94/1092

Cemagref

MEMOIRE

présenté devant

L'UNIVERSITE DE BORDEAUX I

en vue de l'obtention du

DIPLOME D'ETUDES SUPERIEURES ET SPECIALISEES

"GEOSCIENCES APPLIQUEES AUX EQUIPEMENTS EN MILIEUX URBAINS, RURAUX, LITTORAUX ET COTIERS"

par

Josiane SOLLIER

ETUDE DU PERIPHYTON BACTERIEN DU FLEUVE CHARENTE

Soutenu le 6 octobre 1994

Division "Qualité des Eaux", CEMAGREF groupement de Bordeaux.

MEMOIRE

présenté devant

L'UNIVERSITE DE BORDEAUX I

en vue de l'obtention du

DIPLOME D'ETUDES SUPERIEURES ET SPECIALISEES

"GEOSCIENCES APPLIQUEES AUX EQUIPEMENTS EN MILIEUX URBAINS, RURAUX, LITTORAUX ET COTIERS"

par

Josiane SOLLIER

ETUDE DU PERIPHYTON BACTERIEN DU FLEUVE CHARENTE

Soutenu le 6 octobre 1994

Division "Qualité des Eaux", CEMAGREF groupement de Bordeaux.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont participé à ce travail et m'ont soutenue pour la réalisation de ce document.

Je remercie tout d'abord mon tuteur, Michel FRAPPA, directeur des études du DESS "Géosciences appliquées aux équipements en milieux urbains, ruraux, littoraux et côtiers".

Je remercie également Bernard ROUSSEAU, directeur du Groupement de Bordeaux du CEMAGREF, et Hugues AYPHASSORHO, Chef de la division "Qualité des Eaux", de m'avoir accueillie au sein de leur établissement.

Je désire exprimer ma profonde reconnaissance à Mathieu TORRE, ingénieur à la division "Qualité des Eaux", qui m'a proposé cette étude et m'a aidée à la réaliser.

Je remercie Henry BEUFFE, de la division "Qualité des Eaux", pour tous ses conseils et son aide précieuse durant les campagnes de terrain.

Je remercie vivement Véronique LAHOUN, stagiaire CEMAGREF, pour son aide et sa collaboration tout au long de ce stage.

Je remercie également Nathalie MARY, Françoise ULYSSE, stagiaires CEMAGREF, Alain DUTARTRE, Michel COSTE et Jean-Claude GREGOIRE de la division "Qualité des Eaux" pour leur aide et leur soutien.

SOMMAIRE

INTRODUCTION 1

CHAPITRE 1 : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1- ESTIMATION DIRECTE DE L'IMPORTANCE DES PEUPLEMENTS BACTERIENS DANS LES MILIEUX AQUATIQUE 4
1-1 Numérations 4
1-2 Biovolumes 5

2- VIABILITE ET ACTIVITE METABOLIQUE DES MICROORGANISMES 6
2-1 Mise en évidence de la viabilité par coloration vitale ou non vitale 6
2-2 Accumulation de l'int - formazan dans les cellules 6
2-3 Microautoradiographie .....

3- MESURE DE LA PRODUCTION BACTERIENNE 7

4- APPLICATION DES METHODES A DEUX ETUDES PARTICULIERES 9
4-1 Evolution de la microflore bactérienne dans les eaux de rivière. Mesure de l'impact des rejets urbains 9
4-2 Dynamique de croissance du périphyton sur support artificiel 10

5- ETUDE DU PERIPHYTON 12
5-1 Utilisation de supports artificiels 12
5-2 Les substrats naturels 13
5-2-1 Observation directe 13
5-2-2 Techniques de séparation du biofilm 14

CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES

1- PRESENTATION DU SITE D'ÉTUDE
LE FLEUVE CHARENTE 17
1-1 Caractérisation générale du fleuve 17
1-2 Choix des sites d'étude 17
1-3 Orientation 19

2- CAMPAGNES DE TERRAIN 19
2-1 Planification des campagnes 19
2-2 Essais préliminaires 20

2-3 Matériel 20
2-4 Préparation des échantillons 20

3- INVESTIGATIONS DE LABORATOIRE 21
3-1 Numération bactérienne 21
3-1-1 Mise au point méthodologique 21
3-1-2 Application de la méthode de coloration aux essais préliminaires 22
3-2 Mesure de l'activité bactérienne 23
3-2-1 Mode opératoire 23
3-2-2 Interprétation 24

CHAPITRE 3 : RESULTATS ET INTERPRETATION

1- ETUDE DU PERIPHYTON SUR LES MACROPHYTES 27
1-1 Techniques d'observation directe 29
1-1-1 Application de la méthode de coloration DAPI 29
1-1-2 Coloration au bleu d'aniline 29
1-1-3 Traitement au lugol 30
1-1-4 Conclusion 30
1-2 Techniques de séparation du périphyton 31
1-2-1 Traitement mécanique seul ou associé à un traitement chimique 31
1-2-2 Traitement enzymatique 33
1-3 Analyse des résultats 35

2- LES SUPPORTS ARTIFICIELS 36
2-1 Observations microscopiques du périphyton bactérien 38
2-2 Numérations bactériennes et activité 39

CONCLUSION 46

BIBLIOGRAPHIE 47

LISTE DES FIGURES ET DES PLANCHES 50

ANNEXES ..... p 1

INTRODUCTION

La gestion des eaux continentales est de plus en plus complexe et se heurte souvent à l'insuffisance des connaissances scientifiques sur la ressource en eau.

Depuis 1986, un programme pluridisciplinaire de recherche a été lancé par le Ministère de la Recherche et de L'Enseignement Supérieur sur le bassin versant de la Charente. Ce programme vise à améliorer la connaissance des transferts de polluants et nutriments (nitrates, phosphates, métaux, pesticides, ...) depuis l'amont d'un bassin versant continental jusqu'au sein du bassin maritime associé, et à étudier l'influence de ces éléments tant sur le milieu fluvial que sur le milieu maritime. Parallèlement, ce programme permet la mise au point de méthodes de caractérisation de la qualité des eaux ainsi que l'évaluation objective de l'impact de toute activité humaine (rejets ponctuels et diffus, prélèvements d'eau, gestion de barrage) sur le comportement des milieux naturels (régime et qualité des eaux).
Le but de ce programme est d'obtenir des connaissances et des données suffisantes pouvant être adaptées par le biais de la modélisation à d'autres bassins versants en France et en Europe.
La partie maritime de ces travaux a été confiée à IFREMER, le volet continental revenant au CEMAGREF.
Une première étude du bassin versant a été réalisée en 1989. Elle a permis :

- de quantifier les prélèvements d'eau pour l'irrigation des surfaces cultivées (régime des eaux) ainsi que les divers rejets industriels, urbains et agricoles.
- de caractériser du point de vue biologique et chimique les différents cours d'eau charentais.
- d'étudier le rôle des sédiments dans la mobilité des nutriments.
- de proposer une modélisation des effets de l'agriculture sur la qualité des eaux de bassin.

La présente étude, effectuée au laboratoire de microbiologie de la Division Qualité des Eaux, s'inscrit dans le programme de recherche du "Pôle Végétal" (CEMAGREF de Bordeaux). Elle concerne l'étude du biofilm, association complexe de bactéries, d'algues, de protozoaires et divers invertébrés inféodés, recouvrant tout substrat immergé. Plus globalement appelé périphyton, ce complexe biologique présente, en raison de sa capacité auto-épuratoire, une incidence déterminante sur la qualité des eaux des milieux aquatiques. Il joue un rôle important dans la consommation et le transfert de la matière organique et des nutriments.
Ainsi, dans le cadre de la gestion intégrée d'un bassin versant, la connaissance de l'intensité des processus biologiques dans la dégradation de la matière organique et le transfert des substances chimiques sera primordiale.

Cette étude s'applique plus précisément au compartiment bactérien développé sur les végétaux aquatiques. Les macrophytes, en plus de leur capacité propre d'assimilation et de relargage de nutriments, offrent un important support au périphyton. Les bactéries ainsi fixées ont une activité métabolique accrue. Pour réaliser numérations et tests sur cette microflore, il s'agit d'isoler celle-ci de son support vivant. Deux voies sont envisageables :

- la mise au point d'une technique de décrochage du biofilm qui ne lèse ni les organismes, ni le végétal.
- la substitution des supports naturels (macrophytes) par des supports artificiels. A condition que leurs colonisations soient comparables de manière qualitative et quantitative, la récupération du biofilm sera aisée.

Les actions engagées comportent des investigations de terrain conduites entre mai et août 1994 au niveau de deux stations du fleuve Charente, situées en amont et en aval des rejets de l'agglomération d'Angoulême. Les travaux menés en laboratoire faisant intervenir essentiellement des observations microscopiques (numérations cellulaires, mesures d'activité) définiront l'évolution de la microflore bactérienne sur ces deux sites et permettront donc d'estimer l'impact des divers rejets sur la qualité des eaux du fleuve.

CHAPITRE 1

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

En 1983, Wetzel définit le périphyton comme étant "l'ensemble de tous les organismes vivant à la surface des objets immergés dans l'eau".
Ce périphyton occupe une place importante dans les méthodes de détermination de la qualité des eaux qu'il s'agisse de la diversité spécifique des communautés ou bien du taux de croissance directement lié aux conditions physico-chimiques du milieu. L'abondante littérature sur ce sujet fait apparaître que de nombreux auteurs ont mis en oeuvre différentes techniques et protocoles expérimentaux.
Cette synthèse bibliographique présente les principales méthodes permettant l'étude du compartiment bactérien du périphyton : quantification des peuplements, activité métabolique, mesure de production. Il sera ultérieurement abordé les moyens mis en oeuvres *in situ* (bioessais) et les diverses applications des méthodes, utilisés pour caractériser le développement des communautés photoautotrophes et hétérotrophes libres ou liées aux substrats et par suite, la qualité des eaux.

1- ESTIMATION DIRECTE DE L'IMPORTANCE DES PEUPLEMENTS BACTERIENS DANS LES MILIEUX AQUATIQUES

Durant ces dernières années, des méthodes diversifiées se sont développées telles la microscopie à épifluorescence, l'analyse d'image ou le cytomètre de flux. Elles permettent de compter et mesurer les abondances et biomasses bactériennes.

1-1 Numérations

La quantification des populations ou des peuplements peut être obtenue par simple dénombrement. Ainsi, la numération directe au microscope est sans doute le moyen le plus simple d'observer et de compter les particules fines. Cette méthode reste cependant limitée par la taille des organismes (pouvoir de résolution du microscope optique $\geq 0,3$ µm) et la difficulté à apprécier par la seule observation, leur viabilité.
Un progrès considérable a été accompli avec l'utilisation de la fluorescence émise par les particules vivantes.

Cette fluorescence, si elle n'est pas naturelle (autofluorescence due à des molécules contenues dans les cellules elles-mêmes), sera alors provoquée par des colorants capables de fluorescer et de se fixer sélectivement sur des molécules constitutives des cellules (fluorescence induite).

l L'observation des bactéries de petite dimension a été facilité par l'emploi de fluorochromes. Ces colorants se fixent sur les molécules d'acides nucléiques puis, excités par la lumière U-V, émettent de la fluorescence.

=> L'acridine orange (A.O) se fixe sur l'ADN et sur l'ARN. Excitée en lumière bleue (450-490 nm), la liaison A.O.-DNA fluoresce en vert et la liaison A.O.-RNA en rouge-orangé ou jaune. Cependant, elle ne permet pas la distinction entre bactéries et particules inertes (colloïdes, argiles, détritus...).

=> 4-6 diamino-2-phénylindole (DAPI) plus sélectif, se fixe sur les ADN. Le complexe ADN-DAPI excité en U.V fluoresce en bleu vif (longueur d'onde 365 nm).

1-2 Biovolumes

– calculés à partir des dimensions linéaires. L'étude microscopique des organismes permet de mesurer leurs dimensions. Par suite, le biovolume pourra être déterminé par assimilation à des combinaisons de volume géométrique simple (Kovala et Larrance, 1966). Toutefois, une correction des mesures sera nécessaire, l'organisme ayant plus ou moins subi des contractions durant les traitements qui ont précédé l'observation.
Avec L la longueur de la cellule et l sa largeur, $V = \pi/4.l^2(L-l/3)$.

– estimés à partir des surfaces projetées.
L'examen optique de chaque particule détermine de manière approchée le volume à partir de la surface considérée. Quelques inconvénients sont à prendre en compte : la contraction des organismes due au traitement subi et leur éventuelle juxtaposition (ou même superposition) sont les causes d'une estimation par défaut.

De plus, cette méthode n'est pas valable pour des cellules de trop petites dimensions. Afin de l'améliorer, des systèmes d'acquisitions de mesures et de traitement d'images ont pu être associés (Furaya, 1982, Estep, 1986).
En 1985, Sieracki, Johnson et Sieburth introduisent le système couplé microscopie à épifluorescence associé à un analyseur d'image. Ce système digitalise l'image vidéo de la fluorescence naturelle ou induite

des cellules dans le champ microscopique. L'image digitalisée peut alors être stockée, éditée et analysée afin de quantifier le peuplement ou bien mesurer la taille de cellules individualisées et autres paramètres de forme. Certaines options (histogrammes...) permettent l'estimation du biovolume et de la biomasse bactérienne.

Avec S aire de la section et P périmètre cellulaire, $V= 8,5.S^{2,5}.P^{-2}$.

2- VIABILITE ET ACTIVITE METABOLIQUE DES MICROORGANISMES

2-1 Mise en évidence de la viabilité par coloration vitale ou non vitale

Certains composés colorés comme le bleu de méthylène ou le violet d'améthyste ne peuvent pénétrer dans les cellules que lorsque la membrane est détruite, soit à la mort de l'organisme. D'autres au contraire, franchissent la membrane des cellules vivantes. Tel en est le cas du diacétate et dibutyrate de fluoresceine qui sont absorbés par de nombreuses bactéries hétérotrophes Gram + durant leur croissance. Le composé absorbé activement est ensuite hydrolysé à l'intérieur du cytoplasme et la fluorescence ainsi démasquée sera détectée en épifluorescence.

Cette méthode peut paraître aléatoire dans la mesure où la présence ou l'absence de coloration dans une cellule est fonction de son activité métabolique.

2-2 Accumulation de l'*int* - formazan dans les cellules

Cette méthode s'appuie sur le principe de l'accumulation d'un composé dans les cellules directement liée à l'activité respiratoire. En effet, tous les organismes présentent des systèmes de transports électroniques respiratoires ("Electron Transport System" = ETS). On utilise ainsi un excès de substrat nécessaire au fonctionnement enzymatique et un accepteur d'électron qui, ajouté à l'extrait cellulaire permettra la mesure du potentiel maximum de transport électronique d'un échantillon.

Le chlorure de 2-(p-iodophényl)-3-p(nitrophényl)-5 phényl tétrazolium ou INT est utilisé comme révélateur d'activité respiratoire cellulaire. Il est réduit sous l'action des ETS en INT-formazan.

L'INT-formazan obtenu se présente sous la forme de cristaux intracellulaires opaques ou rouges. La présence de ces cristaux révèle donc des cellules physiologiquement actives (Tabor et Neihof, 1982).

La présence d'INT-formazan peut être davantage matérialisée par l'application de vert malachite qui améliore le contraste avec le cytoplasme (Dutton, Bitton, Koopman, 1986).

2-3 Microautoradiographie

Le principe de cette méthode s'appuie sur l'absorption par les cellules de composés nécessaires au métabolisme. Ces composés seront préalablement marqués avec des éléments radioactifs émetteurs de rayonnement. Au contact d'une émulsion sensible contenant des sels d'argent, les cellules enrichies en produits radioactifs produisent un noircissement. L'autoradiographie permet de distinguer le type trophique des organismes. Ainsi, on utilisera du bicarbonate marqué au ^{14}C pour différencier les bactéries autotrophes des bactéries hétérotrophes qui elles, peuvent être caractérisées par l'absorption de composés organiques simples (glucose ou acides aminés) marqués au ^{3}H ou au ^{14}C.

Cette méthode a été amélioré en associant à l'autoradiographie la détection par fluorescence en microscopie (Douglas, 1984).

L'adjonction d'un traitement d'image permet d'évaluer la plus ou moins grande activité des organismes d'un même groupe trophique en considérant simultanément d'autres paramètres (taille, forme, pigments...).

3- MESURE DE LA PRODUCTION BACTERIENNE

La méthode repose sur le marquage d'une molécule nécessaire à la croissance par un élément repérable. Un isotope (stable ou radioactif) est utilisé comme marqueur. Aprés un temps d'incubation déterminé qui a permis l'assimilation des molécules marquées, la quantité retenue dans la biomasse microbienne est alors mesurée.

Afin de fiabiliser cette méthode, il convient de choisir une molécule ayant accés au milieu intra- cellulaire et qui, une fois associée à l'isotope, ne modifie pas le métabolisme de l'organisme. De plus, la prise du substrat tout au long de l'incubation doit rester faible comparée à la quantité totale de substrat initialement disponible.

Plusieurs types de mesures peuvent être effectuées :

- des mesures de potentiels peuvent être déterminées si la concentration de substrat marqué ajoutée au milieu est trés supèrieure à la concentration naturelle du substrat (initialement présent). Ce type de mesure permet d'évaluer l'optimum d'activité (ainsi que la quantité d'enzymes bactériennes impliquées dans l'utilisation du substrat).

- pour la mesure d'activités réelles, on choisira une concentration en substrat marqué trés nettement inférieure à la concentration naturelle. La méthode des substrats marqués est plus difficilement applicable aux organismes hétérotrophes. En effet, les microorganismes dans leurs milieux naturels consomment des molécules différentes (glucose,acides aminés...). Ainsi les mesures basées sur la consommation d'un seul substrat, ne reflètent donc pas la prise réelle totale des substrats *in situ.*

Afin d'obtenir des mesures plus représentatives, il est nécessaire de prendre en compte la part de produit marqué perdue par respiration ou excrétion (part importante si l'incubation est longue).
On établit le rapport isotope fixé / isotope fixé+isotope libéré hors cellule.

Servais et Lavandier ont appliqué simultanément deux méthodes dans diverses eaux douces naturelles, afin de mesurer la production des bactéries hétérotrophes :

- l'incorporation de ^{3}H-thymidine dans les macromolécules (synthèse de l'ADN).
- l'incorporation de ^{3}H-leucine dans les proteines.

Les taux d'incorporation des deux isotopes ainsi obtenus ont permis d'observer une corrélation significative entre les méthodes et obtenir des résultats de production bactérienne concordants (bien que deux aspects différents du métabolisme bactérien -synthèse d'ADN et synthèse de proteines - aient été mesurés).

De nombreuses études basées sur l'utilisation de substrats marqués ont été réalisées durant ces dernières années. Le tableau ci après présente quelques résultats : il s'agit de différentes productions bactériennes exprimées en terme de flux de carbone (Figure 1).

Il est possible de suivre de manière satisfaisante le devenir d'atomes de carbone marqués liés à des molécules de sucre consommées par un hétérotrophe : ces atomes de carbone peuvent être libérés sous forme de CO_2 (respiration) ou de molécules organiques ou, au contraire, fixés dans les molécules constitutives de la cellule et donc contribuer directement à la croissance.
Kirchman et Mitchell ont quantifié l'abondance et la prise de substrat des bactéries hétérotrophes sur les particules en suspension dans différents marais par l'utilisation de [^{14}C]glucose et [^{14}C]glutamate. Cette méthode leur a aussi permis de mettre en évidence une prise par cellule significativement plus élevée chez les bactéries épiphytes par rapport aux bactéries libres.

Figure 1 : Production bactérienne exprimée en µg C/ l.h.

MILIEUX	METHODES	PROD. BACT.	REFERENCES
Lacs Bagsvaerd	Leucine^3 H Valine^3 H Thymidine^3 H	9,4 8,0 4,6	Jogensen 1992
La Seine	Thy^{3}H ou Leu^{3}H	2-27	Servais -Garnier 1993
La Meuse	Thymidine^{3}H	2,3-3,9	Servais -Billen 1989
Site ombragé Site ouvert	Thymidine^{3}H Thymidine^{3}H	1,3-4,6 8,2-51	Hudson 1990

4- APPLICATION DES METHODES A DEUX ETUDES PARTICULIERES

4-1 Evolution de la microflore bactérienne dans les eaux de rivière. Mesure de l'impact des rejets urbains

L'impact des rejets d'effluents urbains et industriels sur les eaux d'une rivière peut être abordé par l'étude de sa microflore bactérienne hétérotrophe. Garnier et Servais (1989) ont étudié, en utilisant des profils d'incorporation de thymidine et de leucine tritiées, l'abondance et la biomasse bactérienne des eaux de la Seine en différentes stations en aval de Paris recevant notament les effluent urbains de Acheres (centre de traitement des eaux usées).

Ils ont constaté une augmentation de l'abondance et de la biomasse bactérienne à proximité des rejets suivie d'une rapide diminution en aval. Cette population allochtone est majoritairement constituée de cellules de grande taille qui croissent trois fois plus rapidement que les cellules de taille inférieure (biovolume moyen 0,2 μm^3). Leur taux de disparition est plus important, les pertes pouvant s'expliquer par une sédimentation importante, broutages...

Des études plus récentes réalisées sur la rivière Charente (Torre, Rebillard, 1992) renseignent sur les caractéristiques de la microflore bactérienne sur un secteur subissant les

rejets de l'agglomération d'Angoulême. Les cellules observées ont été comptées et mesurées par la méthode DAPI-INT. Les dénombrements obtenus sont les suivants :

Volume cellulaire individuel (en μm^3)	0,014	0,065	0,124	0,164	0,262	0,268	0,360	0,369	0,524	0,620
Nombre de cellules										
Angoulême	50	16	15	20		10		4	8	3
Rejets : o km										
3 km	24	68	30	42		42	2	2	46	6
16 km	24	40	16	36	2	28	6		12	
30 km	23	50	27	10		27		2	6	

Evolution de la microflore bactérienne :

	Nombre de cellules * 10^6 /ml	% cellules actives
Angoulême	1,29	36
Rejets : 0 km		
3 km	9,53	60
16 km	1,56	30
30 km	1,70	25

Cette étude d'une durée de huit mois met en évidence les modifications spatio-temporelles des numérations et de l'activité bactérienne, les populations des rejets d'effluents urbains (cellules de grande taille) se mêlant à une microflore autochtone.

4-2 Dynamique de croissance du périphyton sur support artificiel

Des expériences destinées à définir la dynamique de colonisation des substrat artificiels par le périphyton ont été conduites en 1983 par Watanabe et Capblanc, sur des points situés à l'amont et à l'aval de rejets de stations d'épuration en rivière (effluents domestiques et industriels). Elles ont permis de mettre en évidence que la colonisation initiale des substrats est due aux communautés hétérotrophes, celles-ci représentant plus de 70% de poids de matière organique à l'issue de la première semaine d'immersion. Leur biomasse atteint un maximun aprés 15 jours d'immersion des substrats. Le développement algal étant plus lent, les

communautés autotrophes n'atteindront leur phase d'équilibre qu'aprés 4 à 5 semaines d'immersion.

L'influence des rejets sur l'évolution des communautés photoautotrophes et hétérotrophes a été démontrée en comparant les stations situées à l'amont et à l'aval.

L'activité métabolique des communautés présente des variations avec l'age du périphyton fixé sur les substrats et avec les conditions du milieu. Ainsi, la consommation d'oxygène par unité de surface colonisée est plus intense pendant les deux premières semaines, puis décroît avec l'age du biofilm. En liaison avec un développement plus important des hétérotrophes, l'influence des rejets se traduit par une forte augmentation de la consommation d'oxygène dans la station aval.

Des travaux antécédents réalisés sur le bactérioplancton par Hobbie & Wright en 1965 et sur le périphyton par Capblancq & Cassan en 1979 ont montré que les cinétiques d'assimilation de molécules organiques obéissent à une loi de réaction enzymatique. Celle-ci est décrite par l'équation de Michaelis-Menten dont les paramètres (Vmax, ks) permettent de caractériser le potentiel hétérotrophe d'une communauté de microorganismes. Les mesures ont été réalisées avec des solutions de glucose marqué au 14C à des concentrations comprises entre 3 et 25 mg/l. Aprés assimilation et dégradation du glucose, le $^{14}CO_2$ rejeté a été capturé par de la hyamine. Le taux maximal d'assimilation du glucose (Vmax) obtenu, passe par un maximun correspondant à des communautés âgées de 10 à 15 jours. Il décroît ensuite avec l'age du biofilm, l'augmentation de la couche de périphyton et de la biomasse non active diminuant l'activité par unité de surface colonisée et ralentissant la diffusion du glucose (ceci se traduit par une augmentation du paramètre ks qui représente par définition la concentration du substrat entrainant la demi saturation du système enzymatique).

Les données de Capblancq & Cassan (1979) puis de Watanabe (1988) ont montré que la cinétique de développement du périphyton sur les supports artificiels suit un modèle général.
Les paramètres de ce modèle sont : l'activité métabolique, le taux de croissance et le rapport de biomasse des organismes autotrophes et hétérotrophes. Pendant la phase exponentielle, ces paramètres dépendent des conditions physico-chimiques du milieu. Au cours de la phase de saturation, la complexité de la communauté augmente et les processus de régulation interne deviennent peu à peu plus importants que les échanges avec le milieu aquatique ambiant.
La biomasse totale atteint sa phase d'équilibre vers la quatrième ou cinquième semaine d'immersion. Pour les hétérotrophes seuls, les valeurs maximales sont obtenues entre 15 et 20 jours d'immersion des substrats. Ceci peut être justifié par les processus de perte de biomasse par mortalité et décrochage beaucoup plus importants chez les hétérotrophes, fait auquel s'ajoute un effet inhibiteur du développement bactérien causé par les algues.

L'activité métabolique du biofilm périphytique, mesurée par la consommation d'oxygène, la photosynthèse et l'assimilation hétérotrophe de glucose marqué baisse en fonction du temps d'immersion. Elle est fonction de la densité du biofilm fixé sur les substrats,

celle-ci réglant les mécanismes de transport des substances organiques dissoutes et les échanges gazeux au sein de la biomasse.

L'ensemble des résultats obtenus ont ainsi révélé que les conditions du milieu agissent plus directement sur les paramètres de croissance et de métabolisme du biofilm pendant les phases initiales de colonisation du substrat (conclusion moins évidente pour une communauté à l'équilibre). **Les conditions optimales pour les bioessais *in situ* correspondent donc à des périodes d'immersion des substrats artificiels inférieures à deux semaines.**

5- ETUDE DU PERIPHYTON

Le *biofilm* peut être défini comme étant une association de micro organismes constituée majoritairement par les algues, les bactéries, les protozoaires et se développant aux interfaces (air/eau, eau /solide). Ordinairement, le terme *benthos* est employé pour définir l'ensemble des organismes vivant à l'interface liquide-solide (Haeckel, 1891) sans aucune distinction de taille. Pour le benthos microscopique, des termes plus précis ont été définis par Warming (1923) afin de distinguer deux type d'association :

- l'*haptobenthos*, appelé aussi *périphyton*, se développe sur les surfaces solides de toutes natures. On y distingue alors l'*épilithon* colonisant les surfaces solides et l'*épiphyton* vivant à la surface de végétaux.
- l'*herpobenthos* qualifie les organismes se développant sur ou dans la boue.

Ainsi, selon la nature du substrat colonisé, l'étude du périphyton peut être abordée de différentes façons. L'abondante littérature sur ce sujet permet de distinguer deux voies :

- les travaux basés sur l'étude du périphyton colonisateur de supports artificiels.
- les travaux effectués directement à partir des substrats naturels.

Différentes méthodes sont utilisées pour l'obtention d'un biofilm qui sera, aprés croissance, examiné en place ou récupéré pour observation et mesures (dénombrements, activité...).

5-1 Utilisation de supports artificiels

Les expériences menées par Capblancq et Cassan (1983) et destinées à définir la dynamique de colonisation des supports artificiels par le périphyton, ont été effectuées à l'aide de feuilles de polyéthylène fixées sur des supports en PVC. Aprés un temps défini d'immersion, le support artificiel est ramené au laboratoire immergé dans de l'eau du milieu puis raclé ou bien conservé intact pour une observation directe au microscope.

Wardell (1988) tente de répertorier les différentes méthodes d'étude des bactéries liées. La plus simple d'entre elles utilise des surfaces de verre qui, aprés colonisation, sont nettoyées à l'aide d'un tissu stérile ultèrieurement agité dans un diluant approprié. Le diluant recueilli entre lame et lamelle sera alors soumis au comptage.

Les méthodes d'extraction du périphyton furent ensuite améliorées, les modalités d'adhésion des microorganismes au substrat ayant été prises en compte. Dés 1970, Corpe puis Costerton (1973) et Fletcher (1973) ont tenté de mettre au point des méthodes permettant d'agir sur les polysaccharides extracellulaires responsables des processus d'attachement entre cellules et substrat solide. Les mécanismes régissant l'adhésion des bactéries au support sont depuis les travaux de Van Loosdrecht (1990) bien connus. Sur une surface vierge, l'adhésion initiale est un processus physico-chimique réversible qui fait intervenir diverses interactions électrostatiques. Les bactéries, une fois déposées, produisent des structures particulières : fibrilles et polymères (polysaccharides) formant des liens solides entre organismes et support.

Afin de détacher le périphyton des lames de verre, Allison et Sutherland (1987) mettent au point le traitement suivant : la surface colonisée est trempée dans du chlorure de cetyl pyridinium (10mM) puis séchée à l'air. Ce procédé précipite les polysaccharides et fixe les cellules. L'échantillon est ensuite soumis à une solution de rouge congo mélangée à du tween 80 (10%). Avec précaution les organismes sont retirés du support à l'aide de carbol fuchsine dilué (10%).

En 1986, les travaux conduits par O'Neill Morin comparent la colonisation initiale du périphyton sur des apex de *Myriophyllum heterophyllumn* naturels et artificiels. Il en résulte que la composition des communautés ne diffère pas significativement entre les deux types de substrats. L'abondance est toutefois plus élevée sur les substrats naturels. *Myriophyllum* apparait donc comme un support neutre en terme de composition de communautés mais a un effet sur le nombre total d'organismes.

5-2 Les substrats naturels

5-2-1 Observation directe

Elle nécessite la décoloration du végétal et la coloration des micro organismes avant observation en lumière transmise.

Carter (1982) examine l'assemblage du périphyton sur deux macrophytes immergés (*Nuphar luteum, Panicum repens)* et deux espèces emmergées (*Ceratophyllum demersum, Hydrilla verticillata)* . Les segments de plantes ont été soumis à une décoloration par une solution de javel à 10 % (agent actif : hypochlorite de sodium 5,25%) puis transférés dans une solution de Lugol à 2% . L'échantillon monté entre lame et lamelle, est observé directement au

microscope. Selon l'espèce considérée, on distingue différents temps d'immersion pour les différentes solutions :

	Javel 10%	Lugol 2%
Hydrilla	3 à 4 min	10 à 15 sec
Ceratophyllum	4 à 6 min	10 à 20 sec
Nuphar	2 à 3 min	20 à 30 sec
Panicum	5 à 6 min	20 à 30 sec

Baker (1988) utilise pour une observation directe le bleu d'aniline phénolique (phenol 3,75 g ; aniline bleue soluble 0,05g ; acide acétique 20% v/v 100 ml) sans fixer le matèriel. Toutefois, certaines plantes trop pigmentées comme *Glyceria* doivent être décolorées au méthanol ou au chloroforme avant traitement au bleu d'aniline (plante + méthanol placés à l'obscurité).

5-2-2 Techniques de séparation du biofilm

Certains auteurs et notamment Delbecque (1985), ont préféré mettre au point des techniques de séparation permettant d'isoler le périphyton de son substrat d'origine.

=> Méthodes mécaniques.

L'agitation mécanique simple a été la première méthode utilisée pour isoler les communautés épiphytiques (Cattaneo et Kalff, 1978; Foerster et Schlichting, 1965). En 1971, Hickman choisit de pulvériser ses substrats colonisés à l'aide de jets d'eau, récupérant le biofilm aprés un léger balayage. Plus tard, il utilisera la sonication (1974). En 1976, Gough et Woelkerling utilisent l'hydrolyse acide mais, comme pour les techniques précédentes, la totalité de l'épiphyton ne peut être séparée.

=> Méthode chimique

Cette méthode est basée sur l'hydrolyse acide des mucopolysaccharides des micro organismes qui permettent l'adhésion au substrat. Elle n'est applicable que lorsque la cellule présente une grande résistance. Afin de rendre la méthode plus exploitable, des solutions moins agressives ont été utilisées, combinées à des techniques de séparation mécaniques. Un mélange

formaldéhyde-acide acétique-alcool associé à une agitation manuelle n'a pas donné de résultat satisfaisant.

=> Méthode enzymatique

L'utilisation de cellulases, pectinases, zymolases, mutanases et hélicases à différentes dilutions n'a pas permi d'isoler correctement le périphyton malgré une exposition prolongée des feuilles de macrophytes.

Perceval (1979) utilise pour tenter d'isoler le périphyton une propriété de l'EDTA (Ethylènediaminetétracétate) qui est de former des complexes stables avec le borate, le sulfate et le calcium, principaux facteurs de l'adhésivité mucilagineuse des micro-organismes aux substrats.

Delbecque utilise l'EDTA à différentes concentrations et divers pH. Les résultats les plus satisfaisants ont été obhtenu pour un PH de 4,7 et une concentration comprise entre 75 et 125mmol.l^{-1}. Selon Meyers et Quinn (1971), l'action de l'EDTA à des pH supérieurs à 7 est inhibée par la présence de couches organiques, cette matière organique étant déstabilisée à un pH de 4,7.
Cette manipulation, tout comme les précédentes, ne donne pas entièrement satisfaction.

En 1981, Booth propose une méthode de séparation originale permettant d'isoler les diatomées épiphytiques. Les cellules algales sont soumises à un traitement enzymatique (actinidine et pepsine, enzymes extraites du kiwi). Cette méthode ayant été utilisée pour l'étude du périphyton du fleuve Charente, sera décrite ultérieurement.

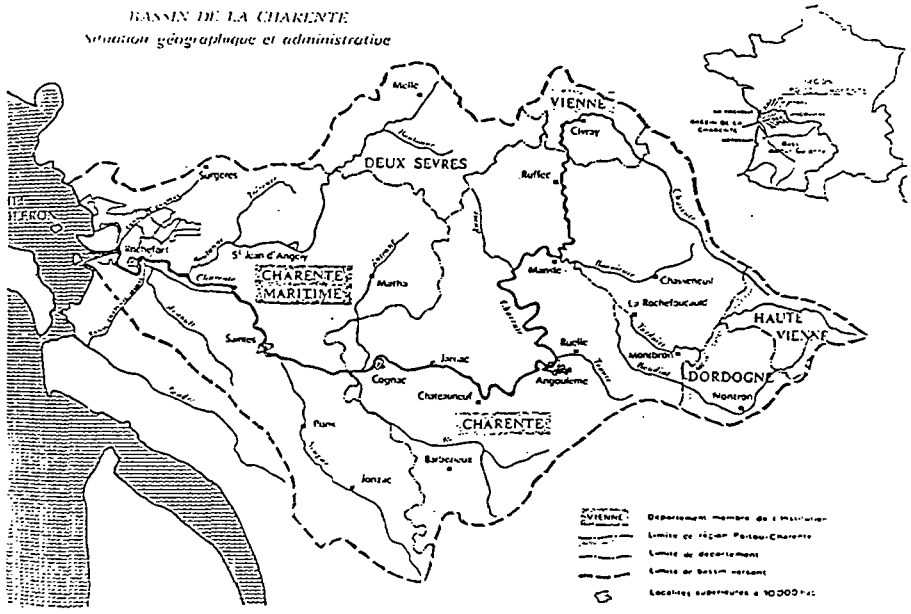
CHAPITRE 2

MATERIEL ET METHODES

1- PRESENTATION DU SITE D'ÉTUDE : LE FLEUVE CHARENTE

1-1 Caractérisation générale du fleuve

La Charente est un fleuve côtier de 350 km de longueur drainant un bassin versant d'une superficie voisine de 10000 km^2 et débouchant dans la baie de Marennes-Oléron. Sa pente générale est faible et son régime fortement variable selon les saisons. Les écoulements sont conditionnés par un climat océanique.



Le bassin versant est à forte dominante rurale, la surface agricole représentant près de 75 % de la superficie totale et la densité de population n'étant que de 60 habitants au km^2. On ne note que cinq villes de plus de 10 000 habitants, la plus notable étant l'agglomération d'Angoulême, qui avec ses 87 000 habitants regroupe une bonne part des industries du bassin.

1-2 Choix des sites d'étude

Sur l'ensemble du bassin versant se répartissent des rejets ponctuels dus aux activités industrielles et urbaines. Le tableau qui suit permet de comparer les valeurs des rejets d'origine

industrielle et urbaine pour la totalité du bassin à celles obtenues dans la proximité d'Angoulême (Figure 2).

Figure 2 : Rejets d'origines domestique et industrielle de l'agglomération d'Angoulême.

	Bassin versant			Agglomération d'Angoulême		
Rejets (en tonnes/jour)	industriels	urbains	total	industriels	urbains	total
Azote (N Kjeldahl)	2,8	1,5	4,3	1,41	0,39	1,8
Phosphore (P total)	0,28	0,63	0,91	0,07	0,12	0,19
Matière organique	21	4,6	25,6	2,58	0,84	3,42

(CEMAGREF, 1991)

On peut ainsi constater que l'agglomération d'Angoulême seule est responsable de la moitié des rejets d'azote d'origine industrielle (produits chimiques) et totaux sur le bassin versant. Les rejets phosphatés représentent environ 20 % du rejet total sur le bassin.
Ainsi, les divers rejets de l'agglomération d'Angoulême peuvent provoquer un impact notable sur l'environnement.

Chalonne, premier site d'échantillonage, se situe 5 km en amont d'Angoulême. Nersac est la seconde station positionnée 3 km en aval des rejets. Entre ces deux sites, trois stations d'épuration déversent leurs effluents (Frégeneuil, Saint Michel, Gond Pontouvre) auxquels s'ajoutent ceux en provenance des diverses industries (papeteries, chimie, alimentaire).

Des travaux antérieurs portant sur la microflore bactérienne ont été réalisés sur des échantillons d'eau prélevés en ces mêmes stations (Torre, Rebillard 1992). Les prélèvements ont été effectués toutes les trois semaines durant huit mois sur un tronçon de 40 km de rivière. Les divers comptages et mesures d'activité ont montré une évolution particulière de la biomasse bactérienne en aval des rejets de l'agglomération d'Angoulême : l'augmentation de la taille des cellules constatée à la station de Nersac qui semble être due au rejet, la proportion de cellules actives plus importante sur le site de Nersac qu'ailleurs, l'augmentation du nombre de micro organismes.

Les mesures effectuées de mai à août 1994 sur le périphyton bactérien ont été réalisées de façon analogue en amont et en aval immédiat (Nersac) des rejets d'Angoulême afin d'en estimer l'impact.

1-3 Orientation

Ce travail comporte deux parties :

- l'étude du périphyton obtenu à partir de supports artificiels immergés. Des manipulations préliminaires ont permis de sélectionner la nature du support autorisant la meilleure colonisation et de déterminer un temps d'immersion convenable.

- l'étude directe sur le périphyton recueilli sur les macrophytes (végétaux aquatiques).
Cette seconde partie s'est révélée être plus délicate : de nombreuses méthodes ont été élaborées puis testées afin d'étudier le biofilm soit isolé de son support soit en observation directe sur le végétal.

Une comparaison des deux parties permettra de dire si l'outil "substrat artificiel" est satisfaisant et s'il peut se substituer aux supports naturels pour l'examen et l'étude des bactéries fixées et de leur relation avec la qualité du milieu.

2- CAMPAGNES DE TERRAIN

2-1 Planification des campagnes

Les investigations de terrain ont été menées toutes les deux semaines durant quatre mois (de mai à août) au niveau de chaque station :

- mise en place les supports artificiels vierges aptes à accueillir les micro organismes périphytiques.

- prélèvement des surfaces immergées quinze jours plus tard.

Le temps d'immersion a été déterminé d'aprés les travaux de Watanabe, Capblancq et Dauta (1988) sur la dynamique de croissance du périphyton sur les supports artificiels. La

colonisation initiale des surfaces est due aux communautés hétérotrophes (bactériennes) qui représentent plus de 75 % du poids de matières organiques à l'issue de la première semaine d'immersion, leur biomasse atteignant un maximum après 10 à 15 jours d'immersion.

2-2 Essais préliminaires

Des supports artificiels de diverses natures et disposés à différentes profondeurs, ont été immergés durant une quinzaine de jours en étang afin de pouvoir déterminer lequel d'entre eux permettrait la meilleure colonisation. Ces surfaces ont ensuite été raclées de façon à récupérer la totalité du biofilm. Ce dernier (mélangé à l'eau du milieu préalablement filtrée) est recueilli dans un flacon stérile. On obtient ainsi un flacon pour chaque type de substrat et pour chaque profondeur. On rapportera ensuite les comptages effectués sur le volume recueilli, à la surface colonisée.

En ce qui concerne l'efficacité des supports testés, ces essais ont permis d'aboutir à la conclusion suivante : après immersion et observation des quatre surfaces de natures différentes, PVC, polyéthylène, verre et faïence, le polyéthylène a été choisi comme support pour les campagnes ultérieures sur le fleuve Charente.

2-3 Matériel

Les dispositifs utilisés sont composés de supports de polyéthylène se présentant sous forme de petites feuilles transparentes de surface bien définie (10 x 10 cm^2) disposées le long d'une corde. Pour chaque campagne, les supports sont disposés sur un profil vertical :
0 m (surface) - 0,30 m - 0,50 m - 0,75 m - 1m - 1,5 m.
Le dispositif est maintenu tendu entre un corps mort et une bouée de surface.

2-4 Préparation des échantillons

Aprés relevage des supports à chaque site d'étude, les feuilles de polyéthylène sont prélevées. Leurs surfaces sont raclées à l'aide de lames de verres et d'une petite brosse souple. Le biofilm est récupéré dans de l'eau du milieu stérilisée par filtration, et placé en flaconnage stérile. On obtient ainsi un échantillon pour chaque profondeur.
Pour chaque prélèvement, un sous-échantillon de 10 ml est additionné de 0,5 ml de formol stérile.

L'étude du biofilm recouvrant les macrophytes nécessite des prélèvements de végétaux aquatiques réalisés sur place, conditionnés et fixés.

L'ensemble des échantillons fixés est conservé à 4° et acheminé au laboratoire où il sera traité.

3- INVESTIGATIONS DE LABORATOIRE

Deux méthodes de dénombrement et de mesure d'activité bactérienne ont été retenues pour l'examen du biofilm recouvrant les supports artificiels et naturels. Ces derniers posant des problèmes d'exploitation, il a été nécessaire de développer une technique de séparation du biofilm qui sera présentée avec les résultats.

3-1 Numération bactérienne

3-1-1 Mise au point méthodologique

Un protocole de coloration par la méthode DAPI en microscopie à épifluorescence, associé à une lecture des préparations par caméra et vidéo-imprimante permet le dénombrement des cellules bactériennes. Ce comptage direct des micro-organismes requiert l'emploi de fluorochromes spécifiques des acides nucléiques bactériens. Le complexe colorant-cellules ainsi formé, excité en lumière de courte longueur d'onde, réémet une lumière visible dans une longueur d'onde supérieure intense. Les formes bactériennes sont ainsi mises en évidence et peuvent être comptées.

Le 4-6-diamino-2-phenylindole dihydrochlorure (DAPI) est un colorant ayant la propriété de se lier aux acides nucléiques bactériens. La liaison DAPI-ADN ainsi établie, fluoresce en bleu brillant en présence de lumière U-V (340-380 nm).
La pénétration passive du fluorochrome dans la cellule autorise l'utilisation d'échantillons fixés au formol. La coloration peut ainsi être différée.
La solution de DAPI utilisée, est dosée à 10 µg/ml.

Après sonication durant 2 minutes et agitation vigoureuse, 1 ml de l'échantillon est prélevé puis filtré sur membrane noire en polycarbonate de porosité 0,2 µm (Millipore, diamètre 25 mm). La membrane est déposée sur lame et recouverte de 0,8 ml de DAPI. Après 5 mn d'incubation à l'obscurité, la membrane est rincée à l'eau distillée (5 ml environ) puis séchée à l'air.

La membrane est coupée en quatre parties montées séparément entre lame et lamelle et deux gouttes d'huile.

Les bactéries sont comptées sur 20 champs microscopiques différents répartis sur la surface totale du filtre au grossissement 1000, avec un microscope à épifluorescence (Leitz) équipé d'une lampe à vapeur de mercure et d'une combinaison de filtres (filtre d'excitation 340-380 nm, miroir séparateur 400 nm, filtre d'arrêt 430 nm).

La connaissance du rapport entre la surface utile du filtre et celle d'un champ de comptage permet d'estimer le nombre de bactéries par unité de volume d'échantillon filtré.

Le comptage s'effectue à l'aide d'un système vidéo : la monture C de la tête triloculaire reçoit une caméra noir et blanc CCD 0.5 Lux reliée à une unité de contrôle qui permet des corrections de l'image reçue sur moniteur et transmise à une vidéo-imprimante. Le signal vidéo est traité par une carte d'acquisition montée sur micro-ordinateur Macintosh Quadra 700. L'image est ensuite stockée sur disque dur. Elle sera ensuite analysée par un logiciel d'analyse d'image (Optilab) qui effectuera, après seuillage, un comptage automatique des particules.

3-1-2 Application de la méthode de coloration aux essais préliminaires

Des numérations bactériennes en microscopie à épifluorescence aprés coloration au DAPI, ont été effectuées sur les échantillons obtenus à partir des différents substrats artificiels (P.V.C, polyéthylène, verre, faïence). Un exemple est donné ci-aprés pour un type de support sur un profil vertical :

SUPPORT ARTIFICIEL : P.V.C. (11x10 cm2)

PROFONDEUR (m)	NOMBRE DE CELLULES /cm2
surface	$1{,}10 \times 10^{8}$
0,3	$1{,}34 \times 10^{8}$
0,5	$4{,}32 \times 10^{7}$
0,75	$3{,}36 \times 10^{7}$
1	$8{,}58 \times 10^{6}$
1,5	$2{,}92 \times 10^{7}$

Calculs intermédiaires : échantillon de surface

- Surface support : 110 cm2
- Volume de l'échantillon : 120 ml
- Dilution pour filtration : 1/100

Dénombrement cellulaire sur 20 champs : 286
Nombre moyen de cellules par champs : 14,3
Nombre de champs caméra par membrane : 70500

14,3 x 70500 x 100 =1,008 x 10^8 cellules/ml d'échantillon.
soit (1,008 x 10^8 x 120) /110 =1,1 x 10^8 cellules/cm2.

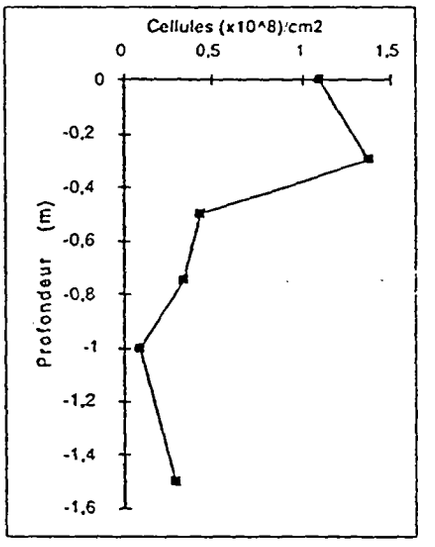


Figure 3 : Numérations bactériennes en fonction de la profondeur.

3-2 Mesure de l'activité bactérienne

L'utilisation du fluorochrome DAPI a permis de dénombrer l'ensemble des micro-organismes d'un échantillon. Parmi la totalité de ces cellules, il est possible de distinguer la fraction bactérienne active. La méthode choisie pour l'étude des eaux de la rivière Charente est basée sur l'**accumulation de l'INT-formazan dans les cellules.** La pénétration d'un sel de tétrazolium à l'intérieur des cellules met en évidence l'activité respiratoire bactérienne. En effet, l'INT traverse les parois cellulaires et intervient comme accepteur d'électrons dans les systèmes de transports électroniques respiratoires en détournant le flux de la chaîne des cytochromes de la cellule active. Ainsi, seules les cellules vivantes réduisent l'INT.

3-2-1 Mode opératoire

La solution-mère d'INT est dosée à 0,2 g/100 ml. La concentration finale est de 0,02 % soit 0,2 mg/ml d'échantillon. Cette solution se conserve à 4°C et à l'obscurité.

Sur le terrain, 1 ml d'INT est ajouté à 10 ml d'échantillon obtenu comme précédemment, par raclage des supports artificiels et récupération du biofilm mélangé à de l'eau du milieu filtrée. Une solution de cyanure de potassium est ensuite utilisée à raison de 1 ml par 10 ml d'échantillon. L'ajout de ce sel, dosée à 1,4 mg CN/l, permet d'inhiber le dernier transporteur d'électrons de la chaîne respiratoire et améliore le marquage. Le mélange obtenu est placé à l'obscurité et à température de terrain pendant une heure. Après incubation, l'échantillon est fixé au formol (0,5 ml).

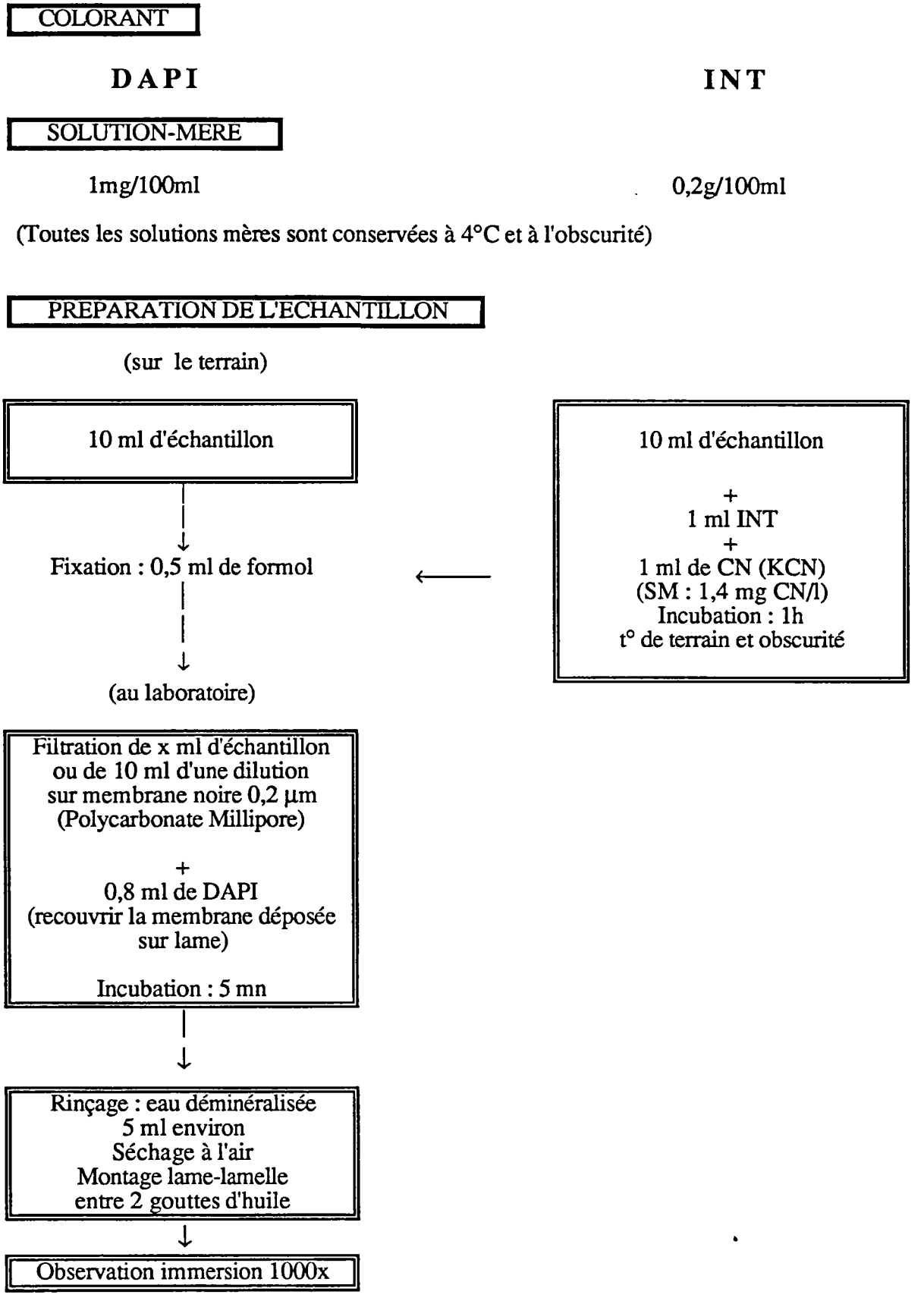
La suite du protocole opératoire est identique à celui de la coloration DAPI (figure 4).

3-2-2 Interprétation

L'INT est réduit (sous l'action des systèmes de transports électroniques respiratoires) en formazan qui se présente sous forme de cristaux rouges intracellulaires. La réduction de l'INT est donc fonction de l'intensité des processus respiratoires cellulaires.

L'examen en microscopie s'effectue en lumière transmise pour l'observation des cristaux de formazan, et en lumière réfléchie pour l'observation des cellules fluorescentes.

Figure 4 : Protocole opératoire des méthodes de coloration utilisées.



CHAPITRE 3

RESULTATS ET INTERPRETATION

La comparaison des effectifs et des activités périphytiques à l'amont et à l'aval des rejets d'Angoulême et permet une première évaluation de leur impact sur les eaux de la Charente.
Pour cela, deux issues ont été retenues :

- l'étude de périphyton sur les macrophytes.
- le remplacement des végétaux, substrats naturels, par des supports artificiels aptes à être colonisés de manière comparable, afin de s'affranchir des contraintes de prélèvement in situ et de la difficulté de récupération du biofilm.

1- ETUDE DU PERIPHYTON SUR LES MACROPHYTES

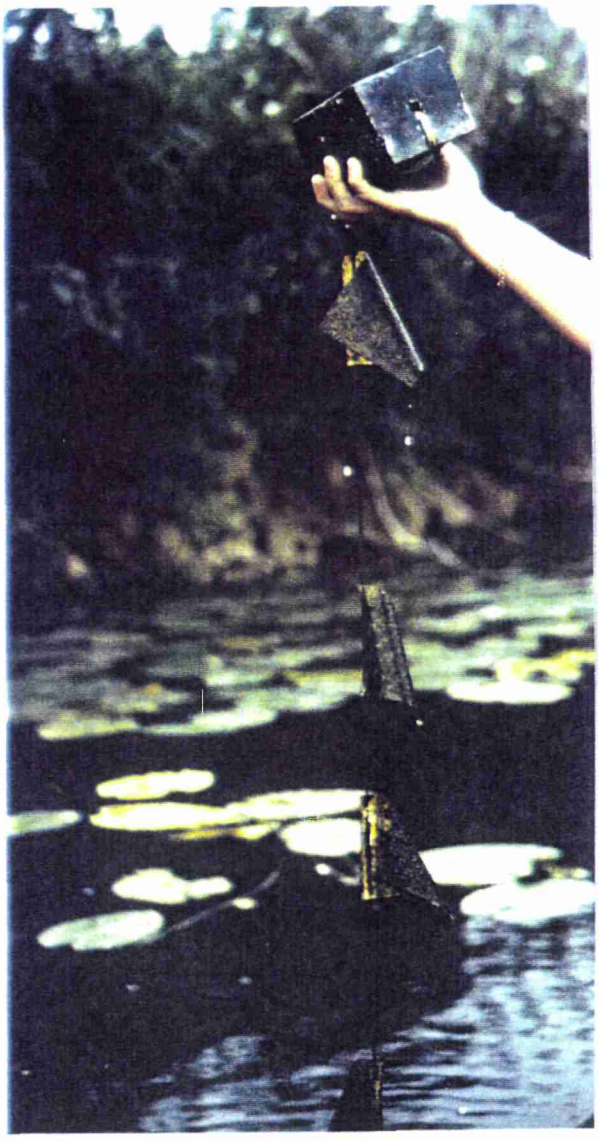
Cette partie traite des différentes approches et mises au point méthodologiques pour l'étude du biofilm associé au substrat naturel. Elle sera développée selon deux orientations:

- étude directe du périphyton sur les macrophytes.
- tentatives de séparation du biofilm pour l'étude de la fraction bactérienne isolée de son substrat.

Afin de permettre ces différents travaux effectués en laboratoire, des prélèvements de macrophytes ont été réalisés pendant les campagnes de terrain menées pour l'étude des bactéries périphytiques colonisant les supports artificiels. Les végétaux ont été prélevés lors de plongées en scaphandre. Les feuilles de macrophytes ont été délicatement détachées de l'herbier puis remontées à la surface avec la plus grande précaution afin d'éviter toute perte d'organismes. Les feuilles recueillies sont alors placées dans des flacons stériles contenant un volume défini d'eau du robinet préalablement stérilisée par filtration sur membrane de porosité de 0,22 µm. L'échantillon est fixé au formol (concentration finale de 5 %.). Maintenu à une température de 4°, il pourra être conservé plusieurs jours.

Remarque : Lors des premiers prélèvements, les macrophytes ont été placés dans de l'eau distillée. Par suite, les observations au microscope n'ont pas été satisfaisantes. En effet, l'eau distillée migrant vers des milieux plus concentrés (ici le milieu intracellulaire), entraîne la turgescence et l'éclatement des cellules végétales rendant impossible l'observation du biofilm.
Les herbiers immergés sont choisis de préférence éloignés de la berge à des profondeurs comprises entre 1,5m et 2m (ou plus). Les prélèvements ont été effectués dans des herbiers de nénuphar jaune *(Nuphar lutea)* et de potamot *(Potamogeton fluitans)*, deux espèces caractéristiques des eaux eutrophes.

Feuille de polyéthylène colonisée.



Substrats artificiels en place
sur dispositif flottant.

Feuille de macrophyte colonisée (*Nuphar lutea*).

PLANCHE 1 : SUBSTRATS NATURELS ET ARTIFICIELS.

1-1 Techniques d'observation directe

1-1-1 Application de la méthode de coloration DAPI

Le protocole de coloration par la méthode DAPI en microscopie à épifluorescence a été directement appliqué aux surfaces végétales. A partir des feuilles recueillies, des fragments de petites dimensions (1 cm^2 environ) ont été découpés puis déposés sur lame. Après addition de fluorochrome DAPI, l'ensemble est incubé durant cinq minutes à l'obscurité. Le tout est ensuite rincé à l'eau stérile puis recouvert d'une lamelle. L'observation en immersion est ensuite possible (1000x). L'application de cette méthode sur des échantillons provenant des deux stations, a permis d'aboutir aux conclusions suivantes :

- la coloration DAPI ne permet pas de numération bactérienne lorsque les populations périphytiques sont trop denses. Des comptages peuvent être réalisés sur des échantillons prélevés à Chalonne (station en amont d'Angoulême), la densité de micro organismes étant nettement moins élevée par rapport aux échantillons provenant de Nersac (station aval) pour lesquels aucune numération n'a pu être effectuée.

- dans des eaux très turbides, les surfaces immergées peuvent être recouvertes de fines particules d'origine minérale ou végétale (argiles, substances humiques...) . Dans ce cas , tout comptage devient impossible, les particules agglomérées au biofilm masquant la fluorescence des bactéries.

Ainsi, la méthode de coloration DAPI en microscopie à épifluorescence appliquée aux substrats naturels ne permet pas l'observation satisfaisante des échantillons.

1-1-2 Coloration au bleu d'aniline

Le bleu d'aniline phénolique fut utilisé dés 1936 par Maneval pour la coloration d'algues et de champignons . Cette coloration sera ensuite appliquée aux bactéries fixées aux macrophytes aquatiques par Hossell et Baker en 1979 .

Le bleu d'aniline phénolique (phénol 3.75 g, aniline bleue soluble 0.05 g, acide acétique 20 % v/v 100ml) permet donc de colorer les bactéries épiphytiques pour l'observation directe au microscope en lumière transmise. La surface du macrophyte est recouvert de deux à trois gouttes de colorant puis disposée entre lame et lamelle. Le comptage au microscope peut être effectué immédiatement.

Cette coloration est plus satisfaisante que la précédente dans la mesure où les diverses particules agglomérées en plus ou moins grande quantité sur les substrats ne gênent pas l'observation. Les chaînes bactériennes ainsi que les cellules isolées de petites tailles se distinguent correctement. Malgré tout, les numérations cellulaires ne sont toujours pas

réalisables lorsque les populations périphytiques sont trop denses, ce qui est le cas des échantillons prélevés à la station de Nersac.

Remarque : Certaines espèces de macrophytes ont des feuilles trop pigmentées; La lumière transmise est alors insuffisante pour l'observation des cellules.

1-1-3 Traitement au lugol

Cette méthode décrite par Carter (1982), consiste dans un premier temps, à décolorer des fragments de macrophytes en les plongeant dans une solution à 10 % de chlorox (eau de javel). L'échantillon est ensuite transféré dans une solution de Lugol à 2% puis disposé entre lame et lamelle pour l'observation en immersion.

L'agent décolorant utilisé pour les macrophytes de la Charente est un extrait d'eau de javel à 48°, dilué afin d'obtenir la concentration appropriée.

Note : La dilution a été déterminée après la conversion suivante :

équivalence degré chloro. français = (grammes de Cl_2 / l) x 1,12

=> 48° / 1,12 = 42,86 g Cl_2 / l

Des feuilles de nénuphar jaune ont été immergées dans l'eau de javel diluée puis dans du lugol, selon les temps d'immersion indiqués dans la littérature:

	Eau de Javel 10%	Lugol 2%
Nuphar lutea	2 à 3 min	20 à 30 sec

Après ce traitement , l'échantillon disposé entre lame et lamelle est observé en immersion.

Cette technique n'a pas permis de distinguer nettement les cellules bactériennes. Les numérations directes sur macrophytes n'ont pu être réalisées.

1-1-4 Conclusion

Ces trois techniques d'observation directe du périphyton sur substrat naturel n'ont pas permis d'obtenir des dénombrements cellulaires corrects. En effet, l'observation et la numération bactérienne sont impossibles dans le cas d'échantillons trop chargés en microflore. Pour obtenir des peuplements moins denses, il faut pouvoir travailler sur des dilutions. Ceci n'est réalisable que si les micro-organismes sont mis en solution à l'aide de méthodes qui permettraient d'isoler le périphyton. Il s'agit donc maintenant de mettre au point des techniques

de séparation entre biofilm et surfaces colonisées. Suivant cette orientation, de nombreuses investigations ont été menées en laboratoire et sont présentées dans la partie suivante.

La coloration au bleu d'aniline a été retenue pour la suite des manipulations. Elle sera utilisée après chaque technique afin d'en vérifier l'efficacité. Elle servira à mettre en évidence la fraction de micro-organismes non décrochés du substrat, et à évaluer le degré de contamination de certaines substances employées comme agent de séparation du périphyton.

1-2 Techniques de séparation du périphyton

Différentes techniques de séparation ont été testées sur les macrophytes de la Charente. Les trois premières reposent sur des actions mécaniques et chimiques et la quatrième sur une action enzymatique.

1-2-1 Traitement mécanique seul ou associé à un traitement chimique.

a) A partir d'un prélèvement de macrophyte (Nénuphar) effectué à la station de Chalonne, trois fragments de feuille sont mis respectivement dans trois tubes à essai contenant de l'eau du robinet stérilisée par filtration. Le premier est traité au pyrophosphate de sodium selon la méthode utilisée par Maurice (1993) : ce produit favoriserait le détachement du biofilm. Le second est soumis à une sonication de 125 watts pendant 2 minutes. Le troisième sert de témoin.

Chaque échantillon est ensuite coloré au DAPI. Les comptages sont effectués sur microscope à épifluorescence couplé à un système vidéo. Les images acquises sont ensuite analysées par "Optilab" (logiciel d'analyse d'image). Outre les numérations bactériennes, ce même système permet de déterminer très précisément les surfaces de feuilles. L'obtention de ces mesures est nécessaire afin d'exprimer les dénombrements bactériens en fonction d'une surface élémentaire (nombre de cellules par cm^2).

Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 5.

Figure 5 : Dénombrement des bactéries du biofilm après traitement du végétal.

TECHNIQUES	COMPTAGES (Nombre moyen de cellules par champ)	SURFACE ECHANTILLONS (cm^2)	NOMBRES DE CELLULES PAR CM^2
Incubation de l'échantillon de feuille en présence de **pyrophosphate de sodium** 0,002 M pendant 20 mn.	45,5	60, 9	$1,02.10^6$
Echantillon soumis aux **ultrasons** 125 W pendant 2 mn.	58,1	31,3	$1,3.10^6$
Sans traitement	72,1	60,8	$1,62.10^6$

Les résultats présentés ci-dessus révèlent les points suivants :

- les ultrasons ont une action plus efficace que le pyrophosphate.
- toutefois, la fraction de périphyton décrochée de substrat apparaît comme étant relativement faible. Ces méthodes ne sont donc pas satifaisantes.

b) D'autres techniques ont été mises en oeuvre impliquant de nouveaux agents de séparation. Pour une meilleure efficacité , certaines ont même été couplées. La centrifugation utilisée comme unique traitement n'est pas performante. Elle sera alors exploitée, associée à un autre agent de séparation, l'EDTA. Afin d'optimiser la séparation, le traitement à l'EDTA est complété par une centrifugation pendant une durée déterminée. Quatre échantillons de macrophytes sont préparés comme précédemment. Les différentes observations qui découlent des traitements appliqués sont présentées dans la figure 6. Les comptages ont été impossibles à réaliser du fait d'une colonisation encore trop importante.

Figure 6 : Observations des bactéries du biofilm aprés traitement mécanique et chimique du végétal.

TECHNIQUES	OBSERVATIONS
Centrifugation pendant 40 mn à 4000 tours/mn.	Peu de micro-organismes ont été isolés du substrat.
Agitation au Vortex (1 heure)	Insuffisant.
Incubation en présence d'EDTA 100 mmol.l^{-1} (15 ml pour 40 ml d'eau)	Les micro-organismes maintenus sur le substrat sont moins nombreux. Ils se disposent en amas sur les contours de la cellule végétale, au niveau des parois squelettiques, formant des amas indénombrables.
Incubation en présence d'EDTA + Centrifugation 1 heure à 4000 t/mn	Une fraction encore trop importante de bactéries se maintient fixée au substrat.

Note : Tout produit utilisé comme agent de séparation (EDTA, Pyrophosphate) doit être stérilisé avant emploi. Cette stérilisation s'opère à l'aide d'une seringue à embout filtreur (type Sartorius 0,45 µm).

Les différentes méthodes chimiques et physiques citées précédemment n'ont pas abouti à des résultats satisfaisants : trop peu d'organismes périphytiques sont dissociés des substrats.

1-2-2 Traitement enzymatique

D'autres techniques basées sur l'utilisation de matériel enzymatique ont été proposées, notamment par Booth (1981) et Delbecque (1985). Leurs travaux ont abouti aux conclusions suivantes : l'emploi de cellulases et pectinases ne permet pas d'extraire correctement le périphyton. Toutefois, Booth a mis au point une méthode de séparation originale permettant d'isoler les diatomées épiphytiques. L'actinidine (enzyme du kiwi) a permis l'extraction des cellules algales. Il parait donc intéressant de vérifier l'efficacité de cet agent sur la fraction bactérienne du périphyton colonisant les macrophytes de la Charente.

Cette enzyme n'étant pas commercialisée, un extrait obtenu à partir de kiwi frais *(Actinidia chinensis)* doit être préparé. Les fruits pelés sont mixés puis centrifugés à 4000 tours/mn durant 30 minutes. Le surnageant est récupéré et conservé à 4°. Comme tout agent de

séparation, le liquide recueilli est stérilisé afin de ne pas fausser les comptages . Le choix du mode de stérilisation est délicat. En effet, le procédé employé ne doit pas dénaturer les enzymes. Une stérilisation à haute température ne peut donc être envisagée. Trois procédés ont été testés; Ils sont décrits et critiqués dans la figure 7. La coloration au bleu d'aniline permet de vérifier l'efficacité de la stérilisation. Une à deux gouttes de colorant sont versées sur l'extrait de kiwi déposé sur une lame de verre. Le tout est recouvert d'une lamelle puis observé en immersion au microscope.

Figure 7 : Techniques de stérilisation de l'extrait de kiwi.

TECHNIQUES	OBSERVATIONS
Tyndallisation : trois passages de 20 mn à 60° espacés de 24 h.	N'a pas suffit à éliminer toutes les bactéries.
Filtration sur membrane de porosité 0,45 µ.	La membrane est très rapidement colmatée. (liquide très épais) Malgré des dilutions progressives, l'extrait ne peut pas être filtré.
Centrifugation 1 h à 6000 tours/mn	Technique satisfaisante malgré la persistance d'une faible contamination bactérienne. Par sécurité, l'extrait de kiwi sera tyndallisé avant centrifugation.

L'extrait de kiwi est prêt à l'emploi. Son utilisation ne doit pas excéder une semaine, des essais montrent que le liquide perd ses propriétés en vieillissant.
L'échantillon de macrophyte est placé dans un tube à essai. L'extrait de kiwi est ajouté. L'ensemble est agité au vortex pendant une heure.

Deux fragments de feuille sont ensuite découpés stérilement, puis étalés sur lame de manière à pouvoir observer les deux faces de la feuille. Après coloration au bleu d'aniline, les lames sont examinées au microscope afin d'énumérer les cellules non décrochées. L'extrait de kiwi, est soumis à la coloration DAPI puis observé en microscopie à épifluorescence (évaluation de la contamination bactérienne introduite lors du traitement), de même que l'eau du flacon ayant contenu le prélèvement de feuille de macrophyte (prise en compte des cellules du biofilm détachées lors du transport).

La numération bactérienne finale est obtenue par addition des différents comptages rapportés soit aux surfaces soit aux volumes de liquide utilisés.

[Numération directe sur la feuille + Comptage des cellules récupérées dans l'extrait de kiwi + Comptage des cellules dans l'eau du flacon de transport]	-	Contamination *	=	Nombre total de cellules par cm^2 de feuille.

* numération effectuée sur extrait de kiwi avant utilisation.

1-3 Analyse des résultats

Les numérations effectuées sur des macrophytes prélevés sur les stations de Chalonne et Nersac sont présentées dans la figure 8.
Ces résultats ont pour but de vérifier si les supports artificiels sont colonisés de la même manière que les macrophytes et constituent donc un outil convenable pour l'étude du périphyton.

Le prélèvement provenant de Chalonne a été effectué sur des herbiers de *Nuphar lutea* implantés à 1 m de profondeur. Le comptage réalisé sur support artificiel à la même période et pour la même profondeur a donné un nombre total de cellules 25 fois plus important que celui des macrophytes.

Figure 8 : Comparaison des numérations totales des cellules sur substrat naturel et artificiel.

STATIONS	NOMBRE TOTAL DE CELLULES PAR CM^2 DE MACROPHYTE	NOMBRE TOTAL DE CELLULES PAR CM^2 DE SUPPORT ARTIFICIEL
Chalonne	$1,62.10^6$	$4,25.10^7$
Nersac : Nénuphar jeune	$5,25.10^7$	-
adulte	$6,43.10^8$	$4,9.10^8$

Les numérations réalisées sur les échantillons de macrophytes prélevés à Nersac comparées à celles obtenues à partir des surfaces de polyéthylène montrent une colonisation quasi identique.
Cela semble indiquer que l'outil "support artificiel pourrait se substituer dans ce cas au macrophytes.
Au contraire, la différence observée à Chalonne fait apparaître les supports artificiels comme une meilleure surface d'accueil comparé aux végétaux.

On ne peut à ce stade, conclure sur la représentativité des supports artificiels. La mise au point de la technique de récupération du biofilm ayant été longue, peu de résultats sont disponibles pour évaluer l'efficacité de tels substrats. La poursuite de ces travaux sera nécessaire dans le but de multiplier les données.

Un point reste cependant à souligner. Il concerne l'activité macrophytique qui, ici, n'est pas prise en compte. Contrairement à un support inerte, le végétal aquatique participe aux échanges avec le milieu et avec son périphyton.
Une surface inerte a une capacité d'accueil de biofilm presque uniquement controlée par un éventuel relargage de substances toxiques ou inhibitrices pour les micro organismes. Un macrophyte a des besoins propres en nutriments. A une période donnée, par exemple en pleine phase de croissance, il doit empêcher ou du moins limiter l'implantation du biofilm en concurrençant la microflore algale et bactérienne pour les sources d'azote et de carbone.

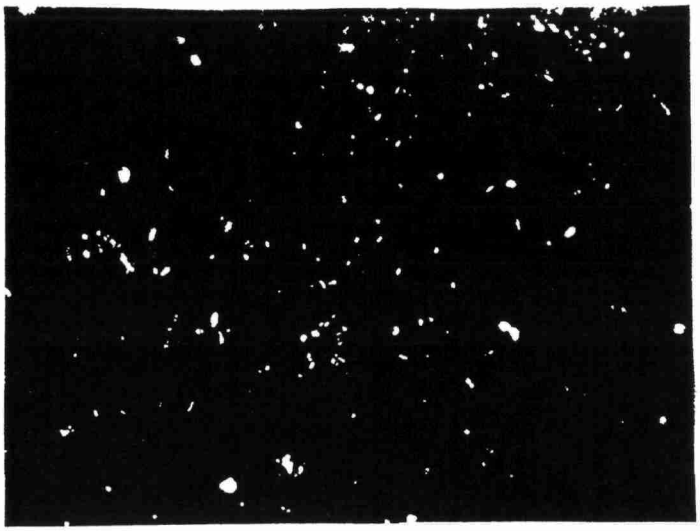
2- LES SUPPORTS ARTIFICIELS

2-1 Observations microscopiques du périphyton bactérien

L'observation qualitative des échantillons représentant les deux stations de référence est réalisée par la méthode de coloration DAPI-INT en microscopie à épifluorescence, associée à une lecture des préparations sur caméra-vidéo imprimante. Les clichés (planches 2 et 3) illustrent les divers types de communautés rencontrés et permettent de constater les faits suivants :

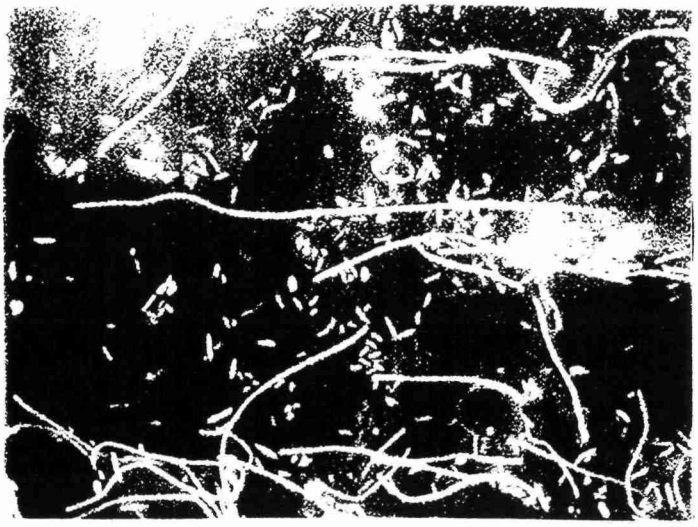
=> Une nette **différence de densité** est observable entre les populations issues de chaque station. Les substrats relevés à Chalonne sont moins colonisés.

=> **Les bactéries disposées en chaîne ne se retrouvent qu'à la station de Nersac.** De longues chaînes s'enchevêtrées sont entourées de nombreuses bactéries isolées qui viennent s'agglomérer. Cette disposition des cellules constitue une difficulté pour la réalisation



Chalonne

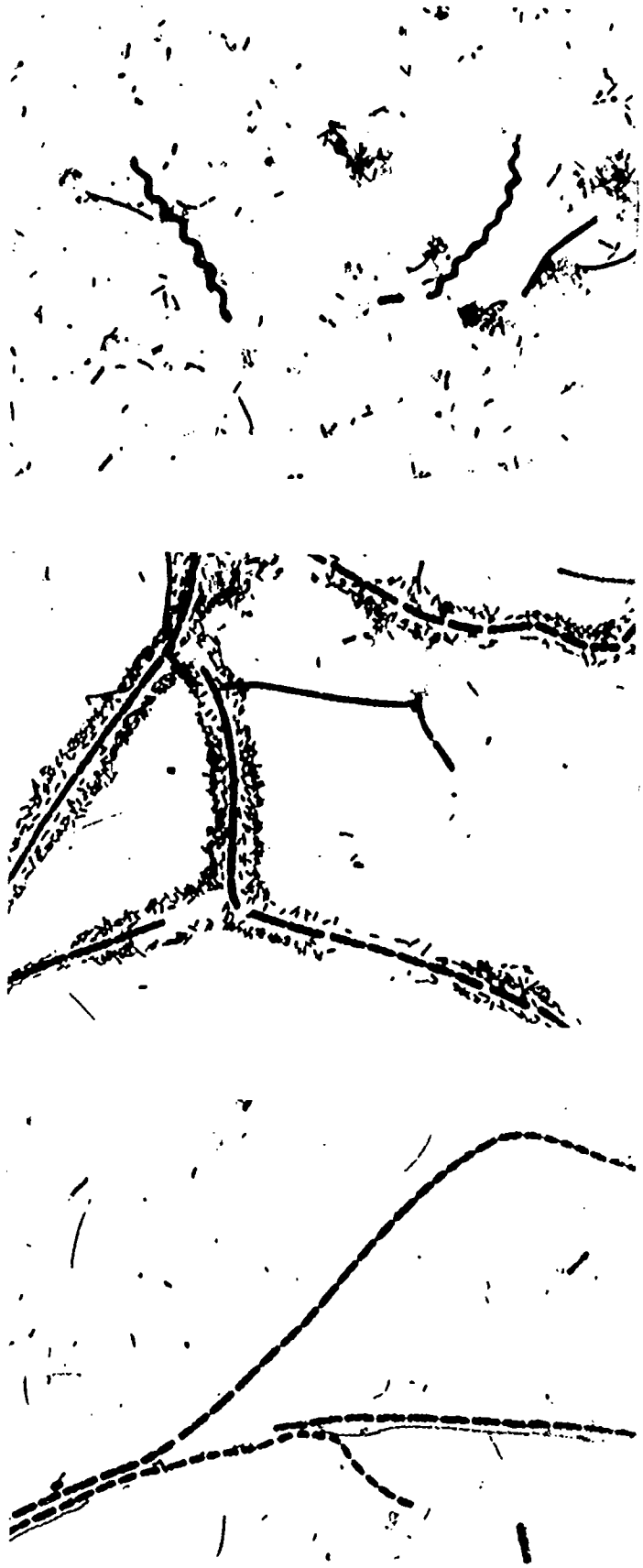
Nersac



Nersac

(grossissement x1000)

PLANCHE 2 : EXAMENS MICROSCOPIQUES DU PERIPHYTON COLORE PAR LA METHODE DAPI.



(grossissement x1000)

PLANCHE 3 : EXAMEN MICROSCOPIQUE DU BIOFILM BACTERIEN COLORE PAR LA METHODE DAPI - STATION DE NERSAC.

des comptages. Les contours cellulaires des bactéries placées bout à bout sont très mal discernés par le logiciel sur lequel sont effectués les numérations (obtention de dénombrements par défaut parfois très éloignés du nombre réel d'organismes). Un traitement de l'image est dans ce cas rendu indispensable afin d'améliorer le comptage.

=> De nombreuses cellules de grande taille sont présentes sur les échantillons provenant de la station de Nersac. De même, Servais et Garnier (1990) mettent en évidence, à l'aval immédiat des rejets urbains d'Achères dans la Seine, des bactéries dont le biovolume est trois fois plus élevé que celui observé en amont du secteur étudié. Sur la Charente, Torre et Rebillard (1992) constatent une augmentation du volume cellulaire moyen dans les échantillons d'eau prélevés à Nersac semblant être due aux rejets d'effluents.
=> Bien que les supports aient été volontairement placés en position verticale afin d'éviter les dépôts passifs et par sédimentation, des quantités plus ou moins grandes de particules en suspension d'origine minérale ou végétale, se sont déposées sur les surfaces. Dans les cas de colonisation trés abondante, une dilution au 1/1000 est effectuée pour permettre une lecture correcte de l'échantillon.
Cette quantité élevée de matériel aggloméré est attribué au piégeage de matières en suspension dans le réseau de filaments et de fibrilles de polysaccharides (d'origine bactérien) qui se développe sur le substrat

2-2 Numérations bactériennes et activité

Ces mesures sont réalisées sur les micro organismes du biofilm isolé des supports. Les résultats obtenus sont représentés sur les graphiques, illustrant les comptages effectués sur chaque station de référence lors d'une même campagne. Les dates accompagnant chaque graphe correspondent aux périodes de prélèvement, c'est à dire au terme de la période d'immersion.

Ces données fournissent les informations suivantes :

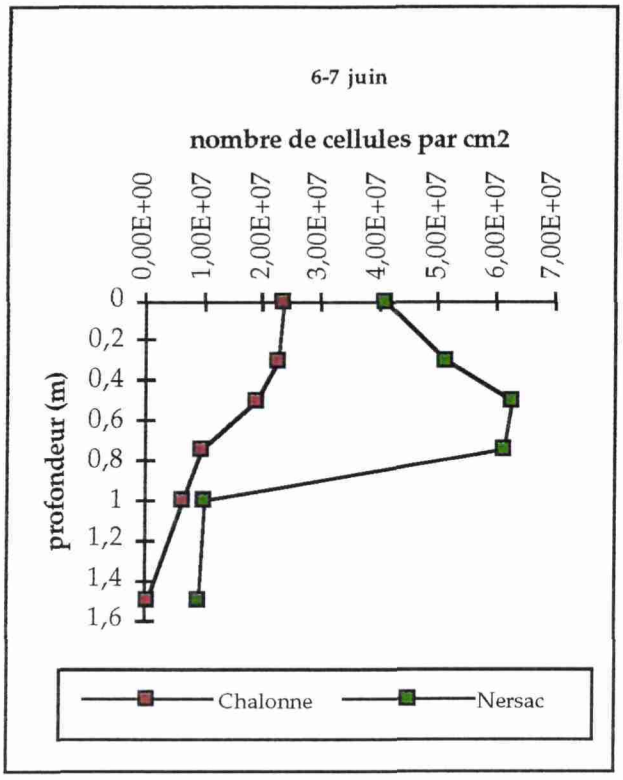
- L'influence des rejets se manifeste par des effets visibles sur les communautés bactériennes périphytiques. Ces effets apparaissent de façon évidente en comparant les stations situées à l'amont et à l'aval. Les populations périphytiques sont, pour chacune des campagnes, nettement plus denses à Nersac. Les numérations obtenues pour cette

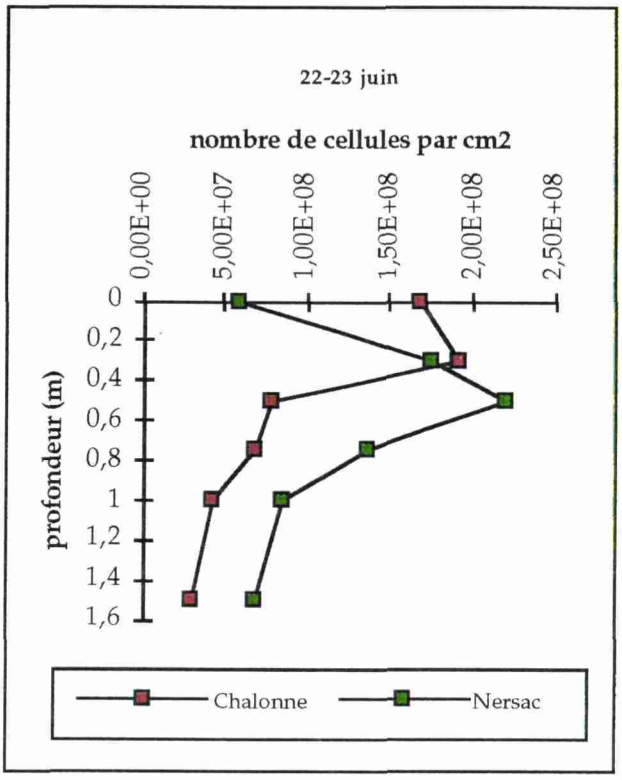
station sont de deux à quatorze fois plus importantes comparé à celles réalisées pour la station de Chalonne.
Les communautés périphytiques colonisant les supports placés à la surface et à 0,3 m de profondeur, sont exceptionnellement plus pauvres à Nersac lors de la seconde campagne (22-23 juin). Ces résultats non conformes s'expliquent par une accumulation "accidentelle" de branchages et débris végétaux divers au niveau de la bouée, empêchant une colonisation normale des supports les plus superficiels.

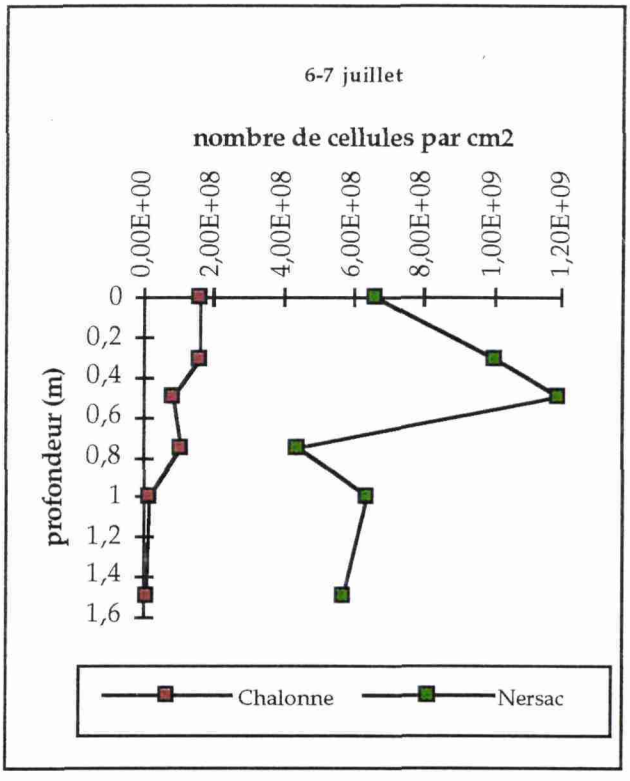
- Les courbes présentent un profil général voisin : un maximum situé entre 0,3 et 0,5 m, suivi d'une décroissance assez régulière du nombre de bactéries jusqu'à 1,5 m. Ce profil, déjà observé lors de l'essai préliminaire effectué en étang, se généralise à toutes les campagnes.
Note : L'étude de la répartition du périphyton dans la colonne d'eau est toutefois soumise à la variabilité de la profondeur en fonction du débit d'étiage. De mai à août, des variations pouvant atteindre 10 cm, ont été enregistrées sur le site. De telles fluctuations sont à prendre en considération dans la mesure où les substrats ne peuvent suivre l'évolution de la hauteur d'eau. Ainsi des supports immergés à une profondeur définie et subissant une montée des eaux ne sont pas rigoureusement représentatifs de la colonisation de ce niveau (+/- 0,1 m).

- Les mesures d'activité effectuées pour les deux dernières campagnes montrent que les micro organismes sont plus actifs à Nersac. Les pourcentages d'activité sont compris entre 20 et 35 % en aval des rejets, de 5 à 25 % à la station amont (annexe).
On remarque une hétérogénéité dans la colonne d'eau de l'activité des cellules : Les micro organismes des couches d'eau superficielles sont effectivement plus actifs, ce qui se remarque dans la tranche d'eau 0,3-0,5 m, surtout à Nersac.

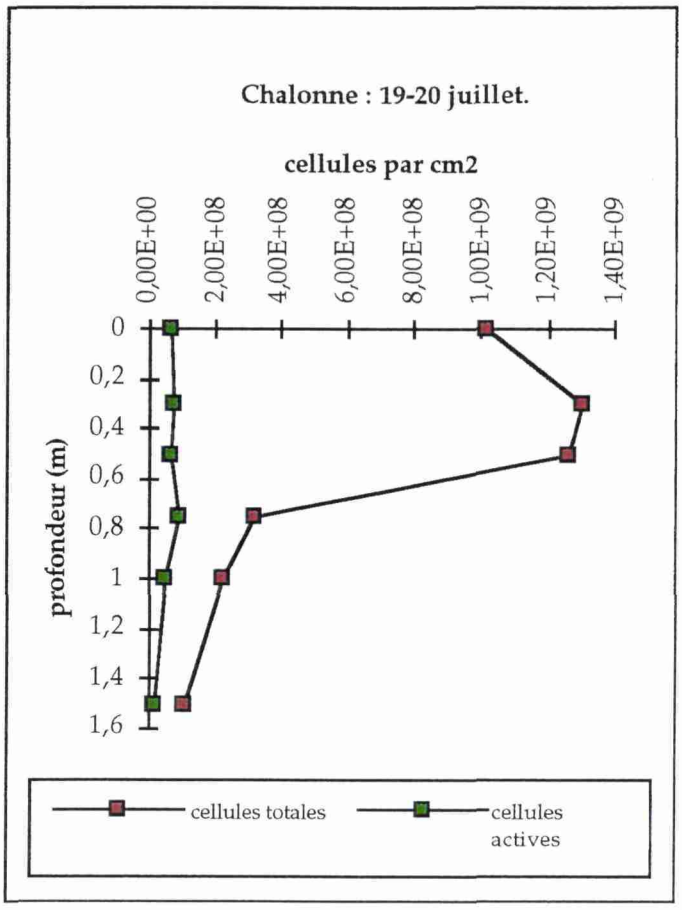
Le développement plus ou moins important des colonies périphytiques représente une réponse directe aux conditions chimiques du milieu. Les eaux du fleuve Charente, soumises aux rejets de pollutions diverses d'origine domestique ou industrielle, reçoivent des charges d'éléments nutritifs, minéraux et organiques qui favorisent la production hétérotrophe. L'influence de ces apports sur l'évolution des communautés bactériennes apparaît de façon évidente en comparant les stations situées en amont et en aval d'Angoulême.

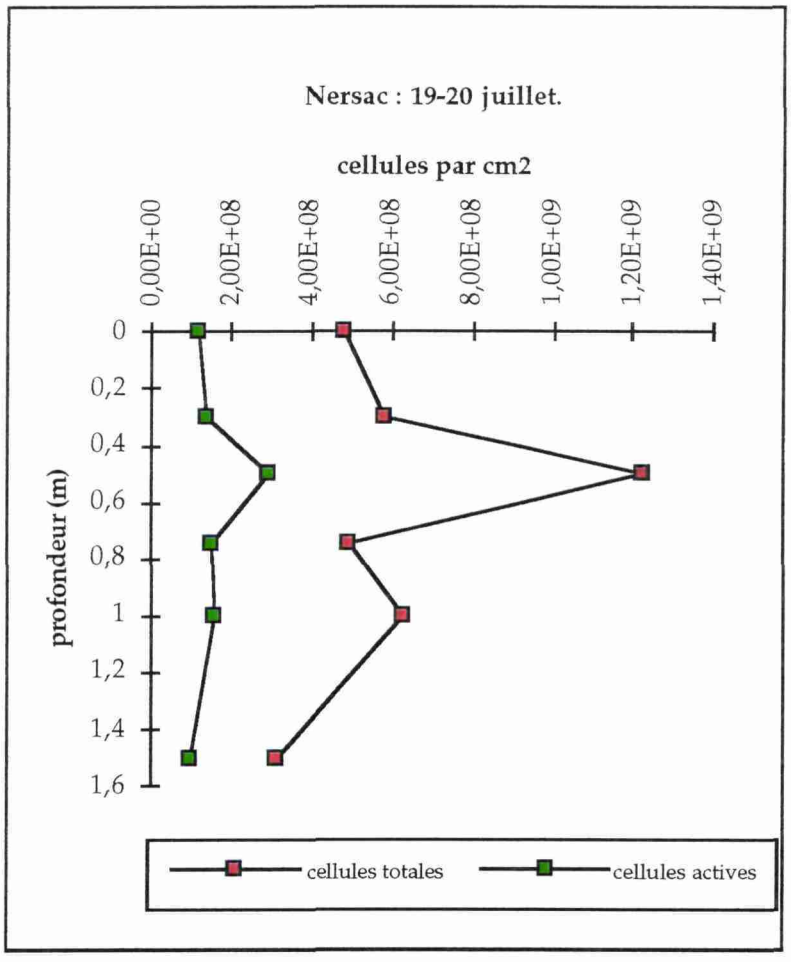


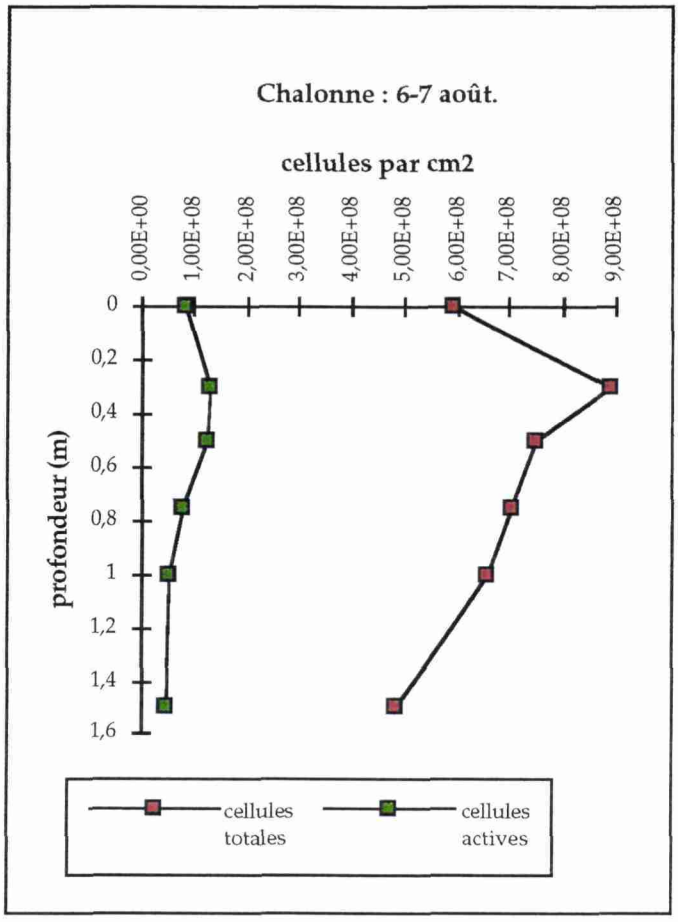


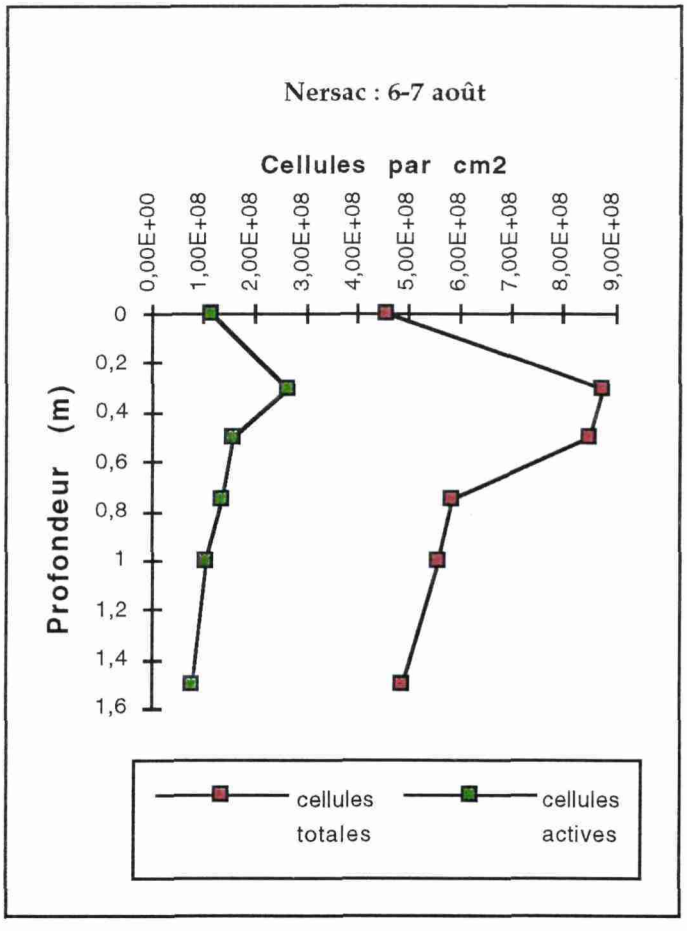


NUMERATIONS BACTERIENNES EN FONCTION DE LA PROFONDEUR


Chalonne : 19-20 juillet.
cellules par cm2
0,00E+00
2,00E+08
4,00E+08
6,00E+08
8,00E+08
1,00E+09
1,20E+09
1,40E+09
profondeur (m)
0
0,2
0,4
0,6
0,8
1
1,2
1,4
1,6
cellules totales
cellules actives


Nersac : 19-20 juillet.
cellules par cm2
0,00E+00
2,00E+08
4,00E+08
6,00E+08
8,00E+08
1,00E+09
1,20E+09
1,40E+09
profondeur (m)
0
0,2
0,4
0,6
0,8
1
1,2
1,4
1,6
cellules totales
cellules actives





NUMERATIONS BACTERIENNES ET MESURES D'ACTIVITE EN FONCTION DE LA PROFONDEUR

Outre un accroissement de la production hétérotrophe, l'augmentation du nombre de micro organismes à Nersac semblerait correspondre au mélange de deux populations bactériennes, celle du fleuve et celle des rejets (Rebillard, Torre 1992). La présence de cellules de grandes tailles à la station de Nersac suggère aussi l'existence de communautés allochtones (Servais, Garnier 1990).

Les supports artificiels ont permis de suivre la colonisation du périphyton en fonction de la profondeur. Les numérations effectuées, ont révélé une nette hétérogénéité dans la colonne d'eau en ce qui concerne la répartition des communautés périphytiques, le maximum de colonisation se situant entre 0,3 et 0,5 m de profondeur.
Cette distribution inégale des bactéries peut être interprétée de deux façons :

Les bactéries pionnières pourraient dans un premier temps se développer de façon homogène quel que soit la profondeur et croître ensuite en fonction de la production primaire, ou bien coloniser préférenciellement la zone des 0,3 / 0,5 m en raison de conditions plus favorables. C'est en effet à ce niveau que le taux d'oxygène dissous est maximum , la température et le pH plus élevé. Ces paramètres, ayant des valeurs plus faibles en profondeur, deviennent des facteurs limitants pour le développement bactérien.

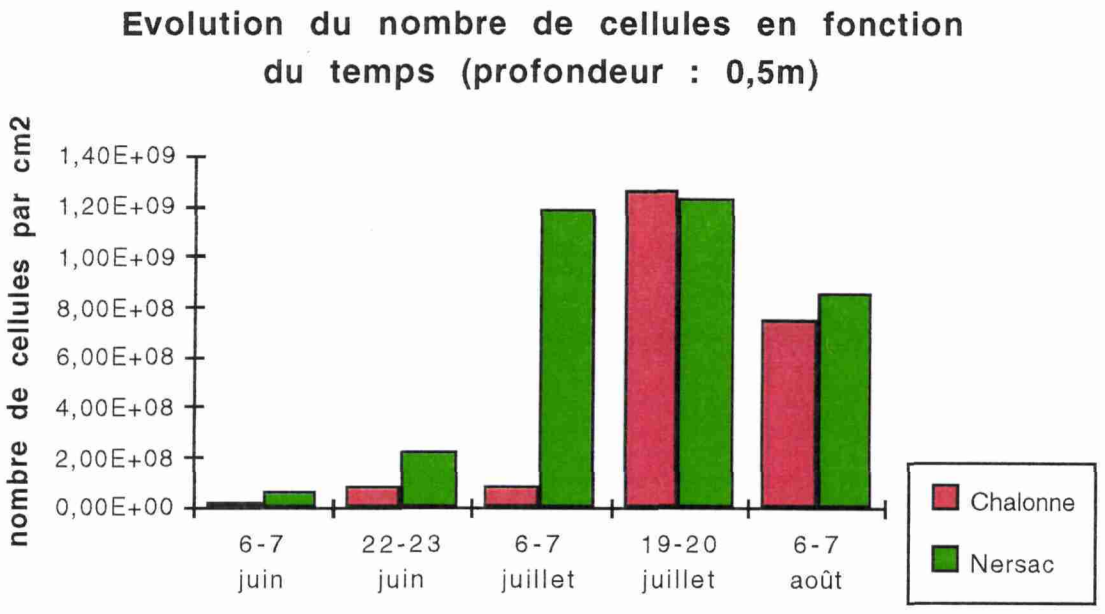
Les travaux de Capblancq et Cassan (1979) s'intéressent à la cinétique de développement des micro organismes sur les supports artificiels. Les supports vierges sont colonisés initialement par les bactéries dont le développement est lié aux conditions physicochimiques du milieu et plus particulièrement aux teneurs en matière organique de l'eau. Les algues ont un développement plus lent. A l'équilibre, les processus de régulation interne au sein du biofilm deviennent progressivement plus importants que les échanges avec le milieu aquatique ambiant. Le périphyton est alors comparable à un microcosme dont le fonctionnement résulte de l'interaction entre les processus autotrophes et hétérotrophes.

Dans le périphyton, le compartiment bactérien est associé aux cellules algales autotrophes. Ces organismes photosynthétiques constituent une source d'oxygène dissous d'une part, et d'autre part un apport en matières organiques. Ces appoints sont favorables à la croissance des cellules bactériennes hétérotrophes. Ainsi, une production primaire élevée pourrait entraîner un développement d'organismes hétérotrophes plus importants. Les travaux effectués parallèlement sur le compartiment algal du périphyton pour les même sites d'étude (Lahoun, 1994), ont montré que la production primaire était effectivement maximale dans la zone des 30 cm. Ce maximum est du aux conditions d'éclairement particulièrement favorables à ce niveau (photo-inhibition en surface, luminosité insuffisante en profondeur). Ces données semblent indiquer que la production primaire plus élevée induit un développement bactérien hétérotrophe plus important.

Les graphiques précédents montrent l'évolution de la colonisation en fonction de la qualité des eaux et de la profondeur. L'histogramme suivant se propose de quantifier les bactéries périphytiques en fonction du temps (de mai à août). La profondeur de 0,5 m est choisie comme référence sachant qu'elle correspond à un développement maximum des colonies bactériennes.

Une nette augmentation des effectifs bactériens a lieu dès le début juillet à la station aval (Nersac), alors qu'elle n'a lieu que quinze jours plus tard à la station amont (Chalonne). Les numérations sensiblement plus faibles en août sur les deux stations seraient sans doute à relier à la fermeture estivale de certaines entreprises. Cette différence entre les deux stations au mois de juillet, pourrait être due en partie à une dilution moins importante des rejets d'Angoulême liée au faible débit observé à cette période.

Figure 9.



CONCLUSION

En raison de sa contribution aux processus épuratoires, le périphyton joue un rôle déterminant sur la qualité des eaux des milieux aquatiques.

Dans l'association macrophytes-algues-bactéries dans le fleuve Charente, chaque associé a un fonctionnement (activité photosynthétique, autotrophie, hétérotrophie...) et des besoins qui lui sont propre. Lors de l'installation du biofilm, à une première phase de compétition pour les nutriments apportés par le milieu, succède une phase d'équilibre des populations à l'interface foliaire.

La caractérisation du rôle du périphyton bactérien en suivant son évolution le long d'un cours d'eau en fonction des conditions environnementales et des apports anthropiques, peut être abordé soit par l'étude in situ sur les végétaux aquatiques, soit par des examens de laboratoire après isolement.

Les difficultés techniques rencontrées pour la séparation du biofilm de son support macrophyte, ont conduit à remplacer les supports naturels par des supports artificiels. La colonisation des supports et le comportement des micro organismes vis à vis de la dégradation de matière organique doivent alors être proches de ceux observés en conditions naturelles. Dans ce cas, il est aisé d'effectuer dénombrements et mesures d'activité ou de production.
Les résultats obtenus ont amené les conclusions suivantes :

- les supports artificiels ne semblent pas, a priori, reproduire les phénomènes de colonisation des communautés périphytiques à la surface des macrophytes. Mais le manque de données ne permet pas une prise de position définitive concernant leur efficacité.

- ils constituent toutefois un outil efficace pour la comparaison entre sites. Dans le cas du fleuve Charente, l'utilisation de tels supports a permis de mettre en évidence l'effet des rejets sur l'évolution des communautés bactériennes. Les bactéries hétérotrophes, principaux agents de l'épuration biologique, dominent à la station de Nersac et leur abondance indique une forte pollution organique.

L'avantage des supports artificiels réside dans la possibilité offerte d'uniformiser les conditions de développement vis à vis des facteurs physiques (lumière, turbulence). Leur utilisation pourra être envisagée pour les études comparatives entre cours d'eau, ou bien entre deux stations d'un même réseau.

La mise au point d'une technique permettant de travailler directement à partir de macrophytes n'est pas totalement satisfaisante. Il apparaît indispensable de poursuivre l'étude du périphyton sur substrats naturels afin de déterminer précisément son rôle en relation avec celui des macrophytes dans la consommation et le transfert des substances organiques et des nutriments.

BIBLIOGRAPHIE

ALLISON D G, SUTHERLAND I W (1987) The role of exopolysaccharides in adhésion of fresh water bacteria.

BAKER J.H. (1988) Epiphytic bacteria Methods in aquatic bacteriology . Edited by B.AUSTIN . p 171-191.

BILLEN G., SERVAIS P. (1989) Modelisation des processus de dégradation bactérienne de la matière organique en milieu aquatique. Micro-organismes dans les écosystèmes océaniques. Masson. p219-245.

BONIN D.J., TRAVERS M. (1992) Examen critique des méthodes d'estimation de la biomasse et de l'activité des micro-organismes dans les systèmes aquatiques. Mar.Life. 2 (1) p1-29.

CAPBLANCQ J. , CASSAN M. (1979) Etude du périphyton d'une rivière polluée (l'Agout). Structure et développement des communautés sur substrats artificiels. Annls. Limnol. 15 (2) p193-210.

CAPBLANCQ J. , CASSAN M. (1979) Etude du périphyton d'une rivière polluée (l'Agout).Métabolisme et dynamique de croissance sur substrats artificiels. Annls. Limnol. 15 (2) p211-222.

CARTER CC (1982) A technique for direct microscopic observation of Periphyton assemblages on aquatic Macrophytes. J. Aquat. Plant. Manage. 20 p53-56.

DELBECQUE E. (1985) Periphyton on Nymphaeids : An evaluation of methods and separation techniques. Hydrobiologia 124 . p85-93.

DUTTON R.J. , BITTON G. , KOOPMAN B. (1986) Application of a direct microscopic method of the determination of active bacteria in lakes. Wat.Res. vol.20 n°11 p1461-1464.

GOCKE K., RHEINHEIMER G. (1988) Microbiol investigations in rivers. Seasonal variations of bacterial numbers and activit in eutrophied rivers of Northern Germany. Arch. Hydrobiol. 112 (2) p197-219.

HUDSON N J J (1990) Measuring epilithic bacterial production instreams. can J Fish aquat Sci p1913-1920.

JORGENSEN OG (1992) "Incorporation of H3 leucine et H3 valine into protein of freshwater Bacteria" uptake kinetics and intracellular Isotope Dilution. Appel Environ Microbiol.

KIRCHMAN D. , MITCHELL R. (1982) Contribution of particle-bound bacteria to total microheterotrophic activity in five pounds and two marshes. Applied and Environmental Microbiology. Jan.82 p200-209.

KRECKER F.H. (1939) A comparative study of the animal population of certain submerged aquatic plants. Ecology. Vol.20 n°4 p553-562.

LALONDE S. , DOWNING J.A. (1991) Epiphyton biomass is related to lake trophic status,depth, and Macrophyte architecture. Can. J. Fish. Aquat. Sci. Vol.48 p2285-2291.

LAU Y.L. , LIU D. (1993) Effect of flow rate on biofilm accumulation in open channels. Wat. Res. Vol.27 n°3 p355-360.

LETARTE Y.,.HANSEN H.J., SONDERGAARD M., PINEL ALLOUL B. (1992) Production and abundance of different bacterial size classes: relationships with primary production and chlorophyll concentration. Arch. Hydrobiol. 126.(1) p15-26.

LIU D., LAU Y.L., CHAU Y.K., PACEPAVICIUS G.J. (1993) Characterization of biofilm development on artificial substratum in natural water. Wat.Res. vol 27 n°3 p361-367

LOOSDRECHT M. LYKLEMA J. NORDE W. ZEHNDER A. (1990) Influence of interfaces on microbial activity. Microbiological Reviews Mar.1990 p 75-87

MAURICE L (1993) Modélisation du cycle de dégradation bactérienne de la matière organique. application à la zone de turbidité maximale de l'estuaire de la Gironde. Thèse INP Toulouse.

MORIN A. , CATTANEO A. (1992) Factors affecting sampling variability of freshwater periphyton and the power of periphyton studies. Can. J. Fish. Aquat. Sci. Vol.49. p1695-1703.

OGER C. , HERNANDEZ J.F. , DELATTRE J.M. , DELABROISE A.H. , KRUPSKY S. (1987) Etude par épifluorescence de l'évolution de la microflore totale dans une eau minérale embouteillée. Wat.Res. vol.21 n°4 p469-474.

O'NEILL MORIN J. (1986) Initial colonization of periphyton on natural and artificial apices of Myriophyllum heterophyllum michx. Frechwater Biology. 16 p685-694.

SERVAIS-GARNIER (1993) "Activité bactérienne hétérotrophe dans la Seine" R C Acad Sci. Paris 311 III 353-360.

REBILLARD J.P. , TORRE M. (1993) Numération bactérienne en épifluorescence par la méthode couplée DAPI-INT : application à un cas concret. Revue des sciences de l'eau . vol.6. n°2 p153-174.

RICE E.W., SCARPINO P.V., REASONER D.J., LOGSDON G.S., WILD D.K. (1991) Correlation of coliform growth response with other water quality parameters. Research and Technology. July 1991. p98-102.

SCHALLENBERG M., KALFF J. (1993) The ecology of sediment bacteria in lakes and comparisons with other aquatic ecosystems. Ecology vol.74 n°3 . p 919-934.

SIERACKI M.E. , JOHNSON P.W. , SIEBURTH J. (1985) Detection, enumeration and sizing of planktonic bacteria by image-analyzed epifluorescence microscopy. Applied and Environmental Microbiology. Apr.85 p799-810.

TABOR P.S. , NEIHOF R.A. (1982) *I*mproved method for determination of respiring individual micro-organisms in natural waters. Applied and Environmental Microbiology. June 82. p1249-1255.

VILES C.L. , SIERACKIS M.E. (1992) Measurement of marine picoplankton cell size by using a cooled , charge-coupled device camera with image- analyzed fluorescence microscopy. Applied and Environmental Microbiology. Feb.92. p584-592.

WARDELL J.N. (1988) Methods for the study of Bacterial attachment. Methods in Aquatic Bacteriology. Edited by B. Austin. p389-410.

WATANABE T. , CAPBLANCQ J. , DAUTA A. (1988) Utilisation des bioessais "in situ" (substrats artificiels) pour caractériser la qualité des eaux de rivière à l'aide du périphyton. Annls.Limnol. 24 (2) p111-125.

WELCH E.B. , QUINN J.M. , HICKEY C.W. (1992) Periphyton biomass related to point-source nutrient enrichment in seven New Zealand streams. Wat. Res. vol. 26 n°5 p669-675.

LISTE DES FIGURES ET DES PLANCHES

Figure 1 : Production bactérienne exprimée en µg C/1.h

Figure 2 : Rejets d'origines domestique et industrielle d'Angoulême.

Figure 3 : Numérations bactériennes en fonction de la profondeur.

Figure 4 : Protocole opératoire des méthodes de coloration utilisées.

Figure 5 : Dénombrement des bactéries du biofilm aprés traitement du végétal.

Figure 6 : Observation des bactéries du biofilm après traitement mécanique et chimique du végétal.

Figure 7 : Techniques de stérilisation de l'extrait de kiwi.

Figure 8 : Comparaison des numérations totales des cellules sur substrat naturel et artificiel.

Figure 9 : Evolution du nombre de cellules en fonction du temps.

Planche 1 : Substrats naturels et artificiels.

Planche 2 : Examens microscopiques du périphyton coloré par la méthode DAPI.

Planche 3 : Examen microscopique du biofilm bactérien coloré par la méthode DAPI. Station de Nersac.

ANNEXE

NUMERATIONS CELLULAIRES SUR SUPPORTS ARTIFICIELS.

Unités : Nombre de cellules par cm2

6-7 juin

PROFONDEUR (m)	Chalonne	Nersac
0	2,35E+07	4,13E+07
0,3	2,29E+07	5,13E+07
0,5	1,89E+07	6,29E+07
0,75	9,73E+06	6,16E+07
1	6,57E+06	1,02E+07
1,5	5,47E+05	9,15E+06

22-23 juin

PROFONDEUR (m)	Chalonne	Nersac
0	1,69E+08	5,85E+07
0,3	1,91E+08	1,75E+08
0,5	7,96E+07	2,20E+08
0,75	6,98E+07	1,36E+08
1	4,25E+07	8,56E+07
1,5	3,06E+07	6,90E+07

6-7 juillet

PROFONDEUR (m)	Chalonne	Nersac
0	1,61E+08	6,62E+08
0,3	1,66E+08	1,00E+09
0,5	8,81E+07	1,19E+09
0,75	1,09E+08	4,38E+08
1	1,45E+07	6,38E+08
1,5	6,08E+06	5,71E+08

ANNEXE

NUMERATIONS BACTERIENNES ET MESURES D'ACTIVITE.

Unités : Nombre de cellules par cm2

	Numérations totales		Mesures d'activité	
PROFONDEUR (m)	Chalonne	Nersac	Chalonne	Nersac
0	1,01E+09	4,84E+08	6,61E+07	1,22E+08
0,3	1,30E+09	5,84E+08	7,23E+07	1,37E+08
0,5	1,26E+09	1,23E+09	6,69E+07	2,95E+08
0,75	3,20E+08	4,94E+08	9,52E+07	1,54E+08
1	2,19E+08	6,27E+08	5,14E+07	1,57E+08
1,5	1,09E+08	3,16E+08	1,83E+07	1,01E+08

19-20 juillet

	Numérations totales		Mesures d'activité	
PROFONDEUR (m)	Chalonne	Nersac	Chalonne	Nersac
0	5,90E+08	4,59E+08	8,55E+07	1,16E+08
0,3	8,90E+08	8,76E+08	1,31E+08	2,65E+08
0,5	7,50E+08	8,50E+08	1,26E+08	1,58E+08
0,75	7,05E+08	5,85E+08	8,05E+07	1,39E+08
1	6,60E+08	5,55E+08	5,20E+07	1,09E+08
1,5	4,85E+08	4,90E+08	5,01E+07	7,90E+07

6-7 août

POURCENTAGES D'ACTIVITE

PROFONDEUR (m)	Chalonne %	Nersac %
0	6,5	25,2
0,3	5,5	23,4
0,5	5,3	24
0,75	25	31
1	23,5	25
1,5	16,8	32

19-20 juillet

PROFONDEUR (m)	Chalonne %	Nersac %
0	14,5	25,2
0,3	14,7	30,2
0,5	16,8	18,5
0,75	11,4	23,7
1	7,8	19,6
1,5	10,3	16,1

6-7 aout