux des cours d'eau ou des plans d'eau. La composition du biofilm est souvent marquée par des diatomées et des algues filamenteuses (incluant *Oscillatoria*, *Lygbya*, *Spyrogyra*, ...). Le terme périphyton a été défini par R.G. Wetzel (Wetzel, 1983) comme « une communauté complexe de micro-organismes (algues bactéries, champignons) attachée à un substrat. Les substrats peuvent être inorganiques ou organiques, vivants ou morts ». Un autre terme pourra utiliser : biofilm, l'ensemble de ces micro-organismes qui ont adhéré avec les sédiments.

Il est important de noter aussi que dans un environnement aqueux, l'adhésion de micro-organismes à la surface de matériaux est un processus naturel (Sekar, Venugopalan, Nandakumar, Nair, & Rao, 2004). Le biofilm est nommé différemment en fonction du substrat où il repose. Par exemple, sur du sable on parle d'un biofilm épisammique, sur des rochers ou des galets d'épilithique et sur de la boue (vase) d'épipélique.

Mes recherches ont porté sur la croissance du périphyton dans les lacs. Dans la littérature, la cinétique de croissance du périphyton se caractérise par plusieurs étapes : une étape de dépôt et de croissance qui est plutôt rapide jusqu'à ce que le biofilm atteigne une taille critique avant la phase de perte. L'étape initiale de la formation du biofilm est celle du dépôt et de l'attachement sur le support des premiers micro-organismes. Cette phase de piégeage se finit lorsque la taille du périphyton est assez importante pour que les couches supérieures puissent être arrachées par la vitesse du courant ou encore broutées par les invertébrés aquatiques ou les poissons. La courbe de cinétique retombe formant ainsi une « cloche ». Cette chute est due à la mortalité des cellules des couches inférieures. Les cellules algales des couches inférieures ne sont plus en contact avec l'oxygène, la lumière et les nutriments. Par conséquent, elles ne seront plus capables de se maintenir en vie, d'assurer leur métabolisme. Ce cycle peut se renouveler sur un substrat au cours du temps. Cependant, il peut être aussi perturbé à n'importe quel moment. Par exemple, lors d'un fort événement pluvieux ou encore d'un arrachement anthropique (par exemple, draguage dans des lacs eutrophisés). La figure suivante représente le modèle conceptuel de la formation du périphyton décrit par B.J.F. Biggs (Biggs, 1996). Ce modèle a pu être observé autant en rivières qu'en canaux expérimentaux, sur substrats naturels et artificiels, d'après l'auteur.

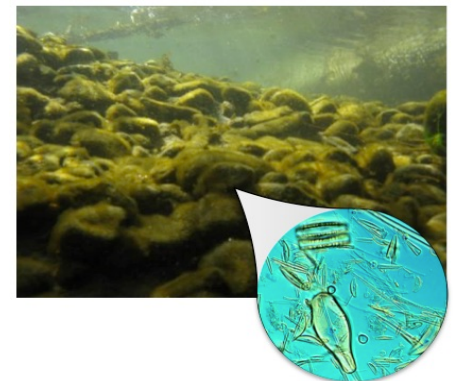
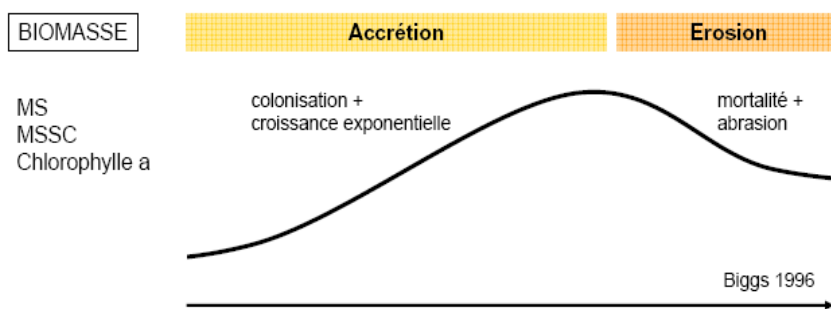


Figure 1: Les différentes phases du cycle de développement d'un biofilm (d'après Biggs B.J.F., 1996) et des photographies de périphyton (source : <http://host119.yakama.com> & <http://news.science360.gov>)

Le périphyton est considéré comme un bioindicateur efficace de la qualité des écosystèmes aquatiques. Un bio indicateur peut se définir comme une espèce ou un groupe d'espèces végétales ou animales dont les caractéristiques observées (occurrence, abondance, biomasse, caractéristiques ou « traits » biologiques) fournissent une indication sur le niveau de la dégradation du milieu. Donc en étudiant la croissance du périphyton nous pouvons avoir une idée du fonctionnement d'un plan d'eau. Par exemple, une accumulation rapide de biofilm sur les substrats littoraux pourrait indiquer qu'il y a une pollution anthropique responsable de l'augmentation de la vitesse de croissance algale. C'est un processus nommé eutrophisation, synonyme en général de dégradation de la qualité de l'eau.

Le périphyton développé sur les substrats est la première communauté à réagir aux apports (Lambert, Cattaneo, & Carignan, 2008). Il est un des systèmes biologiques les plus sensibles à un début d'eutrophisation dans l'eau douce (Mattila & Räsänen, 1998). Du coup, la détermination de la biomasse et de la composition des algues littorales peut donc s'avérer être un outil efficace pour déceler tôt une perturbation dans les lacs.

II. Matériel et méthode

Ce stage se divise en deux études expérimentales : comprendre le fonctionnement de la BenthosTorch et vérifier la fiabilité de ces mesures. Ensuite, il a fallu analyser la croissance du périphyton dans différentes conditions environnementales, comme des milieux naturels et artificiels.

A. La BenthosTorch

1) Rappel sur la photosynthèse

La BenthosTorch est un outil qui permet de mesurer rapidement et *in situ* la concentration de différentes algues benthiques : algues vertes, algues bleues-vertes (cyanobactéries) et diatomées, à partir de leur émission de fluorescence. La fluorescence est une émission lumineuse provoquée par l'excitation d'une molécule, généralement après l'absorption d'un photon. Ainsi la fluorescence algale est directement liée au processus de photosynthèse.

La photosynthèse est une action métabolique qui consiste à synthétiser de l'énergie (Adénosine Triphosphate, ATP) à l'aide d'énergie lumineuse et de pigments photosynthétiques. Ces pigments sont stockés dans des organites, nommés les chloroplastes. C'est une chaîne de réactions enzymatiques qui débute lorsque des photons frappent les thylakoïdes des chloroplastes. Dans les membranes thylakoïdales, se trouvent des photosystèmes, formés de protéines et de molécules pigmentaires chlorophylliennes. Il existe deux types de photosystèmes, PSI et PSII, branchés en série via des molécules qui servent de navettes de transport aux électrons qu'elles génèrent. La première phase débute lorsque la cellule végétale, au niveau du PSII, piège les photons de la lumière solaire, pour scinder les molécules d'eau (H_2O) en oxygène (O_2), protons (H^+) et électrons (e^-). Les protons vont ensuite intervenir dans la formation d'ATP et les électrons vont parcourir la chaîne de transfert complexe, jusqu'au PSI, aboutissant à la formation d'une autre molécule énergétique, le NADP (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate). Ce sont les pigments chlorophylliens excités par les photons qui émettent les électrons pour se décharger et retourner à leur état fondamental de repos. Mais au niveau du PS II, l'état fondamental est aussi retrouvé par une émission de fluorescence chlorophyllienne et un dégagement de chaleur. La fluorescence rouge est naturellement émise et son spectre d'émission est compris entre 630 et 680nm. Le schéma ci-dessous résume la chaîne de réactions de la photosynthèse.

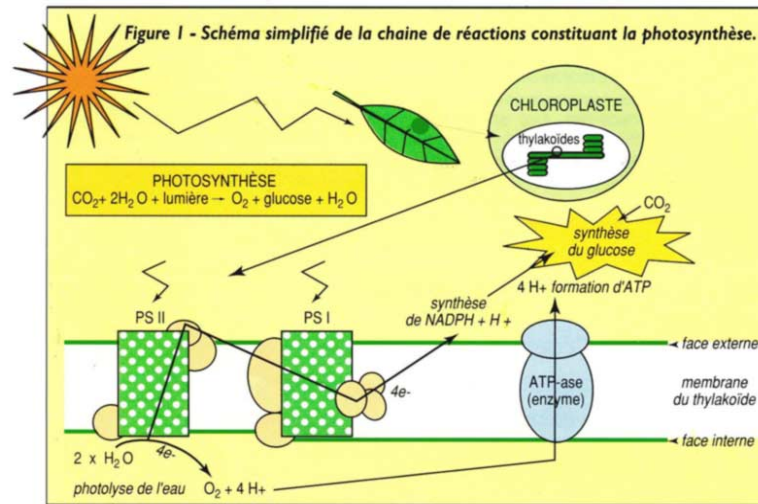


Figure 2: Schéma simplifié de la chaîne de réactions de la photosynthèse (source : <http://www.fluorimetrie.com/emission-de-fluorescence.html>)

Les 3 classes algales détectées par la BenthosTorch se différencient par leur gamme de pigments, responsable de leur coloration et de l'absorption de certaines longueurs d'ondes lumineuses.

- ❖ **Les algues vertes**, Chlorophytes, ont une composition pigmentaire principalement de chlorophylle-a, un pigment qui absorbe toutes les longueurs d'onde à part celle de la couleur verte, entre 490 et 570 nanomètres.
- ❖ **Les cyanobactéries**, Cyanophytes, synthétisent plusieurs types de pigments: la chlorophylle-a, les caroténoïdes, les phycobiliprotéines (tels que la phycocyanine, la phycoerythrine et l'allophycocyanine). Cette composition en pigments, spécifique des cyanobactéries, leur permettent d'exploiter une plus grande étendue de longueur d'onde du rayonnement solaire disponible. Ainsi la photosynthèse est plus efficace même avec de faible intensité lumineuse (Lavoie, Laurion, Warren, & Vincent, 2007). Ce sont des organismes qui ont aussi la particularité de ne pas avoir de chloroplastes. Les pigments sont répartis sur des thylakoïdes dispersés dans le cytoplasme de la cellule. Les cyanobactéries sont plus proches des bactéries que des végétaux.
- ❖ **Les diatomées**, Bacillariophyta, forment la plus vaste des cinq classes de chromophytes unicellulaires. Ces algues sont enfermées dans une coque silicieuse (le frustule) et représente en général une part prépondérante du périphyton en eau douce. Les diatomées sont d'excellents indicateurs de la qualité des eaux, en particulier en considérant leur tolérance aux paramètres de l'eau indicateurs de pollution (pH, teneur en sels, en azote, en éléments nutritifs, température). Elles sont plutôt de couleur jaune clair, vert olive ou brun foncé et cette coloration est due à une combinaison de pigments de carotènes et de xanthophylles, dont la fucoxanthine.

2) Description du matériel (MOLDAENKE, 2014)

La BenthosTorch est un appareil de terrain portable pour la quantification *in situ* de la fluorescence de la chlorophylle-a sur différents supports tels que les pierres et les sédiments. Aucune préparation de l'échantillon n'est nécessaire.

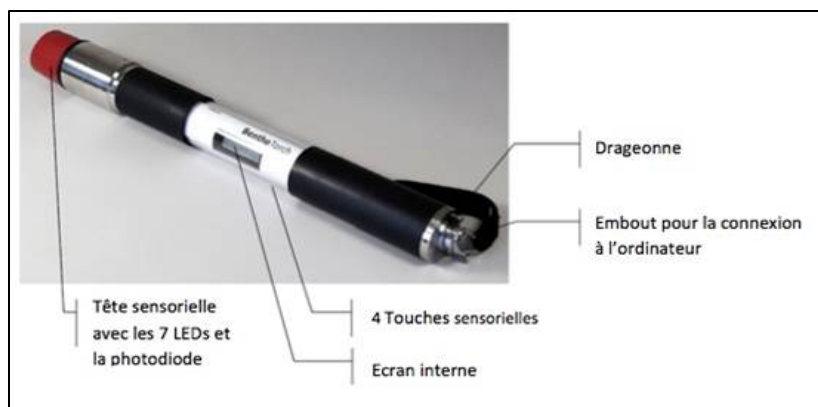


Figure 3: Photographies de la BenthosTorch (source: Manuel d'utilisation)

L'utilisation de la sonde fluorimétrique est plutôt simple et pratique. Le principe consiste à poser l'embout de la sonde (mousse rouge) sur la zone du substrat que nous voulons étudier, la mesure sera faite au centre de l'embout sur une surface de 1 cm². L'embout est assez épais et opaque pour permettre de mettre la photodiode² dans le noir pour mesurer les concentrations algales dans la zone déterminée. C'est pour cela qu'il faudra faire attention quand on utilise la sonde sur des substrats meuble parce qu'il peut être indispensable d'appuyer avec la sonde pour être sûr que la zone de mesure est bien délimitée.

Ensuite, après avoir placé la sonde à 90° par rapport au substrat, nous pouvons lancer la mesure à partir du menu apparaissant sur l'écran de l'appareil. Les touches nécessaires pour naviguer dans le menu sont tactiles et vibratiles, elles émettent une vibration lorsque l'action est confirmée. La mesure peut prendre entre 10 à 15 secondes le temps que les coordonnées GPS, en WSG84 décimaux, soient calculées, que la mesure soit effectuée et les données calculées. L'appareil vibrera pour confirmer que la mesure est finie. Il faut éviter de bouger l'embout avant, pour être sûr de ne pas fausser les résultats. Ces données seront conservées dans le disque interne de la BenthosTorch et il sera possible de les récupérer sur un PC à l'aide d'un câble de connexion USB. Les données pourront ensuite être transférées sur un logiciel bbe++, fourni avec la sonde. Sur ce logiciel, pour chaque mesure de concentrations algales : l'heure, la température, la latitude et la longitude, la concentration totale de microalgues dans deux unités, la température de la sonde et le pourcentage de réflexion du substrat sont indiquées. Les données seront exploitées soit à partir de ce logiciel ou soit d'EXCEL, car il est possible de copier les données et de les coller sur un fichier EXCEL. Ensuite, on peut réaliser des analyses statistiques avec R. Un protocole de terrain et une liste du matériel fourni avec la BenthosTorch ont été réalisés pour les prochains utilisateurs d'Irstea et se trouve en annexe 1.

3) Le principe de fonctionnement

La BenthosTorch est une sonde fluorimétrique. Elle utilise la particularité des pigments à émettre de la fluorescence lorsqu'ils sont excités. En effet, l'excitation des pigments a pour conséquence de passer les électrons d'un état fondamental à un état excité au niveau moléculaire. Ce changement d'état libère de l'énergie sous forme de fluorescence qui peut être détectée et mesurée par la photodiode au niveau de la tête sensorielle de la sonde.

La tête sensorielle possède aussi 7 LEDs qui vont émettre à des longueurs d'onde de 470, 525 et 610 nm (et 700 nm en complémentaire pour limiter l'effet du substrat). Ces longueurs d'ondes vont exciter les pigments des microalgues présentes sur la surface de substrat délimitée par l'embout. Ensuite, la photodiode



Figure 4: Photographie de la tête sensorielle de face (source: Manuel d'utilisation de la BenthosTorch)

² Photodiode : Composant semi-conducteur ayant la capacité de détecter un rayonnement (fluorescence) et de le transformer en signal électrique.

sert à quantifier la fluorescence rouge émise par ces mêmes cellules à la longueur d'onde fixe d'émission de 680 nm.

Une longueur d'onde va exciter un type de pigments. En déterminant si les cellules répondent ou pas, il est possible de différencier les trois classes algales. Le maximum de fluorescence produit par les algues vertes a lieu lors de l'excitation par les deux LEDs émettant à 470 nm, ce sont les chlorophylles a et b qui produisent la fluorescence. Le pic de fluorescence émis par les cyanobactéries se situe à 610 nm (phycobilines). Enfin, pour les diatomées le maximum de fluorescence est émis à 525 nm.

Groupe algal	Pigments présents	Longueur d'onde
Algues vertes	Chlorophylle a et b	470 nm
Diatomées	Chlorophylle a et c, carotènes, fucoxantine	525 nm
Cyanobactéries	Chlorophylle a, phycobilines	610 nm

Tableau 1: Récapitulatif des pigments présents dans les différents groupes algaux et la longueur d'onde d'excitation responsable du maximum de fluorescence.

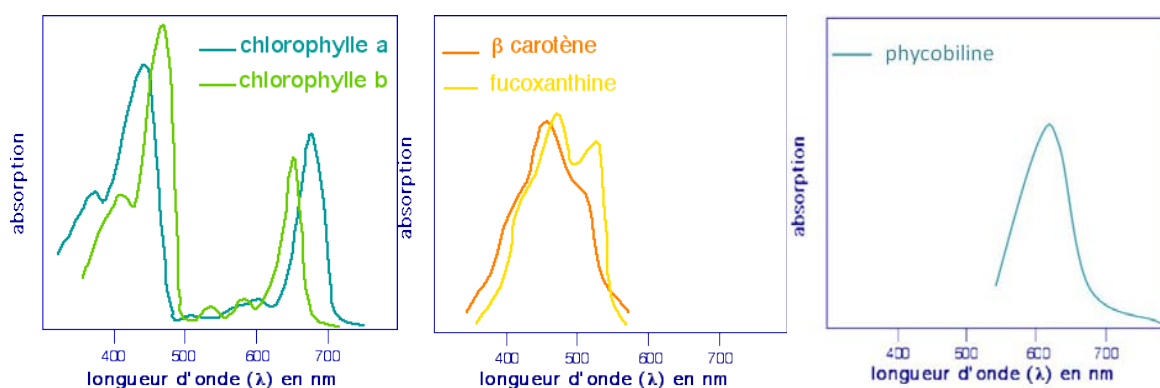


Figure 5 : Les spectres d'absorptions des pigments permettant la distinction entre les différents groupes microphytiques (source : <http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/Photosynthese-cours/04-pigments.htm>)

L'appareil contient un algorithme interne qui traduit l'intensité de fluorescence en concentration de chlorophylle, en $\mu\text{g}_{\text{chloro-a}}/\text{cm}^2$ ou en cellules/ mm^2 , pour chaque classe algales. D'après le manuel, la gamme de mesure de la sonde est de 0 jusqu'à $15 \mu\text{g}_{\text{chloro-a}}/\text{cm}^2$ et sa précision est de $0,1 \mu\text{g}_{\text{chloro-a}}/\text{cm}^2$. Tout au long de ce rapport, les concentrations en chlorophylle-a seront considérées équivalentes aux concentrations en microalgues.

4) La calibration

La société Moldaenke avait déjà tenté de mettre en place un système pour mesurer les concentrations d'algues benthiques en rajoutant à un de leur produit, plutôt destiné à l'analyse du phytoplancton, la Fluoroprobe, un adaptateur benthique (BenthoFluor). Mais de nombreuses recherches (stages) réalisées ont pu démontrer que cette sonde auxiliaire avait des difficultés: les résultats ne correspondaient pas à la réalité. Les hypothèses étaient qu'il y avait un problème pour prendre en compte les différentes couches cellulaires du biofilm ou la réflexion due au substrat. Par conséquent, ces problèmes ont été pris en considération lors de l'élaboration de la BenthoTorch. Dans le manuel, il est indiqué que l'appareil comporte un algorithme pour appréhender les différentes couches cellulaires possibles dans le biofilm. Ainsi il gère l'ombre de la couche supérieure sur la couche inférieure pour ainsi comptabiliser l'ensemble des cellules sur la surface. La BenthoTorch a aussi été pré-calibrée pour la réflexion du substrat par le constructeur. Nous avons fait le choix de conserver cette calibration. En annexe 2, se trouve un scan des données de calibration de l'appareil.

5) Description des tests préalables

i. Vérification de la stabilité

Les premiers tests sont pour vérifier que la sonde donne des résultats stables et reproductibles pour la même zone de mesure. Ainsi sur le littoral d'un lac, j'ai utilisé la BenthosTorch sur des galets de tailles variables. Le but était de vérifier que pour une même zone de mesure, la sonde détectait la même composition et concentration algale. Pour cela, la BenthosTorch était placée sur le substrat et au cours de la mesure il fallait essayer de bouger le moins possible pour enchaîner cinq mesures sur la même zone.

Les boxplots suivants présentent la dispersion des données pour chaque groupe microphytique et la concentration totale en chlorophylle-a pour les 5 réplicats d'un même substrat. Nous pouvons remarquer que les « boîtes à moustache » sont plutôt de petites tailles, ce qui indique qu'il y a une faible dispersion des valeurs mesurées avec la BenthosTorch. Les séries de données sont peu dispersées autour de la moyenne.

De plus, les résultats ont montré une bonne stabilité de la sonde avec des écarts-types des mesures faibles ($\pm 0,01 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), c'est-à-dire que les valeurs étaient peu dispersées autour des moyennes pour chaque échantillon de périphyton.

De plus, en calculant le coefficient de variation, c'est-à-dire le rapport de l'écart-type sur la moyenne, on obtient des coefficients de variation de faible pourcentage ($< 50\%$ pour la grosse majorité, juste un cas à 91%). Il est important de rappeler que plus le coefficient de variation est faible, plus la dispersion autour de la moyenne est faible aussi. La série est considérée homogène. Les données sont en annexe 3.

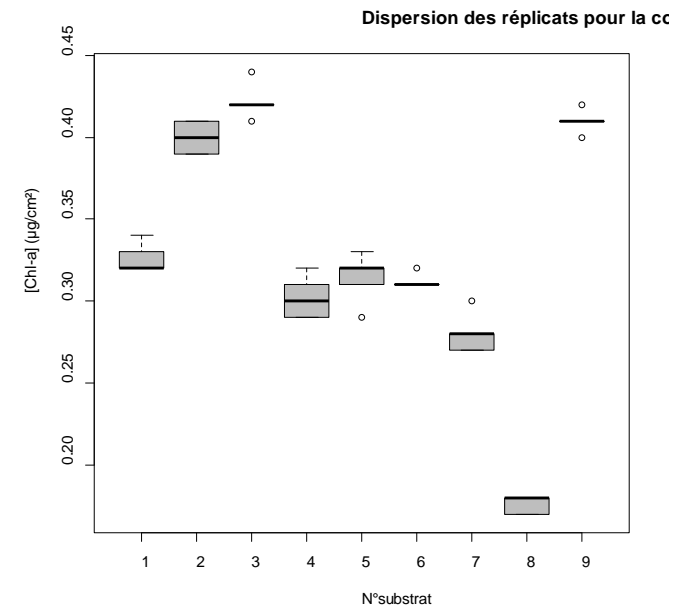
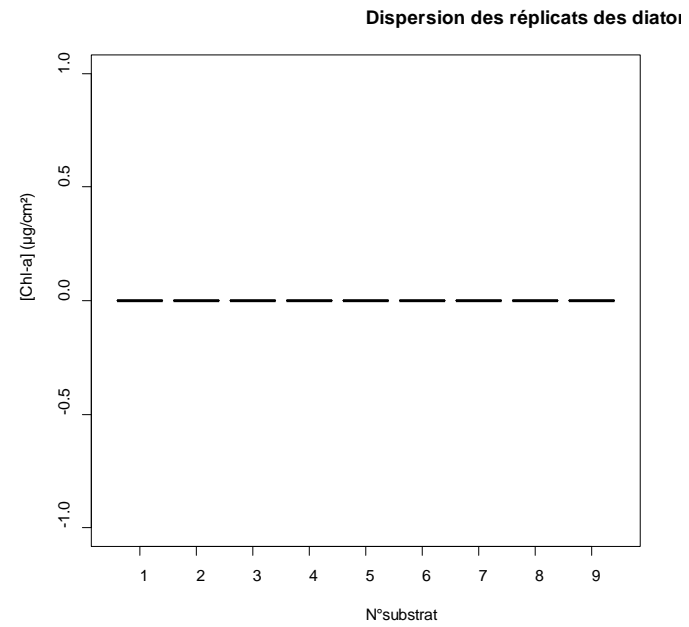
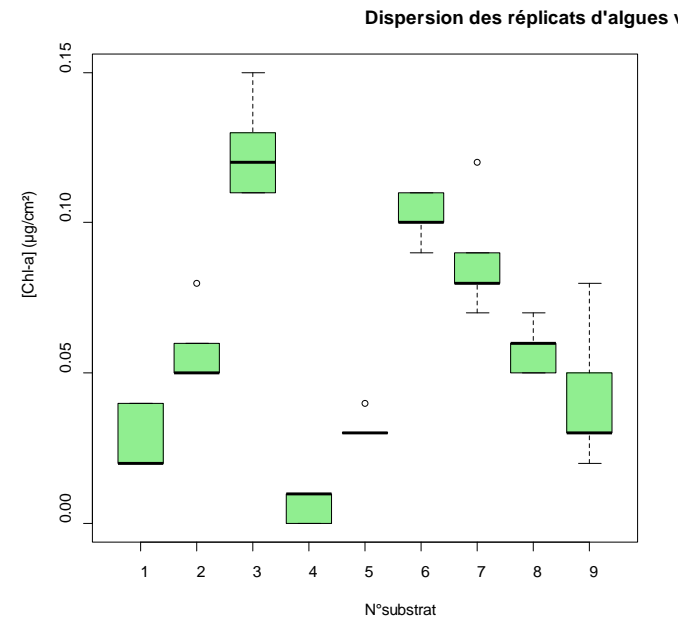
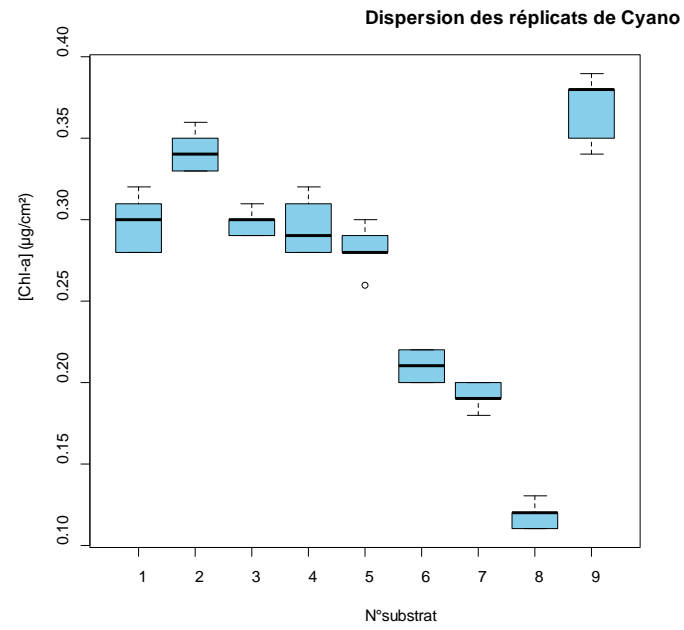


Figure 6 : Les représentations de la dispersion des valeurs présent en 5 réplicats pour chaque groupe microphytique

ii. Vérification qualitative avec des échantillons naturels

Pour ce test, l'une des étapes était de prélever des galets dans un milieu naturel, comme la Cause, une rivière à proximité des locaux d'Irstea. Ils étaient choisis en fonction de la couleur de leur biofilm, car chaque groupe microphytique a une couleur distincte: marron pour les diatomées, bleu-vert pour les cyanobactéries et vert pour les algues vertes. Du coup, à l'œil nu il est souvent possible d'identifier le groupe dominant. Une vérification de la mesure a été ensuite faite avec une observation au microscope des biofilms remis en suspension, pour déterminer quels groupes algaux sont présents ou non.

Cette expérience fut une première manipulation pour se familiariser avec la BenthosTorch, avec le laboratoire et le microscope optique, mais aussi avec la détermination des différents groupes algaux. Le tableau ci-dessous résume les données et les observations. Une seule mesure a été faite à la sonde avant de remettre en suspension le biofilm.

	Descriptions	BenthosTorch [ChlA] ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)			Observations au microscope (Gx100)		
	Couleur	Cyano.	Algues vertes	Diatomées	Cyano.	Algues vertes	Diatomées
Echantillons de terrain remis en suspension	Galet recouvert d'une mousse marron	0,87	0	4,57	Quelques individus d'une espèce (<i>Oscillatoria</i> , gaine non visible)	/	Une grande diversité et densité (<i>Gyrosigma</i> , <i>Melosira</i> , <i>Nitzschia</i> , <i>Fragilaria</i> , <i>Surirella</i> , <i>Gomphonema</i>)
	Biofilm bleu-vert	2,53	0	0,93	Nombreux filaments de (<i>Oscillatoria</i>)	/	Une densité moyenne (<i>Gyrosigma</i> , <i>Melosira</i> , <i>Nitzschia</i> , <i>Surirella</i> , <i>Navicula</i>)
	Galet avec des filaments verts	0,98	1,33	3,2	Quelques individus d'une espèce (<i>Oscillatoria</i>)	une faible diversité d'algues vertes filamenteuses (<i>Vaucheria</i> et <i>Ulothrix</i>)	Une grande diversité et densité (<i>Gyrosigma</i> , <i>Melosira</i> , <i>Nitzschia</i> , <i>Fragilaria</i> , <i>Synedra</i> , <i>Diatoma</i>)

Tableau 2: Tests qualitatifs sur des échantillons *in situ* de la Cause (13 février 2015)

Cette première vérification est concluante, dans chaque cas une dominance de la classe algale est en adéquation avec la couleur des substrats récoltés. La BenthosTorch semble donner de bons résultats qualitatifs. Pour confirmer ces résultats, une seconde vérification sur des cultures pures a été réalisée.

iii. Vérification qualitative et quantitative sur culture pure de laboratoire

Avant mon arrivée, mon tuteur Mr Vincent ROUBEIX, avait isolé et mis en culture pure des algues vertes et des diatomées provenant de la Cause. Le tableau ci-dessous regroupe les cultures expérimentales utilisées pour tester la sonde. Comme il a été difficile de mettre en culture les cyanobactéries trouvées dans la Cause, seulement des échantillons de biofilm bleu-vert à forte dominance de cyanobactéries (avec un peu de diatomées) ont été utilisés.

Groupe microphytique	Espèces	Initial
Algues vertes	<i>Chlorella</i> sp.	AV
Cyanobactéries	<i>Lyngbia</i> sp. (+diatomées)	C
Diatomées	<i>Nitzschia palea</i>	NPAL
	<i>Fragilaria ulna</i>	FULN
	<i>Eolimna minima</i>	EOMI

Tableau 3: Informations sur les individus utilisés pour les tests de la BenthosTorch

Le but était de réaliser un test quantitatif et qualitatif des mesures de la sonde à partir d'échantillons de microalgues homogènes. Pour chaque échantillon, un volume de 2 mL de culture pure était placé dans des disques de calibration fournis avec la sonde. Ce volume permet de recouvrir

complètement le fond du disque et en alignant l'embout de la sonde et les bords du disque, il était possible de faire une mesure avec la BenthosTorch. Le tableau n'est qu'un exemple des résultats obtenus. L'ensemble des expériences réalisées sont en annexe 4, par exemple les résultats mesurés avec les disques de calibration de différents couleurs (noir, gris et blanc). Nous avons choisis aussi de faire pour chaque cas deux mesures à la sonde.

		Moyenne cyano.	Moyenne algues vertes	Moyenne diatomées	Moyenne TOTAL
		[ChlA] µg/cm ²	[ChlA] µg/cm ²	[ChlA] µg/cm ²	[ChlA] µg/cm ²
	Eau enrichie de culture	0 ± 0,000	0 ± 0,000	0 ± 0,000	0 ± 0,000
Algues vertes	<i>Chlorella</i> sp. (AV)	0 ± 0,000	0,80 ± 0,014	0 ± 0,000	0,80 ± 0,014
Cyanobactéries	<i>Lyngbya</i> sp. (et quelques diatomées)	0,07 ± 0,007	0 ± 0,000	0,02 ± 0,000	0,10 ± 0,007
Diatomées	<i>Fragilaria ulna</i> (FULN)	0 ± 0,000	0,06 ± 0,000	0,03 ± 0,000	0,09 ± 0,000
	<i>Nitzschia palea</i> (NPAL)	0 ± 0,000	0,11 ± 0,007	0,08 ± 0,000	0,19 ± 0,007
	<i>Eolimna minima</i> (EOMI)	0 ± 0,000	0,03 ± 0,000	0,02 ± 0,000	0,05 ± 0,000

Tableau 4: Exemples de tests qualitatifs sur des échantillons de cultures pures dans des disques de calibration blanc (avril 2015, moyennes et écarts-types)

Les premiers tests sur les cultures d'algues vertes et de cyanobactéries, réalisés en laboratoire, ont révélé une véritable adéquation entre les mesures et la composition des échantillons. La sonde donne les groupes microphytiques correspondant à chaque culture.

Par contre, pour les concentrations de diatomées nous avons rencontré un problème : au lieu de détecter seulement une concentration de diatomées, la sonde détectait aussi une concentration d'algues vertes (données en rouge). Par conséquent, les hypothèses que je peux proposer pour expliquer ce « faux » signal d'algues vertes sont les suivantes :

- ❖ une mauvaise calibration, préalablement accomplie par la société. En annexe 2, les concentrations minimal et maximal pour la détection de diatomées sont étonnamment identiques ;
- ❖ une mauvaise différenciation des groupes algaux par la sonde lorsque la concentration en chlorophylle-a totale de l'échantillon est trop faible. Des études sur d'autres sondes ont montré que plus la densité cellulaire totale est faible, plus la distinction des groupes sera plus difficile et la confusion plus courante. Ainsi la sonde ne distinguerait plus les deux groupes algaux, diatomées et algues vertes.

En comparant les résultats avec ceux du test précédent, ce problème n'a été observé qu'avec les cultures pures. En effet, en prélevant des galets recouverts d'un biofilm marron, prouvant une dominance de diatomées, nous avons pu mesurer avec la BenthosTorch un biofilm composé seulement de cyanobactéries et de diatomées, sans un signal d'algues verts erroné. L'observation au microscope confirme l'absence d'algues vertes. Donc, avec mon tuteur, nous avons supposé que ce problème de détection venait plutôt d'une confusion de la BenthosTorch car les cultures seraient faiblement concentrées. Dans le milieu naturel, la détection pour des biofilms plus dense (supérieur à 1 µg/cm²) ne pose pas de problèmes, alors que pour les densités de culture pure (inférieur à 1 µg/cm²), on obtient une mauvaise distinction entre les groupes algaux.

Pour les tests quantitatifs, il a été convenu de faire en plus des dilutions des cultures pures d'algues vertes et de diatomées. En partant d'une culture de microalgues, il était ensuite possible de vérifier que les biomasses mesurées par la sonde correspondaient aux dilutions effectuées. Plusieurs dilutions ont été réalisées et les données, sous forme d'histogrammes sont en annexe 5. Il faut noter que le problème de détection des diatomées s'observe toujours avec un signal d'algues vertes injustifié. Toutefois cette expérimentation démontre que les mesures à la BenthosTorch sont proches de la théorie, même si la sonde semble sous-estimer les résultats par rapport à la théorie au cours des dilutions, et elle permet aussi d'identifier une des limites de la sonde. En effet, lorsqu'en théorie la

concentration de chlorophylle-a des microalgues est d'environ 0,025 µg/cm², la BenthosTorch indique une valeur nulle pour tous les groupes algaux. La sonde semble avoir un seuil de détection de ± 0,02 µg/cm².

iv. Vérification de la mesure de chlorophylle-a par spectrophotométrie

Une vérification plus précise des données peut être obtenue grâce à des mesures de la concentration en chlorophylle-a avec un dosage par spectrophotométrie. La spectrophotométrie repose sur la mesure de l'absorbance de l'échantillon à différentes longueurs d'ondes, par exemple à 665 nm, pour évaluer la concentration en chlorophylle-a. L'absorption lumineuse ou densité optique est la propriété d'une substance matérielle à diminuer l'intensité d'un faisceau lumineux qui la traverse. J'ai décidé de faire cette mesure sur plusieurs biofilms prélevés dans différents milieux (lacs et rivières).

Le dosage se fait en plusieurs étapes. Tout d'abord sur le terrain, après avoir gratté le biofilm présent sur des substrats artificiels ou naturels, l'échantillon est remis en suspension dans un volume d'eau de source connu. Puis il faut filtrer qu'un volume connu de suspension, généralement 20 mL, sur un filtre GF/F Whatman (47 mm de diamètre). Le filtre est ensuite plié en deux afin de protéger la biomasse qui s'y est déposée et il est ensuite placé dans un tube qui sera conservé dans une glacière jusqu'au retour au laboratoire. Dès l'arrivée au laboratoire, il est impératif de mettre les tubes dans le congélateur à -80 °C. Puis au laboratoire, l'extraction de la chlorophylle présente dans les filtres se fait par ajout dans les tubes de 10 mL d'acétone à 90 %. L'acétone lyse les membranes plasmiques des cellules eucaryotes ou des bactéries pour libérer les chloroplastes. Il faut laisser l'acétone agir dans les flacons placés au réfrigérateur pendant 12 à 24 h. Le tube est ensuite centrifugé de façon à ce que les restes de filtre et de sédiments se déposent au fond du tube, formant le culot. Il faut passer seulement le surnageant au spectrophotomètre, dans une cuve d'1 cm de largeur et en utilisant les longueurs d'ondes d'excitations suivantes : 665 et 750 nm.

Les formules de Lorenzen (Lorenzen, 1967) permettent de déterminer les différentes concentrations en chlorophylle-a. Pour utiliser cette formule, il a fallu réaliser aussi une acidification de l'échantillon. L'acidification se fait à partir d'une solution d'acide chlorhydrique (HCl) de 3 M. Mais au laboratoire nous avons seulement une bouteille d'un litre contenant 23 % de la molécule. En annexe 6, se trouve les calculs permettant d'expliquer comment j'ai réalisé cette solution d'HCl. La mesure d'absorbance de l'échantillon se fera avant et après acidification et avec les données on peut effectuer le calcul suivant.

$$Chl.a (\mu g/L) = 29,6 ((DO_{665\ av} - DO_{750\ av}) - (DO_{665\ ap} - DO_{750\ ap})) \times \frac{V_{ex}}{V_{ef} \times l}$$

DO 665 av = Absorption à 665nm avant l'acidification

DO 750 av = Absorption à 750nm avant l'acidification

DO 665 ap = Absorption à 665nm après l'acidification

DO 750 ap = Absorption à 750nm après l'acidification

V_{ex} = Volume d'extraction d'acétone 90%, 10 mL

V_{ef} = Volume d'échantillon filtrée, en L

l = Longueur de la cuve, 1 cm

L'acidification de la solution permettra de soustraire à la concentration mesurée préalablement de chlorophylle-a, la proportion de phéophytine qui serait responsable d'une surestimation de concentration. La phéophytine est un produit de dégradation de la chlorophylle, connue pour absorber la même longueur d'onde que celle-ci. La formule suivante permet de déterminer la concentration en phéophytine :

$$Phéophytine (\mu g/L) = 20,8 (DO_{665\ ap} - DO_{750\ ap}) \times \frac{V_{ex}}{V_{ef} \times l}$$

Concentration qu'on devra soustraire à celle de chlorophylle-a pour avoir la concentration exacte pour les échantillons.

$$Chl. a \text{ exacte } (\mu\text{g/L}) = Chl. a \text{ spectro} - \text{Phéophytine}$$

Ces concentrations pourront être comparées aux concentrations mesurées par la BenthosTorch après une modification des unités de mesure $\mu\text{g/L}$ en $\mu\text{g/cm}^2$.

$$Chl. a (\mu\text{g/cm}^2) = \frac{\text{Volume de mise en suspension (L)}}{\text{Surface grattée (cm}^2)} \times Chl. a (\mu\text{g/L})$$

Le tableau suivant réunit les données à comparer. J'ai utilisé 6 échantillons à analyser : 2 de la Cause et 4 de la campagne DREAM et j'ai mis en annexe toutes les données pour obtenir ces résultats. Les valeurs à la BenthosTorch sont obtenues après plusieurs points de mesures sur la surface délimitée pour la remise en suspension.

Lieux	Code site des échantillons	Valeurs BenthosTorch [ChlA] ($\mu\text{g/cm}^2$)	Valeurs spectrophotomètre [ChlA] ($\mu\text{g/cm}^2$)
Substrat naturel (rivière)	DoBis	2,64 \pm 0,057	1,78
	DoBis'	1,60 \pm 0,298	0,36
	Do 1	2,70 \pm 0,509	2,13
	Do 1'	3,09 \pm 1,250	1,00
	A1	1,42 \pm 0,123	0,25
	A2	1,33 \pm 0,183	0,26
	A3	1,40 \pm 1,175	0,25
	D1	1,62 \pm 0,599	0,26
	D2	1,50 \pm 0,344	0,31
	D3	1,98 \pm 0,444	0,23
Substrat artificiel (lac, rivière, mésocosme)	LM	0,22 \pm 0,041	0,05
	LT	0,35 \pm 0,091	0,24
	P1	1,09 \pm 0,161	0,10
	P2	0,28 \pm 0,024	0,01
	CHAUD	2,72 \pm 0,225	0,44
	FROID	10,95 \pm 0,982	1,06

Tableau 5 : Comparaison des données de la BenthosTorch et des dosages par spectrophotométrie en chlorophylle-a (juin à juillet 2015)

Nous remarquons que les valeurs de concentration de chlorophylle-a entre les deux méthodes de mesure sont du même ordre de grandeur. Ensuite, certaines données sont très proches entre elles, comme par exemple, celles pour l'échantillon LT et D1. Pour ces échantillons, la biomasse de chlorophylle-a détectée par la BenthosTorch est en accord avec la biomasse pigmentaire calculée avec la formule de Lorenzen. Cependant, il y a aussi des données de chlorophylle-a très différentes entre les méthodes. En effet, les valeurs obtenues à l'aide de la sonde semblent être surestimées par rapport aux biomasses mesurées par fluorimétrie *in vivo*.

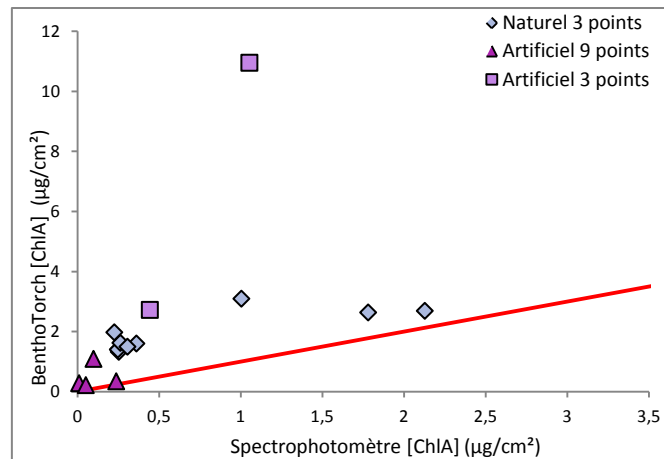


Figure 7 : Régression linéaire (1:1) des valeurs de BenthosTorch en fonction des valeurs de spectrophotométrie

Il semble il y avoir une surestimation des données mesurées avec la BenthosTorch par rapport à celle obtenue avec la méthode de dosage par spectrophotométrie, une méthode conventionnelle. Cette surestimation pourrait être dû à une différence de taille entre les surfaces utilisées. Malgré cela la sonde semble donner une estimation convenable de la chlorophylle-a totale sur une surface.

v. Conclusion des tests

En conclusion, la sonde fluorimétrique semble donner des résultats en adéquation avec la réalité et son seuil de détection minimal semble être de $0,02 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. La BenthosTorch pourrait ainsi être utile dans les années à venir pour l'établissement d'un indice fonctionnel sur la croissance du périphyton dans des plans d'eau. Elle est facile d'utilisation et donne des résultats sur la composition du périphyton en une vingtaine de secondes, alors que normalement ces données nécessiteraient un temps de manipulations, d'observations et d'analyses conséquents.

B. Protocole expérimental de suivi de la production primaire

1) Les Objectifs

Le but de ce stage était de pouvoir étudier la production primaire benthique à l'aide d'une sonde fluorimétrique. Pour cela, le protocole consistait à fabriquer des substrats artificiels, pour les placer dans des plans d'eau. Ces substrats artificiels sont faits avec des plaques lisses de polycarbonate et ont l'avantage de ne pas avoir de relief comme un galet ou un rocher. Le problème de travailler sur des substrats naturels est leur forme quelconque pouvant fausser les résultats lors d'une mesure avec la BenthosTorch car l'embout pourrait ne pas être appliqué correctement.

Plusieurs types de suivis ont été exécutés tout au long de ces mois de stage. Ces suivis se différencient principalement par l'espace de temps laissé entre chaque mesure et les conditions environnementales:

- En laboratoire, j'ai effectué un suivi de croissance de culture pure dans une boîte de Pétri avec une fréquence de mesure quotidienne.
- Dans le bassin expérimental, à proximité d'Irstea, le suivi de la croissance du biofilm s'est fait sur des petites plaques individuelles, tous les deux ou trois jours plus précisément.
- Dans le lac du Bimont, le suivi du périphyton a été réalisé sur des grandes plaques avec 9 points de mesures à une fréquence hebdomadaire ou mensuelle. Pour ce suivi distant du centre Irstea plus de matériel était requis, comme une voiture de service et un bateau. C'est pour cela qu'il a fallu profiter des expériences des recherches sur la dégradation ou d'autres projets, pour faire des mesures toutes les semaines ou mois, pendant 3 mois.

2) Descriptions des milieux expérimentaux

• Le lac du Bimont

Situé à une dizaine de kilomètres au Nord-Est d'Aix-en-Provence, d'une superficie de 100 hectares et d'une profondeur maximale de 60 m, le lac du Bimont est alimenté essentiellement par une dérivation du canal du Verdon et par son seul affluent, la Cause, ruisseau généralement à sec la plupart de l'année. Ce lac est niché au pied de la Sainte Victoire et il est connu pour la couleur verte prononcée de son eau, due au fluor et aux microalgues. En 1952, le barrage du Bimont a été mis en service, sur la commune de Saint-Marc-Jaumegarde dans le massif de la Sainte Victoire. Ce barrage de type voûte a pour rôle de retenir jusqu'à 40 millions de m³ d'eau provenant de l'Infernet et du Verdon pour alimenter les villes alentours : Aix-en-Provence, Marseille et les grands centres industriels. Il a été construit par Joseph Rigaud de 1946 à 1951 et est actuellement il est toujours en activité. Il est entretenu par la Société du Canal de Provence. La navigation pour le loisir est interdite car ce plan d'eau peut-être potentiellement une réserve d'eau potable pour la consommation humaine. Le Canal de Provence et l'Irstea ont reçu une autorisation pour pouvoir y naviguer. Le lac du Bimont est aussi interdit à la baignade parce qu'il reste un ouvrage hydraulique en exploitation. Le barrage permet d'alimenter en eau les villes alentours entraînant des courants souvent changeants, non visible de la surface.

Sur le lac du Bimont, deux dispositifs expérimentaux ont été placés à deux stations: une proche du littoral et une au large. Le dispositif à la rive a dû être placé dans une zone difficile d'accès à pied pour empêcher le vandalisme.

• Le bassin expérimental d'Irstea

A proximité des bureaux Irstea, il existe un bassin expérimental qui a été construit dans le but de faire des essais de prototype. L'objectif est de pouvoir détecter des fuites sur une surface à partir de mesure de la température avec des fibres optiques, pour ensuite utiliser ces sondes sur des barrages.

Ce bassin fait une profondeur max de 1,70 m et il subit des traitements au chlore pour éviter la prolifération algale. Mais comme nous voulions l'utiliser pour ce projet, plus aucun traitement n'avait été fait depuis plus de 6 mois. En annexe, se trouve un plan détaillé du bassin, fourni par les responsables. Le dispositif expérimental avec les plaques de polycarbonate a été placé assez proche du bord pour pouvoir le récupérer aisément à l'aide d'une perche.

3) Description des étapes de construction des substrats artificiels

• Pour le lac du Bimont

Notre plan était de créer un substrat artificiel, placé à une faible profondeur, pour que les algues en suspension se posent dessus et que le biofilm se développe.

Tout d'abord, il a été décidé de construire deux dispositifs expérimentaux avec deux plaques de mesures : un témoin et une de suivi pour des mesures fréquentes. Ces deux dispositifs sont construits de façon similaire, c'est-à-dire que les deux plaques sont maintenues en flottaison et sont séparées par un tube en PVC pour éviter que les cordes s'emmêlent ou que les plaques se cognent. Ensuite, les dispositifs sont placés en deux lieux distincts, à proximité du littoral et au large. Nous pourrions comparer les données et définir l'effet de la proximité de la rive sur la vitesse et la composition des biofilms benthiques. L'annexe 8 représente la carte de Bimont avec les coordonnées GPS des deux stations. Les systèmes ont été placés à la fin du mois de février (26 février 2015). Toutefois, le dispositif au large a la particularité d'avoir en complément une grosse bouée pour aider l'ensemble à flotter. Elle est là pour équilibrer le système à cause du poids supplémentaire rajouté par la longue corde mouillée reliée au corps mort, car le niveau d'eau est de 25-30 m.

Les plaques témoins et de suivis sont en polycarbonate de couleur blanche. Cette matière est plus dense que l'eau et pourra ainsi couler. Ce sont des grandes plaques découpées en carré de dimension de 25x25cm qu'on laisse dans l'eau du lac du Bimont pendant un long laps de temps. Sur ces carrés, 9 mesures avec la BenthosTorch peuvent être réalisées. Les zones de mesures sont toujours les mêmes et pour se repérer sur la plaque j'ai mis en place des boulons papillons à deux endroits pour savoir où placer l'embout de protection de la sonde. Les boulons papillons ont été choisis à la place de vis ou de clous enfoncés dans la plaque car ils peuvent être retirés, permettant ainsi de gratter l'ensemble du biofilm en fin d'expérience. En annexe 9 se trouve un schéma pour représenter les plaques de mesure.

Les deux plaques, par dispositif, flottent à l'aide d'une structure de 4 fils d'acier (diamètre de 8 mm) de même longueur et un flotteur. La profondeur déterminée est de 35 cm pour toutes les plaques. Les plaques sont attachées aux petites bouées de deux façons différentes pour pouvoir les distinguer : les témoins ont seulement à chaque coin une boucle faite avec les fils d'acier, alors que pour la plaque de suivi des mousquetons faisaient le lien entre les fils et la plaque. Cette combinaison permet de récupérer plus facilement tous les mois la plaque de suivi pour gratter le biofilm.

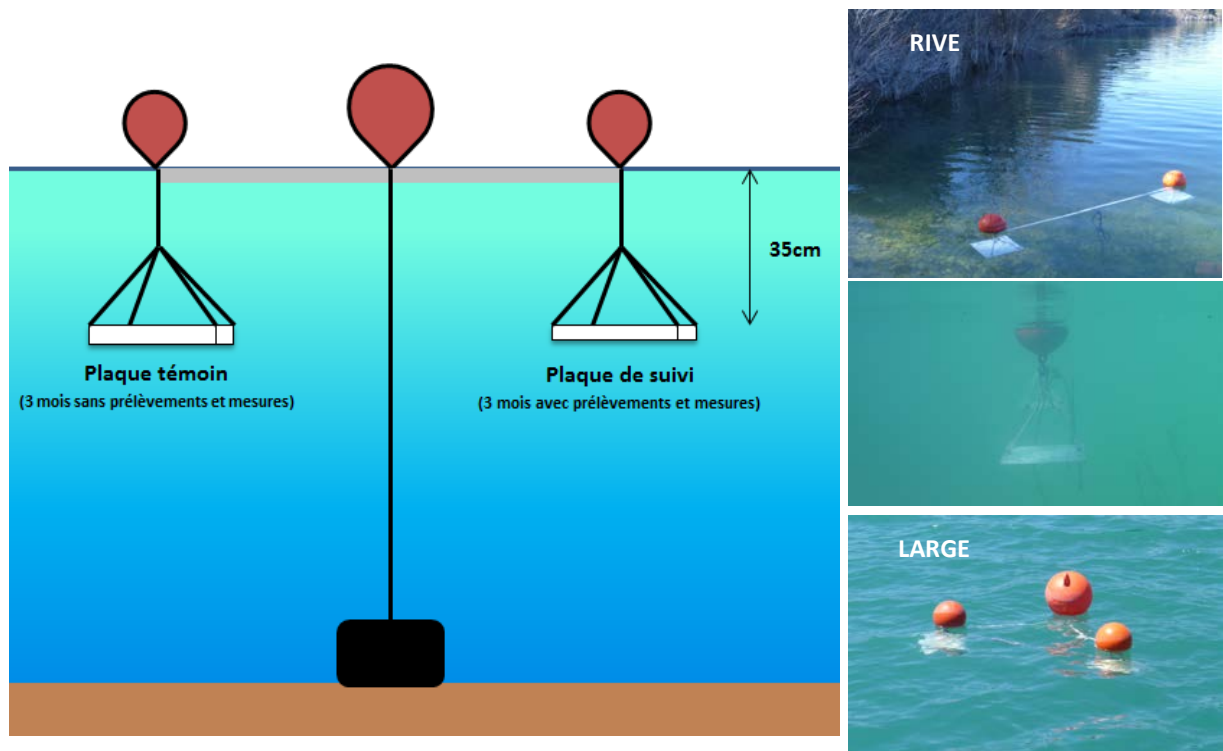


Figure 8 : Schéma et photographies de l'installation des substrats artificiels ©Angleviel & Peroux

- **Pour le bassin expérimental d'Irstea**

Les suivis dans le bassin expérimental se sont faits plutôt à l'aide de plaques individuelles. Ce sont des carrés de seulement 8 x 8 cm fixés sur un plateau avec les vis papillon et maintenus avec le même type de système de flottaison. Ce système a permis de récupérer plus facilement une partie du biofilm (petite plaque) et d'étudier sa composition au cours du temps.

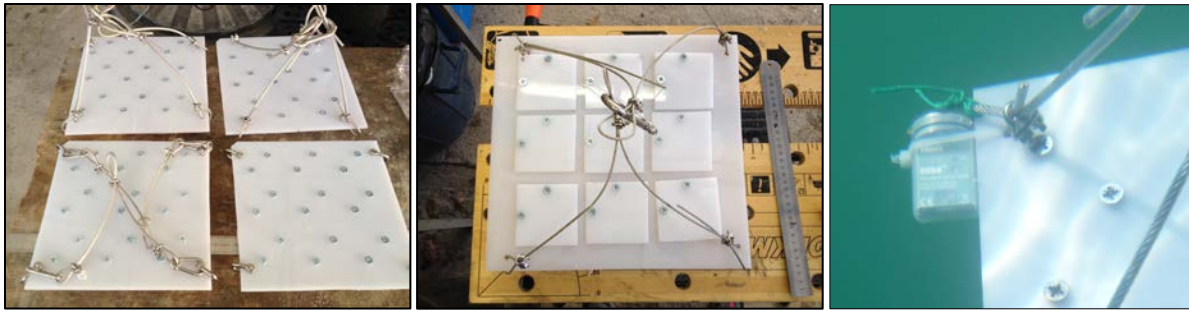


Figure 9: Photographies des substrats artificiels pour le lac du Bimont et le bassin expérimental & de l'enregistreur Hobo en place ©Angleviel & Peroux

4) Suivis des caractéristiques physico-chimiques des milieux

En effectuant un suivi des caractéristiques physico-chimique de l'eau, il est possible de déterminer ce qui influence la composition ou la croissance du périphyton. A l'aide d'enregistreur Hobo, nous avons pu avoir un suivi de la lumière et de la température en continu pendant tout le temps où les plaques étaient en repos. Une mesure de température en degré Celsius et de la luminosité en Lux ont été prise toutes les 30 min. Ainsi nous pouvons comparer la croissance algale avec les variations de ces deux paramètres. Une comparaison essentielle vu qu'il y a eu des grands changements de saison à partir du mois de mars avec l'arrivée du printemps.

5) Comparaison avec l'observation microscopique

Au début du stage, j'ai dû faire des recherches bibliographiques sur la détermination des différentes grandes classes microalgales : algues vertes, cyanobactéries et diatomée, et sur un moyen de déterminer la densité dans un échantillon.

Généralement, la détermination de ces classes est plus ou moins évidente grâce à leur coloration distincte à l'état frais, mais comme dans certains cas, il a fallu travailler sur des échantillons préalablement fixés sur le terrain, il a fallu apprendre à les distinguer avec d'autres caractéristiques.



Figure 10: Photographies de diatomées fixées, *Melosira*, en reproduction (auxospore) ©Angleviel

Pour fixer, les échantillons il suffit de rajouter deux ou trois gouttes d'une solution de fixation, jusqu'à l'obtention d'une couleur caramel. Cette solution de fixation est composée à 90% de lugol et 10% d'acide acétique. Les diatomées sont facilement identifiables grâce à la forme particulière de leur frustule (couche protectrice en silice). De plus, les diatomées peuvent être identifiées jusqu'au genre à l'aide de deux caractéristiques morphologiques: la forme du frustule et les stries. Si l'individu est vivant on peut aussi utiliser la position des chloroplastes dans l'organisme.

Après avoir identifié les individus, l'abondance pouvait être estimée. Pour cela, j'ai réalisé des numérations cellulaires, c'est-à-dire des décomptes du nombre de cellules contenues dans un volume précis de milieu liquide. Le comptage s'est réalisé directement au microscope sur une lame de comptage spécifique. Au laboratoire, il y avait deux types de lame de numération : la cellule de Thomas et la cellule de Malassez, la dernière est la plus courante et c'est celle pour laquelle j'ai opté pour les vérifications des concentrations algales. C'est une lame épaisse en verre, comportant des rigoles et un quadrillage. La cellule de Malassez possède un quadrillage comportant 100 rectangles. Parmi les 100 rectangles totaux, on trouve 25 rectangles qui sont divisés en 20 petits carrés afin de faciliter le comptage. Le volume correspondant au quadrillage total est égal à 1 mm^3 . Chaque rectangle correspond à un volume 100 fois plus faible, soit $0,01 \text{ mm}^3$. Le remplissage de la cellule de numération se fait par capillarité, l'extrémité de la pipette est légèrement inclinée près de la lamelle.

Le remplissage doit être fait en une seule fois, sans bulles d'air, et sans faire déborder le liquide dans les rigoles. Puis pendant quelques minutes, il faut laisser sédimenter les cellules sur le quadrillage.

A l'objectif x10 du microscope, il faut vérifier l'homogénéité de la répartition des cellules à compter car si la répartition est mauvaise, il est recommandé de recommencer. L'objectif x40, permet le comptage. On ne compte les cellules que dans 10 à 25 rectangles pris au hasard dans la cellule. Par contre, pour les cellules chevauchant les lignes du quadrillage, elles ne sont comptabiliser que si elles sont sur les deux arrêtes du rectangle sélectionnées sur les quatre. Dans notre cas, j'ai choisi : la ligne horizontale supérieure et la ligne verticale droite.

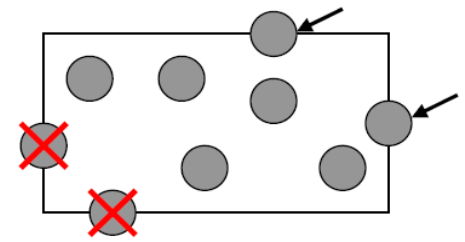


Figure 11: Schéma pour le dénombrement des cellules (source: <http://biotech.spip.ac-rouen.fr/IMG/pdf/TPnumeracioncellulaire.pdf>)

Le calcul est simple, il consiste à faire la moyenne des cellules par rectangles, qu'on multiplie ensuite par 100 pour connaître le nombre d'entités cellulaire par mm³. Si la suspension cellulaire de base est trop concentrée, il est nécessaire de réaliser une dilution préalable, ainsi le facteur de dilution devra être pris en compte dans le calcul final, en multipliant le nombre de cellule moyen par le facteur de dilution.

$$\text{Densité cellulaire/mm}^3 = \frac{\text{Nombre de cellules dans 25 rectangles}}{25} \times 100$$

Ensuite on divise cette densité de façon à l'obtenir en nombre de cellules par mL.

La BenthosTorch a la possibilité de donner un nombre de cellules par mm² (qu'on peut convertir en cellules/cm²). Donc, pour pouvoir comparer les données dans la même unité il faut aussi convertir les résultats obtenus avec la lame de Malassez :

$$\text{Densité cellulaire /cm}^2 = \text{Densité cellulaire/mL} \times \frac{\text{Volume de suspension (mL)}}{\text{Surface grattée (cm}^2\text{)}}$$

Avec le volume de suspension et la surface grattée qui varie en fonction des plaques ou substrats utilisés.

III. Résultats des suivis

A. Suivi en laboratoire (Δt en jours)

Au cours de ce stage j'ai eu la possibilité de faire un suivi régulier sur un court laps de temps de la croissance de microalgues en culture pure dans une boîte de pétri. L'étude consistait à faire croître une population de microalgues dans un milieu liquide et de faire un suivi de cette croissance à l'aide de la BenthosTorch et d'une vérification de la pureté de la culture à l'aide du microscope inversé. J'ai accompli le suivi que sur deux groupes algaux : diatomées et algues vertes, car nous n'avons pas de colonie de culture pure de cyanobactéries. Le protocole de cette manipulation consistait à introduire un faible volume de culture pure dans une boîte de Pétri, préalablement remplie d'eau filtrée enrichie en nutriments. Puis de faire deux mesures à la BenthosTorch à peu près sur la même surface délimitée par une marque, tous les jours pendant une semaine. Lors de tous nos suivis, la BenthosTorch ne détectait pas que l'algue en culture pure présente, c'est un problème que nous avons déjà discuté dans ce rapport pour la détection des diatomées, dans le chapitre matériel et méthode, les tests de la BenthosTorch.

Les graphiques ci-dessous représentent le suivi de la croissance en laboratoire de la diatomée *Nitzschia palea* (NPAL) et de l'algue verte *Chlorella* sp. d'après les données de la BenthosTorch. Deux suivis ont été effectués à des périodes de temps différentes (mai et juin).

Nous pouvons voir que la concentration en diatomée augmente bien au cours du temps. Mais sa proportion est faible par rapport à celle des algues vertes, il y a donc un signal erroné venant probablement de la densité trop faible des échantillons en culture, vu qu'aucune contamination par des algues vertes n'était visible dans la boîte de Pétri. La concentration de chlorophylle-a diminuant après quelques jours. Ce phénomène peut s'expliquer de deux façons : soit par une rapide sénescence de la population de diatomées conduisant à la dégradation de la chlorophylle-a, soit par une grande hétérogénéité de la densité d'algues sur la boîte de Pétri et l'application de la sonde à des endroits légèrement décalés sur la boîte. Nous constatons aussi qu'il y a une faible concentration de cyanobactéries détectée en début d'expérience, quand la concentration en diatomées est faible. Cela suggère une confusion de la sonde entre les groupes algaux lorsque la biomasse totale est faible (voir tests plus haut dans matériel et méthode). Il est possible d'observer que d'un mois à l'autre, le suivi d'une espèce diffère dans la dynamique de croissance ou encore la concentration (mai, le max est à 0,15 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ et en juin, à 0,05 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$).

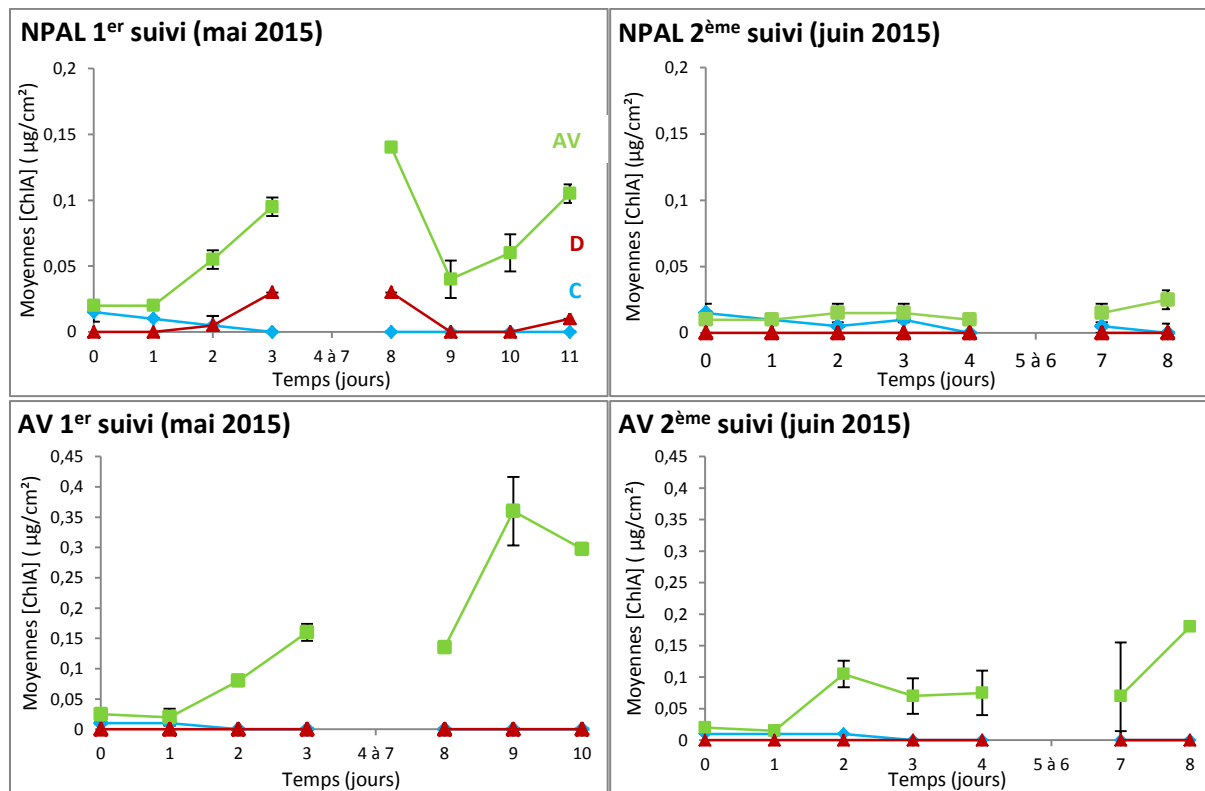


Figure 12: Suivis de la croissance au cours du temps en laboratoire de la diatomée NPAL et de l'algue verte (AV) dans une boîte de Pétri.

Pour la croissance en laboratoire d'une culture d'algues vertes, *Chlorella* sp. , nous observons encore des variations entre les dynamiques de croissance et les concentrations pour les deux réplicats. La densité des microalgues dans la boîte de Pétri semble augmenter mais il y a des fluctuations à certains jours de mesures. Lors de ces suivis, un signal altéré de cyanobactéries est encore détecté mais disparaît dès que les concentrations en algues vertes augmentent. Le suivi de la croissance de la culture d'algues vertes a pu se faire en même temps à l'œil nu, vu que le liquide devient de plus en plus vert au cours du temps.

Ces graphiques me permettent de conclure que la BenthosTorch donne des résultats logiques avec un suivi de croissance de microalgues. Par contre, le fait d'étudier la croissance microalgale dans des boîtes de Pétri, en milieu liquide, peut entraîner des erreurs dans les mesures car il n'y a pas de formation de véritable biofilm. Les cellules adhèrent plus ou moins au substrat et forment un tissu lâche et hétérogène. Le travail sur des plaques immergées dans des grandes masses d'eau permettra d'étudier de façon plus réaliste la croissance de biofilm.

B. Suivi en bassin expérimental (Δt en jours)

Le déroulement du suivi dans le bassin expérimental d'Irstea, consistait à récupérer tous les 2 ou 3 jours une petite plaque d'étude pour ensuite faire une mesure à la BenthosTorch, la gratter, la fixer et enfin faire une analyse microscopique de la densité et diversité. En utilisant 9 plaques, l'expérience dure environ de 32 à 33 jours, j'ai donc décidé de faire un réplicat de cette expérience, pour ainsi caractériser au mieux la croissance et l'effet d'un changement climatique. Ces expériences se sont déroulées lors de deux périodes saisonnières différentes de mars à mi-avril et de mi-avril à mi-mai où les températures vont continuer à augmenter.

1) Caractérisation de la flore algales

Au cours des études microscopiques, il a été de plus en plus facile de déterminer les genres de microalgues présents dans les échantillons grattés et remis en suspension, vu que j'effectuais l'expérience dans un bassin qui subissait très peu de perturbations extérieures (à part le vent) et aucun traitement chimique. Ainsi, je me suis constitué au fil du temps une liste des microalgues présentes dans le bassin (*cf.* annexe 10).



Figure 13: Photographies lors des manipulations pour les suivis en bassin expérimental ©Angleviel

2) Premier suivi

Lors du premier suivi, il est possible de visualiser la formation de biofilm sur les plaques de polycarbonates, que ce soit à l'œil nu ou avec les mesures à la BenthosTorch. Le graphique suivant est une représentation de la croissance algale sur des plaques prises sur le même plateau, au cours du temps. Trois mesures à la BenthosTorch sont faites pour chaque jour de mesures

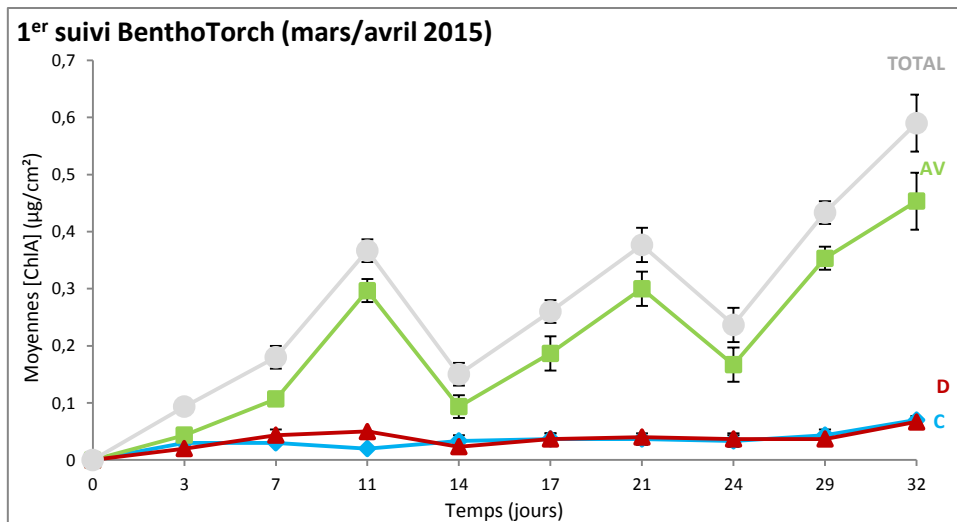


Figure 14: Suivi de la croissance du biofilm dans le bassin expérimental sur 32 jours (mars/avril 2015)

Sur l'ensemble des plaques, il y avait une dominance d'algues vertes. Nous constatons aussi que la position des plaques influence la densité cellulaire : pour 3 petites plaques l'une à côté de l'autre il y a une augmentation de la concentration. Mais ensuite quand je suis passé à la plaque n°4 ou n°7 (les premières petites plaques des lignes suivantes, le 14^{ème} et le 24^{ème} jour), la concentration a chuté, avant d'augmenter au cours du temps sur les petites plaques de la même ligne.³

Après chaque mesure, un dénombrement avec la lame de Malassez permettait de vérifier les données pour les caractéristiques quantitatives et qualitatives des échantillons. Le graphique ci-dessous permet de comparer les données mesurées avec la BenthosTorch (après une conversion en cellules/cm²) et les données déterminées par comptage sur la lame. Nous pouvons observer qu'il y a une différence d'environ un facteur de 10 entre les données. Il y a 10 fois plus de cellules déterminées avec la lame de Malassez que calculées avec la sonde. Les jeux de données sont différents, malgré une tendance similaire dans la croissance des concentrations en chlorophylle-a (surtout les variations du 14^{ème} et 29^{ème} jour). L'écart des valeurs pourraient venir des conversions des données pour qu'elles soient toutes à la même unité. Cette divergence entre les résultats s'expliquerait donc par le calcul interne qu'effectue la sonde. Aucune indication dans le manuel n'est donnée pour expliquer la conversion des valeurs de µg/cm² en cells/mm². Normalement cette conversion nécessite de faire la différence entre les différentes espèces de chaque groupes algaux car elles n'ont pas toutes la même taille. J'en déduis que la BenthosTorch doit seulement se fier à la taille des microalgues utilisées pour la calibration alors qu'avec la lame de Malassez le dénombrement de la densité cellulaire prend en compte la taille des individus vu que je les observais et les identifier lors du comptage. Il y a une sous-estimation des densités cellulaires.

³ Rappel : Schéma des plaques en annexe 9 avec l'ordre de prélèvements des petites plaques sur le plateau.

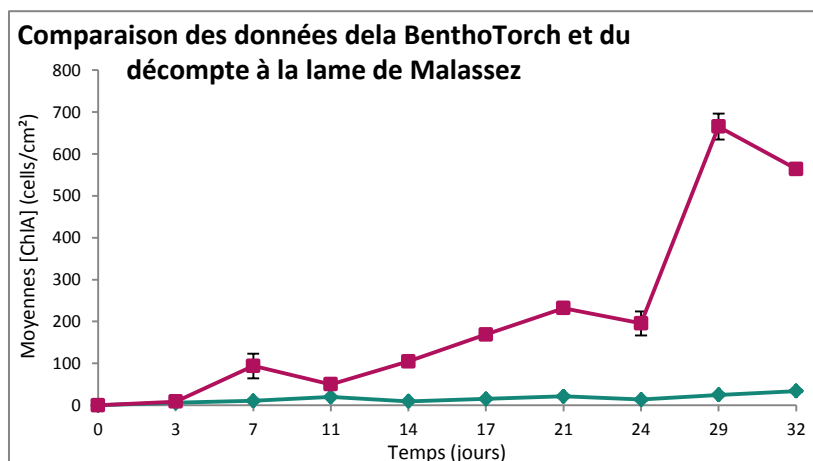


Figure 15: Comparaison des données de la BenthosTorch et celles du décompte à la lame de Malassez pour la concentration totale du biofilm & une photographie de la lame de Malassez. ©Angleviel

Au cours de ce premier suivi, j'ai pu observer les mêmes tendances entre les mesures de la sonde et les observations microscopiques pour les différentes classes algales. Il y a eu une explosion d'algues vertes filamenteuse, *Mougeotia*, avec des *Closterium* et *Cosmarium*, et pour toutes les plaques un faible pourcentage de diatomées et cyanobactéries. La diversité en diatomées était importante (*Navicula*, *Cymbella*, *Rhopalodia*, *Synedra*, ...), alors que pour les cyanobactéries j'observais principalement des algues filamenteuses non identifiables.

3) Deuxième suivi

Lors du second suivi, avec le même protocole, d'après le graphique ci-dessous, la croissance et la composition du biofilm est complètement différente.

Test de student entre les répliquats, pour :

- les concentrations totales, H_0 rejetée car $t(26) = 1,37 \cdot 10^{-06}$, $p\text{-value} < 0,05$;
- [Cyanobactéries], H_0 acceptée, $p\text{-value} > 0,05$;
- [Algues vertes], H_0 rejetée car $t(26) = 3,44 \cdot 10^{-7}$, $p\text{-value} < 0,05$;
- [Diatomées], H_0 rejetée car $t(26) = 1,69 \cdot 10^{-5}$, $p\text{-value} < 0,05$.

Les concentrations moyennes de cyanobactéries semblent avoir la même dynamique alors que tous les autres groupes microphytiques varient entre les répliquats.

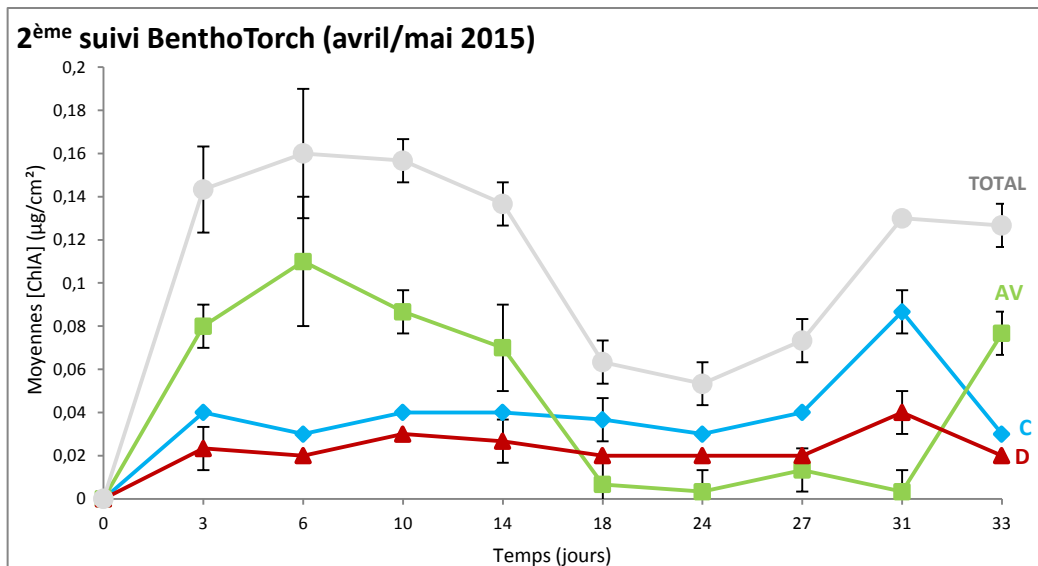


Figure 16: Suivi de la croissance du biofilm dans le bassin expérimental sur 33 jours (réplicat Avril/Mai 2015)

Les algues vertes semblent disparaître pour laisser la place aux cyanobactéries et diatomées. Les observations au microscope démontrent un remplacement des algues vertes filamenteuses par des algues vertes isolées qui sont de moins en moins présentes. Les cyanobactéries, genre *Microcystis* et *Chroococcus*, sont identifiées dans les biofilms prélevés sur les plaques. Les genres de diatomées sont comme pour le premier suivi : *Navicula*, *Synedra*, *Cymbella* et *Rhopalodia* principalement. La comparaison entre les données obtenues avec la sonde et celles obtenues par des observations microscopique établi une plus grande divergence que pour le premier suivi, ce graphique est placé en annexe 12, avec d'autres représentant l'évolution de croissance et les conditions environnementales fournies par l'enregistreur Hobo.

Il est important de noter que le bassin n'a pas subi d'arrivée d'eau (autre que les précipitations) ou d'introduction de produits chimiques qui aurait pu altérer la composition chimique du milieu. Ces changements dans la croissance du biofilm ne peuvent donc être expliqués que par des modifications de la luminosité et de la température survenue entre avril et mai. Quelques événements pluvieux ont entraîné une dilution des eaux du bassin d'étude. Ainsi le périphyton du bassin, milieu confiné et artificiel, semble être particulièrement sensible aux conditions environnementales. C'est en expérimentant en milieu naturel qu'on a pu vérifier si on arrivait aux mêmes conclusions.

C. Suivi *In situ* du lac du Bimont (Δt en semaines et en mois)

L'expérience sur le lac du Bimont a duré 3 mois. Dès le premier mois, nous avons pu remarquer des problèmes au niveau des dispositifs : de la rouille sur les vis papillons. Donc il a été décidé de les enlever de façon à ne pas compromettre la croissance du biofilm. La présence des trous dans la plaque permet toujours de savoir où placer l'embout de la sonde. De plus, pour le dispositif au large, le tube de PVC s'est brisé dont nous avons fait une structure en « triangle » pour éviter toujours un entremêlement des cordes. Le dernier problème que j'ai rencontré au cours de cette expérience est une perte des dernières données sur les plaques à la rive à cause d'une baisse du niveau d'eau consécutive en raison de l'activité du barrage à la fin du mois de mai. Le dispositif au littoral s'est échoué sur la rive et le biofilm s'est complètement desséché. Pour éviter les répétitions et pour une meilleure compréhension du déroulement de cette expérience, le tableau suivant donne le programme de mesures.

	Ce qui a été fait	Ce qui a été analysé
26 février	Installation des deux dispositifs (station RIVE et LARGE)	/
Du 26 février au 2 avril	Croissance du biofilm pendant 36 jours	
2 avril	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Mesure à la BenthosTorch sur les 9 points de mesures des deux plaques de suivis (RIVE et LARGE) ✓ Récupération des biofilms des plaques de suivis seulement 	<p>Etude de l'effet de la position des dispositifs sur la concentration et la composition algale</p> <p>Comparaison entre les données mesurées et les observations microscopiques</p>
Du 2 avril au 1 ^{er} juin (60 jours avec une succession de repos et de journées de mesures)	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Mesure à la BenthosTorch sur les 9 points de mesures des plaques de suivis (RIVE et LARGE) tous les 15 jours en moyennes : le 15 et 21 avril, 6 et 19 mai, et le 1^{er} juin. ✓ Récupération des biofilms des plaques de suivis le 1^{er} juin au LARGE (perte des données à la RIVE) ✓ Récupération des biofilms des plaques témoins le 1^{er} juin au LARGE (perte des données à la RIVE) 	<p>Etude de la croissance algale sur les deux plaques de suivis sur deux mois avec un Δt en semaines</p> <p>Comparaison entre les données mesurées et les observations microscopiques</p> <p>Comparaison entre les données mesurées et des résultats de dosage de chlorophylle-a par spectrophotométrie</p>

Tableau 6: Calendrier du suivi de la croissance des biofilms sur les substrats artificiels localisés à deux stations (RIVE et LARGE) du lac du Bimont

1) Effet de la proximité de la rive

Les dispositifs ont été installés à des distances distinctes, au large et près de la rive, dans le but de caractériser l'influence de la proximité de la rive sur la composition ou la densité des différents groupes algaux.

En comparant les données récoltées sur les plaques de suivis des deux stations, nous remarquons que les biofilms sont différents. Sur l'histogramme des moyennes de concentrations de la station pour la rive, il est possible de voir que le biofilm est plutôt stable dans sa composition avec une majorité de diatomées, d'algues vertes et une faible proportion de cyanobactérie. Alors que dans le cas de la station au large, la composition du biofilm est plus variable.

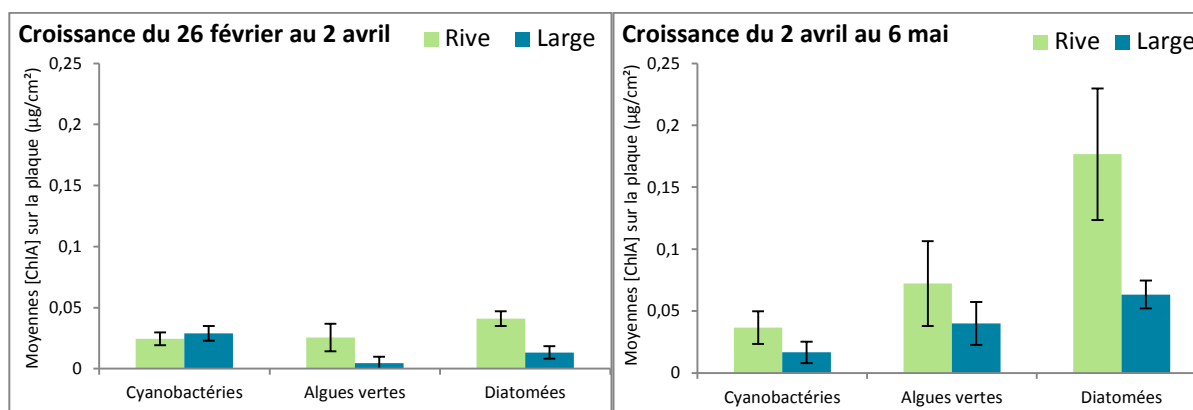


Figure 17: Histogrammes des moyennes de concentrations des différentes classes algales, mesurées sur les 9 points de mesures à la BenthosTorch (de février à juin 2015)⁴. Différence significatives entre les deux plaques pour les deux périodes de croissance (2 avril : $t(26) = 1,19.10^{-5}$ & 6 mai : $t(26) = 5,08.10^{-4}$; H_0 rejetée p -value < 0,05)

⁴ Pour la station à la Rive : perte des données du 1^{er} juin (60^{ème} jour).

Les biofilms se développant sur les plaques sont différents entre les stations. Cette différence pourrait s'expliquer par une composition en phytoplancton différente dans la colonne d'eau qui se dépose sur le substrat. Pour étudier le phytoplancton, j'ai prélevé de l'eau à proximité des dispositifs pour des analyses plus poussées. La première méthode a consisté à filtrer un volume d'eau prélevé aux stations de Bimont (90 mL) et de faire la mesure à la BenthosTorch directement sur le filtre de diamètre de 47 mm. Toutefois, il existe aussi une deuxième méthode pour connaître la biomasse des microalgues en suspension dans la colonne d'eau. Il faut faire sédimenter les microalgues à l'aide d'une colonne d'Uthermöhl, pour ensuite faire une observation du phytoplancton déposé au microscope inversé. Le tableau suivant est un exemple des données collectées sur le phytoplancton dans Bimont. Les différences du phytoplancton sont dues aux influences environnementales différentes entre la rive et le large. Par exemple la rive est caractérisée par une colonne d'eau se réchauffant plus rapidement. Alors qu'au large il faut prendre en compte la taille de la colonne d'eau plus importante, la surface sera chauffée alors qu'en profondeur le phytoplancton subira des températures plus basses.

Commentaires	BenthosTorch (converties en µg/L)				Observations microscopiques		
	Cyano.	Algues vertes	Diatomées	Total	Cyano.	Algues vertes	Diatomées
Filtration pour le LARGE	3,86	0	40,48	44,34	NI ⁵	Très peu d'algues vertes (<i>Mougeotia</i>)	Principalement des diatomées dans la colonne d'eau de tailles et formes différentes.
Filtration pour la RIVE	0	0	1,93	1,93	NI	Peu d'algues vertes observés dans le plancton précipité	Une grande diversité de genres de diatomées, par contre individus de petites tailles et densité élevée

Tableau 7: Exemple d'analyse de phytoplancton dans le lac du Bimont (2 avril 2015)

2) Variabilité sur le substrat

Une des particularités du biofilm est qu'il se forme naturellement sur un substrat. Mais ce biofilm ne sera pas de composition et de concentration identique sur l'ensemble du substrat. En effet, il y a une variabilité dans la mise en place du périphyton. Nous avons déjà observé ce phénomène, avec mon tuteur, en réalisant une caractérisation de la rive de Bimont, la conclusion était qu'il existe une variabilité entre substrats et sur le même substrat. Sur les plaques, j'ai pu faire les mêmes observations, en prenant les mesures sur 9 points. Par exemple, lors des mesures du premier mois sur la plaque de suivi au LARGE les concentrations totales de chlorophylle-a varient de 0,06 à 0,04 µg/cm² et pour la RIVE la gamme de densité algale est de 0,11 à 0,08 µg/cm². Les schémas des plaques avec les données obtenues pour chaque point de mesure du 1^{er} mois sont en annexe 13 et présentent les variations en concentrations et en compositions. Chaque point a sa composition spécifique des trois groupes algaux.

3) Croissance du périphyton

Pendant 3 mois, l'objectif était de faire un relevé des plaques tous les unes ou deux semaines, en fonction des emplois du temps des personnes m'encadrant. Grâce aux 9 points de mesures des plaques, il était possible de réaliser un suivi global de la croissance du périphyton sur la plaque mais aussi en chaque point. Le suivi des plaques, nous permet d'analyser plus en détails les étapes de colonisation des substrats et la croissance du biofilm. Les graphiques présentent les résultats pour les deux stations.

⁵ NI : Non identifiable, c'est-à-dire présence de filaments de cyanobactéries fins sans organites, dont le genre est difficile à identifier au microscope inversé.

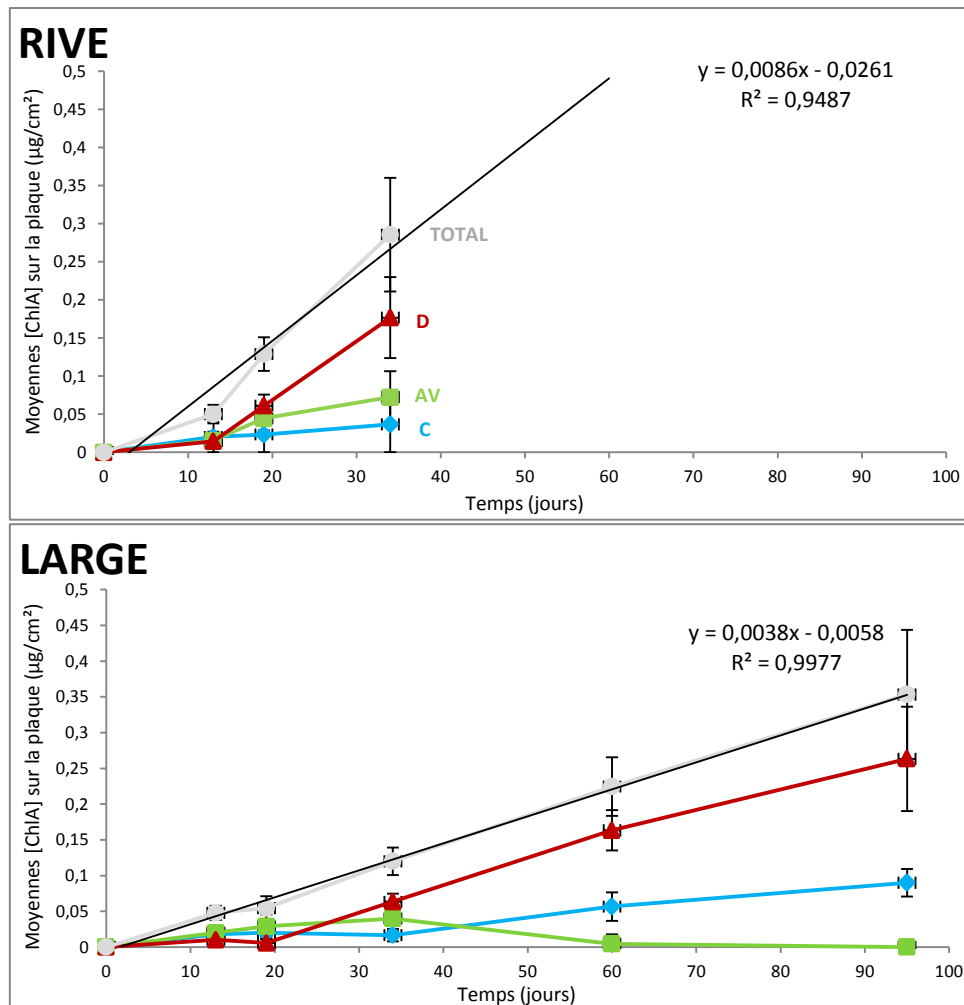


Figure 18: Graphiques de l'évolution des moyennes de concentrations des microalgues sur les plaques au cours du temps pour les deux stations de mesures sur Bimont (fin février / début juin 2015)⁶

Les remarques qui peuvent être faites sont que :

- ❖ la biomasse du biofilm à la station RIVE est plus importante. Le biofilm est plus dense qu'au large ($0,6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$),
- ❖ à l'échelle de temps envisagée dans cette expérience, la croissance du biofilm est assez constante. En effet, une tendance linéaire de l'augmentation de biomasse est observable.
- ❖ le coefficient directeur à la rive est supérieur à celui du large ($0,086 > 0,038$). Donc la croissance du périphyton à la rive est plus rapide qu'au large.
- ❖ il y a pour les deux stations une dominance des diatomées, mais les biofilms se différencient par des variations de densités des cyanobactéries et algues vertes.
- ❖ le schéma en « cloche » du cycle de la formation de biofilm, comme vu dans la littérature en rivière, n'a pas été observé au cours de ces trois mois. La croissance sur notre temps d'étude est dite linéaire.

L'étude du périphyton dans un milieu naturel comme le lac du Bimont, nous démontre que le biofilm, en plus d'être sensible aux conditions environnementales, est aussi influencé par la position du substrat par rapport au littoral et qu'il ne se développe pas de façon homogène sur une surface plane.

⁶ Pour la station à la Rive : perte des données du 6^{er} juin (60^{ème} jour) et de la plaque témoin de (90^{ème} jour).

IV. Etude de l'influence de la température sur le périphyton

Dans le but de déterminer l'effet de la température sur la formation et la composition du périphyton, nous avons choisis de faire une manipulation dans des mésocosmes à des températures contrôlées.

A. Protocole expérimental

Dans les locaux d'Irstea se trouve un laboratoire avec des aquariums à différentes températures pour une autre expérience dirigée par les scientifiques de ce centre de recherche. Les aquariums sont à deux températures : chaude (28 à 30 °C) et froide (20 à 22 °C).

Des substrats artificiels ont été construits pour chaque bassin. Ce sont des plaques rectangulaires de polycarbonate de 25 x 9 cm, où on leur a fixé un enregistreur Hobo de température et de lumière pour faire une vérification des conditions physico-chimique. Les deux plaques sont de formes identiques avec la délimitation de trois zones de mesures à la BenthosTorch. De plus, elles seront placées sous la même intensité lumineuse dans les bassins à différentes températures. Ainsi pendant environ 3 semaines (18 jours), il a fallu faire une mesure tous les jours sur les 3 zones de mesures sur les deux plaques. Nous pouvions donc faire un suivi de la croissance dans les différents bassins et en même temps définir quelles sont les groupes microphytiques préférentielles aux températures chaudes ou froides.

De plus, nous avons pu caractériser la qualité physico-chimique de l'eau des bassins, à l'aide de sonde et de mesures faite en laboratoire sur des échantillons d'eau. Le tableau suivant contient l'ensemble des données collectées au cours de l'expérience dans les mésocosmes.

	Caractéristiques	CHAUD	FROID
T = 0	Température (°C)	29,7	22,1
	pH	7,63	7,66
	Conductivité (µS)	415	413
	Nitrite (NO ₂ mg/L)	< 0,01	< 0,01
	Mesure BT sur filtre	C = 0	C = 0
		AV = 0,01	AV = 0
		D = 0,02	D = 0
Observations Uthermöhl	Forte densité et diversité de diatomées (<i>Pinnularia</i> , <i>Nitzschia</i> , <i>Asterionella</i> , <i>Stephanodiscus</i> , <i>Synedra</i>). Cyanobactéries non identifiable, fins filaments sans organites. Peu d'algues vertes (<i>Ulothrix</i> , <i>chlamydomonas</i>)	Forte densité et diversité d'algues vertes (<i>Ulothrix</i> , <i>Chlamydomonas</i> , <i>stichococcus</i>). Cyanobactéries non identifiable, fins filaments sans organites. Moyenne densité et diversité de diatomées (<i>Nitzschia</i> , <i>Synedra</i> , <i>Asterionella</i>).	

Tableau 8 : Caractéristiques physico-chimique des mésocosmes à t = 0

B. Résultats

Les deux graphiques suivants représentent la dynamique de croissance du périphyton dans des mésocosmes à différentes températures.

Il est possible de visualiser une différence significative entre les deux jeux de données pour la même période de mesure sur les substrats artificiels placés dans les bassins. Ce sont des différences basé sur la composition et la concentration en chlorophylle-a des échantillons, mais aussi sur la valeur de leur taux de croissance exponentielle.

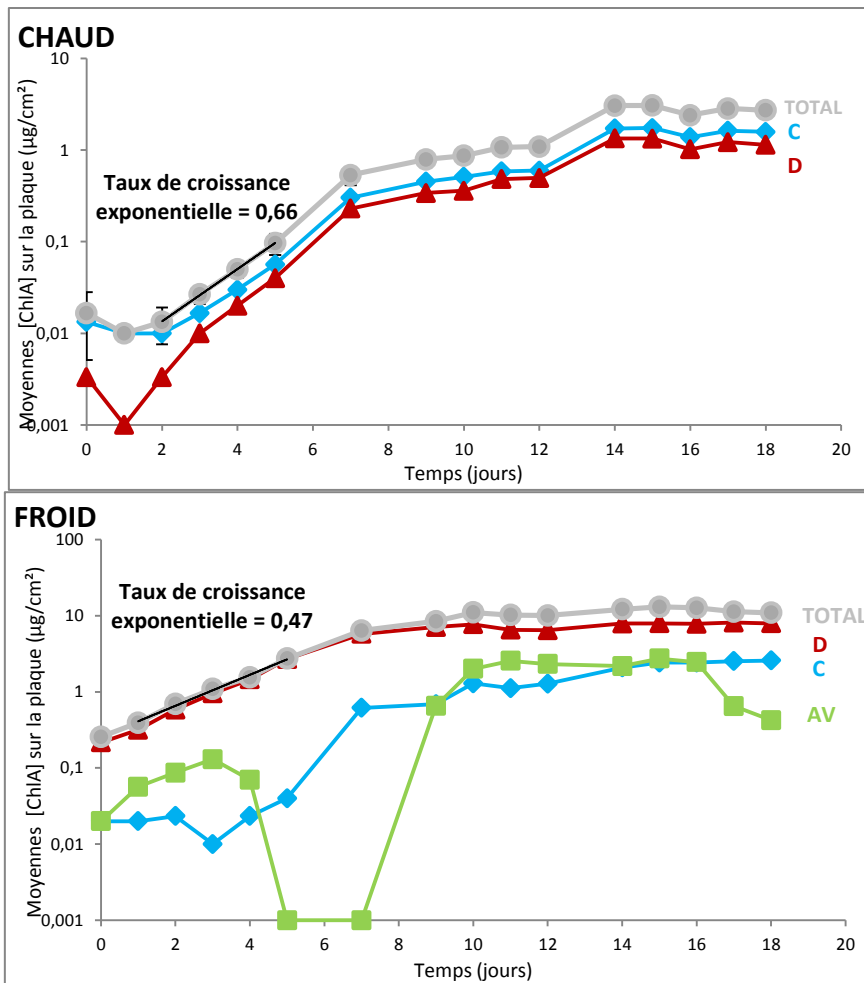


Figure 19 : Graphiques avec une échelle logarithmique du suivi de la croissance du périphyton dans deux milieux contrôlés (chaud 28-30 °C et froid 20-22 °C) sur 18 jours.

Dans le bassin d'eau chaude, le périphyton est peu dense (maximum à 4 µg/cm²), alors que pour l'eau froide avec la BenthosTorch nous avons pu mesurer des densités cellulaires jusqu'à 14 µg/cm². De plus, le périphyton en eau chauffée est composé principalement de cyanobactéries, et ensuite de diatomées, sans algues vertes, ce qui explique sa couleur distincte : gris/noir. Dans une eau plus fraîche le biofilm est de couleur rouge brique lié à une proportion dominante de diatomées. Les concentrations de cyanobactéries et d'algues vertes ont un maximum à environ 4 µg/cm².

Les deux biofilms formaient dans des conditions expérimentales étaient bien adhérent sur les substrats artificiels. Les observations microscopiques ont démontré une variabilité dans les proportions de chaque groupe microphytiques, mais par contre les mêmes genres de diatomées et de cyanobactéries ont pu être observés dans les deux cas. L'eau arrivant dans les bassins a la même origine, elle subit les mêmes traitements : filtre et désinfection UV. Donc l'apport microphytique est le même ce qui entraîne ces différences est la température qui permet à un groupe de microalgues de mieux se développer qu'un autre.

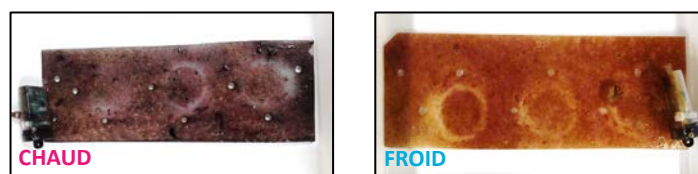


Figure 20: Photographies des deux biofilms à différentes températures ©Angleviel

CONCLUSION

Ce rapport de stage se partage en deux grands chapitres. Tout d'abord, il était indispensable de comprendre le fonctionnement de la BenthosTorch et de pratiquer des tests pour définir si cette sonde fluorimétrique peut-être un bon outils ou non pour des mesures sur le périphyton. Ensuite à l'aide de différents protocoles de suivis expérimentaux de croissance microalgale, il fut possible de caractériser la croissance du périphyton, ainsi que d'identifier les critères qu'il faudrait prendre en compte pour l'établissement d'un indice fonctionnel de la production primaire du périphyton.

Les tests de la BenthosTorch mettent en évidence que la sonde est opérationnelle malgré des problèmes rencontrés lors des mesures sur des cultures pures. Cette sonde a de grands avantages, car elle permet une détermination simultanée des densités de trois groupes algaux du périphyton sans avoir à faire d'échantillons et des préparations pour un décompte au microscope. Les valeurs sont mesurées en quelques secondes et sont conservées dans la mémoire interne de l'appareil. J'en déduis que la BenthosTorch est un outil efficace pour le diagnostic de l'état écologique des plans d'eau.

Il est important de rappeler que le périphyton est un assemblage de microalgues qui se posent et s'assemblent en biofilm sur les rives de plans d'eau ou de cours d'eau. En étudiant, la croissance des biofilms, nous déterminons que la capacité des algues benthiques à croître et à se développer dans les plans d'eau dépend des interactions complexes entre les processus hydrologiques, physico-chimiques et biologiques. Les variations saisonnières, par exemple, ont une grande influence sur le processus d'adhésion entre les microorganismes du périphyton, puisqu'elles sont responsables, entre autres, des variations de température, de lumière et de la quantité d'éléments nutritifs. Chaque espèce répond aux changements de son environnement en fonction de ses caractéristiques morphologiques et physiologiques, entraînant ainsi une série de successions dans la communauté (Lavoie, 2001). Avec l'expérience dans le bassin expérimental et les mésocosmes à différentes températures, il a été possible de déterminer que dans un espace confiné, le périphyton reste sensible aux conditions extérieures comme la température ou l'intensité lumineuse. Ainsi sa formation est modifiée en fonction des conditions extérieures. Mais la position du substrat influence aussi le biofilm. En étudiant les échantillons récupérés sur les plaques au large et à la rive du lac du Bimont, la densité des classes algales est différente entre les deux stations. Au bord, le biofilm semble stable avec des proportions à peu près identiques d'un mois à l'autre pour les classes algales. Alors qu'au large, le biofilm est plutôt hétérogène dans sa composition au cours du temps.

En conclusion, l'indice fonctionnel pourra dans l'avenir être mis en place mais il faudra prendre en compte les critères influençant la production primaire benthique, comme les caractéristiques physico-chimique environnemental ou encore les variabilités entre les substrats et sur les substrats au cours de la croissance. Donc de nombreux tests et études sont encore à effectuer si on veut pouvoir utiliser la BenthosTorch pour établir un indice de production primaire dans un diagnostic environnemental des plans d'eau.

BIBLIOGRAPHIE

- Biggs, B.J.F. (1996). Patterns in benthic algae of streams. *Algal Ecology - Freshwater Benthic Ecosystems*, 31-56.
- Capblanc, J. . (1973). Phytobenthos et productivité primaire d'un lac de haute montagne dans les pyrénées centrales. *Annales de limnologie*, 9, 39.
- Kim, K-T., & Travers, M. (1995). Utilité des mesures dimensionnelles et des calculs de surface et biovolume du phytoplancton: comparaisons entre deux écosystèmes différents. *Marine Nature*, 4, 29.
- Lambert, D., Cattaneo, A., & Carignan, R. (2008). Periphyton as an early indicator of perturbation in recreational lakes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 65(2), 258-265. doi: 10.1139/f07-168
- Lavoie, I. (2001). Evaluation du périphyton comme un bioindicateur de la qualité de l'eau des rivières agricoles du Québec. 125.
- Lavoie, I., Laurion, I., Warren, A., & Vincent, W.F. (2007). Les fleurs d'eau de cyanobactéries. INRS rapport, n°916, xiii, 124.
- Lorenzen, C. J. (1967). Determination of chlorophyll and phaeopigments : spectrophotometric equations. *Limnology and Oceanography*, 12, 543-556.
- Mattila, Johanna, & Räsänen, Reetta. (1998). Periphyton growth as an indicator of eutrophication; an experimental approach. *Hydrobiologia*, 377(1-3), 15-23. doi: 10.1023/A:1003265208397
- MOLDAENKE, bbe. (2014). User Manual - bbe Benthic Torch. 105.
- Sekar, R., Venugopalan, V. P., Nandakumar, K., Nair, K. V. K., & Rao, V. N. R. (2004). Early stages of biofilm succession in a lentic freshwater environment. *Hydrobiologia*, 512(1-3), 97-108. doi: 10.1023/B:HYDR.0000020314.69538.2c
- Wetzel, R. G. (1983). "Opening remarks". *Periphyton of Freshwater Ecosystems*, 2.

WEBOGRAPHIE

Activ'Alg. « Présentation des microalgues ». Sur le site d'Activ'Alg. *Consulté le 09 mars 2015.*
http://www.activalg.fr/p_index.php

Biotech. « TP – La numération cellulaire ». *Consulté 09 mars 2015.*
<http://biotech.spip.ac-rouen.fr/IMG/pdf/TPnumeracioncellulaire.pdf>

Ecosociosystemes. « Algues unicellulaires ». Sur le site d'Ecosociosystemes. *Consulté le 09 mars 2015.*
http://www.ecosociosystemes.fr/algues_unicellulaires.html

Geofree. « Changez de Systèmes de Coordonnées en 1 clic ! ». Sur le site de Geofree, la boîte à Outils Géographiques. *Consulté le 24 mars 2015.*
<http://geofree.fr/gf/coordinateConv.asp#listSys>

Institut national de Recherche en Sciences et Technologies pour l'Environnement et l'Agriculture. *Consulté le 04 mars 2015.*
<http://www.irstea.fr/>

Ioplan. « Phytoplankton pigments ». *Consulté le 12 Juin 2015.*
<http://www.iopan.gda.pl/~kaczmar/bdo/pigments.htm>

Kilauea. « Concentration de l'acide chlorhydrique du commerce ». Sur le site Travaux pratiques SVT. *Consulté le 26 mai 2015*
<http://www.labo52svt.fr/produits/reactifs/32-concentration-de-lacide-chlorhydrique-du-commerce>

McGinley, M. (2014, 9 nov.). « Water pollution ». Sur le site The Encyclopedia of Earth. *Consulté le 25 fév. 2015*
<http://www.eoearth.org/view/article/150157/>

Office de Tourisme d'Aix-en-Provence. « Lac du Bimont ». Sur le site de l'Office du Tourisme d'Aix-en-Provence. *Consulté le 02 mars 2015*
<http://www.aixenprovencetourism.com/a-voir-que-faire/explorez/visites-guidees/?detail=204>

SADEF. « Un procédé basé sur l'émission de fluorescence ». Sur le site SADEF, Agronomie & Environnement. *Consulté le 03 juin 2015.*
<http://www.fluorimetrie.com/emission-de-fluorescence.html>

ANNEXES

Annexe 1: Protocole de terrain synthétique pour l'utilisation de la BenthosTorch



bbe BENTHO TORCH

PROTOCOLE TERRAIN



CONTENU DE LA VALISE DE TRANSPORT

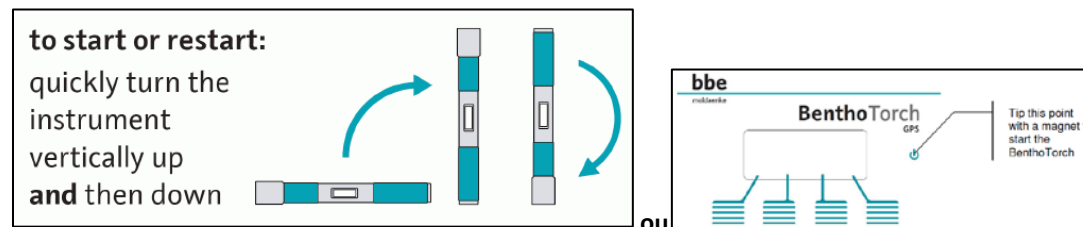
- Câble de connexion USB pour la Benthos Torch.
- Alimentation du Benthos Torch avec 4 adaptateurs (zone géographiques).
- 10 Disques avec une cavité de 1cm², pouvant contenir un volume de 100 µL, pour la calibration de la Benthos Torch (8 noirs, 1 gris, 1 blanc).
- Un aimant pour le démarrage.
- Une dragonne.
- Une capsule avec un tissu pour le nettoyage.
- Un manuel d'utilisation.
- Un CD d'installation.
- Un Sac à dos de transport de la Benthos Torch.

PROTOCOLE

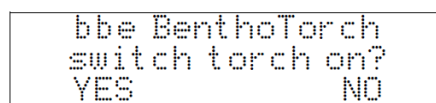
- 1) **Charger** la Benthos Torch avec l'alimentation-chargeur connectée à l'aide du petit câble USB.



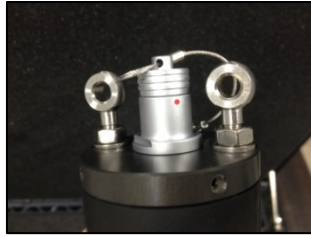
- 2) **Allumer** la Benthos Torch par un mouvement de haut en bas, puis un retour rapide. Si cette méthode ne fonctionne pas il est possible d'utiliser un aimant à placer sur le bouton d'allumage.



- 3) **Confirmer l'allumage** avec les touches tactiles situées sous l'écran, une vibration est émise lorsque la commande est confirmée.



- 4) Utiliser la dragonne pour sécuriser l'appareil.
- 5) S'assurer que le **connecteur est bien protégé** avec le capuchon dédié.

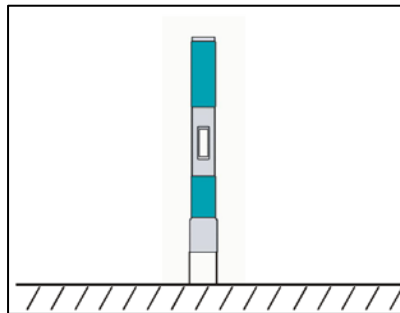


- 6) Aller **menu** -> **start measurement** (après avoir calibré et déterminé les différents modes voulus) à l'aide des touches tactiles se trouvant sur l'écran. Une vibration confirme la commande.

```

bbe BenthosTorch
01.06.2008
12:00:00 menu
  
```

- 7) **Plonger et positionner la « tête »** sensorielle avec l'embout rouge sur la zone dont la concentration algale benthique est à mesurer.



S'assurer que l'embout rouge est bien posé sur le substrat pour éviter que de la lumière fausse les résultats.

- 8) La Benthos Torch est fourni avec un GPS interne, si il est activé il va donner la position spatiale de la zone de mesure. Par contre, s'il y a des problèmes de calcul de positionnement 2 options sont proposées : les conserver malgré tout *takepos.* ou les ignorer *skip.*

```

PosFix Num Quali
YES 4 95%
takepos. skip
  
```

- 9) Durant la calibration interne un nombre décroissant de # est affiché.

```

#####
#####
#####
  
```

- 10) Durant la mesure, le temps restant est affiché.

```

Measuring
Time remaining
5 s
  
```

- 11) **La fin de la mesure** est signalée par une vibration. Les résultats pourront être lus sur l'écran, ils sont visibles alternativement pour les 3 classes d'algues.

```

green:
0.7µg/cm²
more <- -> ESC
  
```

```

cyanos:
0.7µg/cm²
more <- -> ESC
  
```

```

diatoms:
0.7µg/cm²
more <- -> ESC
  
```

- 12) Presser sur *ESC* pour retourner sur l'écran *start measurement*.

- 13) Avant de faire une autre mesure il est nécessaire de **nettoyer l'embout** de la Benthos Torch.

Il faut retirer de la « tête » sensorielle toutes traces d'algues, en la nettoyant avec de l'eau courante et ensuite sécher l'embout avec un tissu doux.

Pour éviter d'abimer l'appareil, lors du nettoyage, il ne faut pas :

- Utiliser un jet d'eau ou de l'eau à forte pression ;
- Utiliser des produits de nettoyage agressif, surtout pas en contact avec la «tête » sensorielle ou les LED ;
- Faire attention à ce que les contacts électriques ne soient pas en contact avec l'eau et bien protégés par un capuchon.

14) Les données seront sauvegardées dans la mémoire interne de l'appareil et pourront être récupérer sur un PC après l'installation du logiciel bbe++.

Annexe 2: L'attestation de calibration de la BenthosTorch fournit par la société Moldaenke

biological · biophysical · engineering

bbe
moldaenke

Preetzer Chaussee 177
D - 24222 Schwentinental

Telefon: +49 (0) 431/380 400
Telefax: +49 (0) 431/380 4010
e-mail: bbe@moldaenke.de
Internet: <http://www.bbe-moldaenke.de>

Chlorophyll Calibration Protocol

Operator: B. Franckowiak

Instrument: BenthosTorch

Date: 22.10.14

Serial No.: BTo-07-022

Software vers.: 3.13

Background Offset :

black	OK
grey	OK
white	OK

		Calibration		Reference	Check	Deviation
		Calibration	Calibration	Reference	Actual value	max =5%
		conc. 1	conc. 2	conc.	conc.	max =5%
		[µg/cm ³]	[µg/cm ³]	[µg/cm ³]	[µg/cm ³]	[%]
Green Algae	<i>Chlorella vulgaris</i>	0,68	5,14	0,68	0,67	-1,47
Cyanobacteria	<i>Microcystis aeruginosa</i>	0,63	5,88	0,63	0,61	-3,17
Diatoms	<i>Cyclotella meneghiniana</i>	0,99	0,99	0,99	1,02	3,03

Reference instrument

Referenz 2 (UV)

Set time and date:

OK

Parameter file:

BT_7022_24102014

Remarks:

Signature:

B. Franckowiak

www.bbe-moldaenke.de

Annexe 3: Tableaux des données utilisées pour la vérification de la stabilité de la BenthosTorch (26 février 2015)

SUBSTRAT 1												
Réplicat	POSITION 1				POSITION 2				POSITION 3			
	Cyano	Green algae	Diatoms	TOTAL	Cyano	Green algae	Diatoms	TOTAL	Cyano	Green algae	Diatoms	TOTAL
1	0,28	0,04	0	0,32	0,33	0,08	0	0,41	0,29	0,15	0	0,44
2	0,28	0,04	0	0,32	0,33	0,06	0	0,39	0,29	0,13	0	0,42
3	0,3	0,02	0	0,32	0,35	0,05	0	0,4	0,3	0,12	0	0,42
4	0,31	0,02	0	0,33	0,34	0,05	0	0,39	0,3	0,11	0	0,41
5	0,32	0,02	0	0,34	0,36	0,05	0	0,41	0,31	0,11	0	0,42
Moyenne ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	0,298	0,028	0	0,326	0,342	0,058	0	0,4	0,298	0,124	0	0,422
Ecart-type ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	0,018	0,011	0	0,009	0,013	0,013	0	0,01	0,008	0,017	0	0,011
Coefficient de variation (%)	6,003	39,123	/	2,744	3,812	22,480	/	2,5	2,808	13,495	/	2,596

SUBSTRAT 2												
Réplicat	POSITION 1				POSITION 2				POSITION 3			
	Cyano	Green algae	Diatoms	TOTAL	Cyano	Green algae	Diatoms	TOTAL	Cyano	Green algae	Diatoms	TOTAL
1	0,28	0,01	0	0,29	0,26	0,03	0	0,29	0,2	0,11	0	0,31
2	0,28	0,01	0	0,29	0,28	0,03	0	0,31	0,2	0,11	0	0,31
3	0,29	0,01	0	0,3	0,28	0,04	0	0,32	0,21	0,1	0	0,31
4	0,32	0	0	0,32	0,29	0,03	0	0,32	0,22	0,1	0	0,32
5	0,31	0	0	0,31	0,3	0,03	0	0,33	0,22	0,09	0	0,31
Moyenne ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	0,296	0,006	0	0,302	0,282	0,032	0	0,314	0,21	0,102	0	0,312
Ecart-type ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	0,018	0,005	0	0,013	0,015	0,004	0	0,015	0,01	0,008	0	0,004
Coefficient de variation (%)	6,137	91,287	/	4,317	5,260	13,975	/	4,830	4,762	8,203	/	1,433

SUBSTRAT 3												
Réplicat	POSITION 1				POSITION 2				POSITION 3			
	Cyano	Green algae	Diatoms	TOTAL	Cyano	Green algae	Diatoms	TOTAL	Cyano	Green algae	Diatoms	TOTAL
1	0,18	0,12	0	0,3	0,11	0,07	0	0,18	0,34	0,08	0	0,42
2	0,19	0,09	0	0,28	0,12	0,06	0	0,18	0,35	0,05	0	0,4
3	0,19	0,08	0	0,27	0,12	0,05	0	0,17	0,38	0,03	0	0,41
4	0,2	0,08	0	0,28	0,11	0,06	0	0,17	0,38	0,03	0	0,41
5	0,2	0,07	0	0,27	0,13	0,05	0	0,18	0,39	0,02	0	0,41
Moyenne ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	0,192	0,088	0	0,28	0,118	0,058	0	0,176	0,368	0,042	0	0,41
Ecart-type ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	0,008	0,0192	0	0,0122	0,008	0,008	0	0,005	0,0217	0,024	0	0,007
Coefficient de variation (%)	4,358	21,858	/	4,374	7,090	14,425	/	3,112	5,891	56,844	/	1,725

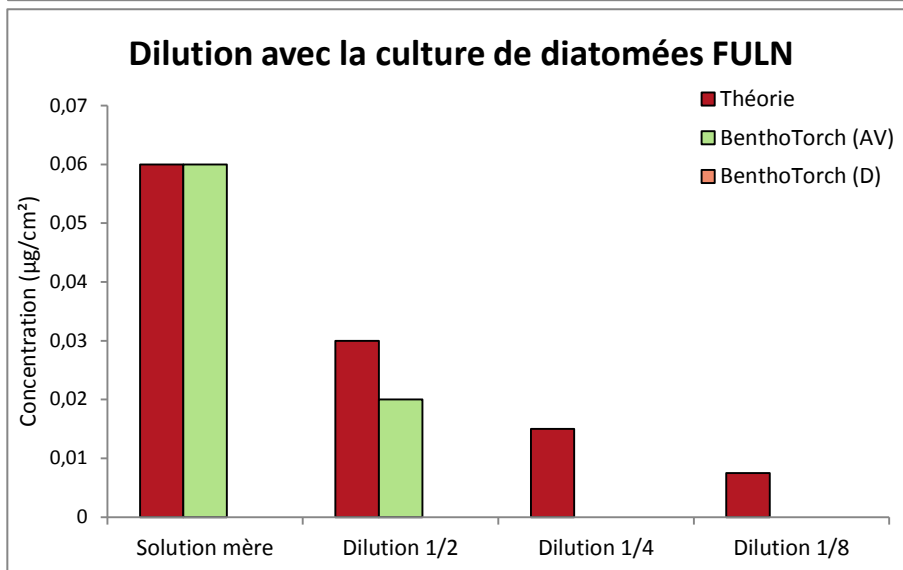
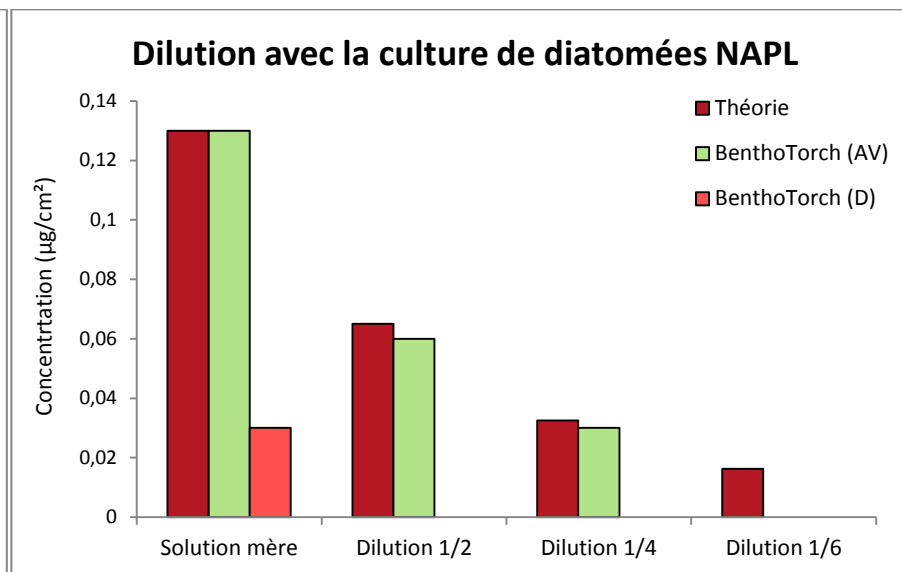
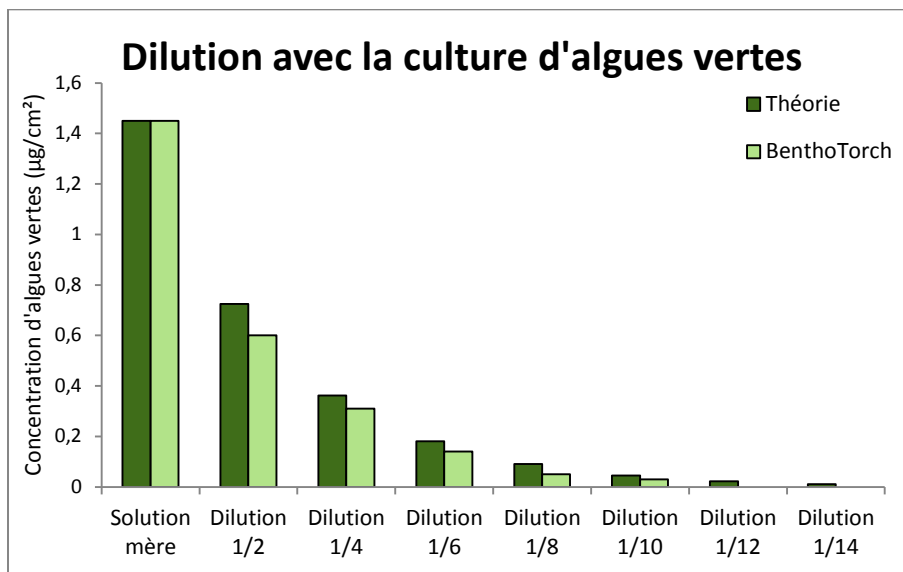
Annexe 4: Récapitulatif des tests qualitatifs sur cultures pures de microalgues (avril/mai 2015)

Date/Time	Commentaire	Cyano	Green Algae	Diatoms	Total Conc.
date		µg/cm ²	µg/cm ²	µg/cm ²	µg/cm ²
08/04/2015 14:49	Vérification AV	0	0,9	0	0,9
08/04/2015 14:49	Vérification AV	0	0,83	0	0,83
08/04/2015 14:53	Vérification D FULN	0	0,04	0	0,04
08/04/2015 14:53	Vérification D FULN	0	0,03	0	0,03
08/04/2015 14:58	Vérification D NAPL	0	0,02	0	0,02
08/04/2015 14:58	Vérification D NAPL	0	0,04	0	0,04
16/04/2015 10:48	Test NAPL blanc	0	0,11	0,08	0,19
16/04/2015 10:49	Test NAPL blanc	0	0,1	0,08	0,18
16/04/2015 10:49	Test NAPL gris	0	0,1	0,09	0,19
16/04/2015 10:50	Test NAPL gris	0	0,12	0,09	0,21
16/04/2015 10:52	Test NAPL noir	0	0,09	0,03	0,12
16/04/2015 10:52	Test NAPL noir	0	0,08	0,03	0,11
16/04/2015 11:03	Test FULN blanc	0	0,06	0,03	0,09
16/04/2015 11:03	Test FULN blanc	0	0,06	0,03	0,09
16/04/2015 11:04	Test FULN gris	0	0,06	0,04	0,1
16/04/2015 11:04	Test FULN gris	0	0,07	0,04	0,11
16/04/2015 11:05	Test FULN noir	0	0,06	0	0,06
16/04/2015 11:05	Test FULN noir	0	0,05	0,01	0,06
16/04/2015 11:12	Test EOMI blanc	0	0,03	0,02	0,05
16/04/2015 11:13	Test EOMI blanc	0	0,03	0,02	0,05
16/04/2015 11:13	Test EOMI gris	0	0,07	0,12	0,19
16/04/2015 11:13	Test EOMI gris	0	0,07	0,1	0,17
16/04/2015 11:14	Test EOMI noir	0	0,05	0	0,05
16/04/2015 11:14	Test EOMI noir	0	0,04	0	0,04

Date/Time	Commentaire	Cyano	Green Algae	Diatoms	Total Conc.
date		µg/cm ²	µg/cm ²	µg/cm ²	µg/cm ²
16/04/2015 15:09	Test AV blanc	0	0,81	0	0,81
16/04/2015 15:09	Test AV blanc	0	0,79	0	0,79
16/04/2015 15:10	Test AV gris	0	0,95	0	0,95
16/04/2015 15:10	Test AV gris	0	0,94	0	0,94
16/04/2015 15:10	Test AV noir	0	0,47	0	0,47
16/04/2015 15:11	Test AV noir	0	0,46	0	0,46
24/04/2015 10:56	Filtre FULN	0	0,02	0,02	0,04
24/04/2015 10:57	Filtre FULN	0	0,02	0,02	0,04
24/04/2015 11:00	Filtre NAPL	0	0,07	0,03	0,1
24/04/2015 11:00	Filtre NAPL	0	0,07	0,04	0,11
24/04/2015 11:03	Filtre AV	0	0,45	0	0,45
24/04/2015 11:04	Filtre AV	0	0,43	0	0,43
24/04/2015 11:06	Filtre EOMI	0	0,01	0,03	0,04
24/04/2015 11:07	Filtre EOMI	0	0,01	0,03	0,04
12/05/2015 16:33	Test C noir	0,11	0	0	0,11
12/05/2015 16:33	Test C noir	0,1	0	0	0,1
12/05/2015 16:34	Test C gris	0,08	0	0,03	0,11
12/05/2015 16:34	Test C gris	0,08	0	0,03	0,11
12/05/2015 16:35	Test C blanc	0,07	0	0,02	0,09
12/05/2015 16:35	Test C blanc	0,08	0	0,02	0,1

Il existe trois couleurs de disques de calibration: noir, gris et blanc.

Annexe 5: Histogrammes des dilutions, pour comparer les données théoriques et les données de la BenthosTorch (avril 2015)



AV = Algues vertes

D = Diatomées

Annexe 6: Etapes pour les mesures de chlorophylle avec le spectrophotomètre

Calculs de 3M d'HCL avec un produit de 1L dont 23% d'HCL

Données :

- Masse molaire HCL = $M_h + M_{cl} = 1 + 35,45 = 36,45 \text{ g/mol}$
- $d = 1,115$ (d'après la littérature pour 23% d'HCL)
- 23% d'HCL dans 1 L de produit
- Masse volumique référence = masse volumique de l'eau = 1000 g

- Masse volumique de produit

$$\rho_{produit} = d \times \rho_{référence} = 1,115 \times 1000 = 1115 \text{ g}$$

- Masse volumique d'HCL

$$\rho_{HCl} = 23\% \text{ de } \rho_{produit} = \frac{23 \times \rho_{produit}}{100} = \frac{23 \times 1115}{100} = 256,5 \text{ g de HCl}$$

- Nombre de mol d'HCL

$$n = \frac{\rho_{HCl}}{M_{HCl}} = \frac{256,5}{36,45} = 7,04 \text{ mol}$$

Donc la concentration d'HCL dans 1 L de produit est de 7,04 mol/L

Objectif : Utilisation d'un volume concentré à 3 M d'HCL pour l'acidification des échantillons

Données :

- $C_m = 7,04 \text{ mol/L}$
- $V_f = 10 \text{ mL}$ (choisis)
- $C_f = 3M = 3 \text{ mol/L}$

$$C_m \times V_m = C_f \times V_f$$

$$V_m = \frac{C_f \times V_f}{C_m} = \frac{3 \times 10}{7,04} = 4 \text{ mL}$$

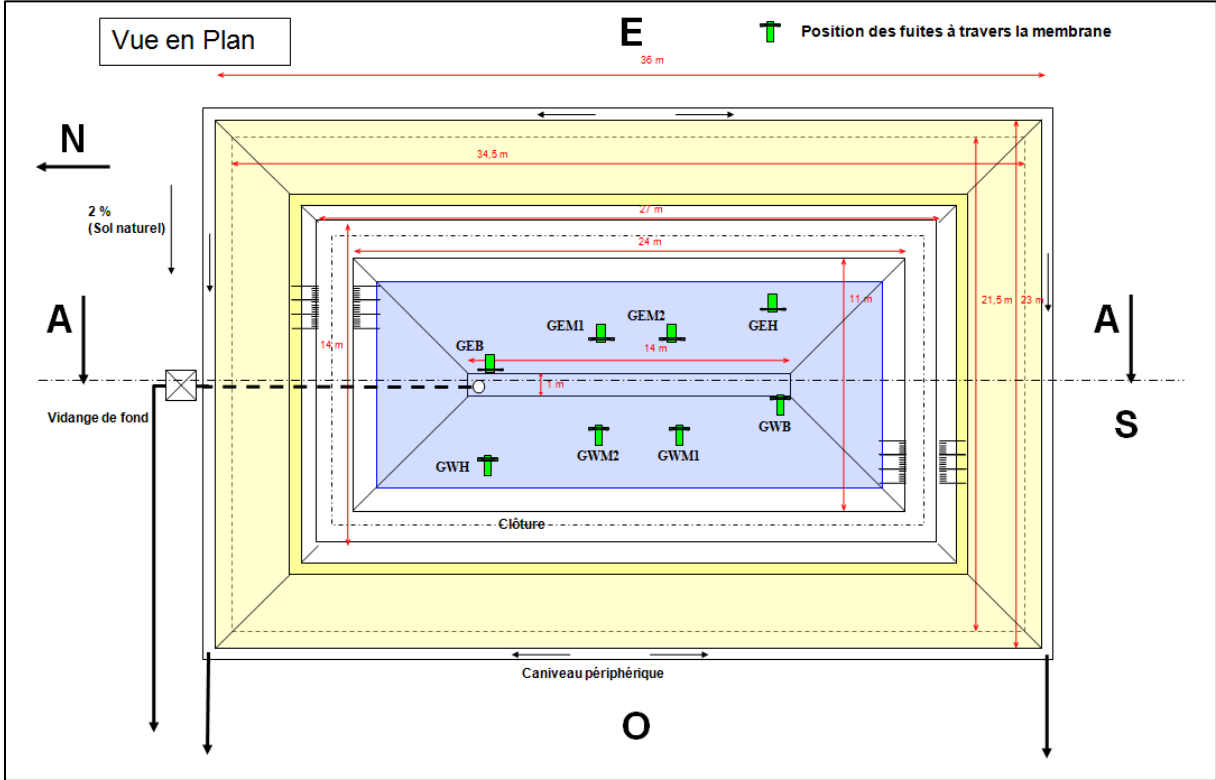
Par conséquent, il faut 4mL de la solution mère pour obtenir 10 mL de solution à 3M d'HCL.



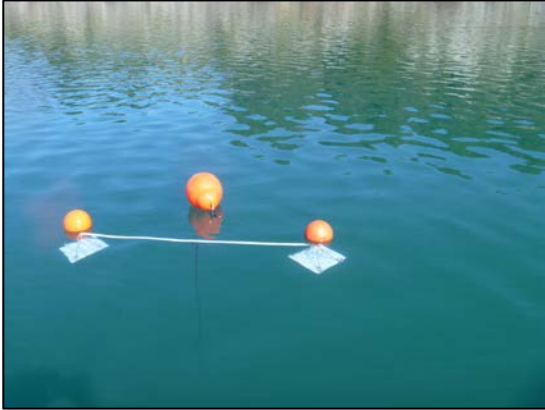
Annexe 7: Tableaux des résultats pour comparer les mesures à la BenthosTorch et les mesures par dosage spectrophotométrique

Lieux	Station	Aspect	Surface grattée	Valeurs BT chlorophylle - a totale	Volume de resuspension	Volume filtré	Absorbance				Valeurs spectro	Valeurs spectro
			cm ²	µg/cm ²	L	L	DO 665 av	DO 750 av	DO 665 ap	DO 750 ap	µg/L	µg/cm ²
DURANCE	DoBis	Petit galet de couleur marron/vert recouvert d'AV filamenteuses et d'agglomérat marron cotonneux (<i>Didymosphenia</i>)	36	2,640	0,04	0,02	0,541	0,053	0,345	0,064	3204,8	1,780
	DoBis'	Galet recouvert de biofilm transparent avec accroche de sédiments marron et un amas d'AV filamenteuses	64	1,598	0,08	0,02	0,203	0,053	0,146	0,064	1160	0,363
	Do 1	Galet avec peu de biofilm marron et des pousses d'AV filamenteuse	64	2,695	0,08	0,02	0,833	0,042	0,486	0,071	6813,6	2,129
	Do 1'	Galet plat blanc recouvert de biofilm avec accroche de sédiments marrons et des touffes d'AV filamenteuses. Des petits agglomérats marron (<i>Didymosphenia</i>)	64	3,092	0,08	0,02	0,415	0,051	0,256	0,067	3214,4	1,005
	A 1	Biofilm fin avec sédiment gris, avec filaments verts et des amas de "mousses" visqueuses marron clair	100	1,420	0,08	0,02	0,336	0,134	0,234	0,116	1259,2	0,252
	A 2	Biofilm fin avec sédiment gris, avec filaments verts.	100	1,330	0,08	0,02	0,341	0,179	0,224	0,136	1275,2	0,255
	A 3	Biofilm fin avec sédiment gris, avec filaments verts et quelques amas de "mousses" visqueuses marron clair	100	1,400	0,08	0,02	0,232	0,078	0,154	0,071	1238,4	0,248
	D 1	Galet marron avec un fin biofilm avec en plus des masses marron/gris	100	1,620	0,08	0,02	0,213	0,055	0,143	0,059	1316,8	0,263
	D 2	Galet noir avec des petites tâches grises	100	1,500	0,08	0,02	0,262	0,087	0,173	0,082	1540	0,308
	D 3	Galet marron avec tâches grises	100	1,980	0,08	0,02	0,246	0,117	0,173	0,106	1138,4	0,228
BIMONT	LM	Plaque recouverte d'un biofilm marron claire (jaune), bien adhésive avec en plus du pollen.	618,8	0,220	0,15	0,02	0,073	0,048	0,057	0,044	220	0,053
	LT	Plaque recouverte d'un biofilm marron claire (jaune), bien adhésive avec en plus du pollen.	618,8	0,350	0,15	0,025	0,177	0,041	0,113	0,043	980,48	0,238
CAUSE	P 1	Biofilm marron sur la plaque	618,8	1,090	0,1	0,02	0,577	0,168	0,348	0,122	3066,4	0,099
	P 2	Biofilm fin marron sur la plaque	618,8	0,280	0,1	0,02	0,168	0,092	0,117	0,07	369,6	0,012
AQUARIUM	chaud	Biofilm noir/gris avec tâche rougie et des bulles d'air à sa surface, très adhésif	198	2,720	0,1	0,02	0,607	0,083	0,357	0,079	4390,4	0,443
	froid	Biofilm rouge brique, très adhésif	198	10,950	0,1	0,02	1,394	0,106	0,833	0,141	10444,8	1,055

Annexe 8 : Plan et photographie du bassin expérimental sur le site d'Irstea Aix-en-Provence

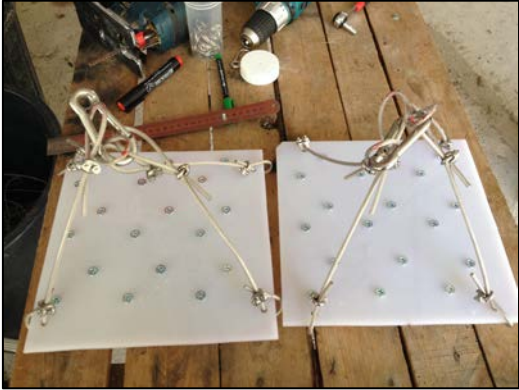
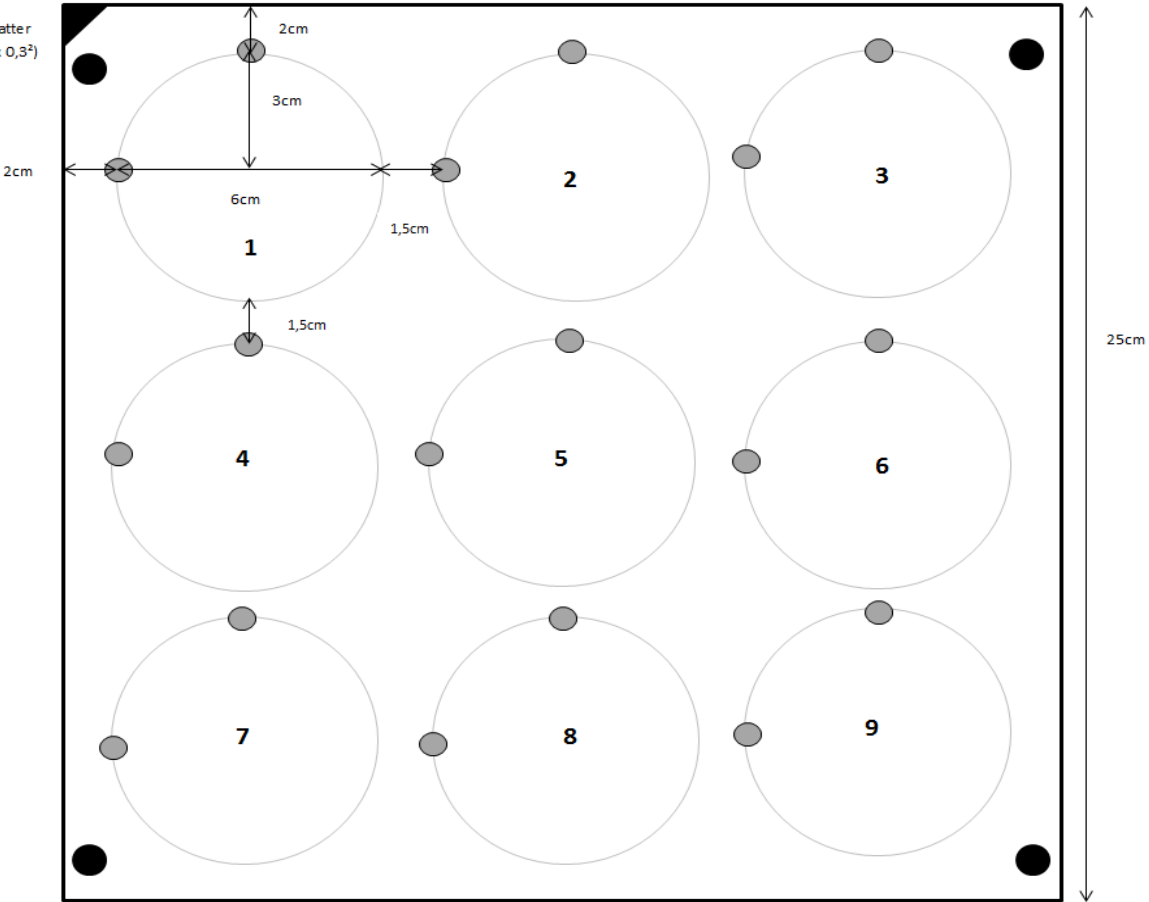


Annexe 9: Carte du lac du Bimont avec les coordonnées des stations RIVE et LARGE et photographies

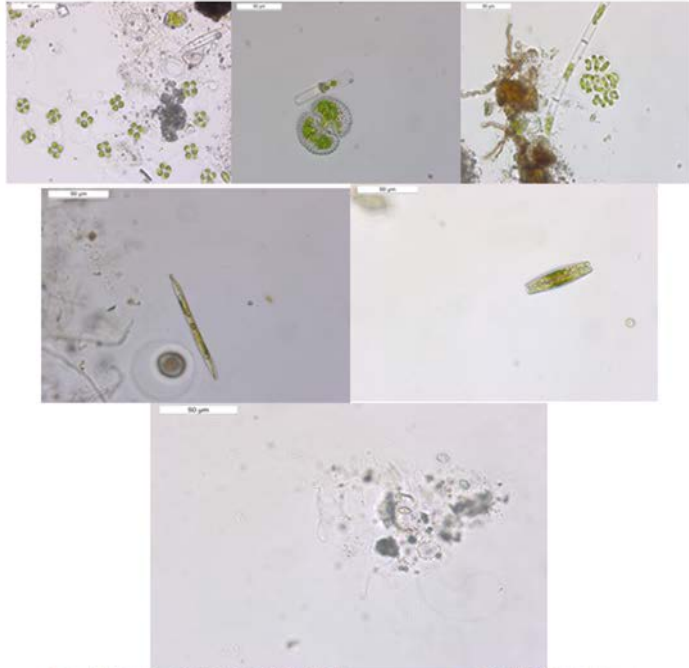
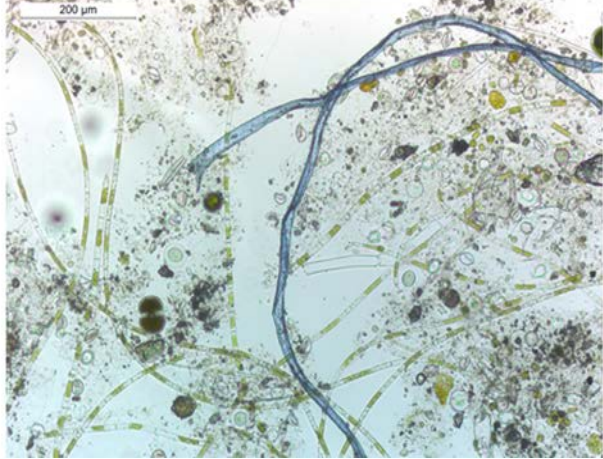
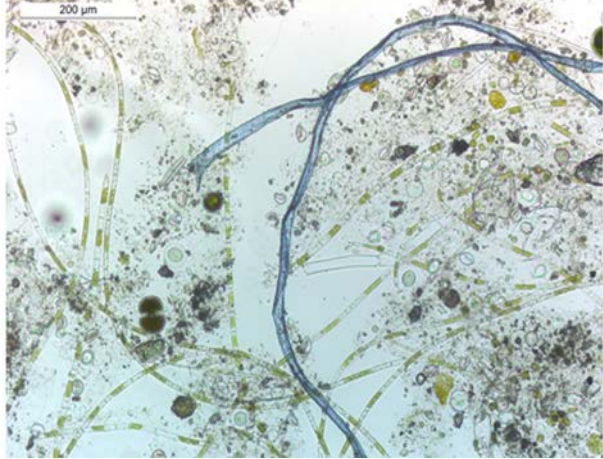


Annexe 10: Schéma et photographies du substrat artificiel en polycarbonate © Angleviel

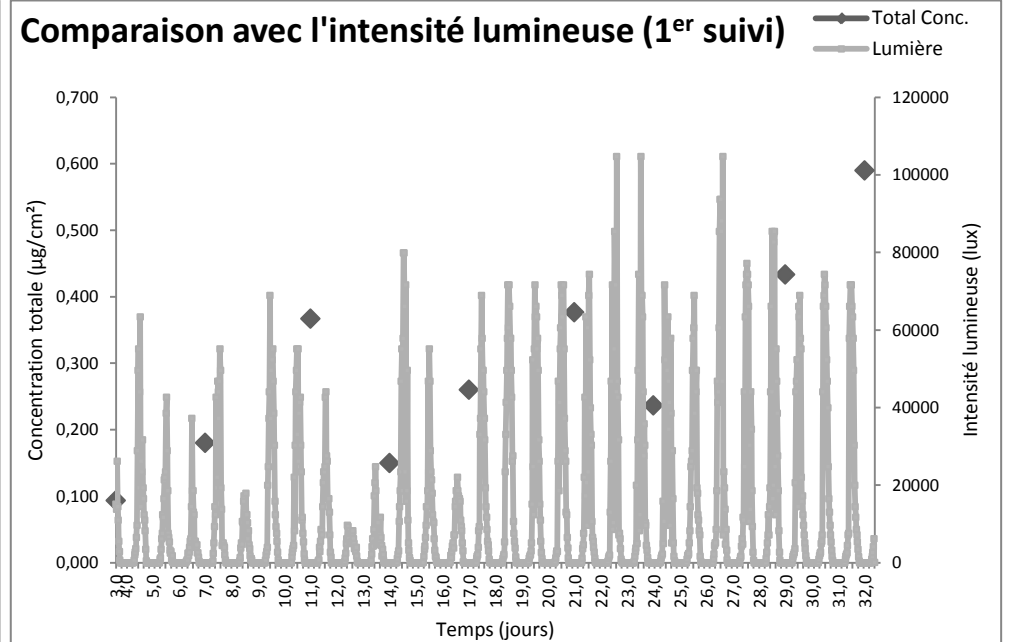
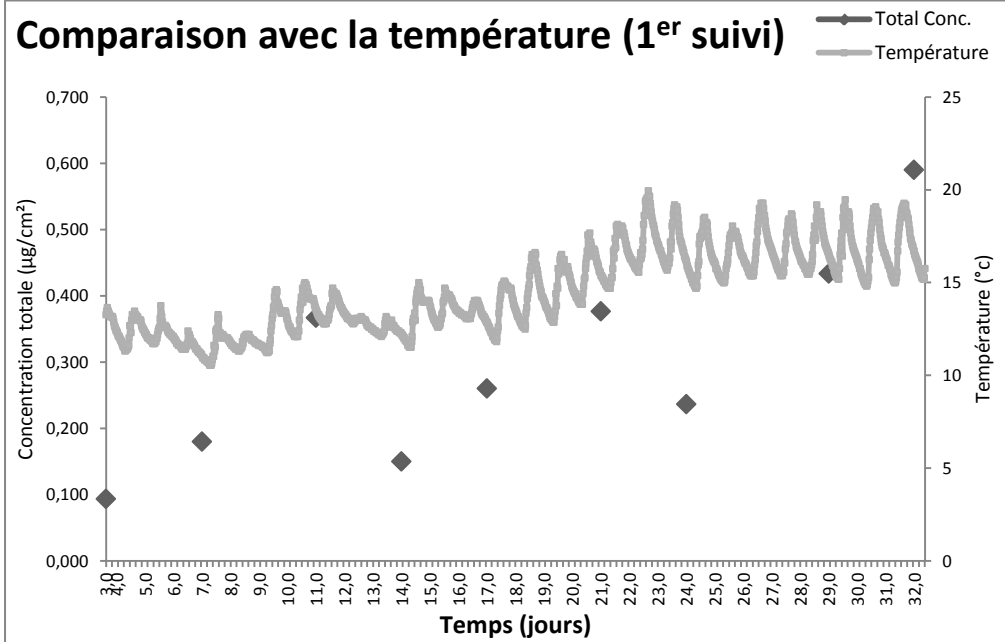
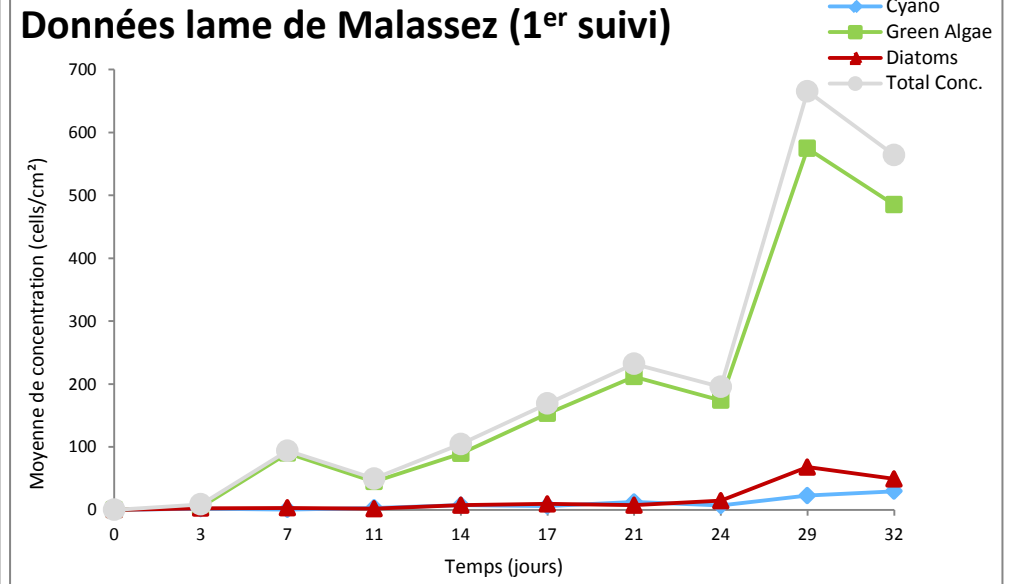
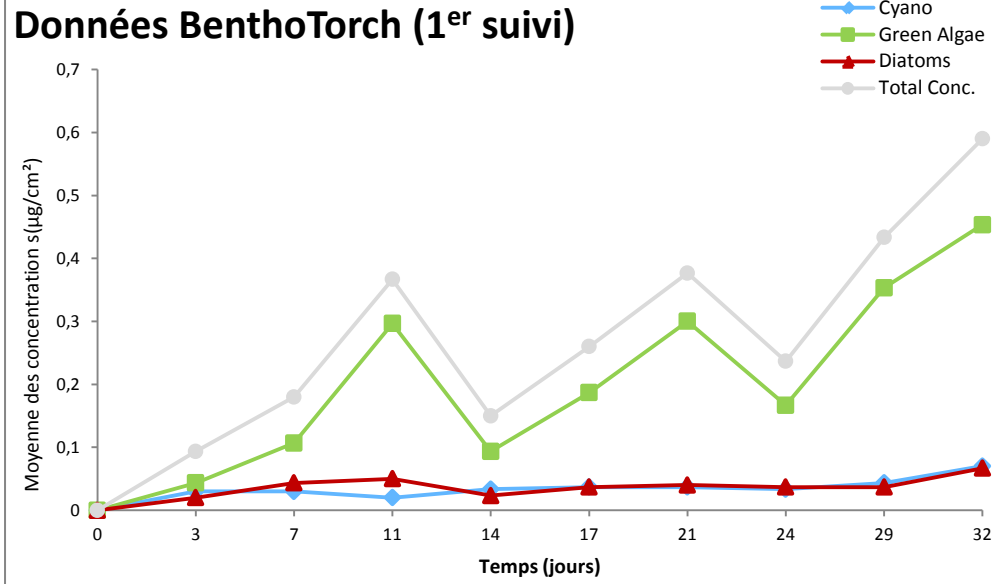
Surface Total à gratter
 = $(25 \times 25) - 22(\pi \times 0,3^2)$
 = 618,8cm²

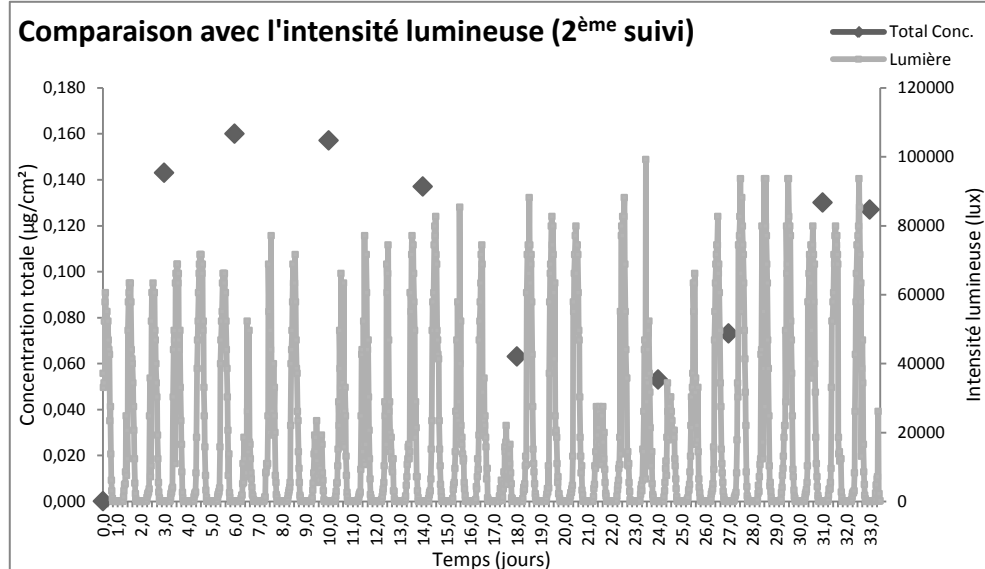
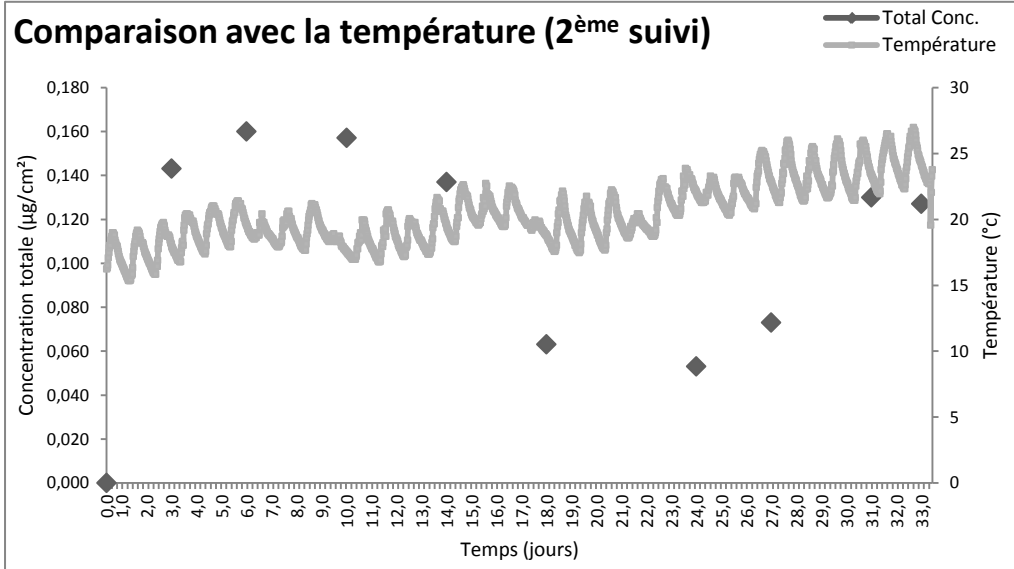
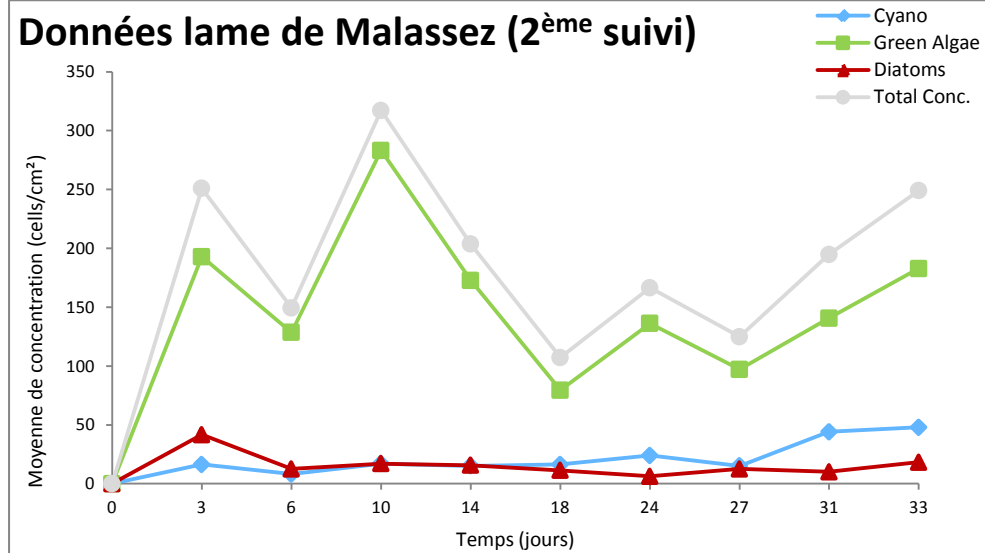
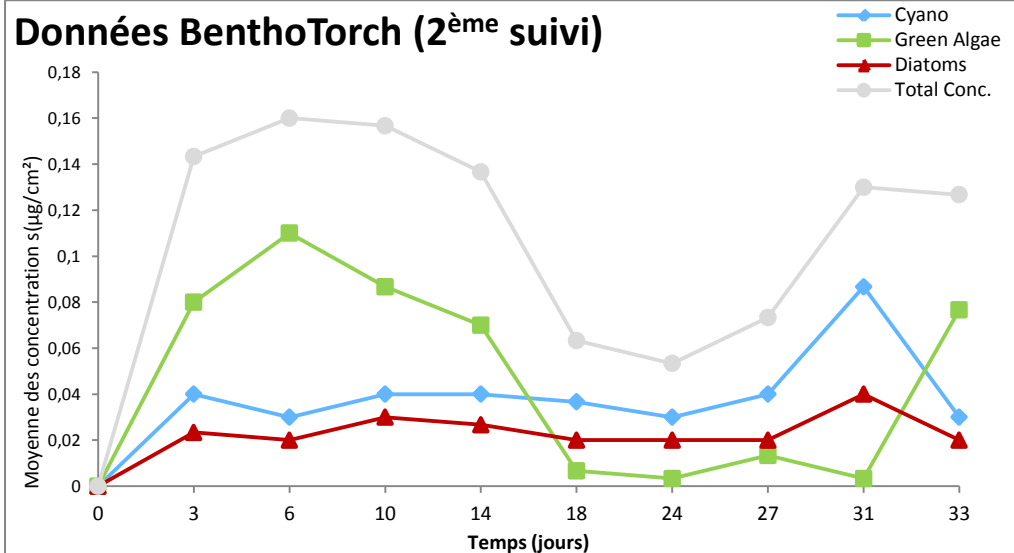


Annexe 11 : Inventaire de la flore algale du bassin expérimental et quelques photographies des microalgues observées © Angleviel

Classe algale	Genre	
Chlorophyte	<i>Carteria</i>	
Chlorophyte	<i>Closterium</i>	
Chlorophyte	<i>Cosmarium</i>	
Chlorophyte	<i>Golenkinia</i>	
Chlorophyte	<i>Hydrodictyon</i>	
Chlorophyte	<i>Mougeotia</i>	
Chlorophyte	<i>Monoraphidium</i>	
Chlorophyte	<i>Oocystis</i>	
Chlorophyte	<i>Pandorina</i>	
Chlorophyte	<i>Pediastrum</i>	
Chlorophyte	<i>Tetraspora</i>	
Chlorophyte	<i>Stichococcus</i>	
Chlorophyte	<i>Ulothrix</i>	
Chlorophyte	<i>Volvox</i>	
Chlorophyte	<i>Inconnu NI (petites sphères vertes)</i>	
Bacillariophyta	<i>Cymbella</i>	
Bacillariophyta	<i>Navicula</i>	
Bacillariophyta	<i>Rhoicosphenia</i>	
Bacillariophyta	<i>Rhopalodia</i>	
Bacillariophyta	<i>Synedra</i>	
Cyanophyte	<i>Chroococcus</i>	
Cyanophyte	<i>Lyngbya</i>	
Cyanophyte	<i>Microcystis</i>	
Cyanophyte	<i>Rivularia</i>	
Cyanophyte	<i>Inconnu NI (filament)</i>	

Annexe 12: Graphiques des données prélevées avec le dispositif dans le bassin expérimental et l'enregistreur Hobo





Annexe 13: Exemple des schémas de la variabilité de la composition du périphyton sur les plaques expérimentales de Bimont au bout d'un mois de croissance (avril 2015)

