



**HAL**  
open science

# Dynamique des communautés microbiennes des biofilms phototrophes à différents niveaux d'intégration biologique : des successions écologiques aux réponses à l'exposition à un herbicide

Armelle Paule

► **To cite this version:**

Armelle Paule. Dynamique des communautés microbiennes des biofilms phototrophes à différents niveaux d'intégration biologique : des successions écologiques aux réponses à l'exposition à un herbicide. Biodiversité et Ecologie. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2012. Français. NNT : . tel-00741353

**HAL Id: tel-00741353**

**<https://theses.hal.science/tel-00741353v1>**

Submitted on 12 Oct 2012

**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.



Université  
de Toulouse

# THÈSE

En vue de l'obtention du

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

---

**Présentée et soutenue par :**

**Armelle PAULE**

Le mardi 10 janvier 2012

**Titre :**

Dynamique des communautés microbiennes des biofilms phototrophes à différents niveaux d'intégration biologique : des successions écologiques aux réponses à l'exposition à un herbicide

---

**École doctorale et discipline ou spécialité :**

ED SDU2E : Écologie fonctionnelle

**Unité de recherche :**

UMR 5245 CNRS/UPS/INPT -EcoLab- Laboratoire Ecologie Fonctionnelle et Environnement

**Directeur(s) de Thèse :**

Jean-Luc ROLS, Professeur, Université Paul Sabatier, Toulouse III

Etienne PAUL, Professeur, INSA Toulouse

**Rapporteurs :**

Pierre CAUMETTE, Professeur, Université de Pau et des Pays de l'Adour, Pau

Bernard MONTUELLE, Directeur de recherche, IRSTEA, Thonon les Bains

**Autre(s) membre(s) du jury :**

Eric CHAUVET, Directeur de recherche CNRS, Toulouse

Frédéric GARABETIAN, Professeur, Université de Bordeaux 1

Sergi SABATER, Professeur, Université de Girone, Espagne

---

## Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier Messieurs Eric CHAUVET (Directeur de Recherche, CNRS) et Jean Luc PROBST (Directeur de Recherche, CNRS), directeurs successifs d'Eco-Lab (Laboratoire d'Ecologie fonctionnelle et Environnement), pour m'avoir accueillie au sein de leur laboratoire à Toulouse.

Je tiens particulièrement à remercier mes directeurs de thèse, Messieurs Jean Luc ROLS (Professeur, Université Paul Sabatier) et Etienne PAUL (Professeur, INSA de Toulouse) qui m'ont offert l'opportunité de réaliser cette thèse et pour toute la confiance qu'ils m'ont accordée.

Je tiens à remercier les personnes qui ont accepté d'évaluer ce travail : les rapporteurs Messieurs Pierre CAUMETTE (Professeur, Université de Pau et des Pays de l'Adour, Pau) et Bernard MONTUELLE (Directeur de recherche, IRSTEA, Thonon-les-Bains) qui ont travaillé dans un temps record, et les examinateurs Messieurs Eric CHAUVET (Directeur de Recherche, CNRS Toulouse), Frédéric GARABETIAN (Professeur, Université de Bordeaux 1) et Sergi SABATER (Professeur, Université de Girone, Espagne).

Un grand merci à John LAWRENCE (chercheur Scientifique) pour m'avoir accueillie au sein de son équipe d'Environnement Canada, à Saskatoon, dans le cadre d'un séjour ATUPS de 2 mois. Merci de l'intérêt qu'il a porté à mon travail, sa confiance, la découverte de son pays et la merveilleuse rencontre avec un hummingbird. Je remercie également le personnel rattaché à cette équipe, George SWERHONE, pour sa disponibilité, ses cours d'initiation à la microscopie confocale, et sa grande gentillesse ; Julie ROY, pour l'ensemble de ses conseils « biomol », et nos nombreux fous rires, Vijay VAMBER, et toutes les personnes du « coffee time » qui essayaient tant bien que mal de me faire comprendre leurs sujets de conversation.

Merci à Robert DURAN (Professeur, Université de Pau et des Pays de l'Adour) pour m'avoir accueillie au sein de son équipe IBEAS du LCABIE à Pau, lors de mes séjours « T-RFLP ». Une mention spéciale à Béatrice LAUGA (Maître de Conférences, Université de Pau et des Pays de l'Adour), un grand merci pour ta disponibilité, ton investissement, ton soutien et tes conseils. Je tenais également à remercier les autres membres de l'équipe, Solange KARAMA pour sa gentillesse, et son aide technique, Magali, Pierre-Jo, Romain, Yannick, Anne, Jean Philippe, Marion (biofilm power ) (merci de m'avoir intégrée dans vos soirées), Florence, et Stéphanie... qui contribuent à la très bonne ambiance de ce laboratoire si accueillant, que je retrouvais à chaque fois avec beaucoup de plaisir. Merci à tous !

Ce travail n'aurait pu être réalisé en totalité sans l'aide de François DELMAS (IRSTEA, Bordeaux) et Vincent ROUBEIX (post-doctorant), notre collaboration fut un réel plaisir, je tenais à les remercier pour leur grande disponibilité, et nos nombreuses discussions. Merci Vincent pour ton grand professionnalisme et l'ensemble des analyses d'identification et de comptage des diatomées que tu as réalisés. Et pour les analyses des pesticides je tiens à remercier Georges MERLINA (EcoLab) et Hugues PREUD'HOMME (du LCABIE, Pau), grâce à qui j'ai pu découvrir le monde complexe (enfin une partie) de la chimie analytique et tout le jargon qui va avec.

---

Je tiens à remercier Jean Jacques BERTRAND (et toute son équipe) de la société ARIAS (Toulouse), pour son professionnalisme, sa grande disponibilité, et son aide précieuse à la suite du moindre de mes appels de détresse lors des premières utilisations du bioréacteur annulaire rotatif.

Je tiens particulièrement à remercier Daniel DALGER (Ingénieur d'Etudes, CNRS) pour sa contribution dans de nombreuses analyses, son investissement, sa disponibilité, la rigueur analytique qu'il nous enseigne, la découverte de la chimie, et par-dessus tout sa joie de vivre, et son sens sur l'humour, toujours à nous dépanner, et sur qui on peut toujours compter. Après 4 années d'expériences, je comprends enfin tous tes jeux de mots du premier coup! Merci à Yvan Nicaise, pour toutes ses connaissances de la biomol qu'il m'a transmises, et à qui je dois mon premier bain non prévu dans une eau de rivière très froide, et oui le courant c'est dangereux. Un grand merci à Loïc TEN-HAGE (Maître de Conférences, Université Paul Sabatier) « monsieur algue » pour les conseils et l'analyse de mes échantillons et Jean-Louis DRUILHE (Ingénieur d'Etudes, Université Paul Sabatier) pour la partie électronique rattachée au bioréacteur. Je tiens également à remercier Asmaa BIAZ, Alexandre LAMY et Elodie MAZEAU pour leur implication, leur motivation, et leur contribution à ce travail lors de stages.

Une pensée particulière à Stéphanie BOULETREAU (post- doctorante, Université Paul Sabatier) et Emilie LYAUTEY (Maître de Conférences, Université de Savoie) mes deux grandes sœurs scientifiques, j'ai eu cette chance de pouvoir partager le même bureau que vous! Un grand MERCI pour votre gentillesse, votre bonne humeur, votre disponibilité, votre soutien et pour tous vos conseils et connaissances qui m'ont été précieux.

Un grand merci à mes collègues du premier étage du bâtiment 4R3, présents ou passés, pour votre soutien, votre aide, ou tout simplement merci pour tous ces petits moments du quotidien passés avec vous dans ce grand bâtiment gris, les Freds, Arthur, Jessica, Claudine, Aurélia, Emilie S., Anthony, Laurent, Amaia, Joséphine, Anne-Marie (merci pour les chocolats), Sylvain grand buveur de café je te remercie pour ta disponibilité, et ta grande gentillesse, toujours prêt à aider... et à ramener du biofilm tôt le matin!! Et enfin Aude la bulldozer, hakuna matata n'est ce pas!! Un grand merci pour le soutien de ces derniers mois, même jusqu'à 3 h du matin; pour notre bonne résolution avec nos séances à la piscine... j'espère le début d'une longue amitié! A toi maintenant, fonce!

Mention spéciale aux abeilles du 3ème étage, Elodie, Fabien et Damien, merci pour ces soirées passées avec vous. Merci à tous ceux qui ont participé de près ou de loin à ces années de thèse quand je n'étais pas au labo, merci pour leur présence, les toulousains, Tom et Marianne (je vous remercie deux fois, à bientôt de l'autre côté de l'Atlantique), mes amis « cheval », merci les filles pour tous ces moments de verdure, Audrey, Sandrine; et les non toulousains, ma famille Corse, Greg, Mathilde, Emilie (elles sont loin nos années sur les bancs de la fac de Tours), Xavier et Alienor, mes lyonnais préférés.

J'adresse mes plus vifs et sincères remerciements à ma famille, mes parents, mes 3 stroumphs, Cla, Val et ptit' la, pour leur soutien sans faille et leur encouragement, malgré la distance.

Le dernier mot est pour toi Thierry, que te dire de plus que tu ne saches déjà, tu m'as d'abord supportée (respect!!), soutenue et aidée jusqu'à la dernière ligne de ce manuscrit... , et tout au long de cette thèse et bien plus... , tu connais le réacteur autant que moi... ! Promis maintenant tout article récemment trouvé, hop direction endnote ! Je ne te remercierai jamais assez pour tout ce que tu as fait pour moi ! Tu es le premier doctorant de neurobiologie aussi calé en biofilm, tout simplement merci... à toi maintenant la dernière ligne droite.

Une petite pensée pour les compagnons à 6 pattes du 4R3...

---

## Résumé

La recherche de relations entre la biodiversité et le fonctionnement de communautés au sein d'écosystèmes est l'un des enjeux majeurs de l'écologie contemporaine de ces dix dernières années. D'un point de vue environnemental, la biodiversité structurelle et/ou fonctionnelle, véritable force motrice des écosystèmes, est à l'origine de leur fonctionnement, de leur stabilité et de leur résilience. Les écosystèmes aquatiques, reconnus pour offrir un éventail de « services écologiques » à la société, sont fortement exposés par l'utilisation massive de pesticides, à l'origine d'une possible érosion de leur biodiversité. L'approche écotoxicologique ne se limite pas à l'évaluation des risques de toxicité de pesticides sur les organismes, elle s'élargit à la nécessité d'évaluer, à l'échelle de l'écosystème aquatique, les conséquences de la perturbation sur les communautés et les descripteurs de bio-indication associés. Dans ce contexte, les biofilms phototrophes d'écosystèmes aquatiques constituent un modèle d'étude pertinent de par la complexité des structures de communautés microbiennes, leur dynamique spatiale et temporelle, et la variété des fonctions hébergées. Une première expérience a permis de mettre en évidence que des agrégats microbiens d'habitats différents (floc de boues activés et biofilms phototrophes) présentent un potentiel comparable de biodégradation d'un herbicide, l'alachlore. Puis par une première approche écologique, la manipulation de la structure de communautés microbiennes de biofilms phototrophes a été explorée en conditions « naturelles » dans des rivières aux caractéristiques physico-chimiques différentes, et en conditions « contrôlées » avec un prototype de bioréacteur photosynthétique à écoulement hydrodynamique du type Taylor - Couette. Ces expériences soulignent que la structure des communautés microbiennes résulte de processus de successions écologiques, gouvernés par des facteurs allogènes et/ou autogènes en fonction de leur stade de maturation. Enfin par une seconde approche écotoxicologique, les réponses structurelles et fonctionnelles de biofilms phototrophes exposés à l'alachlore ont été évaluées. Ainsi, trois conditions expérimentales ont été testées afin d'intégrer le stade de maturation (facteurs autogènes) et l'histoire (facteurs allogènes) des biofilms phototrophes.

En considérant les biofilms phototrophes comme des agrégats dynamiques, ces travaux nous ont permis d'appréhender l'approche écotoxicologique en intégrant le concept des successions écologiques au sein des communautés microbiennes. Les résultats désignent les biofilms phototrophes comme des outils prometteurs en tant que bio-indicateurs de la qualité des eaux lorsqu'ils sont caractérisés par une approche multi-métrique composée de descripteurs fonctionnels et structurels.

**Mots clés :** biofilms phototrophes ; diatomées ; communautés bactériennes ; bioréacteur annulaire rotatif ; succession écologique ; approche écotoxicologique ; bioindication

## Abstract

The study of structure / function relationships in ecosystems is one of the current major environmental challenges. In terms of ecology, the biodiversity and functioning of communities drive ecosystem functioning, stability and resilience. The intensive use of pesticides causes many disturbances in aquatic ecosystems, which are well known to offer a range of “ecological services” for society. One of the consequences of this disturbance is the erosion of structural and / or functional biodiversity.

In terms of ecotoxicology, environmental issue is not limited to the risk assessment of a pollutant toxicity on organisms but it expands to the ability to assess, at the ecosystem scale, the consequences of a disturbance and the use of bio-indicators. In this context, for aquatic ecosystems, phototrophic biofilms provide a particularly relevant model, based on their complex microbial community structures, spatial and temporal dynamics and variety of functions.

In a first experiment our results suggested that microbial aggregates from different habitats (activated sludge and phototrophic biofilm) are characterized by comparable potential of an herbicide biodegradation : alachlor. Then using an ecological approach, a manipulation of the structure of phototrophic biofilms microbial communities was explored in "natural" conditions in rivers exhibiting different physicochemical characteristics, and in "controlled" conditions with a photosynthetic bioreactor prototype (Taylor - Couette flow type). These experiments suggested that the microbial community structures are driven by autogenic and allogenic factors, depending upon maturation state. Finally using an ecotoxicological approach, structural and functional responses of phototrophic biofilms exposed to alachlor were evaluated. Three experimental conditions were tested in order to integrate the maturation stage (autogenic factors) and history (allogenic factors) of phototrophic biofilms.

Considering phototrophic biofilms as dynamic aggregates, this work allowed us to undertake an ecotoxicological approach integrating the concepts of ecological succession in microbial communities.

Our results demonstrate that phototrophic biofilms are promising tools as bio-indicators of water quality when they are characterized by a multi-metric approach including functional and structural descriptors.

**Keywords :** Phototrophic biofilms ; diatoms ; bacterial community ; rotating annular bioreactor ; ecological succession ; ecotoxicological approach ; bioindication

# Sommaire

Remerciements	i
Résumé / Abstract	iv
Introduction	xx
<b>I Synthèse bibliographique</b>	<b>1</b>
I Modèle biologique d'étude : les biofilms phototrophes de milieux lotiques	2
II La problématique des pesticides dans l'environnement	24
III Etude de cas : l'alachlore	43
<b>II Matériel et Méthodes</b>	<b>57</b>
I Sites d'étude et stratégies d'échantillonnage	58
II Stratégies d'approche expérimentale	66
III Volet analytique	98
IV Analyses statistiques des données	117
<b>III Etudes expérimentales</b>	<b>120</b>
I Biodégradation d'un herbicide par des communautés bactériennes de biofilms phototrophes : approche expérimentale en microcosme	121
II Comment appréhender les facteurs qui contrôlent les successions écologiques des communautés microbiennes : cas des biofilms phototrophes	150
III Importance relative des facteurs allogènes et autogènes dans la réponse de biofilms phototrophes à un herbicide – différentes approches expérimentales en microcosmes	193



<b>Conclusion générale et perspectives</b>	<b>284</b>
<b>Annexe</b>	<b>297</b>
<b>Bibliographie</b>	<b>301</b>

## Table des figures

Figure 1	Echelles d'observation de biofilms phototrophes naturels : à l'échelle (A) du tronçon de rivière, (B) et (C) du substrat de type galet, (D) de la loupe binoculaire (LEICA M212 avec une caméra LEICA DFC320), (E) et (F) microscopique . . . . .	3
Figure 2	Représentation en diagramme d'un biofilm phototrophe (ou périphyton) selon Burns et Ryder (2001) . . . . .	3
Figure 3	Exemple de différents aspects et apparences possibles des biofilms phototrophes se développant sur des galets (biofilms épilithiques) (extrait et modifié de Rols et Garabetian 2004) . . . . .	5
Figure 4	Répartition type en micro-organismes présents au sein de biofilms épilithiques (HDR, Garabétian 2006) (illustration du haut), exemple pour des biofilms épilithiques de la Garonne (illustration du bas) (extrait et modifié de cours M2R FEA UPS 2010) . . . . .	7
Figure 5	La zonation d'un hydrosystème fluvial (A, Garabetian 2009) et le concept du continuum fluvial avec les conditions favorables pour le développement de biofilm phototrophe (B, extrait de cours M2R FEA UPS 2010) . . . . .	8
Figure 6	Les différents facteurs influençant la croissance du biofilm phototrophe (extrait de Burns et Ryders 2001) . . . . .	9
Figure 7	L'influence de la vitesse du courant sur la structure tridimensionnelle des biofilms phototrophes et leur résistance face à une perturbation physique (extrait de Stevenson et al. 1996) . . . . .	12

Figure 8	Dynamique de la biomasse comme décrite par la chlorophylle <i>a</i> , la MS (matière sèche) ou la MSSC (matière sèche sans cendre), selon le modèle proposé par Biggs (1996) (A = extrait de Boulêtreau (2010); Schéma conceptuel de l'évolution temporelle de la biomasse (B = extrait de Sigeo 2005 d'après Tuchman et al. 1996; Profil de l'évolution temporelle de la biomasse microbienne le plus souvent observé en milieu naturel, avec présence de deux successions, primaire et secondaire (C = extrait de Garabetian 2009) . . . . .	17
Figure 9	Evolution temporelle du nombre d'espèces et de nouvelles espèces durant les différentes phases de développement d'un biofilm phototrophe, conceptualisée par Jackson et al. (2001) (extrait et amélioré de Jackson et al. 2001) . . . . .	19
Figure 10	Les différents mécanismes qui gouvernent la dispersion des pesticides de la parcelle du sol vers les autres compartiments (extrait de Barriuso et al. 1996) . . . . .	25
Figure 11	Les différentes démarches et types de dispositifs possibles pour appréhender les toxicités aiguës ou chroniques de polluants à différents niveaux trophiques et différents niveaux de complexité et de réalisme (extrait de Caquet et al. 1996) . . . . .	28
Figure 12	La comparaison et la pertinence des différentes approches utilisables lors des études écotoxicologiques (extrait de Laviale 2006) . . . . .	28
Figure 13	Schéma général d'exemples d'impact de plusieurs pesticides (carbaryl, lindane, chlorpyrifos, diazinon, des insecticides; carbendazim, un fongicide; et acetochlor, metolachlor, glyphosate et 2,4-D, des herbicides) sur les micro-organismes et les impacts possibles sur le reste de la chaîne trophique durant des expérimentations en microcosmes (A, extrait et modifié de Van den Brink et al. 2009; B, Van den Brink et al. 2000; C, Mills et Semlitsch 2004 et D, Relyea 2009).R = Ressources	32
Figure 14	Les différents avantages à 3 échelles de représentation (espace, organisation et temps) d'utiliser les biofilms phototrophes comme modèles d'études (extrait de Laviale 2006) . . . . .	34
Figure 15	Différents descripteurs utilisables pour évaluer l'impact d'un polluant sur les biofilms, en fonction de la sensibilité des descripteurs, et des effets étudiés, à court ou long terme (extrait de Sabater et al. 2007) . .	36

Figure 16	Les différentes réponses possibles des communautés face à une perturbation (extrait de Clements et Newman 2002) . . . . .	38
Figure 17	Impacts potentiels d'un polluant sur le fonctionnement général d'un écosystème (extrait de Boudou et Ribeyre 1997) . . . . .	42
Figure 18	Formule chimique développée (A) et caractéristiques physico-chimiques de l'alachlore (B). $K_{ow}$ représente le coefficient de partage octanol / eau et $K_{oc}$ représente le potentiel de rétention de l'alachlore sur la matière organique du sol . . . . .	43
Figure 19	Corrélation entre les valeurs de $\log K_{ow}$ et $EC_{50}$ pour 8 chloroacétanilides : 1, butachlore ; 2, prétilachlore ; 3, acétolachlore ; 4, alachlore ; 5, propachlore ; 6, métazachlore ; 7, diméthachlore, et 8, métolachlore (extrait de Junghans et al. 2003) . . . . .	44
Figure 20	Voies potentielles de dégradation de l'alachlore dans le sol (extrait de Field et Thurman 1996) . . . . .	50
Figure 21	Localisation géographique des 3 sites d'échantillonnage des biofilms phototrophes (complété de Paule et al. 2009). Nomenclature des stations : <b>M</b> : Le Montoussé à Auradé, <b>S</b> : La Save à Larroque, <b>G</b> : La Garonne à l'Aouach. . . . .	58
Figure 22	Photographies des trois sites d'échantillonnage <b>M</b> (Auradé, à gauche), <b>S</b> (Larroque, au milieu) et <b>G</b> (Aouach, à droite) prises au printemps (Photographie de droite de S. Teissier). . . . .	60
Figure 23	Qualité des eaux en 2005 à différentes stations du bassin versant Adour-Garonne, selon leurs concentrations en nitrates ( $mg.L^{-1}$ )(extrait et modifié de Debenest 2007, source <a href="http://www.adourgaronne.fr">www.adourgaronne.fr</a> ). . . . .	61
Figure 24	(A) Concentrations en herbicides des eaux de surface non filtrées à différents points de prélèvement en amont et aval de l'agglomération de Toulouse, en mars 2005 (extrait de Devault 2007). (B) valeurs cumulatives des plus fortes concentrations totales en herbicides à différents points de prélèvement, en 2005 et 2006 (extrait et modifié de Debenest 2007). . . . .	62
Figure 25	Concentrations en pesticides d'échantillons d'eau non filtrée prélevés au niveau de l'exutoire de bassin versant d'Auradé, au même emplacement que le site <b>M</b> mais à des dates différentes (extrait de Taghavi et al. 2010) . . . . .	63

Figure 26	Dispositifs de production et de collecte de biofilms phototrophes <i>in situ</i> : (A) avec les lames de verre disposées à raison de 4 par cagette (1 lame = 1 réplicat) et (B) avec les plaques en polyéthylène disposées à raison de 40 sur support métallique (1 plaque = 1 réplicat) . . . . .	65
Figure 27	Dispositifs de collecte de biofilms phototrophes <i>in situ</i> avec les plaques en polyéthylène (A), avec les lames de verre (B), maintenues dans la colonne d'eau ici du site <b>M</b> . . . . .	65
Figure 28	Plan expérimental de l'étude réalisée <i>in situ</i> sur les sites <b>M</b> et <b>S</b> à l'aide de lames de verre disposées en cagettes. <b>M</b> : Le Montoussé à Auradé ( <b>A</b> ) et <b>S</b> : La Save à Larroque ( <b>L</b> ). . . . .	67
Figure 29	Photographie du dispositif expérimental : incubation en bouteilles placées sur agitateurs magnétiques par lots de 6 et disposés dans une enceinte thermostatée. . . . .	70
Figure 30	Schéma (A) et photographies (B) du dispositif expérimental d'incubation de plaques de polyéthylène, préalablement colonisées en milieu naturel (photographies d'A. Lamy) . . . . .	72
Figure 31	Photographie du dispositif expérimental comprenant 5 microcosmes dans une enceinte thermostatée (photographies d'A. Lamy). . . . .	73
Figure 32	Plan expérimental de chaque expérimentation en microcosmes (extrait de Lamy 2010) : 5 modalités (ou conditions) expérimentales différentes : Microcosme Biofilm NE (coupons colonisés en absence d'alachlore), Microcosme Biofilm 10E (coupons colonisés exposés à $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ d'alachlore), Microcosme Biofilm 30E (coupons colonisés exposés à $30 \mu\text{g.L}^{-1}$ d'alachlore), Microcosme Sans biofilm 10E (coupons vierges exposés à $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ d'alachlore), Microcosme Sans biofilm 30E (coupons vierges exposés à $30 \mu\text{g.L}^{-1}$ d'alachlore). . . . .	74
Figure 33	Schéma simplifié d'un bioréacteur annulaire rotatif à écoulement de type Taylor-Couette : R1 et R2 les rayons des cylindres internes et externes, e l'entrefer, h la hauteur du bioréacteur, et $\Omega$ la vitesse de rotation du cylindre interne (Extrait de Coufort 2004). . . . .	75

Figure 34	Organisation du bioréacteur ( <i>Rotating Annular Bioreactor</i> , RAB). (A) représentation en 3D des différentes parties qui composent le bioréacteur avec a le cylindre externe, b le cylindre interne et c le cylindre étanche qui contient les néons; (B) photographie du bioréacteur; (C) schéma détaillé du bioréacteur et (D) ses caractéristiques géométriques. . . . .	77
Figure 35	Photographies d'un support de colonisation, (gauche) en vue de face (le trou correspond au lieu de passage de la vis de fixation qui se visse sur le cylindre externe du RAB) et (droite) en vue dorsale (la face arrière et les bords sont recouverts de bande adhésive) . . . . .	78
Figure 36	Photographie de l'emplacement des plaques de polyéthylène sur la face interne du cylindre externe (A et B) et détail du système de fixation des plaques (B) . . . . .	79
Figure 37	Le dispositif d'éclairage, capacité de 8 néons protégés par un cylindre étanche en plexiglass (A et B) . . . . .	80
Figure 38	Spectres lumineux et principales caractéristiques des néons « Fluora » (spectre de gauche) et « Lumière du jour » (spectre de droite) utilisés lors des cultures en RAB . . . . .	81
Figure 39	Transitions des écoulements dans un réacteur à comportement hydrodynamique du type Taylor-Couette (D'après Andereck 1986, extrait de Coufort 2004). $Ta_c$ : Nombre de Taylor critique. . . . .	82
Figure 40	Ecoulement de type vortex turbulent similaire à celui recherché au niveau de l'entrefer du prototype RAB. Avec $\omega$ = vitesse de rotation angulaire du cylindre interne (extrait de Ohmura et al. 1997). . . . .	83
Figure 41	Schéma du dispositif expérimental de réalisation de la DTS (a), et photographie du dispositif mis en place en sortie de bioréacteur pour les mesures de conductivité (b) . . . . .	86
Figure 42	Photographie du canal expérimental du laboratoire . . . . .	89
Figure 43	Dispositifs annexes d'inoculation de la culture <b>C1</b> (A) et de la culture <b>C2</b> (B) . . . . .	90
Figure 44	Photographies de l'étape de collecte d'un coupon. Les coupons blancs ou partiellement recouverts correspondent aux coupons remplacés suite à un échantillonnage . . . . .	91
Figure 45	Photographie de la cellule de mesure positionnée en sortie de bioréacteur. . . . .	92

Figure 46	Photographie du dispositif expérimental des tests écotoxicologiques dans l'enceinte thermostatée. . . . .	93
Figure 47	Schéma du protocole expérimental des tests écotoxicologiques réalisés dans des béchers (500 mL) avec des biofilms phototrophes cultivés dans le RAB : utilisation de la biomasse sous forme biofilm fixé sur le coupon, ou mise en suspension dans le milieu, en présence d'une lame de verre vierge. . . . .	94
Figure 48	Photographies d'un mini-bioréacteur (A) et du dispositif expérimental (B) . . . . .	95
Figure 49	Schéma récapitulatif des analyses réalisées au cours de ces travaux de thèse sur les différents types de supports de colonisation utilisés . . . .	104
Figure 50	Différentes approches moléculaires utilisées pour l'étude des communautés microbiennes (extrait de Dorigo et al. 2005) . . . . .	107
Figure 51	Présentation et comparaison du déroulement de deux méthodes de typage moléculaire, la T-RFLP et la DGGE (d'après Okubo et Sugiyama 2009). . . . .	108
Figure 52	Exemple de profils obtenus à partir de la T-RFLP (A) et de la DGGE (B). En bleu un échantillon = un ensemble de pic = un profil = une communauté, et en rouge le standard interne (TAMRA 500). En abscisse = taille des pics, et en ordonnées = fluorescence des pics = des T-RFs. Une bande = un OTU, une piste sur le gel correspond à une communauté. . . . .	114
Figure 53	Détail du positionnement des 31 sources de carbone (A). Photographie (A. Lamy) d'une microplaque Ecoplate à l'issue de 96 h d'incubation (B). Les puits colorés en violet illustrent une consommation de la source de carbone présente dans le puits. . . . .	116
Figure 54	Exemple d'une représentation graphique de $\ln(C_t/C_0)$ en fonction du temps du métolachlore pour MAS (microbiologically active soil) et SS (sterilized soil). $DT_{50}$ (en jour) correspond à la demi-vie du métolachlore calculée pour les deux traitements (extrait de Caracciolo et al. 2005). . . . .	118

Figure 55	Aires de chaque pic (un composé) correspondant à l'alachlore, l'ESA, l'OA sur les spectres de masse des échantillons en début (T0) et fin d'incubation (T final) pour les sites <b>G</b> , <b>M</b> et <b>W</b> et une concentration initiale en alachlore de 20 $\mu\text{g.L}^{-1}$ . Les seuils de détection sont de : 4 $\text{pg g}^{-1}$ pour l'alachlore, 9 $\text{pg.g}^{-1}$ pour ESA et 20 $\text{pg.g}^{-1}$ pour OA . . . . .	127
Figure 56	Modèle de successions écologiques illustrées à travers l'évolution de nombre d'OTUs observée durant l'établissement de différents types de biofilms comparés au modèle proposé par Jackson (2003). Graphe du haut : nombre total d'OTUs, Graphe du bas : nombre de nouveaux OTUs (extrait de l'HDR, F. Garabetian 2006) . . . . .	152
Figure 57	Evolution temporelle de l'épaisseur du biofilm phototrophe durant l'expérience de la culture 1 (loupe binoculaire, LEICA M212, avec une caméra LEICA DFC320, grossissement x 6) observée sur la tranche d'un coupon de colonisation. . . . .	170
Figure 58	Moyenne des valeurs d'activités de la GST selon les différents traitements expérimentaux pour l'expérience avec le biofilm collecté au site <b>M</b> . . . . .	199
Figure 59	Schéma simplifié des interactions complexes entre biodiversité et fonctionnement d'un écosystème (extrait de Boulêtreau et al. 2010c) . . . . .	284
Figure 60	Les concepts et leurs relations abordées dans le cadre de ce travail de recherche . . . . .	296

## Liste des tableaux

Tableau 1	Synthèse comparative de quelques travaux sur les dispositifs d'investigation des biofilms phototrophes. LxlxP = Longueur x largeur x Profondeur . . . . .	23
Tableau 2	Exemple d'un panel de mode d'action de différentes familles de pesticides	25
Tableau 3	Exemples d'études d'évaluation de l'impact de pesticides sur les écosystèmes aquatiques à différents niveaux de réalisme écologique . . . . .	30
Tableau 4	Temps de demi-vie de l'alachlore dans différents environnements . . . . .	47

Tableau 5	Concentrations en alachlore des eaux de surface selon différentes localisations et périodes de détection. (nd = donnée non disponible) . . . . .	52
Tableau 6	Toxicité de l'alachlore sur différents organismes basée sur des paramètres d'écotoxicologie ( $EC_{50}$ et dans certains cas $LC_{50}$ ). (nd = donnée non disponible) . . . . .	54
Tableau 7	Principales caractéristiques des sites d'échantillonnage <b>M</b> , <b>S</b> et <b>G</b> (nr = non répertorié, <sup>c</sup> : source : <a href="http://www.hydro.eaufrance.fr">http://www.hydro.eaufrance.fr</a> ). . . . .	59
Tableau 8	Valeurs d'intensité lumineuse en fonction du nombre de néons (pour chaque cas, il y a autant de néons Fluora que de néons Luminux) . . . . .	80
Tableau 9	Tableau reliant les plages de vitesse de rotation du cylindre interne aux types d'écoulement au niveau de l'entrefer du RAB (* : $Ta_c = 43,3$ ). . . . .	83
Tableau 10	Tableau reliant les vitesses tangentielles à la surface des coupons et à la paroi externe du cylindre interne en fonction de la vitesse angulaire du cylindre interne. Cette relation est basée sur des résultats de travaux antérieurs qui soulignaient que la vitesse tangentielle entre le cylindre interne et la surface des coupons est atténuée d'environ 50 % (Coufort 2004). . . . .	84
Tableau 11	Quelques exemples de concentrations en nutriments dosés dans l'eau du réseau utilisée comme base du milieu d'alimentation du RAB. Avec nm : non mesuré, nd : non détecté et COD : Carbone Organique Dissous. . . . .	87
Tableau 12	Comparaison des principales caractéristiques des deux types de bioréacteurs annulaires rotatifs utilisés dans le cadre de cette étude : Mini-bioréacteurs d'Environment Canada et prototype RAB d'EcoLab. . . . .	96
Tableau 13	Récapitulatif de chaque expérience et des analyses réalisées . . . . .	100
Tableau 14	Comparaison du comportement des chloroacétanilides en milieu aquatique suivant les principales caractéristiques des conditions opératoires.nd = donnée non disponible . . . . .	129
Tableau 15	Comparaison des principales caractéristiques entre les RAB décrits dans la littérature et le RAB expérimenté pour la première fois dans le cadre de cette étude. . . . .	175



---

Tableau 16 Liste des molécules de pesticides recherchés et leurs principales caractéristiques physico-chimiques.  $K_{oc}$  désigne le coefficient de partage carbone organique / eau. Il donne indication sur l'aptitude de la molécule à s'adsorber sur la matière organique. NR = Donnée Non répertoriée 298

## Listes des abréviations et des symboles

### LES ABREVIATIONS

<b>ACP ou PCA</b>	Analyse en Composantes Principales ou <i>Principal Component Analysis</i>
<b>ADNg ou DNA</b>	Acide Désoxyribo Nucléique génomique ou <i>Deoxyribose Nucleic Acid</i>
<b>IA ou AI</b>	Indice Autotrophique ou <i>Autotrophic Index</i>
<b>ANOSIM</b>	<i>Analysis of similarities</i>
<b>ANOVA</b>	<i>Analysis of variances</i>
<b>APHA</b>	<i>American public health association</i>
<b>ARISA</b>	<i>Automated ribosomal intergenic spacer analysis</i>
<b>AWCD</b>	<i>Average Well Color Development</i>
<b>BSA</b>	<i>Bovine Serum Albumin</i>
<b>BDI</b>	<i>Biological Diatom Index</i>
<b>CAS</b>	<i>Chemical Abstracts Service</i>
<b>CFD</b>	<i>Computational Fluid Dynamics</i>
<b>CLLP</b>	<i>Community Level Physiological Profil</i>
<b>CLSM</b>	<i>Confocal Laser Scanning Microscopy</i> ou microscopie confocale à balayage laser
<b>DCE ou WFD</b>	Directive Cadre Européenne ou <i>Water Framework Directive</i>
<b>DGGE</b>	<i>Denaturing Gradient Gel Electrophoresis</i>
<b>DIREN</b>	Direction régionale de l'environnement
<b>dNTP</b>	Désoxynucléotide triphosphate
<b>DTS ou RDT</b>	Distribution des Temps de Séjour ou <i>Residence Time Distribution</i>
<b>EcoLab</b>	Laboratoire d'Ecologie Fonctionnelle et Environnement
<b>EPS</b>	<i>Extracellular Polymeric Substances</i>
<b>ESA</b>	<i>Ethane Sulfonic Acid</i>
<b>ESI</b>	<i>Electrospray Ionization</i>

<b>FEA</b>	Fonctionnement des Ecosystèmes et Anthropisation
<b>FISH</b>	<i>Fluorescence In Situ Hybridization</i>
<b>GC-MS</b>	<i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i>
<b>GST</b>	Glutathione S-Transférase
<b>HPLC</b>	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
<b>LCABIE</b>	Laboratoire de Chimie Analytique, Bio-inorganique et Environnement.
<b>LDE</b>	Laboratoire Départemental de l'Eau
<b>LISPB</b>	Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés
<b>MA</b>	<i>Millennium ecosystem Assessment</i>
<b>MS-MS</b>	<i>Mass Spectrometry/Mass Spectrometry</i>
<b>NMDS</b>	<i>Non-Metric Multimodal Scaling</i>
<b>OA</b>	<i>Oxanilic Acid</i>
<b>DO ou OD</b>	Densité Optique ou <i>Optical Density</i>
<b>OTU</b>	<i>Operational Taxonomic Unity</i>
<b>PAR</b>	<i>Photosynthetically Active Radiation</i>
<b>Pb</b>	Paire de base
<b>PB</b>	<i>Peak of biomass</i>
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
<b>PEHD 300</b>	PolyEthylene à Haute Densité 300
<b>PICT</b>	<i>Pollution-Induced Community Tolerance</i>
<b>PMMA</b>	<i>Poly(methyl methacrylate)</i>
<b>POCIS</b>	<i>Polar Organic Chemical Integrative Samplers</i>
<b>PVC</b>	Poly-Vinyl-Chlorure
<b>RAB</b>	<i>Rotating Annular Bioreactor</i> ou bioréacteur annulaire rotatif
<b>RE</b>	Reticulum Endoplasmique
<b>RSM</b>	<i>Reynolds Stress Model</i>
<b>SPI</b>	<i>Specific Pollution sensitivity Index</i>
<b>TAE</b>	Tris-Acétate-EDTA

<b>T-RF</b>	<i>Terminal-Restriction Fragment</i>
<b>T-RFLP</b>	<i>Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
<b>UPLC</b>	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i>
<b>UPGMA</b>	<i>Unweighted Pair Group Method using Mean Arithmetic</i>
<b>UPS</b>	Université Paul Sabatier
<b>US EPA</b>	<i>United States Environmental Protection Agency</i>
<b>UV</b>	Ultra-violet
<b>LES SYMBOLES</b>	
<b><math>A_i</math></b>	Absorbance du puits à 590 nm
<b><math>c(0)</math> et <math>c(t)</math></b>	Concentrations du traceur aux temps 0 et t ( $\text{mg.L}^{-1}$ )
<b>Chl a</b>	Chlorophylle <i>a</i> ou <i>Chlorophyll a</i> ( $\mu\text{g.mm}^2$ , $\mu\text{g.cm}^2$ et $\text{mg.cm}^2$ )
<b>COD ou DOC</b>	Carbone Organique Dissous ou <i>Dissolved Organic Carbon</i> ( $\text{mg.L}^{-1}$ )
<b>D</b>	Taux de dilution ( $\text{h}^{-1}$ )
<b><math>\text{DBO}_5</math></b>	Demande Biologique en Oxygène à 5 jours ( $\text{mg.L}^{-1}$ )
<b><math>D_h</math></b>	Diamètre hydraulique (m)
<b>DO</b>	<i>Dissolved Oxygen</i> ( $\text{mg.L}^{-1}$ )
<b>e</b>	Entrefer ou <i>annular gap</i> (mm)
<b><math>\text{EC}_{50}</math></b>	<i>half maximal Effective Concentration</i> ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ ou M)
<b>ID</b>	<i>Inside Diameter</i> (mm)
<b><math>K_{oc}</math></b>	Coefficient de partage carbone organique/eau
<b><math>K_{ow}</math></b>	Coefficient de partage octanol/eau
<b><math>\text{LD}_{50}</math></b>	<i>half maximal Lethal Dose</i> ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ ou $\mu\text{M}$ )
<b>LQ ou DL</b>	Limite de Quantification ou <i>Detection Limit</i> ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ et $\text{pg.g}^{-1}$ )
<b>MS ou DM</b>	<i>Matière sèche ou Dry Mass</i> ( $\text{mg L}^{-1}$ )
<b>MSSC ou AFDM</b>	<i>Matière sèche sans cendre ou Ash Free Dry Mass</i> ( $\text{g.m}^{-2}$ et $\text{mg.cm}^{-2}$ )
<b>MVS</b>	Matière Volatile en Suspension ( $\text{mg.L}^{-1}$ )
<b>OD</b>	<i>Outside Diameter</i> (mm)
<b><math>\Omega</math> / <math>\omega</math></b>	Vitesse angulaire ou de rotation du cylindre interne ( $\text{rad.s}^{-1}$ ou $\text{trs.min}^{-1}$ )

<b>Pt ou TP</b>	Phosphore total ou <i>Total Phosphorus</i> ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ et $\text{mg.L}^{-1}$ )
<b>Q</b>	Débit d'alimentation ( $\text{mL.min}^{-1}$ )
<b><math>r_e</math></b>	Rayon interne du cylindre externe ou <i>outer cylinder radius</i> (m et mm)
<b><math>r_i</math></b>	Rayon externe du cylindre interne ou <i>inner cylinder radius</i> (m et mm)
<b><math>\theta</math></b>	Temps de Séjour (h)
<b>U</b>	Vitesse tangentielle du cylindre interne ( $\text{m.s}^{-1}$ )
<b><math>\nu</math></b>	Viscosité cinématique du fluide ( $\text{m}^2.\text{s}^{-1}$ )
<b>V</b>	Volume opérationnel du réacteur ou <i>working volume</i> (L)

#### NOMBRES ADIMENSIONNELS

<b>Ta</b>	Nombre de Taylor
<b>Ta<sub>c</sub></b>	Nombre de Taylor critique
<b>Re</b>	Nombre de Reynolds

# Introduction

## Contexte scientifique

L'année 2010 fût décrétée par les nations unies comme « l'année de la biodiversité ». En effet, les pouvoirs publics ont pris conscience ces dernières années d'une réduction drastique de la biodiversité, c'est-à-dire la variété des formes écologiques, biologiques et génétiques du vivant, quel que soit l'écosystème considéré (*Millenium Ecosystems Assessment, MA 2005*). A l'origine de cette perte, essentiellement les activités d'origine anthropique. Parmi les systèmes aquatiques évalués par la « *Water Frame Directive* » (au nombre de 252), 46 % des systèmes sont victimes de différentes formes de pollution chimique (eutrophisation, acidification, pollution par les métaux, par la matière organique, et les composés organiques), 10 % d'une dégradation hydro-morphologique, et 4 % de l'utilisation des sols et de la modification des flux d'eau (*Millenium Ecosystems Assessment MA 2005*). L'importance fonctionnelle de la biodiversité n'est plus discutable, 4 rôles lui sont attribués par le « *Millenium Ecosystems Assessment* » : (i) **un rôle de support** qui considère la biodiversité comme le pilier d'un écosystème (diversité structurelle et fonctionnelle), (ii) **un rôle de régulateur** par l'influence que joue la biodiversité sur la productivité, la stabilité et la résilience des écosystèmes, (iii) **un rôle culturel** touchant à l'ensemble des bénéfices non matériels, et (iv) **un rôle de ressource** par la production directe ou indirecte de nourriture.

Ainsi les écosystèmes fournissent de l'alimentation, des matériaux et de l'énergie, ils contribuent également à de nombreux processus biogéochimiques. Depuis quelques années, il y a une reconnaissance croissante pour les écosystèmes qui offrent à la société un large éventail de « services écologiques », découlant de leur fonctionnement normal (caractéristiques chimiques de l'atmosphère, productions végétale et animale, qualité et quantité de la ressource en eau...), et importants pour le bien-être humain et le développement durable (*Millenium Ecosystems assessment MA 2005*). Dans ce contexte, un des enjeux environnemental majeur est de se demander si un écosystème appauvri par rapport à son état initial à la suite de pressions anthropiques, est susceptible de devenir moins efficace dans sa capacité à délivrer des « services écologiques » à la société. Ainsi les débats scientifiques sur la relation biodiversité – fonction ont pris place dans un contexte de biologie de la conversation. La protection des fonctions réalisées par les écosystèmes est devenue un argument de poids pour justifier la conservation des espèces, en assumant qu'une perte de la biodiversité suite à la présence d'un polluant pourrait être à l'origine de la perturbation du fonctionnement global d'un écosystème.

---

Avec l'apparition de nouvelles techniques plus sophistiquées, en microscopie notamment, l'appréciation de la diversité est de plus en plus précise. Malgré tout, Loreau (2010) cite une phrase de Lawton (1999) sur l'état d'art des recherches en écologie des communautés, que l'auteur considère encore comme d'actualité « *Where there are a large number of case histories, and very little other than weak, fuzzy generalisations* ». Il y a beaucoup d'étude à ce sujet, mais il est difficile d'en tirer une généralité.

Dans le cadre de cette étude, nous nous sommes intéressés à un exemple de perturbation possible à l'origine du dysfonctionnement des écosystèmes aquatiques, la présence de pesticides. Comme défini par la Directive Cadre Européenne, « L'eau n'est pas un bien marchand comme les autres, mais un patrimoine qu'il faut protéger, défendre et traiter comme tel », en effet la qualité de l'eau peut devenir un problème en cas de pénurie. Dans ce contexte, les milieux aquatiques, par leur volet politico-sociétal (santé humaine notamment) et leur volet « écosystème récepteur » particulièrement exposé aux perturbations humaines (Barcelo et Sabater 2010), présentent un intérêt d'étude particulier. En Europe, de nombreux cours d'eau contiennent des concentrations en pesticides supérieures au seuil de potabilisation fixé à  $0,1 \mu\text{g.L}^{-1}$  par pesticide (Vryzas et al. 2009). C'est dans ce contexte que l'écotoxicologie, définie comme l'étude des effets des polluants sur l'abondance, la diversité et la composition des communautés ainsi que les interactions entre espèces (Clements et Rohr 2009), a vu le jour pour tenter d'évaluer l'impact des polluants sur les organismes aquatiques. L'accroissement préoccupant des concentrations de divers pesticides dans les eaux laisse présager des effets directs non létaux sur les organismes non-cibles et des effets indirects et différés sur les réseaux trophiques, et ainsi une réduction possible de la biodiversité de ces milieux.

La Directive Cadre Européenne dans le domaine de l'eau (DCE 2000) a pour objectif d'obtenir d'ici 2015 un état satisfaisant des eaux continentales. Ce « bon état » des eaux concerne « l'état écologique et chimique ». L'état écologique se réfère à la structure et au fonctionnement des écosystèmes aquatiques, et l'état chimique à des niveaux de concentration établis sur des critères écotoxicologiques. L'impact des pesticides sur les communautés aquatiques a largement été étudié ces quinze dernières années, selon une approche toxicologique et à différents niveaux d'organisation biologique : individus, populations, communautés ou écosystèmes. A l'échelle de l'écosystème, de multiples effets prévisibles ont été observés (Kasai et Hanazato 1995) : diminution de la diversité et augmentation de la dominance de certaines espèces, altération de processus écologiques (par exemple dégradation de la matière organique), etc... Les niveaux de pollution des cours d'eau sont délicats à apprécier pour des raisons de capacités analytiques, de manque de connaissance du comportement des molécules, et de leur biodisponibilité. Afin de définir le statut écologique des cours d'eau, des indices biologiques

---

ont été développés à différents niveaux d'organisation biologique, les macrophytes, les diatomées des biofilms phototrophes, les invertébrés, les poissons (Geiszinger et al. 2009). Ces indices, souvent basés sur la composition, sont généralement peu pertinents pour les polluants du type pesticides, notamment parce que certains d'entre eux sont susceptibles d'affecter à la fois la dimension fonctionnelle et taxonomique de ces différentes communautés. De plus ces indices ne prennent pas en compte les phénomènes d'adaptation. Le deuxième enjeu majeur environnemental ciblé dans le cadre de ce travail est donc la nécessité de développer des outils méthodologiques pour évaluer le niveau de contamination, la sensibilité et la vulnérabilité des écosystèmes aquatiques.

Jean Paul Sartre (1949) décrit le « blé mur comme un microcosme parce qu'il a fallu, pour qu'il lève, le concours du soleil, des pluies et du vent ; un épi, c'est à la fois la chose la plus naturelle et la chance le plus improbable ». Cette image s'adapte aux biofilms phototrophes de rivière, communautés microbiennes composées de micro/meio-organismes hétérotrophes et de micro-organismes photo-autotrophes enchâssés dans une matrice d'exopolymères. Leur structure est contrôlée par une multitude de facteurs allogènes ou autogènes dont la prédominance varie en fonction de l'âge de maturation de l'agrégat (Lyautey 2005). Ce qui rend délicat l'évaluation des effets des pesticides sur les communautés, difficiles à distinguer des autres effets engendrés par les autres facteurs environnementaux.

Les biofilms phototrophes sont des agrégats fonctionnels clefs des écosystèmes aquatiques. Ils se situent à la base de la chaîne trophique, par leur rang de producteur primaire, ils sont ubiquistes, et leur vitesse de croissance leur confère une intégration rapide des changements environnementaux, à l'origine du qualificatif de « *early warning pollution indicators* » (Sabater et al. 2007). Les biofilms phototrophes se composent d'une vaste biodiversité et de processus biologiques et physico-chimiques générant une multitude de fonctions intimement liée au fonctionnement des écosystèmes aquatiques (production primaire, contribution aux cycles biogéochimiques) dont certaines qualifiées de « services écologiques » (adsorption des pesticides et des métaux, biodégradation des polluants organiques, dénitrification, etc...). Cette biodiversité structurelle et fonctionnelle est susceptible de varier sensiblement et différemment suite à des perturbations d'origine anthropique (Barranguet et al. 2004 ; McClellan et al. 2008) aboutissant à un panel d'effets indirects ou directs possibles, de natures différentes (fonctionnelle et structurelle).

Dans un contexte visant à l'identification de la relation biodiversité /structure des communautés et fonctionnement global des écosystèmes, les communautés microbiennes des biofilms phototrophes constituent des modèles d'étude intéressants.



Il est important de considérer les biofilms phototrophes comme des agrégats dynamiques dont la maturation se traduit par un épaissement (Biggs et Stokseth 1996) associé à des successions de populations algales (Stevenson et al. 1996) et bactériennes (Lyautey 2005) aboutissant à des trajectoires bien précises. Avec l'épaississement du biofilm, des microgradients (pH, oxygène, nitrate, etc...) se forment et sont à l'origine de la diversification des niches écologiques engendrant ainsi de nouvelles fonctions. Pour la plupart des études écotoxicologiques appliquées aux biofilms phototrophes, la maturation est rarement considérée (Guash et al. 1997; Duang et al. 2010) et la distinction se fait plus généralement à une échelle saisonnière.

## Les objectifs et l'organisation de l'étude

Dans ce contexte scientifique, cette étude vise à améliorer les connaissances dans les domaines de l'écologie (concept de successions écologiques et de relation structure / diversité et fonctionnement) et de l'écotoxicologie (effet d'un herbicide, bio-indication) et de combiner ces deux domaines afin de mieux appréhender les conséquences d'une perturbation d'origine anthropique (présence d'un herbicide) sur la structure/biodiversité d'un compartiment fonctionnel clef (biofilm phototrophe) des écosystèmes aquatiques. Deux grands objectifs sont proposés :

- i) Approfondir nos connaissances en ce qui concerne les effets potentiels d'un herbicide sur les communautés de biofilms phototrophes dans une dimension structurelle et fonctionnelle, dans une optique de les utiliser comme bio-indicateurs de pollution des cours d'eau,
- ii) Intégrer davantage d'écologie dans l'écotoxicologie, en prenant en compte dans la réponse des biofilms à une exposition à un herbicide, l'évolution des communautés liée aux successions écologiques, et donc au degré de maturation du biofilm.

Pour aborder l'ensemble de ces points, ce manuscrit se structure en 3 parties :

**La première partie** concerne une synthèse bibliographique sur un état des lieux de la pollution des écosystèmes aquatiques par les pesticides, ainsi que la présentation des modèles chimiques (alachlore, herbicide de la famille des chloroacétanilides) et biologiques (biofilm phototrophe de rivière) utilisés dans le cadre de ce travail et la justification du choix de ces deux modèles.

**La deuxième partie** présente le volet expérimental de l'étude et les sites naturels. Cette partie vise à justifier le choix des différentes stratégies expérimentales utilisées dans ce travail,

---

l'ensemble de la méthodologie biologique et chimique, et les types d'approches (fonctionnelle et structurelle) utilisées pour évaluer les effets écotoxicologiques et appréhender les successions écologiques.

**La troisième partie** expose en trois chapitres les résultats obtenus, chaque chapitre faisant l'objet de publications parues ou à paraître.

### **Chapitre 1, une relation structure - fonction : un exemple de « service écologique »**

Trois suspensions de communautés microbiennes issues d'habitats différents, deux communautés de biofilms phototrophes, et une communauté de flocs de boues activées, ont été exposées à l'alachlore en microcosmes. Ces deux types de communautés (biofilms phototrophes et boues activées) sont bien connues dans la littérature pour participer à la dissipation des pesticides via des phénomènes de biodégradation ou d'adsorption (Lawrence et al. 2001 ; Stasinakis et al. 2009) au sein des écosystèmes aquatiques. Par leur exposition à l'alachlore réalisée en microcosmes, nous souhaitons vérifier si (i) le processus de biodégradation prédit la chimiodynamique environnementale de l'alachlore en milieu aquatique et si (ii) la  $\beta$ -diversité des communautés microbiennes naturelles d'habitats différents peut expliquer les différences de potentiel de biodégradation de l'alachlore.

### **Chapitre 2, une approche écologique : le concept de successions écologiques**

Le reste de l'étude s'est focalisée sur les communautés de biofilms phototrophes, car comme développé plus haut, leur nature en tant que producteurs primaires, compartiment fonctionnel clef, et leur variété structurelle et fonctionnelle, font de ce type de communautés un outil particulièrement intéressant dans l'étude des relations structure - fonction, thématique en plein essor des enjeux de l'écologie contemporaine. La structure des biofilms phototrophes à l'origine de leur panel de fonctions est contrôlée par deux types de facteurs, les facteurs allogènes, associés aux facteurs externes environnementaux (lumière, température, etc. . . ) et les facteurs autogènes, liés à la maturation du biofilm, qui s'épaissit pour créer des microenvironnements et s'orienter vers un déterminisme autogène. Ainsi, pour appréhender la relation structure - fonction au sein de ces communautés, il est indispensable de comprendre les mécanismes par lesquels les facteurs allogènes et autogènes contrôlent le développement et la trajectoire de successions écologiques des biofilms. A travers une étude *in situ*, intégrant une étape de transplantation, l'importance relative des facteurs autogènes versus les facteurs environnementaux sur la structuration des communautés est analysée. Le phénomène de

transplantation nous a permis de vérifier s'il était possible de modifier la structure des communautés microbiennes et leurs dynamiques temporelles. La deuxième partie de ce chapitre a été réalisée à l'aide d'un prototype de bioréacteur annulaire rotatif, présenté et utilisé pour la première fois dans le cadre de ce travail, sous des conditions environnementales maintenues stables afin d'évaluer la part du déterminisme autogène sur la structuration des biofilms.

### **Chapitre 3, de l'écologie à l'écotoxicologie...**

Dans ce chapitre, nous avons souhaité associer aux études écotoxicologiques classiques, nos connaissances sur les successions écologiques qui apparaissent lors de la structuration du biofilm, afin ne pas assimiler le biofilm à un agrégat statique dépourvu de dynamique intrinsèque mais de le considérer comme un agrégat présentant une structure que l'on peut qualifier d'image transitoire d'une dynamique temporelle prise à un moment donné en tenant compte de trois paramètres : 1) son stade de maturation, 2) son état structurel et 3) son histoire. Chaque paramètre testé fait l'objet d'expériences en microcosmes associées à des stratégies expérimentales bien particulières et des approches analytiques multimétriques afin d'intégrer des niveaux d'organisation biologique différents et des aspects fonctionnels et structurels.

Dans un contexte écologique actuel de perte drastique de la biodiversité, ce travail se propose de contribuer à l'amélioration des connaissances des concepts de successions écologiques en les appliquant à l'écotoxicologie, et tenter de rapprocher l'écologie des communautés avec les fonctionnalités des écosystèmes, visant à évaluer les conséquences potentielles sur le fonctionnement global des écosystèmes.



« L'avenir ne sera pas ce qui va arriver, mais ce que nous allons faire »  
Henri Bergson (1859-1941)

# Partie I

## Synthèse bibliographique

# Modèle biologique d'étude : les biofilms phototrophes de milieux lotiques

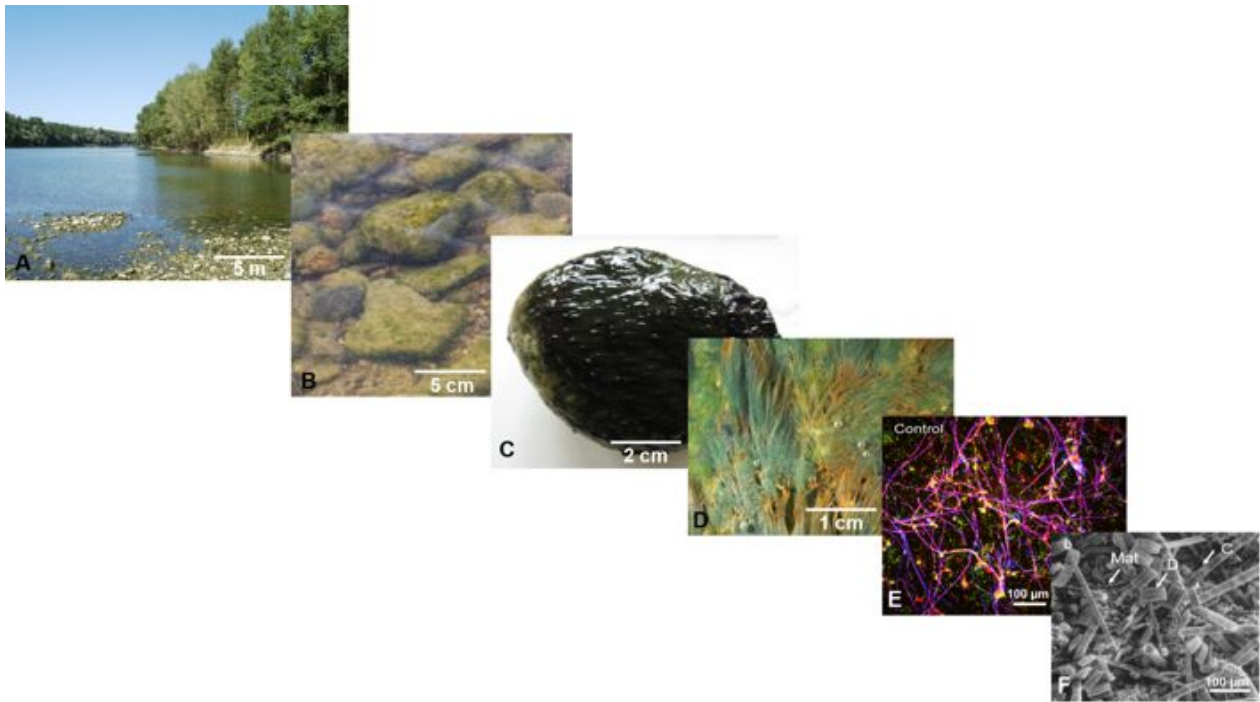
---

## I.1 Présentation

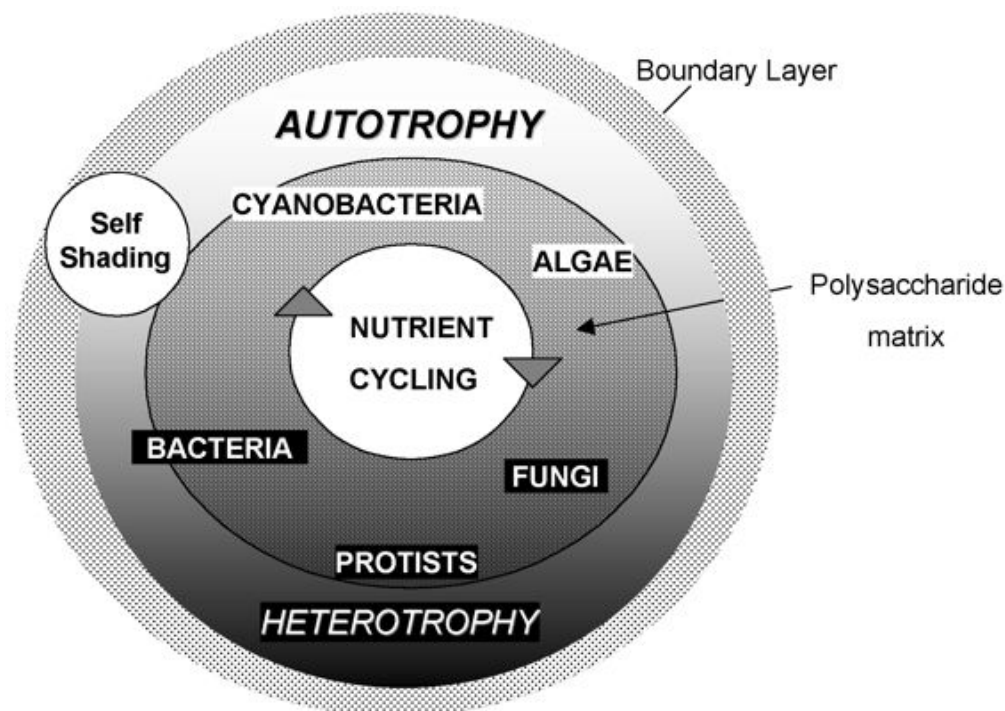
Dans un écosystème aquatique lotique, certains tronçons développent des conditions hydrodynamiques qui ne sont pas propices au développement de la biomasse microbienne sous forme planctonique : les flux de masse d'eau sont tels que le phytoplancton est continuellement « lessivé » vers l'aval (Reynolds et al. 1994). Ces tronçons se caractérisent alors par des biomasses microbiennes agrégées et fixées sur des supports de natures organiques (macrophytes...) ou minérale (sédiments, roches et galets...), créant une interface entre le substrat et la colonne d'eau (Costerton et al. 1995; Nikolaev et Plakunov 2007). Cette fraction microbienne fixée peut représenter jusqu'à 90 % de la biomasse microbienne totale contenue dans ce tronçon (Pyl'nik et al. 2007). Par exemple, Lock et al. (1984) a mesuré une biomasse bactérienne dans un ruisseau de l'ordre de  $6 \times 10^6$  à  $2 \times 10^8$  cellules fixées  $\text{cm}^{-2}$  sur les substrats contre seulement  $2,4 \times 10^5$  à  $1,6 \times 10^6$  cellules planctoniques  $\text{mL}^{-1}$  dans la colonne d'eau.

Ces assemblages microbiens (**Figure 1**) sont composés de divers micro et méso-organismes procaryotes et eucaryotes, autotrophes et hétérotrophes, enchevêtrés dans une matrice d'exopolymères (Wetzel 1993), et contiennent de façon transitoire des macro-organismes (oligochètes, larves d'insectes aquatiques) (**Figures 2 et 4**). Ces communautés fixées sont traditionnellement désignées sous le terme de « périphyton », après avoir longtemps été nommées en Europe sous le terme de « Aufwuchs » qui signifie en allemand « se développer ». Le terme « périphyton » est souvent employé par les auteurs pour ne se référer le plus souvent qu'au compartiment algal de l'assemblage microbien ne considérant ainsi que son rôle de producteur primaire (par exemple : Stevenson et al. 1996). Par la suite, à partir des travaux de Lock et al. (1984), le « périphyton » est étudié et considéré dans toute sa dimension microbiologique (e.g. Romani et Sabater 2000; Battin et al. 2003a; Olapade et Leff 2005).

Le concept générique de « biofilm » a été introduit et proposé par Costerton et al. en 1987, qu'il qualifie alors « de simples cellules ou de micro-colonies de cellules sœurs toutes enchâssées dans une matrice hautement hydratée principalement anionique d'exopolymères bactériens



**Figure 1** – Echelles d’observation de biofilms phototrophes naturels : à l’échelle (A) du tronçon de rivière, (B) et (C) du substrat de type galet, (D) de la loupe binoculaire (LEICA M212 avec une caméra LEICA DFC320), (E) et (F) microscopique



**Figure 2** – Représentation en diagramme d’un biofilm phototrophe (ou périphyton) selon Burns et Ryder (2001)

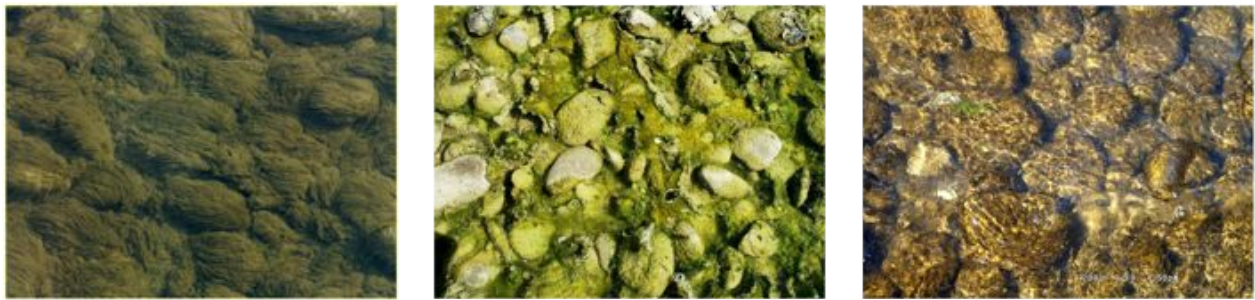
et piégées dans des macro-molécules externes ». Il faut reconnaître que ces communautés, composées d'une à plusieurs espèces, sont souvent associées à des enjeux sociétaux, car elles sont retrouvées dans différents environnements (lacs, rivières, réseaux de distribution d'eau potable, échangeurs thermiques...), et sur une multitude de supports (macrophytes, galets, dents, canalisations, coques de bateau...). Wimpenny et al. (2000) qualifient les biofilms de « ville microbes » ou de « vie en société » (Fletcher et Marshall 1982). Comme souligné par Boulêtreau (2007), « la complexité structurelle et fonctionnelle de l'agrégat est associée à l'idée de biofilm ». Ainsi pour la suite de l'étude, le terme de « périphyton » si souvent employé dans la littérature sera remplacé par le terme « biofilm phototrophe ».

Les biofilms phototrophes qui se développent aux interfaces substrat / colonne d'eau au sein des écosystèmes aquatiques sont un type particulier de biofilms observés quand certaines conditions sont réunies, dépendant de la couche limite (Rasmussen et Lewandowski 1998), la lumière, la vitesse de courant, la hauteur d'eau, les nutriments, et la présence de support de colonisation. Ces biofilms sont constitués d'une forte composante de micro-organismes photo-autotrophes qui leur confère une coloration variant du vert au brun et associée à une variété d'aspects d'un feutrage plus ou moins filamenteux (**Figure 3**). Ces agrégats peuvent donc prendre différentes apparences selon la composition des espèces, la lumière et l'hydrodynamique (Wetzel 1983). En effet, une communauté d'organismes photo-autotrophes peut représenter jusqu'à 30 % de la masse en carbone de biofilms phototrophes (biofilms épilithiques, Lyautey 2005). De plus, dans les eaux « claires », la production microbienne totale peut résulter d'une contribution des biofilms phototrophes jusqu'à 77 % supérieure à celle du phytoplancton (Liboriussen et Jeppesen 2003).

Les termes « biofilm phototrophe » ou « périphyton » désignent « des communautés attachées » sans qualifier le type de support sur lequel se fixe l'assemblage. Un terme plus spécifique est attribué à chaque type de substrat (Aloi 1990; Townsend et Gell 2005) : galet et aux autres surfaces minérales : épilithon ou biofilm épilithique, sédiment : épipelon, macrophyte : épiphyton ou biofilm épiphytique, bois : épixylon et sable : épipsammon.

Ce mode de vie sessile est reconnu pour être majoritaire dans les milieux naturels (Watnick et Kolter 2000) et peut être considéré comme une stratégie de développement. Les biofilms sont des communautés où les micro-organismes interagissent entre eux (Davey et O'Toole 2000), et à l'intérieur desquels « les propriétés des communautés sont plus importantes et plus variées que la somme des propriétés de chacun des micro-organismes » (Sutherland 2001). En effet, les biofilms phototrophes sont à considérer comme un système complexe et non seulement comme la somme des espèces présentes, parce que les micro-organismes





Filamentous diatoms and  
Chlorophytes

Blue-green algae and  
Chlorophytes (crustous and  
filamentous)

Filamentous  
Diatoms

**Figure 3** – Exemple de différents aspects et apparences possibles des biofilms phototrophes se développant sur des galets (biofilms épilithiques) (extrait et modifié de Rols et Garabetian 2004)

interagissent et se développent de manière inter-dépendante (Barranguet et al. 2004). Quel que soit l'environnement, ce mode de vie apporte de nombreux avantages :

- Protection contre les changements environnementaux et toutes autres perturbations ;
- Possibilité de réaliser du « *Quorum sensing* », qui correspond à des mécanismes de synchronisation de l'expression (ou de la répression) de gènes particuliers. Un signal moléculaire appelé auto-inducteur est libéré dans l'environnement de la cellule, suite à ce signal l'expression de certains gènes est induite (Redfield 2002) ;
- Grande efficacité pour capter les nutriments, dégrader certains composés (Jefferson 2004 ; Lawrence et al. 2001) ;
- Nombreuses interactions : protection, mutualisme, compétition (MacLeaod et al. 1990 ; Paerl et Pinckney 1996) ;
- Stabilisation de la communauté (Jefferson 2004) ;
- Présence d'un grand nombre de gradients, pour l'oxygène, le pH... permettant ainsi une diversité importante des micro-habitats physiques, donc des niches écologiques ;
- Agencement vertical favorisant les échanges horifontaux du matériel génétique (Ghigo 2001) ;
- La présence des exopolymères (EPS pour « *extracellular polymeric substances* » en anglais) constituant la matrice organique du biofilm. Les EPS, qui sont composés de polysaccharides et de protéines, et dans la plupart des cas d'acides nucléiques, de lipides et autres biopolymères (Flemming et Wingender 2001), confèrent de nombreux avantages aux biofilms, quelle que soit leur nature (Vu et al. 2009). Les EPS améliorent l'attachement des micro-organismes sur les supports (Costerton et al. 1987), présentent un rôle de barrière de diffusion (Freeman et Lock 1995), et favorisent l'atténuation des stress environnementaux (Flemming 1995 ; Davies 2000). Ils sont le siège de liaisons

possibles de colloïdes, de composés inorganiques et organiques (Wolfaardt et al. 1995 ; Romani et al. 2004), particulaires ou dissous, de leur bioaccumulation (Wang et al. 2002) pouvant mener à leur métabolisation progressive par des enzymes extracellulaires, et une protection contre les organismes brouteurs (Lawrence et al. 2002 ; Barranguet et al. 2005). Les EPS contiennent une grande quantité d'enzymes extracellulaires. Pour des biofilms jeunes, les enzymes des EPS représentent 65 à 81 % de l'activité totale des enzymes du biofilm contre 13 à 37 % pour des biofilms plus matures (Romani et al. 2008). En réalité, cette capacité à créer des liaisons est un moyen de se protéger de la présence de polluant, comme la présence de métaux lourds (Kucera et al. 2008). Cette matrice agit également sur la structuration, l'architecture (Battin et al. 2003b) et apporte une certaine stabilité à l'agrégat (Flemming et al. 2000).

Au sein des biofilms phototrophes, il existe d'étroites interactions entre les algues et les bactéries (Rier et Stevenson 2002 ; Gao et al. 2005 ; Romani et al. 2004 ; Carr et al. 2005). Ces interactions peuvent être de différentes natures, compétition, synergie, prédation, etc. . . . Les organismes autotrophes peuvent utiliser les nutriments provenant de la matière organique dégradée par les hétérotrophes. Ces derniers peuvent utiliser les exsudats des algues mortes ou de la lyse cellulaire (Romani et Sabater 2000). Il y a une inter-dépendance entre hétérotrophie et autotrophie. Le long d'un écosystème aquatique lotique, il y a des modifications des conditions amont-aval avec des différences d'un point de vue nutriments, type de substrats, apports de pollutions anthropiques. . . à l'origine d'une mosaïque d'habitats avec des gradients verticaux (Stanford et Ward 1988) ou horizontaux (Junk et al. 1989). D'après le concept de continuum fluvial proposé par Vannote et al. (1980), les conditions favorables pour le développement des biofilms phototrophes en milieu lotique sont rencontrées dans les cours d'eau de tailles intermédiaires (de l'ordre de 3 à 7 selon le classement de Strahler (1957)) (**Figure 5**).

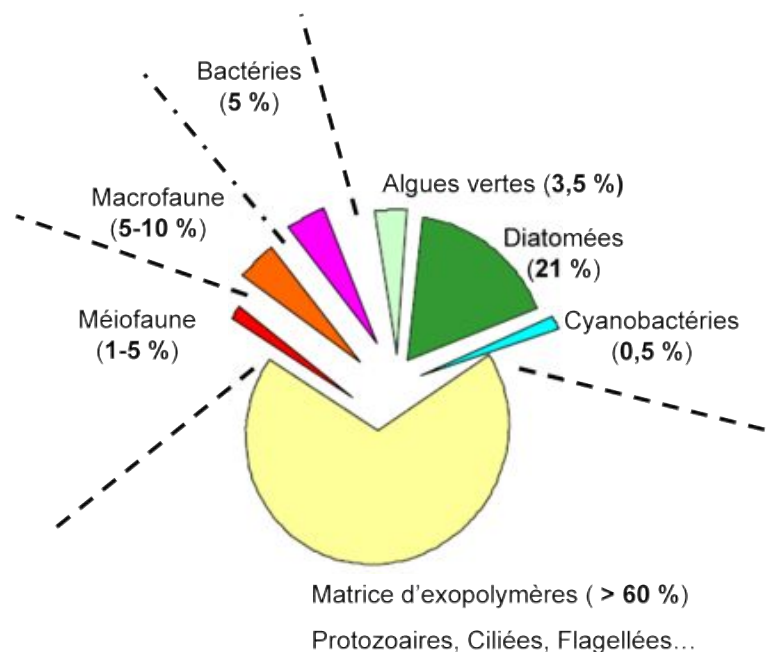
## **I.2 Le développement d'une entité structurale et fonctionnelle dynamique**

### **I.2.1 Les facteurs influant le développement des biofilms phototrophes**

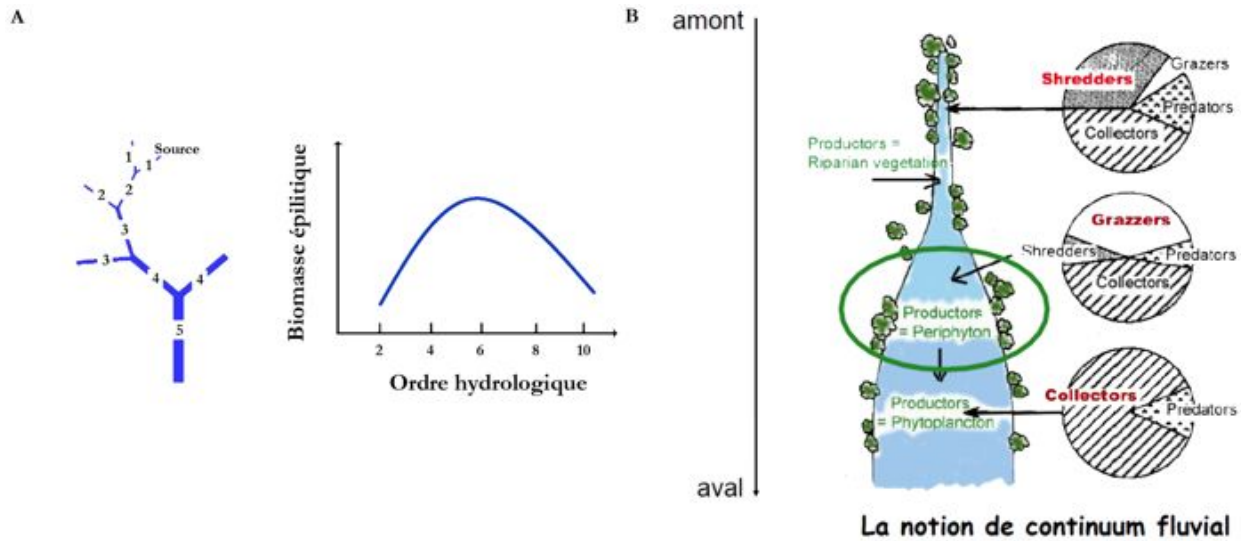
Les biofilms phototrophes sont influencés par deux grands groupes d'effets, les effets dits primaires et secondaires (Fechner 2010). Les effets primaires sont observés à courts termes, parmi ces effets nous pouvons citer la présence de ressources qui peuvent engendrer des mo-

<b>Microorganismes photoautotrophes</b>				
		69 espèces	Rivière, Canada	Elster et al. (1997) <i>Archiv für Hydrobiologie</i> 119:57-93
		76 taxons	Rivière, France	Lyautey (2005) <i>Th Doc. Univ. Toulouse 3</i> , 182pp
	Diatomées	57 taxons	Rivière, Nouvelle Zélande	Biggs & Smith (2002) <i>Limnol Oceanogr</i> 47:1175-1186
	Cyanobactéries	19 taxons		
	Chlorophycées	19 taxons		
	Rhodo et Xanthophycées	< 3 taxons		
	Diatomées	145 espèces	Rivière, Idaho, USA	Cushing et al. (1983) <i>Holarct. Ecol.</i> 6: 221-227
	Diatomées	210 espèces	Rivière, France	Eulin & Le Colan (1998) <i>Archiv für Hydrobiologie</i> 143:79-106
<b>Microorganismes eucaryotes</b>				
Ciliés	Péritriches		Rivière, Suisse	Stoessel (1989) <i>Aquatic Sciences</i> 51:235-248
	Peritricha, Suctoria	122 espèces	Rivière, Europe centrale	Nosek & Bereczky (1982) <i>Developments in Hydrobiology</i> 17:55-58
Rotifères	Monogononta	76 espèces	Rivière, Roumanie	Modenutti & Claps (1989) <i>Limnologia</i> 19:167-175
<b>Bactéries</b>				
	Cytophaga, Flavobacterium		Rivière, Japon	Morikawa (1987) <i>Jap. J. Limnol</i> 48:55-65
	β-Protéobactéries, CFB		Rivière, Allemagne	Brümmer et al. (2000) <i>Appl. Environ Microbiol</i> 66: 3078-3082
		20 OTU*	Rivière, Japon	Araya (2003) <i>FEMS Microbiol. Ecol.</i> 43:111-119
		23 OTU*	Rivière, France	Lyautey (2005) <i>Th Doc. Univ. Toulouse 3</i> , 182pp
<b>Macroorganismes</b>				
	Insectes, Oligochètes	17 à 35 taxons	Rivière, France	Lyautey (2005) <i>Th Doc. Univ. Toulouse 3</i> , 182pp

\* Operational Taxonomic Unit



**Figure 4** – Répartition type en micro-organismes présents au sein de biofilms épilithiques (HDR, Garabétian 2006) (illustration du haut), exemple pour des biofilms épilithiques de la Garonne (illustration du bas) (extrait et modifié de cours M2R FEA UPS 2010)



**Figure 5** – La zonation d'un hydrosystème fluvial (A, Garabetian 2009) et le concept du continuum fluvial avec les conditions favorables pour le développement de biofilm phototrophe (B, extrait de cours M2R FEA UPS 2010)

difications au niveau de la croissance, des activités enzymatiques, ou même de l'intégrité physique de cellules (Stevenson et al. 1996). Les effets secondaires sont observés à une plus grande échelle des écosystèmes lotiques, parmi ces facteurs nous pouvons citer l'hydrologie, l'occupation des sols (Biggs et Thomsen 1995; Biggs 2000). Au sein des effets primaires, il existe deux familles de facteurs qui influencent la structuration et le fonctionnement des biofilms phototrophes, les facteurs abiotiques et biotiques. Les facteurs abiotiques regroupent les conditions environnementales, la lumière, le pH, la température, le type de substrats, les conditions hydrodynamiques, etc. Les facteurs biotiques regroupent les interactions intrinsèques au biofilm, comme la prédation, la compétition, l'allélopathie, etc. L'ensemble des effets et des facteurs est représenté par Burns et Ryder (2001) (**Figure 6**). Suivant leurs natures et s'ils peuvent être sources ou non de perturbations, ils peuvent engendrer soit une phase d'accrétion en favorisant la croissance (lumière, nutriments), soit une perte de biomasse (broutage, épisode de crue). L'ensemble de ces facteurs modifie la balance et l'équilibre entre les microorganismes autotrophes et hétérotrophes (Lock et al. 1984). Réaliser une description exhaustive de l'ensemble des facteurs qui participent au contrôle de la structure et du fonctionnement des biofilms phototrophes serait longue et inutile ici. Par la suite, nous détaillerons uniquement les quelques facteurs pris en considération durant les approches expérimentales en laboratoire.

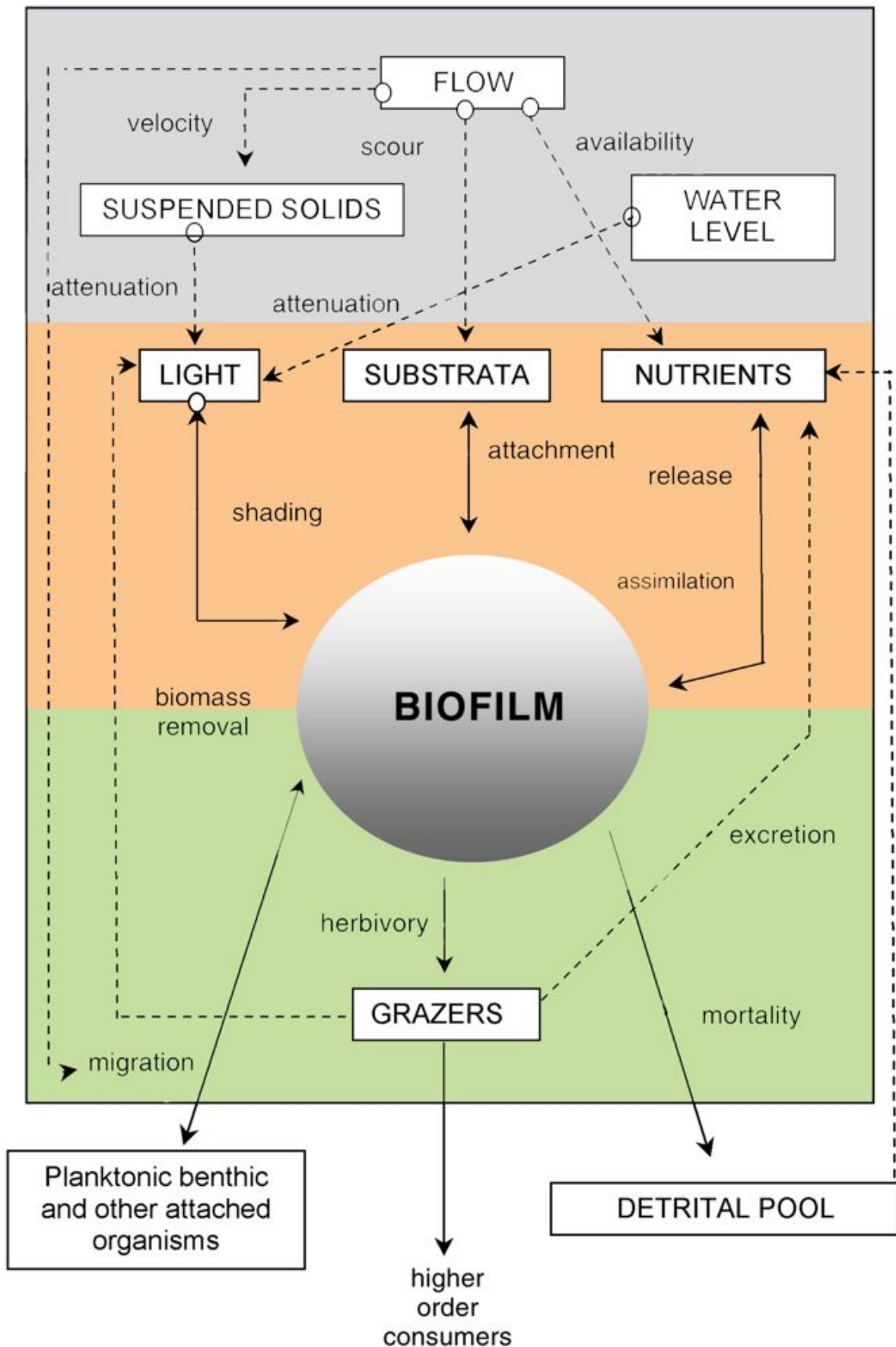


Figure 6 – Les différents facteurs influençant la croissance du biofilm phototrophe (extrait de Burns et Ryders 2001)

**I.2.1.1 La lumière**

Un des facteurs les plus importants, elle constitue une ressource indispensable qui permet la présence du compartiment phototrophe au sein du biofilm. Bothwell en 1993 qualifie même ce paramètre de « *critical factor* » des études en microcosme qui traitent des biofilms phototrophes et Janssen et al. (2003) l'ont désigné comme jouant un rôle clef au sein des photo-bioréacteurs. La quantité et la qualité de la lumière contrôlent la composition et les proportions des communautés algales (Mosisch et al. 2001 ; Roberts et al. 2004). Les diatomées prédominent dans les ruisseaux ombragés alors que les algues vertes vont prédominer dans les ruisseaux plus ouverts (Guasch et al. 1995 ; Sekar et al. 2002). Les effets de la lumière sont souvent associés à des formes de croissance différentes (Steinman et al. 1992). Ces paramètres sont influencés par la profondeur d'immersion des supports de colonisation (hauteur de la colonne d'eau), la turbidité, le couvert végétal, etc (Ricart et al. 2009). La relation entre l'intensité lumineuse et la photosynthèse ne suit pas une relation linéaire, elle se caractérise par une augmentation, une saturation puis une inhibition, bien que la saturation semble être un mécanisme relativement rare (Hillebrand 2005).

Une corrélation positive entre la photosynthèse et l'intensité lumineuse a été enregistrée pour des gammes d'intensité lumineuse comprises entre 100 et 400  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (Boston et Hill 1991) et pour des valeurs  $> 500 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , un effet inhibiteur était observé (Guasch et al. 1995). Une intensité lumineuse faible génère souvent une quantité de biomasse plus faible (Guasch et al. 1995 ; Sultana et al. 2004 ; Zippel et al. 2007), associée également à un taux de croissance plus lent (Zippel et Neu 2005). Hill et al. (1995) obtiennent une quantité de biomasse 1,3 fois supérieure sur un site plus éclairé. La lumière est un facteur important dans le sens où elle agit directement sur les mécanismes de la photosynthèse (transformation de l'énergie lumineuse en source de carbone organique), conditionne le caractère de producteur primaire des biofilms phototrophes et ainsi confère des impacts sur l'ensemble du réseau trophique (Dodds et al. 1996 ; Hill et al. 1995) aussi bien qu'au niveau des mécanismes de rétention du phosphore (Steinman et al. 1995) et du carbone organique dissous (Romani et al. 2004). De même, des études ont pu montrer que la lumière pouvait influencer la réponse du biofilm phototrophe à une contamination par des pesticides (Guasch et Sabater 1998). L'intensité lumineuse est susceptible d'affecter indirectement la structure des communautés bactériennes (Lyautey 2005 ; Rier et al. 2006) et les relations entre les compartiments algal et bactérien (Ylla et al. 2009). De même, Roeselers et al. (2007) ont suggéré que l'influence de la l'intensité lumineuse était plus importante durant la phase initiale du développement du biofilm. Ils observent en produisant du biofilm phototrophe dans un canal que (i) sous de fortes conditions lumineuses, les espèces colonisatrices sont majoritairement des algues

vertes (affiliées au genre *Scenedesmus*) et que (ii) sous de faibles conditions lumineuses, les espèces colonisatrices sont majoritairement des bactéries hétérotrophes (affiliées à la classe des *Betaproteobacteria*) ce qui augmente la durée de la phase initiale de colonisation. Ainsi, la durée de la phase initiale de colonisation augmente avec la diminution de l'intensité lumineuse (Zippel et Neu 2005).

### I.2.1.2 Les teneurs en nutriments

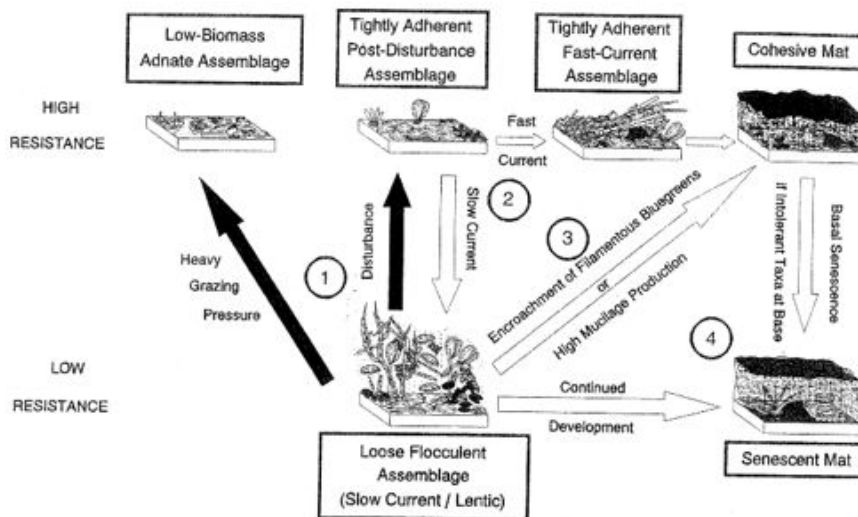
Tout comme l'intensité lumineuse, une relation positive entre les nutriments et la biomasse est souvent observée (Dodds et al. 2002). De nombreuses études décrivent une augmentation des niveaux de biomasse (MS ou chlorophylle *a*) et de la productivité des biofilms avec une augmentation des teneurs en N et P (Biggs et Close 1989; Dodds et al. 1997). D'ailleurs il a été mis en place un classement des milieux lotiques et lenticques suivant leurs niveaux de concentration en P, basé sur les seuils de concentration des biofilms phototrophes en chlorophylle *a* (mésotrophe, eutrophe et oligotrophe, Dodds (2003)). Il apparaît que la taille des cellules d'algues change en relation avec le niveau trophique. Dans un environnement riche en nutriments, la proportion d'algues qui présentent de grandes tailles cellulaires est plus importante, avec une relation positive entre la taille moyenne des cellules algales et les teneurs en phosphore total (Fechner 2010). Le ratio des nutriments influence la composition des communautés algales (Hillebrand et Sommer 2000a). Un enrichissement en nutriment est susceptible de diminuer la richesse de nombre de taxa algaux en favorisant la dominance d'une seule espèce (Hillebrand et Sommer 2000b).

L'assimilation des nutriments par les micro-organismes du biofilm est fortement liée à la couche limite (en anglais, « *diffuse boundary layer* »), c'est l'interface entre le biofilm et l'eau avoisinante du biofilm (Rasmussen et Lewandowski 1998). Cette même couche limite est d'autant plus fine que la vitesse de cisaillement au contact du biofilm est forte, résultant de vitesses de courant élevées sur un radier plat.

### I.2.1.3 Les conditions hydrodynamiques

L'hydrodynamique a une grande influence sur la biomasse, elle peut entraîner des modifications physiques (Biggs et Close 1989), voire même des détachements partiels ou complets de la biomasse. Ces processus sont parfois à l'origine d'une réinitialisation du cycle de la biomasse (Biggs 1996; Boulétreau et al. 2006) et contrôlent la composition en espèces algales et bactériennes (Biggs et Thomsen 1995; Battin et al. 2003b; Francoeur et Biggs 2006). Des valeurs élevées de vitesse de courant peuvent engendrer des réductions de biomasse soit par des effets de cisaillement (Biggs et Thomsen 1995) soit par des phénomènes d'abrasion dus

à la présence de matières en suspension (Francoeur et Biggs 2006). Des études montrent qu'une vitesse de courant importante engendre (i) une croissance plus rapide de la biomasse, (ii) des activités métaboliques plus élevées et (iii) une couche limite de diffusion plus fine (Biggs et Thomsen 1995). Une variation au niveau des régimes hydrodynamiques ou une hétérogénéité spatiale de l'écoulement facilitent également une grande diversité (Singer et al. 2010; Villeneuve et al. 2011b) avec l'apparition de nombreuses niches écologiques. Il semblerait qu'un biofilm qui se développe sous des conditions de vitesse de courant faible, présente un assemblage plus ouvert et moins compact et une sensibilité à une perturbation provenant de la colonne d'eau plus importante (**Figure 7**) (Stevenson et al. 1996). De même, ils sont plus épais, riches en diatomées avec une sinuosité de surface plus importante, que les biofilms colonisés sous des conditions de fort courant (Battin et al. 2003b).



**Figure 7** – L'influence de la vitesse du courant sur la structure tridimensionnelle des biofilms phototrophes et leur résistance face à une perturbation physique (extrait de Stevenson et al. 1996)

Les barrages par exemple atténuent l'amplitude des variations du régime hydrologique, et ainsi l'hétérogénéité des habitats physiques (= micro-habitats), ce qui engendre une réduction de la diversité (Licursi et Gomez 2009). La vitesse du courant n'a pas que des effets sur les algues (Biggs et Stokseth 1996; Ghosh et Gaur 1998; Besemer et al. 2007) mais également sur les bactéries, en terme de diversité, de composition ou de structure (Battin et al. 2003b; Villeneuve et al. 2010).

Pour conclure ce facteur ne fait pas que contrôler la diversité et la structure, il influence également l'architecture du biofilm phototrophe (Battin et al. 2003b).

#### I.2.1.4 La température

La température va influencer principalement la croissance du biofilm dans le sens où ce paramètre agit sur les cinétiques des réactions biochimiques, incluant la dégradation de



la matière organique (Kirchman et Rich 1997). Les variations de température sont souvent liées à des changements saisonniers (Vis et al. 1998 ; Brümmer et al. 2003). Il a été montré que des températures comprises entre 0 et 25°C augmentaient la richesse spécifique et des températures supérieures à 30°C la diminuaient (DeNicola 1996). Parmi les facteurs abiotiques qui peuvent affecter la structure des biofilms phototrophes, nous pouvons citer la salinité, le pH, la présence de molécules toxiques (Stevenson et al. 1996). L'impact de ces facteurs sur les communautés de biofilms phototrophes comme ceux précédemment cités, dépend de la tolérance et des conditions optimales de développement de chaque espèce.

### I.2.1.5 Les substrats de colonisation

Des études montrent que la nature des supports de colonisation, naturelle ou artificielle, influence fortement la quantité de biomasse et la composition du compartiment algal. Certains auteurs observent des différences entre les biofilms développés sur des supports naturels ou artificiels, illustrées par des richesses spécifiques plus faibles pour des biofilms provenant de supports artificiels (Barbiero 2000), des abondances différentes de cyanobactéries, d'algues vertes (Cattaneo et Amireault 1992) et de diatomées (Barbiero 2000), ou des textures à une échelle microscopique différente (Murdock et Dodds 2007). Des résultats contradictoires sont observés entre des supports naturels et artificiels pour des communautés de diatomées (Eulin et Le Cohu 1998). La taille et la nature (Danilov et Ekelund 2001) du substrat sont également importantes, les substrats fins comme le sable produisent des biofilms plus compacts, dominés par des diatomées motiles et des cyanobactéries, et des quantités de biomasse moins importantes, alors que les substrats plus grossiers comme les galets supportent la croissance de biofilms plus riches en biomasse et plus aérés et dominés par des algues filamenteuses (Cattaneo et al. 1997). Par contre, la taille moyenne des algues semble indépendante de la taille du substratum (Cattaneo et al. 1997).

L'utilisation de substrat artificiel est très appréciée lors des investigations sur les biofilms phototrophes de milieux lotiques pour plusieurs raisons :

- Limiter l'hétérogénéité intra-site (Cattaneo et Amireault 1992). Les biofilms ont la particularité d'être très hétérogènes lorsqu'ils se développent sur les substrats naturels (Townsend 1989 ; Lear et al. 2008) ;
- Faciliter les prélèvements *in situ*, le surfaçage des supports et leur transport jusqu'au laboratoire ;
- Maîtriser le temps de production des biofilms phototrophes et ainsi en connaître l'âge et le degré de maturation (Meier et al. 1983).

Généralement, les supports artificiels sont très souvent utilisés pour disposer directement dans les micro/mésocosmes des supports préalablement colonisés par du biofilm phototrophe en milieu naturel (Pérès et al. 1996 ; Schmitt-Jansen et Altenburger 2005). Murdock et Dodds (2007) ont révélé l'importance de l'orientation et de la rugosité du substrat comme un facteur influençant le développement du biofilm. D'un point de vue global, la position verticale des supports engendre des biomasses plus faibles de 35 % par rapport aux substrats positionnés à l'horizontale. De plus, la biomasse algale est plus faible sur des substrats avec des surfaces plus lisses telles que le verre (30 % de biomasse en moins par rapport au galet de rivière). Ainsi les supports plus rugueux (Clifford et al. 1992 ; Sanson et al. 1995) et placés à l'horizontale (Knott et al. 2004 ; Kralj et al. 2006) permettent une accumulation plus importante de biomasse algale comme observée également pour d'autres types de substrats (Vandermeulen et Dewreede 1982). La quantité de biomasse algale peut également être liée à la taille du support (Watermann et al. 1999 ; Luttenton et Baisden 2006) ainsi qu'à sa stabilité (Cattaneo et al. 1997). Il arrive souvent que l'accumulation de biomasse se fasse dans un premier temps sur les frontières plutôt que dans la surface intérieure du substrat (Murdock et Dodds 2007).

### I.2.1.6 Les facteurs biotiques

Parmi les nombreux facteurs biotiques susceptibles d'influencer la structure et le fonctionnement des biofilms phototrophes, nous pouvons citer :

- Le broutage (Lawrence et al. 2002 ; Wellnitz et Rader 2003) qui souvent est responsable d'une perte de biomasse, susceptible d'engendrer des micro-habitats vacants et donc de nouvelles niches écologiques ;
- Les produits allélochimiques qui sont sécrétés par les micro-organismes phototrophes comme moyen de défense, agissant comme un moyen de dissuasion, une toxine, ou un inhibiteur. Ces produits sont appelés composés allélopathiques quand ils inhibent les concurrents et composés allélochimiques quand ils sont libérés pendant le pâturage (Leflaive et al. 2008) ;
- La lyse virale (Lyautey 2005) qui peut avoir des effets sur la mortalité bactérienne et affecter ainsi l'abondance, la diversité et la densité bactérienne, et l'intégrité de la matrice d'EPS. Des virus ont été enregistrés comme spécifiques aux algues.

Il est important de garder à l'esprit qu'aucun de ces facteurs n'est prépondérant, c'est l'ensemble des conditions environnementales et les interactions au sein même du biofilm (liées à la composition), qui contrôlent la structure des biofilms phototrophes. Les effets engendrés par ces facteurs vont dépendre de l'intensité des changements et de la tolérance des communautés, c'est-à-dire des conditions optimales de croissance de chaque espèce. De

nombreuses études essayent d'appréhender les effets de couplage de plusieurs facteurs afin d'être le plus réaliste possible (Villeneuve et al. 2010 et 2011c).

Il est délicat de vouloir dissocier ces deux types de facteurs biotiques et abiotiques, comme souligné par Boulêtreau (2007), il est préférable de parler « d'un double contrôle sur la structure et le fonctionnement des communautés » par des facteurs allogènes, considérés comme extrinsèques aux biofilms (broutage, lumière, température, nutriments, hydrodynamique...) et prédominant sur un biofilm jeune, et les facteurs autogènes intrinsèques au biofilm (broutage, compétition, allélopathie...) et prédominant sur un biofilm mature. Le stade mature des communautés peut être qualifié d'« isolement physique » vis-à-vis de la colonne d'eau. Les processus internes au biofilm peuvent parfois avoir plus d'importance en termes d'effets comme l'observe Schmid-Araya et Schmid (2000) pour le broutage, et Romani et Sabater (2000) pour les nutriments.

### I.2.2 Le concept de succession écologique

Comme précisé par Fierer et al. (2010), les successions écologiques se définissent par « la manière un peu ordonnée et prévisible par laquelle les communautés changent avec le temps suite à la colonisation d'un nouvel environnement ». Nous pouvons rajouter à cette définition comme précisé par Lyautey (2005) que ces changements temporels « conduisent à un équilibre de la communauté nommé climax ». Les recherches sur la compréhension de ces successions se sont focalisées dans un premier temps sur les macro-organismes terrestres (macrophytes par exemple, Clements 1916 ; Prach et Walker 2011). Des limites d'ordre méthodologique rendent difficile la compréhension des successions microbiennes en milieu aquatique, vu leur haute diversité et leur capacité à répondre très rapidement à tout changement environnemental. Avec le développement d'outils moléculaires, la tendance s'est inversée (Fierer et al. 2010).

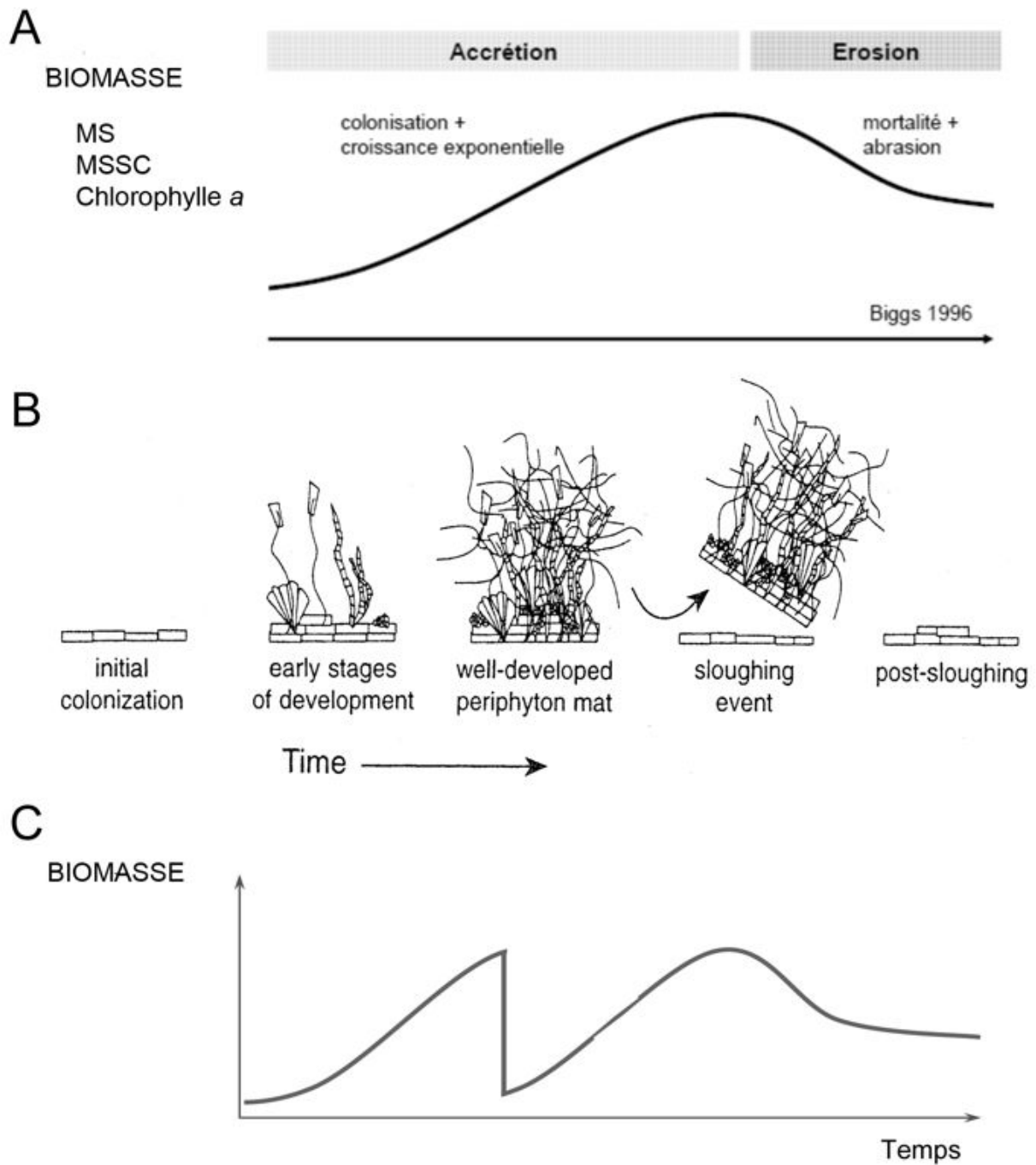
#### I.2.2.1 Dynamique temporelle de la biomasse

Le suivi de l'évolution temporelle de la biomasse des biofilms phototrophes peut s'appréhender à court (< 2 mois) ou long terme (> 2 mois) (Biggs et Stokseth 1996). Dans le cadre de notre travail, nous nous focalisons uniquement sur la dynamique à court terme. Cette dynamique a été conceptualisée par Biggs (1996) via son modèle d'évolution temporelle de la biomasse (matière sèche, matière sèche sans cendre, et chlorophylle *a*) (**Figure 8A et B**). Classiquement, la croissance des biofilms se produit en deux étapes, une phase d'accrétion suivie d'une phase d'érosion. La phase d'accrétion se caractérise par la colonisation d'un substrat vierge (croissance horizontale), puis par la croissance exponentielle de la biomasse du biofilm associée à son épaissement (croissance verticale) (Biggs et Stokseth 1996). Les niveaux de

biomasse atteints par les biofilms sont très variables spatialement (Dodds et al. 1998). Cette quantité de biomasse est souvent liée au niveau trophique et la lumière (Biggs 2000). Le temps nécessaire pour atteindre des pics de biomasse est le plus souvent de l'ordre de 4 à 6 semaines, mais il dépend également des facteurs environnementaux et de la composition du biofilm. Des biofilms riches en algues vertes présentent souvent des taux de croissance plus rapides (Zippel et Neu 2005). Vient ensuite la phase d'érosion qui se matérialise par une perte rapide de biomasse engendrée soit par une perturbation (crue ou broutage, par exemple), soit par des phénomènes d'auto-détachement causés par un passage de l'autotrophie vers une hétérotrophie (Boulêtreau et al. 2006). L'auto-détachement ne se produit que très rarement en milieu naturel (Boulêtreau et al. 2006) (**Figure 8C**).

Ce concept de succession d'espèces a été appliqué aux biofilms phototrophes pour les fractions algale (Setenson et Peterson 1991 ; McCormick et Stevenson 1991 ; Biggs et al. 1998 ; Wellnitz et Rader 2003) et bactérienne (Jackson 2003 ; Lyautey et al. 2005a). Ces successions s'expliquent en partie par les propriétés des espèces impliquées (mode de reproduction, taille des organismes et stratégies énergétiques, Lyautey et al. 2005). Les premières espèces à coloniser un support vierge sont souvent de petite taille avec des taux de croissance rapides, elles sont qualifiées d'espèces à stratégie *R*. Ces colonisateurs vont modifier l'environnement afin de favoriser les développements d'espèces de taille plus grosse avec des vitesses de croissance plus lentes. Ces populations présentent des stratégies *C* et *K* (Biggs et al. 1998). Ainsi les successions des populations sont influencées par des interactions biologiques. Ces interactions deviennent de plus en plus prédominantes avec la maturation du biofilm associée à une épaisseur telle que les échanges avec la colonne d'eau sont limités (Watnick et Kolter 2000 ; Wimpenny et al. 2000 ; Martiny et al. 2003). A ce stade de la croissance du biofilm, les successions suivent un déterminisme autogène (Lyautey 2005).

Les espèces bactériennes colonisatrices de stratégie *R*, au taux de croissance rapide, présentent les traits d'adaptions suivants : elles sont aérobies, présentent des propriétés d'adhésions actives, et sont qualifiées de généralistes et d'ubiquistes (Lyautey et al. 2005a). Par opposition, les espèces compétitrices, de stratégie *K*, au taux de croissance lent, sont des espèces aérobies facultatives à anaérobies strictes, qualifiées de recycleurs et de producteurs d'agent antimicrobiens. Associé à ces différentes stratégies de développement, les biofilms jeunes se caractérisent par de nombreuses interactions avec les eaux oxygénées, de nombreux espaces libres et une alimentation en nutriment par l'eau, et les biofilms plus matures se caractérisent par une diffusion de l'oxygène limitée, l'apparition de micro-gradients sur la hauteur du biofilm.



**Figure 8** – Dynamique de la biomasse comme décrite par la chlorophylle *a*, la MS (matière sèche) ou la MSSC (matière sèche sans cendre), selon le modèle proposé par Biggs (1996) (A = extrait de Boulêtreau (2010) ; Schéma conceptuel de l'évolution temporelle de la biomasse (B = extrait de Sigeo 2005 d'après Tuchman et al. 1996 ; Profil de l'évolution temporelle de la biomasse microbienne le plus souvent observé en milieu naturel, avec présence de deux successions, primaire et secondaire (C = extrait de Garabetian 2009)

### I.2.2.2 Dynamique temporelle du compartiment algal

Pour le compartiment algal, des études montrent que typiquement les espèces qui viennent coloniser en premier le substrat vierge sont les algues de petites tailles, très mobiles et souvent des diatomées (Eulin et Le Cohu 1998) (stratégie *R*). Mais cette tendance peut varier, Szlauer-Lukaszewska (2007) observaient une dominance des diatomées au sein de leurs biofilms matures (> 12 semaines) colonisés sur des supports artificiels. Notons que la phase de colonisation est un processus aléatoire. La colonisation se poursuit, facilitée par les premiers colonisateurs, par la fixation d'espèce d'algues avec des cellules plus grosses, moins mobiles et présentant des stratégies *C*, tels que les chlorophycées, puis arrivent les cyanobactéries suivant les conditions environnementales. Après la phase de colonisation, le nombre d'espèces diminue (Guasch et al. 1997; Hillebrand et Sommer 2000b) puis l'installation d'un stade climacique (Biggs 2000) apparaît.

### I.2.2.3 Dynamique temporelle du compartiment bactérien

Des études montrent que les bactéries sont également de très bonnes colonisatrices (Lyautey et al. 2005a; Roeselers et al 2007). Les colonisateurs primaires modifient le milieu et rendent favorable l'installation des autres espèces (Sigeo 2005) (par exemple avec la production de mucilage, Stevenson 1983).

Ce concept de succession s'appuie essentiellement sur un modèle d'évolution temporelle de la diversité des communautés qui révèle la disparition ou l'apparition de taxons (ou d'OTUs) au cours du développement des communautés (Jackson 2003). Lors des premiers stades de développement, les bactéries colonisent un substrat vierge, le nombre de taxons augmente dans le temps. Suite à l'établissement du biofilm, les échanges avec la colonne d'eau diminuent, entraînant ainsi l'apparition de mécanismes de compétition entre les taxons pour les ressources ou l'habitat, ce qui engendre une diminution du nombre de taxons et une réduction d'apport de nouvelles espèces depuis la colonne d'eau (Jackson 2003) (**Figure 9**). En poursuivant la maturation du biofilm, de nouvelles niches écologiques apparaissent à l'intérieur de l'agrégat, ce qui favorise l'installation de nouvelles populations associées parfois à de nouvelles fonctions telle que la dénitrification (Lyautey 2005).

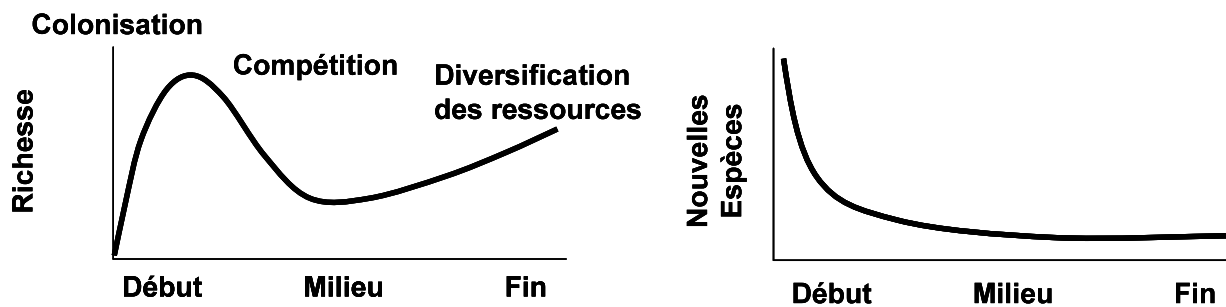


Figure 9 – Evolution temporelle du nombre d'espèces et de nouvelles espèces durant les différentes phases de développement d'un biofilm phototrophe, conceptualisée par Jackson et al. (2001) (extrait et amélioré de Jackson et al. 2001)

### I.3 Les biofilms phototrophes : compartiment fonctionnel clef des milieux lotiques

Les biofilms phototrophes constituent un compartiment fonctionnel clef des milieux lotiques (Woodruff et al. 1999 ; Romani et Sabater 2000 ; Sabater et al. 2002). Ils contribuent au fonctionnement général et la structure des écosystèmes par :

- Leur position à la base des réseaux trophiques (Lamberti 1996 ; Dahm et al. 1998 ; Battin et al. 2003) qui fait de cet assemblage une source de nourriture pour les invertébrés (Cattaneo et Kalff 1980 ; Burns et Ryder 2001 ; Munoz et al. 2001 ; Azim et al. 2005). Les biofilms représentent une part importante de la production primaire totale dans un écosystème lotique (Wetzel 1983) ;
- La participation au déroulement des cycles biogéochimiques (Kostel et al. 1999 ; Battin et al. 2003a), par exemple au niveau du cycle du carbone (production primaire) (Romani et al. 2006), de l'azote (Teissier et al. 2002) ou du phosphore (Dodds 2003). Les biofilms sont le siège de réactions auto et hétérotrophes (Augspurger et al. 2010 ; Ziegler et Lyon 2010 ; Flipo et al. 2007 ; Romani et al. 2004), comme le recyclage de la matière (Wanatabe 2001) et la transformation d'un état organique à un état minéral. La matière organique peut être d'origine autochtone (formée par les autotrophes) ou allochtone (provenant du courant et des détritits) (Garland 1997) ;
- Leur rôle de refuge pour les invertébrés (Kostel et al. 1999) ;
- Leur capacité à adsorber et ou dégrader des molécules, dans une optique de biorémediation (Singh et al. 2006 ; Roeselers et al. 2007) telles que les pesticides (Lawrence et al. 2001) ou les métaux (Dynes et al. 2006 ; Duong et al. 2009 ; Hitchcock et al. 2009 pour le nickel). Cette adsorption liée principalement à la présence des EPS peut varier en fonction de l'âge du biofilm (Duong et al. 2010) et la saison (Pokrovsky et al. 2010).

Des études ont pu montrer que cette capacité de se lier aux molécules pouvait être en réalité une capacité à se protéger de ces mêmes molécules.

Il est intéressant de noter que les biofilms phototrophes sont utilisés dans le traitement des eaux usées (Guzzon et al. 2008) via des « systèmes à filtres ». Pour des conditions de faibles temps de séjour hydraulique, ces types de biofilms sont plus efficaces que des boues activées, surtout quand les réactions concernent des individus avec de faibles taux de croissance (bactéries méthanogènes, nitrifiantes). Les biofilms présentent souvent des structures filamenteuses favorisant ainsi l'augmentation du rapport surface/ volume et le transfert de matière (Boulêtreau 2006). Cette capacité peut engendrer des services écologiques, ainsi les biofilms phototrophes peuvent contribuer à l'auto-épuration des eaux naturelles. Il est important de souligner que ce métabolisme peut varier avec la maturation du biofilm phototrophe. Des études ont montré que le fonctionnement des biofilms peut évoluer au cours du temps. Garabétian (HDR 2006) parle « d'équilibre entre l'assimilation nécessaire à une croissance de la partie active du biofilm et la reminéralisation ou relargage d'une fraction sénescence / détritique ». En d'autres termes, lorsque le biofilm est jeune et peu épais, les échanges avec la colonne d'eau sont prédominants, il est dans une programmation de croissance, ce qui a comme conséquence d'absorber de grandes quantités de nutriments provenant des masses d'eau. A l'inverse, lorsque le biofilm est mature et très épais, des processus hétérotrophes (ammonification, dénitrification) dominent, et sont à l'origine du relargage d'une partie de l'azote récupérée, via la réaction de dénitrification. Ces observations sont consistantes avec les taxons dominants détectés au sein des biofilms épais impliqués dans des processus de dénitrification (Lyautey 2005). Pour exemple, 25 g.m<sup>-2</sup> de MS de biofilm épilithique permettraient dans un volume d'eau correspondant à 10-50 litres, de produire chaque jour entre 15 à 70 mg de N-N<sub>2</sub> (Teissier et al. 2002)

## I.4 Les biofilms phototrophes : un outil pour la Directive Cadre Européenne ?

Les biofilms phototrophes sont souvent décrits comme « des témoins de la qualité de l'eau », ils intègrent des flux d'eau et d'éléments dissous importants. Par exemple, Sabater et al. (2007), en décrivant les biofilms, les qualifient de « *early warning systems* » et Montuelle et al. (2010) de « sentinelles des rivières ». Ceci est dû principalement à leur capacité à intégrer des changements environnementaux sur du long terme présent ou passé, essentiellement grâce à leur mode de vie sous une forme sessile. Les biofilms, par leurs natures ubiquistes (Lowe et al. 1996), leur temps de renouvellement rapide, et leur structure tridimensionnelle complexe



à l'origine d'une variété de niches écologiques, de structure et de profils physiologiques, ont cette capacité à intégrer rapidement les changements des conditions environnementales au cours du temps, et la simplicité de leur collecte et de leur transport font d'eux de très bons candidats comme bio-indicateurs (Montuelle et al. 2010). La complexité et la diversité de ces assemblages engendrent une variété de réponses possibles (Newman 1996) à une perturbation et non une simple réponse du type « tout ou rien » (Lowe et al. 1996).

En effet, les communautés de biofilms phototrophes répondent aux critères de la définition d'un bio-indicateur établie par Dale et Beyeler (2001) et reprise par Montuelle et al. (2010) : être facilement mesurable, être sensible à un stress, répondre à ce stress de façon prédictible, et avoir une faible variabilité de réponse pour un même stress.

Pour utiliser les biofilms comme bio-indicateurs, il faut tenir compte de l'influence possible des variations saisonnières (Leira et Sabater 2005 ; Duong et al. 2008), du temps de colonisation du substrat (Hoagland et al. 1982), de l'évolution temporelle du biofilm et de divers facteurs biotiques ou abiotiques (Stevenson et al 1996 ; Brümmer et al. 2003) sur la composition et le fonctionnement du biofilm, c'est pourquoi il est difficile de vraiment associer un effet à une cause particulière. Il existe deux moyens d'évaluer la réponse des communautés à un stress environnemental, soit par une approche structurelle (diversité, composition, biomasse), soit par une approche fonctionnelle souvent mesurée via des activités métaboliques (production primaire, respiration, activités enzymatiques. . . ). Les descripteurs possibles pour évaluer l'effet d'un stress sur les communautés de biofilms phototrophes sont nombreux. Le choix du descripteur est très important, il peut être basé sur (i) la structure et la diversité des communautés, (ii) l'aspect fonctionnel ou (iii) l'évaluation de la tolérance du biofilm. Le descripteur basé sur l'acquisition de la tolérance est appelé le concept de PICT (« *Pollution Induced Community Tolerance* », se rapporter à la thèse de doctorat de Tlili 2010). Ce concept est basé sur la notion d'adaptation des organismes, il considère que des communautés biologiques déjà exposées à un polluant acquièrent une tolérance à ce polluant. Cette différence de tolérance est mise en évidence par des tests de courte durée (Blanck 2002) (mesure de l'activité photosynthétique par exemple). Cette approche a l'avantage de relier facilement la pollution à un effet (Tlili 2010). En terme de bio-indicateurs, les composants algaux sont pour le moment les plus utilisés (Prygiel et Coste 1993 ; McCormick et Cairns 1994), notamment les communautés de diatomées (Debenest 2007). Mais certaines études se sont focalisées sur l'utilisation des bactéries comme bio-indicatrices des changements des conditions environnementales (Lyautey 2005 ; Lear et Lewis 2009). Les communautés de diatomées sont largement utilisées comme bio-indicatrices de la qualité des eaux, notamment des pollutions d'acidification ou d'eutrophisation, basées essentiellement sur l'abondance, la

composition et la forme des diatomées. Cette mesure d'altérations est à l'origine de la mise en place d'indices standardisés tels que le BDI (« *Biological Diatom Index* ») (Coste et al. 2009) et le SPI (« *Specific Polluosensitivity Index* ») (Coste 1982) dans le but d'évaluer et comparer la qualité d'un cours d'eau à l'autre (Debenest 2007). Pour le moment, de tels indices ne peuvent être utilisés pour une pollution par des pesticides (Dorigo et al. 2004). Même si quelques études ont déjà suggéré que les diatomées pouvaient être particulièrement sensibles aux pesticides (Morin et al. 2008 et 2010 ; Roubex et al. 2010).

## I.5 Les dispositifs d'investigation des biofilms phototrophes

En réponse aux difficultés rencontrées face aux expériences réalisées *in situ*, de nombreux systèmes ont été développés dans la littérature (**Tableau 1**), parmi lesquels des canaux à petite (exemple, Zippel et al. 2007) ou grande échelle (exemple, Battin et al. 2003b) qui sont des systèmes ouverts et qui miment particulièrement bien les conditions naturelles d'un milieu lotique. Par leur capacité à reproduire le fond des rivières, ces systèmes sont très attractifs. D'autres systèmes sont également utilisés, les aquariums (exemple, Debenest et al. 2009), et les bioréacteurs annulaires rotatifs (en anglais « *rotating annular bioreacteur* » ou RAB) (Lawrence et al. 2000). Zippel et al. (2007) retiennent quatre points majeurs à prendre en compte lors de la conception d'un microcosme :

- Ajustement et contrôle des conditions extérieures (lumière, température, oxygène dissous, vitesse de courant...);
- Mise en place d'une procédure d'échantillonnage facile permettant la récupération d'un biofilm non déstructuré;
- Une hétérogénéité spatiale faible d'un substrat colonisé à l'autre;
- Un faible coût d'achat et de maintenance.

Le paramètre le plus important étant la présence d'une source de lumière. Les différents dispositifs se différencient par leur taille, la nature des supports de colonisation, le niveau de contrôle des conditions environnementales, leur réalisme, mais également suivant les objectifs de l'étude (**Tableau 1**).

Malgré d'importants efforts dans le développement de dispositifs expérimentaux pour la production de biofilms phototrophes, associés au contrôle des conditions expérimentales, générer des biofilms de manière tout à fait reproductible (Roeselers et al. 2007) demeure toujours un défi.

Dispositif	Caractéristique	Inoculum	Eau d'alimentation	Température/intensité lumineuse (PAR) / durée de l'expérience	Objectif de l'étude	Référence
<b>Canal</b>	L x l x P : 11 m x 0,5 m x 0,2 m	Suspension de biofilm	Bent fermé	200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 8 semaines	Interaction entre turbidité et biofilm Dynamisme autotrophique	Cuadrelli et al 2001 Boudreau et al 2010
	L x l x P : 40 cm x 10 cm x 1,5 m / 2 cm Débit : 1,5 l.min <sup>-1</sup>	Suspension de biofilm de rivière	Renouveler deux fois par semaine Banche en orthophosphate	Support en verre (12 / 12 cm) 17°C 120 $\text{mol m}^{-2} \text{a}^{-1}$ (12 h / 12 h) 29 jours	Les effets à long terme d'une concentration en duron	Reier et al 2009
	L x l x P : 4 m x 0,4 m x 0,35 m		Renouveler 4 fois par jour, Eau d'un lac	Support en verre (7,5 cm) Support en céramique (1 x 1,5 x 0,5 cm) non émailé	Effets chroniques ou à court terme de pesticide (ou herbicide et un fongicide)	Rinos et Boudreau 2010
	L x l x P : 30 m x 0,5 m x 0,3 m		Continue	Support en céramique (1 x 1,5 x 0,5 cm) non émailé 18,4°C	Effet de la vitesse du courant sur l'architecture Utilisation du CCD	Boutin et al 2003a et b
	Volume d'eau 4 litres Débit 100 L.h <sup>-1</sup>		Eau de rivière	Silice en polyacétates (6 x 25 x 1 mm) 20°C 15, 30, 60 ou 120 mmol photons <sup>-1</sup> .m <sup>-2</sup> .s <sup>-1</sup> (16 h / 16h)	Reproductibilité en microcosme	Roclebert et al 2006
	L x l x P : 0,15 m x 0,02 m x 0,02 m		Eau de rivière en continu filtrée sur 40 $\mu\text{m}$	Support en céramique non émailé (longueur 9,2 mm, largeur 18,2, hauteur 3,1) 23,2 $\pm$ 3 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{a}^{-1}$ (12 h / 12 h) 20°C	Contraintes des facteurs biophysique sur les successions des communautés	Stoger et al 2006 Bouvier et al 2007
	Longueur 170 cm Largeur 10 cm	Support en verre colonisé <i>in situ</i> 2 semaines	Continue	Support en verre sablé 19°C 110 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{a}^{-1}$ (6 h / 16 h)	Effet du cuivre à différentes vitesses de courant	Sabatier et al 2002
	Débit : 221 mL.min <sup>-1</sup>	Suspension de biofilm de rivière	Continue	4 semaines 120 $\text{mol m}^{-2} \text{a}^{-1}$ (11 h / 13 h)	Evaluer l'impact et la tolérance à la présence de silice	Paulsson et al 2000
	Jetons de 3 litres	Suspension de biofilm filtrée sur 100 $\mu\text{m}$	Continue	14°C 4000 lux (12h / 12h) 21 jours	Influence du duron	Pece et al 2006
	35 litres 10 litres (dont 6 litres) 0,1 m <sup>3</sup>	Citer entier	Eau de rivière filtrée sur 500 $\mu\text{m}$	70 supports (cylindres de microcosme) 16°C 36 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{a}^{-1}$ (18 h / 6 h) 33 jours	Réponse d'un biofilm chroniquement colonisé à un pulse court de duron	Tillu et al 2008
<b>Tank circulaire</b>	Diamètre 0,75 Hauteur 0,65 m Volume 250 litres		Eau de rivière	Support en verre total 180 12°C 110 mmol photons <sup>-1</sup> .m <sup>-2</sup> (12 h / 12 h)	Influence du phosphate sur la épaisse du biofilm à une exposition à l'azote	Cunha et al 2003
	Débit 450 ml / jour Hauteur 115 mm Diamètre cyl ind / ext 64 / 85 Diamètre int / ext 112,5 / 100 Hauteur 205 Intensité 6,25	Eau de rivière	De l'eau du canal après filtration sur 0,1 mm		Effet du lituron	Daum et al 2008
<b>RAB</b>		Eau de rivière	Continue Eau de rivière	Support en polycarbonate	Adsorption Effet des nutriments	Lawrence et al 2000 Chenier et al 2003
		Eau de rivière	Eau de rivière	Support en polyacétates (3150 mm <sup>2</sup> )	Développement et structure du biofilm	Nou et Lawrence, 1997

**Tableau 1** – Synthèse comparative de quelques travaux sur les dispositifs d'investigation des biofilms phototrophes. LxixP = Longueur x largeur x Profondeur

# La problématique des pesticides dans l'environnement

---

## II.1 La contamination des milieux aquatiques par les pesticides : origines du problème

Il existe de nombreuses sources de pollutions inorganiques ou organiques des milieux aquatiques, parmi lesquelles, la présence des métaux lourds (Liang et al. 2004), l'eutrophisation (Mainstone et Parr 2002 ; Schwarzenbach et al. 2006) et les pesticides qui représentent la majorité des polluants organiques (Downing et al. 2004 ; Konstantinou et al. 2006 ; Dorigo et al. 2007 ; Rabiet et al. 2010).

Les pesticides sont des molécules naturelles ou de synthèses utilisées pour lutter contre des nuisances biologiques. Suivant le type d'organismes visés, le nom de la molécule sera différent, ainsi nous avons les termes « herbicides » pour des plantes, « insecticides » pour les insectes, « fongicides » pour les champignons, etc. Ces molécules sont également classées suivant leurs structures chimiques (triazines, organochlorés, etc.) associées généralement à des modes d'action différents (**Tableau 2**). La pollution des eaux de surface par les pesticides peut avoir une origine agricole ou urbaine (Planas et al. 1997). La majorité des pesticides détectés au sein des écosystèmes aquatiques sont des herbicides (Kreuger 1998).

Les pesticides, une fois appliqués sur une parcelle de sol, peuvent se disperser vers d'autres compartiments, les eaux souterraines, l'atmosphère, les eaux de surface. (**Figure 10**) par différents mécanismes incluant la volatilisation, le ruissellement, l'infiltration. (Payraudeau et al. 2009). La dominance de l'un ou l'autre des mécanismes dépend des propriétés des milieux rencontrés ainsi que des caractéristiques physico-chimiques, des propriétés des molécules, du climat... (Barriuso et al. 1996). Les pesticides détectés dans les eaux de surface peuvent également provenir des usines de traitements des eaux usées (Gerecke et al. 2002 ; Blanchoud et al. 2004).

La thèse de Devault (2007) décrit bien ces différents mécanismes qui aboutissent à la dispersion des pesticides après leur application sur une parcelle de sol. De nombreux méca-

Classe	Mode d'action	Famille	Exemple
Herbicides	Inhibiteur de la photosynthèse	S-Triazines	Atrazine
		Urées substituées	Diuron / Isoproturon
	Inhibiteur de l'élongation des acides gras	Chloroacétanilides	Alachlore / Métolachlore
	Inhibiteur de la synthèse des acides aminés	Sulfonylurées	Glyphosate
Fongicides	Inhibiteur de la biosynthèse des lipides	Triazoles	Tebuconazole
	Inhibition de la chaîne respiratoire	Hétérocycles azotés	Azoxystrobine
	Inhibiteur de la germination des spores	Carbamates	Thirame
Insecticides	Neurotoxicité	Néonicotinoïdes	Imidaclopride
		Organosphosphorés	Lindane

Tableau 2 – Exemple d'un panel de mode d'action de différentes familles de pesticides

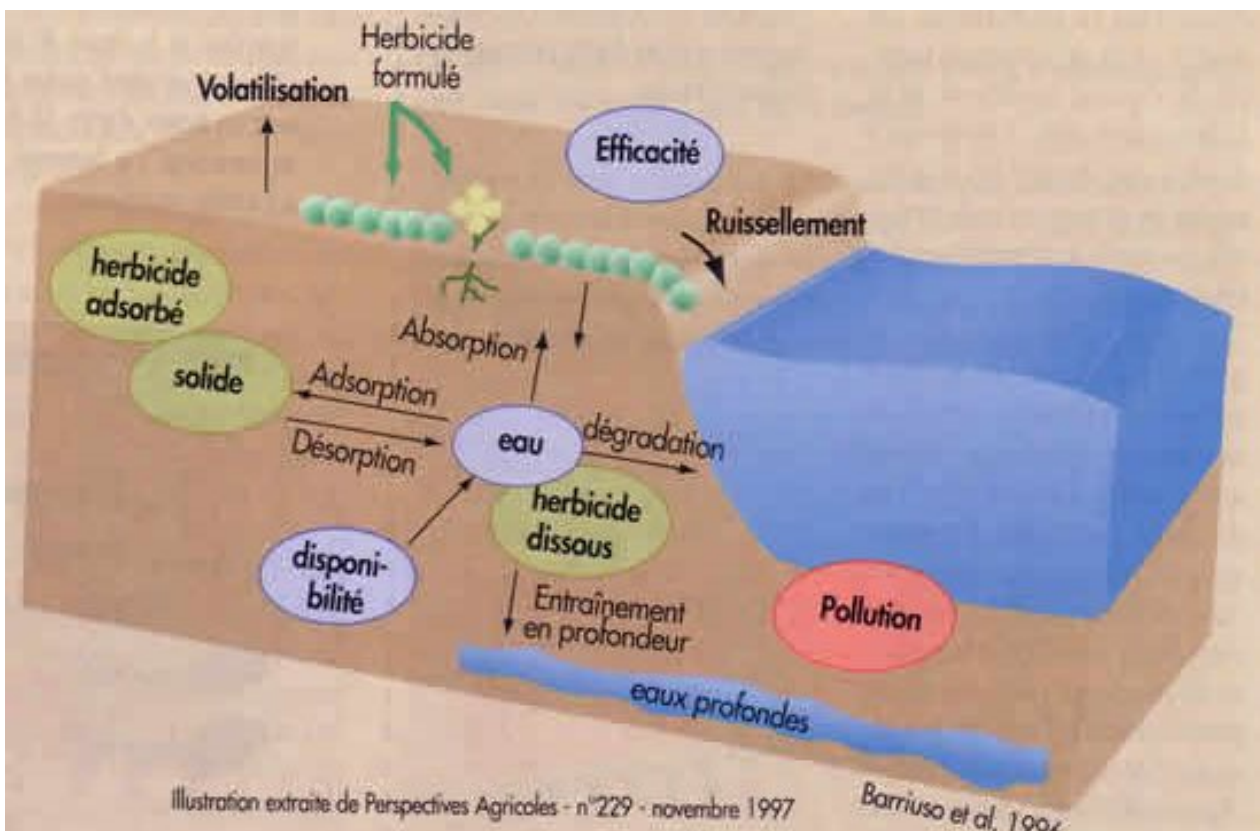


Figure 10 – Les différents mécanismes qui gouvernent la dispersion des pesticides de la parcelle du sol vers les autres compartiments (extrait de Barriuso et al. 1996)

nismes sont à l'origine de la dissipation des pesticides, le lessivage, l'adsorption, la volatilisation (Perfect 1980 ; Majewski et al. 2000 ; Foreman et al. 2000), la photodégradation (Lanyi et Dinya 2005), la biodégradation (Katagi et al. 2010), l'hydrolyse ou l'oxydation (Guimon 2005). Parmi ces mécanismes, la biotransformation est un des mécanismes prépondérant qui permet d'atténuer la pollution des pesticides dans l'environnement (Katagi 2006 ; Sorensen et Aamand 2003 ; Giacomazzi et Cochet 2004). Ces processus ne peuvent se faire que sur la fraction extractible à l'eau, en d'autres termes non adsorbée.

A titre d'exemple, la volatilisation peut aller jusqu'à 15 % de perte de la quantité appliquée à la parcelle (Gouy et al. 2001) souvent rencontrée soit à partir du sol même, soit à partir de la plante (20 à 22 %). Les phénomènes de volatilisation sont accrus sous des conditions thermiques élevés (Perfect 1980). La dispersion vers les milieux aquatiques, eaux de surface ou eaux souterraines via des phénomènes de lessivage et de lixiviation dépendent de la nature du sol, de l'adsorption de la molécule et des conditions climatiques (Gish et al. 1995 ; Taghavi et al. 2010). Le pourcentage de pesticides lessivé peut hautement varier, des études enregistraient des valeurs de 2 %, de 0,5 à 30 %, parfois même jusqu'à 90 % (Devault 2007). Les sols peu travaillés qui sont plus riches en micro-organismes, peuvent favoriser les processus de biodégradation mais induire également beaucoup d'aération et favoriser ainsi les mécanismes de drainage (Elliott et al. 2000). Cette présence de la pédofaune est susceptible d'augmenter l'hétérogénéité spatiale et structurelle et d'augmenter ainsi la capacité de rétention de l'eau (Binet et al. 2006). De même, en fonction de la profondeur du sol, la biodégradation n'aura pas le même rendement, par exemple l'isoproturon est mieux dégradé à la surface du sol (Madrigal et al. 2007). Une exposition répétée dans le sol va créer une pression de sélection sur la communauté, et est susceptible de rendre la communauté apte à utiliser le pesticide comme source de carbone (Pesce et al. 2009b). Cette dégradation peut être sensible aux valeurs de température (Palmisano et al. 1991).

L'adsorption au niveau des sols et des sédiments peut être considérée comme un stockage des polluants, retarde leurs mouvements, et les rend moins biodisponibles pour les micro-organismes (Abate et Masini 2005 ; Schwab et al. 2006) et moins sujet à des phénomènes de ruissellement.

Seule une petite fraction des pesticides utilisés dans l'agriculture et l'urbanisme se déplacent avec les eaux de ruissellement vers les écosystèmes aquatiques, les rivières, lacs (Chèvre et al. 2008 ; Hoagland et al. 1996 ; Solomon et al. 1996), ou les eaux souterraines (Kolpin et al. 2000). Habituellement, moins de 2 % des pesticides appliqués sur les récoltes finissent dans les ruisseaux (Battaglin et Fairchild 2002). Seulement 10 % des rivières Européennes peuvent être considérées comme « très propres » en termes de pollution chimique

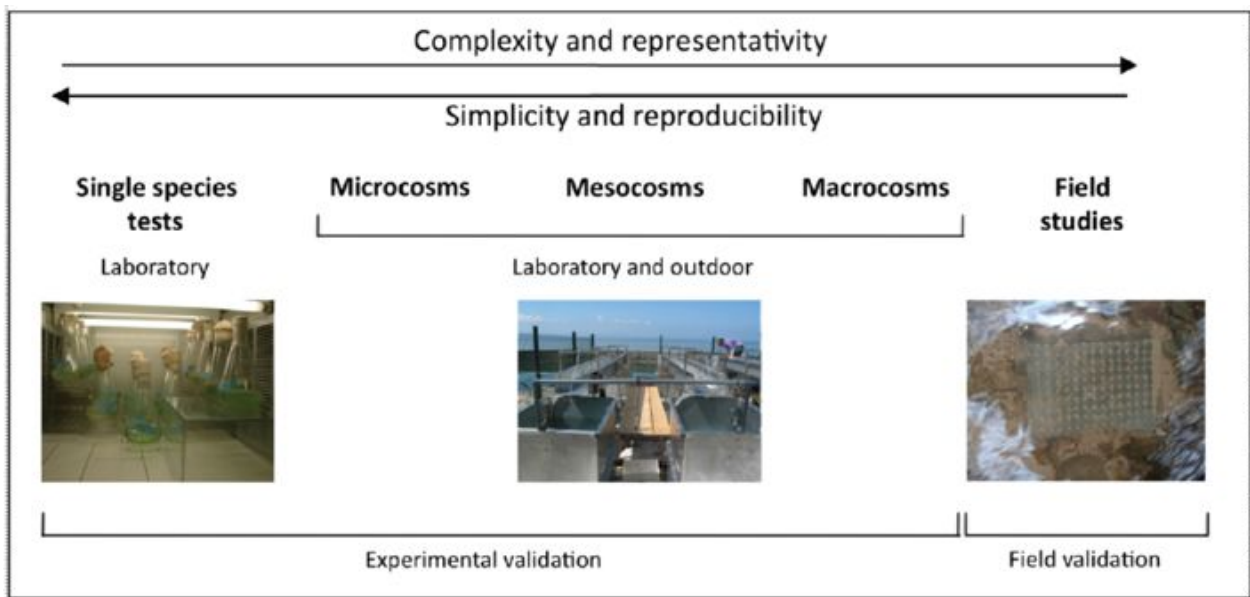
(Loos et al. 2009). Cette contamination s'avère dépendante des pratiques agricoles (Huber et al. 2000), des variations saisonnières, des compétences analytiques, des propriétés de la molécule, de la typologie du bassin versant (Neuman et al. 2003), de la taille de la rivière (Dorigo et al. 2004) et des conditions climatiques (Taghavi et al. 2010). Le challenge réside à évaluer et prédire la persistance d'une molécule afin de connaître les risques potentiels sur les organismes aquatiques. Dans ce contexte, de nombreux outils et modèles sont mis en place pour évaluer les risques environnementaux liés à ces molécules, leurs effets sur les organismes biologiques et leurs persistances dans l'environnement (Gardenas et al. 2006 ; Ansara-Ross et al. 2008).

## **II.2 Impact des pesticides sur les organismes aquatiques en milieu lotique**

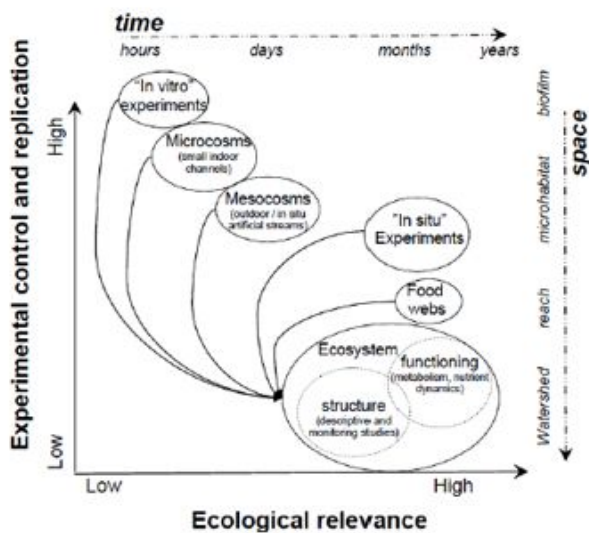
### **II.2.1 Différentes approches utilisées en écotoxicologie**

Les différentes approches utilisées lors de l'évaluation de la toxicité d'un polluant sur un organisme ou un groupe d'organismes doivent répondre à plusieurs critères : la sensibilité, la fiabilité, la précision et la robustesse, tout en se rapprochant d'un réalisme écologique (Laviale 2006). Chaque approche répondra plus ou moins bien aux différents critères suivant son objectif de départ, par exemple suivant s'il s'agit de travailler sur un ou plusieurs niveaux trophiques, sur une contamination chronique ou aiguë, d'étudier les effets à court ou long terme ou suivant la nature de la pollution. La plupart des études en écotoxicologie sont conduites en laboratoire sur des organismes isolés des autres espèces et de son environnement abiotique, ce qui rend difficile la détection d'effets indirects (Kapustka et al. 1996). En dehors des approches en bio-essais sur une seule espèce, de nombreuses études *in situ* (Friborg-Jensen et al. 2003) ainsi qu'une multitude de dispositifs expérimentaux de laboratoire (microcosmes, mésocosmes et macrocosmes) ont été développés (**Figure 11**). Ces trois types d'approche se distinguent par leurs représentativités, les niveaux d'organisation biologique qu'ils intègrent (organismes, populations ou communautés), et leurs capacités à reproduire la réalité (**Figure 12**).

La difficulté des études *in situ*, malgré leurs fortes représentativités, réside dans la difficulté à différencier la variabilité naturelle de celle liée aux polluants. Il est difficile *in situ* de prédire le début, la durée et l'intensité de l'exposition au polluant recherché, en effet tous ces paramètres sont conditionnés par le temps de transfert du polluant vers le milieu aquatique, le type d'application, les caractéristiques du bassin versant, les conditions climatiques, et



**Figure 11** – Les différentes démarches et types de dispositifs possibles pour appréhender les toxicités aiguës ou chroniques de polluants à différents niveaux trophiques et différents niveaux de complexité et de réalisme (extrait de Caquet et al. 1996)



**Figure 12** – La comparaison et la pertinence des différentes approches utilisables lors des études écotoxicologiques (extrait de Laviale 2006)



les propriétés physico-chimiques du polluant. Une des démarches, souvent utilisée lors des études *in situ*, est de travailler sur des gradients de pollution, en amont – aval de la source de pollution et / ou d'utiliser une stratégie de transplantation (par exemple : Dorigo et al. 2010a ; Morin et al. 2010). Inversement, les bio-essais en laboratoire sur des organismes isolés (e.g. Walker et al. 2006) et souvent planctoniques pour les algues (e.g. Fairchild et al. 1997) permettant de prédire les impacts des pesticides sous des conditions hautement contrôlées et standardisées (lumière, milieu riche, température, Nyholm et Kallqvist (1989)), constituent une approche traditionnelle en écotoxicologie, malgré le manque de réalisme d'un point de vue environnemental (Cairns 1983) où le nombre de taxa est plus important (Fleeger et al. 2003 ; Van Wijngaarden et al. 2005). Cette approche a l'avantage de présenter de fortes reproductibilités, d'être facile à réaliser, peu coûteuse, et répétable, avec une grande quantité de réplicats, mais ne peut être considérée comme représentative des milieux naturels. En effet, ce genre d'approche ne tient pas compte des interactions existantes inter et intra espèces au sein d'un même niveau trophique ou entre deux niveaux, des variations des conditions environnementales, de l'importance de la fraction fixée des micro-organismes au sein des systèmes lotiques, des phénomènes de compensation (via succession d'espèces) ou d'adaptation possibles (Blanck et Wangberg 1988 ; Admiraal et al. 2000). Dans la plupart des cas, des bio-essais sur une ou plusieurs espèces permettent l'estimation d'une variété de paramètres écotoxicologiques,  $EC_{50}$  (la concentration en polluant inhibant 50 % du descripteur étudié, tel que la croissance),  $LD_{50}$  (la concentration en polluant nécessaire pour tuer 50 % des individus de la population testée). Pour le cas des algues, la réponse des organismes à un même polluant est en effet très variable d'une espèce à l'autre (Sato et al. 2005). Par exemple, pour les bio-essais de Pavlic et al. (2006) sur des monocultures d'algues vertes exposées à différentes concentrations en alachlore, les valeurs de  $EC_{50}$  étaient de 15, 32 et 995  $\mu\text{g.L}^{-1}$  pour *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Chlorella kessleri* et *Desmodesmus subspicatus*, respectivement. Certaines espèces communément retrouvées dans le milieu naturel ne sont pas toujours cultivables une fois isolées (Andersen et Kawachi 2005). De plus, il est préférable d'utiliser des communautés *in situ* plutôt que des cultures d'algues car la sélection génétique *in vitro* altère la sensibilité des algues aux polluants (Peterson et al. 1997).

L'approche en microcosmes et mésocosmes peut être considérée comme le meilleur compromis entre la complexité des expériences *in situ* et le manque de réalisme écologique des bio-essais sur des organismes isolés (Villeneuve et al. 2011a). Cette variété de dispositifs se différencie par leur dimension, leur représentativité, et leur degré de simplification (**Tableau 3**). Ces dispositifs reconstituent d'une manière plus ou moins complexe les chaînes trophiques des écosystèmes lotiques suivant leurs degrés de simplification et de contrôle des conditions

environnementales, mais également suivant leurs tailles. D'après Odum (1985), un dispositif de taille inférieure à 15 m est considéré comme un microcosme et un dispositif de taille supérieure à 15 m considéré comme un mésocosme.

Certes les micro- et mésocosmes ne constituent pas une copie parfaite des écosystèmes mais permettent le contrôle de certaines variables afin de simplifier le système et d'identifier les relations causes-effets. Ils ont l'avantage en fonction de leurs tailles et de leurs complexités d'intégrer des niveaux d'organisation différents (**Tableau 3**). Villeneuve (2008) qualifie ces dispositifs « de maillon entre les bio-essais en monoculture et les expériences *in situ* » (Caquet et al. 2000).

Contaminant	Unité d'expérimentation	Les niveaux d'organisations	Dimension	Référence
Atrazine/Endosulfan (herbicide)	Mésocosme	Libellule Têtard Escargot Périphyton	40,6x 28,5 x 77,5 cm Volume: 11,3 L	Rohr et Crumrine 2005
Atrazine/ Lindane (herbicide)	Microcosme interne	Macro invertébrés Zooplancton Phytoplancton Periphyton	Longueur: 110 cm Profondeur: 70 cm	Van den Brink et al. 2009
Linuron (herbicide)	Microcosme interne	Zooplancton Macrophytes Phytoplancton Périphyton	1,1 x 1,1 x 0,7 m Volume: 600 L	Van den Brink et al. 1997
5 insecticides + 5 herbicides	Mésocosme externe	Zooplancton Phytoplancton Périphyton	Volume: 1000 L	Relyea, 2009
Linuron (herbicide)	Microcosme externe (tank circulaire)	Zooplancton Phytoplancton Périphyton	Diamètre: 0,75 m Hauteur: 0,65 m Volume d'eau: 250 L	Daam et al. 2009
Métazachlore (herbicide)	Mésocosme externe (bassin rectangulaire)	Zooplancton Phytoplancton Périphyton	2,48 x 1,65 x 1,25 m Volume: 5 m <sup>3</sup>	Noack et al. 2003

**Tableau 3** – Exemples d'études d'évaluation de l'impact de pesticides sur les écosystèmes aquatiques à différents niveaux de réalisme écologique

### II.2.2 Cibles biologiques potentielles des pesticides

En accord avec la définition de Butler (1978) (Boudou et Ribereyre 1997), « l'écotoxicologie concerne les effets toxiques des agents chimiques et physiques sur les organismes vivants,

spécialement sur les populations et les communautés à l'intérieur des écosystèmes ; ceci inclue les voies de transfert de ces polluants et leurs interactions avec l'environnement ».

Comme abordé au début de ce chapitre, les pesticides par différents moyens de dissipation se retrouvent dans les eaux de surface (Devault 2007). Ces molécules présentent donc une source de pollution potentielle pour ces milieux, notamment pour les organismes aquatiques qui ne sont pas la cible première de leur usage, avec des risques pour la santé humaine en ce qui concerne la potabilisation de l'eau (seuil fixé à  $0,1 \mu\text{g.L}^{-1}$  pour l'exemple de l'Europe). Il a été répertorié un grand nombre d'effets directs ou indirects (Friberg-Jensen et al. 2003), positifs ou négatifs sur les organismes aquatiques à différents niveaux d'organisation biologique, des producteurs primaires (phytoplancton, biofilm phototrophe, macrophytes), aux prédateurs (poisson...) en passant par les herbivores (zooplancton, poisson...) (cf. les revues bibliographiques de DeLorenzo 2001, Relyea et Jason 2006 et Ricciardi et al. 2009). Les effets directs d'un polluant induisent habituellement une réduction de l'abondance de la part de l'organisme, alors que les effets indirects souvent mènent à une augmentation ou une diminution de l'abondance (cf. revue bibliographique de Fleegler et al. 2003). Fleegler et al. (2003) ont observé que les effets indirects sont prédominants. La **figure 13** présente 4 exemples d'études écotoxicologiques qui ont évalué l'impact de pesticides au sein d'écosystèmes aquatiques. Ainsi, à terme, une pollution par des pesticides peut donc engendrer des changements à de plus grandes échelles, perte de la biodiversité par une sélection d'espèces résistantes, homogénéisation des biotopes, prolifération d'espèces opportunistes... D'après ces 4 exemples, le compartiment des biofilms phototrophes (= périphyton) semble être un compartiment clef dans l'évaluation de la toxicité d'un pesticide et son impact sur le fonctionnement d'un écosystème.

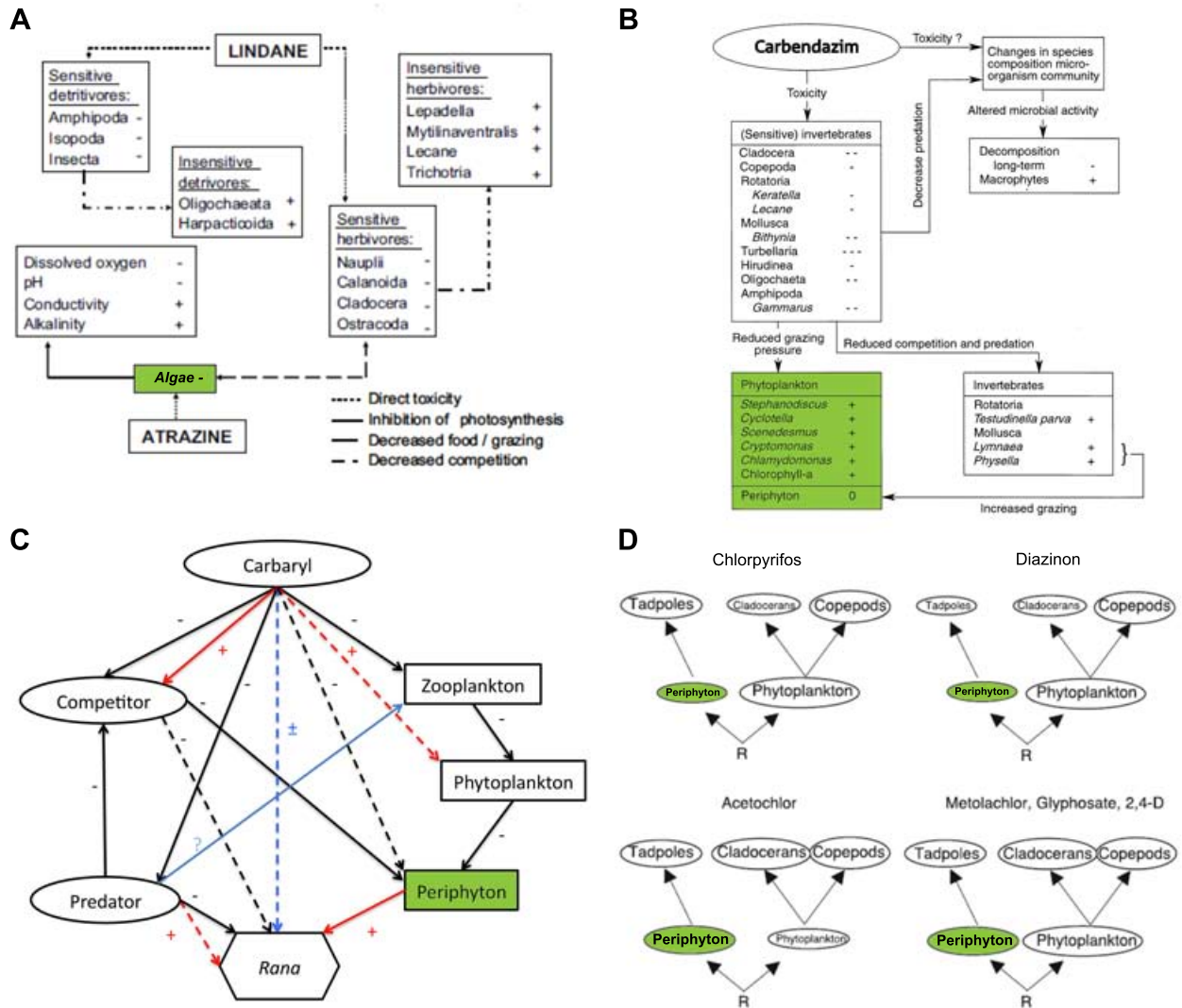
## II.3 Interactions biofilms phototrophes-pesticides en milieux lotique

### II.3.1 L'importance des biofilms phototrophes en écotoxicologie

L'utilisation des biofilms phototrophes est largement préconisée dans l'évaluation de la toxicité d'un polluant (Sabater et al. 2007) au sein des systèmes lotiques (**Figure 14**) pour différentes raisons (cf. **partie I, chapitre 1 Synthèse bibliographique**).

D'un point de vue écologique :

- Sa position de 1er maillon dans la chaîne trophique de la plupart des écosystèmes lotiques (Flipo et al. 2007) et sa complexité structurelle et fonctionnelle permettant



**Figure 13** – Schéma général d'exemples d'impact de plusieurs pesticides (carbaryl, lindane, chlorpyrifos, diazinon, des insecticides ; carbendazim, un fongicide ; et acetochlor, metolachlor, glyphosate et 2,4-D, des herbicides) sur les micro-organismes et les impacts possibles sur le reste de la chaîne trophique durant des expérimentations en microcosmes (A, extrait et modifié de Van den Brink et al. 2009 ; B, Van den Brink et al. 2000 ; C, Mills et Semlitsch 2004 et D, Relyea 2009). R = Ressources

d'intégrer différents niveaux d'organisations biologiques : organisme, population, communauté et écosystème ainsi que leurs interactions ;

- Leur participation à une grande partie de la production primaire (Stevenson et al. 1996 ; Navarro et al. 2008), et leur participation aux cycles biogéochimiques (Battin et al. 2003a) ;
- La fraction microbienne des écosystèmes d'eau douce se trouve principalement sous une forme fixée (Pyl'nik et al. 2007) ;
- Son utilisation comme bio-indicateur de la qualité de l'eau (Coste et al. 2009) notamment pour des pollutions trophiques (Debenest 2007) ou des pollutions par les métaux (Morin 2006) ;
- Contrairement aux communautés du phytoplancton, les biofilms ne sont pas uniquement contrôlés par des facteurs allogènes tels que la température, l'hydrodynamisme, l'intensité lumineuse, etc... , mais également par les interactions existantes au sein même de l'agrégat, liées à la dynamique temporelle du biofilm (facteurs autogènes) ;
- Le caractère sessile du biofilm fait qu'il n'est pas capable d'éviter le polluant (Sabater et Admiraal 2005).

#### D'un point de vue temporel :

- Une gamme importante de paramètres structuraux et fonctionnels, ce qui permet d'appréhender les effets du polluant à court ou long terme (Stevenson et Pan 1999) ;
- La particularité des biofilms à intégrer rapidement les changements environnementaux durant de longues périodes.

#### D'un point de vue spatial :

- Sa capacité à coloniser une variété de substrats différents, même artificiels, ce qui permet une batterie d'études, allant de simples bio-essais sur des organismes isolés à des expériences plus complexes *in situ*.

Les communautés microbiennes lotiques sont les premières à interagir avec les pesticides. D'un point de vue écologique, parce que ces agrégats se placent à la base de la chaîne trophique aquatique, les perturbations affligées aux biofilms phototrophes peuvent se répercuter sur l'ensemble des organismes de la chaîne trophique et ainsi modifier le fonctionnement général d'un écosystème. Les biofilms phototrophes se caractérisent par leur hétérogénéité, leur organisation tridimensionnelle et les fonctions qui en découlent. Il est possible dans certains cas de réaliser une certaine standardisation par :

- L'utilisation de substrats artificiels, ceci réduit la variabilité naturelle des substrats à l'échelle des communautés bactériennes (Lear et al. 2008) ou algales (Stevenson 1997), réduit le temps d'échantillonnage, augmente la possibilité d'avoir une quantification des



**Figure 14** – Les différents avantages à 3 échelles de représentation (espace, organisation et temps) d'utiliser les biofilms phototrophes comme modèles d'études (extrait de Laviale 2006)

échantillons, mime au mieux l'attachement du biofilm. Les substrats en verre sont les plus utilisés en écotoxicologie (Aloi 1990) ;

- Une meilleure définition du temps de colonisation du biofilm avant son utilisation. Blanck et Dahl (2002) conseillent des biofilms jeunes pour limiter le problème lié à leurs épaisseurs.

Les biofilms phototrophes se composent d'une fraction importante de micro-organismes phototrophes (pour un biofilm épilithique en rivière : jusqu'à 30 % de la masse de carbone, Lyautey 2005). Vu leur ressemblance physiologique avec les plantes terrestres, pour la suite de ce chapitre, nous nous intéresserons principalement aux études écotoxicologiques concernant les herbicides.

## II.3.2 L'impact des pesticides sur les biofilms autotrophes

### II.3.2.1 Comment évaluer la réponse du biofilm phototrophe ?

Il existe de nombreux paramètres possibles pour évaluer l'impact d'un polluant sur les biofilms phototrophes, tout en intégrant les deux compartiments, algues et bactéries. Ces paramètres sont de deux types, les descripteurs structuraux et fonctionnels (**Figure 15**) (Sabater et al. 2007).

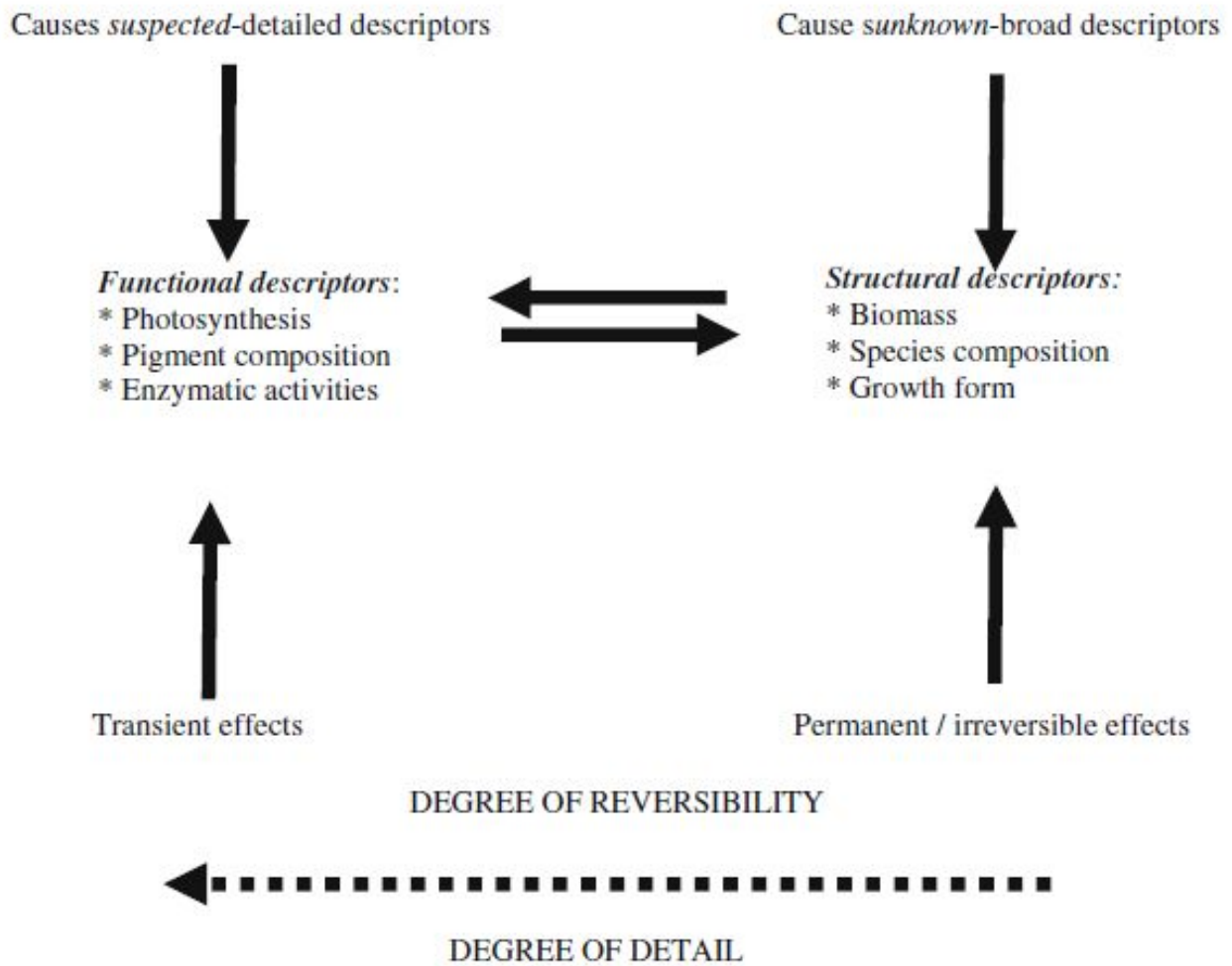
Choisir l'un ou l'autre de ces paramètres dépend de l'effet potentiel du polluant (réversible ou pas, phénomène de résilience, Culp et al. 2000) et de son mode d'action (Vinten et al. 2011) (pour les inhibiteurs de la photosynthèse comme le diuron ou l'isoproturon, la stratégie est de

mesurer l'activité de la photosynthèse ou la production primaire). Les effets aigus sont souvent bien détectés par des paramètres physiologiques plus ou moins spécifiques (photosynthèse, activités enzymatiques...) alors que les effets persistants ou chroniques sont détectés par des paramètres plus structuraux comme les teneurs en chlorophylle *a* ou la composition en espèces (Sabater et al. 2007). Il a été montré que coupler des descripteurs structuraux et fonctionnels permettait au mieux d'évaluer les effets potentiels des pesticides (Foley et al. 2008 ; Lawrence et al. 2003 ; Montuelle et al. 2010).

Lors de leurs expériences écotoxicologiques, Ricart et al. (2009) ont montré que certains paramètres répondent mieux aux pesticides, tels que la chlorophylle *a* et l'activité photosynthétique (capacité et efficacité) particulièrement pour les herbicides inhibiteurs de la photosynthèse. Il est important de considérer la sensibilité de chaque paramètre mesuré. Par exemple les descripteurs de biomasse comme exprimés en termes de matière sèche sans cendre ne sont pas toujours considérés comme de très bons indicateurs de la qualité chimique de l'eau (Montuelle et al. 2010). Ces descripteurs sont très influencés par les conditions hydrodynamiques et l'intensité lumineuse (Villeneuve et al. 2010).

De même, les méthodes de typage moléculaire telles que la DGGE et T-RFLP intègrent uniquement les taxons les plus dominants de la communauté bactérienne avec une part associée à des taxons d'Eucaryotes pour les couples d'amorces choisies dans cette étude (Lyautey et al. 2005b ; Cole et al. 2009). Pour les paramètres basés sur des méthodes de culture (Biolog), il est important de se rappeler que seulement 1 % des espèces bactériennes sont cultivables (Amann et al. 1995).

Parmi les descripteurs structuraux utilisés durant les expériences écotoxicologiques, nous pouvons citer l'évaluation de la biomasse (exemple, Noack et al. 2003 ; Roubeix et al. 2011a), l'analyse des pigments (e.g. Dorigo et Leboulanger 2001), l'épaisseur du biofilm (Lawrence et al. 2008), la composition, la structure, la forme de vie des diatomées, la forme de leur frustule et leur métabolisme... (Debenest et al. 2010), la structure des communautés Eucaryotes (DGGE 18S, Villeneuve et al. 2011c) et bactériennes (DGGE 16S, Pesce et al. 2009a ; T-RFLP 16S, Vercraene-Eairmal et al. 2010 ; FISH, Pesce et al. 2006 ; Grenni et al. 2009), et la composition des EPS (Lawrence et al. 2008 ; Ricart et al. 2009). Les descripteurs fonctionnels prennent en compte l'état physiologique des communautés comme la production bactérienne (Pesce 2006), la production primaire par une mesure de la photosynthèse (par exemple, Nyström et al. 2000 ; Bérard et al. 2008 ; Tlili et al. 2008), les profils physiologiques au niveau des communautés (CLPP, *Community Level Physiological Profil*, Ecoplate, Foley et al. 2008), diverses activités enzymatiques (Ricart et al. 2009 ; Bonnineau et al. 2010), la présence ou non de gènes de dégradation de certains pesticides principalement utilisés pour le moment



**Figure 15** – Différents descripteurs utilisables pour évaluer l’impact d’un polluant sur les biofilms, en fonction de la sensibilité des descripteurs, et des effets étudiés, à court ou long terme (extrait de Sabater et al. 2007)



pour des communautés bactériennes de sol (De Liphtay et al. 2002 ; Lee et al. 2005 ; Gonod et al. 2006), et diverses autres fonctions (nitrification, Chénier et al. 2003 ; Dorigo et al. 2002 et 2005).

La composition taxonomique au moment de la contamination semble être un facteur important dans la sensibilité de réponse du biofilm (Villeneuve et al. 2011a). Il semblerait que les biofilms peu diversifiés ne présentent pas forcément plus de sensibilité vis-à-vis d'un herbicide (Villeneuve et al. 2010). McCann (2000) a introduit l'hypothèse de la « Biodiversité-stabilité », en accord avec les mécanismes de résilience et résistance des écosystèmes qui augmentent avec le nombre d'interactions à l'intérieur d'une communauté. Mais une biodiversité importante ne signifie pas forcément une diversité fonctionnelle importante dû à une présence possible d'espèces redondantes. De même l'arrivée d'une nouvelle espèce n'apporte pas forcément de nouvelle fonction à la communauté. Lors d'une étude (Wicke et al. 2008), les biofilms les moins diversifiés étaient les plus denses, ainsi les biofilms se suffisent-ils à eux même comme barrière de protection pour empêcher la diffusion des pesticides ?

### II.3.2.2 Une variété de réponses possibles

Dans la littérature, il existe une multitude de systèmes utilisables pour des études écotoxicologiques qui se différencient essentiellement par leur volume et leur niveau de complexité biologique (de quelques espèces à quelques niveaux trophiques) suivant les objectifs du départ :

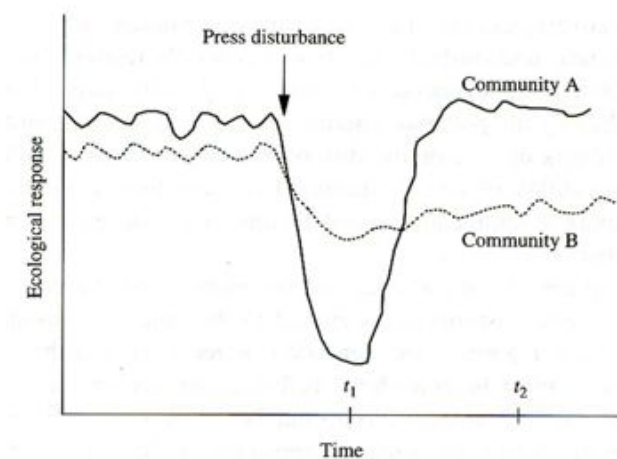
- L'étude est-elle réalisée à cours ou long terme ? Dans ce dernier cas, il est important de tenir compte de la dynamique des organismes, du recyclage des éléments, des processus écologiques (Guckert 1993) ;
- L'étude est-elle réalisée à partir d'une exposition aiguë, chronique, quelle est l'origine de l'exposition ? Il est donc important de tenir compte de la chimiodynamique et de la persistance du polluant (Rand et al. 2000 ; Belanger et al. 2002) ;
- Tenir compte des effets directs et indirects engendrés par le polluant liés au type d'organisme et à la nature du polluant ; et de la possibilité de résilience de la part des communautés (Culp et al. 2000).

Vu la multitude de facteurs qui influencent les biofilms phototrophes ((**cf. partie I, chapitre 1, Synthèse bibliographique**)), il est difficile d'évaluer la part des effets des polluants, des autres facteurs (Geiszinger et al. 2009). Comme discuté par Culp et al. (2000), il est difficile de différencier un stress bien particulier d'un autre, et de vraiment connaître la causalité des effets obtenus (Dorigo et al. 2009). Il faut neutraliser certains facteurs de confusion d'où l'intérêt de travailler en milieu contrôlé. L'adjonction de plusieurs herbicides,

triazines par exemple, peut engendrer une coopération et produire un effet plus important (Faust et al. 2001). Guasch et al. (1998) ont montré une synergie d'effet entre le phosphore et l'atrazine.

Face à une pollution, les communautés agissent de deux manières, elles sont soit tolérantes, soit sensibles avec un continuum de réponses, suivi par une possible adaptation ou une résilience dans le cas d'une courte perturbation (**Figure 16**). La réponse structurelle ou fonctionnelle (sensibilité ou tolérance) de la part des communautés dépend de nombreux facteurs abiotiques : lumière (Guash et Sabater 1998 ; Laviale et al. 2010), hydrodynamique (Sabater et al. 2002 ; Villeneuve et al. 2010), disponibilité des nutriments (Wendt-Rasch et al. 2004 ; Guash et al. 2007 ; Tlili et al. 2010), variations saisonnières (Guash et al. 1997 ; Pesce et al. 2009a), nature de l'exposition (Kasai 1999 ; Tlili et al. 2008, 2011 ; Vallotton et al. 2008), nature du polluant (Debenest et al. 2009) et des facteurs biotiques : composition du biofilm (Leboulanger et al. 2001 ; Seguin et al. 2001), pression des brouteurs (Lopez-Doval et al. 2010 ; Munoz et al. 2011). Par l'influence de l'ensemble de ces facteurs biotiques et abiotiques qui peuvent interagir avec le polluant, il existe une variété d'effets directs ou indirects, de natures transitoires ou réversibles sur les communautés algales ou bactériennes des biofilms phototrophes (Sabater et al. 2007).

Les biofilms sont des systèmes dynamiques, avec une physiologie qui évolue suivant les processus de succession écologique. Un biofilm phototrophe qui présente une structure un peu distendue, souple, est plus sensible à un pesticide qu'un biofilm plus compact (Guasch et al. 2003).



**Figure 16** – Les différentes réponses possibles des communautés face à une perturbation (extrait de Clements et Newman 2002)

Par la diversité des facteurs biotiques et abiotiques susceptibles d'influer sur les biofilms phototrophes, les pesticides peuvent engendrer une multitude d'altérations, dont voici quelques exemples :

- Perturbation de la production primaire, souvent observée pour des herbicides inhibiteurs de la photosynthèse (Pesce et al. 2006 durant une exposition au diuron ; Guasch et al. 1998 durant une exposition à l'atrazine) ;
- Modification de la biomasse mesurée à travers les paramètres suivants : chlorophylle *a*, matières sèches sans cendre et composition des pigments (Navarro et al. 2008 ; Roubeix et al. 2011a). Par exemple, certains auteurs obtiennent un niveau de biomasse plus faible en présence de glyphosate (Vera et al. 2011), alors que Austin et al. (1991) observent un comportement contraire, avec une amélioration de la biomasse et de la densité algale en présence de glyphosate. Dans la plupart des expositions à un herbicide, une inhibition de la croissance des communautés algales est observée (Tang et al. 1997 ; LeBoulanger et al. 2001 ; Tlili et al. 2011), pouvant être expliquée par une épaisseur du biofilm ou une adhésion au substrat plus faibles (Morin et al. 2010). Pour les herbicides inhibiteurs de la photosynthèse, une augmentation de la chlorophylle *a* associée à une incorporation plus forte de carbone (Tlili et al. 2011, inhibiteur de la photosynthèse : diuron ; Debenest et al. 2010 ; Roubeix et al. 2011b) a pu être observée dans certains cas, ce phénomène reflète le « *greening* » (Pratt et Barreiro 1998). Les microorganismes phototrophes sont capables d'ajuster leurs pigments intracellulaires durant des périodes d'éclairage (tels que la chlorophylle *a*) pour maintenir un niveau de conversion d'énergie en énergie chimique toujours efficace en réponse à une inhibition. Mais au bout d'un moment, ce système d'adaptation n'est plus efficace, ainsi avec une augmentation du temps d'exposition, la toxicité du polluant devient plus importante (Vallotton et al. 2008) ;
- Changements dans la composition des espèces algales. De par leurs caractéristiques physiologiques proches avec les plantes terrestres, les algues sont susceptibles de subir des impacts directs des herbicides. Une exposition aux herbicides peut mener à une sélection d'espèces tolérantes au détriment des espèces les plus sensibles (Dahl et Blanck 1996 ; Pérès et al. 1996 ; De Lorenzo et al. 1999 ; Ricart et al. 2009). Ces changements d'espèces dominantes sont susceptibles d'engendrer un déséquilibre entre les espèces et modifier ainsi les interactions au sein du biofilm ou vis-à-vis de la chaîne trophique aquatique. Certaines études ont pu observer que les espèces venant d'un site pollué présentent une tolérance plus importante (Dorigo et al. 2007). Des auteurs ont souligné une sensibilité des diatomées plus importante que les cyanobactéries (Lurling et Roessink 2006, metribuzin ; Vera et al. 2010, glyphosate). Inversement, d'autres études ont montré que suite à une contamination par des triazines, les chlorophycées, souvent de grandes cellules filamenteuses, sont remplacées par de petites diatomées (Gurney

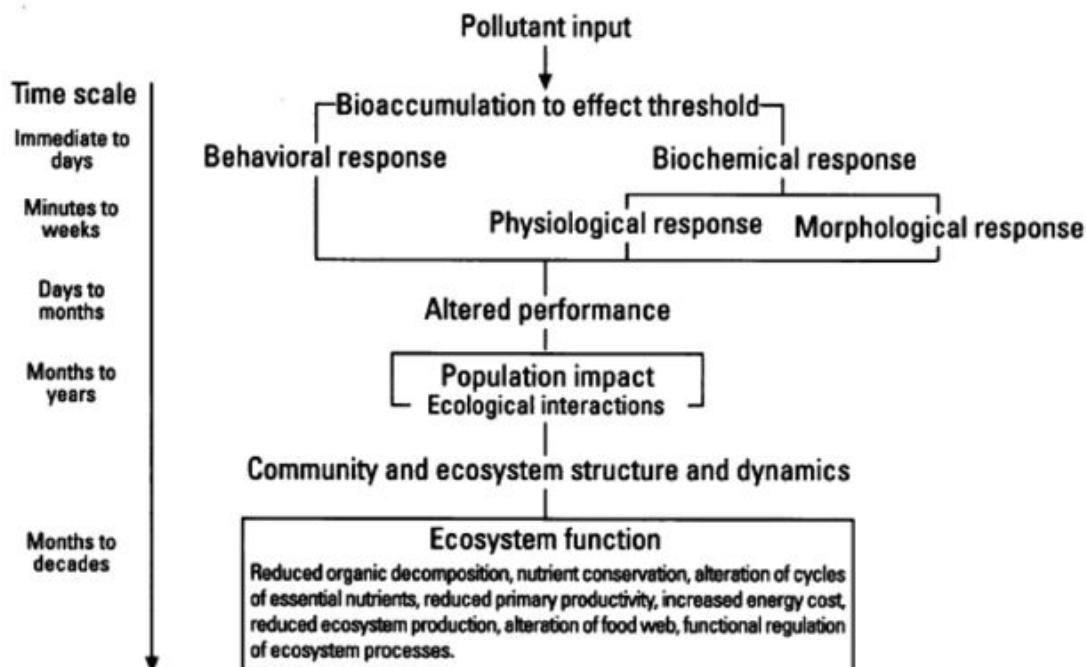
- et Robinson 1989; Kasai 1999), associé parfois à une diminution des cyanobactéries (Dahl et Blanck 1996; Dowing et al. 2004). Ces changements de structure sont rendus possibles soit par une dominance d'espèces tolérantes, soit par un changement dans la composition de la communauté (Pérès et al. 1996; Nyström et al. 2000; Tlili et al. 2008; Ricart et al. 2009; Villeneuve et al. 2011a) sans que ce soit forcément associé à des changements de proportion (Guasch et al. 1998);
- Changements dans la composition des espèces bactériennes. Ces changements peuvent être induits par des effets directs (Pesce et al. 2006) ou indirects à la suite de changements de structure de la communauté des Eucaryotes (Gao et al. 2005; Barranguet et al. 2003 pour les métaux) cela dépend en partie du mode d'action de l'herbicide. La densité bactérienne apparaît plus importante en présence du contaminant dans certaines études, souvent suite à une baisse de l'activité algale engendrant une baisse de la compétition et un meilleur accès aux ressources nutritives (DeLorenzo et al. 1999). Une étude met en évidence une augmentation de la diversité bactérienne (Pratt et al. 1988) alors qu'une autre observe une diminution (Hamala et Kollig 1985). Sur des biofilms bactériens, des altérations sur la composition des EPS ont pu être observées (Onbasli et Aslim 2009). Lors de leur étude, Pesce et al. (2009a) ont montré que les effets du polluant (diuron) sont plus importants lors d'une exposition chronique suggérant une adaptation progressive des communautés. Parfois, les modifications de structure des communautés bactériennes engendrent le développement et la dominance d'espèces capables de dégrader le polluant (Pesce et al. 2006; Tlili et al. 2008);
  - Changements du mode trophique des algues. Ce processus de survie a été rencontré plus particulièrement pour les herbicides inhibiteurs de la photosynthèse sur certaines espèces de diatomées et dans certaines conditions (Goldsborough et Robinson 1986; Pérès et al. 1996);
  - Altérations de l'activité métabolique des microorganismes hétérotrophes. Ces modifications d'activités peuvent être ou non associées à des modifications de la composition en espèces. Les activités métaboliques des communautés bactériennes qui sont souvent utilisées comprennent l'incorporation d'acide nucléique radioactif (Admiraal et al. 1999), des activités extracellulaires (Nyström et al. 2000), l'activité de la phosphatase (Kloeke et Geesey 1999) ou de la peptidase, une autre enzyme extracellulaire (Bonnineau et al. 2011), ou certaines fonctions telles que la nitrification (suite à une exposition au glyphosate, Enrich-Prast 2006). Parfois, les effets sur la production primaire peuvent être masqués par une forte influence de la température (Pesce et al. 2008). En contact avec un herbicide, une stimulation de la croissance est susceptible d'être engendrée (Fran-

- queira et al. 1999; Prado et al. 2009). Cette stimulation peut être provoquée par (i) l'utilisation du polluant ou de ses métabolites de dégradation comme source d'énergie sous forme de carbone, phosphore ou nitrate (Wong 2000; Stamper et Tuovinen 1998), (ii) une diminution de la compétition avec les algues (DeLorenzo et al. 1999), ou (iii) par l'utilisation de matériel issu de la mort des algues (Ricart et al. 2009);
- Changement dans la communauté des diatomées. Durant certaines études, l'herbicide provoque l'apparition d'espèces de diatomées dominantes comme *Diatoma vulgare* et *Encyonema minutum* ou *Fragilaria capucina* (Villeneuve et al. 2011a), au détriment d'espèces plus sensibles (Dahl et Blanck 1996; Pérès et al. 1996). Seguin et al. (2001) n'observent pas d'effet sur la structure des communautés diatomiques, ce que les auteurs expliquaient par la composition initiale des communautés qui est dominée par des diatomées de petites tailles et colonisatrices, comme *Achnanthydium minutissimum* considérée souvent comme tolérante aux herbicides (Stevenson et Bahls 2002). Souvent les espèces pionnières (par exemple, *Achnanthydium minutissimum sensu lato*, *Amphora pediculus*) présentent une résistance plus importante que les espèces motiles, espèces de diatomées mobiles associées à des mouvements très rapides (*Navicula sensu lato* et *Nitzschia sensu lato*) (Rimet et al. 2011). Cette tendance a souvent été observée durant des pollutions par les métaux (Sabater et al. 2002; Guasch et al. 2004). La taille (Van de Brink et al. 1997), la forme des frustules (Roubeix et al. 2011a) et le nombre (Pérès et al. 1996; Schmitt-Jansen et Altenburger 2005) peuvent s'avérer être affectés par la présence du contaminant. Les déformations de frustules sont soit un dommage du pesticide, soit un mécanisme de défense pour limiter les transports de diffusion (Pérès et al. 1996).

Après une contamination, il semble que les phénomènes de résilience soient d'une longueur temporelle variable suivant l'âge du biofilm (de 1 à 2 mois) (Rimet et al. 2005; Dorigo et al. 2010; Morin et al. 2010). Une des explications donnée par les auteurs était l'âge important du biofilm qui est de ce fait essentiellement dominé par des facteurs autogènes (Lyautey 2005) ou par la présence de processus d'immigration et d'émigration (Stevenson et Peterson 1989 et 1991).

D'un point de vue écologique, toutes ces altérations (sur le compartiment bactérien ou algal) susceptibles d'engendrer des modifications de fonctions et de structure, peuvent (i) provoquer des modifications au niveau des interactions bactéries / algues au sein même de l'agrégat, et (ii) entraîner de plus grandes conséquences à l'échelle des écosystèmes, de part leur position à la base du réseau trophique des milieux lotiques, leurs contributions aux cycles

biogéochimiques et leurs influences dans la chimiodynamique des polluants (biodégradation, adsorption) (Brock et al. 2004) (**Figure 17**).



**Figure 17** – Impacts potentiels d’un polluant sur le fonctionnement général d’un écosystème (extrait de Boudou et Ribeyre 1997)

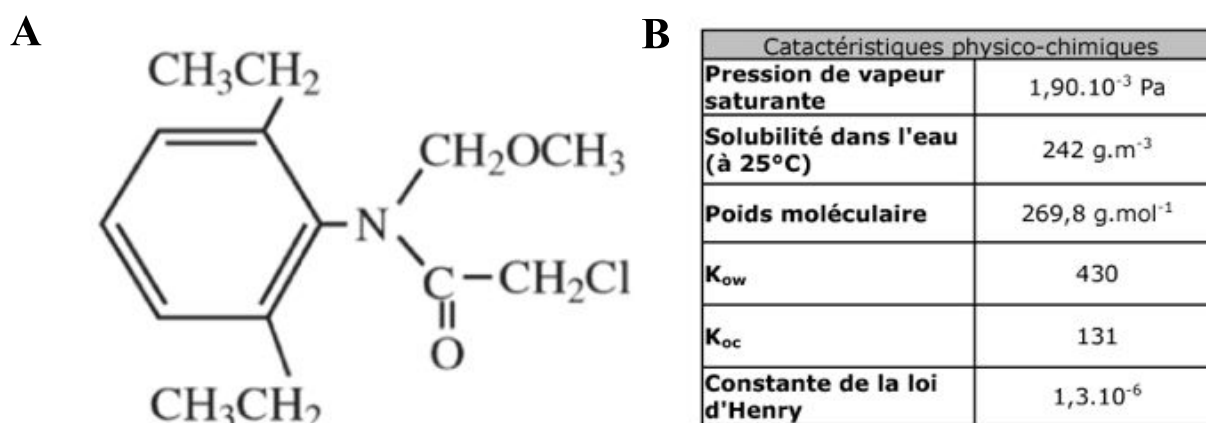
Il est donc difficile de distinguer l’impact des pesticides et des autres facteurs environnementaux. Par exemple, il a été souligné que dans certains cas, les pesticides et les nutriments ont des effets antagonistes (Lozano et Pratt 1994). De même, un ensemble de pesticides peut présenter des effets antagonistes ou synergiques. Par exemple, des herbicides comme l’alachlore (Carder et Hoagland 1998) et le chlorothalonil (DeLorenzo et Serrano 2003) agissent en synergie avec l’atrazine.

L’impact d’un pesticide sur les biofilms dépend également de sa biodisponibilité (Serra et al. 2009), c’est à dire de sa répartition soit dans la matrice du biofilm, soit dans la colonne d’eau. La biodisponibilité d’un pesticide est conditionnée par les propriétés de la molécule mais également par les conditions physico-chimiques (Nikkila et al. 2001). Il est nécessaire de mesurer la fraction du pesticide qui est absorbée par le biofilm (Lawrence et al. 2001 ; Bohuss et al. 2005 ; Tlili et al. 2008).

## Etude de cas : l'alachlore

### III.1 Présentation de la molécule d'alachlore

L'alachlore ( $C_4H_2OClNO_2$ ) est un herbicide de pré-émergence de la famille des chloroacétanilides. Il est utilisé comme inhibiteur de la plupart des herbes annuelles, et à larges feuilles, sur des cultures de pré-émergence de maïs et de soja. Il se présente sous la forme d'un solide cristallin inodore. Les caractéristiques physico-chimiques de la molécule sont présentées dans la **Figure 18**.



**Figure 18** – Formule chimique développée (A) et caractéristiques physico-chimiques de l'alachlore (B).  $K_{ow}$  représente le coefficient de partage octanol / eau et  $K_{oc}$  représente le potentiel de rétention de l'alachlore sur la matière organique du sol

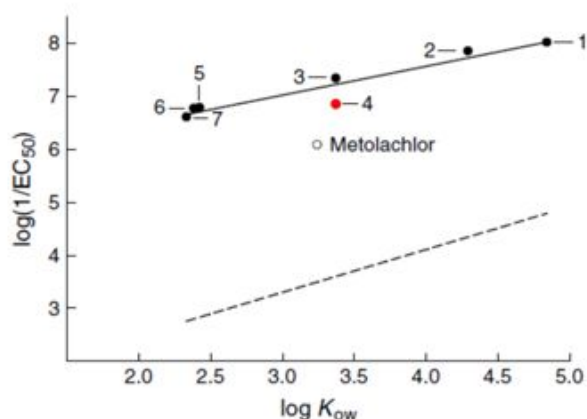
Devault (2007) qualifie ces herbicides de pré-levée des « plus critiques des herbicides » car ils sont utilisés souvent sur des sols nus avant la germination des semences. Ils sont ainsi particulièrement exposés aux processus de transport des matières organiques, de la parcelle de sol aux milieux aquatiques notamment lors de fortes précipitations, surtout durant la période printanière. D'un point de vue législatif, l'alachlore est interdit au Canada depuis 1975 et en France depuis 1998. La concentration maximale permise pour la présence d'un seul pesticide et de ses métabolites dans les eaux destinées à la consommation est de  $0,1 \mu\text{g.L}^{-1}$  selon la DCE, et aux USA, le seuil limite est de  $2 \mu\text{g.L}^{-1}$ .

Parmi la grande famille des chloroacétanilides (butachlore, alachlore, acétolachlore, méta-zachlore et métolachlore, propachlore, diméthachlore...), l'alachlore, le métolachlore et l'acétolachlore présentent des structures physiques similaires.

Dans le cadre de la Directive Cadre Européenne, la molécule de l'alachlore est classée comme « substance prioritaire » par la commission européenne (Directive 2000/60/EC (Debenest 2007)) et qualifiée de cancérigène (classe 2) par l'US EPA 1993. Cette molécule est un des principes actifs du produit commercialisé, Lasso.

## III.2 Mode d'action de l'alachlore

La famille des Chloroacétanilides regroupe un ensemble d'herbicides inhibiteurs cytosoliques des « élongases » ou « synthétases » qui sont des enzymes de la molécule nodale de la synthèse des acides gras à longues chaînes, des terpènes, des terpénoïdes et des protéines (Devault 2007) chez les plantes et les algues (Böger et al. 2003). Ces herbicides vont affecter la stabilité et la perméabilité de la membrane plasmique et les fonctions nécessaires pour la division et l'élongation des cellules, ce qui va engendrer une inhibition de la croissance et de la division cellulaire et parfois la mort des plantes suivant les quantités. Le processus engendré par ces enzymes « élongases » est un processus métabolique vital. Les enzymes ont été localisées dans les membranes du réticulum endoplasmique, un environnement lipophile. Junghans et al. (2003) ont comparé la toxicité ( $EC_{50}$ ) de plusieurs herbicides de la famille des chloroacétanilides en fonction de leurs valeurs de  $\log K_{ow}$ . Ils observent une relation linéaire entre le caractère lipophile et la toxicité des molécules (**Figure 19**).



**Figure 19** – Corrélation entre les valeurs de  $\log K_{ow}$  et  $EC_{50}$  pour 8 chloroacétanilides : 1, butachlore ; 2, prétilachlore ; 3, acétolachlore ; 4, alachlore ; 5, propachlore ; 6, méta-zachlore ; 7, diméthachlore, et 8, métolachlore (extrait de Junghans et al. 2003)

Les auteurs émettent l'hypothèse que cette corrélation peut refléter principalement les différences de propriétés des herbicides à passer dans les membranes cellulaires et à s'accumuler dans la phase lipidique de la membrane du réticulum endoplasmique (RE). Cependant une



augmentation de 1000 fois du  $K_{ow}$  n'engendre qu'une augmentation de moins de 50 fois du  $1/EC_{50}$ . D'après les auteurs, la possibilité qu'une répartition hydrophobe dans la membrane du RE qui ne soit pas le seul pré-requis pour l'interaction de l'herbicide avec l'enzyme, pourrait expliquer ce décalage. L'affinité au domaine de liaison de l'enzyme ciblée doit également être un facteur crucial, et semble être gouvernée également par des propriétés électroniques et stériques de la molécule en question. Le panel de valeurs d' $EC_{50}$  observées pour l'ensemble des herbicides de cette même famille peut s'expliquer par leurs différences de caractère lipophile. Une étude sur l'algue verte *Scenedesmus actus* montre une rétention de l'acétate plus faible liée à une diminution de l'incorporation à l'intérieure des lipides acyl lorsque que les cellules sont en contact avec l'alachlore (Weisshaar et boger 1987).

Une étude a montré que 30 minutes est le temps nécessaire à la fixation du métozachlore à la synthétase (ou élongase) des acides gras à chaînes longues. Il s'est avéré que cette fixation est irréversible (Mohr et al. 2008), suggérant un effet des chloroacétanilides à l'échelle des cellules irréversible comme ceux induits par les herbicides inhibiteurs de la photosynthèse (Valotton et al. 2008).

Valotton et al. (2008) ont cherché à évaluer à quel moment du développement d'une algue verte *Scenedesmus*, le S-métolachlore a le plus d'effet. Le cycle de développement de l'algue verte *Scenedesmus* se déroule en deux phases, de la façon suivante : une phase de croissance cellulaire qui se déroule durant la période d'éclairage et une phase de division cellulaire qui se déroule durant la phase d'obscurité du cycle. Etant donné que les processus de formation des acides gras à longues chaînes se déroulent pendant la phase d'éclairage (Cedergreen et al. 2005), les auteurs concluent que c'est durant la phase de division cellulaire que le chloroacétanilide est susceptible de présenter le plus de perturbations. Cette inhibition se matérialise par une inhibition de la reproduction ou division cellulaire, étape qui arrive en fin de phase de croissance et qui se matérialise par une augmentation du volume des cellules. Fedike (1982) observe également une inhibition de la division cellulaire sur l'algue verte *Chlamydomonas* durant son exposition à l'alachlore. Une étude enregistrait des effets négatifs du métolachlore pour les algues vertes alors que les diatomées et les cryptophytes semblaient insensibles (Rohr et al. 2006). Les teneurs et compositions en acides gras des algues peuvent varier en fonction des conditions environnementales (température, concentration en nutriment, intensité lumineuse, etc...) (Mohr et al. 2008). Par exemple Rohr et al. (2006) observaient une sensibilité vis à vis du métolachlore plus importante de la part des algues vertes en comparaison aux diatomées et aux cryptophytes. Des études ont pu montrer que certaines espèces sont capables de remplacer les acides gras à longues chaînes constituant leur membrane ou paroi, par d'autres composés (Couderchet et al. 1995 ; SchmalfuB et al. 1998).

Ainsi, ce sont les espèces qui contiennent de très grandes quantités d'acides gras à longues chaînes qui risquent de présenter de fortes sensibilités aux chloroacétanilides.

### III.3 Chimiodynamique de l'alachlore

Comme souligné précédemment, l'alachlore une fois appliqué au sol va être soumis à une combinaison de processus (biotransformation, photodégradation, adsorption, volatilisation...) qui vont contrôler sa persistance, sa biodisponibilité au sein des écosystèmes aquatiques (eaux de surfaces ou souterraines) et sa toxicité sur les organismes (Stamper et Tuovinen 1998). Suivant les écosystèmes considérés (sols, eaux de surface ou eaux souterraines), le temps de demi-vie de l'alachlore varie (**Tableau 4**). La persistance de l'alachlore est plus grande dans les environnements les plus saturés (aquifères, Novick et al. 1986 ; Pothuluri et al. 1990 ; Cavalier et al. 1991), et la biotransformation de l'alachlore apparaît être généralement plus lente dans les eaux, peut être dû à un contenu plus faible en micro-organismes.

L'alachlore est considéré comme relativement mobile dans le sol. Albanis et al. (1998) considèrent que le pouvoir lessivable de l'alachlore au vu de ses propriétés est relativement faible sans pour autant être absent (Fava et al. 2000). La mobilisation augmente avec la quantité de matière organique et d'argile dans le sol (Guo et al. 1993). Weber et Peter (1982) observent une fixation du calcium dans l'argile avec les groupements carboxyles de l'alachlore. L'adsorption des chloroacétanilides augmente avec la diminution de la température. Le pH, à des valeurs inférieures à 7, a peu d'effet sur l'adsorption des chloroacétanilides, par contre pour des valeurs de pH supérieures, l'adsorption augmente, donc le lessivage diminue (Chesters et al. 1989).

La volatilisation dans le sol dépend de la pression de vapeur saturée, de la solubilité dans l'eau, du contenu en eau du sol, de la porosité, de la densité, des matières organiques, de la température, de la présence d'argile, de la vitesse du vent, de l'humidité, et de la précipitation (Chesters et al. 1989 ; Gish et al. 1995). L'alachlore, avec une constante de Henry de  $1,3 \cdot 10^{-6}$ , est considéré comme peu volatile (Chesters et al. 1989). Toutefois, dans certaines conditions, les processus de volatilisation peuvent apparaître au niveau du sol lorsque que celui-ci est humide et associé à un vent fort (Clay et al. 2004).

La biodégradation de l'alachlore a été détectée plusieurs fois dans le sol (Sun et al. 1990 ; Thurman et al. 1996 ; Rodriguez-Cruz et Lacorte 2005), bien que l'alachlore soit très peu minéralisé (Alkhabib et al. 2002). Des bactéries et des champignons isolés montrent une capacité à dégrader les chloroacétanilides (Sette et al. 2004). Cette biodégradation dépend à la fois de la concentration en herbicide, de la température du sol (Selim et al. 2002 ; Sette

Milieu	Explication de la variabilité	Temps de demi-vie (en jours)	Références	
Les eaux de surfaces	"large" microcosme (202 litres)	47,2	Laabs et al 2001	
	"petit" microcosme (0,78 litres)	18,8		
	"large" microcosme (202 litres) + sédiment	22,8		
	"petit" microcosme (0,78 litres) + sédiment	4,9		
		21	Graham et al 2000	
	Anaérobie	9,7	Graham et al 2000	
	Aérobie	21		
	Gradient d'oxygène + riche en nutriment	22		
	Gradient d'oxygène + pauvre en nutriment	46		
		oligotrophe	86	Knapp et al 2003
		mésotrophe	56	
		oligotrophe	36	
		Hypereutrophe	22	
		grande et moyenne quantité de lumière	5 à 60	Ensz et al 2003
	obscurité	> 180		
Sol	Diverses caractéristiques des sols	7 à 14	Chester et al 1989	
		15 à 30	Leonard, 1988	
		40 à 70	Teïssier et al 2005	
		15 à 30	Kolpin et al 1996	
		7,8	Ramesh et al 2004	
		8	Aga et Thurman 2001	
		5,2	Fava et al 2000	
			Rodriguez-Cruz et Lacorte 2005	
		6,5	Locke et al 1996	
		4 à 50	Clay, 2004	
		11	Chirnside et al 2007	
		sous climat tempéré	14 à 49	Laabs et al 2002
		sous climat tropical	1 à 6	
Les eaux souterraines	température/ concentration initiale en alachlore / profondeur	808 à 1518	Cavalier et al 1991	
		400	Perry, 1990	
	aérobie ou anaérobie	23 à 66	Pothuluri et al 1990	

Tableau 4 – Temps de demi-vie de l'alachlore dans différents environnements

et al. 2004; Wang et al. 2009) et de la complexité de la communauté microbienne (Wang et al. 2008). Par exemple, Wang et al. (2008) observent qu'une température de 30°C est la plus favorable.

La photodégradation n'est pas le mécanisme prédominant de la dissipation de l'alachlore du sol ou du milieu aquatique (Graham et al. 2000b; Ryu et al. 2003). La dégradation par voie chimique dans le sol apparaît être un processus susceptible d'être significatif suivant les caractéristiques physico-chimiques du sol (Chesters et al. 1989). En ce qui concerne la photodégradation indirecte de la molécule (Miller et al. 2005), les matières organiques dissoutes, les teneurs en nitrates et le type d'eau sont des facteurs importants car ils absorbent la lumière (Bahena et al. 2006). Lors d'une étude réalisée par Chiron (2005), avec une solution de 4 mg.L<sup>-1</sup> de substances humiques, la demi-vie de l'alachlore est de 84 à 150 minutes pour une irradiation d'intensité 550 W.m<sup>-1</sup> et de spectre de 300 à 800 nm. Tissier et al. (2005) trouvent un temps de demi-vie de 2 heures à 239 jours pour l'alachlore.

De nombreux produits de dégradation biotiques ou abiotiques ont été mis en évidence (Chesters et al. 1989; Galassi et al. 1996; Stamper et Tuovinen 1998; Fava et al. 2000) dans le sol comme en milieu aquatique. Parmi les plus détectés, l'alachlore ESA (*Ethane Sulfonic Acid*) et OA (*Oxanilic Acid*) font l'objet de nombreuses études (par exemple Graham et al. 1999; Kalkhoff et al. 1998), et présentent des toxicités relativement faibles (Heydens et al. 2000). D'autres produits de dégradation des chloroacétanilides ont été montrés comme possédant une toxicité similaire voire supérieure aux molécules mères (Osano et al. 2002). Les OA et ESA métabolites résultent d'un enlèvement de l'atome de chlore associé à l'arrivée d'un groupe fonctionnel acide sulfonique (**Figure 20**). Généralement ces molécules métabolites sont plus stables, avec des poids moléculaires plus faibles que la molécule mère (alachlore = 270) ou très proche (ESA = 314) et sont oxydés, leur donnant une plus grande solubilité et un plus grand potentiel de lessivage (Potter et Carpenter 1995), ce qui explique leur présence dans les eaux de surface, parfois sous de plus fortes concentrations que l'alachlore (Kolpin et al. 1998; Kalkhoff et al. 1998).

Quel que soit le type de milieux considéré (sol ou aquatique), l'alachlore semble principalement être dégradé via des processus biologiques comme l'ont observé entre autres Stamper et Tuovinen (1998) pour le sol, et Knapp et al. (2003) en milieu aquatique. Knapp et al. (2003) ont constaté que 90 % de l'alachlore est dégradé uniquement par voies biotiques. La minéralisation complète de cette molécule est également rare en milieu aquatique (Novick et Alexander 1985; Graham et al. 1999). Pour le cas de l'acétolachlore qui présente une structure similaire à l'alachlore, Brohuss et al. (2005) enregistrent sur une dissipation totale de la

molécule (45 %) : 1,3 % de disparition associée à la photodégradation, 0,64 % à l'adsorption et 96 % à la biodégradation.

Des études ont montré que l'alachlore est transformé très rapidement en ESA ou OA alachlore, via la Glutathione S-Transférase (GST) qui entraîne la disparition de l'atome de chlore affaiblissant le caractère toxique de la molécule d'origine et qui augmente son potentiel de transport par ruissellement (par ajout d'une structure ionique). Ce processus a été observé dans le sol (Thurman et al. 1996) mais également dans les eaux de surface (Graham et al. 2000b) et souterraines (Fields et Thurman 1996). L'alachlore est associé à un tripeptide (le glutathione), qui va former un pont avec l'alachlore au niveau de son sulfure catalysé par la GST, formant des métabolites sulfonés. Le glutathione est un tripeptide ubiquiste qui, en réagissant avec un composé électrophile exogène ou endogène, peut former un produit de dégradation moins toxique et plus soluble dans l'eau. Ces réactions sont catalysées par les enzymes GST (Thurman et al. 1996; Vuilleumier 1997). Elles sont retrouvées dans la plupart des organismes : plantes, animaux, protozoaires, champignons et bactéries (Thurman et al. 1996; Field et Thurman 1996). Ces réactions sont réalisées au cours d'un processus de détoxification des molécules (Vuilleumier 1997). L'apparition de la GST est liée à des phénomènes de résistances et d'adaptations à différents stress chimique ou physique dans l'environnement (Field et Thurman 1996) tels qu'une exposition à un herbicide (Feng et al. 1991), un hydrocarbure polycyclique aromatique (Lyoyd-Jones et al. 1997). Actuellement, de nombreuses études ont pu mettre en évidence ces réactions de conjugaison : chez les plantes pour des voies de détoxification aux herbicides (par exemple : Labrou et al. 2005 dans le maïs) chez les algues et chez les microorganismes du sol (champignons ou bactéries) (Zablutowic et al. 1995).

Certaines études montrent que la biotransformation de cette molécule se fait par co-métabolisme (Novick et Alexander 1985; Ensz et al. 2003). La présence d'une autre source de carbone comme le glucose ou le saccharose permet d'améliorer cette biodégradation. L'utilisation de l'alachlore comme source d'azote n'a pas été fermement démontrée (Stamper et Tuovinen 1998).

Le tableau 4 montre bien la diversité des temps de demi-vie dans les eaux de surface, associée à une grande variabilité des conditions environnementales. La biotransformation de l'alachlore en milieu aquatique dépend de plusieurs paramètres :

- La teneur en phosphore total (Pt). En effet dans les milieux aquatiques les valeurs de Pt sont souvent limitantes, ce qui peut réduire l'activité microbienne. La biodégradation s'est avérée plus efficace dans un système aquatique riche en nutriments (Novick et Alexander 1985; Graham et al. 2000b; Knapp et al. 2003) ;

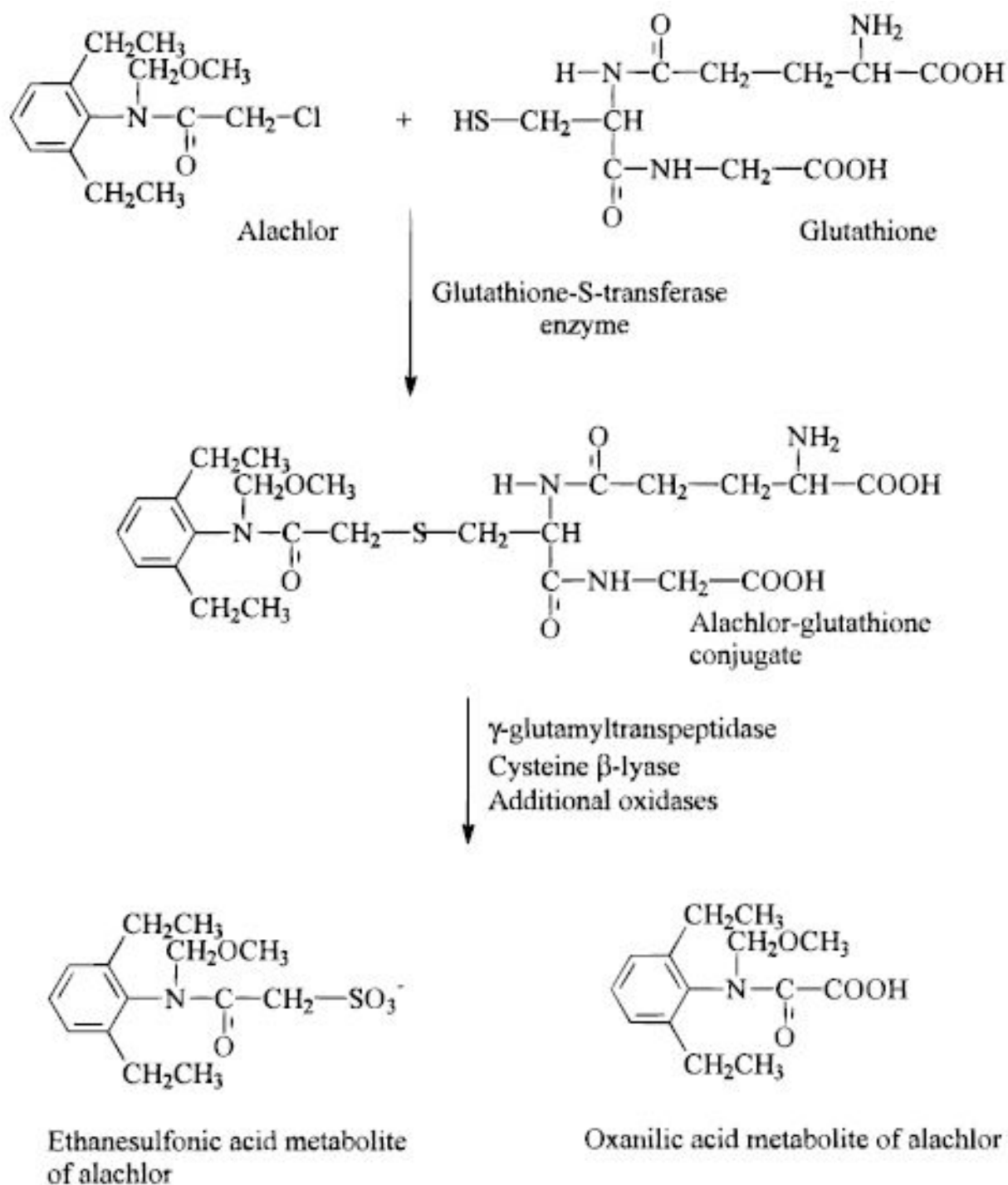


Figure 20 – Voies potentielles de dégradation de l'alachlore dans le sol (extrait de Field et Thurman 1996)

- Les microorganismes présents. Knapp et al. (2003) observent que la dégradation de l'alachlore est plus efficace lorsque les « Bacteria » et « Eucaryote » sont actifs. En effet, si l'on suit l'hypothèse de Graham et al. (2000b) et Thurman et al. (1996) sur la biodégradation, les GSTs sont des enzymes communes aux deux domaines (Vuilleumier 1997) ;
- La teneur en carbone autochtone. Il pourrait se produire deux phénomènes simultanés, premièrement une dégradation du carbone de fort poids moléculaire par les bactéries et deuxièmement une dégradation du carbone de faible poids moléculaire issu de la production primaire (Ensz et al. 2003). Le rajout de glucose par Novick et Alexander (1985) a entraîné dans son milieu d'étude un taux de dégradation plus important ;
- L'intensité lumineuse. Ensz et al. (2003) font varier l'intensité lumineuse dans leurs microcosmes aquatiques. Une réduction de la lumière (de 1200 à 240  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) sur la colonne d'eau provoque une diminution de la production de carbone disponible autochtone limitant ainsi le taux de dégradation.
- Le contenu en oxygène et des teneurs en nutriments. Le taux de biodégradation en condition anaérobie est plus élevé (Graham et al. 2000b). Il existe donc une corrélation importante entre la teneur en nutriments (phosphore total, nitrates et carbone organique) de la colonne d'eau et le taux de dégradation de la molécule d'alachlore uniquement sous un fort éclairage (Graham et al. 1999). Le carbone organique dissous présent dans la colonne d'eau ne joue pas seulement le rôle de surface d'adsorption comme pour la plupart des composés hydrophobes, mais également le rôle de source de carbone pour la croissance et pour le co-métabolisme des micro-organismes
- Les concentrations initiales enalachlore. Galassi et al. (1996) observent une biodégradation d'autant plus grande que la concentration enalachlore est faible ;
- La taille des microcosmes. Laabs et al. (2007) montrent que les temps de demi-vie sont plus faibles d'un facteur 2 dans les microcosmes de plus petite taille (0,78 L) par rapport aux microcosmes de plus grande taille (202 L).

En plus de ces facteurs, nous pouvons supposer que le ratio biomasse sur la quantité enalachlore ainsi que la composition en espèce, dans une hypothèse où la capacité de biodégradation de l'alachlore est un mécanisme non ubiquiste, sont susceptibles d'influencer les taux de biodégradation de l'alachlore.

Date d'échantillonnage	Rivière d'étude	Pays	Concentration ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )			Référence
			Moyenne	Min	Max	
Nov 1999-Mars 2000	Stream	Brésil	nd	0,004	0,009	Laabs et al. 2002
Nov 1999-Mars 2000	River	Brésil	nd	0,003	0,016	Laabs et al. 2002
Nov 1999-Mars 2000	Surface waters	Brésil	nd	0,007	0,019	Laabs et al. 2002
1981-1987	Sydenham river	Canada	2	0,9	3,4	Kimbrough et al. 1996
Printemps-Automne 2005-2006	Llobrega river bassin	Espagne	nd	0,0922	0,0171	Ricart et al. 2010
2004-2006	Ebro river	Espagne	nd	0,005	0,272	Navarro et al. 2010
Mai à Aout 2005	Ebro river	Espagne	15,8	nd	62,9	Kuster et al. 2008
Octobre 1997	Surface waters	Espagne	6,13	0,06	20,9	Sanchez-Camazano et al. 2005
Avril 1998	Surface waters	Espagne	7,95	0,09	31,9	Sanchez-Camazano et al. 2005
Octobre 1998	Surface waters	Espagne	2,35	0,63	8,5	Sanchez-Camazano et al. 2005
Juin 1998-Décembre 1998	Guarena, Almar rivers	Espagne	nd	0,09	0,16	Garabias-Martinez et al. 2000
Mars 2008-Mars 2009	Save river	France	0,007	-	0,05	Taghavi et al. 2011
1999-2007	Evros bassin	Grèce	nd	nd	< 1,2	Vryzas et al. 2009
Mai 1996-Avril 1997	Central Macedonia	Grèce	0,005	-	0,023	Albanis et al. 1998
Mai 1996-Avril 1997	Central Macedonia	Grèce	0,002	-	0,037	Albanis et al. 1998
Mai 1996-Avril 1997	Central Macedonia	Grèce	0,02	-	0,265	Albanis et al. 1998
1993-1994	Axios river	Grèce	nd	-	0,26	Papadopoulou-Mourkidou 2004
1997-1998	Axios river	Grèce	nd	-	0,031	Papadopoulou-Mourkidou 2004
1998-1999	Kalamas river	Grèce	nd	-	0,939	Albanis et al. 2004
1998-1999	Louros river	Grèce	nd	-	1,026	Albanis et al. 2004
1994	Po et Olona river	Italie	nd	nd	0,007	Galassi et al. 1996
Mars 1998- Aout 1998	Nzoi river	Kenya	nd	0,02	0,35	Osano et al. 2003
1996-1998	Scheldt river	Pays-Bas	nd	0,002	0,1	Konstantinou et al. 2006
Juin 2004	Vela Lake	Portugal	1,13 à 3,26	nd	nd	Abrantes et al. 2010
Octobre 2004	Vela Lake	Portugal	1,68 à 7,61	nd	nd	Abrantes et al. 2011
Avril à Juillet 1999	River	Portugal	nd	0,02	5,4	De Almeida et al. 2000
1990-1993	Midwestern rivers and reservoir	USA	< 0,05	nd	nd	Thurman et al. 1996
1990-1991	Minnesota river	USA	nd	nd	2,4	Schottler et al. 1994
Mars 1999-Mai 2000	Mississippi river	USA	nd	0,05	0,18	Rebich et al. 2004
1998	Midwestern streams and rivers	USA	nd	0,045	17,2	Battaglin et al. 2000
2002-2003	Ground water Southwest Georgia	USA	nd	-	0,521	Dalton et Frick 2008
Avril 1991 - Décembre 1997	Mississippi river	USA	nd	nd	2	Clark et Goolsby 2000
1989	Midwestern streams	USA	1,9	nd	nd	Scribner et al. 2000
1995	Midwestern streams	USA	0,13	nd	nd	Scribner et al. 2000
1998	Midwestern streams	USA	0,05	nd	nd	Scribner et al. 2000
1991-1998	White river, Indiana	USA	nd	nd	3	Crawford 2001

**Tableau 5** – Concentrations enalachlore des eaux de surface selon différentes localisations et périodes de détection. (nd = donnée non disponible)



### III.4 Contamination des eaux de surface par l'alachlore

L'alachlore appliqué à un sol, sera soit transporté vers les eaux souterraines par infiltration, soit vers les eaux de surface (lotique et lentique) par ruissellement (Postle et al. 2001). Dans cette partie, nous nous focalisons uniquement sur la contamination des eaux de surface par l'alachlore. Le **tableau 5** montre bien la répartition mondiale d'utilisation de l'alachlore. Dans la plupart des études, les auteurs n'enregistrent que de faibles concentrations ( $< 30 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) dans les écosystèmes aquatiques d'eau douce. Différents paramètres, incluant la proximité entre le site d'application et l'eau de surface, le type de terrain et le sol, les pratiques agricoles, la pluviométrie, la période d'étude... peuvent expliquer ces écarts de concentrations inter et intra sites d'étude.

Parmi les produits de dégradation de l'alachlore (biotique ou abiotique), OA et ESA sont les plus recherchés (par exemple Thurman et al. 1996 ; Rebich et al. 2004 ; Sanchez-Camasano et al. 2005).

### III.5 Impact de l'alachlore au sein des milieux aquatiques

Généralement le potentiel toxique d'un pesticide est évalué à partir de tests écotoxicologiques le plus souvent monospécifiques et réalisés sur du court terme. Lors de ces tests, la toxicité potentielle de la molécule est basée sur le calcul de l' $EC_{50}$ , correspondant à la concentration qui engendre 50 % d'inhibition des individus de la population. Comme nous le montre le **tableau 6**, de nombreux tests ont été réalisés afin d'évaluer la toxicité de l'alachlore sur des vertébrés, des invertébrés et des producteurs primaires. Parmi les producteurs primaires, les tests sont généralement utilisés sur les algues vertes (*Scenedesmus* et *Chlorella*) et beaucoup moins sur les cyanobactéries ou les diatomées. Ces données soulignent bien les différentes valeurs d' $EC_{50}$  qui ont été enregistrées. La toxicité varie en fonction des espèces, mais également du *design* expérimental tels que la taille des microcosmes, la durée de l'expérience, la mesure de l' $EC_{50}$  (chlorophylle *a*, nombre de cellules...) et le groupe taxonomique de l'espèce (Pavlic et al. 2006). Par exemple pour des tests sur l'algue verte *Scenedesmus capricornutum*, Fairchild et al. (1998) observent des valeurs d' $EC_{50}$  comprises entre 4 et 9  $\mu\text{g.L}^{-1}$  alors que Pavlic et al. (2006) observent des valeurs comprises entre 12 et 15  $\mu\text{g.L}^{-1}$ .

A notre connaissance, peu de données sont disponibles dans la littérature en ce qui concerne la toxicité des principaux produits de dégradation (OA et ESA). Bian et al. (2009) enregistreraient une valeur d' $EC_{50}$  (à 96 h) sur des espèces d'algues vertes de 0,019 à 0,037  $\mu\text{g.L}^{-1}$  pour l'alachlore contre des valeurs d' $EC_{50} > 1000 \mu\text{g.L}^{-1}$  pour ESA alachlore, suggérant une toxicité plus faible de la part du métabolite. Les quelques études à ce sujet

Types d'organismes	Espèces	Temps d'exposition (heures)	Paramètres mesurés	Valeur moyenne EC <sub>50</sub> (µg.L <sup>-1</sup> )	Référence	
Invertébrés	<i>Daphnia sp.</i>	48	nd	13 (LC <sub>50</sub> )	Abrantes et al. 2010	
	<i>Tetrahymena pyriformis</i>	0,75	Activité non spécifique de l'estérase	1,49.10 <sup>5</sup> (LC <sub>50</sub> )	Bonnet et al. 2007	
		12	Taux de croissance de la population	8,9		
	<i>Daphnia sp.</i>	48	nd	53,06	Ansara-Ross et al. 2008	
<i>Chironomus riparius</i>	96	Luminescence	1,7.10 <sup>4</sup> (LC <sub>50</sub> )	Osano et al. 2002		
Plantes aquatiques	<i>Lemna gibba</i>	nd	nd	340	Battaglin et Fairchild 2002	
	<i>Lemna minor</i>	96	Quantité de biomasse	198	Fairchild et al. 1997	
	<i>Ceratophyllum demersum</i>	336	Chlorophylle	85	Fairchild et al. 1998	
	<i>Najas sp.</i>			584		
	<i>Lemna minor</i>			482		
	<i>Elodea canadensis</i>			> 3000		
	<i>Myriophyllum heterophyllum</i>			> 3000		
Producteurs primaires	<i>Chlamydomonas eugametos</i>	48	Chlorophylle totale	2700	Hess 1980	
	<i>Selenastum capricornutum</i>	96	Chlorophylle	10	Fairchild et al. 1998	
	<i>Chlorella vulgaris</i>			26		
	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>			460		
	<i>Scenedesmus quadricauda</i>			1328		
	<i>Microcystis sp.</i>			> 3000		
	<i>Anabaena flosque</i>			> 3000		
	<i>Ceratophyllum</i>			85		
	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>			10		Fairchild et al. 1998
	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>			nd		Tomlin 2000
	<i>Scenedesmus vacuolatus</i>			24		Reproduction
	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	72	Densité	12 (bioessai en béccher)	Pavlic et al. 2006	
				15 (en microplaque)		
	<i>Desmodesmus subspicatus</i>			880 (en béccher)		
				995 (en microplaque)		
	<i>Chlorella kessleri</i>			22 (en béccher)		
				32 (en microplaque)		
<i>Scenedesmus obliquus</i>	96	Croissance	27	Bian et al. 2009		
<i>Chlorella vulgaris</i>	nd	nd	5,54.10 <sup>3</sup>	Yang et al. 2004		
<i>Scenedesmus capricornutum</i>	nd	nd	1,64	US EPA		
<i>Scenedesmus capricornutum</i>	96	Quantité de biomasse	6	Fairchild et al. 1997		
<i>Scenedesmus subspicatus</i>	24	Assimilation	7,5.10 <sup>4</sup>	Zagorc-Koncan 1996		
		Croissance	3,5.10 <sup>3</sup>			
<i>Scenedesmus vacuolatus</i>	24	Reproduction	0,14 µM	Junghans et al. 2006		
Bactérie	<i>Vibrio fischeri</i>	0,5	Inhibition de la bioluminescence	1,28.10 <sup>5</sup>	Bonnet et al. 2007	
		0,25		2,06.10 <sup>5</sup>		
		0,25		589	Osano et al. 2002	

**Tableau 6** – Toxicité de l'alachlore sur différents organismes basée sur des paramètres d'écotoxicologie (EC<sub>50</sub> et dans certains cas LC<sub>50</sub>). (nd = donnée non disponible)

suggèrent que ESA et OA alachlore sont moins toxiques que l'alachlore (Bian et al. 2009). Les métabolites des chloroacétanilides sont souvent considérés comme non mutagènes et non génotoxiques bien que certains ont été soulignés plus tératogènes que leurs molécules mères (Tessier et Clark 1995 ; Heydens et al. 2000).

Les valeurs d'EC<sub>50</sub> mesurées sont souvent nettement supérieures aux concentrations en alachlore détectées dans les eaux de surface. Sur la base de ces tests standardisés monospécifiques, l'alachlore présente une toxicité chronique modérée pour les vertébrés et invertébrés aquatiques et globalement peu toxique pour les producteurs primaires (algues ou plantes) (US EPA 1997). Une étude réalisée dans un lac du Portugal a détecté des concentrations importantes d'alachlore dans des tissus de poissons, 0,16 et 0,08 µ.g.kg<sup>-1</sup> de tissus de *Mi-*

*cropterus salmoides*, en octobre 2004 et juin 2004, et  $0,19 \mu\text{g.kg}^{-1}$  de tissus de *Cyprinus carpio* (Abrantes et al. 2010). Les différents habitats et stratégies d'alimentation peuvent expliquer les quantités différentes d'alachlore accumulées dans les tissus des deux espèces de poissons. *M. salmoides* est un poisson prédateur appartenant à des niveaux trophiques supérieurs. Dans un environnement aquatique, la présence de ces poissons contaminés peut engendrer des effets sur la santé humaine et des phénomènes de bioaccumulation d'un échelon à l'autre de la chaîne trophique.

### III.6 L'alachlore et les biofilms phototrophes

Peu d'études se sont intéressées à l'impact de l'alachlore sur les biofilms phototrophes à l'échelle des communautés (Krieger et al. 1988 ; Spawn et al. 1997 ; Carder et Hoagland 1998...), en comparaison aux herbicides inhibiteurs de la photosynthèse (e.g. Debenest et al. 2009). De nombreux auteurs observent des dommages plus marqués de la part des inhibiteurs de la photosynthèse, comparés aux dommages engendrés par les herbicides de la famille des chloroacétanilides (exemple Debenest et al. 2009). Cette différence vient probablement des modes d'actions différents de ces deux types de famille et la fonction de détoxification des chloroacétanilides par les organismes via la GST. Globalement une exposition à des concentrations importantes en alachlore ( $5 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) induit une réduction des teneurs en chlorophylle *a*, et de la densité algale (Carder et Hoagland 1998 ; Spawn et al. 1997). Pour des concentrations plus élevées ( $> 30 \mu\text{g.L}^{-1}$ ), la composition algale peut être affectée (Carder et Hoagland 1998). Certaines espèces se présentent comme directement tolérantes à l'alachlore, c'est le cas de *F. crotonensis* (diatomée) ou de *Chlorella vulgaris* (algue verte), et d'autres semblent plus sensibles comme *M. varians* (diatomée) ou *Cladophora glomerata* (algue verte) (Carder et Hoagland 1998 ; Mohr et al. 2008). Mohr et al. (2008) suggéraient que la faible sensibilité de *C. vulgaris* à une exposition au métozachlore pouvait venir de sa faible quantité en acides gras à longues chaînes.

Vu les fortes similarités du mode d'action des chloroacétanilides, nous pouvons nous baser sur les impacts engendrés par les autres chloroacétanilides sur les biofilms phototrophes. Noack et al. (2003) et Debenest et al. (2009) observaient pour des concentrations de 5 et  $30 \mu\text{g.L}^{-1}$ , que le métolachlore et le métazachlore engendrent des inhibitions de la croissance du biofilm illustrées par des teneurs en chlorophylle *a* plus faibles que les contrôles alors que Roubeix et al. 2011a n'observaient pas d'effet sur la biomasse pour des biofilms phototrophes exposés à 5 et  $30 \mu\text{g.L}^{-1}$  de métolachlore. Les impacts sur la composition taxonomique des diatomées ou des algues vertes sont espèces dépendantes, certaines espèces étant tolérantes

(*Melosira varians*, *Nitzschia dissipata* et *Cocconeis placentula*), d'autres sensibles (*Eolimna minima* et *Navicula reichardtiana*). Certaines études ont pu montrer qu'à de fortes concentrations en métolachlore (environ  $30 \mu\text{g.L}^{-1}$ , il est possible d'observer des déformations de diatomées ou d'algues vertes (Liu et Xiong 2009 ; Roubeix et al. 2011a).

Il est important de rappeler le pouvoir adsorbant des biofilms vis-à-vis des métaux (Duong et al. 2011) mais également vis-à-vis des herbicides (Lawrence et al. 2001, pour l'atrazine), qui dépend du Koc du polluant (Junghans et al. 2003). Nous ne connaissons pas d'étude focalisée sur l'adsorption de l'alachlore par les biofilms phototrophes. Bohuss et al. (2005) observent seulement 1,3 % d'adsorption de l'acétolachlore par un biofilm. Il faut noter que cette adsorption est susceptible de modifier la toxicité de l'alachlore vis-à-vis du biofilm. En effet, la mobilité d'un herbicide dépend de sa distribution entre les phases liquide et solide, ce qui va également agir sur sa biodisponibilité.

### III.7 Les arguments du choix de l'alachlore

L'ensemble de ce travail a été réalisé autour d'un chloroacétanilide, l'alachlore, pour différentes raisons :

- Son mode d'action : l'alachlore est susceptible d'avoir des effets directs et indirects sur les bactéries et sur les algues de nos communautés au sein des biofilms phototrophes ;
- C'est une molécule souvent détectée dans les eaux de surface, certes le plus souvent à de faibles concentrations mais suivant une large répartition géographique. Ce qui peut poser des problèmes (i) écotoxicologiques pour les organismes aquatiques autochtones et (ii) de contamination de l'eau à potabiliser et des organismes aquatiques devenus impropres à la consommation ;
- La présence des produits de dégradation notamment OA et ESA, détectés parfois en plus fortes concentrations ;
- Les connaissances analytiques de nos collaborateurs ' ;

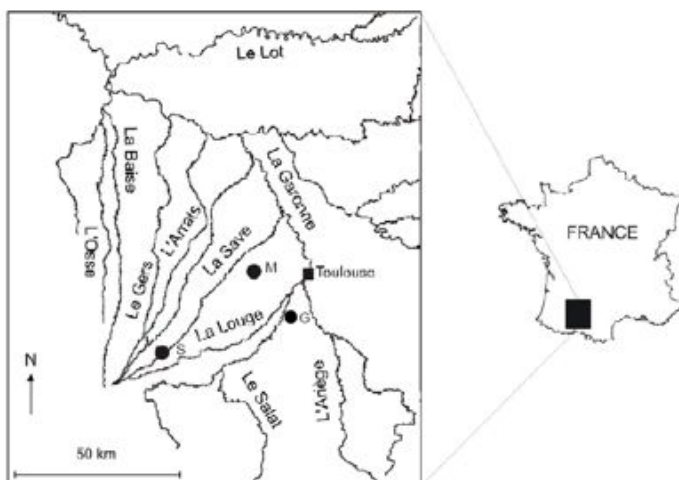
## Partie II

### Matériel et Méthodes

# Sites d'étude et stratégies d'échantillonnage

## I.1 Choix des sites

Dans le cadre de cette thèse, trois sites d'échantillonnage ont été retenus pour la production *in situ* sur des supports naturels ou artificiels et la collecte de biofilms phototrophes. Ces trois sites présentent des caractéristiques environnementales spécifiques liées notamment à leurs caractéristiques hydrauliques contrastées et leurs qualités chimiques de l'eau. Ils sont localisés dans la région de Midi-Pyrénées, dans le sud-ouest de la France (**Figure 21**), au sein du bassin versant de la Garonne qui s'étend sur 56 000 km<sup>2</sup>. La stratégie a été de choisir des sites d'étude les plus diversifiés possibles, en termes de faciès, de vitesse de courant, de statut trophique, d'usage de pesticides, de type de substrats, etc... afin d'avoir un panel varié de conditions environnementales. Au-delà de leurs caractéristiques morphologiques et physico-chimiques différentes, d'autres critères ont été pris en compte : leur bonne accessibilité, la possibilité de fixer facilement des supports artificiels et des distances raisonnables d'un site à l'autre.



**Figure 21** – Localisation géographique des 3 sites d'échantillonnage des biofilms phototrophes (complété de Paule et al. 2009). Nomenclature des stations : **M** : Le Montoussé à Auradé, **S** : La Save à Larroque, **G** : La Garonne à l'Aouach.

Caractéristiques des sites d'échantillonnage			
Station	M	S	G
Nom	Le Montoussé	La Save	La Garonne
Type	Ruisseau	Rivière	Fleuve
Localisation	Auradé (32)	Larroque (31)	Aouach (31)
Coordonnées	(43°33'55.06"N-01°03'30.92"E)	(43°11'43.77"N-00°36'28.59"E)	(43°23'N - 01°18'E)
Ordre de Strahler	1		6
Largeur (m)	1,5	6,7	100
Débit moyen ( $m^3.s^{-1}$ )	nr	nr	200 <sup>c</sup>
Substrat	Sédiment	Banc de galets	Banc de galets
Bassin	Agricole	Forestier	
Pesticide	Forte	Faible	Faible

**Tableau 7** – Principales caractéristiques des sites d'échantillonnage **M**, **S** et **G** (nr = non répertorié, <sup>c</sup> : source : <http://www.hydro.eaufrance.fr>).

## I.2 Présentation des sites

Les sites d'échantillonnage se situent sur des cours d'eau de différentes importances, au niveau :

- d'un ruisseau, Le Montoussé (station annotée **M**),
- d'une rivière, La Save (station annotée **S**),
- et d'un fleuve, La Garonne (station annotée **G**).

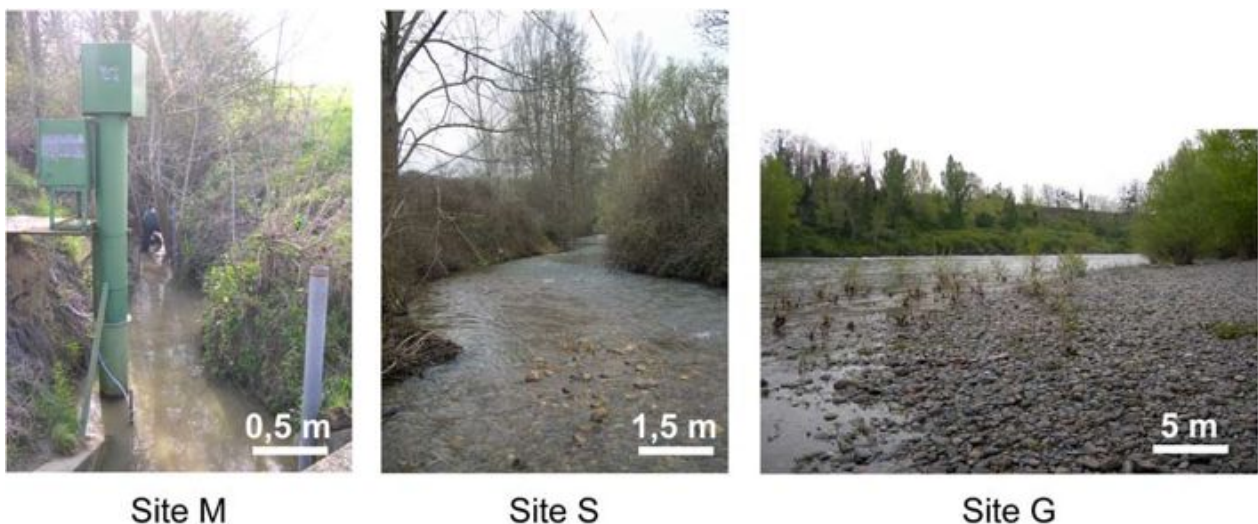
Les principales caractéristiques des sites retenus sont résumées dans le **tableau 7**.

Le site d'échantillonnage **M** sur Le Montoussé (**Figure 22**, gauche), un ruisseau affluent de La Save, est localisé à l'exécutoire d'un bassin versant agricole expérimental (328 hectares, [www.agriculteur-aurade.fr](http://www.agriculteur-aurade.fr)) en amont immédiat du village d'Auradé (Gers, France) situé à 40 km de la ville de Toulouse (Sud-ouest, France). Ce bassin versant est dominé par un paysage agricole dont les principales cultures sont le tournesol et le blé (Taghavi et al. 2010). Il a fait l'objet d'un suivi des concentrations en nitrates et en produits phytosanitaires durant une décennie (Rapports de 1996 à 2006 de l'Association des Agriculteurs d'Auradé; Debenest 2007). Le lit du ruisseau est sédimentaire (pas de substrat naturel du type rocher ou galet),

confiné (1,5 mètres de large) et très boisé. La profondeur de l'eau est au maximum de 50 cm et la vitesse du courant, hors période de crue, était de  $0,045 \text{ m.s}^{-1}$  au moment de l'ensemble de nos expériences (courantomètre, Flow-Mate model 2000, Marsh-McBirney Inc., USA).

Le site d'échantillonnage **S** sur La Save (**Figure 22**, milieu), une rivière affluent de La Garonne, est localisé dans le bassin versant situé en amont des Gorges de La Save, à 2 km en amont du village de Larroque (Haute-Garonne, France) et 80 km de la ville de Toulouse. Le bassin est dominé par un paysage forestier avec la présence de pâturages. Le lit de la rivière est très rocailleux et large de 6,7 mètres. La Save présente des périodes d'étiage avec des profondeurs moyennes de 50 cm et une vitesse de courant de  $1 \text{ m.s}^{-1}$  en basses eaux et  $3 \text{ m.s}^{-1}$  en hautes eaux.

Le site d'échantillonnage **G** sur La Garonne (**Figure 22**, droite) est localisé au niveau du village de L'Aouach (Haute-Garonne, France) situé à 36 km en amont de la ville de Toulouse. De par son régime pluvionival, La Garonne a deux périodes d'étiage, une estivale et une hivernale, avec des débits inter-annuels moyens de  $200 \text{ m}^3.\text{s}^{-1}$  (à la station de Portet-sur-Garonne, Boulêtreau et al. 2006). Durant les périodes de basses eaux, le lit du fleuve a une largeur de 100 mètres avec des profondeurs de moins de 1,5 mètres et une vitesse de courant de  $0,5 \text{ m.s}^{-1}$  à proximité du rivage. Son lit est constitué de graviers et galets, conditions favorables au développement de biofilms phototrophes.



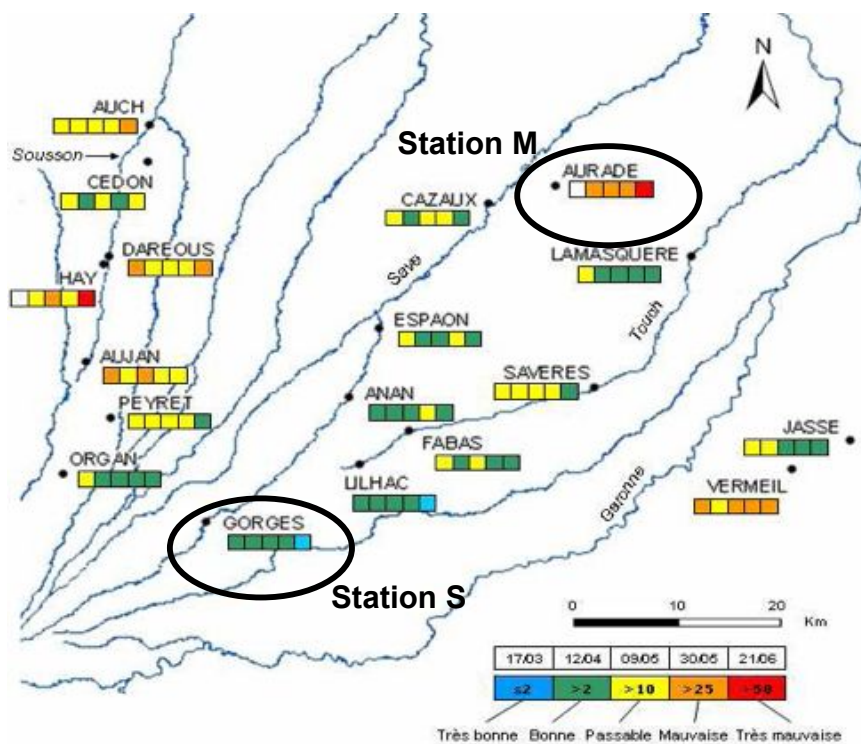
**Figure 22** – Photographies des trois sites d'échantillonnage **M** (Auradé, à gauche), **S** (Larroque, au milieu) et **G** (Aouach, à droite) prises au printemps (Photographie de droite de S. Teissier).



## I.3 Caractéristiques physico-chimiques des stations

Le choix de ces trois sites d'échantillonnage a été influencé également par les connaissances que nous avons sur leurs caractéristiques physico-chimiques grâce à des études réalisées antérieurement. Ces sites présentent des niveaux trophiques et de contamination par les produits phytosanitaires différents.

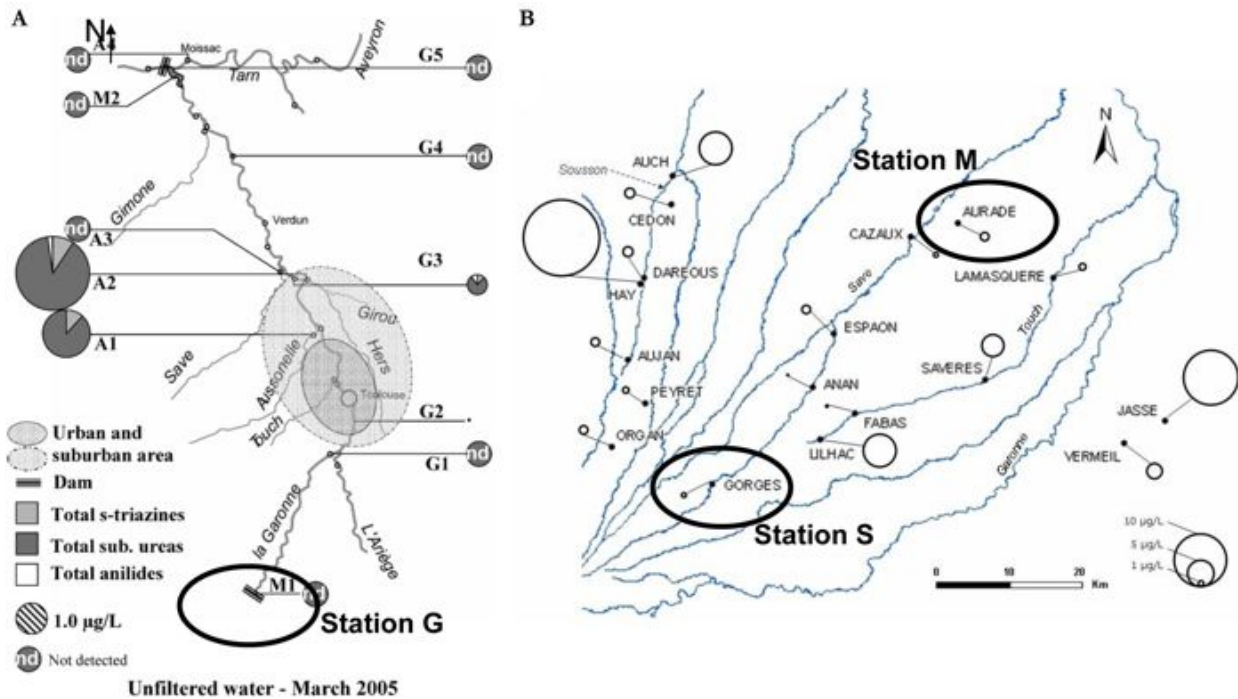
La **figure 23** présente le degré de pollution en 2005 des eaux de surface par les nitrates suivant la qualification de SeQeau (Debenest 2007). Notre station **S** se trouve à quelques kilomètres en amont de la station « Gorges » (entourée sur la carte). Ce site **S** peut être qualifié comme étant de bonne, voire de très bonne qualité, en terme de contamination des eaux par les nitrates. Par contre, le site **M** (repéré sur la carte par Auradé) présente une qualité mauvaise, voire très mauvaise, avec une eau ayant des concentrations en nitrates pouvant dépasser le seuil de potabilité ( $50 \text{ mg.L}^{-1}$ ).



**Figure 23** – Qualité des eaux en 2005 à différentes stations du bassin versant Adour-Garonne, selon leurs concentrations en nitrates ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) (extrait et modifié de Debenest 2007, source [www.adourgaronne.fr](http://www.adourgaronne.fr)).

Les sites d'échantillonnage présentent également de fortes différences en ce qui concerne les teneurs en pesticides. Lors de deux études réalisées en 2005, les analyses en pesticides dans des échantillons d'eau non filtrés révèlent peu (non détectable) ou pas d'herbicides à proximité

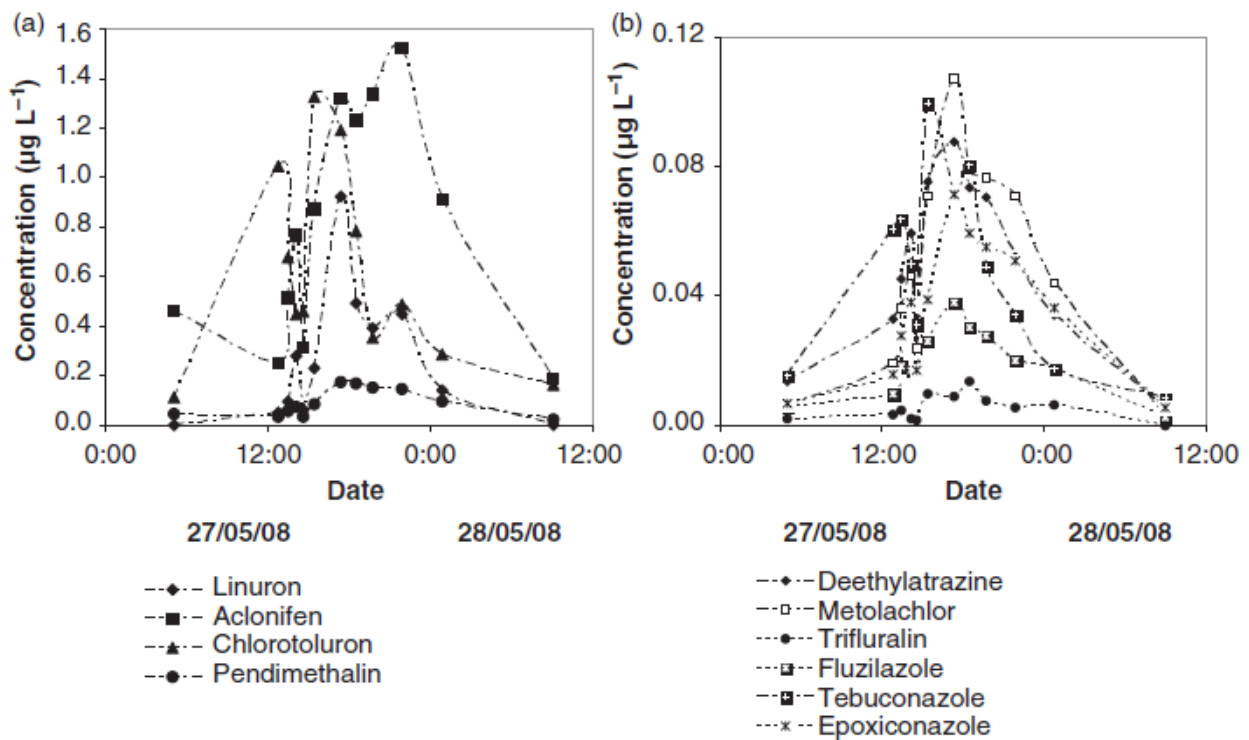
des sites d'échantillonnage **G** et **S** (Figure 24A et B), alors qu'elles révèlent des concentrations légèrement plus importantes au niveau du site d'échantillonnage **M** (Figure 24B).



**Figure 24** – (A) Concentrations en herbicides des eaux de surface non filtrées à différents points de prélèvement en amont et aval de l'agglomération de Toulouse, en mars 2005 (extrait de Devault 2007). (B) valeurs cumulatives des plus fortes concentrations totales en herbicides à différents points de prélèvement, en 2005 et 2006 (extrait et modifié de Debenest 2007).

Sur le site **M**, les herbicides ne sont pas les seuls pesticides à être détectés dans les eaux de surface : un suivi de 1996 à 2006 révèle également la présence de fongicides avec une forte disparité d'une année à l'autre (Jankowski 2007). Vue la géomorphologie de cette station, des études ont pu montrer de plus fortes concentrations en pesticides lors d'épisodes de crue (Figure 25) (Taghavi et al. 2010).

Les résultats de qualité chimique de l'eau des sites présentés ici proviennent d'études réalisées durant des années différentes de celles auxquelles nous avons effectué nos expériences. D'une année sur l'autre, suivant les pratiques agricoles ou les conditions météorologiques, les niveaux de contamination en pesticides peuvent varier. Même s'il est difficile dans ce genre d'étude de définir un site de « référence » (Dermont 2002), dans le cadre de nos différentes approches expérimentales, les sites **G** et **S** correspondent à nos points de « référence » en terme de qualité chimique de l'eau en opposition au site **M** qui correspond au site susceptible d'être le plus contaminé par les pesticides et les nitrates.



**Figure 25** – Concentrations en pesticides d'échantillons d'eau non filtrée prélevés au niveau de l'exutoire de bassin versant d'Auradé, au même emplacement que le site M mais à des dates différentes (extrait de Taghavi et al. 2010)

## I.4 Dispositifs de collecte des biofilms phototrophes

Dans le cadre de cette thèse, les biofilms phototrophes ayant colonisé des supports artificiels ou naturels sont collectés sur les sites d'étude présentés ci-dessus. L'utilisation de supports artificiels s'est avérée très utile car le site M ne présentait aucun support naturel pour le développement de biofilms phototrophes. D'une manière plus générale, l'utilisation de substrats artificiels présente de nombreux autres avantages :

- faciliter les prélèvements *in situ*, le surfaçage des supports et leur transport jusqu'au laboratoire,
- maîtriser le temps de production des biofilms phototrophes et ainsi en connaître l'âge et le degré de maturation,
- limiter l'hétérogénéité intra-sites (Cattaneo et Amireault 1992).

La littérature rapporte de nombreux types de supports artificiels pour la production de biofilms phototrophes (Aloi 1990), le plus utilisé étant des lames de verre (par exemple Morin et al. 2008) que ce soit pour des études *in situ* (par exemple Dorigo et al. 2009 ; Duong et al. 2010) ou en laboratoire (par exemple Bonnineau et al. 2010) parfois sablées, (Sabater et al. 2002) ou dépolies (Dorigo et al. 2009) pour faciliter l'adhésion des micro-organismes. Il est également utilisé des tuiles en céramique (Smucker et al. 2009), en argile cuites (Belanger

et al. 1996), des briques, plaques ou billes de polystyrène, des fils de nylon, des bouées de navigation (Vis et al. 1998), des substrats diffusant des nutriments (*nutrient diffusive substrate*) (Hoch 2008), des supports en polyéthylène (Szlauer-Lukaze 2007), en polypropylène (Jobger et al. 2005), en polycarbonate (Lawrence et al. 2000) et en polyuréthane (Boulêtreau et al. 2010). Généralement les supports artificiels sont très souvent utilisés pour disposer directement dans les micro/mésocosmes des supports préalablement colonisés par du biofilm phototrophe en milieu naturel (par exemple Pérès et al. 1996 ; Schmitt-Jansen et Altenburger 2005 ; Debenest et al. 2009).

Dans le cadre de notre étude, suivant l'utilisation des substrats collectés que nous en avons faite, pour des aspects pratiques, deux types de dispositifs de collecte associés à deux types de substrats ont été utilisés :

i) un premier dispositif de collecte (nommé « cagette ») adapté des dispositifs de Morin et al. (2008) et constitué de lames de verre (L x h : 244 x 78 mm) (**Figure 26A**) maintenues verticalement sur leur largeur par des baguettes à relier, et disposées à l'intérieur de cagettes en matière plastique ajourées (L x l x h : 400 mm x 300 mm x 100 mm ; volume : 12 L). Chaque cagette contient quatre lames de verre et est recouverte d'un grillage de maille 5 mm pour limiter l'accumulation de sédiments et de débris plus grossiers transportés par la colonne d'eau (Aloi 1990).

ii) un deuxième dispositif de collecte (nommé « coupons ») constitué de plaques en polyéthylène à haute densité (PEHD 300) (L x l x h : 100 mm x 50 mm x 5 mm) fixées par des vis en inox sur des barres d'inox (**Figure 26B**). Ce dispositif contient 4 séries de 10 plaques placées en parallèle les unes par rapport aux autres.

Les lames de verre et les plaques en polyéthylène sont disposées de telle sorte qu'elles soient positionnées à la verticale de manière à limiter les dépôts sédimentaires, et parallèlement au courant pour reproduire sur leurs surfaces les vitesses de courant qui agissent sur le fond du cours d'eau. Ces dispositifs de collecte sont ainsi maintenus dans la colonne d'eau des sites d'échantillonnage à environ 10 cm en dessous de la surface (**Figure 27**), attachés par des ficelles soit aux arbres des berges soit à des piquets métalliques plantés dans les sédiments du fond. Ils sont entourés par un grillage de maille 5 mm de manière à limiter l'abrasion par l'accumulation de débris transportés par le courant (**Figure 27**).

A la fin de la période choisie de production des biofilms phototrophes sur les sites, les dispositifs sont prélevés et transportés au laboratoire dans des glacières en polystyrène (700 mm x 500 mm x 400 mm), disposés à l'intérieur de sacs poubelle hydratés.



**Figure 26** – Dispositifs de production et de collecte de biofilms phototrophes *in situ* : (A) avec les lames de verre disposées à raison de 4 par cagette (1 lame = 1 réplikat) et (B) avec les plaques en polyéthylène disposées à raison de 40 sur support métallique (1 plaque = 1 réplikat)



**Figure 27** – Dispositifs de collecte de biofilms phototrophes *in situ* avec les plaques en polyéthylène (A), avec les lames de verre (B), maintenues dans la colonne d'eau ici du site M

# Stratégies d'approche expérimentale

---

## II.1 Approche expérimentale *in situ*

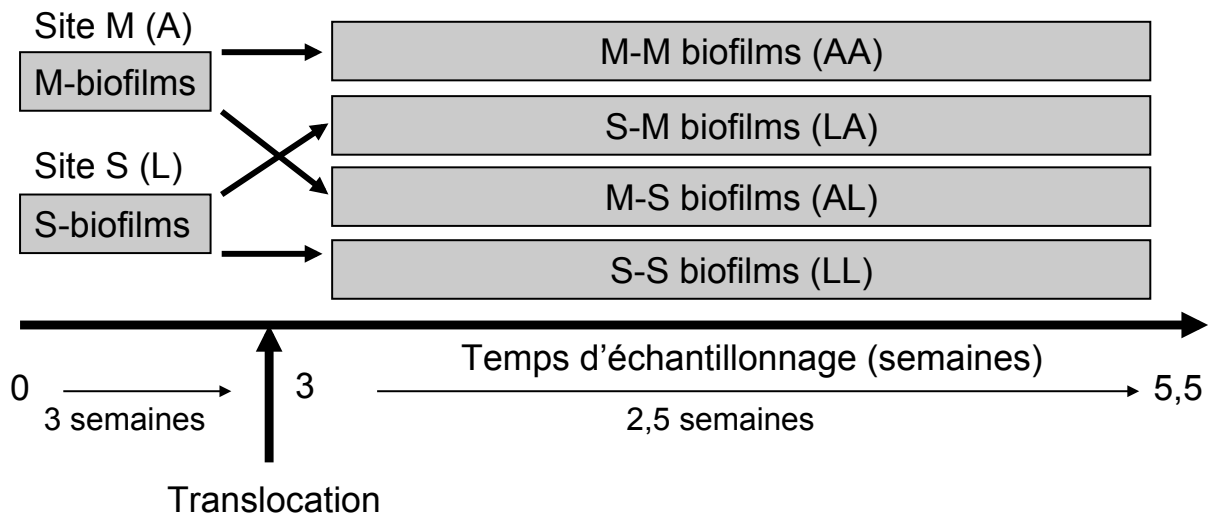
### II.1.1 Objectif de l'étude

Une première expérience a été réalisée entièrement *in situ* sur les sites **M** et **S** du 22 mars au 30 avril 2007 (période de stage de mon Master) pour recouvrir la période d'application des pesticides sur le site **M** et la période où les débits d'eau rendent l'accès possible au site **S**. L'objectif de ce travail était (i) d'évaluer les changements temporels d'une structure de communautés bactériennes durant le développement *in situ* de biofilms phototrophes, (ii) de comparer la structure entre deux sites d'étude différents et enfin (iii) d'évaluer l'influence d'un processus de transplantation croisé entre ces deux sites réalisé durant le développement des biofilms. La transplantation permettait de tester l'influence relative des facteurs auto-gènes et allogènes durant le développement d'un biofilm. L'exploitation et la valorisation de ces travaux ont été réalisés durant ma première année de thèse, en parallèle des étapes de fiabilisation du réacteur annulaire rotatif.

### II.1.2 Déroulement de l'étude

Cette étude s'est déroulée de la façon suivante (**Figure 28**) : à  $T_0$ , un lot de trois dispositifs de collecte de type « cagette » (12 lames de verre au total) a été positionné sur chacun des deux sites **M** et **S**. Les cagettes sont positionnées en travers du lit de telle sorte qu'elles soient dans des conditions de courant similaires. A l'issue d'une première phase de production d'une durée de 3 semaines, pour chaque site, 4 des 12 lames sont prélevées au hasard pour analyses du biofilm au laboratoire, 4 autres (également prélevées aléatoirement) sont assemblées dans une nouvelle cagette, elle-même placée sur l'autre site d'étude (c'est le processus de transplantation), et les 4 dernières lames restent sur place (**Figure 28**). Puis une seconde phase de poursuite de développement des biofilms d'une durée de 2,5 semaines a lieu au bout de laquelle toutes les lames sont récupérées et analysées au laboratoire (**cf. chapitre III**). Notre choix de fixer la durée des deux phases consécutives de production du biofilm à 5,5 semaines s'est basé sur la dynamique de croissance des biofilms phototrophes

connue en rivières (Boulêtreau et al. 2006) nous permettant de nous situer dans la période d'accrétion du biofilm (Biggs 1996).



**Figure 28** – Plan expérimental de l'étude réalisée *in situ* sur les sites **M** et **S** à l'aide de lames de verre disposées en caquettes. **M** : Le Montoussé à Auradé (**A**) et **S** : La Save à Larroque (**L**).

Pour résumer, cette étude se compose de six conditions expérimentales différentes : deux sites d'étude **M** et **S** aux caractéristiques physico-chimiques contrastées, deux temps d'incubation de 3 et 5,5 semaines et une translocation croisée durant le développement du biofilm (M, S, MM, SS, MS et SM) (**Figure 28**).

Durant toute la période des 5,5 semaines de développement des biofilms phototrophes, des prélèvements d'eau (100 mL) ont été effectués hebdomadairement sur les deux sites d'étude pour un suivi physico-chimique, chaque fois en début de matinée pour limiter les variations journalières. Les analyses réalisées ainsi que les protocoles utilisés sont décrits dans les paragraphes suivants (**cf. chapitre III**). En parallèle, la conductivité, la température, les teneurs en oxygène dissous ainsi que le pH sont mesurés *in situ* par l'utilisation de sondes spécifiques (**cf. chapitre III**).

## II.2 Approches expérimentales en microcosmes

Pour l'ensemble des expériences présentées ci-après et traitant de l'impact ou de la biodégradation d'un herbicide, la molécule utilisée est l'alachlore, pour des raisons déjà énoncées dans la partie « **Synthèse bibliographique** » (**cf. Partie I**). Quel que soit le microcosme considéré, la contamination se déroule toujours de la même manière. L'alachlore sous forme de poudre (pureté 99%, Sigma-Aldrich ou pureté 98%, Chem Service, Inc. USA), est dissout dans un solvant organique, acétone (analytic grade, VWR) ou méthanol (analytic grade, Fi-

sher scientifique, Nepean, ON, Canada) suivant l'étude considérée, pour produire une solution stock d'alachlore concentrée. A partir de cette solution stock homogénéisée quelques minutes dans un bac à ultrason, un aliquot est réalisé et rajouté aux microcosmes au volume permettant d'obtenir la concentration finale souhaitée. La concentration finale de solvant rajouté dans chaque microcosme pour chaque expérience est inférieure à 0,005 % v / v.

## II.2.1 Capacité de biodégradation d'un herbicide par des suspensions de biofilms phototrophes

### II.2.1.1 Objectif de l'expérience

L'étude a été menée dans le but d'évaluer le devenir de l'alachlore en phase dissoute exposé à 3 suspensions de communautés microbiennes issues de 3 agrégats différents, eux-mêmes originaires d'habitats distincts. Ces 3 agrégats se composent initialement de 2 types de biofilms phototrophes et d'un extrait de boues activées. Vu leurs rôles clefs au sein des stations d'épuration, les boues activées sont des modèles d'étude très utilisés dans la littérature lors de tests de biodégradation des polluants (Stanislak et al. 2009), et présentent souvent de fortes capacités à biodégrader ces molécules. Ainsi, ces communautés provenant de boues activées seront considérées comme un « référentiel » pour la biodégradation. La phase expérimentale a été réalisée par A. Biaz dans le cadre d'un stage de Master en 2008 et un complément d'analyse, l'exploitation des résultats et la valorisation ont ensuite été réalisées dans le cadre de la thèse.

### II.2.1.2 Déroulement de l'expérience

L'expérience s'est déroulée en deux phases :

- i) une première phase de production et de collecte de biofilms phototrophes *in situ* sur deux sites d'étude, sites **M** et **G**,
- ii) une deuxième phase d'incubation en microcosmes de 10 jours où les biofilms collectés sont mis en suspension et exposés à deux concentrations en alachlore (1 et 20  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ). Ces seuils de concentration ont été choisis pour reproduire des valeurs de concentration détectées dans les eaux de surface (Battaglin et al. 2000; Sanchez-Camazano et al. 2005).

La production de biofilm sur le site **M** (ruisseau Le Montoussé) s'est effectuée du 22 février au 3 avril 2008 pour recouvrir la période d'application des pesticides au niveau de ce site. Les biofilms sont collectés à l'issue de 6 semaines de développement sur lames de verre disposées en cagettes. Pour le site **G** (fleuve La Garonne), les biofilms phototrophes sont



collectés par prélèvement direct de galets. Les biofilms collectés sur les galets représentent une communauté dite « naturelle » dont ni l'histoire ni la durée d'incubation ne sont connues alors que les biofilms collectés sur des supports artificiels représentent une communauté « sélectionnée » dont on connaît la durée d'incubation mais pas l'histoire.

Les caractéristiques physico-chimiques de l'eau ont été analysées pour les deux sites durant la période de développement *in situ* des biofilms sur le site **M**.

Pour le site « station d'épuration » **W**, les boues activées ont été collectées dans la station de traitement des eaux usées de Toulouse (Usine de dépollution de Ginestous, Sud Ouest, France). Les paramètres chimiques ont été analysés seulement le jour du prélèvement des boues activées. Ces boues activées ont été prélevées sur la boucle de recirculation des boues du clarificateur vers le bassin d'aération de la tranche fonctionnant à forte charge massique appliquée de  $0,9 \text{ kgDBO}_5 \cdot \text{kgMVS}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$  ( $\text{DBO}_5$  : demande biologique en oxygène à 5 jours d'incubation et MVS : matières volatiles en suspension), ainsi qu'un temps de séjour hydraulique de 1 à 5 heures et un âge de boues de 3 jours. Le choix de ce type de boues activées a été motivé à partir d'une étude réalisée sur le potentiel de biodégradation de molécules organiques par des boues activées opérant à forte charge massique appliquée (Vazquez-Rodriguez et al. 2003 et 2007). Les auteurs ont montré que ce type de boues présente une capacité de biodégradation plus importante que les boues activées fonctionnant à moyenne ou faible charges massiques appliquées.

Les galets et les lames de verre ont été échantillonnés aléatoirement. Un réplicat représente soit un lot de deux lames de verre prélevées parmi les trois dispositifs de collecte type « cagette », soit un lot de trois galets, l'ensemble étant transporté au laboratoire dans des glacières. Durant le transport vers le laboratoire, les galets sont placés individuellement dans des sacs de congélation humidifiés et les lames de verre maintenues fixées à leurs supports et placées dans des sacs poubelle également humidifiés. Les biofilms sont détachés par grattage des supports naturels ou artificiels (**cf. chapitre III Préparation des biofilms**). Pour chaque réplicat, les biofilms sont mis en suspension dans 250 mL d'eau du réseau filtrée sur filtre de  $0,22 \mu\text{m}$  (acétate de cellulose, Whatman) et homogénéisés (13 500 tpm, Ultra Turrax, T25). Une fois les boues activées collectées, seul le surnageant, après une décantation de 30 min, est utilisé. Chaque homogénat de suspension de biofilms ou de boues activées est subdivisé en deux aliquots : un aliquot de 200 mL pour une caractérisation des biomasses (**cf. chapitre III Analyses biologiques**) et un aliquot de 50 mL pour inoculer les microcosmes.

Les microcosmes consistent en des bouteilles en verre ambré de 500 mL (**Figure 29**). Chaque bouteille est remplie avec 450 mL d'eau collectée sur le site **G** et filtrée sur filtre de  $0,22 \mu\text{m}$  (acétate de cellulose, Whatman), le site **G** étant considéré dans cette étude comme

le moins pollué en termes de pesticides. Les concentrations initiales en nutriments sont de  $N-NH_4^+ = 0,053 \text{ mg.L}^{-1}$ ,  $N-NO_3^- = 0,7 \text{ mg.L}^{-1}$ ,  $P_{\text{total}} = 0,012 \text{ mg.L}^{-1}$ ,  $COD = 2,1 \text{ mg.L}^{-1}$  (COD : carbone organique dissous), et  $pH = 7,5$ .

Trois expérimentations ont été réalisées pour chaque type d'inoculum, incluant les boues activées et les deux types de biofilms. Pour chacune, deux traitements y sont associés, et menés en triplicat : les microcosmes sont inoculés et traités avec 1 ou 20  $\mu\text{g.L}^{-1}$  d'alachlore. En parallèle, des microcosmes témoins, dépourvus d'inoculum microbien et traités aux deux mêmes concentrations d'alachlore, sont mis en œuvre (évaluation de la disparition d'origine abiotique de la molécule).

Les bouteilles, stérilisées au préalable par autoclavage, sont incubées pendant 5 heures avant le début de l'expérience associé à l'inoculation des suspensions microbiennes, pour obtenir des conditions physico-chimiques stables et homogènes dans chaque bouteille et entre les bouteilles (e.g. température, concentration en alachlore). Toutes les bouteilles sont fermées par un bouchon en coton stérile pour maintenir une ambiance aérobie et maintenues à l'obscurité et sous agitation (agitateurs magnétiques multi-postes, Inductive stirring system, Oxitop IS 6, WTW) dans une enceinte thermostatée à 25°C.

A l'issue de 1, 5 et 10 jours d'incubation, des échantillons d'eau de 100 mL sont prélevés pour évaluer la concentration résiduelle en alachlore ainsi que les concentrations des deux métabolites OA et ESA (cf. chapitre III).



**Figure 29** – Photographie du dispositif expérimental : incubation en bouteilles placées sur agitateurs magnétiques par lots de 6 et disposés dans une enceinte thermostatée.

## II.2.2 Réponse des communautés microbiennes de biofilms phototrophes à une exposition à un herbicide

### II.2.2.1 Objectif de l'expérience

L'objectif de cette expérience est d'évaluer, à l'échelle des communautés, la réponse à une contamination chronique à l'alachlore, de biofilms phototrophes qui présentent des traits de vie différents et des lieux de production aux propriétés potentiellement toxiques et trophiques distinctes. La phase expérimentale a été réalisée par A. Lamy dans le cadre de son stage de Master en 2010, et un complément d'analyses, l'exploitation et la valorisation ont ensuite été réalisés dans le cadre de la thèse.

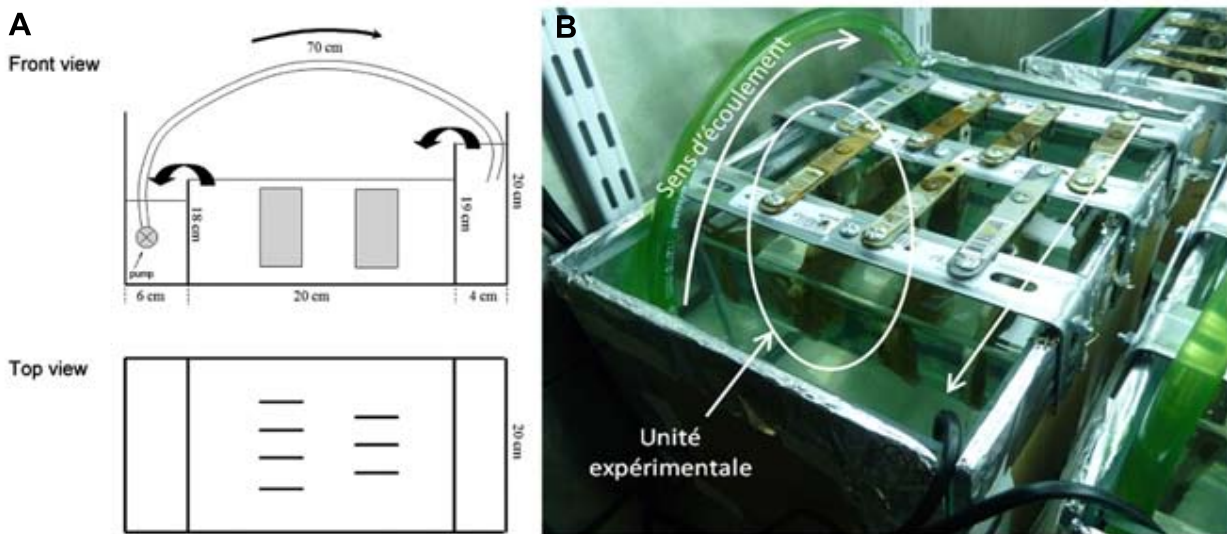
### II.2.2.2 Déroulement de l'expérience

Deux expérimentations ont été effectuées sur une période de 8 semaines chacune, comprenant une période de colonisation *in situ* de 4 semaines sur des supports artificiels de type « coupons » (24 plaques en polyéthylène sur chaque site) sur les sites **M** et **S**, suivie par des expériences en microcosmes de 30 jours. Chaque expérience en microcosme se déroule de la manière suivante : une phase d'acclimatation de 7 jours suivie par une phase d'exposition à l'alachlore de 23 jours.

La première expérience a été réalisée du 2 février au 1 mars 2010 sur le site **S** (rivière La Save) et la deuxième du 8 mars au 8 avril 2010 sur le site **M** (ruisseau Le Montoussé). Des études antérieures ont montré que ces 4 semaines permettent d'obtenir un biofilm avec suffisamment de biomasse et produit sous influence des facteurs environnementaux, sans être rentré complètement dans un fonctionnement autonome marqué par l'influence des facteurs autogènes (Dorigo et al. 2007).

Les microcosmes, adaptés des microcosmes de Debenest et al. (2009), sont constitués de réservoirs en verre (300 mm x 200 mm x 200 mm), chacun séparé en trois compartiments par des plaques de verre d'une hauteur de 190 mm et 180 mm (**Figure 30**). Chaque microcosme est rempli avec  $9,6 \pm 0,1$  L d'eau de rivière autoclavée provenant du lieu de collecte des biofilms. L'utilisation d'eau de rivière a pour but de réduire le stress du biofilm lors de son transfert du milieu naturel vers le microcosme. Une circulation en boucle fermée est maintenue dans le réservoir avec une pompe immergée (Proflow 600, JBL) connectant les deux petits compartiments (**Figure 30**). L'eau circule dans le compartiment central du microcosme par écoulement gravitaire à une vitesse de courant de  $0,5 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ , ce qui permet d'y réduire les turbulences pouvant contribuer à l'érosion en surface des biofilms tout en y favorisant son développement (Biggs et Close 1989). Un tube de néon est placé 40 cm au-dessus de chaque

microcosme (tube fluorescent TL-15E 14W, 5500 K, Zoomed Aquatic). Cet éclairage artificiel est programmé pour une photopériode de 12 h de lumière, 12 h d'obscurité pour reproduire le cycle nyctéméral de la saison. L'homogénéité de l'éclairage a été contrôlée par mesure de l'intensité lumineuse, sous forme de radiations photosynthétiques actives avec l'aide d'une sonde plate reliée à un quantamètre (Li-189, Li-Cor). L'ensemble des microcosmes a été maintenu à température constante de 20°C en enceinte ventilée. Les plaques colonisées par du biofilm sont fixées sur des rampes en inox (soit 7 plaques par microcosme) et placées dans le compartiment central.



**Figure 30** – Schéma (A) et photographies (B) du dispositif expérimental d'incubation de plaques de polyéthylène, préalablement colonisées en milieu naturel (photographies d'A. Lamy)

Pour chaque expérimentation, un nombre de 5 microcosmes correspondant à 5 conditions différentes sont nécessaires (**Figure 31**) :

- deux microcosmes en présence de plaques colonisées pour évaluer les effets des deux concentrations d'exposition à l'alachlore (10 et 30  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ),
- un microcosme en présence de plaques colonisées pour évaluer les effets de la période d'incubation sur le biofilm en absence d'alachlore,
- deux microcosmes en présence de plaques vierges afin d'évaluer le devenir abiotique de l'alachlore dans les deux conditions de concentration.

Un à trois coupons sont prélevés par tirage aléatoire dans chaque microcosme aux trois dates suivantes (**Figure 32**), échantillonnages effectués à la même heure, soit le matin dans le cadre de cette étude :

- à  $T_{-7}$  : après 4 semaines de colonisation *in situ*,



**Figure 31** – Photographie du dispositif expérimental comprenant 5 microcosmes dans une enceinte thermostatée (photographies d’A. Lamy).

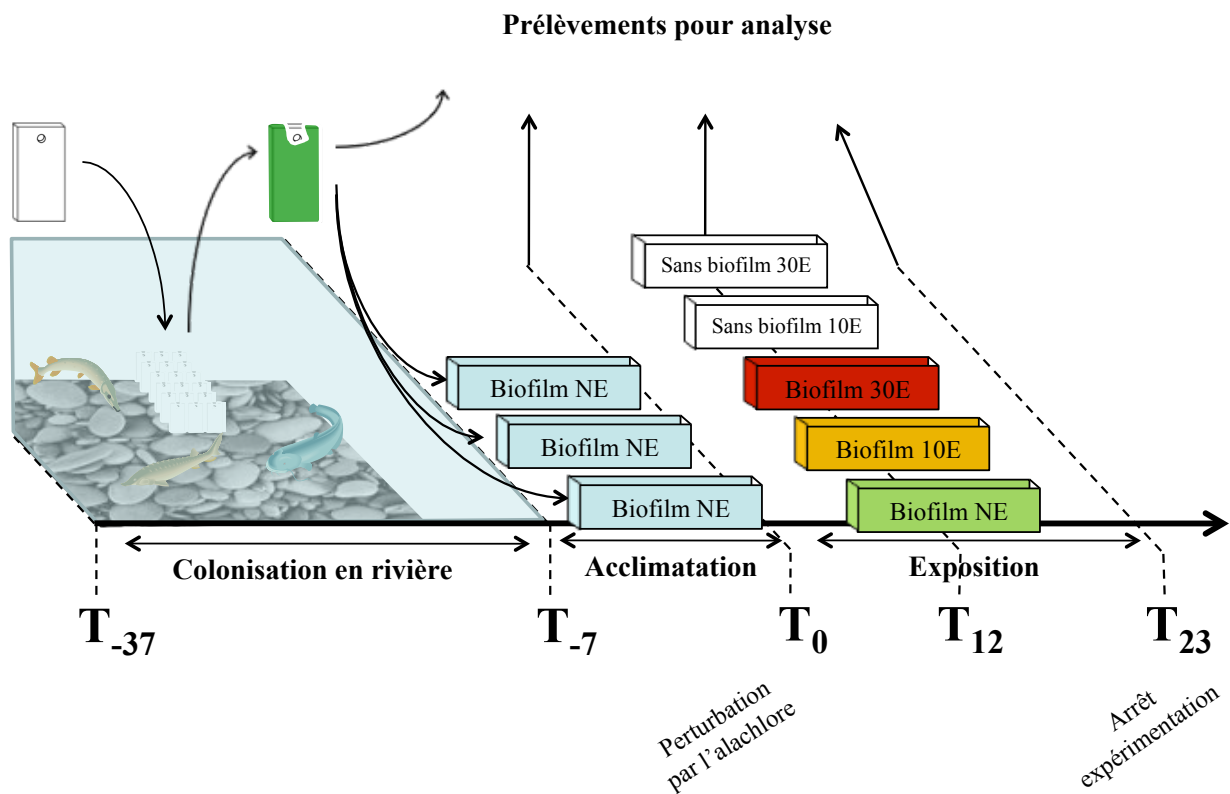
- à  $T_0$  : après 7 jours d’incubation dans les aquariums sans contamination à l’alachlore (phase d’adaptation), la contamination par l’alachlore est alors réalisée à des concentrations de 10 et 30  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ,
- à  $T_{12}$  : après 12 jours d’incubation en présence d’alachlore,
- à  $T_{23}$  : après 23 jours d’incubation en présence d’alachlore.

A chaque prélèvement, la biomasse de chaque coupon collecté est mise en suspension dans 50 mL d’eau du réseau au préalable filtrée sur filtre de 0,22  $\mu\text{m}$  (acétate de cellulose, Watman). Cette solution est homogénéisée (13 500 tpm, Ultra Turrax T25) avant les différentes analyses (cf. **chapitre III Analyses biologiques**). Dans cette étude, un coupon représente un réplicat.

Des dosages de l’alachlore sont effectués dans l’eau d’incubation à  $T_0$  afin de contrôler l’apport en polluant pendant l’expérimentation. Des mesures de pH, température, conductivité, et concentration en oxygène dissous ont été effectuées à intervalles de temps réguliers avec l’aide de sondes spécifiques (cf. **chapitre III Analyses chimiques**). En parallèle (une fois par semaine et les jours de prélèvement) des échantillons d’eau (100 mL) sont prélevés pour les dosages de l’alachlore, du COD (Carbone Organique Dissous) et des nutriments additionnés au départ (10  $\text{mg.L}^{-1}$  de silice, 0,7  $\text{mg.L}^{-1}$  d’orthophosphates, 15  $\text{mg.L}^{-1}$  de nitrates) (cf. **chapitre III Analyses chimiques**).

### II.2.3 Bioréacteurs annulaires rotatifs

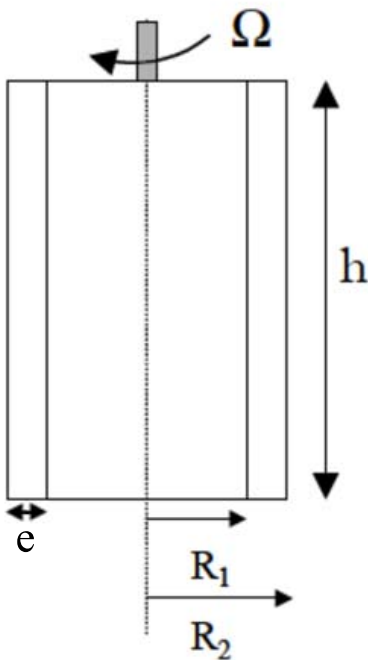
Par définition, un bioréacteur annulaire rotatif ("*Rotating Annular Bioreactor*", RAB en anglais) est constitué par deux cylindres concentriques, un cylindre interne en rotation et un cylindre externe fixe (**Figure 33**). Le fluide circule alors dans l’entrefer formé par l’espace



**Figure 32** – Plan expérimental de chaque expérimentation en microcosmes (extrait de Lamy 2010) : 5 modalités (ou conditions) expérimentales différentes : Microcosme Biofilm NE (coupons colonisés en absence d'alachlore), Microcosme Biofilm 10E (coupons colonisés exposés à  $10 \mu\text{g.L}^{-1}$  d'alachlore), Microcosme Biofilm 30E (coupons colonisés exposés à  $30 \mu\text{g.L}^{-1}$  d'alachlore), Microcosme Sans biofilm 10E (coupons vierges exposés à  $10 \mu\text{g.L}^{-1}$  d'alachlore), Microcosme Sans biofilm 30E (coupons vierges exposés à  $30 \mu\text{g.L}^{-1}$  d'alachlore).

entre les deux cylindres. Dans un RAB à écoulement de type Taylor-Couette, la vitesse de rotation du cylindre interne et les rayons des deux cylindres définissent le type d'écoulement du fluide dans l'entrefer. Ainsi différentes combinaisons sont possibles entraînant différents types d'écoulements (Guyon 2001).

Au cours de cette thèse, deux types de RAB ont été utilisés : un prototype au développement duquel nous avons contribué dans le cadre des relations EcoLab et LISPB (INSA de Toulouse), et une batterie de mini-RABs accessibles au sein d'Environment Canada.



**Figure 33** – Schéma simplifié d'un bioréacteur annulaire rotatif à écoulement de type Taylor-Couette :  $R_1$  et  $R_2$  les rayons des cylindres internes et externes,  $e$  l'entrefer,  $h$  la hauteur du bioréacteur, et  $\Omega$  la vitesse de rotation du cylindre interne (Extrait de Coufort 2004).

### II.2.3.1 Prototype de bioréacteur annulaire rotatif (RAB) à écoulement de type Taylor-Couette

#### II.2.3.1.1 Présentation et description générale

Un prototype de RAB à écoulement de type Taylor-Couette a été conçu par la société ARIAS (Toulouse, Sud Ouest, France) et expérimenté au sein du laboratoire EcoLab pour la première fois dans le cadre de cette thèse. La conception de ce prototype est inspirée des RABs développés au LISPB en tant que procédés de dépollution des eaux usées (Coufort 2004). Notre RAB intègre une source lumineuse modulable interne dont on peut faire varier le spectre lumineux et son intensité. Cette particularité oriente le choix de la matière du cylindre interne, à savoir un matériel transparent ne filtrant pas la lumière. Le développement et l'utilisation de ce prototype a nécessité un certain nombre d'adaptations techniques et méthodologiques au

cours de la première année de thèse (étanchéité, évacuation de gaz produit par photosynthèse, adaptation de capteurs oxygène et pH, test de sources lumineuses, etc.). Des schémas du bioréacteur ainsi que ses caractéristiques sont présentés dans la **Figure 34**. Ce prototype de RAB possède trois particularités :

- un cylindre contenant la source lumineuse interne avec une capacité d'accueil de 8 néons. Ce cylindre, en plexiglass sur la partie haute (interne au RAB) et en PVC sur la partie basse (externe au RAB), est fermé aux deux extrémités dont la partie haute est étanche et la partie basse démontable pour accéder aux néons, et fixé sur le châssis ;
- un cylindre interne transparent en plexiglas, venant se reposer axialement sur le cylindre contenant les néons, avec un espace entre ces deux cylindres inférieur à 2 mm. Le volume d'eau contenu dans ce pseudo-entrefer sera négligé par la suite, du fait de son faible renouvellement (connectivité avec l'entrefer réduite). Le cylindre interne est accouplé par le haut avec un moteur équipé d'un variateur de vitesse permettant de couvrir la gamme 0 à 200 trs.min<sup>-1</sup>. Le réacteur est muni d'un tachymètre permettant la mesure de la vitesse de rotation du cylindre interne ;
- un cylindre externe en PVC gris permettant de générer entre les deux cylindres interne et externe un entrefer de 18,5 mm. Ce cylindre externe est fixé sur le châssis par vissage, pour assurer l'étanchéité du RAB, tout en le rendant démontable. Il contient sur sa face interne les coupons sur lesquels se développera le biofilm phototrophe. La surface servant de logement des coupons a été creusée de manière à avoir une continuité de surface entre la partie contenant les coupons et la partie exempte de coupon.

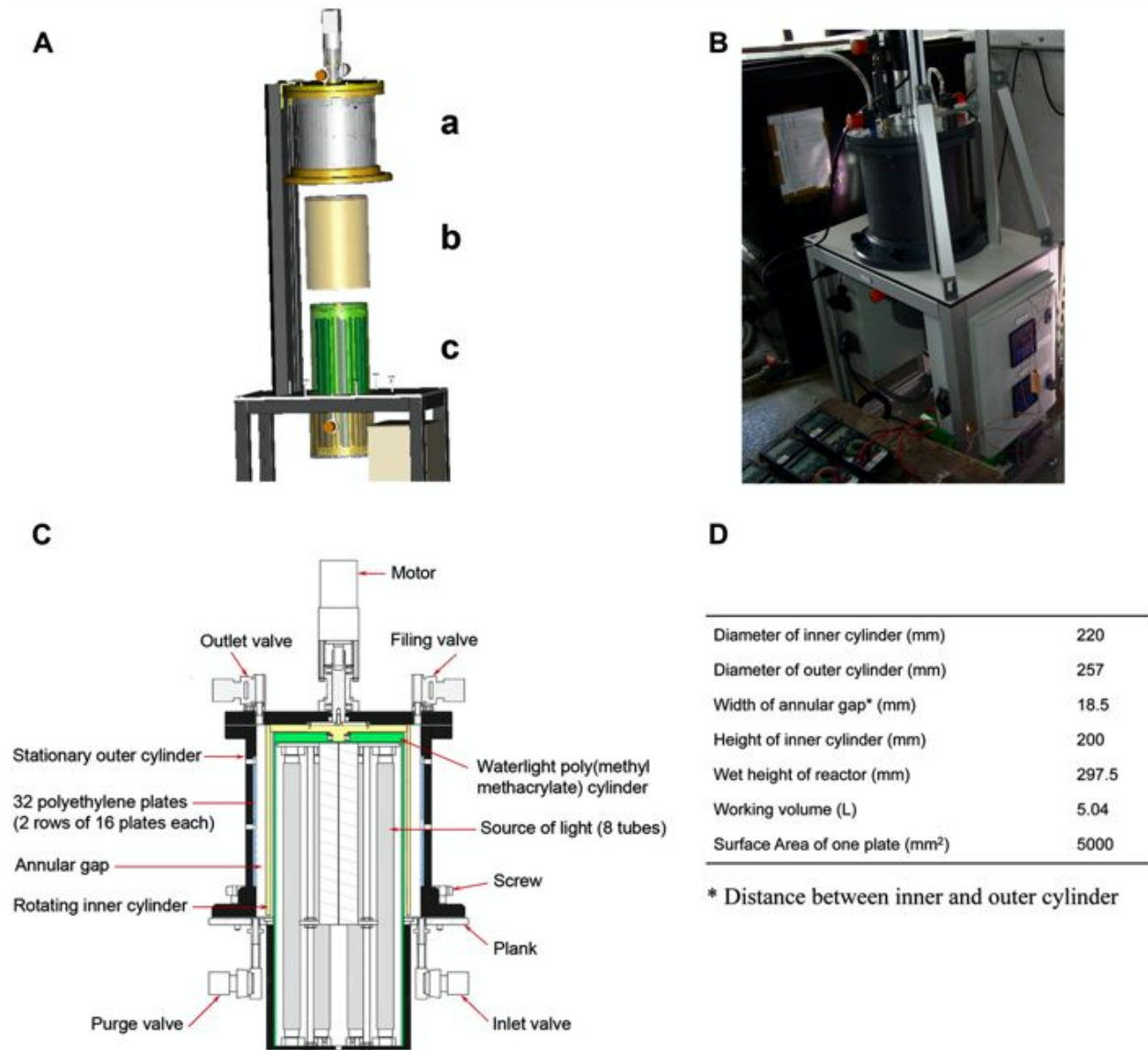
Avant la mise en fonctionnement du réacteur, l'ensemble du matériel a été rincé plusieurs fois avec de l'eau déminéralisée afin de limiter la présence de molécules chimiques ou minérales suite à l'usinage.

### II.2.3.1.2 Choix des conditions expérimentales

#### II.2.3.1.2.1 Support de colonisation

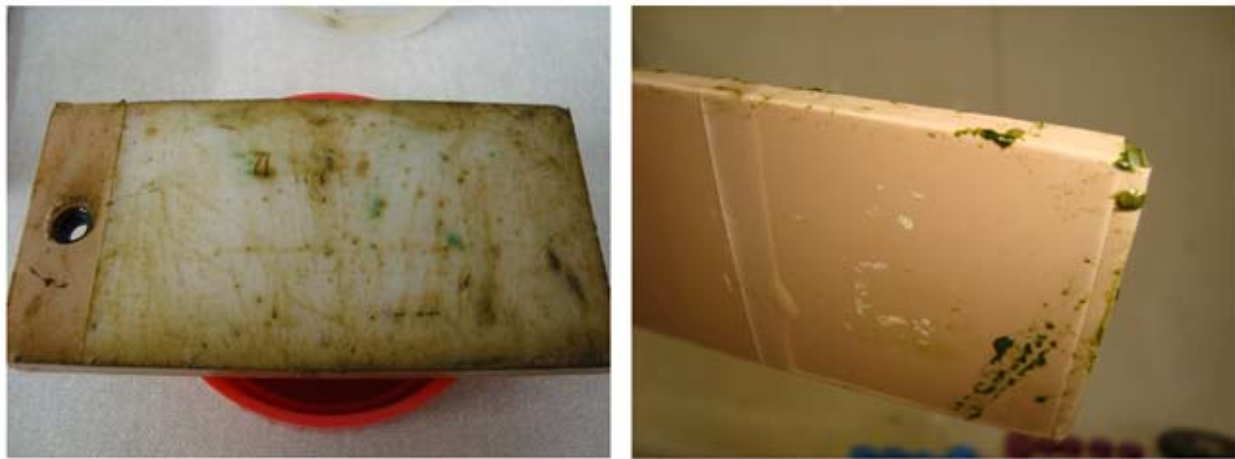
Des plaques en polyéthylène (L x l x e : 100 mm x 50 mm x 5 mm) ont été utilisées comme support pour la colonisation et le développement des biofilms phototrophes. Les plaques sont fixées chacune individuellement avec une vis sur la face interne du cylindre externe dans la partie centrale et creusée du cylindre pour limiter les effets bords. Deux rangées de 16 plaques sont positionnées, ce qui fournit potentiellement 32 coupons échantillonnables pour une surface globale de colonisation de 0,117 m<sup>2</sup> (**Figure 35**). Chaque plaque est recouverte sur sa face adossée au cylindre externe et sur les côtés d'une bande adhésive de manière à limiter la production de biofilm sur les parties autres que la face exposée à l'entrefer (**Figures 35**





**Figure 34** – Organisation du bioréacteur (*Rotating Annular Bioreactor*, RAB). (A) représentation en 3D des différentes parties qui composent le bioréacteur avec a le cylindre externe, b le cylindre interne et c le cylindre étanche qui contient les néons ; (B) photographie du bioréacteur ; (C) schéma détaillé du bioréacteur et (D) ses caractéristiques géométriques.

et 36) (Derlon 2008). Ce matériau a été sélectionné pour ces propriétés plastiques lui conférant la possibilité d'être incurvé (moule en inox chauffé à 120°C) pour suivre la courbure du cylindre externe. Afin de s'affranchir de problèmes liés au relargage de substances issues de la fabrication, les plaques ont été immergées dans de l'eau du réseau durant plusieurs jours avant leur première utilisation. Par la suite, entre chaque expérience et avant d'être placées dans le RAB, les plaques sont nettoyées au détergent (Décon dilué) puis rincées plusieurs fois à l'eau déminéralisée.

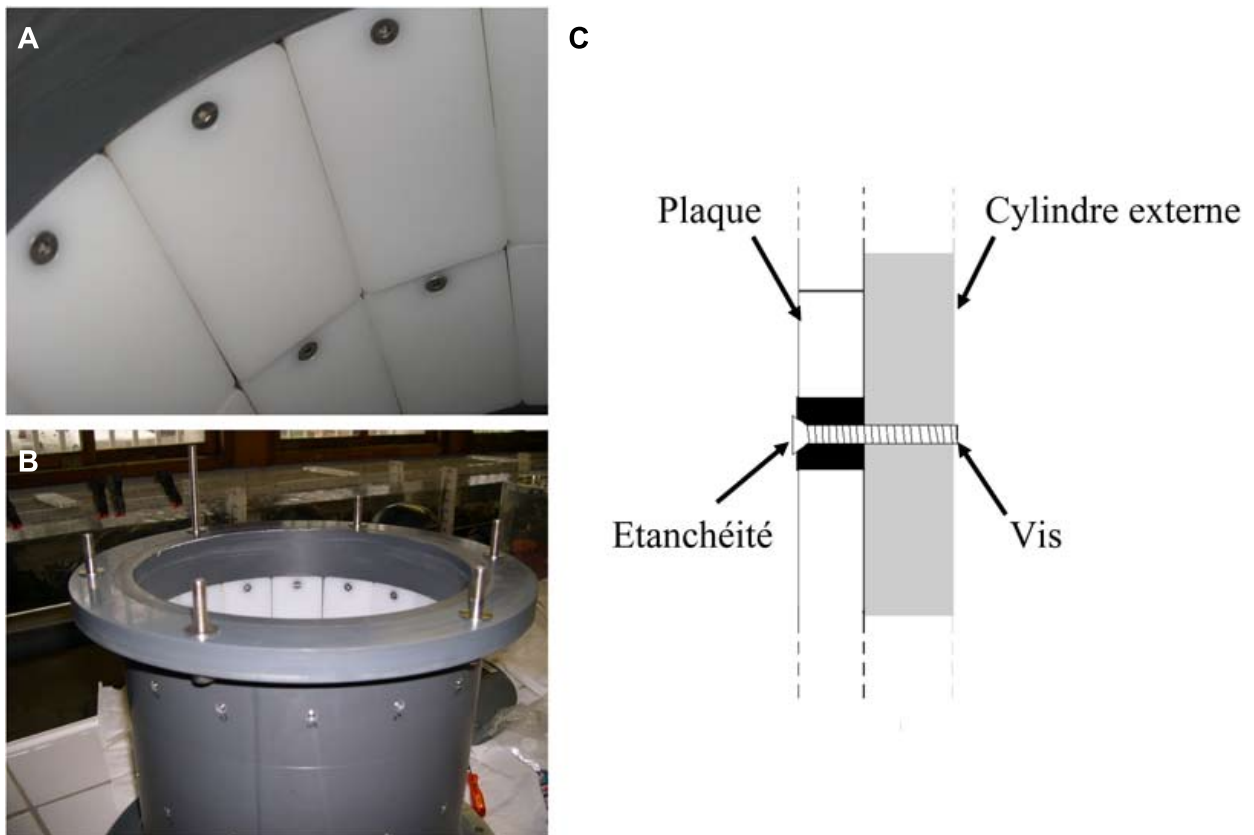


**Figure 35** – Photographies d'un support de colonisation, (gauche) en vue de face (le trou correspond au lieu de passage de la vis de fixation qui se visse sur le cylindre externe du RAB) et (droite) en vue dorsale (la face arrière et les bords sont recouverts de bande adhésive)

#### II.2.3.1.2.2 Source lumineuse interne

L'éclairage est assuré par la présence de néons de longueur standard 438 cm (contrainte imposée par la hauteur du RAB) positionnés au cœur du dispositif (**Figure 37**). Le RAB peut contenir un nombre de néons de 1 à 8 fournissant des valeurs d'intensités lumineuses de 130 à 283  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (**Tableau 8**). L'intensité lumineuse était mesurée comme une valeur du niveau des radiations photosynthétiques actives (ou "*photosynthetically active radiation*", en anglais PAR) par l'utilisation d'une sonde de quantamètre (model LI-189, LI-COR, Inc - Lincoln - Nebraska). La mesure est réalisée à l'air, à une distance du cylindre interne équivalente à l'entrefer. De manière à distribuer le plus homogènement possible la lumière dans le RAB, un cylindre plein en plexiglass est placé au centre du dispositif sur toute la hauteur des néons. Notre choix s'est porté sur 2 et 4 néons, qui est un bon compromis entre :

- une distribution homogène de l'éclairage : moins il y a de néon utilisé et plus l'éclairage est hétérogène ;

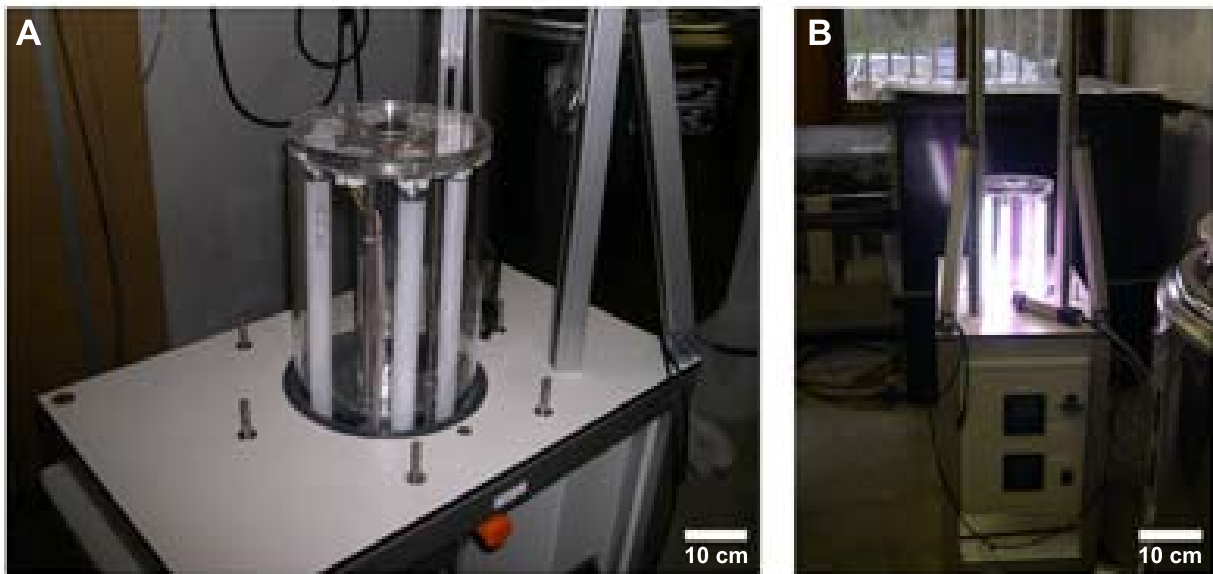


**Figure 36** – Photographie de l'emplacement des plaques de polyéthylène sur la face interne du cylindre externe (A et B) et détail du système de fixation des plaques (B)

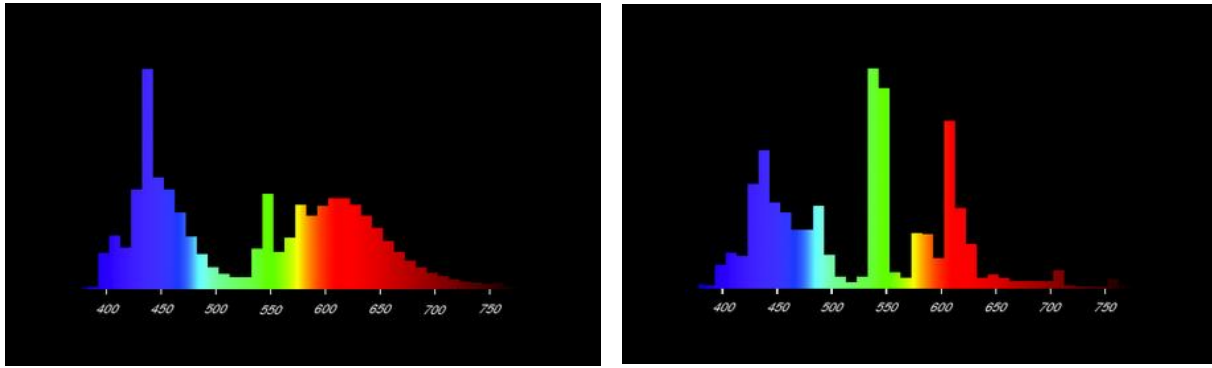
Nombre de néons	Intensité lumineuse ( $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ )
8	$283 \pm 20$
6	$265 \pm 16$
4	$180 \pm 10$
2	$130 \pm 20$

**Tableau 8** – Valeurs d'intensité lumineuse en fonction du nombre de néons (pour chaque cas, il y a autant de néons Fluora que de néons Luminux)

- une trop forte élévation de température dans l'entrefer qui peut constituer une pression de sélection vis-à-vis des microorganismes (le RAB n'est pas thermostaté). La température était de 16 à 21°C avec 2 néons, de 16 à 23° avec 4 néons et de 17 à 28° avec 8 néons ;
- d'après Bothwell (1993), l'activité photosynthétique des communautés algales benthiques, qu'elles soient intactes ou déstructurées, est saturée entre 100 à 400  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ .



**Figure 37** – Le dispositif d'éclairage, capacité de 8 néons protégés par un cylindre étanche en plexiglass (A et B)



Néon	Désignation	Teinte	Puissance électrique (Watt)	Intensité lumineuse (Lumen)	Longueur (mm)
Fluora	L15W / 77	77	15	400	438
Luminux	L15W / 865	438	15	900	438

**Figure 38** – Spectres lumineux et principales caractéristiques des néons « Fluora » (spectre de gauche) et « Lumière du jour » (spectre de droite) utilisés lors des cultures en RAB

### II.2.3.1.2.3 Conditions hydrodynamiques

L'écoulement dans un réacteur de type Taylor-Couette est caractérisé par deux nombres sans dimension : le nombre de Taylor ( $Ta$ ) et le nombre de Reynolds ( $Re$ ).

Le nombre de Reynolds détermine l'importance du flux convectif par rapport au flux diffusif. Ces deux flux représentent les deux mécanismes de transport possibles lors de l'écoulement d'un fluide. Pour caractériser l'écoulement dans un entrefer annulaire, ce nombre est donné par l'équation suivante :

$$Re = (r.\Omega.e)/\nu$$

avec  $r$  le rayon externe du cylindre interne (m),  $\Omega$  la vitesse angulaire du cylindre interne ( $\text{rad.s}^{-1}$ ),  $e$  l'entrefer (m) et  $\nu$  la viscosité cinématique du fluide, en l'occurrence ici l'eau du réseau d'eau potable ( $\nu = 10^{-6} \text{ m}^2.\text{s}^{-1}$  à  $20^\circ\text{C}$ ).

Suivant la valeur du nombre de Reynolds, le régime d'écoulement dans un système du type conduite est caractérisé de :

- régime laminaire pour  $Re < 2000$ ,
- régime transitoire pour  $2000 < Re < 4000$ ,
- régime turbulent pour  $Re > 4000$ .

Le nombre de Taylor représente la transition turbulente de l'écoulement d'un fluide. Pour un fluide mis en mouvement par un cylindre en rotation, il est donné par l'équation suivante (Mehel 2006) :

$$Ta = Re.(e/r)^{1/2}$$

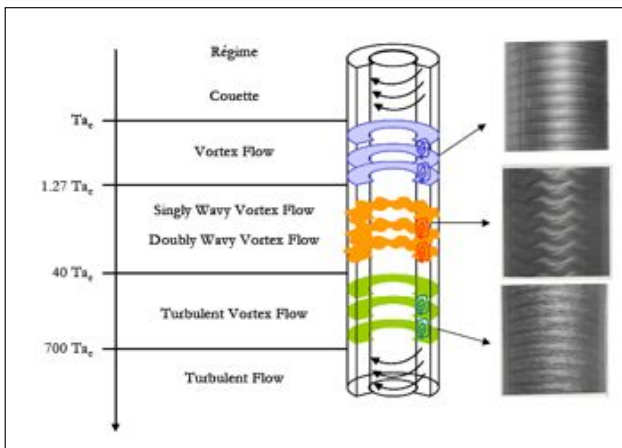
Suivant la vitesse de rotation du cylindre interne, le nombre de Taylor sera différent et permettra de décrire les 5 types de régimes possibles (de l'écoulement stable à l'écoulement pleinement turbulent, voir **Figure 39** et **40**) dans l'espace annulaire du réacteur (Coufort 2004). La plage de variation du nombre de Taylor est réduite par la valeur du nombre de Taylor critique correspondant à l'apparition de la première instabilité,  $Ta_c = 43,3$  (développement des cellules de Taylor dans l'espace annulaire).

D'après le nombre de Taylor (Mehel 2006), la vitesse angulaire du cylindre interne est donnée par l'équation suivante :

$$\Omega = \frac{Ta.v}{e^{3/2}.r^{1/2}}$$

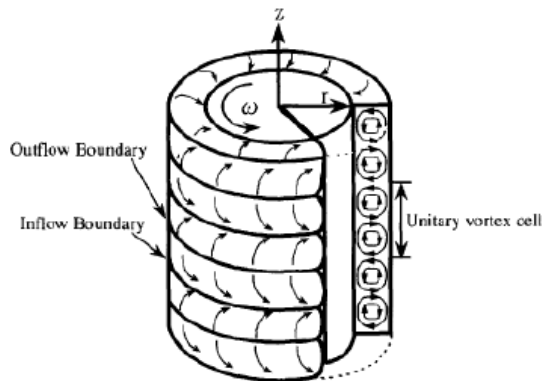
Les 5 régimes d'écoulement sont mis en regard des plages de variation du nombre de Taylor et des vitesses correspondantes de rotation du cylindre interne de notre RAB (**Tableau 9**). Le choix du régime pleinement turbulent a été fait avec une vitesse de rotation du cylindre interne de notre RAB de  $80 \text{ trs.min}^{-1}$  pour avoir :

- une vitesse de rotation du cylindre interne suffisante pour éviter les phénomènes de décantation des particules en suspension et d'accumulation dans la partie basse de l'entrefer ;
- une absence d'ondulation (comme observée pour les écoulements entre  $1,27$  et  $40.Ta_c$  selon le référentiel de Coufort (2004)) (voir **Figure 39**) ;
- une périodicité spatiale sur toute la hauteur de l'entrefer (pouvant laisser penser à une homogénéité de colonisation du biofilm sur les coupons).



**Figure 39** – Transitions des écoulements dans un réacteur à comportement hydrodynamique du type Taylor-Couette (D'après Andereck 1986, extrait de Coufort 2004).  $Ta_c$  : Nombre de Taylor critique.

Aucune expérience n'a été effectuée à des vitesses de rotation du cylindre interne supérieures à  $80 \text{ trs.min}^{-1}$ , car d'après des travaux antérieurs (Coufort 2004) pour un réacteur



**Figure 40** – Ecoulement de type vortex turbulent similaire à celui recherché au niveau de l'entrefer du prototype RAB. Avec  $\omega$  = vitesse de rotation angulaire du cylindre interne (extrait de Ohmura et al. 1997).

Type d'écoulement	Nombre de Taylor ( $Ta$ )	Vitesse de rotation du cylindre interne (trs.min <sup>-1</sup> )
Tourbillonnaire (« <i>Vortex flow</i> »)	$Ta_c^*$ à $1,15.Ta_c$ (43,3 à 49,6)	0,49 à 0,53
Tourbillonnaire ondulant (« <i>Wavy vortex flow</i> »)	$1,15.Ta_c$ à $6,14.Ta_c$ (49,6 à 266)	0,53 à 3
Taylor turbulent (« <i>Turbulent vortex flow</i> »)	$6,14.Ta_c$ à $16,17.Ta_c$ (266 à 700)	3 à 8
Turbulence naissante	$16,17.Ta_c$ à $30.Ta_c$ (700 à 1300)	8 à 14,9
Pleinement turbulent ( <i>Turbulent flow</i> )	$> 104.Ta_c$ ( $> 4500$ )	$> 51,5$

**Tableau 9** – Tableau reliant les plages de vitesse de rotation du cylindre interne aux types d'écoulement au niveau de l'entrefer du RAB (\* :  $Ta_c = 43,3$ ).

similaire au nôtre, avec des proportions géométriques identiques, la vitesse tangentielle entre le cylindre interne et la surface des coupons est atténuée d'environ 50 %, ainsi cela nous donnait une vitesse tangentielle au niveau du cylindre interne de  $0,9 \text{ m.s}^{-1}$  et une vitesse au niveau de la paroi de  $0,45 \text{ m.s}^{-1}$  (**Tableau 10**). Au delà de  $80 \text{ trs.min}^{-1}$ , la vitesse tangentielle à la surface des plaques pouvait présenter des conditions très sélectives vis-à-vis des micro-organismes. Le cylindre interne est caractérisé par deux valeurs de vitesse : la vitesse tangentielle ( $U$ ) et la vitesse angulaire ( $\Omega$ ). Ces deux vitesses sont reliées par l'équation suivante :

$$U = \Omega \times r$$

avec  $r$  le rayon externe du cylindre interne en m,  $\Omega$  la vitesse angulaire (en  $\text{rad.s}^{-1}$ ) et  $U$  la vitesse tangentielle (en  $\text{m.s}^{-1}$ )

Vitesses angulaires du cylindre interne ( $\text{trs.min}^{-1}$ )	Vitesses tangentielles à la paroi externe du cylindre interne ( $\text{m.s}^{-1}$ )	Vitesses tangentielles à la surface des coupons ( $\text{m.s}^{-1}$ )
17,36	0,2	0,1
52,1	0,6	0,3
86,8	1	0,5
121,5	1,4	0,7
156,7	1,8	0,9
173,6	2	1

**Tableau 10** – Tableau reliant les vitesses tangentielles à la surface des coupons et à la paroi externe du cylindre interne en fonction de la vitesse angulaire du cylindre interne. Cette relation est basée sur des résultats de travaux antérieurs qui soulignaient que la vitesse tangentielle entre le cylindre interne et la surface des coupons est atténuée d'environ 50 % (Coufort 2004).

Afin de se rapprocher des vitesses de courant du milieu naturel à la surface du biofilm, nous avons à considérer une gamme de valeurs de vitesse de  $0,1$  à  $1 \text{ m.s}^{-1}$ , la plus élevée étant représentative de phénomènes de crue. D'après Biggs et Stokseth (1996), la biomasse augmente proportionnellement avec la vitesse du courant entre  $0,2$  et  $0,5 \text{ m.s}^{-1}$ . De même Horner et Welch (1990) trouvent une vitesse du courant optimale pour un biofilm colonisé sur un substrat dans une rivière pauvre en nutriment autour de  $0,5 \text{ m.s}^{-1}$ , et dans un canal Horner et al. (1990) obtiennent une biomasse maximale pour  $0,6 \text{ m.s}^{-1}$ . Afin de bien connaître les conditions de mise en oeuvre du RAB, l'hydrodynamique a été caractérisée



expérimentalement à l'échelle du bioréacteur via une méthode de traçage et les propriétés locales du flux ont été étudiées via une simulation numérique.

### II.2.3.1.2.3.1 Distribution des temps de séjours

Le comportement général du mélange dans le RAB a été caractérisé expérimentalement en utilisant la méthode de traçage par impulsion afin de déterminer la distribution des temps de séjour (DTS). Dix mL d'une solution de NaCl de concentration  $0,16 \text{ g.mL}^{-1}$  est injectée en entrée de réacteur par impulsion. L'expérience est réalisée pour deux vitesses de rotation du cylindre interne, 80 et  $170 \text{ trs.min}^{-1}$  et le débit d'alimentation (de l'eau du réseau maintenue à  $20^\circ\text{C}$ ) est de  $Q = 26 \text{ mL.min}^{-1}$  pour un volume opérationnel dans le bioréacteur de  $V = 5,04 \text{ L}$  (volume de l'entrefer). La conductivité de l'eau est mesurée en sortie pendant 15 heures avec une sonde spécifique (conductivity meter 524, CRISON, SELI, temps de réponse de la sonde de 2 s) localisée dans une cellule de mesure de 30 mL positionnée après la valve de sortie du RAB (**Figure 41**). Cette période expérimentale de 15 heures correspond à 5 fois le temps de séjour moyen, ce qui permet d'atteindre un régime stationnaire à la sortie du réacteur en fin d'expérimentation. L'expérience est réalisée en absence de biofilm et sans éclairage afin de limiter les variations de température.

Les courbes de DTS sont définies à partir des valeurs de conductivité en sortie du réacteur comme la concentration sans dimension ( $E(\theta)$ ) en fonction du temps sans dimension ( $\theta$ ) :

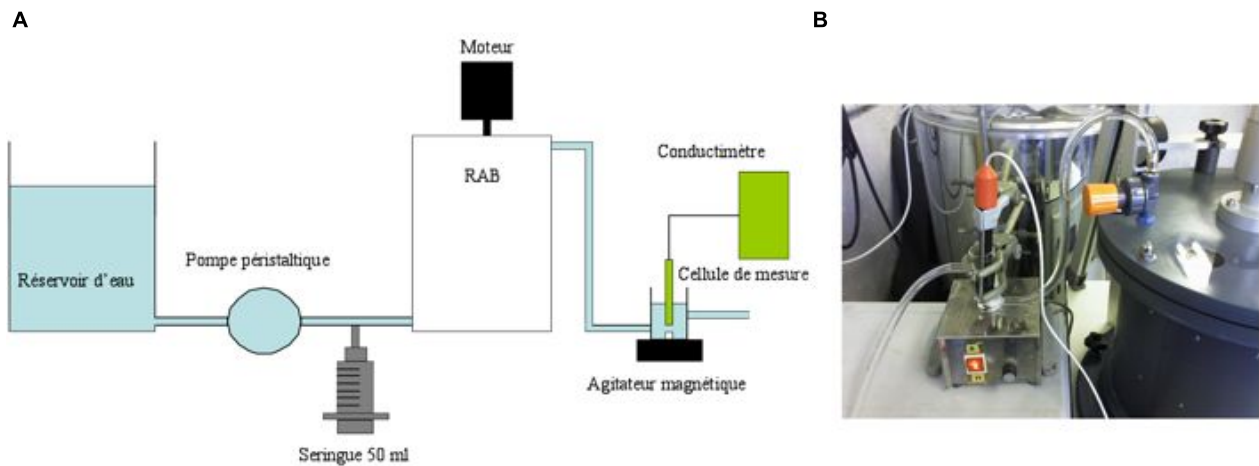
$$E(\theta) = \frac{c(t)}{c(0)}$$

avec  $\theta$  qui est donné par le ratio  $t/\tau$ , avec  $\tau = V/Q$ , et  $c(t)$  et  $c(0)$  sont respectivement les concentrations du traceur aux temps  $t$  et 0 pour lequel  $c(0)$  serait obtenue si le traceur injecté était instantanément mélangé.

Les courbes expérimentales de DTS sont comparées à des courbes DTS théoriques obtenues à partir de modèles mathématiques de réacteurs infiniment mélangés et placés en série comme décrit par Sugiharto et al. (2009).

### II.2.3.1.2.3.2 Simulations numériques de l'écoulement

Les simulations numériques ont été réalisées pour évaluer le comportement hydrodynamique à l'intérieur de l'entrefer et les caractéristiques de l'écoulement à l'échelle des turbulences. Les forces de cisaillement moyennes à la paroi sur le cylindre externe et les profils de vitesse axiale moyenne dans l'entrefer ont été extraites de ces simulations. Les simulations ont été réalisées en utilisant le logiciel Fluent CFD (version 6.2) aux deux vitesses de rotation



**Figure 41** – Schéma du dispositif expérimental de réalisation de la DTS (a), et photographie du dispositif mis en place en sortie de bioréacteur pour les mesures de conductivité (b)

du cylindre interne 80 et 170 trs.min<sup>-1</sup>. La première étape consiste à représenter le volume de l'entrefers par un maillage à deux dimensions en utilisant le pré-processeur Gambit® de Fluent. Les simulations sont lancées comme décrit par Coufort et al. (2005) à savoir les équations de Navier-Stokes en moyenne de Reynolds combinées avec le modèle k-ε RSM (« *Reynolds Stress Model* ») et le modèle 2D-axisymmetric sous des conditions stables. Ces simulations ont été réalisées par E. Mazeau dans le cadre d'un stage 3ème année INSA sous la responsabilité de J. Morchain.

#### II.2.3.1.2.4 Inoculum et eau d'alimentation

Plusieurs sources d'inocula sont proposées dans la littérature pour les dispositifs de microcosmes : eau de rivière (Lawrence et al. 2000), suspension de biofilm naturel (Pesce et al. 2006), suspension de biofilm artificiel (Hayashi et al. 2010), ou de biofilm intact (Vercraene-Eairmal et al. 2009). De même, plusieurs sources d'eau d'alimentation sont proposées, celles-ci présentent des contraintes et des avantages :

- l'eau de rivière : source d'inoculation continue, mais très variable d'une saison à l'autre en termes de température, de nutriments et de micro-organismes. De plus, ce type d'alimentation nécessite le stockage de grandes quantités d'eau. Cette source est carencée en nutriment particulièrement en phosphates et souvent source de limitation de la croissance du biofilm (Bothwell 1985),
- l'eau du réseau : carencée en nutriments, et peut contenir des produits de traitements des eaux (dont le chlore). Elle a l'avantage d'être facile d'accès, sans nécessiter un stockage,

- un milieu de culture synthétique : ce type de milieu fournit une très bonne reproductibilité, mais demande de nombreuses heures de préparation et de produits et ne favorise que la croissance d'un certain type d'algues.

Pour des raisons pratiques et être le plus reproductible possible, nous avons finalement décidé d'utiliser l'eau du réseau, après avoir dosé ponctuellement les nutriments sur quelques échantillons (1999 et 2007, en hiver et printemps) dont les concentrations sont présentées dans le **Tableau 11**. Le but étant de favoriser la croissance des biofilms phototrophes dans le bioréacteur, il s'est avéré indispensable de faire des ajouts en éléments N, P et silice.

Dosages	Madigou et Caveda 1999	Nos 1 <sup>er</sup> dosages (12/2007)
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg.L <sup>-1</sup> )	3,7	2,9±0,2
N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg.L <sup>-1</sup> )	1,1	0,016±0,014
P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (mg.L <sup>-1</sup> )	0,01	nd
SiO <sub>2</sub> (mg.L <sup>-1</sup> )	nm	2,9±0,05
COD (mg.L <sup>-1</sup> )	nm	0,63±0,03

**Tableau 11** – Quelques exemples de concentrations en nutriments dosés dans l'eau du réseau utilisée comme base du milieu d'alimentation du RAB. Avec nm : non mesuré, nd : non détecté et COD : Carbone Organique Dissous.

Pour déterminer les concentrations finales et le débit au sein de notre réacteur, nous nous sommes basés sur une étude réalisée au sein du laboratoire (Madigou et Caveda 1999) pour la culture de biofilms phototrophes avec de l'eau du réseau sur des plans inclinés et en circuit fermé.

Lors de la première expérimentation avec le bioréacteur, les concentrations ont été choisies selon 2 critères : nous voulions (i) des concentrations plus élevées que celles mesurées dans les eaux de rivière où les nutriments sont souvent limitant, notamment les orthophosphates et (ii) un ratio N : P de 16, conforme au ratio de Redfield. Il a été décidé d'apporter l'azote sous la forme nitrate, cette forme est la plus assimilable par les algues. La silice est indispensable à la croissance des algues et particulièrement des diatomées ; pour limiter les éventuelles carences, un ajout en silice est effectué. Les nitrates sont apportés sous forme de NaNO<sub>3</sub> (concentration finale de 7 mg.L<sup>-1</sup> en N), les phosphates sous forme de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (concentration finale de 0,44 mg.L<sup>-1</sup> en P) et la silice sous forme de Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub> · 9H<sub>2</sub>O (concentration finale de 6,5 mg.L<sup>-1</sup> en SiO<sub>2</sub>).

Ainsi, pour l'ensemble de nos expériences, le bioréacteur est alimenté par de l'eau du réseau enrichie en nutriments (silice, orthophosphates et nitrates) et fonctionne en circuit ouvert et exceptionnellement en circuit fermé lors de la phase d'ensemencement (pompe d'alimentation péristaltique, 520S/R2 220 T/MN pump avec des tuyaux en silicone, ID x OD = 1,6 x 2,4 mm). Le réservoir d'eau est un tank à lait en inox (150 L, model CV 150, Japy) d'une contenance de 150 litres, agité à l'aide d'une pale et thermostaté à 4°C. Le

brassage de l'eau dans le tank est programmé de manière discontinue à des intervalles de temps de 5 min. Le tank subit entre chaque expérimentation un nettoyage à l'eau de javel, suivi par un nettoyage au Decon (détergent) et des rinçages successifs à l'eau déminéralisée (ou eau du réseau).

Le taux de dilution dans le bioréacteur est donné par l'équation suivante :

$$D = Q/V = 1/\theta$$

avec  $D$  le taux de dilution en ( $\text{h}^{-1}$ ),  $Q$  le débit d'alimentation (en  $\text{L.h}^{-1}$ ),  $V$  le volume de l'entrefer (en L) et  $\theta$  le temps de séjour (en h).

Pour définir le taux de dilution de notre réacteur, nous nous sommes basés sur les conditions mises en oeuvre par Madigou et Cavada (1999) au prorata de la surface de substrat à coloniser. Nous avons choisi un taux de dilution  $D = 0,32 \text{ h}^{-1}$ , soit un temps de séjour  $\theta = 3,125 \text{ h}$ .

#### II.2.3.1.2.5 Entretien du bioréacteur : nettoyage complet et partiel

Les matériaux choisis imposent des contraintes en ce qui concerne les produits de nettoyage à utiliser. Entre chaque expérience et lors de sa première utilisation, le bioréacteur subissait un nettoyage complet. Toutes les composantes du bioréacteur sont nettoyées avec du liquide vaisselle suivi par du détergent dilué (Decon, 10 %) pour les plaques, le cylindre externe et les vannes de sortie, ou du peroxyde d'hydrogène (30 %) pour les cylindres internes (rotatif et néons) et en utilisant un chiffon doux pour ne pas rayer le plexiglass. Chaque partie est ensuite rincée plusieurs fois à l'eau déminéralisée. Avant le commencement des cultures, l'ensemble est ensuite rincé pendant 3 jours à l'eau du réseau avec une vitesse de rotation du cylindre élevée ( $170 \text{ trs.min}^{-1}$ ) pour éliminer les dernières particules.

#### II.2.3.1.3 Validation de la capacité du bioréacteur à produire du biofilm phototrophe

Afin de vérifier la capacité du bioréacteur à produire du biofilm phototrophe, et évaluer la dynamique de croissance de celui-ci, deux expérimentations ont été réalisées à un an d'intervalle, la première du 11 juin au 30 juillet 2008 (culture nommée **C1** par la suite) et la deuxième du 23 juillet au 16 septembre 2009 (culture **C2**). Ces deux cultures présentaient des procédures d'inoculation et des valeurs d'intensité lumineuses différentes.

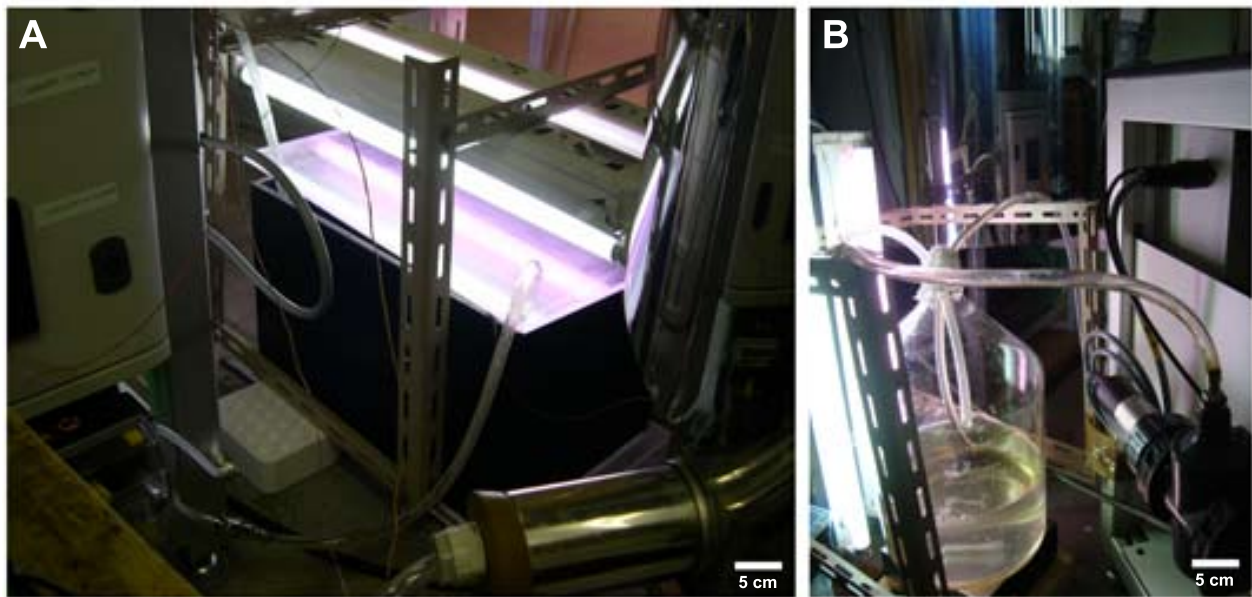
### II.2.3.1.3.1 Phase d'inoculation

Etant donné la nature du milieu de culture (l'eau du réseau), le démarrage d'une culture nécessite obligatoirement l'apport externe de biomasse. Durant cette phase d'inoculation, le bioréacteur fonctionne en circulation fermée, en boucle avec un aquarium contenant une suspension de biofilm épilithique. Deux procédures d'inoculation différentes ont été développées. La première procédure (culture **C1**) est réalisée avec un inoculum constitué de biofilms collectés sur des lames de verre et des galets disposés dans le canal expérimental de notre laboratoire (**Figure 42**) et la seconde procédure (culture **C2**) est réalisée avec un inoculum constitué de biofilms collectés sur des galets dans différentes rivières. Les supports (galet et lame de verre) sont grattés (**cf. chapitre III Volet analytique**) et la biomasse est mise en suspension dans 10 litres d'eau du réseau au préalable autoclavée et enrichie en nutriments (avec des quantités similaires au milieu de culture du bioréacteur), homogénéisée (13 500 rpm, Ultra Turrax, T25) pour broyer la macrofaune et dilacerer les agrégats macroscopiques, puis filtrée sur filtre de 250  $\mu\text{m}$  puis 100  $\mu\text{m}$  (VWR) pour éliminer une partie des débris sédimentaires et de la macrofaune. Cette suspension de 10 litres est subdivisée en 2 aliquots, avec un aliquot transféré dans une « annexe » (un aquarium ou une bouteille de 10 litres), et l'autre aliquot transféré dans l'entrefer du bioréacteur. Durant ces phases d'inoculation, le bioréacteur fonctionne en circulation fermée, relié uniquement à l'annexe (**Figure 43**). Les annexes sont agitées et éclairées par des lampes fluorescentes comprenant une lampe cool daylight (F18W/GRO, Sylvania, Allemagne) et une lampe fluora (F18W/54, Grande Bretagne), donnant une intensité lumineuse de  $32 \pm 3 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  avec une photo-période jour / nuit de 16 h / 8 h. A l'issue de cette phase, qui correspond au  $T_0$  des expériences, le bioréacteur fonctionne de nouveau en circulation ouverte et les processus de croissance sont sensés prévaloir sur les processus d'immigration pour expliquer la croissance du biofilm et la structuration des communautés.



**Figure 42** – Photographie du canal expérimental du laboratoire

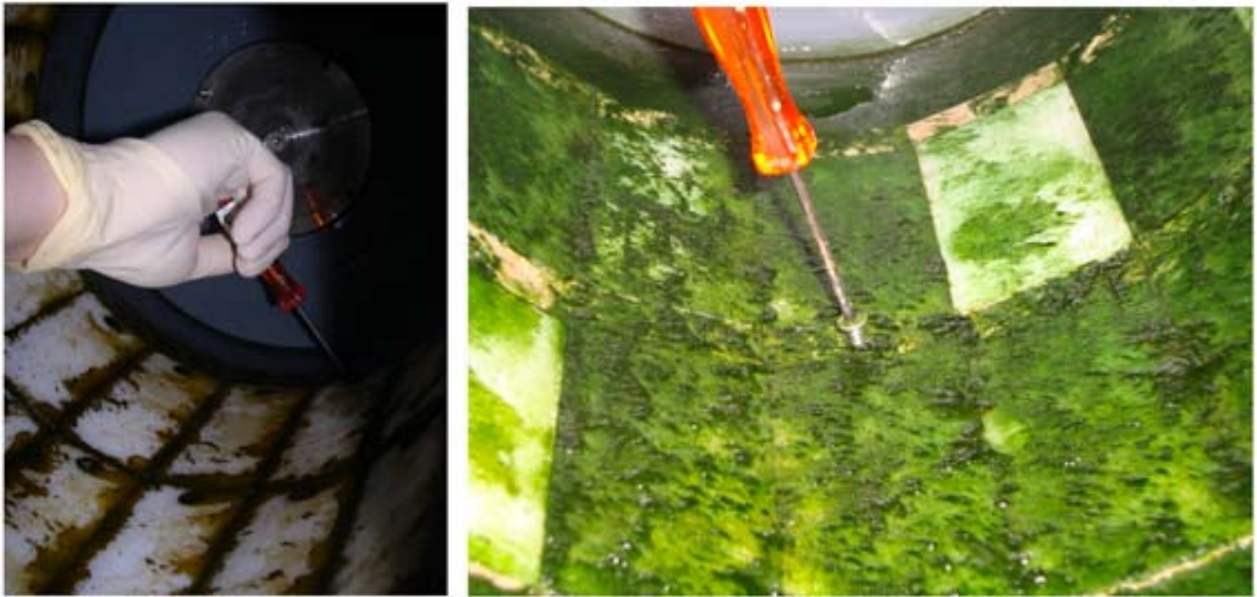
La première procédure d'inoculation (culture **C1**) (**Figure 43A**) a lieu durant 48 h en circuit fermé. La seconde procédure (culture **C2**) (**Figure 43B**) est réalisée en deux phases d'inoculation de 48 h chacune, séparées par une phase en circulation ouverte à l'aide du tank pendant 24 h. Cette stratégie permet une première installation des micro-organismes pionniers suivie par leur croissance pour ensuite favoriser l'arrivée des organismes non pionniers lors de la deuxième phase d'inoculation. La deuxième phase d'inoculation a été réalisée avec une nouvelle suspension fraîche de biofilms provenant des mêmes sites.



**Figure 43** – Dispositifs annexes d'inoculation de la culture **C1** (A) et de la culture **C2** (B)

### II.2.3.1.3.2 Echantillonnage des coupons

A chaque pas d'échantillonnage, 3 coupons sont prélevés au hasard dans le réacteur, et remplacés par des coupons vierges propres afin de ne pas perturber les conditions hydrodynamiques. Les coupons déjà échantillonnés au cours d'une même expérience sont exclus pour le reste des échantillonnages. La procédure d'échantillonnage nécessite l'ouverture du réacteur pour l'accès aux coupons, précédé donc par une vidange de l'eau de l'entrefer qui est gardée pour être réutilisée une fois la collecte des échantillons terminée. Cette étape de collecte se réalise en 15 minutes maximum, durant laquelle le biofilm humide reste à l'air. Les plaques, une fois dévissées (**Figure 44**), sont détachées de manière précautionneuse du cylindre externe, puis stockées à 4°C avant traitement dans des récipients en plastique de 90 mL, avec un fond d'eau, dans les 4 heures qui suivent le prélèvement.



**Figure 44** – Photographies de l'étape de collecte d'un coupon. Les coupons blancs ou partiellement recouverts correspondent aux coupons remplacés suite à un échantillonnage

Les mesures d'accumulation / production de biomasse au niveau des supports artificiels ont été complétées par des mesures de biomasse en suspension dans l'eau (associé au détachement de biomasse des coupons ou la croissance de biomasse planctonique).

### II.2.3.1.3.3 Analyses physico-chimiques

En sortie de bioréacteur, il a été placé une cellule dite de mesure (**Figure 45**), d'une contenance de 30 mL, laquelle contient une sonde pH et température (sentix H 8481 HD, SCHOTT) et une sonde oxygène (trioxmatic 701, WTW). Les sondes étaient reliées à un oxymètre (oxy 296, WYW) et pH-mètre (pH mètre 296, WTW), eux mêmes reliés à un boîtier électronique (METRA HIT) qui enregistrait en continu (toutes les secondes) les valeurs des paramètres. Tous les 15 jours, les données étaient récupérées via un logiciel (METRA View). Ce système a été mis en place par J-L Druilhe (Ingénieur d'études en électronique, UPS EcoLab).

En parallèle, à intervalles de temps réguliers, matin et soir des échantillons d'eau (100 mL) sont récoltés en sortie du réacteur et dans l'eau d'alimentation située dans le tank pour des mesures de conductivité, et de dosage des nitrates, orthophosphates et silice. Ces analyses permettent de vérifier que ces derniers ne sont pas limitant pour la croissance du biofilm.

Après avoir démontré la capacité de ce prototype à produire du biofilm phototrophe, il est possible de l'utiliser soit comme nourrice à biofilm soit comme microcosme. C'est dans ce contexte que deux études ont été réalisées, une première étude où le bioréacteur est utilisé comme une nourrice, le biofilm étant utilisé durant des expérimentations d'écotoxicologie



**Figure 45** – Photographie de la cellule de mesure positionnée en sortie de bioréacteur.

ultérieures, et une seconde étude où le bioréacteur est utilisé comme microcosme afin d'évaluer la capacité de biodégradation d'un herbicide par le biofilm en développement.

#### II.2.3.1.4 Bioréacteur prototype RAB, une nourrice à biofilms phototrophes

##### II.2.3.1.4.1 Objectif de l'expérience

La configuration biofilm permet aux micro-organismes de se protéger du milieu ambiant. Les stades précoces (premières semaines) de développement de biofilms phototrophes (faible biomasse) sont caractérisés par des interactions fortes avec la colonne d'eau. Ces interactions sont moins importantes rapportées à la biomasse pour un biofilm plus mature (forte biomasse, quelques semaines).

##### II.2.3.1.4.2 Déroulement de l'expérience

A partir de biofilms phototrophes collectés dans le RAB au cours de la culture **C2** présentée ci-dessus, deux expériences d'écotoxicologie ont été réalisées avec des coupons d'âges de biofilm de 1,6 et 4,4 semaines. Les deux expériences sont réalisées en microcosme durant 15 jours en été 2009 : la première du 09/08 au 24/08, la seconde du 29/08 au 15/09. Chaque expérience représente donc un stade de maturation du biofilm différent. Les microcosmes consistent en des béchers de 500 mL, remplis d'eau du réseau autoclavée au préalable et enrichie en nutriments (silice, nitrates et orthophosphates) dans des quantités plus importantes que dans le réacteur qui a produit les biofilms pour ne pas être en carence pendant la phase d'incubation. Les béchers sont positionnés aléatoirement sur des agitateurs magnétiques multi-postes (**Figure 46**). A chaque stade de maturation (1,6 et 4,4 semaines), l'expérience



se déroule de la façon suivante (**Figure 47**) : 9 coupons colonisés sont échantillonnés du RAB de manière aléatoire à la date souhaitée et utilisés comme suit :

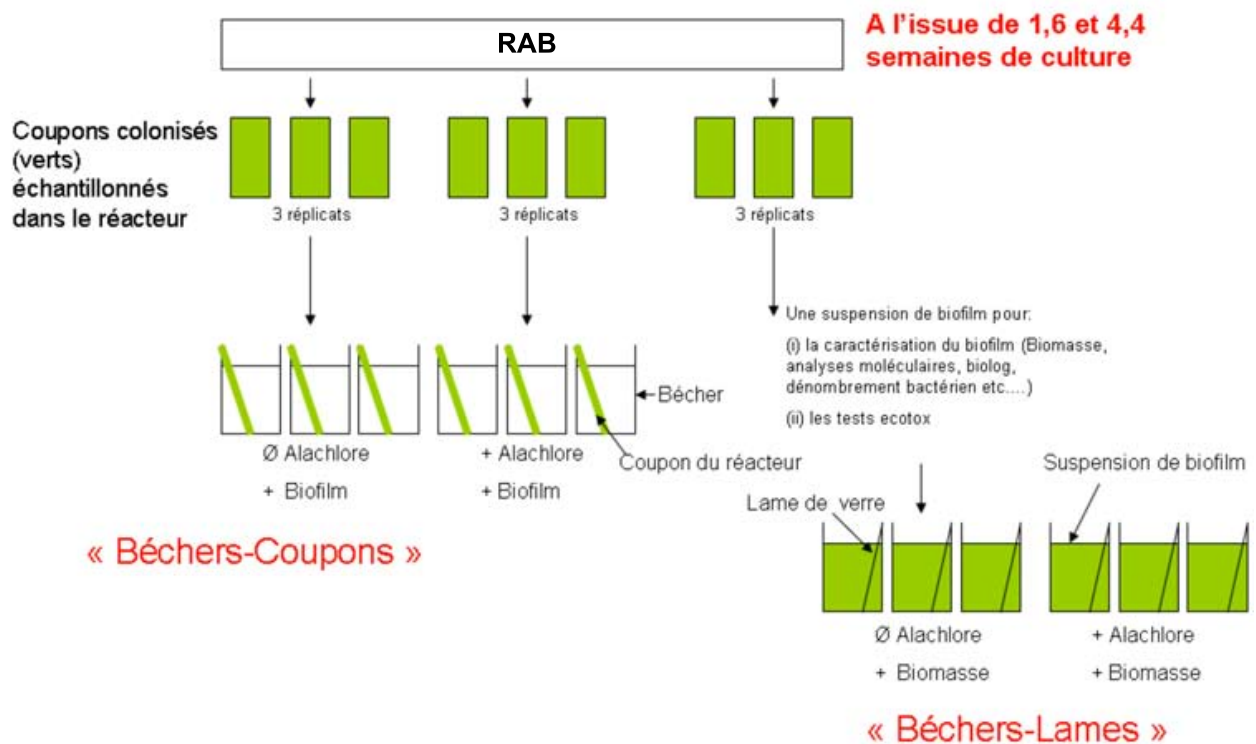
- 6 coupons sont gardés intacts et positionnés à la verticale dans les béciers à raison de 1 coupon par bécier. Sur les 6 béciers, 3 sont contaminés avec de l'alachlore (= 3 réplicats) à  $10 \mu\text{g.L}^{-1}$  et 3 sans alachlore servent de référence. Ces microcosmes permettent d'évaluer l'effet d'une exposition de biofilms phototrophes intacts à l'alachlore dans des conditions favorables de poursuite de croissance.
- 3 coupons colonisés sont grattés et la biomasse mise en suspension dans un volume connu (250 mL) d'eau du réseau filtrée sur filtre de  $0,22 \mu\text{m}$  (membrane en acétate de cellulose, Whatman) et homogénéisée. Sur ces 250 mL, une fraction est utilisée pour les analyses biologiques et le reste est subdivisé en 6 aliquots identiques répartis dans 6 béciers qui contiennent chacun une lame de verre nettoyée au préalable au détergent. Sur ces 6 béciers, 3 sont contaminés avec  $10 \mu\text{g.L}^{-1}$  d'alachlore (= 3 réplicats) et 3 servent de contrôle. Ces microcosmes permettent d'évaluer l'effet d'une exposition à l'alachlore de biomasse issue de biofilms phototrophes déstructurés, pendant la phase de colonisation d'un support vierge, les lames de verre.

Les coupons ou lames de verre sont maintenus par des baguettes en plastiques et immergés dans le milieu. Les microcosmes sont incubés dans une enceinte thermostatée à  $20^\circ\text{C}$ , éclairés par le dessus par 8 néons "Lumière du jour" (F18W/GRO, Sylvania, Allemagne) pendant 15 jours (photo-période : 16 h jour /8 h nuit).



**Figure 46** – Photographie du dispositif expérimental des tests écotoxicologiques dans l'enceinte thermostatée.

Au bout de 5 et 15 jours d'incubation, des échantillons d'eau sont prélevés (100 mL) pour des analyses physico-chimiques (pH, température, oxygène dissous, nitrates, silice, orthophosphates, COD), ainsi que la détermination des concentrations résiduelles en alachlore et de deux de ses métabolites de biodégradation OA et ESA. Les biofilms sont caractéri-



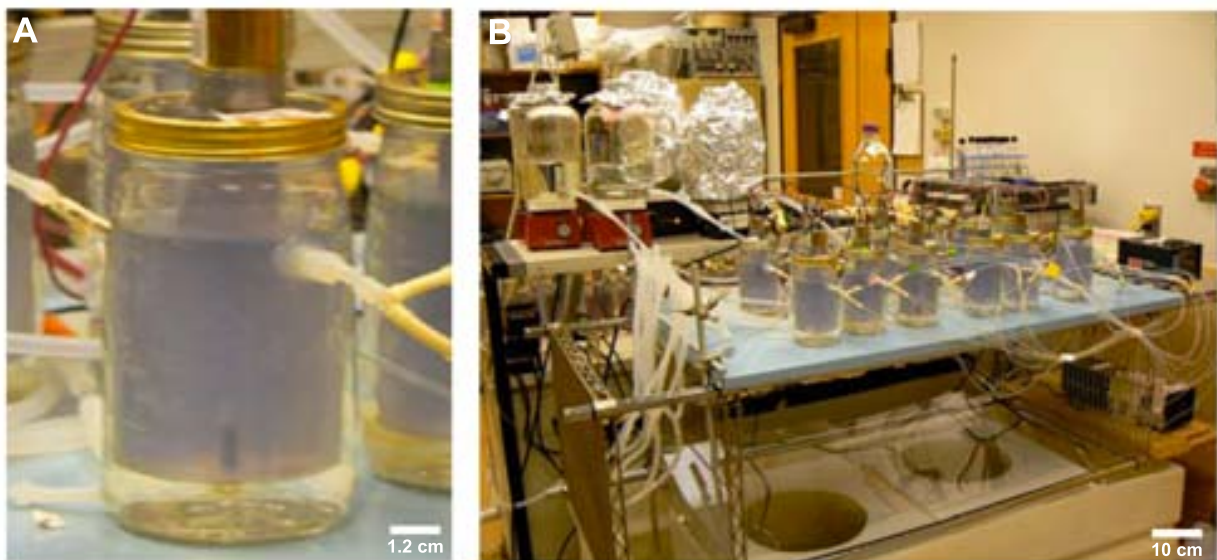
**Figure 47** – Schéma du protocole expérimental des tests écotoxicologiques réalisés dans des béchers (500 mL) avec des biofilms phototrophes cultivés dans le RAB : utilisation de la biomasse sous forme biofilm fixé sur le coupon, ou mise en suspension dans le milieu, en présence d'une lame de verre.

sés fonctionnellement (Biolog) et structurellement (descripteurs de biomasse, PCR-DGGE, composition algale) avant incubation et en fin d'incubation à 15 jours.

### II.2.3.1.4.3 Mini-bioréacteurs annulaires rotatifs de laboratoire

#### II.2.3.1.4.3.1 Description

Au laboratoire Environment Canada, J.R. Lawrence et ses collaborateurs ont développé des bioréacteurs annulaires rotatifs (Lawrence et al. 2000) pour la culture de biofilms phototrophes (**Figure 48**). De plus petite taille que notre prototype RAB, ces réacteurs ont l'avantage de permettre la culture de biofilm, sous conditions hydrodynamiques maîtrisées, en réplicats (batterie de plusieurs mini-bioréacteurs en parallèles) et ainsi de pouvoir aborder facilement l'impact d'une variété de facteurs environnementaux ou de contaminants sur la croissance du biofilm, sa structure et ses fonctionnalités (Lawrence et Neu 2003). Le point faible de ces réacteurs réside dans le fait que la source lumineuse qui soutient l'activité phototrophe est externe au réacteur et que le cylindre interne en rotation ( $130 \text{ trs.min}^{-1}$ ) supporte les coupons (12 unités d'échantillonnage), faisant subir une force centrifuge au biofilm qui s'y développe. La quantité de biomasse obtenue ainsi que le nombre d'échantillons possible sont bien plus faibles que pour notre prototype RAB (**Tableau 12**).



**Figure 48** – Photographies d'un mini-bioréacteur (A) et du dispositif expérimental (B)

#### II.2.3.1.4.3.2 Objectif de l'expérience

Au cours d'un stage de deux mois, financé par une bourse ATUPS de l'UPS, j'ai eu l'opportunité de pouvoir travailler avec J.R. Lawrence au sein de son laboratoire Environment

<b>Types de bioréacteur</b>	Mini-bioréacteurs	Bioréacteur prototype
<b>Diamètre externe du cylindre interne (mm)</b>	64	220
<b>Diamètre interne du cylindre externe (mm)</b>	85	257
<b>Surface des coupons (mm<sup>2</sup>) et nombre</b>	1100 12 (polycarbonate)	5000 32 (polyéthylène HD)
<b>Entrefer (mm)</b>	11	18,5
<b>Hauteur du réacteur (mm)</b>	115	297
<b>Volume utile (L)</b>	0,45	5,1
<b>Contrôle de la lumière</b>	aucun	Spectre et photo-période
<b>Taux de dilution (h<sup>-1</sup>)</b>	0,046	0,32
<b>Inoculum</b>	Eau de rivière	Suspension de biofilm
<b>Milieu de culture</b>	Eau de rivière	Eau du réseau + nutriments

**Tableau 12** – Comparaison des principales caractéristiques des deux types de bioréacteurs annulaires rotatifs utilisés dans le cadre de cette étude : Mini-bioréacteurs d'Environment Canada et prototype RAB d'EcoLab.

Canada. Il m'a permis d'accéder à une batterie de mini-bioréacteurs pour pouvoir tester l'effet de l'alachlore et du méthanol (solvant de préparation des solutions mères d'alachlore) sur les communautés de biofilms phototrophes, dans des conditions de fonctionnement se rapprochant des conditions naturelles (eau de rivière, apport continu de micro-organismes par l'alimentation). L'objectif a donc été de réaliser une étude écotoxicologique en conditions maîtrisées avec des réplicats.

### II.2.3.1.4.3.3 Déroulement de l'expérience

Lors de cette expérimentation, 12 mini-bioréacteurs ont été utilisés pendant 5 semaines du 10 Mai au 15 Juin 2010, alimentés par de l'eau de rivière comme source d'inoculum microbien et de nutriments et maintenus dans une pièce thermostatée à  $21 \pm 2^\circ\text{C}$  avec éclairage en continu (**Figure 48**). Quatre traitements sont testés, chacun avec 3 bioréacteurs pour réaliser des triplicats : une culture sans contaminant rajouté, une exposition à  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  d'alachlore (Chem Service, Inc. USA, purity 98 %), une exposition à  $10 \mu\text{g.L}^{-1}$  d'alachlore et une exposition à 0,0025 % (v/v) de méthanol (analytic grade, Fisher Scientific, Nepean, ON, Canada). Chaque mini-bioréacteur est alimenté par l'eau de rivière à raison de  $500 \text{ mL.j}^{-1}$ , donnant un temps de séjour moyen de 24 h.

Au niveau de l'alimentation de chaque mini-bioréacteur (**Figure 48**), deux tuyaux se rejoignent :

- un tuyau connecté à un bac réfrigéré à  $4^\circ\text{C}$  contenant l'eau de rivière via une pompe péristaltique multicanaux (Watson Marlow, Wilmington, MA),
- un tuyau relié à une bouteille de 2 L remplie d'eau déminéralisée préalablement autoclavée et contenant les concentrations correspondantes pour des solutions stocks d'alachlore, de méthanol ou sans contaminant rajouté suivant le traitement considéré. Le liquide de la solution stock, préparée tous les 15 jours, alimente les mini-bioréacteurs via une pompe péristaltique multicanal (Watson Marlow, Wilmington, MA). Chaque bouteille alimente 3 mini-bioréacteurs qui correspondent à 3 réplicats, elles sont maintenues fermées sur des agitateurs magnétiques, et recouvertes de papier d'aluminium pour les bouteilles contenant de l'alachlore afin de limiter les processus de photodégradation. A l'issue des 5 semaines de colonisation, l'ensemble des supports est échantillonné de chaque mini-bioréacteur et analysé par une approche multiphasique soit immédiatement (la Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM), la chlorophylle *a* et les *Community Level Physiological Profil* (CLPP)).

# Volet analytique

---

L'ensemble des expérimentations avec les différentes analyses réalisées sont présentées dans le Tableau 13. Il permet de synthétiser et comparer les différentes approches méthodologiques et analytiques.

Au cours des travaux de thèse, que ce soit durant la colonisation *in situ* de biofilms sur des supports naturels ou artificiels ou durant les différentes approches expérimentales en microcosmes, les propriétés physico-chimiques de l'eau ont été caractérisées. Pour les eaux des différents sites d'étude, la température, la conductivité, la concentration en oxygène dissous, ainsi que le pH étaient mesurés en utilisant des sondes spécifiques *in situ*. Les valeurs de pH et de conductivité étaient mesurées avec un conductimètre (Hanna HI 99 1300) et un pH-mètre (320 WTC associé à une sonde sentix 41, WTV), et l'oxygène dissous était mesuré avec l'aide d'un oxymètre (oxi 323 associé à une sonde oxical-S) et les valeurs de température étaient représentées par la moyenne des valeurs données par le pH et l'oxymètre.

En parallèle, des échantillons d'eau étaient collectés (environ 100 mL) quelle que soit leur origine (rivières et microcosmes), pour analyser les paramètres suivants : les concentrations en nitrates ( $\text{N-NO}_3^-$ ), ammonium ( $\text{N-NH}_4^+$ ), orthophosphates ( $\text{P-PO}_4^{3-}$ ), phosphore total (Pt), et silice ( $\text{SiO}_2$ ). Ces paramètres étaient mesurés par une méthode classique de colorimétrie (Secoman, Uvi Light, XT5), en accord avec les méthodes standard (APHA 1992). L'ensemble de ces paramètres n'était pas systématiquement mesuré, cela dépendait de l'expérience (Tableau 13). Les concentrations en ammonium étaient déterminées dans les 10 jours qui suivaient la collecte de l'eau et les concentrations en orthophosphates dans la semaine. Pour les dosages d'ammonium, de silice, d'orthophosphates, de nitrates et de COD, les échantillons étaient préalablement filtrés sur  $0,45 \mu\text{m}$  (membrane en acétate de cellulose, 25 mm diamètre, Whatman) et stockés à  $4^\circ\text{C}$  jusqu'à analyse. Les concentrations en carbone organique dissous (COD) étaient analysées en utilisant un catalyseur de platine à  $650^\circ\text{C}$  (Shimadzu, Model TOC 5000, Kyoto, Japon). Pour les dosages du phosphore total, les échantillons étaient stockés directement à  $4^\circ\text{C}$  sans subir d'étape de filtration.

## III.1 Analyses physico-chimiques

Toutes ces mesures (*in situ* ou collecte d'échantillons d'eau) ont été réalisées à des intervalles de temps réguliers et à des moments identiques de la journée afin de limiter la variabilité des mesures au cours de la journée. Les échantillons d'eau étaient transportés au laboratoire dans des glacières. La matière en suspension était mesurée par pesée d'un filtre séché à l'étuve (105°C, 4 h) après filtration sur membrane à 0,45  $\mu\text{m}$  de seuil de coupure (membrane en acétate de cellulose, 47 mm diamètre, Whatman).

Expérience	Un exemple de "service écologique"		Une approche écologique		De l'écologie à l'écotoxicologie		
	Microcosme	<i>In situ</i>	Bioréacteur Taylor - Couette (2 cultures)	Microcosme "petit" (Bécher)	Microcosme "moyen" (aquarium)	Mini-bioréacteur annulaire rotatif (Canada)	
Dispositif							
Dimensionnement	Bouteille ambree de 450 mL		Diamètre interne du cylindre externe : 257 mm Largeur de l'entrefer : 18,5 mm Hauteur du bioréacteur : 297,5 mm Volume d'eau : 5,04 litres	Bécher de 500 mL	L : 30 cm l : 20 cm h : 20 cm Volume d'eau : 10 litres	Diamètre interne du cylindre externe : 85 mm Largeur de l'entrefer : 11 mm Hauteur du bioréacteur : 115 mm Volume d'eau : 0,45 litres	
Durée	10 jours	5 semaines	8 semaines en continue	15 jours	30 jours	5 semaines	
Site d'échantillonnage	G, M et W	M et S	-	-	M et S	South Saskatchewan River	
Descripteurs physiques							
Eclairage ( $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ )	NON	naturel (mars-avril)	artificiel : 130 (C1) et 180 (C2)	artificiel (37)	artificiel (44)	artificiel	
T°C	20 (enceinte thermostatée)	x	-	-	20 (enceinte thermostatée)	20 (salle climatisée)	
Vitesse du courant ( $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ )	-	x	0,3	-	-	0,44	
Débit d'entrée	-	-	26 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$	-	-	500 $\text{mL}\cdot\text{jour}^{-1}$	
Descripteurs chimiques							
Conductivité	-	x	-	x	x	-	
pH	-	x	-	x	x	-	
N-NO <sub>3</sub>	-	x	-	x	x	-	
SiO <sub>2</sub>	-	x	-	x	x	-	
P-PO <sub>4</sub>	-	x	-	x	x	-	
COD (carbone organique dissous)	-	-	-	x	x	-	
Analyse multi-résidus des pesticides	-	-	-	-	-	-	
Alachlore	x	-	-	-	x	x	
Métabolites de l'alachlore	x	-	-	-	x	-	
Stratégies d'échantillonnage (Prélèvement et préparations des échantillons)							
Nature des supports expérimentaux	NON	lame de verre	polychétylène	polychétylène		polycarbonate	
Origines des biofilms	Suspension de biofilm naturel	-	Suspension de biofilm naturel	Bioréacteur		eau de rivière	
Volume suspensions initiale (mL)	-		50 (C1) ou 90 (C2)	50 ("suspension") ou 90 ("plate")	50	-	
Descripteurs biologiques (Volume prélevé)							
Structuraux							
Chlorophylle <i>a</i>	-	x	x	x	x	x	
Matière sèche sans cendre	x	x	x	x	x	x	
Microscopie confocale	-	-	-	-	-	-	
Diversité bactérienne (DGGE 16S)	-	x	x	-	x	-	
Diversité bactérienne (T-RFLP)	-	-	-	-	-	-	
Diversité algale (observation)	-	-	-	x	x	x	
Diversité des Eucaryotes (DGGE 18S)	-	-	-	x	x	x	
Fonctionnels							
BIOLOG	-	-	-	x	x	x	
Production bactérienne	-	-	-	-	-	-	
Activité de la Glutathione S-transférase (GST)	-	-	-	-	-	-	
Chapitre de la partie 3 "Etudes expérimentales"	CHAPITRE 1		CHAPITRE 2		CHAPITRE 3		

Tableau 13 – Récapitulatif de chaque expérience et des analyses réalisées



## III.2 Analyse des pesticides

### III.2.1 Analyses de l'alachlore et de deux de ses métabolites de biodégradation

La collecte des échantillons d'eau destinés à l'analyse des pesticides (volumes variables en fonction des molécules et des recommandations du laboratoire d'analyse) était réalisée avec du matériel en verre et l'eau conservée dans des bouteilles en verre ambré pour limiter les processus d'adsorption et bio/photodégradation jusqu'à analyse. Pour les analyses de l'alachlore, les échantillons d'eau étaient filtrés sur des GF/F ( $0,7 \mu\text{m}$  de seuil de coupure). Les analyses étaient effectuées au Laboratoire Département de l'Eau (LDE, Toulouse, France), en utilisant une HPLC couplée à un spectromètre de masse en tandem (HPLC-MS-MS, Thermo Fisher, model E-Quan TSQ Quantum ultra), avec une source d'ionisation par électrospray (« *Electrospray Ionization* », ESI, en anglais) équipé d'une colonne de pré-concentration (Thermo Fisher Hypersil GOLD C18, taille des particules  $12 \mu\text{m}$ ,  $20 \times 2,1 \text{ mm}$ ). L'analyse se faisait par une injection directe de 2 mL d'échantillon. La séparation de l'alachlore est permise par l'utilisation d'une colonne Thermo Fisher Hypersil GOLD C18 (taille des particules  $3 \mu\text{m}$ ,  $50 \times 2,1 \text{ mm}$ ). La limite de quantification (LQ) était de  $0,005 \mu\text{g.L}^{-1}$ . Pour mettre en évidence une biodégradation potentielle de l'alachlore, les deux métabolites principaux connus dans la littérature pour être issus de processus de biodégradation OA (*Oxanilic Acid*) et ESA (*Ethane Sulfonic Acid*) ont été analysés par H. Preud'homme (Ingénieur, LCABIE à Pau). Pour ces analyses, les échantillons d'eau (2 mL) étaient filtrés sur membrane à  $0,22 \mu\text{m}$  de seuil de coupure des tubes SpinX à filtre et à centrifugation ( $10\,000 g$ , 10 min) (Sigma-Aldrich), puis transférés dans des vials (Agilent Technologies) et stockés à  $-20^\circ\text{C}$  jusqu'à analyse. L'analyse se faisait en mode directe en utilisant une UPLC (*Ultra Performance Liquid Chromatography*) couplée à un spectromètre de masse en tandem (UPLC-MS/MS) avec une source d'ionisation par électrospray (ESI) (Protocole détaillé en Annexe). En parallèle des dosages de OA et ESA et en plus du dosage réalisé par le LDE, l'alachlore était de nouveau analysé.

### III.2.2 Dosage des pesticides

Durant l'approche expérimentale *in situ* uniquement, afin de caractériser ponctuellement le niveau de pollution en pesticides aux deux sites d'études (**M** et **S**), trois échantillons d'eau de 3 L ont été prélevés sur chaque site et transportés dans des bouteilles en verre préalablement autoclavées. Ces prélèvements ont été réalisés à trois dates clefs de l'étude : le 27 Mars 2007, soit une semaine après la mise en place des cagettes ; le 18 mars, qui correspond au jour

de prélèvement d'eau utilisée pour remplir les microcosmes du test 1 de biodégradation de l'alachlore, et le 26 Avril, qui correspond au jour de prélèvement d'eau utilisée pour remplir les microcosmes du test 2. Pour chaque échantillon, 1,5 L sont filtrés (« eau filtrée ») sur des filtres en acétate de cellulose de seuil de coupure 0,45  $\mu\text{m}$  et stockés avec 10 mL de dichlorométhane en chambre froide (4°C). L'autre moitié (« eau brute ») est également stockée avec 10 mL de dichlorométhane (qualité pesticide, VWR) en chambre froide. Les échantillons sont ensuite préparés par extraction au dichlorométhane comme décrit par Devault et al. (2007) avant leur passage à la GC-MS (*Gas Chromatography-Mass Spectrometry*). L'extraction des molécules de pesticides se faisait par une méthode d'extraction liquide-liquide, en utilisant le dichlorométhane comme solvant organique. Les 1,5 L d'eau échantillonnés sont placés dans une ampoule à décanter. L'extraction se déroule en trois phases. Une première extraction avec 70 mL de dichlorométhane. Après avoir agité très fortement le mélange, laisser décanter et récupérer le dichlorométhane (phase la plus dense) qui contient les molécules de pesticides. Il faut recommencer cette étape 2 autres fois avec 60 mL de dichlorométhane.

L'extrait obtenu est séché par un passage sur du sulfate de sodium anhydre puis passé à l'évaporateur rotatif (à une température de 40°C). Une fois l'extrait complètement séché, il est dilué dans 2 mL d'acétonitrile (qualité pesticide, VWR), passé aux ultrasons pour homogénéiser le mélange. Les échantillons sont prêts à être injectés et séparés par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS Thermo Fisher, Model Trace DSQ) selon Devault et al. (2007). Un total de 33 pesticides (Tableau 16 en Annexe), communément utilisés dans le sud ouest de la France, sont recherchés dans les échantillons. Parmi ces 33 pesticides, 17 herbicides (Aclonifen, Atrazine, Atrazine desethyl, Chlorotoluron, Cyanazine, Hexazinone, Imazathabenz-methyl, Isoproturon, Linuron, Metazachlor, Metolachlor, Metoxuron, Monolinuron, Sebuthylazine, Simazine, Terbutylazine, Trifluralin) et 6 fongicides (Cyproconazol, Epoxiconazol, Fenpropimorph, Flusilazol, Pendimethalin, Tebuconazol) ont été quantifiés à 3 temps durant le développement du biofilm.

## III.3 Analyses biologiques des biofilms

### III.3.1 Préparation des échantillons de biofilms

Les galets ou les supports artificiels (lames de verre, coupons en polyéthylène ou en PVC) colonisés par du biofilm phototrophe étaient collectés et transportés au laboratoire dans des caisses en bois (700 mm x 300 mm x 400 mm). Les substrats collectés n'étaient pas transportés dans de l'eau de rivière pour éviter les phénomènes d'arrachage du biofilm par des mouvements d'eau. Chaque galet était maintenu durant le transport dans un sac de congélation fermé, et

les substrats artificiels étaient maintenus fixés sur leurs dispositifs de manière à éviter tout dommage sur le biofilm et placés dans des sacs poubelle humidifiés. Arrivés au laboratoire, tous les supports étaient gardés à 4°C jusqu'aux traitements ou stockages systématiquement effectués dans les 4 heures qui suivaient le prélèvement.

Les biofilms étaient détachés des supports artificiels ou naturels par grattage soit avec l'aide d'une brosse à dent préalablement traitée avec une solution de NaOH à 1N pour enlever toute trace d'ADN (pour les supports naturels), soit avec une lame en verre de microscopie préalablement nettoyée à l'alcool (pour les supports en verre et en polyéthylène), soit avec un morceau de silicone stérile maintenu par une pince préalablement autoclavée (pour les supports en polycarbonate) (**Figure 49**). Cette étape de récupération de la biomasse est une étape critique et souvent une source de sur ou sous estimation de la biomasse, c'est pourquoi à chaque type de substrat, le matériel utilisé pour récupérer la biomasse était adapté aux dimensions des supports. Plusieurs études ont montré l'efficacité relative du brossage ou du grattage des galets (Jones 1974; Cattaneo et Roberge 1991), et ils ont observé l'existence d'une quantité importante d'algues perdue après le nettoyage des supports (Murdock et Dodds 2007). Les biofilms étaient mis en suspension (annotée « suspension initiale ») dans un volume (volume variable suivant la quantité de biomasse et le nombre d'analyses à réaliser) d'eau de rivière ou du réseau au préalable filtrée (sur 0,22  $\mu\text{m}$ , membrane en acétate de cellulose, Whatman) et/ou autoclavée, puis homogénéisée (13 500 tpm, Ultra Turrax, T25, 1 min). Cet homogénat de suspension de biofilm est par la suite aliquoté pour les différentes analyses biologiques présentées dans le paragraphe suivant. Les analyses biologiques étaient de deux types : les descripteurs fonctionnels ou structurels (**Figure 49**).

## III.3.2 Descripteurs structurels

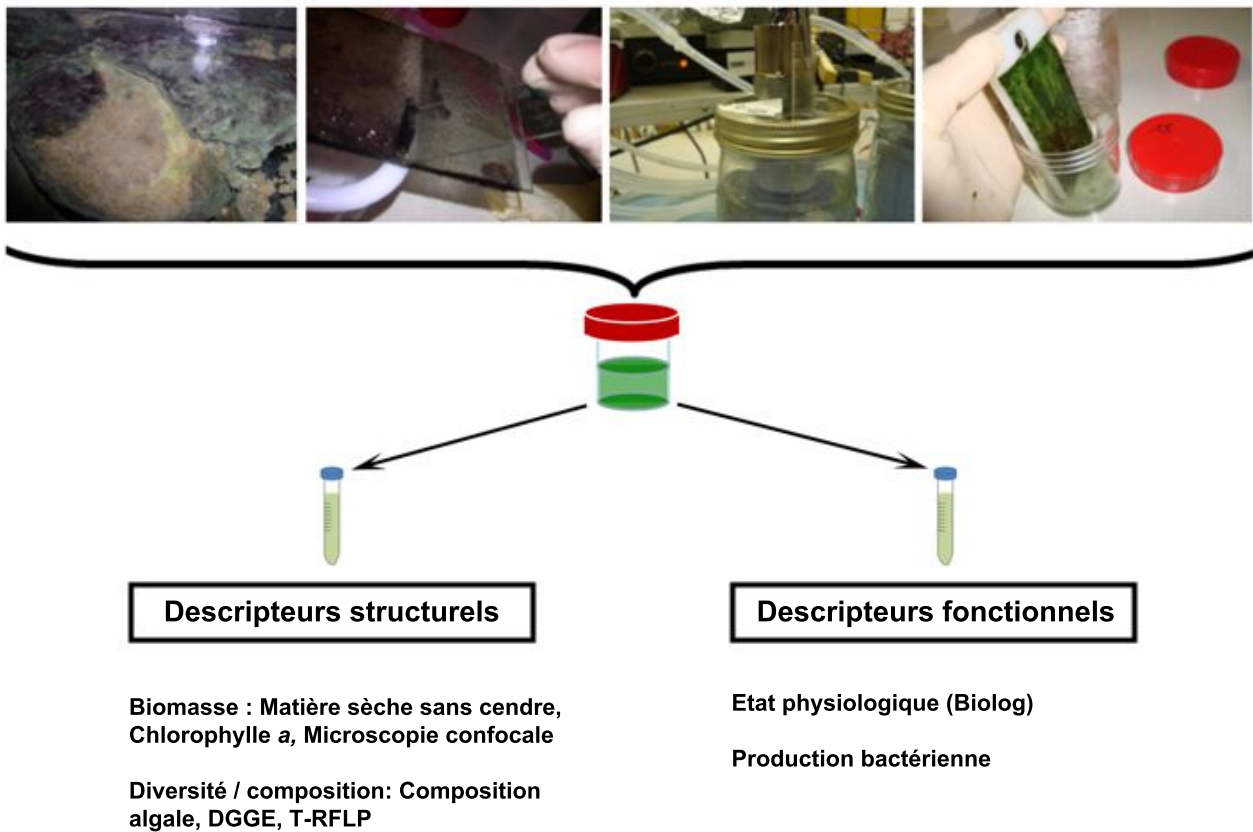
### III.3.2.1 Descripteurs de biomasse

#### III.3.2.1.1 Matière sèche et matière sèche sans cendre

La matière sèche ( $MS$ ) en  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  était mesurée par pesée d'un culot sec (24 h à 110°C ou 36 h à 80°C), d'un aliquot de la suspension de biofilm initiale centrifugé à 3 500  $g$  pendant 15 minutes (Heraeus Function Line) suivant la formule suivante :

$$MS = \frac{p2 - p1}{v}$$

avec  $p1$  le poids de la coupelle sèche et sans culot (en mg),  $p2$  le poids de la coupelle avec culot et après le passage à l'étuve (en mg) et  $v$  le volume de l'aliquot (en mL).



**Figure 49** – Schéma récapitulatif des analyses réalisées au cours de ces travaux de thèse sur les différents types de supports de colonisation utilisés

Le culot a été par la suite carbonisé à 550°C pendant 8 h pour fournir la matière sèche sans cendre (*MSSC*) en  $\text{mg.cm}^{-2}$  donnée par l'équation suivante :

$$MSSC = \frac{p3 - p2}{v} \times \frac{V}{S}$$

avec *p3* le poids de la coupelle après calcination (en mg), *S* la surface du support de colonisation (en  $\text{cm}^2$ ), *V* le volume de la suspension initiale (en mL) et *v* le volume de l'aliquot (en mL).

La matière sèche sans cendre représente à la fois la composante des autotrophes et hétérotrophes ainsi que le carbone détritique.

#### III.3.2.1.2 Chlorophylle *a*

La teneur en chlorophylle *a* des échantillons de biofilm est mesurée au spectrophotomètre (663, 645 et 630 nm) à partir des équations trichromatiques (Jeffrey et al. 1997) après extraction à l'acétone 90 % (4 h, à l'obscurité et à température ambiante) du culot homogénéisé (13 500  $\text{trs.min}^{-1}$ , Ultra Turrax T25) et désagrégé (Sonde à Ultra Son, 1 min). La chlorophylle *a* représente la composante des autotrophes (Biggs et Close 1989).

#### III.3.2.1.3 Index autotrophique et ratio *MSSC* / *MS*

L'index autotrophique ("*autotrophic index*" en anglais AI) défini comme le ratio entre la *MSSC* et la chlorophylle *a*, indique l'importance relative des organismes autotrophes par rapport aux organismes hétérotrophes et aux détritiques (Biggs et Close 1989). Une valeur d'index autotrophique jusqu'à 100 indique généralement une communauté dominée par des algues, et supérieure à 400 une communauté dominée par des organismes hétérotrophes et/ou des détritiques organiques. De même, pour chaque échantillon le rapport entre *MSSC* et *MS* a été calculé pour fournir une indication des proportions de la fraction organique au sein du biofilm.

### III.3.3 Analyse de la composition algale

Pour les deux expériences en bioréacteur prototype RAB, ce travail a été réalisé par L. Ten-Hage (Maître de conférences à l'UPS, EcoLab) pour la détermination des 3 groupes de microalgues (Diatomées, Chlorophytes et Cyanobactéries) sur un pool de 3 réplicats d'un volume de suspension (5 mL), préservé dans une solution formolée à 3 %, stockée dans le noir et à 4°C jusqu'à comptage et identification. La densité totale et le pourcentage d'abondance ont été déterminés avec un microscope inversé (Axiovert 10, Zeiss, West Germany) comme décrit

par Utermöhl (1958). Pour les échantillons qui proviennent des expériences sur la réponse du biofilm à l'alachlore, seule la détermination des diatomées a été réalisée par V. Roubeix (Post-doctorant du Cemagref de Bordeaux). Un volume connu d'un aliquot de la suspension initiale de biofilm homogénéisé (5 mL) de chaque condition d'exposition est fixé avec 3 % de formaldéhyde puis transféré au Cemagref de Bordeaux pour analyses. Les échantillons ont été digérés dans du peroxyde d'hydrogène porté à ébullition (le ratio échantillon total / peroxyde d'hydrogène était de 2/3 v/v) pour digérer les composés organiques cellulaires, puis centrifugés (2500 g, 10 min), puis le culot est récupéré et rincé avec de l'eau déminéralisée (2 fois). Une fois rincé, le culot est resuspendu dans de l'eau distillée, et un sous-échantillon de 200  $\mu\text{L}$  est pipeté, puis monté sur lame de microscope avec une résine possédant un indice de réfraction élevé (1,73) (Naphrax©, Brunel Microscopes Ltd UK). L'identification et le comptage des diatomées ont été effectués au microscope (grossissement x 1000, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, G) au nombre de 400 frustules par échantillon et au niveau de l'espèce à partir de la littérature taxonomique de l'Europe Centrale (Krammer et Lange-Bertalot 1986-1991) et des dernières nomenclatures en date.

### III.3.4 Microscopie confocale à balayage laser

Seuls les échantillons provenant de l'expérience réalisée en mini-bioréacteurs ont été analysés par microscopie confocale. Chaque coupon extrait de chaque mini-réacteur était coupé en morceaux de 1 cm<sup>2</sup> et fixé dans le couvercle d'une petite boîte de Pétri par l'utilisation de silicone dépourvu d'acide (Dow Corning # 3140 acid-free silicone, WPI, Inc., Sarasota, FL). Chaque morceau ainsi fixé, était marqué puis analysé comme décrit en détail par Lawrence et al. (2004). L'analyse d'image numérique de la microscopie confocale à balayage laser (CLSM, *Confocal Laser Scanning Microscopy*), réalisée en fines sections, a été utilisée pour déterminer des paramètres tels que la profondeur du biofilm, la biomasse bactérienne, la masse des exopolymères, la biomasse des cyanobactéries, et la biomasse photosynthétique totale à différentes profondeurs.

### III.3.5 Structure des communautés bactériennes (DGGE et T-RFLP)

Les techniques de cultures traditionnelles ne permettent pas d'estimer correctement la diversité et la structure des communautés microbiennes, en effet seulement 0,1 % des microorganismes sont cultivables (Azam et al. 1983). L'utilisation de cultures, en plus de sélectionner les microorganismes cultivables, sont susceptibles de sélectionner la structure globale des communautés, en favorisant par exemple les individus à taux de croissance rapide et

capables de se développer sur des milieux plus ou moins riches. L'observation au microscope pour les procaryotes permet de réaliser un comptage mais non une identification, pour les eucaryotes l'identification est possible, cependant pour certaines espèces, vu la taille et les caractéristiques morphologiques parfois très proches (Stevenson et al. 1996) ceci reste délicat, et engendre une sous estimation de la diversité.

Les approches moléculaires, disponibles depuis une quinzaine d'années, ont permis une meilleure connaissance de la biodiversité et de la structure des communautés de micro-organismes (Von Wintzingerode et al. 1997). Il existe deux types d'approches moléculaires, intégrant ou pas une étape d'amplification par PCR (réaction en chaîne par polymérase, en anglais « *Polymerase Chain Reaction* »). Parmi les techniques qui reposent sur une étape d'amplification, deux groupes se distinguent, les méthodes de typages moléculaires (« *fingerprinting methods* », en anglais) et les méthodes de clonage / séquençage plus coûteuses, plus longues et difficiles à réaliser (Figure 50). Les méthodes de typages moléculaires présentent une forte robustesse, et une rapidité d'utilisation pour des analyses comparatives de différentes communautés ou des analyses pour évaluer la dynamique de l'évolution temporelle des communautés.

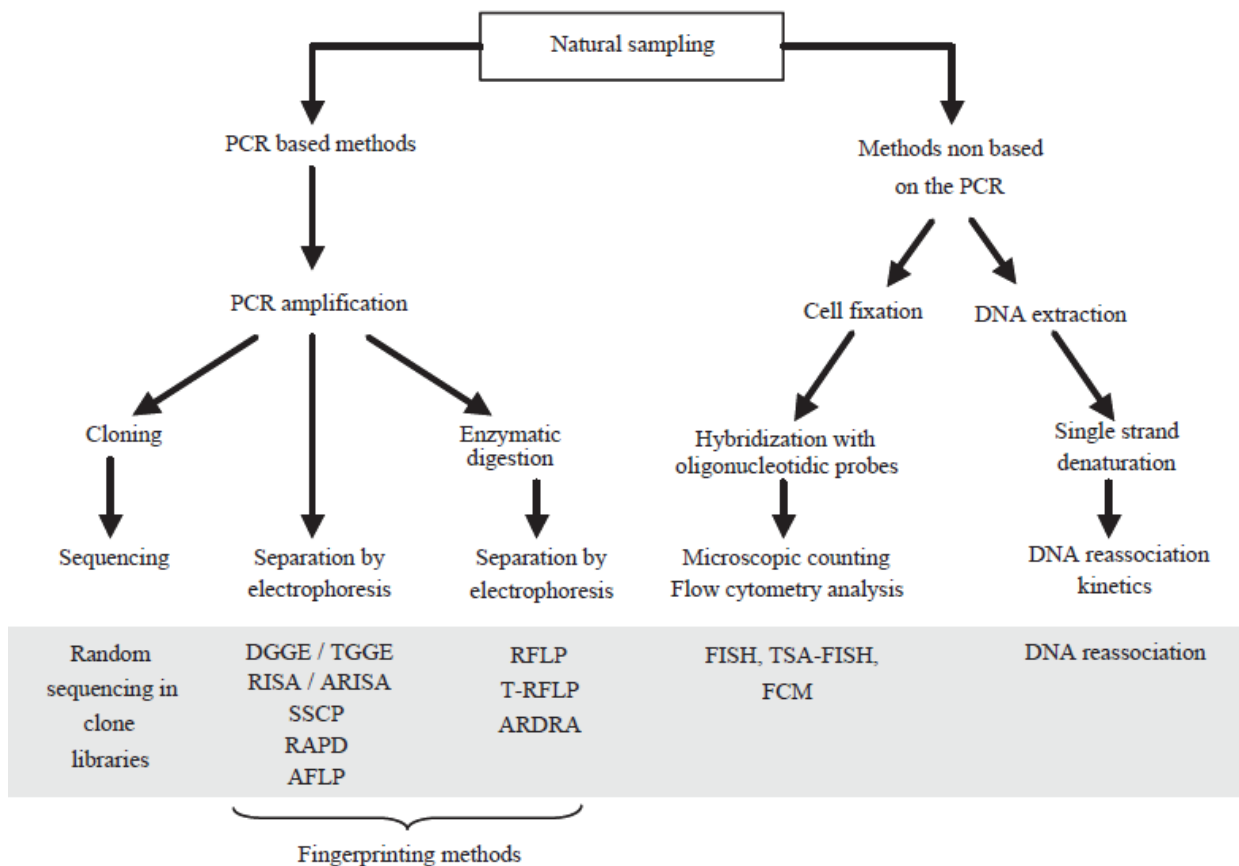


Figure 50 – Différentes approches moléculaires utilisées pour l'étude des communautés microbiennes (extrait de Dorigo et al. 2005)

Malgré quelques biais techniques, apportés par ces approches moléculaires basées sur des amplifications de gènes cibles (Miralles 2007), Morris et al. (2002) soulignaient que ces biais sont de moindre importance en milieu aquatique face à l'ensemble des biais associés aux différentes stratégies d'échantillonnage et d'analyse de données (Fromin et al. 2002; Blackwood et al. 2003).

Dans le cadre de ce travail de thèse, deux méthodes de typage moléculaire ont été utilisées, une avec l'étape de digestion enzymatique, la T-RFLP (« *Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism* », en anglais) et l'autre sans cette étape, la DGGE (« *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis* », en anglais) (Figure 50). Ces deux techniques sont les plus utilisées dans la littérature de ces 10 dernières années dans le domaine de l'écologie microbienne. Ces deux méthodes sont utilisées aussi bien pour des communautés procaryotes du sol (T-RFLP : Dunbar et al. 2000; DGGE : Enwall et Hallin 2009) ou en milieu aquatique avec les procaryotes (T-RFLP : Moss et al. 2006; Anderson-Glenna et al. 2008; Vercraene-Eairmal et al. 2010; DGGE : Massieux et al. 2004; Dorigo et al. 2008; Villeneuve et al. 2010) et les eucaryotes (DGGE : Villeneuve et al. 2010) (Figure 51).

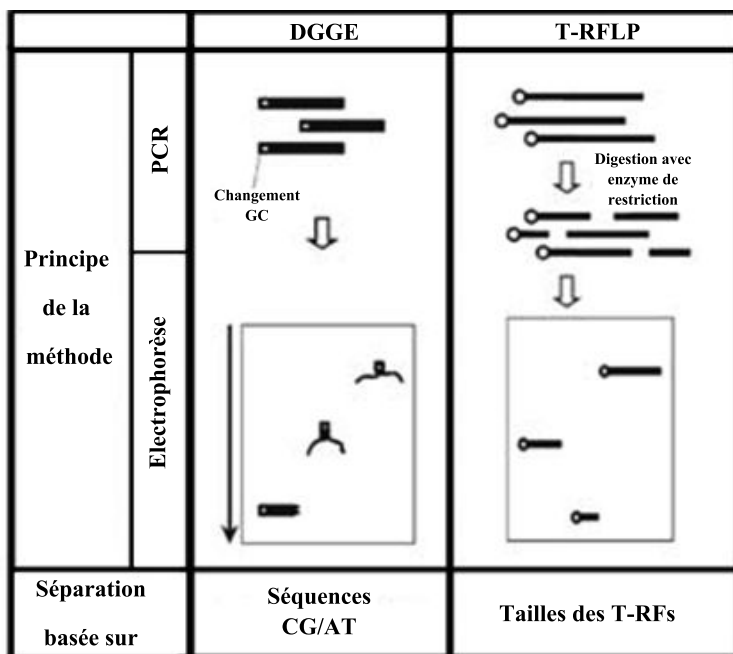


Figure 51 – Présentation et comparaison du déroulement de deux méthodes de typage moléculaire, la T-RFLP et la DGGE (d'après Okubo et Sugiyama 2009).

Il existe un débat important sur la question de la meilleure méthode de typage moléculaire (Gao et Tao 2011). De nombreux travaux comparent ces deux méthodes de T-RFLP et DGGE, que ce soit en milieu terrestre ou aquatique (par exemple : Spiegelman et al. 2005; Enwall et Halin 2008; Chen et al. 2010; Carballa et al. 2011). Comme décrit par Fechner (2010), pour l'ensemble de ces types de méthode, les étapes d'extraction d'ADNg et d'amplification par PCR apportent déjà des biais. L'ADN extrait ne peut pas être considéré comme



parfaitement représentatif de l'échantillon, de plus suivant la nature de l'échantillon, mais également suivant la technique utilisée, les rendements peuvent être différents (Lear et al. 2010). En parallèle de ces biais liés aux étapes d'extraction et d'amplification, chacune des méthodes présente des avantages et des inconvénients propres à chacune d'elle (Gao et Tao 2011). Parmi de nombreuses différences, nous pouvons citer :

- le coût : la DGGE globalement est une technique moins onéreuse, avec beaucoup moins d'étapes que la T-RFLP,
- d'un point de vue technique : la séparation des bandes sur le gel de polyacrylamide est très sensible aux conditions de l'électrophorèse ainsi que du choix des amorces (Okubo et Sugiyama 2009) et la comparaison gel-gel est très délicate (Marsh 1999 ; Moeseneder et al. 1999). De plus, la méthode de T-RFLP permet de comparer par gel ou « run » un nombre plus important d'échantillons. Pour la T-RFLP, la présence d'un standard taille interne à l'intérieur de chaque échantillon facilite la comparaison des échantillons entre eux (inter ou intra « run »).
- l'identification des micro-organismes : un des points forts de la DGGE réside dans la possibilité d'obtenir des informations taxonomiques par excision d'une bande d'un gel, sa ré-amplification, et son séquençage (exemple dans Lyautey et al. 2005b). La T-RFLP rend possible l'attribution phylogénétique à partir de la taille des T-RFs en utilisant des bases de données (Kent et al. 2003).
- la sensibilité : avec une technique comme la DGGE, la limite de détection pour une espèce est d'environ 1 % de la population totale, ce qui signifie qu'en-deça de cette limite, l'espèce ne peut pas être détectée ; avec la T-RFLP, le seuil de détection se situe entre 0,1 et 1 % (Luna et al. 2006). En effet malgré des séquences différentes, certains fragments peuvent migrer ensembles et être considérés comme des OTUs identiques, ce qui exclue la mise en évidence d'OTUs rares (Vallaey et al. 1997).

En comparant la résolution des deux méthodes, la plupart des études enregistraient des résolutions plus importantes pour la méthode de T-RFLP (par exemple Horz et al. 2001 ; Nunan et al. 2005) voir similaires entre elles (Moeseneder et al. 1999 ; Smalla et al. 2007). A l'inverse, une étude comparative entre la DGGE et la T-RFLP sur l'analyse des communautés dénitrifiantes, révélait une résolution légèrement plus importante pour la DGGE que pour la T-RFLP (Enwall et Hallin 2008) lorsque les analyses combinaient les résultats des 3 enzymes de restriction utilisées. Dans le cadre de ce travail, pour chaque échantillon, 3 enzymes de restrictions étaient testées, Hpa, HaeIII, et HinfI, les profils qui permettaient au mieux de discriminer les échantillons étaient conservés. L'augmentation du nombre d'enzymes de res-

triction peut augmenter la résolution (Moss et al. 2006) mais engendrer une augmentation du bruit de fond par la suite au cours des analyses statistiques.

Il est important de préciser qu'à travers l'utilisation de la T-RFLP ou de la DGGE, pour les amorces qui seront utilisées dans le cadre de ce travail, les deux méthodes sont susceptibles de cibler des OTUs ou T-RFs affiliés aux Cyanobactéries, ce qui mène à une surestimation de la diversité des bactéries non photosynthétiques (Cole et al. 2009 pour la T-RFLP, et Lyautey et al. 2005 pour la DGGE).

Plusieurs auteurs soulignaient que la méthode de T-RFLP est un outil pertinent et approprié à des communautés de niveaux faibles ou intermédiaires en termes de diversité, et la DGGE pouvait être une technique appropriée à des communautés plus complexes, hautement hétérogènes et riches en microorganismes (Engebretson et Moyer 2003; Okubo et Sugiyama 2009). Toute technique, quelle qu'elle soit, présentera toujours des avantages et des inconvénients, il est important d'en être conscient et de maîtriser au mieux les différentes sources d'erreur possibles et de bien comparer les échantillons qui ont subi les mêmes traitements (Schloss et al. 2003). Malgré ces inconvénients, ces techniques apportent de nombreuses informations et ont permis de révolutionner notre vision et notre compréhension de la biodiversité microbienne et l'influence de facteurs environnementaux, sur ces mêmes communautés aquatiques et terrestres (Yannarell et Triplette 2005; Loisel et al. 2006).

### III.3.5.1 Préparation des échantillons

Après centrifugation d'un aliquot compris entre 20 et 50 mg de MS de la suspension initiale du biofilm (Lyautey et al. 2005b) (12 000 *g* à 4°C pendant 20 min, Heraeus Multifuge), le culot a été stocké à -80°C jusqu'aux analyses.

### III.3.5.2 Extraction de l'ADN génomique total (ADNg)

Au cours de ces travaux, suivant les expériences, les ADN génomiques totaux n'ont pas été extraits par l'utilisation du même kit d'extraction. Trois kits d'extraction commerciaux ont été utilisés : le kit d'extraction Ultra Clean TM Soil DNA (MoBio Laboratories, Inc., Carlsbad, CA, USA), le kit d'extraction DNeasy Plant mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) et le kit Power Soil DNA (MoBio Laboratories, Inc., Carlsbad, CA, USA). Les extractions étaient réalisées en accord avec le protocole du fournisseur (Qiagen Laboratories, Mobio Laboratoire). Dans tous les cas à l'issue de l'extraction, l'intégrité et la concentration des ADN génomiques extraits ont été vérifiées et calculées soit par migration des échantillons sur un gel d'agarose 1 % (Sigma-Aldrich), pendant 25 min à 100 V, dans du tampon TAE 1X avec l'utilisation d'un marqueur de masse (Biorad) comme décrit par Lyautey et al. (2005), soit par

quantification avec marquage au SYBR Green (Sigma Aldrich) par fluorimétrie (Fluoroscan Ascent, Labssystem) en se référant à une courbe étalon, et enfin soit au nanodrop.

### III.3.5.3 Amplification par PCR

Pour chaque amplification, de l'ADN témoin (*Escherichia coli*) a été utilisé comme référence positive et de l'eau milli-Q stérile comme référence négative. Pour chaque échantillon, un rendement d'amplification est calculé.

#### III.3.5.3.1 La T-RFLP

Le gène ARNr 16S a été amplifié par PCR comme décrit ultérieurement par Bruneel et al. (2006) avec quelques modifications. Les amorces marquées FAM8F (5'-6-carboxy-fluorescein-phosphoramidite-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') (Eurogentec, 295 Liege, Belgium) (Lane 1991) et HEX 1489R (5'-hexa-chloro-fluorescein-phosphoramidite- TAC CTT GTT ACG ACT TCA-3') (Invitrogen, Carlsbad, USA) (Marchesi et al. 1998) sont décrites comme universelles des domaines bactériens. Le milieu réactionnel pour l'amplification était de 50  $\mu$ L contenant 30 ng d'ADN template, 25  $\mu$ L AmpliTaq Gold 360 Master Mix (Applied Biosystems) et 0,5  $\mu$ L de chaque amorce. L'étape d'amplification a été réalisée en utilisant un thermocycleur (Applied Biosystems) avec le programme suivant : 5 min hot start à 95°C, suivi par 35 cycles de dénaturation (45 s à 95°C), annealing (45 s à 55°C), une étape d'extension (1 min à 72°C), et une extension finale à 72°C pendant 10 min. Une fois amplifiée, les ADNg étaient purifiés par utilisation de kit commercial de purification GFX DNA (GE, Healthcare) en suivant le protocole du manuel d'utilisation. Le produit PCR purifié était récupéré dans 30  $\mu$ L d'eau ultra pure. Par une migration sur gel d'Agarose 1,0 % dans du tampon TBE et le gel visualisé avec une caméra CCD avec l'aide du marqueur de masse Smartladder (200-10000 pb)(Eurogentec), la quantité et l'intégrité des produits PCR ont été analysées. Une quantité de 100 ng a été digérée avec les enzymes de restriction, HaeIII, HinfI ou Hpa (New England Biolabs, Promega) suivant les expériences à 37°C pendant 3 h. Des premiers tests sont effectués pour le choix des enzymes de restriction, l'enzyme choisie est celle qui permet au mieux de discriminer les échantillons, celle qui apporte le plus de polymorphisme. Les produits digérés seront passés au séquenceur après une étape à 95°C pour séparer les deux doubles brins d'ADN.

#### III.3.5.3.2 La DGGE

L'ADN extrait a été quantifié par comparaison à un marqueur de masse (10  $\mu$ L / puits ; Fermentas, réf. : SM1263) après électrophorèse sur gel d'agarose 1 % contenant du bromure

d'éthidium à  $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (Sigma Aldrich, réf. E1510). Les bandes ont été révélées par UV transillumination, puis une image a été capturée avec une caméra CCD et le logiciel BIOCAPT (Vilbert Lourmat). Une courbe étalon a été réalisée à chaque quantification sur l'intensité relative des bandes du marqueur par le logiciel d'analyse d'imagerie Bio1D (Vilbert Lourmat). Une quantité définie de l'ADN extrait (30 ou 50 ng suivant les expériences) a été utilisée pour la PCR d'après le protocole de Lyautey et al. (2003). La région variable V3-V5 (500 pb), universelle au domaine bacteria, de l'ADNr 16S a été amplifiée en utilisant les amorces 341-F (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3') et 907F (5'-CCGTCAATTCMTTGTGAGTTT-3') (Proligos). L'amorce 341-F possède un clamp G-C de 40 nucléotides à l'extrémité 5' dans le but d'améliorer la résolution de la séparation des fragments sur DGGE (Muyzer et Smalla 1998). L'amplification a été réalisée avec le Mastercycler (Eppendorf) sur un volume final de  $50 \mu\text{L}$  contenant 1x de tampon de réaction, 2,5 mM de  $\text{MgCl}_2$  (Promega, réf. : M8301),  $0,3 \text{ mg.mL}^{-1}$  d'albumine sérique bovine,  $0,48 \mu\text{M}$  de chaque amorce,  $200 \mu\text{M}$  de désoxy-nucléotides tri-phosphate et 2,5 U de Taq polymérase (Promega, réf. : M8301). Chaque PCR a été conduite avec un témoin positif (*Escherichia Coli*,  $1 \text{ ng.L}^{-1}$ ) et négatif (eau milliQ). La concentration d'ADN amplifié a été déterminée suivant la méthode décrite précédemment après migration sur gel d'agarose 1,65 %. La DGGE a été réalisée verticalement en utilisant le D-Code Universal Mutation Detection System (BioRad). Une quantité de 500 ng de l'ADN amplifié a servi à la séparation sur gel contenant un gradient de 30 à 70 % de dénaturant (où 100 % de dénaturant correspond à 7 M d'urée et 40 mL de formamide déionisée). La migration a été effectuée durant 18 h à 100 V et à  $60^\circ\text{C}$ . Après l'électrophorèse, le gel a été marqué avec du SYBR Green I (Sigma Aldrich, dilution 1 : 20 000) puis visualisé selon la méthode décrite précédemment. Dans le but d'éviter les biais induits par la variabilité méthodologique des gels, les DGGE (20 échantillons / gel) ont été lancées avec des échantillons communs servant de référence et permettant la comparaison des profils obtenus depuis les trois différents gels. La présence ou absence d'une bande (définie comme une unité taxonomique opérationnelle OTU) pour chaque échantillon, à une distance de migration donnée, a été marquée dans une matrice par 1 ou 0, respectivement.

#### III.3.5.4 Exploitation et interprétation des profils

L'exploitation des profils consiste à évaluer le nombre de bandes ou de pics, leur intensité relative ainsi que l'absence ou la présence des pics. Les résultats de la migration par capillarité (la T-RFLP) sont exploités dans un premier temps par l'intermédiaire d'un logiciel, GeneScan, ce qui permet d'obtenir un électrogramme en convertissant le temps de migration associé à chaque fragment de restriction ou pic de fluorescence (également appelé T-RFs) en nombre

de paire de bases, par l'intermédiaire d'un marqueur de taille standard qui a co-migré avec les échantillons (GeneScan-500 TAMRA Size Standard, Applied Biosystems) (**Figure 52a**). Chaque électrogramme ou profil est associé à une communauté. Par la suite, il est nécessaire d'aligner les profils via l'utilisation du logiciel T-Align avec un intervalle de confiance de 0,5 comme décrit par Smith et al. (2005). A l'issue de cette alignement, des matrices d'abondance ou de présence / absence de T-RFs sont engendrées. Le type de matrice pour la suite de l'analyse est choisi pour sa capacité à discriminer le plus les échantillons et à présenter des réplicats les plus homogènes possibles. Dans tous les cas, les T-RFs qui présentent une différence de taille  $< 0,5$  paire de bases sont considérés comme identiques. Le choix du seuil est basé en accord avec la méthode décrite par Osborne et al. (2006), réalisée sur chaque matrice exploitée.

Pour la DGGE les profils obtenus sont sous la forme de bandes sur gel (= OTUs) (**Figure 52b**). Deux stratégies ont été utilisées pour l'exploitation des gels. Dans le cas où la comparaison de plusieurs gels n'est pas nécessaire, l'analyse du gel s'est faite sans logiciel et dans le cas où la comparaison de plusieurs gels était nécessaire, dû au nombre important d'échantillons, l'analyse se faisait via le logiciel BioNumerics 5.1 (Applied Maths, Saint-Martens-Latem, Belgium) par l'intermédiaire de marqueurs externes et internes facilitant la comparaison inter et intra gel.

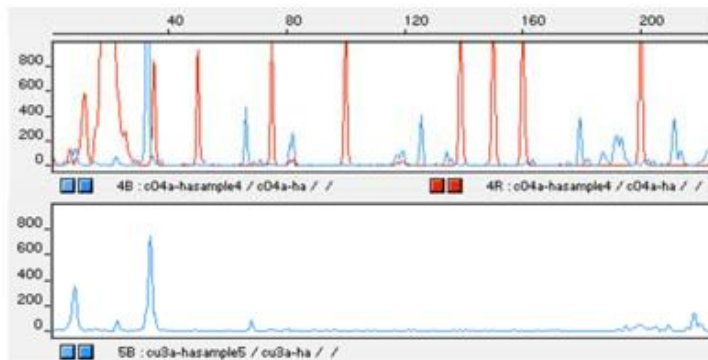
Une matrice de présence / absence des bandes est mise en place pour la suite de l'exploitation des profils. Les techniques de biologie moléculaire permettent d'obtenir des profils génétiques caractéristiques de chaque communauté. L'objectif consiste à comparer l'ensemble de ces profils correspondant à une communauté pour évaluer la dynamique et l'effet d'un facteur environnant. L'exploitation des profils consiste à évaluer le nombre de bandes ou de pics, leur intensité relative ainsi que l'absence ou la présence des pics. A l'issue de cette migration, nous obtenons des courbes qui présentent l'évolution de l'intensité de fluorescence en fonction du temps et du nombre de base, chaque pic = T-RF = un groupe de fragment de même longueur. Cette technique semble plus sensible (Dahllof 2002), avec possibilité de détecter des espèces rares.

L'analyse des profils T-RFLPs (**Figure 52a**) nécessite au préalable l'alignement des T-RFs réalisé avec le logiciel en ligne T-Align (Smith et al. 2005), après une mise en forme particulière demandée par le programmeur. La valeur de l'intervalle de confiance pour l'alignement avec T-Align était fixée à 0,5. Plusieurs essais sont réalisés et l'alignement conservé est celui qui donne un résultat le plus proche de l'observation des profils.

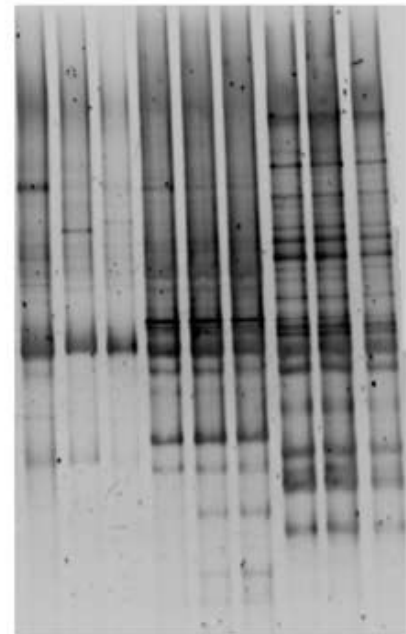
Pour l'interprétation de résultats obtenus via des méthodes de typage moléculaire telles que la DGGE et la T-RFLP, plusieurs stratégies peuvent être utilisées (Portillo et Gonza-

lez 2008) : l'utilisation d'indices de similarité ou de diversité (exemple Shannon, Simpson) et l'utilisation d'analyses multivariées (Ramette 2007). Ces techniques de typage moléculaire permettent, contrairement à celle du clonage / séquençage, de comparer rapidement des échantillons entre eux et de détecter tout changement des communautés soit au cours du temps (par exemple Araya et al. 2003), soit sous un traitement ou des conditions environnementales différentes (Duineveld et al. 1998; McCaig et al. 2001; Portillo et Gonzalez 2008).

A



B



**Figure 52** – Exemple de profils obtenus à partir de la T-RFLP (A) et de la DGGE (B). En bleu un échantillon = un ensemble de pic = un profil = une communauté, et en rouge le standard interne (TAMRA 500). En abscisse = taille des pics, et en ordonnées = fluorescence des pics = des T-RFs. Une bande = un OTU, une piste sur le gel correspond à une communauté.

### III.3.6 Descripteurs fonctionnels

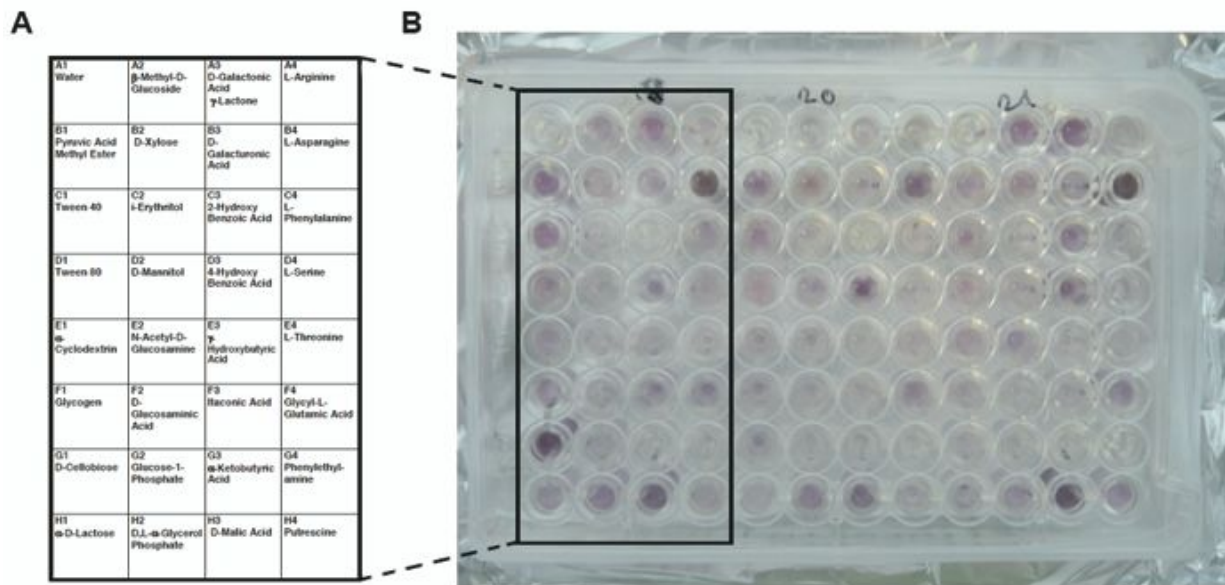
#### III.3.6.1 Etat physiologique du biofilm

L'analyse des profils physiologiques à des niveaux des communautés ("*Community level Physiological Profil*", CLLP, en anglais) a été effectuée avec l'aide de microplaques commerciales BIOLOG EcoPlate de 96 puits (Biolog, Inc., Hayward, CA). Cette technique est bien connue pour permettre la différenciation de communautés suivant les effets d'un facteur environnemental (sol ou aquatique, Lawrence et Neu 2003) ou d'un habitat différent (Garland et Mills 1991), d'évaluer la dynamique de la communauté au niveau du sol ou au niveau aquatique, et de fournir des indications sur la diversité fonctionnelle et l'état

physiologique de la communauté (Konopka et al. 1998). Comme toute méthode, elle présente des inconvénients déjà cités dans un certain nombre d'articles (par exemple Konopka et al. 1998 ; Preston-Mafham 2002) : la sélection des micro-organismes cultivables et capables de se développer sur des milieux de culture riches, la présence souvent d'une forte hétérogénéité. . . Sur chaque microplaque, 31 sources de carbones et un blanc contenant de l'eau milli-Q stérile sont testées simultanément en triplicat. (**Figure 53A**). Chaque puits contient également le tétrazolium qui, lorsqu'il est réduit en formazan par la respiration bactérienne, forme une coloration violette (**Figure 53B**). Chaque puits est inoculé avec 100  $\mu\text{L}$  de la suspension initiale de biofilm phototrophe, préalablement filtrée (sur membrane en polycarbonate, 0,3  $\mu\text{m}$  de seuil de coupure, GS 25 mm, Whatman©) ou non suivant l'expérience considérée. Les microplaques ont été incubées à 20°C à l'obscurité durant 7 jours. La densité optique (DO) de cette coloration a été mesurée toutes les 24 h à 590 nm par un lecteur de microplaque et soustrait à celle du blanc (Spectro Max plus 384, Molecular Device, ou Metertech) (Garland et Mills 1991 ; Leflaive et al. 2005). Suivant l'expérience considérée, l'analyse se faisait soit sur les données non normalisées, c'est à dire, les données d'absorbances, auxquelles l'on soustrait la DO du blanc (qualifiées d'absorbances nettes) soit sur les données normalisées par la division des données d'absorbances nettes par les AWCD ("*Average Well Color Development*", la moyenne de l'ensemble des absorbances nettes de l'ensemble des puits). Pour certaines expériences, les différents substrats ont ensuite été regroupés pour l'analyse en 7 grandes fonctions (guildes de substrats) : ester (méthylpyruvate), polymères (tween 40, tween 80,  $\alpha$ -cyclodextrine, glycogène), carbohydrates (D-cellobiose,  $\alpha$ -D-lactose,  $\beta$ -D-méthylglucoside, D-xylose, i-erythritol, D-mannitol, N-Acétyl-D-glucosamine), produits chimiques phosphorylés (glucose-1-phosphate, D, L- $\alpha$ -glycérolphosphate), acides carboxyliques (acide D-glucosaminique, acide D-galactonic  $\gamma$ -lactone, D-acide galacturonique, acide 2-hydroxybenzoïque, acide 4-hydroxybenzoïque, acide  $\gamma$ -hydroxy-butérique, acide itaconic, acide  $\alpha$ -ketobutyrique, acide D-malique), amino acides (L-arginine, L-asparagine, L-phénylalanine, L-sérine, L-thréonine, acide glycyl-L-glutamic) et amines (phényléthyl-amine, putrescine).

### III.3.6.2 Productions bactériennes

Il existe plusieurs méthodes pour analyser la production bactérienne. Soit l'analyse est basée sur la mesure de la fréquence de division cellulaire, sur la détermination du taux de synthèse de l'ADN bactérien par incorporation de thymidine tritiée, soit sur la détermination du taux de synthèse protéique, dans ce cas c'est l'incorporation de la leucine tritiée qui est réalisée (Pesce 2006). Les deux premières techniques permettent d'obtenir une estimation du



**Figure 53** – Détail du positionnement des 31 sources de carbone (A). Photographie (A. Lamy) d'une microplaque Ecoplate à l'issue de 96 h d'incubation (B). Les puits colorés en violet illustrent une consommation de la source de carbone présente dans le puits.

taux de division bactérienne alors que la troisième mesure un accroissement de la biomasse bactérienne. Dans le cadre de cette étude, la méthode choisie pour évaluer la production bactérienne a été l'incorporation de la thymidine radioactive suivant le protocole de Robarts et Wicks (1989) réalisé par V. Tumber d'Environment Canada. Tous les contrôles se voyaient ajouter une concentration finale en formaldéhyde à 0,4 % pour tuer l'ensemble des bactéries. Un morceau du support artificiel (5 cm) où s'est développé le biofilm avec 4 morceaux de supports par conditions traitées, ce qui correspond à 3 réplicats et un contrôle.

### III.3.6.3 Mesure de l'activité enzymatique de la GST

Après centrifugation d'un aliquot de la suspension initiale du biofilm de volume variable suivant la quantité de MS de l'échantillon (12 000 g à 4°C pendant 20 mn, Heraeus Multifuge), le culot a été stocké à -20°C jusqu'aux analyses. Les mesures de l'activité enzymatique de la Glutathione S-transférase (GST), réalisées par A. Lamy à EcoLab, se déroulaient en deux étapes : une extraction et un dosage de l'ensemble des protéines de chaque échantillon suivant le protocole de Bonnineau et al. (2010), suivie par la mesure de l'activité de la Glutathione S-transférase réalisé via le kit Glutathion S-Transférase Fluorescent Activity Kit (Assay Design, Stressgen) en accord avec le protocole du fournisseur.



# Analyses statistiques des données

---

## IV.1 Les analyses univariées

Les comparaisons de l'ensemble des données physico-chimiques, des descripteurs de biomasse, des densités optiques (DO), des abondances des diatomées, des valeurs de productions bactériennes, et le nombre d'OTUS ou de T-RFs se sont faites par l'utilisation des tests de Man Whitney, de Kriskall Wallis, ou d'ANOVA suivant la normalité (paramétrique ou non paramétrique), le nombre d'échantillons et leurs appariements (données appariées ou non appariées). Les analyses statistiques concernant les données non paramétriques étaient réalisées à partir du logiciel SPSS 15.0 pour Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Les analyses statistiques à partir des données paramétriques étaient réalisées avec le logiciel Mini Tab (State College, PA).

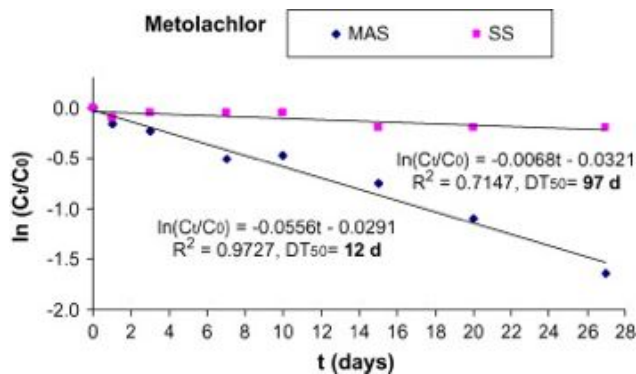
## IV.2 Le calcul du temps de demi-vie de l'alachlore durant les expériences en microcosmes

La demi-vie représente le temps pour lequel la concentration initiale d'un composé diminue de moitié. Lorsque la courbe de disparition du polluant suit une diminution de type exponentielle décroissante au cours du temps, alors un modèle de réaction de premier ordre est utilisé pour estimer sa vitesse de disparition et sa demi-vie, la démarche étant décrite par Stasinakis et al. (2009). Une réaction de premier ordre est décrite comme :

$$\ln\left(\frac{C_t}{C_0}\right) = -k \times t$$

avec  $C_t$  qui représente la concentration résiduelle d'alachlore au temps d'incubation  $t$ ,  $C_0$  représente la concentration initiale d'alachlore, et  $k$  ( $\text{j}^{-1}$ ) est le coefficient de disparition. La demi-vie de l'alachlore est calculée comme le rapport de  $\ln(2)$  sur le coefficient de disparition  $k$ . La régression linéaire faite à partir de ce modèle permettait de déterminer le coefficient de disparition correspondant au coefficient de corrélation et de calculer les demi-vies de

l'alachlore (**Figure 54**). La même démarche est appliquée aux courbes exponentielles, dans ce cas là croissantes, d'apparition des deux produits de dégradation de l'alachlore dosés ici.



**Figure 54** – Exemple d'une représentation graphique de  $\ln(C_t/C_0)$  en fonction du temps du métochlorure pour MAS (microbiologiquement active soil) et SS (sterilized soil).  $DT_{50}$  (en jour) correspond à la demi-vie du métochlorure calculée pour les deux traitements (extrait de Caracciolo et al. 2005).

### IV.3 Les analyses multivariées

Dans le cadre de cette thèse, 3 analyses multivariées ont été utilisées en fonction des propriétés et de la nature des données, (i) l'ACP, une analyse en composante principale (exemple, Lawrence et al. 2009; Vercaene-Eairmal et al. 2010), (ii) le NMDS (« *Non-metric Multidimensional Scaling* »), c'est une représentation en 2 dimensions des distances de similarités entre les échantillons, où les différences de structure des communautés peuvent être interprétées comme des distances. Plus les points sont proches en terme de structure, plus leurs distances seront petites sur la représentation. Les échantillons les plus proches sur la représentation graphique sont les échantillons les plus proches en termes de structure (en utilisant une valeur de stress inférieure à 0,1) (Araya et al. 2003) et la représentation en cluster (exemple, Duong et al. 2010). Les analyses multivariées ont été conduites sur :

i) les matrices binaires (présence / absence), ou d'abondances des profils des OTUs et T-RFs, après une transformation des données en matrice de similarité, soit à partir de l'indice de Jaccard ( $J = c/(a+b+c)$ ) où  $a$  est le nombre de bandes trouvées seulement dans l'échantillon A,  $b$  est le nombre de bandes trouvées seulement dans l'échantillon B, et  $c$  le nombre de bandes partagées entre les échantillons A et B), soit à partir de l'indice de Bray Curtis.

(ii) les matrices d'abondances comme décrit par Leflaive et al. (2005) sur les valeurs de  $\pi$  est défini comme la somme des densités optiques de chaque guildes multiplié par un facteur de correction et subdivisé par la somme de tous les guildes. Auparavant les densités optiques des substrats étaient regroupées par guildes suivant leur structure chimique (Choi et Dodds 1999) : polymères, carbohydrates, acides carboxyliques, acides aminées, amines et composés phénoliques.

Pour certaines matrices d'abondances, notamment quand les données présentent de fortes variations d'un échantillon à l'autre avant la réalisation d'une analyse multivariée, les données subissaient une transformation, afin de les normaliser, par la transformation log avec le logiciel Primer v6 (PrimerE, Ltd, Luton, United Kingdom).

Après chaque analyse multivariée, un test de similarité était analysé, l'ANOSIM, cette analyse teste la proximité ou la similarité entre les groupes ou traitements. Cette similarité est calculée à travers le chiffre R noté R-global. Cette valeur se définit comme le rapport de (moyenne des distances de rang entre groupes - moyenne des distances de rang intra-groupes) / (le nombre de rang / 2). La valeur de R est considérée comme statistiquement « utilisable » au seuil de  $p < 0,05$ . Si  $R\text{-ANOSIM} > 0,75$  les groupes sont bien séparés ;  $0,5 < R\text{-ANOSIM} < 0,75$  les groupes sont considérés comme séparés mais légèrement chevauchant ;  $0,25 < R\text{-ANOSIM} < 0,5$  séparés mais fortement chevauchant ;  $R\text{-global} < 0,25$  groupes non séparés. Les ANOSIM ont été réalisés soit avec le logiciel PAST 2.06 (Hammer et al. 2001), soit Primer v6 (PrimerE, Ltd, Luton, United Kingdom).

## Partie III

### Etudes expérimentales

# Biodégradation d'un herbicide par des communautés bactériennes de biofilms phototrophes : approche expérimentale en microcosme

---

ou l'exemple de l'étude d'une relation structure des communautés – fonction d'intérêt écologique.

Questions :

- Le processus de biodégradation assuré par différentes communautés microbiennes naturelles permet-il de prédire la chimiodynamique environnementale d'un herbicide tel que l'alachlore ?
- La  $\beta$ -diversité de communautés microbiennes naturelles peut-elle expliquer les différences de potentiel de biodégradation de l'alachlore ?

*Ce chapitre présente l'analyse de la capacité de biodégradation d'un herbicide en microcosmes, l'alachlore, par 3 communautés microbiennes issues d'habitats différents. Deux des 3 communautés consistent en des communautés de biofilms phototrophes provenant soit d'un ruisseau soit d'un fleuve, produits sur des supports artificiels ou naturels. La troisième communauté provient d'un échantillon de boues activées de station d'épuration urbaine. Ce chapitre fait l'objet de la préparation d'un article pour une soumission à la revue Chemosphere (**Article 1**).*

Résumé du projet d'article intitulé « **Fate of the herbicide alachlor exposed to different microbial consortia in aquatic systems** » par **A. Paule, A. Biaz, J.R. Lawrence, H. Preud'homme, B. Lauga, E. Paul et J-L. Rols. (Article 1)**

## I.1 Contexte de l'étude

Pour les eaux de surface, la notion de préservation des processus fonctionnels fondamentaux est au cœur du concept d'état écologique. Dans les cours d'eau, par exemple, ces processus assurent en grande partie la réversibilité des perturbations naturelles (crues, étiages, . . .) et anthropiques (aménagements hydrauliques, pollutions ponctuelles ou diffuses, . . .). Ce suivi conduit au devoir d'identification des sources de pollution, leur persistance et leur effet sur la structure et le fonctionnement des écosystèmes. Une grande partie des polluants organiques retrouvés dans les écosystèmes aquatiques sont des pesticides (Kreuger 1998).

Parmi les nombreux mécanismes de transformation tels que l'adsorption, la volatilisation, l'hydrolyse, et la photodégradation (par exemple : Chesters et al. 1989 ; Stamper et Tuovinen 1998 ; Katagi 2010) la transformation microbienne est souvent considérée comme le mécanisme prépondérant (Calvet et al. 2005). Prenons l'exemple de diuron, un herbicide de la famille des Phényl-urées, sa biodégradation a été démontrée au sein d'habitats contrastés (cours d'eau, sols, sédiments, . . .) Il est à noter que d'un point de vue qualitatif, des agrégats microbiens de diversité variée et résultant de conditions environnementales différentes et subies, expriment finalement une même fonction d'intérêt écologique, ici la biodégradation d'un pesticide.

Les communautés microbiennes résultent de processus complexes basés sur des successions écologiques dont la trajectoire globale est fortement associée à la typologie de l'habitat et aux facteurs environnementaux. Il est intéressant de se questionner sur les processus et les conditions selon lesquels ces communautés bactériennes, si différentes, peuvent se comporter de la même manière face à un polluant, alors que ce potentiel de biodégradation peut temporellement évoluer au sein d'un même habitat. Comme Cavigelli et Robertson (2000) lors de leur étude sur la fonction de dénitrification réalisée par des communautés bactériennes de différents sols, il est important de se demander si « la régulation du fonctionnement des écosystèmes est influencée par les micro-organismes et si le fonctionnement des écosystèmes reflète la composition des communautés et des groupes fonctionnels ». Dans ce travail, les biofilms phototrophes sont utilisés comme modèle d'étude pour plusieurs raisons comme citées préalablement (**cf. partie I Synthèse bibliographique**) :

- dans les cours d'eau, les biofilms phototrophes sont le siège de réactions de transformation des cycles biogéochimiques (production primaire, minéralisation. . .). A ce titre, ils en constituent un compartiment fonctionnel clef (Sabater et al. 2007) ;
- ces agrégats sont les premiers à interagir avec les pesticides qui peuvent endommager une partie de la communauté microbienne et modifier le fonctionnement global de l'écosystème aquatique ;

Parallèlement à l'utilisation du modèle « biofilm phototrophe », des communautés microbiennes de boues activées provenant d'une station d'épuration urbaine sont également utilisées dans le cadre de cette étude. Les boues activées sont des biomasses épuratrices floculées, particulièrement efficaces, notamment pour la dégradation des pesticides (Forney et al. 2001 ; Stasinakis et al. 2009). Elles constituent ici un cadre de référence de par leur potentiel de biodégradation.

## I.2 Approche expérimentale

Afin d'évaluer la pertinence de l'origine des communautés bactériennes et de leur composition pour une fonction d'intérêt écologique, nous avons exposé un herbicide, l'alachlore, dans des conditions opératoires identiques à des biomasses de trois communautés microbiennes résultant d'habitats différents. Ces communautés sont issues pour deux d'entre elles de biofilms phototrophes et la troisième de boues activées de station d'épuration urbaine. Les biofilms sont produits *in situ*, soit sur substrat naturel (des galets) récolté dans le fleuve La Garonne (nommé site **G**, cf. **partie II Matériel et méthodes**), soit sur substrat artificiel (des lames de verre) récolté après une phase d'incubation de 4 semaines dans le ruisseau Le Montoussé (nommé site **M**, cf. **partie II Matériel et méthodes**). Les communautés du site **G** sont considérées comme « naturelles », dont l'histoire n'est pas connue (âge du biofilm) et les communautés du site **M** sont considérées comme « sélectionnées » de par le choix du support incubé. Les flocs de boues activées sont collectés au niveau du bassin d'aération fonctionnant à forte charge massique appliquée de la station d'épuration Ginestous traitant les eaux usées de Toulouse (nommée site **W**, cf. **partie II Matériel et méthodes**). Elles sont mises à décanter 30 minutes dans une éprouvette et le surnageant est utilisé pour ensemencher les microcosmes. La molécule modèle choisie est l'alachlore, qui présente certains avantages dans le cadre de ce travail (**Partie I Synthèse bibliographique**). C'est une molécule relativement soluble dans l'eau (solubilité = 170,3 mg.L<sup>-1</sup> à 20°C, pH 7, Tomlin 1995) et dont la principale voie de transformation est microbienne (Graham et al. 2000b). L'alachlore s'adsorbe très peu (coefficient de partage log Kow = 3,09, Laabs et al. 2007) et a été détecté dans les

eaux de surfaces de nombreux pays du monde (par exemple, Battaglin et al. 2000 ; Osano et al. 2003 ; Navarro et al. 2010). Les 3 agrégats échantillonnés sont caractérisés à travers leur structure microbienne (par PCR-DGGE), leur quantité de matière sèche sans cendre (MSSC), et leur capacité à dégrader différentes sources de carbones (Biolog) (**cf. partie II Matériel et méthodes**). Ces agrégats sont mis en suspension et incubés pendant 10 jours dans de petits microcosmes (**cf. partie II Matériel et méthodes**), à l'obscurité, sous agitation, en présence d'alachlore à deux concentrations différentes, 1 et 20  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (détails de l'étude, **cf. partie II Matériel et méthodes**). La cinétique de disparition de l'alachlore ainsi que les cinétiques d'apparition des deux principaux métabolites (*Oxanilic acide*, OA et *Ethane Sulfonic Acid*, ESA) de biodégradation de l'alachlore (Thurman et al. 1996) sont réalisées, en phase aqueuse avec un échantillonnage à 1, 3 et 10 jours d'incubation (**cf. partie II Matériel et méthodes** pour l'analyse). A l'heure actuelle, seule une partie des échantillons a pu être analysée pour le dosage d'OA et d'ESA. Les analyses des autres échantillons sont en cours.

### I.3 Principaux résultats et discussion

Les biofilms phototrophes échantillonnés dans le site **M** présentent des niveaux de MSSC plus faibles ( $0,19 \text{ mg.cm}^{-2}$ ) que les biofilms échantillonnés dans le site **G** ( $0,97 \text{ mg.cm}^{-2}$ ). Le surnageant des boues activées (après décantation 30 min) présente des valeurs de MSSC de l'ordre de  $8,3 \text{ mg.L}^{-1}$ . Les trois communautés se distinguent par leur structure, leur diversité (valeurs moyennes 23, 36 et 32 OTUs pour les sites **G**, **M** et **W** respectivement), les types de substrats utilisés comme source de carbone, et le nombre d'espèces qui compose leurs communautés de diatomées (37 pour le site **G** et 10 pour le site **M**). Les faibles valeurs de MSSC et de la diversité des diatomées observées au sein des biofilms collectés dans le site **M** peuvent s'expliquer par :

- une adhésion limitée des espèces de diatomées due à l'utilisation de supports artificiels (Cattaneo et Amireault 1992 ; Lane et al. 2003). Cattaneo et Amireault (1992) précisent que les substrats artificiels supportent des biomasses nettement plus faibles que les substrats naturels, et surtout pour des périodes de colonisation courtes ( $< 60$  jours) ;
- une disponibilité moindre des nutriments (Dodds et al. 1997) ;
- les conditions hydrodynamiques bien connues pour contrôler la composition des espèces algales (Biggs et Stokseth 1996).

Pour l'ensemble des microcosmes « contrôle » (en absence de biomasse microbienne, exposition à l'alachlore à 1 et 20  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ), les concentrations en alachlore restent constantes



pendant la période d'incubation, preuve d'une absence de volatilisation, d'hydrolyse ou d'adsorption sur les parois des microcosmes. De plus, quelles que soient les concentrations initiales en alachlore et les types d'agrégats microbiens considérés, nous observons une disparition de la molécule au cours du temps plus ou moins rapide. Pour les sites **W** et **M**, le temps de demi-vie de l'alachlore est du même ordre de grandeur en moyenne de 16,3 à 30,8 jours, quelles que soient les concentrations initiales considérées. Les microcosmes avec les biomasses du site **G** présentent des taux de dissipation de la molécule les plus forts aux deux concentrations testées, avec des valeurs de temps de demi-vie de 3,9 et 8 jours. Les seuls mécanismes susceptibles d'être à l'origine de cette disparition sont l'adsorption sur la biomasse et / ou la transformation par voie microbienne. Plusieurs éléments laissent supposer à une prédominance de la biodégradation :

- le taux de disparition de l'alachlore est continu au cours du temps alors que l'adsorption est un phénomène souvent instantané ;
- les temps de demi-vie enregistrés pour les 3 communautés bactériennes se situent dans les rangs de valeurs données dans la littérature en présence de biodégradation (par exemple, Graham et al. 1999, 2000b ; Ensz et al. 2003 ; Knapp et al. 2003 ; Daam et al. 2009) ;
- il n'est pas observé de phénomène de relargage pourtant souvent présent après une adsorption (mort des cellules) ;
- il est détecté une apparition et augmentation au cours de l'incubation des deux métabolites de dégradation de l'alachlore : ESA et OA, comme montré par les résultats complémentaires partiels dans le paragraphe suivant.

Il a été montré que les biofilms phototrophes pouvaient jouer un rôle dans l'adsorption et l'accumulation des polluants, incluant les métaux (Duong et al. 2010), et les pesticides (Headley et al. 1998 ; Lawrence et al. 2001 ; Bohuss et al. 2005 ; Tlili et al. 2008). Ces études montrent qu'il existe une grande quantité de liaisons des métaux soit au sein de la matrice formée par les EPS, soit à la surface des cellules, soit au niveau des particules organiques piégées par le biofilm (Hill et al. 2000). L'influence du stade de maturation des biofilms sur les quantités de métaux accumulés a également été étudié (Duong et al. 2010). L'accumulation des métaux s'est avérée se dérouler en deux temps, une première phase de sorption rapide, processus qualifié de « *biosorptive* », suivie par une phase active plus lente (Hill et al. 2000).

Les structures algales et bactériennes étant différentes entre les différentes communautés testées, nous pouvons supposer que la nature des exopolymères (EPS) l'est également. Même si les communautés, en suspension, ne présentent plus de structures tridimensionnelles, des changements dans la composition des EPS sont susceptibles d'induire des changements dans

les sites de liaisons et présentent alors des capacités d'adsorption et d'accès du polluant aux cellules différentes.

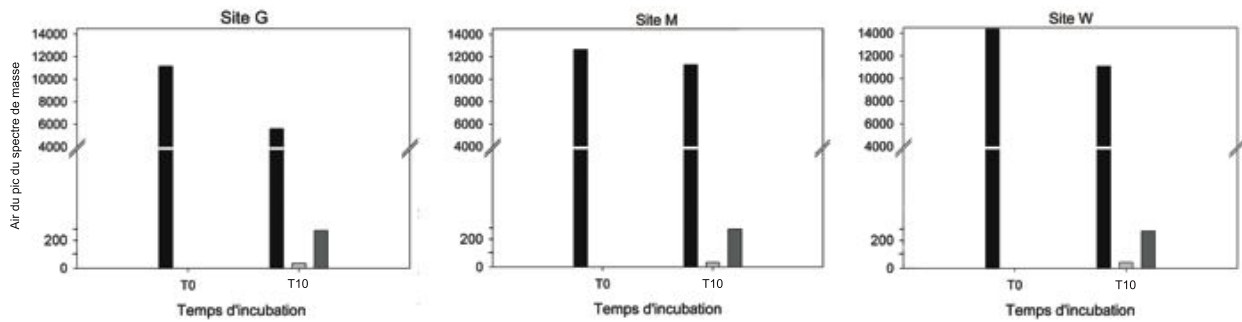
## I.4 Résultats complémentaires à l'article 1

Afin de vérifier l'hypothèse de transformation de l'alachlore par voie microbienne, deux métabolites OA et ESA bien connus pour être des produits de biodégradation en milieu terrestre (Thurman et al. 1996) et aquatique (Graham et al. 2000b) sont recherchés dans les échantillons d'eau des microcosmes. Les résultats présentés ici sont préliminaires, les « quantités » de chaque molécule ne sont pour le moment pas exprimées en concentration mais en aire de chaque pic sur les spectres de masse des échantillons. A ce jour, seul un réplicat sur trois a été analysé, les réplicats restants sont en cours d'analyses.

D'après la **Figure 55**, en début d'expérience, les échantillons d'eau ne contiennent aucune trace de OA et ESA pour les seuils de détection fournis par cette méthode, quel que soit le site d'étude. A l'issue des 10 jours d'incubation, les eaux des microcosmes contiennent des teneurs résiduelles en alachlore qui ont subi une diminution de 50, 11 et 23 % pour les sites **G**, **M** et **W**, respectivement. Malgré un protocole de dosage de l'alachlore différent par rapport aux dosages réalisés par le LDE (**Figure 3 de l'article 1**), les tendances sont similaires. L'alachlore présente des valeurs de temps de demi-vie les plus faibles en présence de la biomasse collectée au site **G**. Malgré des comportements différents d'un site à l'autre, les concentrations résiduelles en OA et ESA semblent identiques d'une biomasse à l'autre, avec une présence plus importante du métabolite ESA. Cette observation n'est pas cohérente avec les résultats de Graham et al. (1999 et 2000b) qui soulignaient une dominance du métabolite OA par rapport au métabolite ESA et cela, quelles que soient les teneurs en oxygène dissous de la colonne d'eau dans leurs microcosmes. Cette différence peut s'expliquer tout simplement par des seuils de détection très différents entre les deux métabolites (9  $\text{pg.g}^{-1}$  pour ESA et 20  $\text{pg.g}^{-1}$  pour OA).

Malgré des concentrations résiduelles proches en OA et ESA pour les biomasses des 3 sites, les concentrations résiduelles d'alachlore sont beaucoup plus faibles pour la biomasse du site **G** que pour les biomasses provenant des sites **M** et **W**. Cette différence peut venir soit :

- d'une plus grande quantité d'alachlore adsorbée par les matières en suspension (débris d'algues et de sédiments). L'absence de relarguage montre que le mécanisme serait irréversible, et ce malgré les conditions d'obscurité maintenues tout au long de l'incubation qui auraient pu être à l'origine de la mort très rapide des algues et par conséquent d'une



**Figure 55** – Aires de chaque pic (un composé) correspondant à l'alachlore, l'ESA, l'OA sur les spectres de masse des échantillons en début (T0) et fin d'incubation (T final) pour les sites **G**, **M** et **W** et une concentration initiale enalachlore de  $20 \mu\text{g.L}^{-1}$ . Les seuils de détection sont de :  $4 \text{ pg g}^{-1}$  pour l'alachlore,  $9 \text{ pg.g}^{-1}$  pour ESA et  $20 \text{ pg.g}^{-1}$  pour OA

désorption de l'alachlore. Vu les valeurs de temps demi-vie de l'alachlore en contact avec la biomasse du site **G**, les mécanismes d'adsorption ne se sont pas produit instantanément en début d'expérience ;

- d'une biodégradation ou adsorption des deux métabolites OA et ESA. Souvent les métabolites présentent des propriétés plus hydrophiles que les molécules parentes, ce qui rend les produits de dégradation plus solubles et moins susceptibles d'être adsorbés. Cette propriété est une des causes de leur occurrence au sein des eaux de surface presque plus importante que celles des composés parents (Thurman et al. 1996).

## I.5 Conclusion et perspectives

A partir de trois habitats microbiens différents (ruisseau, fleuve et station d'épuration), trois structures de communautés microbiennes différentes sont obtenues. Il est important de noter que ces trois structures sont des images transitoires d'une dynamique temporelle des communautés prises à un moment donné. En effet, la structure des communautés bactériennes ou algales résulte de processus plus ou moins complexes de successions écologiques menant à des trajectoires particulières propres à chaque habitat. Les premières questions qui se posent : Comment est-il possible à partir de 3 communautés structurellement différentes et résultant de processus de successions différents d'observer des comportements similaires vis-à-vis d'une fonction ? Les mécanismes de biodégradation de l'alachlore sont-ils réalisés par des micro-organismes ubiquistes ? Présents au sein d'habitats différents et quelles que soient l'histoire et les caractéristiques des communautés ? Nous pouvons nous interroger sur la manière dont ces processus de successions écologiques sont réalisés pour aboutir à ces images de structures transitoires : Quels sont les facteurs qui conditionnent ces successions ? Est-il possible de modifier leurs trajectoires ? En milieu aquatique ou terrestre, des études sur la

biotransformation de l'alachlore ont suggéré que cette molécule est co-métabolisée en OA et ESA via une réaction catalysée par une glutathione-S-transférase (GST) non spécifique (Ferrer et al. 1997 ; Knapp et al. 2003). Ces enzymes sont présentes chez les procaryotes et les eucaryotes. Chez les plantes supérieures, elles participent à des mécanismes de détoxification vis-à-vis de chloroacétanilides (Rossini et al. 1996). C'est une hypothèse à vérifier, même si la biodégradation n'est pas le seul mécanisme susceptible d'influencer le comportement de l'alachlore en solution, l'adsorption semble également jouer un rôle, particulièrement au sein des microcosmes exposés aux biomasses du site **G**. Pour les 3 types de biomasses, aucune phase de latence n'est observée, comme dans le cas d'expériences antérieures menées sur l'alachlore (Graham et al. 1999 ; Knapp et al. 2003). Mais la structure de la communauté microbienne ne semble pas être le seul facteur susceptible d'influencer le comportement de l'alachlore. Le métolachlore et l'alachlore présentent des structures moléculaires et des modes d'action très similaires. Une étude de Graham et al. (1999) suggère pour ces deux chloroacétanilides biodégradés en ESA et OA (dans des proportions différentes), des voies de transformation dans des eaux de rivières similaires et semblables aux voies de transformation de l'acétolachlore dans les sols (Aga et Thurman 2001). Debenest et al. (2009) enregistrent une diminution du s-métolachlore au sein de leurs aquariums en contact avec du biofilm. A l'inverse, Roubeix et al. (2011a) n'observent aucune disparition du métolachlore durant l'incubation de leurs biofilms au sein de leurs microcosmes. Ainsi le comportement, voir la biodégradation des chloroacétanilides, ne semble pas dépendre uniquement de la présence ou pas de certaines espèces ubiquistes ni de la présence seule de la GST, sinon quelles que soient les conditions opératoires utilisées durant les expériences, les chloroacétanilides disparaîtraient au cours du temps (**Tableau 14**). Le ratio entre la quantité de biomasse et la quantité d'alachlore, l'aspect agrégé ou en suspension de ces biomasses qui induit des surfaces de contacts micro-organismes /alachlore différentes, ainsi que la taille des microcosmes (Laabs et al. 2007), pourraient participer au contrôle du comportement des chloroacétanilides en milieu aquatique. L'histoire des contaminations rencontrées par les communautés microbiennes peut également gouverner le comportement d'un polluant.

Référence	Molécule	Concentration initiale / durée de l'expérience	Type de dispositif	Comportement de la molécule (% de disparition ou temps de demi-vie)	Organismes présents
Bohuss et al. 2005	Acétolachlore	12,4 g.L <sup>-1</sup> 14 jours	Aquarium de 6 litres	44 % de diminution	Biofilms phototrophes
Knapp et al. 2003	Alachlore	25 g.L <sup>-1</sup> 42 jours	Cylindre en fibre de verre 11,3 m <sup>3</sup> , 3,2 m de diamètre et 1,4 m de profondeur.	Temps de demi-vie (en jours) : 86 (oligotrophe) 56 (mesotrophe) 35 (eutrophe) 22 (hypertrophi)	Phytoplancton
Roubeix et al. 2011	Métolachlore	5 et 30 g.L <sup>-1</sup>	Canaux: 6 * 10 cm (40 litres)	aucune diminution significative	Biofilms phototrophes
Debenest et al. 2009	Métolachlore	5 et 30 g.L <sup>-1</sup> 6 jours	Microcosme en verre de deux compartiments: (650 mm * 270 * 210 mm) et (50 mm * 270 mm et 210 mm), (51,5 litres)	70% de diminution	Biofilms phototrophes
Laabs et al. 2007	Métolachlore	15 g.L <sup>-1</sup> 50 jours	Microcosme en verre: bêcher de 0,78 L (petite taille)	Temps de demi-vie (en jours) : 97,6 (petite taille) 26,7 (grande taille)	Phytoplancton
	Alachlore		58 * 58 * 60 cm (grande taille)	Temps de demi-vie (en jours) : 18,8 (petite taille) 47 (grande taille)	Phytoplancton
Graham et al 1999	Métolachlore	10 et 25 g.L <sup>-1</sup> 21 jours	Cylindre en fibre de verre: diamètre de 3,2 m et profondeur de 1,4 m (11,3 m <sup>3</sup> )	Temps de demi-vie (en jours) : 46,2 (à 10 µg /L) 33 (à 25 µg /L)	Phytoplancton
	Alachlore	25 g.L <sup>-1</sup> 21 jours		Temps de demi-vie (en jours) : 21	
Mohr et al. 2008	métazachlor	5, 20, 80 et 200 g.L <sup>-1</sup> 140 jours	Bassin avec 100 t de sable: 690 * 325 * 250 cm)	Temps de demi-vie : 27 à 44,2 (stream) Temps de demi-vie : 38,3 à 47,9 (pond)	Phytoplancton / Zooplancton et Macrophytes
Noack et al. 2003	métazachlore	32, 100, 320 et 10000 g.L <sup>-1</sup> 49 jours	Bassin en polyéthylène: 2,48 * 1,65 * 1,25 m	20 à 60% de diminution selon la concentration	Biofilm phototrophes et Zooplancton

**Tableau 14** – Comparaison du comportement des chloroacétanilides en milieu aquatique suivant les principales caractéristiques des conditions opératoires.nd = donnée non disponible

I.6 Article 1

## Fate of the herbicide alachlor exposed to different microbial consortia in aquatic systems

Armelle Paule<sup>1,2</sup>, Asmaa Biaz<sup>1,2</sup>, John R Lawrence<sup>3</sup>, Hugues Preud'homme<sup>4</sup>, Etienne Paul<sup>4</sup> and Jean Luc Rols<sup>1,2</sup>

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

<sup>2</sup> CNRS, EcoLab, F-31062 Toulouse, France

<sup>3</sup>Université de Pau et des Pays de l'Adour, LCABIE, CNRS, IPREM, BP1155, F-64000 Pau, France

<sup>4</sup>Environment Canada, Saskatoon, Saskatchewan, Canada

<sup>5</sup>Université de Toulouse, INSA, LISBP (Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés), 135 Avenue de Rangueil, F-31077 Toulouse, France

### Abstract

In the aquatic environment, microbial processes are the main cause of pesticide degradation. The structure and function of microbial communities are influenced by a number of environmental parameters in their habitats. This work explored the influence of different microbial consortia on the behaviour of the herbicide alachlor. To assess this influence, field experiments were performed using small size microcosms (450 mL) at two alachlor environmental concentrations (1 and 20  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) with or without suspended microbial inoculum, monitored for 10 days. Alachlor levels were evaluated over time for all experimental treatments (1, 5 and 10 days). The microbial consortia from different habitats included activated sludge from a waste water treatment plant and natural epilithic biofilms from two distinct river environments. At the first incubation site, located in an agricultural watershed (Aurade, France), epilithic biofilm were cultivated *in situ* on artificial substrates placed vertically and parallel to river water flow over 5 weeks. At the second site, located on the mid-slope of the River Garonne, upstream of the city of Toulouse (south-west, France), epilithic biofilms were sampled from pebbles whose incubation time and history were not known. In this study, a multiphasic approach was used to characterize the structure of the different microbial consortia. Comparison of biomass levels, bacterial structures measured by PCR-DGGE of 16S rDNA fragments and functional diversity measured by the use of the Ecoplate system, revealed differences according to habitat types and incubation sites among microbial consortia. The disappearance curves of water soluble alachlor were exponential, thus a first-order model was used to estimate the rate of disappearance and the half-life of alachlor. Decay coefficients were similar between the 20  $\mu\text{g L}^{-1}$  and 1  $\mu\text{g L}^{-1}$  treatments for communities from activated sludge but differed significantly for communities from epilithic biofilms with the greatest decrease for 20  $\mu\text{g L}^{-1}$  treatments. For both treatments, the lowest half-lives were observed for experiments with biofilms from the river Garonne (3.9 and 8 days) followed by biofilms from agricultural watershed (16.3 and 30.8 days) and then, by activated sludge (21.6 and 21.8 days). This study confirmed the influence of habitat type and thus environmental conditions on the structure of microbial communities. The behaviour of water soluble chemical such as alachlor can be affected by the environmental parameters such as biomass levels, habitat type, structure of microbial communities, and initial concentrations.

### Keywords

Alachlor; fate; activated sludge; epilithic biofilm; microbial community

### 1. Introduction

The objective of the European Water Framework Directive (WFD, European Commission, 2000) is to implement an assessment of "good chemical and ecological status" for all European river bodies by 2015. This monitoring leads to the identification of sources of pollution, their persistence and effect on the structure and

functioning of ecosystems. Pesticides are one of the causes of pollution in aquatic environments. Residual pesticides migrate from agricultural lands to surface and ground waters by mechanisms such as leaching, draining and surface run-off (Papadopoulou-Mourkidou et al., 2004).

The persistence of pesticides in aquatic ecosystems can be mediated by different mechanisms such as photodegradation (Bahena and Martinez, 2006), volatilisation (Dailey, 2004), biodegradation (Stamper and Tuovinen, 1998) and adsorption (Katayama et al., 2010). All these mechanisms are present but often difficult to predict and quantify and will influence the toxicity of the chemical of concern. Most studies which have evaluated pesticide behaviour used microbial communities, such as those in activated sludge (Stasinakis et al., 2009), surface water (Graham et al., 2000) and soil (Sarmah et al., 2009). The efficiency of micro-organisms in pollutant degradation appears to depend on several parameters (e.g. Briceno et al., 2007; Das et al., 2008) including, compound properties (Sabljić et al., 2001), inoculum types (Forney et al., 2001) and environmental conditions (such as light, dissolved organic carbon levels (e.g. Ensz et al., 2003), dissolved oxygen (Graham et al., 2000) and temperature (e.g. Daam et al., 2009; El Sebai et al., 2010).

Alachlor [2-chloro-N-(2, 6-diethylphenyl)-N-(methoxymethyl) acetamide] is extensively used as a pre-emergence herbicide applied to corn and soybeans worldwide and known to inhibit the transformation of very long chain fatty acids in plants and algae (Böger et al., 2000). This molecule is classified as highly toxic by US EPA (Graham et al., 2000) and has been included in a list of 33 priority substances by the EU Water Framework Directive (EU, 2001). As a consequence of its extensive use, alachlor is commonly detected in surface and ground waters. For example, in irrigated areas dedicated to corn cultivation in Spain, surface water concentrations ranged from 0.06 to 31.9  $\mu\text{g L}^{-1}$  and ground water concentrations ranged from 0.05 to 4.85  $\mu\text{g L}^{-1}$  (Dalton and Frick, 2008). Alachlor is relatively non-persistent in soil with half-life values ranging from 3 to 14 days (Stamper and Tuovinen, 1998; Chirnside et al., 2007) which is consistent with its low adsorption (partition coefficient,  $\log K_{ow} = 3.09$ ) and high water solubility (170.3  $\text{mg L}^{-1}$  at 20°C, pH 7) (Sabljić et al., 1995). In surface waters, alachlor half-lives ranged from 9.7 to 122 days reflecting the dependence of fate and attenuation on specific environmental conditions (Galassi et al., 1996; Graham et al., 2000; Ensz et al., 2003; Laabs et al., 2007). It was previously suggested that biodegradation of alachlor in aquatic environments mainly proceeds by co-metabolism catalyzed via a non-specific glutathione-S-transferase (GST) (Thurman et al., 1996), however, complete mineralization is rarely observed (Stamper and Tuovinen, 1998).

In river ecosystems, the epilithic biofilm, a microbial aggregate consisting of heterotrophic micro- and meio-organisms and phototrophic micro-organisms (Lock et al., 1984), constitutes a functional key compartment. Epilithic biofilms are involved in primary production (Dodds, 2006), mineralization and element recycling processes (Sabater et al., 2007) and biodegradation of pollutants (Lawrence et al., 2001). Because of its ubiquitous character, short generation time, sessile nature and rapid response to changes in environmental conditions (Paule et al., 2009), epilithic biofilm is widely used as a bioindicator of water quality in lotic systems (Burns and Ryder, 2001). Changes in the structure and diversity of the microbial consortia in epilithic biofilms are mediated by abiotic factors such as nutrient availability (Della Bella et al., 2007), light (Boston and Hill, 1991), substratum types (Acs et al., 2008), hydrodynamics (Battin et al., 2003), and by biotic interactions such as competition (Jackson et al., 2001).

In the present work, *in situ* development of microbial communities followed by experiments in aquatic microcosms were conducted to investigate the influence of different microbial consortia, including communities



from activated sludge and natural epilithic biofilms, on the behaviour ofalachlor. Epilithic biofilms were sampled at sites representing contrasting environmental conditions, different colonization substrata and incubation times. Analyses focused on examining differences in structure or functional diversity in microbial communities inhabiting different environments, using a combination of culture-dependent and independent methods as well as physico-chemical analysis.

## **2. Material and methods**

### **2.1. Microbial consortia**

#### **2.1.1. Sampling sites**

Three sites (sites G, M and W) representing different microbial habitats and environmental physico-chemical parameters were chosen to sample three different types of bacterial communities. These different microbial habitats included (i) epilithic biofilms collected at both sites G and M, and (ii) activated sludge collected at site W. Site G on the mid-slope of the River Garonne is located 36 km upstream of the city of Toulouse (south-west, France) which corresponds to a 6th-order shallow river. The mean daily discharge is  $200 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$  (from DIREN Midi-Pyrénées, in Boulêtreau et al. 2006). During the low water period, the bed is 100 m wide, less than 1.5 m deep with a mean flow velocity on the riverbed of  $0.5 \text{ m s}^{-1}$ . These conditions favour the development of epilithic biofilms on pebbles (diameter about 12 cm) on the river bottom. This site is known to have minor herbicide pollution in surface water (Devault et al., 2007). Site M on the Montoussé stream is located in an experimental agricultural watershed outlet (328 ha) of the city of Auradé (south-west, France). The area is dominated by an agricultural landscape (wheat and sunflower) and reported as highly contaminated by pesticides (Taghavi et al., 2010) and nitrate (Debenest, 2007). Howeveralachlor is not detected in this stream. The river bed is sedimentary, confined (2 m wide), and shady. Water depths (50 cm) and flow velocity ( $0.045 \text{ m s}^{-1}$ ) were constant during the biofilm development period. Moreover, no natural substrate (pebbles, rocks) was available at site M to allow the development of epilithic biofilms. Cleaned and smooth glass slides ( $244 \times 78 \text{ mm}$ ) were chosen as uniform artificial substrates, as described by Paule et al. (2009).

The activated sludge material was sampled from the wastewater treatment plant of Toulouse (site W) operating at high massic loading rates of  $0.9 \text{ kgBOD}_5 \text{ kgVSS}^{-1} \text{ d}^{-1}$  ( $\text{BOD}_5$  is biological oxygen demand after 5 days and VSS are volatile suspend solids), a hydraulic retention time of 1 to 5 hours and a sludge age of 3 days.

#### **2.1.2. Sample collection**

Biofilm *in situ* colonization at site M was carried out between February 22 and April 3, 2008 to cover the pesticide application period in the experimental agricultural watershed. Epilithic biofilms were collected after 5 weeks of colonisation on artificial supports. Biofilms from site G were sampled from pebbles whose incubation period length and history were not known. After collection, glass slides and pebbles were transported to the laboratory within moisturized bags. One replicate represented two slides sampled randomly or a mixing of 3 pebbles for the epilithic biofilm from artificial and natural substrates respectively. The scrubbed surface area of the pebbles was traced on tracing paper and its area ( $\text{m}^2$ ) calculated from the mass of the tracings. Biofilm was removed from artificial or natural substrates by scraping with a toothbrush or a microscope slide, previously treated with NaOH 1N in order to avoid all trace of DNA. For each replicate, biofilm was suspended in 250 mL of filter sterilized river water ( $0.2 \mu\text{m}$  pore size filter, cellulose acetate membrane, Whatman) and homogenised (13,500 rpm, Ultra Turrax, T25). The activated sludge was collected from the aeration tank of the wastewater treatment plant. After sampling of sludge, only the supernatant was used after settling for 30 min. Each epilithic

biofilm or activated sludge homogenates (250 mL) were subdivided into aliquots, a 50 mL subsample as inoculum source for the microcosm study, and a 200 mL subsample for biomass descriptors, DGGE analyses and carbon utilization assays of microbial consortia.

### 2.1.3. Sampling sites physico-chemical characteristics

Water physico-chemical characteristics were estimated for both biofilm sampling sites during the *in situ* biofilm development period at sites G and M. For site W, the chemical parameters analyses were conducted only when the activated sludge was sampled. Water conductivity and pH values were measured with a conductimeter Hanna HI 99 1300 and a pH meter 320 (sentix 41 probe). Dissolved oxygen (DO) concentration was determined with an oxi 323 oxymeter (cellox 325 probe) and temperature values were represented by the mean values that were determined by the pH meter and oxymeter. In parallel, water samples were collected to assess the water quality using the following parameters: nitrate ( $\text{NO}_3^-$ -N), total phosphorus (TP) and ammonium ( $\text{NH}_4^+$ -N) concentrations. For measures of nitrate and ammonium concentrations, water samples previously were filtered in the field using 0.45  $\mu\text{m}$  pore size acetate cellulose membranes. These parameters were measured by classic colorimetric methods (Secoman, Uvi Light, XT5) according to standard methods (APHA, 1992). Ammonium concentrations were determined within 10 h following sampling. Dissolved organic carbon (DOC) concentrations were measured as described by Paule et al. (2009). All sampling and measurements were performed in the morning to provide consistency between samples. Water samples were refrigerated during transport to the laboratory.

### 2.1.4. Microbial consortium characteristics

**Biomass descriptors.** From an aliquot of initial biofilm or activated sludge homogenates, the dry mass (DM) (aliquot of 10 mL), the ash free dry mass (AFDM) and the chlorophyll *a* (aliquot of 10 mL) (for biofilm samples only) was measured as described by Paule et al. (2009). Autotrophic index (AI) was defined as the ratio between AFDM and chlorophyll *a*, and indicates the relative importance of autotrophic organisms versus heterotrophic organisms and detritus (Biggs and Close, 1989). For each sample, the ratio between AFDM and DM was determined to indicate the relative importance of the organic fraction in the biomass.

**Microbial community structure.** After centrifugation (12,000 g at 4°C for 20 min, Heraeus Multifuge) of an aliquot of 10 mL of the initial biofilm or activated sludge homogenates, the pellet was stored at -80°C until further analysis. Genomic DNA extraction was performed on the pellet using the DNeasy Plant Mini Kit according to the manufacturer's protocol (Qiagen Laboratories). The extracted DNA integrity was checked on a 1 % agarose gel (Eurogentec), staining ethidium bromide and using the precision Molecular Mass Ruler (Fermentas) and quantified as previously described by Paule et al. (2009).

The 16S rRNA genes were amplified by PCR following a protocol described elsewhere (Lyautey et al., 2005a) using 50 ng of extracted DNA as template for the PCR. Amplified product concentrations were quantified on a 1.65 % agarose gel (Eurogentec) using precision the Molecular Mass Ruler (Fermentas) as described previously (Lyautey et al., 2005a). DGGE was realized following the protocol previously described by Paule et al. (2009).

**Carbon source utilization profiles.** Community level analysis of carbon source utilization profiles for the three different microbial habitats were evaluated by using commercial Eco-plates (Biolog, Hayward, CA, USA) (Konopka et al., 1998). Each microplate was inoculated with 100  $\mu\text{L}$  of an aliquot of initial sludge and biofilm homogenate previously diluted ( $10^{-2}$ ) and then incubated in the dark at 20°C for 10 days. One plate was used for each replicate. The absorbance was measured every day at 590 nm using a multi well plate reader (Metertech)

until a stable value was obtained. For every absorbance value, the controls were subtracted. For statistical analysis, the net absorbances at 48 hours of incubation were used.

The substrates were grouped by guild following their chemical structure (Choi and Dobbs, 1999): polymers, carbohydrates, carboxylic acids, amino acids, amines and phenolic compounds. As described by Leflaive et al. (2005), a Principal Component Analysis (PCA) was conducted on the “*pi*” values defined as the sum of optical density (OD) of each guild previously multiplied by a correcting factor, and subdivided by the sum of all guilds. This correcting factor corresponded to the number of substrates in the largest guild divided by the number of substrates of each guild and allowed standardization of the weighting of the different guilds.

## **2.2. Microcosm experimental procedure**

Microcosm study was monitored to assess the fate of water soluble alachlor exposed to microbial communities from different habitats. The microcosms consisted of amber glass bottles of 500 mL. Each bottle was initially filled with 450 mL of water from site G ( $\text{NH}_4^+\text{-N} = 0.053 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $\text{NO}_3^-\text{-N} = 0.7 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $\text{TP} = 0.012 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $\text{DOC} = 2.1 \text{ mg L}^{-1}$ , and  $\text{pH} = 7.5$ ), considered as the least polluted previously filtered through a  $0.2 \mu\text{m}$  pore size filter (cellulose acetate membrane, Whatman). For each inoculum source, epilithic biofilms (site G and M) and activated sludge (site W), treated microcosms with alachlor were designed to evaluate the disappearance of alachlor at two initial concentrations of 1 and  $20 \mu\text{g L}^{-1}$ . Control microcosms without microbial inoculum were established to evaluate the abiotic disappearance of alachlor at two initial concentrations. Experiment was monitored for 10 days in triplicate. Bottles were incubated for 5 hours to obtain stable water column chemical conditions in the microcosms before inoculation with biomass obtained from the homogenates of epilithic biofilms or settled activated sludge (50 mL). All the bottles were closed by sterile cotton cloth plugs and maintained in the dark, on a rotary shaker (Inductive stirring system, Oxitop IS 6, WTW), at  $25^\circ\text{C}$ . Alachlor purchased from Sigma-Aldrich (purity 99 %) was dissolved in acetone to make a stock alachlor solution. Aliquots of this stock solution were then added to microcosms to obtain tested final concentrations which represent a range of environmental concentrations (Dalton and Frick, 2008). The final concentration of solvent added in each microcosm was less than 0.005 % (v/v). After 1, 5 and 10 days of incubation, water samples (100 mL) from each microcosm were collected to evaluate the residual concentration of alachlor. The samples were filtered through Whatman GF/F glass fibre filters ( $0.7 \mu\text{m}$  pore size) and analyzed at “Laboratoire Départemental de l’Eau” (Toulouse, France), using high performance liquid chromatography coupled tandem to mass spectrometry (HPLC-MS-MS, Thermo Fisher, model E-Quan TSQ Quantum ultra) with ionization electron spray source and equipped with a pre-concentration column (Thermo Fisher Hypersil GOLD C18,  $12 \mu\text{m}$  particle size,  $20 \times 2.1 \text{ mm}$ ), by a direct sample injection. The sample volume was 2 mL. The alachlor separation was monitored using a Thermo Fisher Hypersil GOLD C18 ( $3 \mu\text{m}$  particle size,  $50 \times 2.1 \text{ mm}$ ) column.

## **2.3. Data analysis**

DGGE bands (defined as operational taxonomic units [OTUs]) were scored as present or absent from DGGE gel analysis. To assess changes in the microbial community function and structure for each inoculum source, the similarity of carbon source utilization profiles and DGGE patterns was assessed by a Principal Component Analysis (PCA) with R.2.2.1 software for windows using the *ade4* package. Statistical analyses of PCA were run using an analysis of similarity (ANOSIM) via PRIMER v6 software (PrimerE, Ltd, Luton, United Kingdom) on Bray Curtis similarity matrices generated from binary data. The analysis of similarity reports global R and p-values. A global R close to 1 indicates a significant effect of incubation site and the p value reflects the statistical

significance of the global R (Clarke, 1993). The statistical significance of the global R was considered at  $p < 0.05$ . The difference in physico-chemical characteristics and in biomass descriptors, the number of bands on DGGE banding patterns between sampling sites, andalachlor concentration during microcosm experiments were assessed with the Mann Whitney test using SPSS 15.0 software for Windows. Results were considered statistically different at  $p \leq 0.05$ .

### 3. Results

#### 3.1. Water physico-chemical parameters

Physico-chemical characteristics of sampling sites are summarized in Table 1. Higher  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  ( $47.8 \text{ mg L}^{-1}$ ), TP ( $13.4 \text{ mg L}^{-1}$ ), and DOC ( $20.9 \text{ mg L}^{-1}$ ) concentrations were recorded for samples from the wastewater treatment plant (site W) relative to both biofilm sampling sites (sites G and M). Whereas  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  values measured at site M ( $8.1 \text{ mg L}^{-1}$ ) were higher than at site G ( $0.64 \text{ mg L}^{-1}$ ) and at site W ( $0.2 \text{ mg L}^{-1}$ ) ( $p < 0.05$ ). Values were very similar at site G and at site M for water temperature ( $8.8$  and  $8.6^\circ\text{C}$ ), dissolved oxygen concentration ( $11.2$  and  $9.9 \text{ mg L}^{-1}$ ), and pH ( $7.5$  and  $7.8$ ) values ( $p > 0.05$ ). Conductivity values were lower at site G ( $299 \text{ }\mu\text{S cm}^{-1}$ ) than at site M ( $984 \text{ }\mu\text{S cm}^{-1}$ ) ( $p = 0.032$ ). All water physico-chemical parameters remained constant over time for both sites G and M.

	$\text{NH}_4^+\text{-N}$ ( $\text{mg L}^{-1}$ )	$\text{NO}_3^-\text{-N}$ ( $\text{mg L}^{-1}$ )	TP ( $\text{mg L}^{-1}$ )	DOC ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Temp ( $^\circ\text{C}$ )	DO ( $\text{mg L}^{-1}$ )	pH	Conductivity ( $\mu\text{S cm}^{-1}$ )
Site G (n = 3)	$0.08 \pm 0.02$	$0.64 \pm 0.03$	$0.024 \pm 0.010$	$1.8 \pm 0.4$	$8.8 \pm 0.5$	$11.2 \pm 0.5$	$7.5 \pm 0.2$	$299 \pm 28$
Site M (n = 4)	$0.03 \pm 0.02$	$8.1 \pm 0.8$	$0.008 \pm 0.003$	$2.3 \pm 0.1$	$8.6 \pm 1.9$	$9.9 \pm 0.6$	$7.8 \pm 0.2$	$984 \pm 6$
Site W (n = 1)	47.8	0.2	13.4	20.9	na	na	na	na

**Table 1:** Physico-chemical characteristics of sampling sites (mean  $\pm$  SD). Measures were determined during the period of *in situ* site M biofilm colonization (between February 22 and April 3, 2008). TP, total phosphorus; DOC, dissolved organic carbon; Temp, temperature; and DO, dissolved oxygen concentration. na: not available.

#### 3.2. Microbial consortium characteristics

##### 3.2.1. Biomass descriptors

Epilithic biofilms from river site (site G) exhibited AFDM values significantly higher ( $0.97 \text{ mg cm}^{-2}$ ) than AFDM values at stream site (site M) ( $0.19 \text{ mg cm}^{-2}$ ) ( $p = 0.05$ ) (Table 2). The autotrophic index (AI) revealed values of 176 and 46, and AFDM/DM ratio values of 8 and 20 %, for site G and M respectively. Low values reveal epilithic biofilms rich in detritus and sediment particles. The larger standard deviation values obtained for site G resulted from a strong heterogeneity that typically occurs on natural substrates (Rolland et al., 1997). Dry mass value recorded for activated sludge sample was  $8.3 \text{ mg L}^{-1}$ .

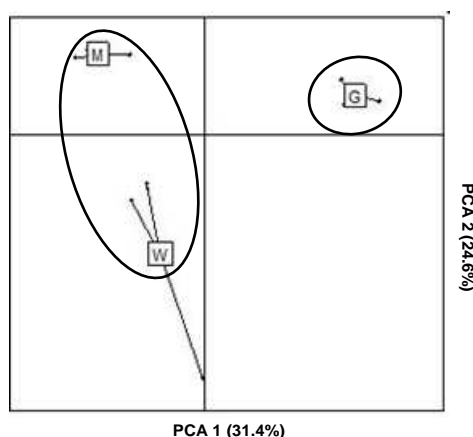
	AFDM (mg cm <sup>-2</sup> )	AFDM / DM (%)	AI (g AFDM g Chl a <sup>-1</sup> )
Site G (n = 3)	0.97 ± 0.54	8 ± 2	176 ± 23
Site M (n = 3)	0.19 ± 0.05	20 ± 1	46 ± 12

**Table 2:** Ash free dry mass (AFDM), Ash free dry mass / dry mass ratio (AFDM / DM), and autotrophic index (AI) for epilithic biofilm samples from sites G and M.

### 3.2.2. Bacterial community structure

DGGE banding patterns revealed a total of 62 OTUs. The average numbers (n = 3) of OTUs ( $\pm$  SD) per sample were  $23.3 \pm 3$ ,  $36 \pm 1$  and  $32.3 \pm 1$ , for communities from site G, M and W, respectively. The three different bacterial communities shared 18 common OTUs. Among a total of 62 OTUs, 2 bands were specific to site G, 5 for site M and 8 for site W.

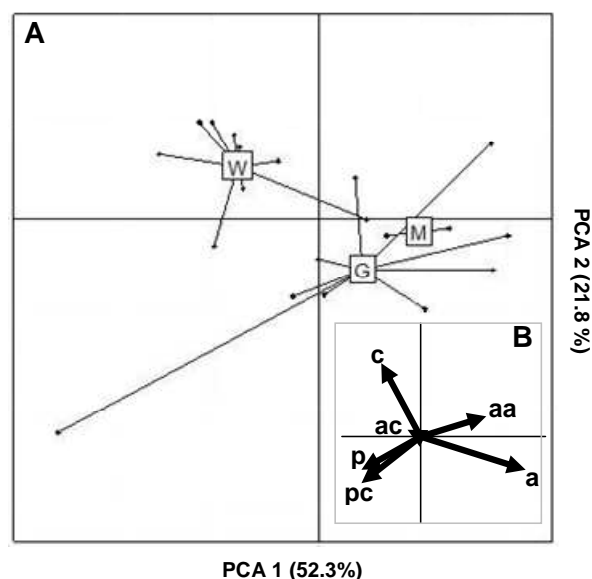
PCA analysis was carried out on the presence absence matrix for DGGE gels (Figure 1). The two axes accounted for 31.4 and 24.6 % of the variance, respectively. The plot revealed an important similarity between the replicates of each site. The analysis of similarity (ANOSIM) showed influence of site on the bacterial structures ( $R = 0.885$ ,  $p = 0.004$ ), with differences between the bacterial community structure from site G and the other bacterial communities from site M and W (global  $R = 1$ ,  $p < 0.001$ ). However no significant difference was detected between bacterial communities from M and W ( $R = 0.556$ ,  $p < 0.001$ ). The test revealed significantly different bacterial structure according to microbial sources (epilithic biofilm *versus* activated sludge) and their incubation sites for the epilithic biofilms.



**Figure 1:** Results of the Principal Component Analysis carried out on DGGE banding patterns from the gel analyzed in the present work for bacterial communities from sampling sites G, M and W. Squares represent the gravity center of the plot for each group. Circles correspond to a similarity of 60% based on the hierarchical cluster analysis of on Bray Curtis similarity matrices.

### 3.2.3. Sole-carbon source utilization profiles

No difference was observed in the total number of carbon sources used by the different bacterial communities, site G ( $27 \pm 2.01$ ), site M ( $28 \pm 1$ ) and site W ( $26.7 \pm 1.2$ ) ( $p = 0.486$ ). No carbon source was preferentially used by epilithic biofilms from sites G and M ( $p = 0.32$ ) whereas microbial communities of site W appeared to preferentially use carbohydrate ( $p = 0.001$ ). A PCA was performed on the guild categorization of total activity of different microbial communities (Figure 2). The two axes accounted for 52.3 % and 21.8 % of the variance, respectively. Plots were grouped according to sampling sites. As was the case for other analyses site G presented greater heterogeneity between replicates. A fraction of replicates of biofilm sampling at site M exhibited optical density values drastically lower than other replicates suggesting that a methodological problem occurred with these replicates. Data from these replicates were thus not included in the analysis. PCA revealed two distinct groups, the bacterial communities from activated sludge and microbial communities from epilithic biofilms. This distinction resulted from the different utilization of specific carbon sources. For example, the microbial community from activated sludge was in particular associated with the utilization of carbohydrate substrates. The ANOSIM analysis of PCA (for pairwise comparison) showed significantly different carbon source utilization profiles according to the nature of the microbial community source ( $R = 0.527$ ;  $R = 0.924$ ,  $p < 0.001$ , respectively for W/G and W/M), however, there was not a significant difference between either epilithic biofilm samples ( $R = 0.052$ ,  $p < 0.001$ , for G/M).



**Figure 2:** Results of the Principal Component Analysis carried out on the carbon source group of net optical density at 48 h for the three microbial samples (A). Plots were grouped according to the sampling sites G, M and W. Projection of the variables (carbon source guild) on the component planes (B) with a, amine; aa, amino acid; c, carbohydrate; ac, carboxylic acid; p, polymer; pc, phenolic compound. Squares represent the gravity center of the plot for each group.

### 3.3. Alachlor disappearance

Alachlor disappearance curves and half-life and decay coefficient values for the three sampling sites and for the two alachlor concentration treatments are shown in Figure 3 and Table 3. The curves in Figure 3 indicated an exponential disappearance of alachlor over time, thus a first-order model was used to estimate the rate of disappearance and the half-life of alachlor (Stasinakis et al., 2009). The equation of the first order reaction was:

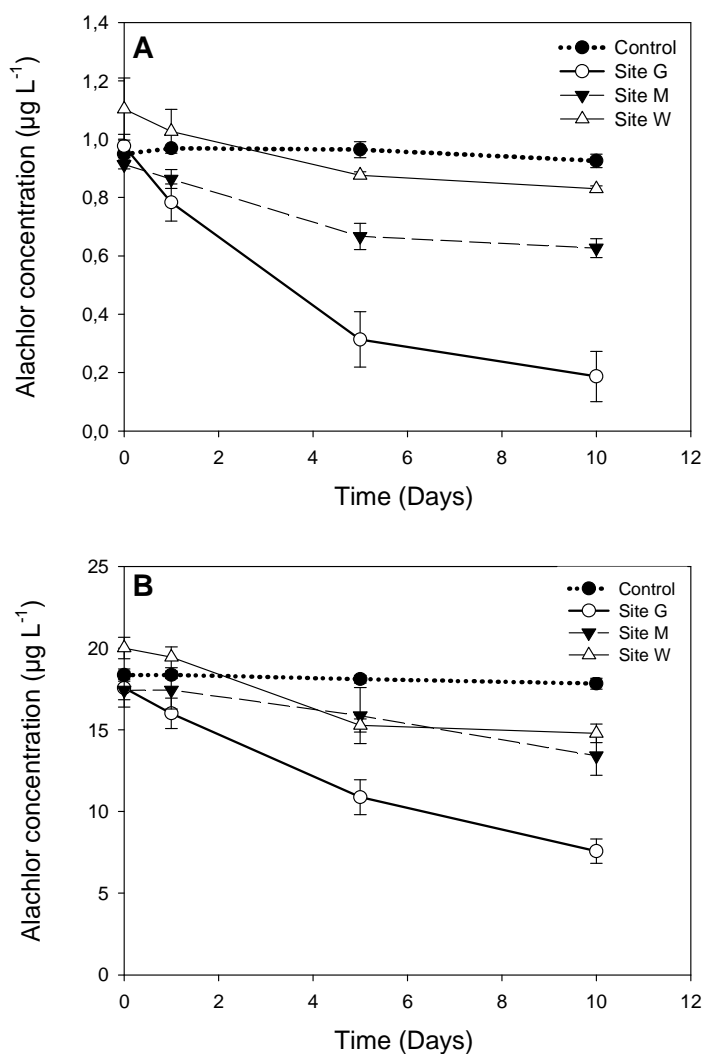
$$\ln(C_t/C_0) = -k \times t$$

Where  $C_t$  is the residual alachlor concentration at incubation time  $t$  (day),  $C_0$  is the initial alachlor concentration and  $k$  ( $\text{day}^{-1}$ ) is the decay coefficient. The half-life was calculated as  $\text{half-life} = \ln(2) / k$ . For all disappearance curves, the linear regression ( $R^2$ ) values ranged from 0.76 to 0.99.

Decay coefficients ( $k$ ) ranged from 0.025 to 0.185  $\text{day}^{-1}$  and half-lives ranged from 3.9 to 30.8 days in the different microcosms. Values of  $k$  and half-life presented large standard deviation. Decay coefficients differed significantly between the 1  $\mu\text{g L}^{-1}$  and 20  $\mu\text{g L}^{-1}$  treatments for site G ( $p = 0.05$ ) and M ( $p = 0.05$ ), whereas they were similar for site W ( $p = 0.658$ ). For the two alachlor concentration treatments, half-life values were of the same order of magnitude at site M ( $p = 0.05$ ) and W ( $p = 0.05$ ). The highest rates of decay were observed at site G (3.9 and 8 d) for both alachlor concentration treatments.

Alachlor concentration	1 $\mu\text{g L}^{-1}$		20 $\mu\text{g L}^{-1}$	
	$k$ ( $\text{d}^{-1}$ )	Half-life (d)	$k$ ( $\text{d}^{-1}$ )	Half-life (d)
Site G	0.185 $\pm$ 0.046	3.9 $\pm$ 1	0.087 $\pm$ 0.004	8 $\pm$ 0.4
Site M	0.043 $\pm$ 0.005	16.3 $\pm$ 2	0.025 $\pm$ 0.009	30.8 $\pm$ 12.1
Site W	0.045 $\pm$ 0.033	21.8 $\pm$ 14.5	0.032 $\pm$ 0.003	21.6 $\pm$ 1.9

**Table 3:** Average  $\pm$  SD values of decay coefficient  $k$  and half-live for both alachlor treatment concentrations for three sampling sites G, M and W



**Figure 3:** Alachlor disappearance curves for both alachlor treatment concentrations, at  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  (A) and  $20 \mu\text{g L}^{-1}$  (B) initial alachlor concentrations for three sampling sites G, M and W. Each time point represents the mean of three replicats. Errors bars refer to the SD ( $n = 3$ ).

#### 4. Discussion

The main objectives of this work were to evaluate, in aqueous phase, the behaviour of an organic contaminant, such as alachlor, exposed to different microbial consortia and thus examine the impact of microbial community structures on the fate of alachlor. The microbial consortia included suspended communities from epilithic biofilms and activated sludge samples.



#### 4.1. Differences among microbial inocula

The choice of the activated sludge community was based on studies involving the biodegradation potential of activated sludge operating at various massic loading rates (MLR) (Vazquez-Rodriguez et al., 2003, 2007). The result of these studies suggested that activated sludge treatment operating at high MLR exhibited a greater capacity for biodegradation than activated sludge systems operating at small or medium MLR. Previous studies have suggested that substrate properties (surface roughness or hydrophobicity) and substrate types (natural or artificial) can influence bacterial community structure (Anderson-Glenna et al., 2008) and algal production of epilithic biofilms (Cattaneo and Amireault, 1992). Thus, in the site G, the pebbles represent the “natural” community present in the river, whereas the incubation site M represents a selected community.

Activated sludge and epilithic biofilms developed in habitats with both imposed and intrinsically different environmental conditions (trophic states, light, hydrodynamics...). The aeration tank of the wastewater treatment plant used for activated sludge sampling (site W) was characterized by high concentrations of DOC, TP and  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ , supporting extensive bacterial growth. Epilithic biofilm community development occurred in two separate aquatic environments characterized by different *in situ* hydrodynamics and environmental conditions. For example, site M, located in an agricultural watershed basin, presented high conductivity and nitrate concentrations, whereas site G was characterized by high flow velocity.

Epilithic biofilms exhibited AFDM values which were consistent with those previously recorded in the literature (0.7 to 290 g AFDM  $\text{m}^{-2}$ , Biggs and Price, 1987). Epilithic biofilm from site G exhibited higher AFDM values than those from site M. The lower AFDM value within site M biofilms could be explained by (i) a reduced adhesion of species due to the use of artificial substrates (Cattaneo and Amireault, 1992; Lane et al., 2003), (ii) differences of nutrient availability (Dodds et al., 1997) and hydrodynamic conditions (Biggs and Stokseth, 1996) or (iii) the shorter growth period length (6 weeks) as opposed to previous studies (11 weeks, Biggs and Price, 1987). Low values of AFDM / DM ratios recorded for both epilithic biofilms from site G and M, suggested biofilms dominated by sedimentary particles. These particles were probably imported by a flood event observed at site G and by the presence of sediments on the river bed at site M. The autotrophic index (AI) indicates the relative importance of autotrophic versus heterotrophic organisms and detritus. With AI values of 46, the epilithic biofilm from site M essentially was constituted by algae whereas with AI values of 176, the epilithic biofilm from site G was stable and constituted by equivalent proportions of photoautotrophic and heterotrophic microorganisms (Biggs and Close, 1989).

Microbial structure of different microbial consortia were compared using 16S rDNA based PCR-DGGE. Principal Component Analysis (PCA) of DGGE patterns revealed distinct groups according to the habitat type and the incubation sites of the biofilm.

Methodological biases (chimera and heteroduplex formation, template annealing detection of the dominant populations) are well known and have been widely discussed in the literature (Lyautey et al., 2005a). With a number of OTUs ranging between 23 and 36, epilithic biofilm communities exhibited values similar to previous studies of this type of community (19.5 OTUs, Araya et al., 2003a; 36 OTUs, Lyautey et al., 2005b). Interestingly, in previous studies, the activated sludge communities were considered to be highly complex, exhibiting more complex DGGE banding patterns than the patterns obtained during the current study (Boon et al., 2002). This lower OTUs number could be explained by a reduction of the biomass composition during the step of activated sludge settling. In the natural environment, it was apparent that environmental factors such as pH, temperature, nutrient availability (Hullar et al., 2006), and turbulent flow (Besemer et al., 2007) influenced microbial community structure. The DGGE analysis of structure and composition is a powerful tool to characterize and to compare microbial communities, but not differentiate them on their functional potentialities.

Therefore, we assayed carbon source utilization spectra of communities by the use of commercial Eco-plates. Limits of this approach (inoculum density, bacterial physiological states, metabolic redundancy, inability of growth in nutrient-rich medium, and detection of rapid bacterial growth) were well reviewed in the literature (Preston-Mafham et al., 2002). However, the ability of this method to distinguish microbial communities within similar habitats (Forney et al., 2001) or from different habitats (Garland and Mills, 1991, soil versus river samples), has been widely verified. Our results suggested discrimination between samples from disparate habitats (activated sludge and river). These different profiles may be associated with different biodegradation potential and bacterial activities consistent with different functional diversity (Konopka et al., 1998). The data obtained in this and previous studies showed that activated sludge communities preferentially use carbohydrate sources (Paixao et al., 2006).

Epilithic biofilm from site G exhibited a greater heterogeneity among replicates consistent with intra-site variation associated with the use of natural substrates (Rolland et al., 1997) or Biolog system which can present large variation between replicates as recorded by Baath et al. (1998).

As observed by Foley et al. (2008), the data obtained in this study support the importance of complementary method combinations. Each method described a different aspect of the overall microbial communities. DGGE revealed a dominant subset of the total community membership (Lyautey et al., 2005a), while carbon source utilization spectra analysis revealed a subset of the overall community which rapidly grew on specific substrates (Preston-Mafham et al., 2002).

#### **4.2. Alachlor disappearance rate**

Pesticide concentration and type of molecules detected in surface waters are affected by several factors such as the season, the physico-chemical properties (persistence, solubility) and the topography of the drainage basin (Carabias-Martinez et al., 2003). In the aquatic environment, microbial processes are the main cause of disappearance of alachlor however, mineralization is rarely complete (Stamper and Tuovinen, 1998). Most studies which have evaluated alachlor disappearance used microbial assemblages such as activated sludge (Lapertot and Pulgarin, 2006), surface water (Graham et al., 2000; Ensz et al., 2003), groundwater (Schwab et al., 2006b) and soil (Hildebrandt et al., 2007). Activated sludges are very often used because many contaminants enter the environment through waste water treatment facilities (Forney et al., 2001). Activated sludges exhibited highest reproducibility and cell biomass (Struijs and Van den Berg, 1995) and higher and wider capacity for biodegradation (Thouand et al., 1996; Vazquez-Rodriguez et al., 1999). Our results showed a significant disappearance of alachlor for all treatments. With a half-life from 16.3 to 30.8 days for activated sludge and epilithic biofilm from site M samples, values were consistent with previous results recorded in the aquatic environment for inoculum from surface water (Graham et al., 1999; Graham et al., 2000; Ensz et al., 2003), but lower than those recorded in ground water (808 to 1518 days, Cavalier et al., 1991) and higher than in soil (3 to 7 days, Stamper and Tuovinen, 1998; 5.2 days, Aga and Thurman, 2001). This broad range of half-lives can be explained by the highly variable environmental conditions in these studies. Previous studies showed that environmental parameters such as nutrient and dissolved organic carbon level (Ensz et al., 2003), light intensity (Graham et al., 1999), and temperature (Daam et al., 2009) affected the fate and behaviour of alachlor in aquatic environments. These studies showed a positive correlation between nutrient quantity and light, and the decay of alachlor in aquatic systems. The nutrient and the light stimulated the algal and bacterial activities with the production of autochthonous, dissolved organic carbon, stimulating the high co-metabolism of alachlor and its degradation. Knapp et al. (2003) observed the highest alachlor decay in hypereutrophic waters (half-life = 16 days, total phosphorous > 80  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) as opposed to

oligotrophic waters (half-life = 122 days, TP < 12  $\mu\text{g L}^{-1}$ ). Finally, under the experimental conditions used for the current study, darkness, low nutrient (total phosphorous = 12  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) and low dissolved organic carbon levels (2  $\text{mg L}^{-1}$  as opposed to 11.9  $\text{mg L}^{-1}$  in Enszt et al., 2003), alachlor would be predicted to be more persistent in our microcosms. These differences could be explained by several reasons. Laabs et al. (2007) compared the persistence of pesticides in small (0.75 L) and large (200 L) microcosm systems, and showed shortened half-life times by a factor from 1.5 to 5.3 in the smaller microcosm. The smaller size of microcosm could permit shorter distances between chemical and degraders and a higher ratio of biomass to water phase favouring degradation. Finally, the origin of inoculum also could affect the fate of the xenobiotic; Araya et al. (2003b) showed that bacteria from epilithic biofilm degraded N-Methylaniline more rapidly than bacteria of planktonic origin. Interestingly, with half-life times of 3.9 to 8 days, site G clearly exhibited the lowest alachlor persistence. In the literature, values in this range were generally associated with soil environments (Aga and Thurman, 2001). This lower persistence of alachlor could be explained by several reasons: (i) a high percentage of potential degraders (Van Ginkel et al., 1995), (ii) an increased adsorption due to a high amount of suspended particles, (iii) an adapted bacterial community due to the longer term *in situ* development of the biofilms at site G. Site G presented lower values of nitrogen, TP and DOC compared to sites M and W, typically these might be limiting factors for bacterial growth. It has been suggested that inoculum acclimatization to environmental conditions during field experiments enhanced their xenobiotic biodegradability potential (Thouand et al., 1996). The data obtained on AFDM values of both epilithic biofilms hypothetically revealed mature biofilms at site G. Biofilm maturation can ultimately promote the occurrence of micro-niches (Jackson et al., 2001) within the aggregates that will favour the development of populations involved in processes such as biodegradation which is consistent with our observation for biofilms at site G.

At site M pesticide-pollution of surface water was a more important issue than for site G. Thus epilithic biofilm from site M could exhibit an adaptation to herbicides and show higher herbicide biodegradation potential as observed by Pesce et al. (2009) for epilithic biofilm from a herbicide-treated wine-growing watershed, or Celis et al. (2008) who studied activated sludge that was herbicide-acclimated for 30 days. The fact that site G exhibits lower half-lives than site M could suggest the importance of exposure of the bacteria to the herbicide or related compounds in the adaptation phenomena and herbicide biodegradation potential.

According to our operating conditions, photodegradation was not a factor, the absence of alachlor removal in control microcosms rules out other abiotic mechanisms (in absence of

inoculum amendment) and the low value of Henry Law constant suggested no volatilization occurred (Lapertot and Pulgarin, 2006). Hypothetically, with a solubility value in water at 25°C of 239 mg L<sup>-1</sup> and moderate octanol-water partition coefficient (log K<sub>ow</sub>) of 3.52 (Lapertot and Pulgarin, 2006), alachlor is considered to be relatively water soluble, thus its adsorption on suspended particles appeared to be a minor mechanism governing its water removal. Laabs et al. (2007) only recorded 1 % of the applied alachlor under went sorption to suspended particles. A previous study showed that quantities of acetochlor (similar family of alachlor) sorbed by a structured epilithic biofilm amounted to 0.63 % of losses against 96.2 % caused by biodegradation mechanisms (Bohuss et al., 2005).

Except in the case of activated sludge, the highest rate of alachlor disappearance appeared at the lowest initial alachlor concentration. Various studies demonstrated that biodegradability potential was affected by the initial concentration of the target chemical (Novick and Alexander, 1985; Kawai et al., 1998). In sewage and lake water, Novick and Alexander (1985) observed that metabolic rate was proportional to amended alachlor and propachlor concentrations contrary to conclusions by Galassi et al. (1996) which were consistent with our results for the epilithic biofilms. High concentrations of alachlor (50 mg L<sup>-1</sup>) may inhibit degradation as shown for activated sludge by Lapertot and Pulgarin (2006).

Alachlor biodegradation is known to occur by co-metabolism catalyzed via non-specific glutathione-S-transferase (GST) (Thurman et al., 1996). Earlier studies demonstrated that amendment with other easily degraded carbon sources (or primary substrates) such as, acetate, glucose (Wilber and Wang, 1997) or humic substances (Badriyha et al., 2003) could enhance the biodegradability potential of alachlor by microorganisms. Consequently, alachlor was not used as a primary carbon source by microorganisms (Stamper and Tuovinen, 1998) and its biotransformation requires access to primary substrates. This behaviour has also been shown for demeton-S-methyl (Girbal et al., 2000). Thus, in our microcosms, exudates, exopolymers and algal biomass may have been used by the bacteria as primary carbon sources facilitating degradation.

### **4.3. Conclusion**

This study confirmed that allogenic factors control the microbial community structure within each microbial habitat. Complementary methods proved to be powerful tools to discriminate bacteria community function and diversity. The comparative analyses of different microbial communities can increase knowledge regarding the structure / function relationships at the scale of microbial aggregates. Field experiments reveal that the fate of alachlor in aquatic medium depends on the bacterial community origin, biomass levels and chemical

concentrations. Our results suggest that suspended biomasses obtained from epilithic biofilms can be used to predict the environmental fate of a chemical based on biodegradability tests. However more information about the influence of experimental conditions, such as the composition of the medium and aqueous phase metabolites levels would increase the value of such experiments. Further investigation will be required to identify the degrader populations within the native bacterial community. Alachlor is known to be degraded by co-metabolism and catalyzed by non-specific GST (Noack et al 1985; Thurman et al 1996), it could be interesting to explore the occurrence and expression of genes coding for this enzyme in order to better understand alachlor biodegradation pathways in aquatic environments.

### Acknowledgements

This work was supported by the “Conseil Régional Midi-Pyrénées”. We thank D. Dalger for the water chemistry analysis and J. Leflaive for sole-carbon source utilization profiles statistic analysis. We also thank the “Association des Agriculteurs d’Auradé” and “Véolia Company” for the access to site M and W respectively.

### References

- Acs, E., Borsodi, A.K., Kiss, E., Kiss, K.T., Szabo, K.E., Vldar, P., Varbiro, G., Zaray, Gy., 2008. Comparative algological and bacteriological examinations on biofilms developed on different substrata in a shallow soda lake. *Aquat. Ecol.* 42, 521-531.
- Aga, D.S., Thurman, E.M., 2001. Formation and transport of the sulfonic acid metabolites of alachlor and metolachlor in soil. *Environ. Sci. Technol.* 35, 2455-2460.
- Anderson-Glenna, M.J., Bakkestuen, V., Clipson, N.J.W., 2008. Spatial and temporal variability in epilithic biofilm bacterial communities along an upland river gradient. *FEMS Microbiol. Ecol.* 64, 407-418.
- APHA., 1992. Standard methods for the examination of water and wastewater. American Public Health Association, Washington DC.
- Araya, R., Tani, K., Takagi, T., Yamaguchi, N., Nasu, M., 2003a. Bacterial activity and community composition in stream water and biofilm from an urban river determined by fluorescent *in situ* hybridization and DGGE analysis. *FEMS Microbiol. Ecol.* 43, 111-119.
- Araya, R., Yamaguchi, N., Tani, K., Nasu, M., 2003b. Change in the bacterial community of natural river biofilm during biodegradation of aniline-derived compounds determined by denaturing gradient gel electrophoresis. *J. Health Sci.* 49, 379-385.
- Baath, E., Diaz-Ravina, M., Frostegard, A., Campbell, C.D., 1998. Effect of metal - rich sludge amendments on the soil microbial community. *Appl. Environ. Microb.* 64, 238-245.
- Badriyha, B.N., Ravindran, V., Den, W., Pirbazari, M., 2003. Bioadsorber efficiency, design, and performance forecasting for alachlor removal. *Water Res.* 37, 4051-4072.
- Battin, T.J., Kaplan, L.A., Newbold, J.D., Cheng, X., Hansen, C., 2003. Effects of current velocity on the nascent architecture of stream microbial biofilms. *Appl. Environ. Microb.* 69, 5443-5452.
- Bahena, C.L., Martinez, S.S., 2006. Photodegradation of chlorbromuron, atrazine, and alachlor in aqueous systems under solar irradiation. *Int. J. Photoenergy* 2006, 1-6 (Article ID 81808).
- Besemer, K., Singer, G., Limberger, R., Chlup, A.-K., Hochedlinger, G., Hödl, I., Baranyi, C., Battin, T.J., 2007. Biophysical controls on community succession in stream biofilms. *Appl. Environ. Microb.* 73, 4966-4974.
- Biggs, B.J.F., Price, G.M., 1987. A survey of filamentous algal proliferations in New-Zealand rivers. *N. Z. J. Mar. Freshwat. Res.* 21, 175-191.
- Biggs, B.J.F., Close, M.E., 1989. Periphyton biomass dynamics in gravel bed rivers: the relative effects of flows and nutrients. *Freshwater Biol.* 22, 209-231.
- Biggs, B.J.F., Stokseth, S., 1996. Hydraulic habitat suitability for periphyton in rivers. *Regul. Rivers: Res. Manage.* 12, 251-261.
- Böger, P., Matthes, B., SchmalfuB, J., 2000. Towards the primary target of chloroacetamides - new findings pave the way. *Pest Manag. Sci.* 56, 497-508.
- Bohuss, I., Rékasi, T., Szikora, S., Barkacs, K., Zaray, G., Acs, E., 2005. Interaction of acetochlor and atrazine with natural freshwater biofilms grown on polycarbonate substrate in lake Velence (Hungary). *Microchem. J.* 79, 201-205.

- Boon, N., De Windt, W., Verstraete, W., Top, E.M., 2002. Evaluation of nested PCR-DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) with group-specific 16S rRNA primers for the analysis of bacterial communities from different wastewater treatment plants. *FEMS Microbiol. Ecol.* 39, 101-112.
- Boulêtreau, S., Garabétian, F., Sauvage, S., Sanchez-Perez, J-M., 2006. Assessing the importance of a self-generated detachment process in river biofilm models. *Freshwater Biol.* 51, 901-912.
- Boston H.L. and Hill W.R., 1991. Photosynthesis-light relations of stream periphyton communities. *Limnol. Oceanogr.* 36, 644-656.
- Burns, A., Ryder, D.S., 2001. Potential for biofilms as biological indicators in Australian riverine systems. *Ecol. Manage. Restor.* 2, 53-63.
- Carabias-Martinez, R., Rodriguez-Gonzalo, E., Fernandez-Laespada, M.E., Calvo-Seronero, L., Sanchez-San Roman, F.J., 2003. Evolution over time of the agricultural pollution of waters in an area of Salamanca and Zamora (Spain). *Water Res.* 37, 928-938.
- Cattaneo, A., Amireault, M.C., 1992. How artificial are artificial substrata for periphyton? *J. N. Am. Benthol. Soc.* 11, 244-256.
- Cavalier, T.C., Lavy, T.L., Mattice, J.D., 1991. Persistence of selected pesticides in ground-water samples. *Groundwater* 29, 225-231.
- Celis, E., Elefsiniotis, P., Singhal, N., 2008. Biodegradation of agricultural herbicides in sequencing batch reactors under aerobic or anaerobic conditions. *Water Res.* 42, 3218-3224.
- Chirnside, A.E.M., Ritter, W.F., Radosevich, M., 2007. Isolation of a selected microbial consortium from a pesticide-contaminated mix-load site soil capable of degrading the herbicides atrazine and alachlor. *Soil Biol. Biochem.* 39, 3056-3065.
- Choi, K.-H., Dobbs, F.C., 1999. Comparison of two kinds of Biolog microplates (GN and ECO) in their ability to distinguish among aquatic microbial communities. *J. Microbiol. Methods* 36, 203-213.
- Clarke, K. R., 1993. Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. *Aust. J. Ecol.* 18, 117-143.
- Coste, M., Boutry, S., Tison-Rosebery, J., Delmas, F., 2009. Improvements of the Biological Diatom Index (BDI): description and efficiency of the new version (BDI-2006). *Ecol. Indicators* 9, 621-650.
- Daam, M.A., Van den Brink, P.J., Nogueira, A.J.A., 2009. Comparison of fate and ecological effects of the herbicide linuron in freshwater model ecosystems between tropical and temperate regions. *Ecotox. Environ. Saf.* 72, 424-433.
- Dailey, O.D., 2004. Volatilization of alachlor from polymeric formulations. *J. Agric. Food Chem.* 52, 6742-6746.
- Dalton, M.S., Frick, E.A., 2008. Fate and transport of pesticides in the ground water systems of southwest Georgia, 1993-2005. *J. Environ. Qual.* 37, 264-272.
- Debenest, T., 2007. Caractérisation de l'impact des pollutions agricoles sur les diatomées benthiques. Ph.D. thesis. Bordeaux, Univ. Bordeaux 1, 251 pp.
- Della Bella, V., Puccinelli C., Marcheggiani S., and Mancini L., 2007. Benthic diatom communities and their relationship to water chemistry in wetlands of central Italy. *Ann. Limnol. - Int. J. Lim.* 43, 89-99.
- Devault, D.A., Merlina, G., Lim, P., Probst, J.L., Pinelli, E., 2007. Multi-residues analysis of pre-emergence herbicides in fluvial sediments: application to the mid-Garonne River. *J. Environ. Monit.* 9, 1009-1017.
- Dodds, W.K., Jones J.R., Welch E.B., 1997. Suggested classification of stream trophic state: distributions of temperate stream types by chlorophyll, total nitrogen, and phosphorus. *Water Res.* 32, 1455-1462.
- Dodds, W., 2006. Eutrophication and trophic state in rivers and streams. *Limnol. Oceanogr.* 5, 671-680.
- European Commission 2000 Directive 2000/60/EC of the European parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy. *Off. J. Eur. Communities* L327, 1-73.
- European Union, 15/12/2001. Decision No 2455/2001/EC of the European Parliament and of the council of 20 November 2001 establishing the list of priority substances in the field of water policy and amending directive 2000/60/EC. *Off. J. Eur. Communities* L331, 1-5.
- Ensz, A.P., Knapp, C.W., Graham, D.W., 2003. Influence of autochthonous dissolved organic carbon and nutrient limitation on alachlor biotransformation in aerobic aquatic systems. *Environ. Sci. Technol.* 37, 4157-4162.
- Foley, M.E., Sigler, V., Gruden, C.L., 2008. A multiphasic characterization of the impact of the herbicide acetochlor on freshwater bacterial communities. *ISME J.* 2, 56-66.
- Forney, L.J., Liu, W.-T., Guckert, J.B., Kumagai, Y., Namkung, E., Nishihara, T., Larson, R.L., 2001. Structure of microbial communities in activated sludge: potential implications for assessing the biodegradability of chemicals. *Ecotox. Environ. Saf.* 49, 40-53.
- Galassi, S., Provini, A., Mangiapan, S., Benfenati, E., 1996. Alachlor and its metabolites in surface water. *Chemosphere* 32, 229-237.
- Garland, J.L., Mills, A.L., 1991. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 2351-2359.
- Girbal, L., Hilaire, D., Leduc, S., Delery, L., Rols, J.L., Lindley, N.D., 2000. Reductive cleavage of demeton-S-methyl by *Corynebacterium glutamicum* in cometabolism on more readily metabolizable substrates. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1202-1204.
- Graham, W.H., Graham, D.W., deNoyelles Jr, F., Smith, V.H., Larive, C.K., Thurman, E.M., 1999. Metolachlor and alachlor breakdown product formation patterns in aquatic field mesocosms. *Environ. Sci. Technol.* 33, 4471-4476.
- Graham, D.W., Miley, M.K., deNoyelles, F., Smith, V.H., Thurman, E.M., Carter, R., 2000. Alachlor transformation patterns in aquatic field mesocosms under variable oxygen and nutrient conditions. *Water Res.* 34, 4054-4062.
- Hildebrandt, A., Lacorte, S., Barcelo, D., 2007. Assessment of priority pesticides, degradation products, and pesticide adjuvants in groundwaters and top soils from agricultural areas of the Ebro river basin. *Anal. Bioanal. Chem.* 387, 1459-1468.

- Hullar, M.A.J., Kaplan, L.A., Stahl, D.A., 2006. Recurring seasonal dynamics of microbial communities in stream habitats. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 713-722.
- Jackson, C.R., Churchill, P.F., Roden, E.E., 2001. Successional changes in bacterial assemblage structure during epilithic biofilm development. *Ecology* 82, 555-566.
- Kawai, S., Kurokawa, Y., Harino, H., Fukushima, M., 1998. Degradation of tributyltin by a bacterial strain isolated from polluted river water. *Environ. Pollut.* 102, 259-263.
- Knapp, C.W., Graham, D.W., Berardesco, G., deNoyelles Jr, F., Cutak, B.J., Larive, C.K., 2003. Nutrient level, microbial activity, and alachlor transformation in aerobic aquatic systems. *Water Res.* 37, 4761-4769.
- Konopka, A., Olivier, L., Turco Jr, R.F., 1998. The use of carbon substrate utilization patterns in environmental and ecological microbiology. *Microb Ecol.* 35, 103-115.
- Laabs, V., Wehrhan, A., Pinto, A., Dores, E., Amelung, W., 2007. Pesticide fate in tropical wetlands of Brazil: an aquatic microcosm study under semi-field conditions. *Chemosphere* 67, 975-989.
- Lane, C.M., Taffs, K.H., Corfield, J.L., 2003. A comparison of diatom community structure on natural and artificial substrata. *Hydrobiol.* 493, 65-79.
- Lapertot, M.E., Pulgarin, C., 2006. Biodegradability assessment of several priority hazardous substances: choice, application and relevance regarding toxicity and bacterial activity. *Chemosphere* 65, 682-690.
- Lawrence, J.R., Kopf, G., Headley, J.V., Neu, T.R., 2001. Sorption and metabolism of selected herbicides in river biofilm communities. *Can. J. Microbiol.* 47, 634-641.
- Leflaive, J., Céréghino, R., Danger, M., Lacroix, G., Ten-Hage, L., 2005. Assessment of self-organizing maps to analyse sole-carbon source utilization profiles. *J. Microbiol. Methods* 62, 89-102.
- Lock, M.A., Wallace, R.R., Costerton, J.W., Ventullo, R.M., Charlton, S.E., 1984. River epilithon: toward a structural-functional model. *Oikos* 42, 10-22.
- Lyautey, E., Lacoste, B., Ten-Hage, L., Rols J.L. and Garabétian F., 2005a. Analysis of bacterial diversity in river biofilms using 16S rDNA PCR-DGGE: methodological settings and fingerprints interpretation. *Water Res.* 39, 380-388.
- Lyautey, E., Jackson, C.R., Cayrou, J., Rols, J.L., Garabétian, F., 2005b. Bacterial community succession in natural river biofilm assemblages. *Microb. Ecol.* 50, 589-601.
- Muyzer, G., Smalla, K., 1998. Application of denaturing gel electrophoresis (DGGE) temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek* 73, 127-141.
- Novick, N.J., Alexander, M., 1985. Cometabolism of low concentrations of propachlor, alachlor, and cycloate in sewage and lake water. *Appl. Environ. Microbiol.* 49, 737-743.
- Paixao, S.M., Saagua, M.C., Tenreiro, R., Anselmo, A.M., 2006. Biodegradability testing using standardized microbial communities as inoculum. *Environ. Toxicol.* 21, 131-140.
- Papadopoulou-Mourkidou, E., Karpouzias, D.G., Patsias, J., Kotopoulou, A., Milothridou, A., Kintzikoglou, K., Vlachou, P., 2004. The potential of pesticides to contaminate the groundwater resources of the Axios river basin in Macedonia, Northern Greece. Part. I Monitoring study in the north part of the basin. *Sci. Total Environ.* 321, 127-146.
- Paule, A., Lyautey, E., Garabétian, F., Rols, J.L., 2009. Autogenic *versus* environmental control during development of river biofilm. *Ann. Limnol.- Int. J. Lim.* 45, 1-10.
- Pesce, S., Martin-Laurent, F., Rouard, N., Montuelle, B., 2009. Potential for microbial diuron mineralisation in a small wine-growing watershed: from treated plots to lotic receiver hydrosystem. *Pest Manag. Sci.* 65, 651-657.
- Preston-Mafham, J., Boddy, L., Randerson, P.F., 2002. Analysis of microbial community functional diversity using sole-carbon source utilisation profiles - a critique. *FEMS Microbiol. Ecol.* 42, 1-14.
- Rolland, T., Fayolle, S., Cazaubon, A., Pagnetti, S., 1997. Methodical approach to distribution of epilithic and drifting algae communities in a French subalpine river: interferences on water quality assessment. *Aquat. Sci.* 59, 57-73.
- Sabater, S., Guasch, H., Ricart, M., Romani, A., Vidal, G., Klünder, C., Schmitt-Jansen, M., 2007. Monitoring the effect of chemicals on biological communities. The biofilm as an interface. *Anal. Bioanal. Chem.* 387, 1425-1434.
- Sarmah, A.K., Close, M.E., Mason, N.W.H., 2009. Dissipation and sorption of six commonly used pesticides in two contrasting soils of New Zealand. *J. Environ. Sci. Heal. B* 44, 325-336.
- Schwab, A.P., Splichal, P.A., Banks, M.K., 2006a. Adsorption of atrazine and alachlor to aquifer material and soil. *Wat. Air Soil Pollut.* 177, 119-134.
- Schwab, A.P., Splichal, P.A., Banks, M.K., 2006b. Persistence of atrazine and alachlor in ground water aquifers and soil. *Wat. Air Soil Pollut.* 171, 203-235.
- SCOR-Unesco., 1966. Determination of photosynthetic pigments in sea water. *Monogr. Oceanogr. Method Unesco*, 1.
- Stamper, D.M., Tuovinen, O.H., 1998. Biodegradation of the acetanilide herbicides alachlor, metolachlor, and propachlor. *Crit. Rev. Microbiol.* 24, 1-22.
- Stasinakis, A.S., Kotsifa, S., Gatidou, G., Mamais, D., 2009. Diuron biodegradation in activated sludge batch reactors under aerobic and anoxic conditions. *Water Res.* 43, 1471-1479.
- Struijs, J., Van den Berg, R., 1995. Standardized biodegradability tests - extrapolation to aerobic environments. *Water Res.* 29, 255-262.
- Taghavi, L., Probst, J.L., Merlina, G., Marchand, A.L., Durbe, G., Probst, A., 2010. Flood event impact on pesticide transfer in a small agricultural catchment (Montoussé at Auradé, south west France). *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* 90, 390-405.
- Thouand, G., Capdeville, B., Block, J.C., 1996. Preadapted inocula for limiting the risk of errors in biodegradability tests. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 33, 261-267.
- Thurman, E.M., Goolsby, D.A., Aga, D.S., Pomes, M.L., Meyer, M.T., 1996. Occurrence of alachlor and its sulfonated metabolite in rivers and reservoirs of the midwestern United States: the importance of sulfonation in the transport of chloroacetanilide herbicides. *Environ. Sci. Technol.* 30, 569-574.



- Tomlin, C., 1994, editor, Pesticide Manual Book (British Council for Protection of Crops Publications, Alton, Hampshire, UK, 2006).
- Van Ginkel, C.G., Haan, A., Luijten, M.L.G.C., Stroo, C.A., 1995. Influence of the size and source of inoculum on biodegradation curves in closed-bottle tests. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 31, 218-223.
- Vazquez-Rodriguez, G.A., Palluy, F., Goma, G., Rols, J.L., 1999. Procedures in ready biodegradability testing: effects of the inoculation and the monitored parameter. *Environ. Technol.* 20, 301-308.
- Vazquez-Rodriguez, G.A., Goma, G., Rols, J.L., 2003. Activated sludge as inoculum for ready biodegradability testing: effect of source. *Environ. Technol.* 24, 979-987.
- Vazquez-Rodriguez, G.A., Garabétian F., Rols, J.L., 2007. Inocula from activated sludge for ready biodegradability testing: homogenization by preconditioning. *Chemosphere* 68, 1447-1454.
- Wilber, G.G., Wang, G.G., 1997. Biotransformation of herbicides in the presence of various electron acceptors. *J. Air Waste Manage. Assoc.* 47, 690-696.

# Comment appréhender les facteurs qui contrôlent les successions écologiques des communautés microbiennes : cas des biofilms phototrophes

---

ou de l'expérimentation en milieu naturel à une tentative de contrôle en bioréacteur innovant.

Questions :

- Quelle est l'importance relative des facteurs autogènes *versus* les facteurs environnementaux sur la structuration des communautés durant le développement des biofilms phototrophes ?
- Est-il possible de modifier la structure de communautés microbiennes benthiques et sa dynamique temporelle ? Exemple d'une expérience de transplantation en milieu naturel.
- Quel est la part du déterminisme autogène sur la structuration et la dynamique des communautés microbiennes benthiques ? Approche expérimentale en bioréacteur.

*Ce chapitre se déroule en deux sous-parties : dans une première partie, nous proposons une approche expérimentale in situ pour analyser la structuration temporelle des communautés bactériennes selon le concept de succession écologique et évaluer la possibilité d'en modifier la trajectoire par une expérience de transplantation. Dans une seconde partie, nous présentons un prototype de bioréacteur photosynthétique à écoulement de type Taylor – Couette, et nous discutons de sa capacité prometteuse à l'amélioration de nos connaissances sur les successions écologiques. Ce chapitre fait l'objet de deux articles parus dans les revues Annales de Limnologie – Int. J. Lim. (**Article 2**) et Water Research (**Article 3**).*

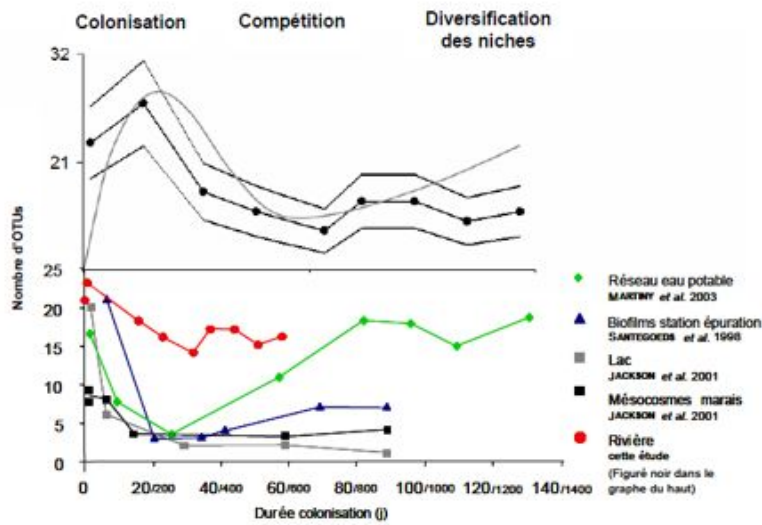
## II.1 Importance des facteurs allo- et autogènes sur les communautés bactériennes durant le développement de biofilms phototrophes

Résumé de l'article intitulé "**Autogenic versus environmental control of river bio-film**" par A.Paule, E. Lyautey, F. Garabetian et JL. Rols (2009). *Annales de Limnologie-Int.J.Lim.* 45 :1-10. (Article 2)

### II.1.1 Contexte de l'étude

Comme déjà évoqué précédemment, les communautés bactériennes des biofilms phototrophes de rivière, comme pour d'autres types d'habitats (lac, réseau d'eau potable, station d'épuration,...) (**Figure 56**), sont structurées selon des processus de succession de populations (Jackson et al. 2001). Ce concept de succession s'appuie essentiellement sur un modèle d'évolution temporelle de la diversité des communautés qui révèle la disparition ou l'apparition de taxons (ou d'OTUs) au cours du développement du biofilm (Jackson et al. 2001). Lors des premiers stades de développement, les bactéries colonisent un substrat vierge, le nombre de taxons augmente dans le temps. Suite à l'établissement du biofilm, les échanges avec la colonne d'eau diminuent, entraînant ainsi l'apparition de mécanismes de compétition entre les taxons pour les ressources ou l'habitat, ce qui engendre une diminution du nombre de taxons et une réduction d'apport de nouvelles espèces depuis la colonne d'eau (Jackson 2003) (**Figure 56**). Avec la maturation du biofilm, de nouvelles niches écologiques apparaissent à l'intérieur de l'agrégat, ce qui favorise l'installation de nouvelles populations associées parfois à de nouvelles fonctions telle que la dénitrification (Lyautey et 2005).

Le chapitre précédent confirmait l'importance d'intégrer l'existence des processus de successions écologiques dans l'expression de fonctions (la biodégradation d'un herbicide) au sein des communautés, celle-ci étant rendue possible par la typologie de leur structure. Cette observation nous amène à nous interroger sur la manière dont ces processus de successions écologiques sont réalisés pour aboutir à des structures particulières. Quels sont les facteurs qui conditionnent ces successions ? Est-il possible de modifier leurs trajectoires ? Pour tenter de répondre à ces questions, une stratégie d'approche *in situ* via une expérience de transplantation a été réalisée. Le biofilm phototrophe, par son caractère ubiquiste, son temps de génération court et son intégration rapide des changements des conditions environnementales, se présente comme un candidat particulièrement intéressant pour appréhender ces concepts de successions écologiques et leurs mécanismes.



**Figure 56** – Modèle de successions écologiques illustrées à travers l'évolution de nombre d'OTUs observée durant l'établissement de différents types de biofilms comparés au modèle proposé par Jackson (2003). Graphe du haut : nombre total d'OTUs, Graphe du bas : nombre de nouveaux OTUs (extrait de l'HDR, F. Garabetian 2006)

Ces processus de succession sont également connus pour les communautés algales benthiques. La colonisation d'un substrat vierge commence le plus souvent par l'installation d'espèces colonisatrices de diatomées (exemple *Nitzschia palea*), souvent de petite taille et présentant des vitesses de croissance très rapide (stratégie R) (Eulin et Le Cohu 1998). Ces espèces vont pouvoir favoriser en cascade l'installation des autres espèces (Stevenson 1983). Cependant, certaines conditions environnementales peuvent favoriser l'installation initiale d'algues vertes ou de bactéries hétérotrophes (Roeselers et al. 2007). Ce dernier aspect ne sera appréhendé que durant la deuxième partie de ce chapitre.

Le principal objectif de cette étude est d'évaluer l'importance relative des facteurs autogènes versus les facteurs allogènes durant le développement des biofilms phototrophes. De récentes études ont utilisé la technique de transplantation principalement lors d'études écotoxicologiques avec des pesticides en transférant les biofilms d'un site pollué à un site non pollué (e.g. Vercaene-Eairmal et al. 2010; Dorigo et al. 2010a; Rotter et al. 2011). Leur développement sur des supports fixes rend les biofilms phototrophes particulièrement bien adaptés à ce genre d'approche, qui présente tous les avantages d'un travail *in situ*.

### II.1.2 Approche expérimentale

La dynamique des communautés bactériennes des biofilms phototrophes est suivie durant leurs développements *in situ* durant 3 et 5,5 semaines sur des substrats artificiels placés sur deux sites, M et S (cf. partie II Matériel et méthodes) aux caractéristiques physico-chimiques différentes en terme de faciès, de niveau de nitrates et de pesticides, de pH et de vitesse courant, (cf. détails partie II Matériel et méthodes). A l'issue de 3 semaines d'incubation, une partie des substrats est collectée dans chaque site et transposée dans le

second site pour une durée d'incubation supplémentaire de 2,5 semaines. Les quantités de biomasses des biofilms collectés à 3 et 5,5 semaines, ainsi que la structure de leurs communautés bactériennes analysée par typage moléculaire (PCR-DGGE) de la molécule d'ADNr 16S sont évaluées et comparées.

### II.1.3 Principaux résultats et discussion

Au cours des 5,5 semaines de développement des biofilms *in situ*, un suivi des paramètres physico-chimiques est réalisé toutes les semaines dans chaque site. Seules les valeurs de température et de concentration en oxygène dissous évoluent au cours de l'incubation. Le site **M** présente des valeurs de pH, de concentration en nitrates et de conductivité plus élevées que le site **S**, résultant de caractéristiques propres à ce site (sol alcalin, pollution par les nitrates...). A l'inverse, le site **S** présente de plus fortes concentrations en phosphore total que le site **M**, assimilées à des événements de crue observés durant la période d'étude. Les deux sites présentent des niveaux de pollution identiques en termes de pesticides (sur 23 pesticides recherchés dont les concentrations sont  $> 1 \mu\text{g.L}^{-1}$ ). Les niveaux de biomasse estimés par la MSSC atteignent après 3 semaines de développement des valeurs similaires d'un site à l'autre (en moyenne  $1,4 \pm 0,22 \text{ g.m}^{-2}$ ). Par contre à l'issue de 5,5 semaines de développement, les niveaux de MSSC sont significativement différents d'un site à l'autre. Une perte de biomasse est observée pour le site **M** (de 1,4 à  $0,18 \text{ g.m}^{-2}$ ), assimilée à la présence de brouteurs (*Bithynia*). A l'inverse, les niveaux de MSSC augmentent au niveau du site **S** suggérant une croissance du biofilm (de 1,4 à  $2,6 \text{ g.m}^{-2}$ ). Les quantités de biomasse observées à 5,5 semaines sont plus faibles que les valeurs de biomasse obtenues dans la littérature (entre 15 et  $25,6 \text{ g.m}^{-2}$  dans Biggs 1996) expliquées par l'utilisation de substrats artificiels qui peuvent limiter la fixation des micro-organismes. La dynamique d'évolution des communautés bactériennes analysée par la méthode de typage moléculaire PCR-DGGE de l'ADNr 16S, révèle un total de 40 et 55 OTUs (suivant le gel de DGGE analysé, cf. **détails partie II Matériel et méthodes**). Ce nombre de taxons reste constant tout au long de la maturation du biofilm pour les deux sites avec ou sans transplantation. Les disparitions ou les apparitions de nouvelles espèces au cours du temps suggèrent des changements au sein des communautés en accord avec le modèle de succession écologique développé par Jackson (2003) pour les communautés bactériennes. L'expérience de transplantation induit également une apparition de nouvelles espèces, en moyenne 12,5 au site **M** et 10 au site **S**. Les communautés provenant des biofilms matures de 5,5 semaines transplantés ou pas, partagent 6 taxons communs. L'analyse NMDS des similarités entre les communautés bactériennes de l'ensemble des échantillons révèle un regroupement des communautés en 2 grands clusters :

- un cluster qui regroupe les échantillons en fonction de leur site d'incubation d'origine, et cela quel que soit le temps de développement. A l'intérieur de chaque cluster, une distinction apparaît entre les communautés, suivant leur état de maturation ;
- un cluster qui regroupe les échantillons après transplantation et cela quel que soit le sens du transfert, suggérant bien une modification des trajectoires de succession écologique suite à cette expérimentation.

Ces résultats permettent de mettre en évidence deux phénomènes importants qui gouvernent la structuration des communautés bactériennes : les conditions environnementales et les successions écologiques liées à la croissance et la maturation du biofilm.

Il est intéressant de noter que certains taxons à 5,5 semaines sont communs (6 OTUs) aux communautés bactériennes des biofilms transplantés ou non transplantés. La présence de ces taxons peut venir soit :

- de taxons qui, à 3 semaines de développement, présentent des niveaux de détection trop faibles et qui sont devenus dominants à la suite de processus de compétition ou d'apparition de niches écologiques qui leur sont spécifiques. Il faut noter que la méthode de PCR-DGGE ne permet de mettre en évidence que les taxons dominants au sein des communautés (Muyzer et al. 1997). Dans ce cas, nous pouvons parler d'une prédominance des facteurs autogènes ;
- de l'arrivée de nouvelles espèces présentes dans le site d'accueil. Dans ce cas, nous pouvons parler d'une influence de la part des facteurs allogènes.

Ainsi les deux types de facteurs allogènes et autogènes ont pu contrôler fortement la structuration des communautés transplantées, avec une légère prédominance pour les facteurs autogènes, sinon les biofilms transplantés présenteraient des structures identiques à celles des biofilms non transplantés. Les temps de génération extrêmement courts des bactéries auraient dû induire cette ressemblance structurelle entre les biofilms transplantés et non transplantés. Le degré de maturation des biofilms transplantés à 3 semaines, une très forte interdépendance associée à une proximité physique entre les algues et les bactéries ainsi qu'une période d'incubation après la transplantation pas suffisamment longue, pourraient expliquer cette absence de ressemblance. Avec la maturation, les biofilms deviennent de plus en plus épais et réalisent de moins en moins d'échanges avec la colonne d'eau. Les communautés bactériennes se retrouvent ainsi principalement contrôlées par les facteurs autogènes comme la compétition pour les ressources. Certains auteurs ont pu montrer que l'intervalle de temps nécessaire pour atteindre cette ressemblance peut varier de 14 à 60 jours (e.g. Rimet et al. 2005 ; Dorigo et al. 2010a et b ; Rotter et al. 2011). Ces résultats suggèrent peut être une durée trop longue des 3 premières semaines de développement des biofilms. Vu l'étroite relation et

les interactions existant entre les algues et les bactéries au sein d'un biofilm phototrophe, le suivi de la dynamique des eucaryotes par l'utilisation de la méthode de PCR –DGGE basée sur l'ADNr 18S aurait pu être envisagée. Les 2,5 semaines qui ont suivi la transplantation nous ont tout de même permis de bien intégrer les changements des communautés des biofilms transplantés sans pour autant atteindre une structure identique à celle de biofilms non transplantés.

La pression exercée par les brouteurs dans le site **M** ainsi que les événements de crues rencontrés dans le site **S** ont pu entraîner un impact sur la biomasse et ainsi provoquer l'apparition de nouveaux habitats, favorisant soit l'installation de nouvelles espèces, soit la dominance d'espèces déjà présentes au sein des biofilms.

#### **II.1.4 Conclusion et perspectives**

Cette étude révèle que :

- les facteurs allogènes apparaissent prédominants lors des premiers stades de développement des biofilms, engendrant des structures bien différentes d'un site à l'autre et à l'origine de l'orientation de la succession écologique menant à une trajectoire particulière. Avec la maturation du biofilm, les facteurs autogènes deviennent progressivement prédominants ;
- cette trajectoire de successions peut être modifiée par des changements des conditions environnementales illustrés par l'expérience de transplantation.

Travailler *in situ* apporte de nombreux avantages, notamment celui de se rapprocher des conditions environnementales réelles d'un écosystème. Mais un certain nombre de facteurs n'y est pas maîtrisé, comme par exemple les variations saisonnières, la présence de brouteurs ou d'épisodes de crue. Ces facteurs peuvent être source de stress et de perturbations pouvant être à l'origine d'une modification ou d'une interruption des successions et entraîner la réinitialisation de la dynamique des communautés (Biggs et Thomsen 1995) à ces échelles spatio-temporelles faibles (5,5 semaines) ou même masquer ces processus. Ces perturbations peuvent rendre difficile l'appréciation de l'importance relative des facteurs autogènes vis-à-vis des facteurs allogènes durant la dynamique de croissance des communautés bactériennes des biofilms.

Une nouvelle stratégie expérimentale consisterait à aborder ces concepts plus simplement en travaillant sous des conditions environnementales stables et à une échelle temporelle plus importante.

### **II.1.5 Article 2**

Les sites annotés A et L de l'article correspondent aux sites M et G du manuscrit dans son ensemble.



## Autogenic versus environmental control during development of river biofilm

Armelle Paule<sup>1,2</sup>, Émilie Lyautey<sup>1,2</sup>, Frédéric Garabetian<sup>1,2</sup> and Jean-Luc Rols<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Université de Toulouse; UPS, INP; EcoLab (Laboratoire d'Écologie Fonctionnelle); 118 route de Narbonne, 31062 Toulouse, France

<sup>2</sup> CNRS; EcoLab; 31062 Toulouse, France

Received 17 June 2008; Accepted 1st February 2009

**Abstract** – In the natural environment, microbial community structure of river biofilm is controlled by biotic and abiotic factors. This study explored the capacity to manipulate the structure of microbial communities by modifying environmental conditions during the course of biofilm development. River epilithic biofilm was cultivated *in situ* on artificial substrates placed parallel to river water flow. Substrates were incubated for 3 and 5.5 weeks in river to allow natural biofilm development, at two sites with contrasting physico-chemical characteristics. The first site (Auradé, Gers, France) was located in an agricultural watershed basin and the second site (Larroque, Haute-Garonne, France) was located in a forested watershed basin. After 3 weeks of biofilm development, a subset of substrates was collected from one site and transplanted to the second site where they remained for 2.5 further weeks. Epilithic bacterial community structure (at 3 weeks from each site and at 5.5 weeks from biofilms with and without transplantation) was assessed using PCR-DGGE of 16S rDNA fragment. Biofilm biomass was estimated using ash free dry mass (AFDM). After 3 weeks of development, biofilms from the two sites exhibited comparable AFDM values (average of  $1.4 \pm 0.2 \text{ g.m}^{-2}$ ). A difference between the two sites was observed after 5.5 weeks of development: AFDM decreased for biofilms from the agricultural watershed basin (from 1.4 to  $0.18 \text{ g.m}^{-2}$ ) as a consequence of grazing pressure (*Bithynia*), and increased for biofilms from the forested agricultural watershed (from 1.4 to  $2.6 \text{ g.m}^{-2}$ ). Microbial community analyses revealed a differentiated community structure between biofilms from the different sites and exhibited a change of microbial community structure after 5.5 weeks of biofilm development. These observations confirm a process of ecological succession in microbial communities. Changing the incubation site during biofilm development modified the trajectory of these ecological successions, suggesting that site characteristics mainly conditioned the structure of these microbial communities.

**Key words:** Colonization experiment / community structure / grazing / microbial ecology / succession

### Introduction

Epilithic biofilms are microbial aggregates constituted by heterotrophic micro- and meio-organisms (*e.g.*, bacteria, protozoan) and phototrophic micro-organisms (*e.g.*, diatoms, cyanobacteria), embedded in a exopolymeric substances matrix secreted by the microorganisms (Lock *et al.*, 1984). Epilithic biofilm development occurs at the interface between river bed substrates (pebbles) and the water column where hydrodynamics, light and geomorphological characteristics favor the development of a sessile biomass (Wetzel, 1983). Typically, epilithic biomass is dominated by the algal component of the community (Peterson, 1996). In lotic systems, epilithic biofilms

represent a major compartment involved in primary production (Dodds, 2006), mineralization and element recycling processes (*e.g.*, dissolved organic carbon dynamics, Romani *et al.*, 2004) and participate in autotrophication (Sabater *et al.*, 2002; Teissier *et al.*, 2007) and biodegradation of pollutants in aquatic environments (Lawrence *et al.*, 2001; Sabater *et al.*, 2007).

Epilithic biofilm functioning is conditioned by the community structure and diversity. Overall, epilithic biofilm structure can be influenced by (i) abiotic parameters such as water temperature (DeNicola, 1996), nutrient availability (Bothwell, 1993; Della Bella *et al.*, 2007), substrate types (Murdock and Dodds, 2007), hydrodynamics (Biggs, 1996; Battin *et al.*, 2003), light (Wetzel, 1983; Boston and Hill, 1991; Hill, 1996) or pollutants (Lawrence *et al.*, 2005; Tornes *et al.*, 2007; Morin *et al.*,

\*Corresponding author: [rols@cict.fr](mailto:rols@cict.fr)

2008; Tlili *et al.*, 2008); and by (ii) biotic interactions such as predation and competition (Bourassa and Cattaneo, 1998; Jackson *et al.*, 2001).

Epilithic biofilm development was demonstrated to be associated with population succession processes, both for the algal and the bacterial compartments. Colonization of bare substrates is completed by early-colonizing diatoms which will modify the microenvironment and favour the settlement and colonization of other communities (Stevenson, 1983). However, some environmental conditions can favour initial colonization of green algae (high light intensities) or of heterotrophic bacteria (low light intensities) (Roeseleers *et al.*, 2007). After initial colonization, succession of diatom populations associated with the biofilm development was recorded (Eulin and Le Cohu, 1998). Succession processes were also demonstrated for epilithic bacterial communities and were associated to biofilm maturation (Manz *et al.*, 1999; Jackson *et al.*, 2001; Araya *et al.*, 2003). Biofilm maturation can ultimately promote the occurrence of micro-niches within the aggregate that will favour the development of populations involved processes such as denitrification (Lyautey *et al.*, 2005a). According to a succession model, late development stages are associated with a decrease of the exchanges between the water column and the biofilm, and with an increase of species interaction within the aggregate (Jackson, 2003). The main interaction is competition, which results in a decrease of the number of new species added to the community in late development stages (Santegoeds *et al.*, 1998; Jackson, 2003; Lyautey *et al.*, 2005a).

Because of its ubiquitous character, short generation time, sessile nature, and rapid response to changes in environmental conditions, epilithic biofilms are widely used as bioindicators of water quality in lotic systems (Burns and Ryder, 2001). The algal compartment, and more especially diatoms, is used to assess water quality using the Diatoms Biological Index (Prygiel and Coste, 1993). Bacteria are also sensitive to environmental or human-induced perturbations. A spatial heterogeneity of bacterial communities was recently reported along an upland river gradient, and was related to temperature and pH variations (Anderson-Glenna *et al.*, 2008). Seasonal variations of environmental parameters proved to cause recurrent changes in community structure (Hullar *et al.*, 2006). Anthropogenic perturbations also proved to influence bacterial community structures (Lyautey *et al.*, 2003; Brümmer *et al.*, 2004).

In the present work, we conducted a 5.5 weeks colonization experiment: epilithic biofilm development was carried out on artificial substrates at two sites presenting contrasting environmental conditions. After 3 weeks of development, epilithic biofilms were either left for 2.5 more weeks at the same site, or were transplanted to the other study site where they were left for 2.5 more weeks of development. Bacterial community composition was assessed using 16S rDNA based PCR-DGGE on 3 and 5.5 weeks old biofilms from transplanted and unmoved communities. The objectives of this study were to (i) assess

bacterial community structure changes during biofilm development; (ii) compare bacterial community structures at two contrasting sites; and (iii) evaluate the influence of a transplantation during biofilm development on bacterial communities. The transplantation process was intended to assess the relative influence of autogenic (succession) and allogenic (environmental conditions) parameters on epilithic bacterial communities.

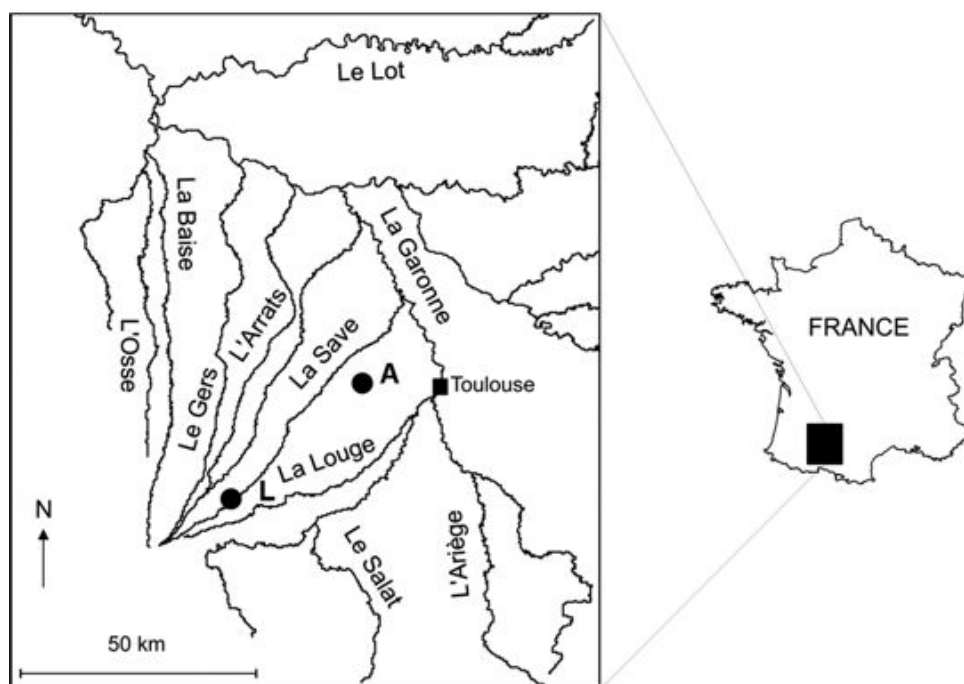
## Materials and methods

### Study sites

Two sites (sites L and A) exhibiting different physico-chemical parameters were chosen to carry out *in situ* epilithic biofilm cultures (Fig. 1). Site L on the Save River is located in a forested watershed basin. The study site is located upstream of Save Gorges and at 2 km of the city of Larroque (France) (43°11'43.77"N/00°36'28.59"E). The basin is dominated by forested and pasturage landscapes. The river bed is very rocky and wide 6.7 m. During biofilm development, the average water depth was of 50 cm and the flow velocity (flow velocity meter, Flo-mate model 2000) was about 1 m.s<sup>-1</sup> during low water periods and 3 m.s<sup>-1</sup> during high water periods. Site A on the Montoussé stream is located in an experimental agricultural watershed basin outlet (328 ha) of Auradé city (France) (43°33'55.06"N/1°3'30.92"E). The area is dominated by an agricultural landscape and reported as highly contaminated by pesticides and nitrate. The main cultivated crops are wheat and sunflower. The river bed is sedimentary, confined (1.5 m wide), and woody. Water depths (50 cm) and flow velocity (0.045 m.s<sup>-1</sup>) were constant during the biofilm development period.

### Experimental protocol and sample collection

Biofilm *in situ* colonization was carried out between March 22 and April 30, 2007 to cover the pesticide application period in the experimental agricultural watershed basin. Artificial substrates were immersed in river water to allow *in situ* epilithic biofilm colonization and development. The use of artificial substrates permitted (i) to reduce the subjectivity of sample collection; (ii) to ease biofilm scraping; and (iii) to compare two stations with different physico-chemical characteristics (Cattaneo and Amireault, 1992). Moreover, no natural substrate was available at site A. Cleaned and smooth glass slides (244 × 78 mm) were chosen as uniform artificial substrates. Glass slides were supported vertically within plastic trays (400 × 300 × 100 mm) and recovered by a 5-mm mesh wire fence, as described by Morin *et al.* (2008). Every tray was made up of four glass slides which represented four replicates. Plastic trays were submerged about 20 cm below the water surface, and placed parallel to water flow, in order to avoid sedimentary deposit on glass slides and to promote micro-organisms fixation. Biofilm colonization



**Fig. 1.** Location of the two sites (black dots) chosen for *in situ* epilithic biofilm cultures. Site L is located in a forested watershed and site A is located in an agricultural watershed.

was performed as follows: three glass slide tray tracks were placed at each of the two sites. For each site, four glass slides were sampled randomly after 3 weeks of biofilm development, and four glass slides were sampled after 5.5 weeks of biofilm development. The last set of four glass slides for which biofilm has initially developed for 3 weeks at one site were removed from their site of origin and transplanted in the other site where biofilm was left for 2.5 further weeks of development. In summary, experimental conditions included two study sites with different environmental conditions, two incubation period lengths (3 and 5.5 weeks, A and AA for site A, and L and LL for site L, respectively) and a transplantation of the biofilms during development (LA: from site L to site A, and AL: from site A to site L). After collection, glass slides were transported to the laboratory in cool bottles within moisturized garbage bags. Biofilm was removed from glass slides by scraping with a toothbrush, previously treated with NaOH 1 N in order to avoid all trace of DNA and by scraping with a microscope blade. Biofilm was suspended in 90 mL of river water previously filtered through a 0.2  $\mu\text{m}$  pore size filter (cellulose acetate membrane, Whatman) and homogenised (13 500 rpm, Ultra Turrax, T25). Biofilm suspension was aliquoted for further analyses.

#### Physico-chemical characteristics analysis

Water physico-chemical characteristics of each study site were estimated during the biofilm development period. Temperature, conductivity, dissolved oxygen concentration and pH were measured *in situ* using specific electrodes. Conductivity and pH values were measured with a

conductimeter Hanna HI 99 1300 and a pH meter 320 WTV (electrodes Sentix41), respectively. Dissolved oxygen concentration values were determined with an Oxi323 oxymeter (electrodes oxical-S) and temperature values were represented by the mean values that were determined by pH meter and oxymeter. In parallel, water samples were collected to assess the water quality using the following parameters: nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ), total phosphorus and ammonium ( $\text{N-NH}_4^+$ ) concentrations. These parameters were measured by classic colorimetric methods (Secoman, Uvi Light, XT5) according to standard methods (APHA, 1992). Ammonium concentrations were determined within 10 h following sampling. Dissolved organic carbon (DOC) concentrations were determined in water filtered through a 0.45  $\mu\text{m}$  pore size filter (cellulose acetate membrane, 25 mm diameter, Whatman) and analyzed using a platinum catalyzer at 680  $^\circ\text{C}$  (Shimadzu, Model TOC 5000). All measures and sampling were performed in the morning to allow homogeneity between samples and once or twice a week. Water samples were refrigerated during transport to the laboratory. Twenty three pesticides, commonly used in the southwest of France, among which 17 herbicides (Aclonifen, Atrazine, Atrazine desethyl, Chlorotoluron, Cyanazine, Hexazinone, Imazathabenz-methyl, Isoproturon, Linuron, Metazachlor, Metolachlor, Metoxuron, Monolinuron, Sebuthylazine, Simazine, Terbutylazine, Trifluralin) and six fungicides (Cyproconazol, Epoxiconazol, Fenpropimorph, Flusilazol, Pendimethalin, Tebuconazol) were quantified at three times during biofilm development: T0 corresponds to the time of artificial substrates positioning, T3 and T5 correspond to 3 and 5.5 weeks of colonization, respectively. Three liters of water were collected in closed glasses bottles previously

cleaned and sterilized by autoclaving. For every sample, 10 mL of dichloromethane were added to 1.5 L of water. Then, samples were kept in a cold chamber at 4 °C. Pesticides were extracted from water using dichloromethane, and pesticides levels were quantified by Gas Chromatography Mass Spectrometer (GC-MS, Thermo Fisher, Model Trace DSQ), according to Devault *et al.* (2007).

### Biomass determination

Dry mass (DM) was measured by weighing the dried pellet (24 h at 80 °C) from an aliquot of 10 mL of biofilm suspension (centrifuged at 3500× *g* for 25 min, Heraeus Function Line). The pellet was subsequently combusted (8 h at 550 °C) to provide the ash free dry mass (AFDM). Another 10-mL aliquot of the biofilm suspension was centrifuged (12 000× *g*, 20 min, 4 °C). After removing the supernatant, Chlorophyll *a* content of the pellet was determined following an extraction in 90% acetone by spectrophotometry according to SCOR-Unesco (1966). Autotrophic index (AI) was defined as the ratio between AFDM and Chlorophyll *a* (APHA, 1992; Steinman and Lamberti, 1996), and indicates the relative importance of autotrophic organisms *versus* heterotrophic organisms and detritus. For each sample, the ratio between AFDM and DM was determined to indicate the relative importance of organic fraction in the biofilm.

### Microbial community structure

After centrifugation (12 000× *g* at 4 °C for 20 min, Heraeus Multifuge) of an aliquot of 10 mL of the initial biofilm suspension, the pellet was stored at – 80 °C until further analysis. Genomic DNA extraction was performed on the pellet using Ultra Clean TM Soil DNA Isolation kit according to the manufacturer's protocol (Mobio Laboratories). The extracted DNA concentration was quantified by fluorimetry (Fluoroscan Ascent, LabSystem) using SYBR green (Sigma Aldrich). The 16S rDNA variable regions V3 to V5 were amplified using primers (Proligos) described as universal within the Bacteria domain: 341F (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3') with a 40 bp GC sequence clamped at its 5' end (5'-CGCCCGCCGCGC-CCCGCGCCCGTCCCCGCCGCCCGCCCG-3') and 907F (5'-CCGTC AATTCMTT TTAGATTT-3') (Muyzer and Smalla, 1998). Amplification was carried out using an Eppendorf Mastercycler following a protocol described elsewhere (Lyautey *et al.*, 2005b) using 20 ng of extracted DNA as template for the PCR. Three replicate amplifications were performed for each sample. Amplified product concentrations were quantified on a 1.65% agarose gel (Eurogentec) using precision Molecular Mass Ruler (BioRad) as described previously (Lyautey *et al.*, 2005b). DGGE was carried out using D-Code Universal Mutation Detection System (BioRad). An amount of 700 ng (approximately 234 ng from each of the three sample replicates) of PCR products were loaded onto an

acrilamide gel containing a gradient of denaturant ranging from 35 to 70% (100% denaturant is 7 M urea and 40% deionized formamide). For practical purposes (only 20 samples can be processed on each DGGE gel), the four replicates of the six samples were processed on two different DGGE gels (two replicates of each sample on each DGGE gel). The replicate 2 from 5.5 week biofilm sample of site L (LL2) exhibited in the DGGE analysis a number of bands drastically lower (< 10 OTUs) than the three other replicates suggesting that a methodological problem happened with this sample, either during DNA extraction or DNA amplification. Data from this sample were thus not included in the analysis. Electrophoresis was performed at 100 V for 18 h at 60 °C. The gels were stained with SYBR Green (Sigma Aldrich) for 30 min. The gel image was captured using a CCD camera and Biocapt Software (Vilbert Lourmat) and analyzed using BioNumerics 5.1 software (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium).

### Data analysis

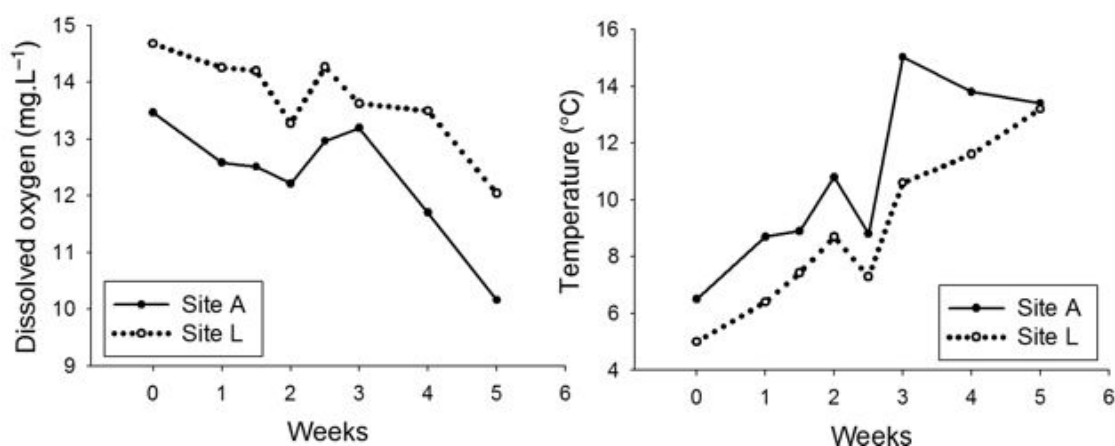
In order to avoid methodological biases due to DGGE intergel variability, each gel were analyzed separately. DGGE bands (defined as operational taxonomic units (OTUs)) were scored as present or absent from DGGE gel analysis. A matrix was constructed from the Jaccard similarity index ( $J = c/(a + b + c)$  where *a*, the number of bands found only in sample A, *b*, the number of bands found only in sample B and *c*, the number of bands shared between samples A and B). To assess changes in the microbial community structure during biofilm development, DGGE patterns were analyzed by non-metric multidimensional scaling (NMDS) analysis as described elsewhere (Van Hannel *et al.*, 1999). NMDS analysis is a mathematical technique which provides a graphical representation of every band pattern (sample) as one plot where relative changes in community structure can be interpreted as distances between the plots. The closer the plots are to each other, the more similar are the DGGE banding patterns. NMDS was carried out using SPSS 13.0 software for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) using a stress value < 0.1.

The difference in physical chemical characteristics between stations and the difference in DM, AFDM, Chlorophyll *a*, number of bands on DGGE banding patterns between biofilm samples were assessed with the Kruskal Wallis test using SPSS 13.0 software for Windows. Differences were considered statistically different at  $P < 0.05$ .

## Results

### Water physico-chemical parameters

For each site, water physico-chemical parameters values presented below represent average value



**Fig. 2.** Weekly evolution of dissolved oxygen concentrations and temperatures for site A (black dots) and site L (white dots) during the period of *in situ* biofilm colonization. “Week = 0” indicates the date where artificial substrates were placed *in situ* (March 22, 2007).

**Table 1.** Cumulated pesticide concentrations measured in river water from study sites A and L for three dates (T0, T3, and T5). T0 corresponds to the time of artificial substrates positioning, T3 and T5 correspond to 3 and 5.5 weeks of colonization, respectively. All concentrations are expressed in  $\mu\text{g.L}^{-1}$ .

	T0	T3	T5
A	1.02	3.03	4.78
L	3.59	3.75	2.17

( $\pm$  standard deviation) from the eight water samples collected during biofilm development (Fig. 2). Water temperatures were comparable between site A ( $10.9 \pm 3^\circ\text{C}$ ) and site L ( $8.8 \pm 2.8^\circ\text{C}$ ) ( $P = 0.128$ ). Dissolved oxygen concentrations measured at site A ( $12.3 \pm 1 \text{ mg.L}^{-1}$ ) were significantly lower than at site L ( $13.7 \pm 0.8 \text{ mg.L}^{-1}$ ) ( $P < 0.01$ ). For both sites, temperature increased and dissolved oxygen concentrations decreased during the experimental period, in accordance to seasonal variations. pH and conductivity values remained constant for both sites over the sampling period, but were significantly different between sites. pH values were above 7 for site A ( $7.6 \pm 0.1$ ) and were lower for site L ( $6.2 \pm 0.4$ ) ( $P < 0.001$ ). Conductivity was higher at site A ( $725 \pm 8 \mu\text{S.cm}^{-1}$ ) than at site L ( $128 \pm 4 \mu\text{S.cm}^{-1}$ ) ( $P < 0.001$ ). Site A is located in a calcareous watershed basin which explained conductivity and pH values. Nitrate concentrations remained constant over time for both sites with higher  $\text{NO}_3^-$  values recorded for site A ( $41 \pm 1.2 \text{ mg.L}^{-1}$ ) than for site L ( $7 \pm 0.6 \text{ mg.L}^{-1}$ ) ( $P < 0.001$ ). No difference was observed for  $\text{N-NH}_4^+$  concentration values between site A ( $16 \pm 4 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) and site L ( $25 \pm 12 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) ( $P = 0.382$ ). Total phosphorus concentrations were significantly lower for site A ( $17 \pm 5 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) than for site L ( $63 \pm 34 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) ( $P < 0.001$ ). Two flood events at site L were recorded during the colonization period. DOC concentrations available were obtained for site A in 2008 (from March to April,  $n = 10$ ) and for site L in 2004 (from February to May,  $n = 6$ ). DOC concentrations were higher at site A ( $2.25 \pm 0.07 \text{ mg.L}^{-1}$ ) than at site L ( $1.32 \pm 0.08 \text{ mg.L}^{-1}$ ) ( $P < 0.05$ ).

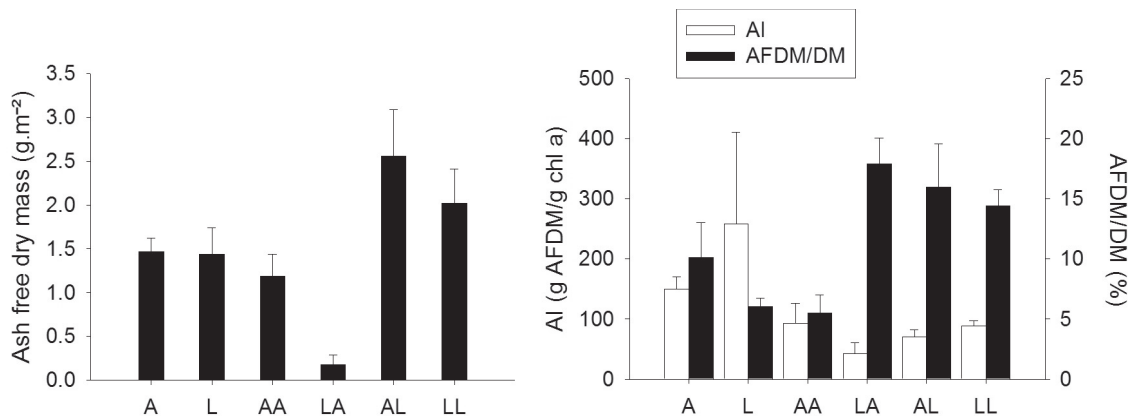
Thirteen of the 23 pesticides tested were detected with a concentration above  $0.1 \mu\text{g.L}^{-1}$  at least once during the study period. Cumulated pesticide concentrations are presented in Table 1. Contamination levels by pesticides on both sites were from 1 to  $5 \mu\text{g.L}^{-1}$  during biofilm development. Concentrations were in the same order of magnitude for both sites at each period.

### Biomass descriptors

AFDM values ranged from  $0.18$  to  $2.6 \text{ g.m}^{-2}$  (Fig. 3). After 3 weeks of development, biofilms from sites L and A exhibited comparable AFDM values around  $1.4 \text{ g.m}^{-2}$  ( $P = 0.773$ ). After 5.5 weeks of development, biofilms from site L (AL and LL) (up to  $2.6 \text{ g.m}^{-2}$ ) exhibited higher AFDM levels than 5.5-weeks biofilms from site A (LA and AA) (down to  $0.18 \text{ g.m}^{-2}$ ) ( $P < 0.001$ ). At site L, important biomass were consistent with the growth process and biofilm accretion, whereas the low biomass recorded at site A were consistent with the occurrence of grazing as revealed by the presence of several *Bithynia* molluscs (*Prosobranchia*, *Bithyniidae*) on glass slides. AFDM/DM ratio values ranged from 6.0 to 17.8%. Low values reveal a biofilm rich in detritus and sedimentary particles. These sedimentary particles are likely to have been imported by the two flood events observed in site L and by the presence of sediments on river bed in site A. Important standard deviation values were caused by the presence of filamentous algae which decreased the homogeneity of biofilm samples. The autotrophic index (AI) values ranged between 42 and 258. Three weeks old biofilms exhibited higher AI levels than 5.5 weeks old biofilms ( $P < 0.001$ ), indicating that late stages were essentially constituted by autotrophic organisms.

### Microbial community structure

The number of bands (OTUs) obtained for each experimental conditions are presented in Table 2. Analysis



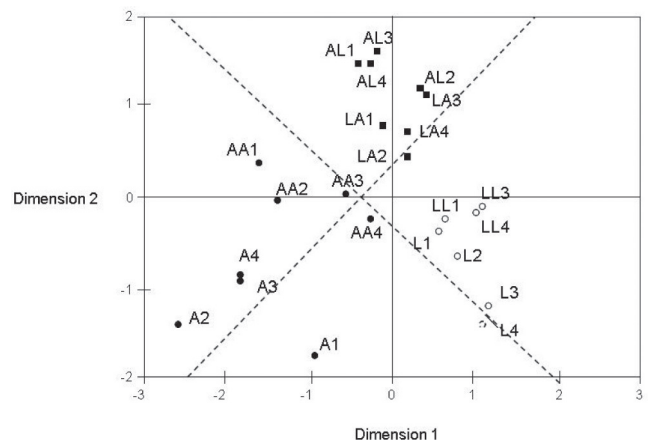
**Fig. 3.** Average  $\pm$  SD value plots of ash free dry mass (AFDM), autotrophic index (AI, white bars) and AFDM/DM ratio (black bars) for biofilm samples according to the different experimental conditions: A, L, AA, LA, AL and LL (refer to materials and methods for the letters meaning).

**Table 2.** Number of bands (OTUs) obtained from DGGE pattern analysis for different experimental conditions (A, L, AA, LL, AL and LA, refer to materials and methods for the letters meaning). Four replicates (numbers 1 to 4) were analyzed for each condition.

	A	L	AA	LL	AL	LA
1	58	52	57	61	54	54
2	56	60	51	–	54	51
3	36	33	39	40	48	37
4	34	31	42	39	48	38

of DGGE banding patterns revealed a total of 66 and 94 OTUs for gel 1 (replicates numbers 3 and 4 of each samples) and gel 2 (replicates 1 and 2), respectively. The average number of OTUs per sample varied from 34 and 56 for communities from 3-week biofilm to 40 and 55 for 5.5-week biofilm communities, for gel 1 and gel 2, respectively, indicating a constant richness along with biofilm maturation ( $P=0.371$ ) and the transplanted experiment ( $P=0.752$ ). Along with biofilm development new species appeared in the communities. An average of 15 OTUs appeared at site A between 3 week old and 5.5 week old communities and an average of 12.5 OTUs appeared at site L. At the same time, the disappearance of OTUs along with the aggregate development was observed, with an average number of 9 OTUs disappearing for both sites. The transplanted experiment also induced the appearance of news OTUs: 12.5 at site A and 10 at site L. Mature biofilms both from the transplanted communities and from the untransplanted biofilms only shared six common OTUs.

NMDS analysis was carried out on the presence-absence matrix separately for each DGGE gel following by a superposition of both dimension representation plots (Fig. 4). NMDS takes the community-level similarity of the samples. The stress values of final configuration were 0.123 and 0.105 and the proportions of variance explained were 0.93 and 0.94. The proximity between replicates on the plot revealed an important similarity of the DGGE banding patterns. Three and 5.5 week old biofilm



**Fig. 4.** Two dimension representation plot of non-metric multidimensional scaling (NMDS) analysis of DGGE banding patterns from the two gels analyzed in the present work for bacterial communities from 3 and 5.5 week biofilms from site L (white dots) and from site A (black dots) and from transplanted biofilms (dark squares). Plots issued from the first DGGE gel were rotated ( $45^\circ$  counterclockwise – axis represented by dashed lines) to allow superposition of plots from gels 1 and 2. The numbers 1, 2, 3 and 4 indicate replicates from one same experimental condition.

communities from sites A and L exhibited differentiated structures according mainly to the different incubation sites and then to the state of maturation of the aggregate. Bacterial communities from the transplanted samples differed according to their site of origin (three first weeks of development) and of the site they were transplanted to. NMDS analysis showed that differentiated bacterial community structures were mainly mediated by the environmental conditions.

## Discussion

The primary objectives of this work were to evaluate the relative importance of development and of environmental

conditions on epilithic biofilm bacterial community dynamics.

The choice of the two study sites proved to be relevant for the purpose of this work since different environmental conditions were recorded during the study period. Hydrodynamics, which discriminated the two sites, generally causes substrate instability, and can generate a loss of biomass during flood events (Biggs, 1996). To minimize the importance of this parameter and to homogenize growth between our two study sites, biofilms were cultivated on artificial substrates. Artificial substrates prevent the occurrence of biases due to intra- and inter-site variations during sampling. Although it has been suggested that substrate properties such as surface roughness or hydrophobicity can influence bacterial community structure (Anderson-Glenna *et al.*, 2008), it was shown that artificial substrate support the development of algal community composition representative of natural communities (Eulin and Le Cohu, 1998; Barbiero, 2000; Lane *et al.*, 2003). However, artificial substrate ability to reproduce natural communities remains controversial (Cattaneo and Amireault, 1992). The water physico-chemical parameters of the two study sites were very contrasted. Site A, located in an agricultural watershed basin, was characterized by high levels of pH, conductivity, nitrate and DOC concentrations. Site L, located in a forested watershed basin, was mainly characterized by its higher total phosphorus concentrations. Concerning pesticides, the two sites presented similar levels of contamination. On the basis of environmental factors, sites A and L are clearly discriminated by their trophic states.

The choice of the incubation period length was based on the dynamic of epilithic biofilm growth occurring in large rivers (Lyautey *et al.*, 2005a; Boulétreau *et al.*, 2006). Epilithic biofilm growth is defined by an accretion phase related to colonization and growth processes and characterized by an increase of AFDM resulting in a biomass peak. Observed AFDM variations were consistent with previous experiments: at site L, epilithic biofilms presented a biomass increase over time (colonization and growth) whereas at site A, a biomass decrease was observed after three weeks. The presence of aquatic *Bithynia* molluscs (*Prosobranchia*, *Bithyniidae*) on glass slides suggests that the disturbance was due to a grazing event. The biomass removal was more important for biofilms transplanted from site L to site A suggesting that they might have been more attractive for the invertebrates. The maximum biomasses reached in the present work were slightly below those previously recorded in the literature (up to 12 g AFDM.m<sup>-2</sup> in Lyautey *et al.* (2003) and between 15 and 25.6 g AFDM.m<sup>-2</sup> in Biggs (1996)). These lower biomasses could be explained by (i) a shorter growth period in the present work (5.5 weeks) as opposed to up to 11 weeks in Biggs (1996); (ii) a limited adhesion of cells due to nature of the substrates used; or (iii) a limited nutrient availability (Dodds *et al.*, 1997). The low AFDM/DM values recorded in the present work suggest that biofilms were rich in detritus and sedimentary particles despite artificial supports being parallel to flow. Sedimentary

particles were likely imported by the two flood events observed in site L and by the presence of sediments on river bed in site A. The autotrophic index indicates the relative importance of autotrophic *versus* heterotrophic organisms and detritus. With values between 42 and 258, epilithic biofilms described here were stable and constituted by equivalent proportions of photoautotrophic and heterotrophic microorganisms (Bourassa and Cattaneo, 1998).

Bacterial community composition was assessed using 16S rDNA based PCR-DGGE. Methodological biases (chimera and heteroduplex formation, template annealing, detection of the dominant populations) are well known and have been widely discussed in the literature (Muyzer *et al.*, 1993). Applied to epilithic biofilms, the use of Eubacteria-specific primers was proved to over-estimate bacterial richness by allowing the amplification of cyanobacteria and plastid DNA (Lyautey *et al.*, 2005b). With averages of 40 (replicates 3 and 4) to 55 (replicates 1 and 2) OTUs per sample of 5.5-week biofilm, bacterial richness was higher than the richness observed for epilithic biofilm grown on artificial substrates (Cody *et al.*, 2000; Araya *et al.*, 2003; Dorigo *et al.*, 2007), natural substrates (Lyautey *et al.*, 2005a), and bacterial communities from phytoplankton in tropical water bodies (Dumestre *et al.*, 2002) or in marine environment (Schauer *et al.*, 2000). This could reflect limited niches and resource availability or much harsher environment caused by continual grazing and sloughing processes (Anderson-Glenna *et al.*, 2008). The use of artificial substrates did not seem to affect bacterial community richness.

Dynamics of biofilm bacterial community were assessed at two sampling dates (at 3 and 5.5-week development) which reveals constant richness values during biofilm maturation but the appearance or the disappearance of species suggest changing bacterial communities and then a species succession consistent with theoretical models of biofilms succession (Jackson, 2003). Observed succession is thus mostly driven by autogenic processes. Allogenic factors also influence bacterial community composition, and can explain the differences observed between the two sampling sites. In freshwater environments, it was suggested that pH, temperature, and nutrient availability were correlated with variations of structure (Lyautey *et al.*, 2003; Hullar *et al.*, 2006). Turbulent flow was also demonstrated to influence bacterial community composition during the biofilm initial growth phase, by selecting the pioneer algal species that will create the biofilm microenvironment (Besemer *et al.*, 2007).

The transplant experiment was intended to assess the relative influence of autogenic (succession) and allogenic (environmental conditions) parameters on epilithic bacterial communities. Epilithic biofilm community development initially occurred in two separate stream environments characterized by their proper trophic states, and then some of the biofilms were transplanted to the second environment for further development. It appeared that transplantation contributed to modifications of the bacterial communities, and modified the trajectory of

the epilithic biofilm succession. However, the fact that some OTUs were commons between 5.5 week biofilms with and without transplantation indicates that succession was also involved in the temporal differentiation process by allowing common populations, either already present at time 3 weeks but below detection level or inoculated from surface waters from both sites, to develop in the aggregate. This implicates an influence of allogenic factors over autogenic ones. Our results suggest that the three initial weeks of biofilm development were too long to already determine the bacterial community composition and the 2.5 weeks of development following transplantation allowed to modify the community. Hypothetically, grazing might favour the addition of new species by decreasing the number of competitive species or by increasing vacant microhabitats. However, such a phenomenon was not observed, probably because the period of time between grazing and sample collection was too short to allow the initiation of a secondary ecological succession.

The present work confirmed that bacterial community structure was initially controlled by allogenic factors and then followed a succession pattern dominated by autogenic factors. Transplantation modified the structure and dynamics of epilithic bacterial communities that revealed the importance of allogenic factors on bacterial community successions. It could have been of interest to link the functional diversity with bacterial community structure during epilithic biofilm development and following transplantation, by identifying the populations that appeared in the community. A minimal number of species is responsible for stability and function in ecosystem processes, and all changes in this biodiversity could cause processes changes (Chapin *et al.*, 2000; Loreau *et al.*, 2001). According to the experimental design used, it could be hypothesized that bacterial community structure changes would reflect variations of functional diversity. Epilithic biofilm could thus represent a powerful model to study relationships between structure and function in aquatic ecosystem.

*Acknowledgements.* We thank D. Dalger and G. Merlina for water chemistry analysis, J.L. Probst for DOC values and Y. Nicaise for PCR-DGGE analysis. We also thank the "Association des Agriculteurs d'Auradé" for the access to site A.

## References

- Anderson-Glenna M.J., Bakkestuen V. and Clipson N.J.W., 2008. Spatial and temporal variability in epilithic biofilm bacterial communities along an upland river gradient. *FEMS Microbiol. Ecol.*, *64*, 407–418.
- APHA., 1992. Standard methods for the examination of water and wastewater, American Public Health Association, Washington DC.
- Araya R., Tani K., Takagi T., Yamaguchi N. and Nasu M., 2003. Bacterial activity and community composition in stream water and biofilm from an urban river determined by fluorescent *in situ* hybridization and DGGE analysis. *FEMS Microbiol. Ecol.*, *43*, 111–119.
- Barbiero R.P., 2000. A multi-lake comparison of epilithic diatom communities on natural and artificial substrates. *Hydrobiologia*, *438*, 157–170.
- Battin T.J., Kaplan L.A., Newbold J.D. and Hansen C.M.E., 2003. Contributions of microbial biofilms to ecosystem processes in stream mesocosms. *Nature*, *426*, 439–442.
- Besemer K., Singer G., Limberger R., Chlup A.K., Hochedlinger G., Hödl I., Baranyi C. and Battin T.J., 2007. Biophysical controls on community succession in stream biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.*, *73*, 4966–4974.
- Biggs B.J.F., 1996. Patterns in Benthic Algae of Stream. In: Stevenson R.J., Bothwell M.L., Lowe R.L. (eds.), *Algal Ecology – Freshwater Benthic Ecosystem*, Academic Press, San Diego, 31–56.
- Boston H.L. and Hill W.R., 1991. Photosynthesis-light relations of stream periphyton communities. *Limnol. Oceanogr.*, *36*, 644–656.
- Bothwell M.L., 1993. Algal-nutrient dynamics. *J. N. Amer. Benthol. Soc.*, *12*, 313–333.
- Boulêtreau S., Garabetian F., Sauvage S. and Sanchez-Pérez J.M., 2006. Assessing the importance of a self-generated detachment process in river biofilm models. *Freshwat. Biol.*, *51*, 901–912.
- Bourassa N. and Cattaneo A., 1998. Control of periphyton biomass in Laurentian streams (Quebec). *J. N. Amer. Benthol. Soc.*, *17*, 420–429.
- Brümmer I.H.M., Felske A.D.M. and Wagner-Döbler I., 2004. Diversity and seasonal changes of uncultured *Planctomycetales* in river biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.*, *70*, 5094–5101.
- Burns A. and Ryder D.S., 2001. Potential for biofilms as biological indicators in Australian riverine systems. *Ecol. Manage. Restor.*, *2*, 53–63.
- Cattaneo A. and Amireault M.C., 1992. How artificial are artificial substrata for periphyton? *J. N. Amer. Benthol. Soc.*, *11*, 244–256.
- Chapin F.S., Zavaleta E.S., Eviner E.S., Eviner V.T., Naylor R.L., Vitousek P.M., Reynolds H.L., Hooper D.U., Lavorel S., Sala O.E., Hobbie S.E., Mack M.C. and Diaz S., 2000. Consequences of changing biodiversity. *Nature*, *405*, 234–242.
- Cody D.G., Heath R.T. and Leff L.G., 2000. Characterization of benthic bacterial assemblages in a polluted stream using denaturing gradient gel electrophoresis. *Hydrobiologia*, *432*, 207–215.
- Della Bella V., Puccinelli C., Marcheggiani S. and Mancini L., 2007. Benthic diatom communities and their relationship to water chemistry in wetlands of central Italy. *Ann. Limnol. - Int. J. Lim.*, *43*, 89–99.
- DeNicola D.M., 1996. Periphyton responses to temperature at different ecological levels. In: Stevenson R.J., Bothwell M.L., Lowe R.L. (eds.), *Algal Ecology – Freshwater Benthic Ecosystems*, Academic Press, San Diego, 149–181.
- Devault D.A., Merlina G., Lim P., Probst J.L. and Pinelli E., 2007. Multi-residues analysis of pre-emergence herbicides in fluvial sediments: application to the mid-Garonne River. *J. Environ. Monitor.*, *9*, 1009–1017.
- Dodds W., 2006. Eutrophication and trophic state in rivers and streams. *Limnol. Oceanogr.*, *5*, 671–680.



- Dodds W.K., Jones J.R. and Welch E.B., 1997. Suggested classification of stream trophic state: distributions of temperate stream types by chlorophyll, total nitrogen, and phosphorus. *Water Res.*, 32, 1455–1462.
- Dorigo U., Leboulanger C., Berard A., Bouchez A., Humbert J.F. and Montuelle B., 2007. Lotic biofilm community structure and pesticide tolerance along a contamination gradient in a vineyard area. *Aquat. Microb. Ecol.*, 50, 91–102.
- Dumestre J.F., Casamayor E., Massana R. and Predos-Alio C., 2002. Changes in bacterial and archaeal assemblages in an equatorial river induced by the water eutrophication of Petit Saut dam reservoir (French Guiana). *Aquat. Microb. Ecol.*, 26, 209–221.
- Eulin A. and Le Cohu R., 1998. Epilithic diatom communities during the colonization of artificial substrates in the River Garonne (France). Comparaison with the natural communities. *Arch. Hydrobiol.*, 143, 79–106.
- Hill H.L., 1996. Effects of light. In: Stevenson R.J., Bothwell M.L. and Lowe R.L. (eds.), *Algal Ecology – Freshwater Benthic Ecosystems*, Academic Press, San Diego, 121–148.
- Hullar M.A.J., Kaplan L.A. and Stahl D.A., 2006. Recurring seasonal dynamics of microbial communities in stream habitats. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72, 713–722.
- Jackson C.R., 2003. Changes in community properties during microbial succession. *Oikos*, 101, 444–448.
- Jackson C.R., Churchill P.F. and Roden E.E., 2001. Successional changes in bacterial assemblage structure during epilithic biofilm development. *Ecology*, 82, 555–566.
- Lane C.M., Taffs K.H. and Corfield J.L., 2003. A comparison of diatom community structure on natural and artificial substrata. *Hydrobiologia*, 493, 65–79.
- Lawrence J.R., Kopf G., Headley J.V. and Neu T.R., 2001. Sorption and metabolism of selected herbicides in river biofilm communities. *Can. J. Microbiol.*, 47, 634–641.
- Lawrence J.R., Swerhone G.D.W., Wassenaar L.I. and Nee T.R., 2005. Effects of selected pharmaceuticals on riverine biofilm communities. *Can. J. Microbiol.*, 51, 655–669.
- Lock M.A., Wallace R.R., Costerson J.W., Ventullo R.M. and Charlton S.E., 1984. River epilithon: toward a structural-functional model. *Oikos*, 42, 10–22.
- Loreau M., Naeem S., Inchausti P., Bengtsson J., Grime J.P., Hector A., Hooper D.U., Huston M.A., Raffaelli D., Schmid B., Tilman D. and Wardle D.A., 2001. Biodiversity and ecosystem functioning: current knowledge and future challenges. *Ecology*, 294, 804–808.
- Lyautey E., Teissier S., Charcosset J.Y., Rols J.L. and Garabetian F., 2003. Bacterial diversity of epilithic biofilm assemblages of an anthropised river section using DGGE analysis of a 16S rDNA fragment. *Aquat. Microb. Ecol.*, 33, 217–224.
- Lyautey E., Jackson C.R., Cayrou J., Rols J.L. and Garabetian F., 2005a. Bacterial community succession in natural river biofilm assemblages. *Microb. Ecol.*, 50, 589–601.
- Lyautey E., Lacoste B., Ten-Hage L., Rols J.L. and Garabetian F., 2005b. Analysis of bacterial diversity in river biofilms using 16S rDNA PCR-DGGE: methodological settings and fingerprints interpretation. *Water Res.*, 39, 380–388.
- Manz W., Wendt-Potthoff K., Neu T.R., Szewzyk U. and Lawrence J.R., 1999. Phylogenetic composition, spatial structure, and dynamics of lotic bacterial biofilms investigated by fluorescent *in situ* hybridization and confocal laser scanning microscopy. *Microb. Ecol.*, 37, 225–237.
- Morin S., Duong T.T., Dabrin A., Coynel A., Herlory O., Baudrimont M., Delmas F., Durrieu G., Schäfer J., Winterton P., Blanc G. and Coste M., 2008. Long-term survey of heavy-metal pollution, biofilm contamination and diatom community structure in the Riou Mort watershed, South-west France. *Environ. Pollut.*, 151, 532–542.
- Murdock J.N. and Dodds W.K., 2007. Linking benthic algal biomass to stream substratum topography. *J. Phycol.*, 43, 449–460.
- Muyzer G. and Smalla K., 1998. Application of denaturing gel electrophoresis (DGGE) temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 73, 127–141.
- Muyzer G., De Wall E.C. and Uitterlinden A.G., 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of PCR-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 695–700.
- Peterson C.G., 1996. Response of benthic algal communities to natural physical disturbance. In: Stevenson R.J., Bothwell M.L., Lowe R.L. and Thorp J.H. (eds.), *Algal Ecology – Freshwater Benthic Ecosystems*, Academic Press, San Diego, 375–402.
- Prygiel J. and Coste M., 1993. The assessment of water quality in the Artois-Picardie water basin (France) by the use of diatom indices. *Hydrobiologia*, 269, 343–349.
- Roeselers G., van Loosdrecht M. and Muyzer G., 2007. Heterotrophic pioneers facilitate phototrophic biofilm development. *Microb. Ecol.*, 54, 578–585.
- Romani A.M., Guasch H., Munoz I., Ruana J., Vilalta E., Schwartz T., Emtiazi F. and Sabater S., 2004. Biofilm structure and function and possible implications for riverine DOC dynamics. *Microb. Ecol.*, 47, 316–328.
- Sabater S., Guasch H., Romani A. and Munoz I., 2002. The effect of biological factors on the efficiency of river biofilms in improving water quality. *Hydrobiologia*, 469, 149–156.
- Sabater S., Guasch H., Ricart M., Romani A., Vidal G., Klunder C. and Schmitt-Jansen M., 2007. Monitoring the effect of chemicals on biological communities. The biofilm as an interface. *Anal. Bioanal. Chem.*, 387, 1425–1434.
- Santegoeds C.M., Ferdelman T.G., Muyzer G. and de Beer D., 1998. Structural and functional dynamics of sulfate-reducing populations in bacterial biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 3731–3739.
- Schauer M., Massana R. and Pedros-Alio C., 2000. Spatial differences in bacterioplankton composition along the Catalan coast (NW Mediterranean) assessed by molecular fingerprinting. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 33, 51–59.
- SCOR-Unesco., 1966. Determination of photosynthetic pigments in sea water. *Monogr. Oceanogr. Method Unesco*, 1.
- Steinman A.D. and Lamberti G.A., 1996. Biomass and pigments of benthic algae. In: Hauer F.R. and Lamberti G.A. (eds.), *Stream ecology*, Academic Press, San Diego, 295–313.
- Stevenson R.J., 1983. Effects of current and conditions simulating autogenically changing microhabitats on benthic diatom immigration. *Ecology*, 64, 1514–1524.
- Teissier S., Torre M., Delmas F. and Garabetian F., 2007. Detailing biogeochemical N budgets in riverine epilithic biofilms. *J. N. Amer. Benthol. Soc.*, 26, 178–190.
- Tlili A., Dorigo U., Montuelle B., Margoum C., Carluier N., Gouy V., Bouchez A. and Berard A., 2008. Responses of

- chronically contaminated biofilms to short pulses of diuron – An experimental study simulating flooding events in a small river. *Aquat. Toxicol.*, 87, 252–263.
- Tornes E., Cambra J., Goma J., Leira M., Ortiz R. and Sabater S., 2007. Indicator taxa of benthic diatom communities: a case study in Mediterranean streams. *Ann. Limnol. - Int. J. Lim.*, 43, 1–11.
- Van Hannen E.J., Zwart G., Van Agterveld M.P., Gons H.J., Ebert J. and Laanbroek H.J., 1999. Changes in bacterial and eukaryotic community structure after mass lysis of filamentous cyanobacteria associated with viruses. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 795–801.
- Wetzel R.G. (ed.), 1983. Periphyton of freshwater ecosystem, Dr W. Junk, Boston.

## II.2 Part du déterminisme autogène sur la structuration et la dynamique des communautés microbiennes benthiques par une approche en bioréacteur

Résumé de l'article intitulé « **A photosynthetic rotating annular bioreactor (Taylor-Couette type flow) for phototrophic biofilm cultures** » par A. Paule, B. Lauga, L. Ten-Hage, J. Morchain, R. Duran, E. Paul et J.L. Rols, (2011) *Water Research*, 45 (18) : 6107 – 6118. (Article 3)

### II.2.1 Contexte de l'étude

La première partie de ce chapitre II abordait l'influence des facteurs allogènes sur les communautés bactériennes de biofilms phototrophes benthiques, illustrée par des structures de communautés différentes entre deux sites. Parmi nos conclusions, nous indiquions la probable influence des facteurs autogènes, dont l'action est associée au degré de maturation du biofilm, sur la structuration de ces communautés. En absence de perturbation, ce qui est rarement le cas dans une rivière (Biggs 1996) où le cycle du développement des biofilms est souvent réinitialisé par des changements hydrauliques (épisodes de crue), les successions écologiques qui contrôlent la dynamique et la structuration des communautés bactériennes sont caractérisées par un déterminisme autogène.

Dans cette deuxième partie du chapitre II, nous nous sommes donc intéressés à l'analyse des facteurs responsables du changement temporel des structures de communautés bactériennes sous des conditions environnementales stables. Dans ce contexte, l'approche la plus judicieuse reste donc l'utilisation de dispositifs à l'échelle du laboratoire simulant les conditions environnementales à différents niveaux de contrôle expérimental. Une grande variété de dispositifs de plus ou moins grandes tailles (microcosmes et mésocosmes) est décrite dans la littérature pour un panel d'études des biofilms phototrophes (**cf. Partie I Synthèse bibliographique**).

Parmi ces dispositifs, nous pouvons citer un exemple de bioréacteurs particulier : les bioréacteurs annulaires rotatifs (en anglais « *Rotating Annular Bioreactor* » ou RAB) qui se sont révélés être de bons outils pour appréhender les différents impacts des changements environnementaux sur le développement des biofilms bactériens ou phototrophes (**cf. Partie I Synthèse bibliographique**). Characklis (1990) concevait ces RAB comme des systèmes hautement homogènes en tout point du volume de l'entrefer de par leur géométrie. Ces bioréacteurs se caractérisent donc par des forces de cisaillement constantes à la paroi de la

face interne du cylindre externe sur laquelle le biofilm se développe, ainsi qu'un écoulement de type turbulent.

Il y a quelques années, Lawrence et al. (2000) ont développé un RAB destiné à la culture de biofilms phototrophes, pour analyser l'influence de certains facteurs environnementaux sur la dynamique de croissance du biofilm (Chénier et al. 2003; Lawrence et al. 2004). Ce RAB présente deux inconvénients, sa petite taille (volume utile de l'ordre de 0,45 litres) qui limite le nombre possible de réplicats (coupons colonisés échantillonnables) et d'analyses, la croissance du biofilm étant réalisée sur la face externe du cylindre interne, condition pour laquelle le biofilm subit une force centrifuge associée à la rotation du cylindre interne.

Dans ce contexte, l'expérimentation de notre étude a été réalisée dans un nouveau prototype de RAB pour maintenir stable et spatialement homogène l'ensemble des variables environnementales et favoriser la croissance du biofilm en choisissant des valeurs élevées d'intensité lumineuse, de concentration en nutriments et de température.

### **II.2.2 Approche expérimentale**

Dans un premier temps, nous présentons le prototype de RAB à écoulement de type Taylor-Couette conçu par la société ARIAS (Toulouse, Sud Ouest, France) et expérimenté au sein du laboratoire EcoLab pour la première fois dans le cadre de cette thèse. Le prototype est décrit en détail dans la **partie II Matériel et méthodes**. La capacité de ce prototype à produire des biofilms phototrophes est évaluée à travers la réalisation de deux expériences de cultures de biofilms phototrophes d'une durée de 6,7 et 7 semaines chacune sous des conditions d'éclairage et avec des procédures d'inoculation différentes. Vu l'importance de la géométrie d'un tel système et les conséquences que cela peut avoir sur la croissance d'un biofilm, les caractéristiques hydrauliques de l'écoulement au sein du prototype RAB sont étudiées via deux approches, une approche expérimentale à l'échelle du bioréacteur par une méthode de traçage (DTS), et une approche par simulation de l'hydrodynamique du fluide à une échelle plus locale (**cf. détails partie II Matériel et méthodes**).

Le bioréacteur fonctionne en circulation ouverte alimentée via une pompe péristaltique à un débit de  $26 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  d'eau du réseau enrichie en nitrates, silice et orthophosphates, pour favoriser la croissance des algues benthiques, et stockée à  $4^\circ\text{C}$  dans un tank à lait réfrigéré de contenance 150 L (**cf. détails partie II Matériel et méthodes**). Le démarrage d'une culture nécessite un apport extérieur de biomasse durant une phase d'inoculation du RAB. Durant cette phase, le RAB fonctionne en circulation fermée, en boucle avec un aquarium contenant une suspension de biomasse issue de biofilms phototrophes. Deux procédures d'inoculation ont été testées (**cf. détails partie II Matériel et méthodes**).

### II.2.3 Principaux résultats et discussion

Les conditions expérimentales au sein du RAB sont stables au cours des deux expériences de culture. Nous avons choisi pour la deuxième culture d'enrichir l'eau d'alimentation avec une quantité moindre de nitrates et d'ajuster son pH à 7 (**cf. détails partie II Matériel et méthodes**). Les valeurs de pH, de température et de concentration en oxygène dissous évoluent avec les variations journalières associées aux processus associés de la photosynthèse.

L'étude du comportement hydrodynamique du RAB est réalisée pour 2 vitesses de rotation du cylindre interne (80 et 170 trs.min<sup>-1</sup>), montrant des résultats similaires quelle que soit l'approche (expérimentale ou par simulation). Comme déjà précisé dans la partie méthodologique du RAB, pour une rotation du cylindre interne de 80 trs.min<sup>-1</sup>, le nombre de Reynolds  $Re = r_i \Omega (r_e - r_i) / \nu = 17040$ , et le nombre de Taylor  $Ta = Re [(r_e - r_i) / r_i]^{1/2} = 6970$ , avec  $\Omega$  la vitesse de rotation du cylindre interne (rad.s<sup>-1</sup>),  $r_i$  le rayon du cylindre interne (m),  $r_e$  le rayon du cylindre externe (m), et  $\nu$  la viscosité cinématique du fluide (Pa.s<sup>-1</sup>). Ces ordres de grandeur sont caractéristiques d'un régime d'écoulement tourbillonnaire turbulent (Ochoa et al. 2007).

La modélisation de l'écoulement à l'intérieur de l'entrefer permet de simuler les profils de vitesses et de contraintes de cisaillement à la paroi. Le profil de vitesses met en évidence l'apparition de gradients de vitesses différents à la paroi des deux cylindres due à la présence de tourbillons (ou tores) engendrant ainsi des gradients de contraintes de cisaillement à la paroi du cylindre externe où se développera le biofilm. Au sein de l'entrefer, il existe donc une périodicité spatiale, selon l'axe vertical, correspondant à un empilement de tores de section globalement carrée et de dimension de celle de l'entrefer (18,5 mm). La présence des vortex conforte bien l'installation d'un écoulement de type turbulent avec des vortex toroïdaux. La contrainte est maximale lorsque le tourbillon est au contact de la paroi du cylindre externe, et presque nulle dans la zone séparant deux tourbillons consécutifs. L'ordre de grandeur de la vitesse tangentielle est le m.s<sup>-1</sup>, contre 10<sup>-4</sup> m.s<sup>-1</sup> pour la vitesse axiale et 10<sup>-1</sup> à 10<sup>-2</sup> m.s<sup>-1</sup> pour la vitesse radiale. Les vitesses radiale et axiale peuvent être considérées négligeables devant la vitesse tangentielle. Le profil des vitesses tangentielles à la paroi entre les cylindres interne et externe indique une diminution de cette vitesse pour atteindre une vitesse à la paroi des coupons de 0,3 m.s<sup>-1</sup> pour une rotation du cylindre interne de 80 trs.min<sup>-1</sup>. Les profils cinétiques de croissance corroborent le modèle de Biggs (1996), montrant une première phase d'accrétion (colonisation du support et épaissement du biofilm) jusqu'à l'obtention d'un pic de biomasse (**Figure 57**). En 6,7 et 7 semaines de culture, les biomasses sous forme de MSSC atteignent des valeurs de 2,5 à 3 mg.cm<sup>-2</sup>. Durant les premiers stades de chaque culture, la colonisation par l'inoculum apparaît préférentiellement sur les bords des supports

(ou coupons). En effet, la présence d'un espace à la jonction entre deux coupons induit une recirculation du flux. Cette zone stationnaire favoriserait l'accumulation de biomasse en augmentant le temps de contact entre les microorganismes et le support. Le biofilm mature, riche en algues vertes de la culture 2, atteint son pic de biomasse plus rapidement, suivi par une perte de biomasse associée à un détachement autogène (Boulêtreau et al. 2006).



**Figure 57** – Evolution temporelle de l'épaisseur du biofilm phototrophe durant l'expérience de la culture 1 (loupe binoculaire, LEICA M212, avec une caméra LEICA DFC320, grossissement x 6) observée sur la tranche d'un coupon de colonisation.

Un total de 35 T-RFs différents a été identifié par culture pour l'ensemble des échantillons. Le nombre moyen de T-RFs estimé par échantillon est de 12 à 25 et de 12 à 23 pour les cultures 1 et 2, respectivement. Ces valeurs sont du même ordre de grandeur que celles données dans la littérature pour des biofilms phototrophes ayant colonisé des substrats naturels ou artificiels, à partir d'enzymes de digestions identiques (une moyenne de 16 T-RFs, dans Anderson-Glenna et al. (2008) ; 11 à 25 T-RFs, dans Szabo et al. (2008)). Comme nous l'avons souligné dans la partie méthodologique sur la technique de T-RFLP, une partie des T-RFs identifiés est associée à des cyanobactéries (Cole et al. 2009), pouvant mener à une surestimation de la richesse en espèces bactériennes non phototrophes. L'analyse en composante principale (ACP) sur les structures bactériennes révèle des variations temporelles similaires aux deux cultures puis se stabilisent à partir de 3-4 semaines pour les deux cultures quels que soient le type d'inoculum, les conditions d'éclairage et la procédure d'inoculation utilisés. Les communautés bactériennes, influencées par des processus de successions écologiques, suivent des trajectoires propres à chaque culture.

Comme nous l'attendions, la composition et la diversité des communautés algales des 2 inocula utilisés lors de cette étude sont bien distinctes :

- l'inoculum de la culture 1 (suspension de biofilm du canal du laboratoire) est dominé par des cyanobactéries à 95,4 % (dont *Leptolyngbya spp.* à 88,5 %),

- l'inoculum de la culture 2 (suspension de biofilms de rivière) est dominé essentiellement par des diatomées à 86,3 % dont *Navicula tripunctata* (O.F. Müller) Bory (23,2 %), *Nitzschia spp.* (19,4 %) et *Achnanthes spp.* (12,3 %).

L'inoculum de la culture 1 se caractérise par un nombre d'espèces d'algues plus faible (7) que l'inoculum de la culture 2 (27). Durant la culture 1, le nombre d'espèces reste constant et faible (de 5 à 7) alors que le nombre d'espèces de la culture 2 diminue au cours du temps (de 27 à 7). Malgré un nombre d'espèces identique au sein des communautés algales en fin de culture, leurs compositions montrent des différences :

- la culture 1 est dominée essentiellement par des diatomées à 98,6 % dont 92,6 % de *Nitzschia palea* (Kutz.) W. Smith,
- la culture 2 est dominée par des algues vertes à 95,5 % dont *Scenedesmus* à 74,9 % et *Ankistrodesmus/Monoraphidium* à 9,9 %.

L'utilisation d'un inoculum au départ plus diversifié et d'une phase d'inoculation plus longue pour la culture 2 ne nous a pas permis d'enrichir la communauté algale. A l'issue des deux cultures, quelles que soient la procédure d'inoculation et l'intensité lumineuse, le nombre d'espèces algales au sein des biofilms les plus matures est de 6-7 espèces. Ce nombre est-il le seuil minimal pour la préservation de l'intégrité d'un biofilm ou correspond-il à un équilibre final entre espèces suite à des processus de compétition (facteurs autogènes) ? Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cette faible diversité algale :

- une durée de la période d'inoculation qui n'est pas suffisante. Durant ces phases d'inoculation, il se produit une sélection des espèces pionnières et colonisatrices qui présentent souvent des taux de croissance rapides (une stratégie R). Comme déjà énoncé, les premières espèces à coloniser un substrat vierge sont typiquement les bactéries hétérotrophes et les algues de petites tailles à taux de croissance rapides, souvent des diatomées (Eulin et Le Cohu 1998 ; Roeselers et al. 2007), suivies par la colonisation d'espèces d'algues de grandes tailles à taux de croissance beaucoup plus lents (une stratégie K) (Biggs et al. 1998 ; Sekar et al. 2004). Les cyanobactéries sont souvent considérées comme des espèces colonisatrices tardives, ce qui pourrait expliquer la réapparition des cyanobactéries en fin de l'expérience 1, suite à des conditions de compétition leur devenant favorable en fin de culture. Il est intéressant de noter que les temps de génération des algues et des bactéries sont relativement différents : de quelques heures pour les bactéries (Smits et Riemann 1988) et de quelques heures à quelques jours pour les algues (Stevenson et Pan 1999). Durant cette étape d'inoculation, la période sous forme planctonique subie par les algues a pu également être une source de sélection ;

- les conditions expérimentales choisies dans cette étude (fortes valeurs de température et de pH, milieu de culture très enrichi) peuvent être sélectives (DeNicola 1996 ; Hillebrand et Sommer 2000a et b). Hillebrandt et Sommer (2000b) ont observé la dominance d'une espèce favorisée par un enrichissement du milieu. La présence du genre *Scenedesmus* et de l'espèce *Nitzschea palea*, espèces eutrophes, révèle bien une influence du milieu de culture riche en nutriments, avec de fortes valeurs de conductivité, sur les communautés algales (facteurs allogènes). Les fortes valeurs de température, de niveau d'intensité lumineuse, des concentrations en nutriments et la photopériode sont des facteurs susceptibles de favoriser et stimuler la croissance du biofilm. Des travaux ont pu montrer qu'un taux de croissance rapide est responsable de la formation de biofilms peu diversifiés (Zippel et Neu, 2005) ;
- le choix d'utiliser des conditions expérimentales stables entraîne une absence de perturbation. Certains auteurs ont souligné que l'absence de perturbation (broutage, hydrodynamique, pollution organique. . . ) pouvait engendrer la formation de biofilms très peu diversifiés, où les mécanismes de compétition prédominent, sélectionnant ainsi des espèces particulièrement compétitrices. Une perturbation peut provoquer des pertes de biomasse, laissant des habitats vacants, favorisant ainsi l'arrivée et l'installation de nouvelles espèces ;
- cette faible diversité peut être attribuée au choix du type d'analyse utilisée dans ce travail. Il a été réalisé une analyse taxonomique basée sur les morphotypes. Certaines espèces à la morphologie très proches peuvent sous – estimer la richesse spécifique de la communauté.

Malgré une communauté algale peu diversifiée pour les deux cultures, une des fonctions principales d'intérêt écologique, la production primaire, a bien été effectuée correctement (pour preuve la quantité de biomasse produite). Cela nous amène à nous interroger sur l'effet d'une faible diversité algale sur la production de biomasse et autres fonctions du biofilm phototrophe. Un défi majeur de ces dernières années est de comprendre la relation entre la perte de la diversité ou de la composition des communautés et le fonctionnement des écosystèmes (Loreau et al. 2001). Cet intérêt qui a mené à de nombreuses recherches à la frontière entre l'écologie des communautés et l'écologie des écosystèmes a subi un grand essor depuis une quinzaine d'années (Chapin et al. 2000 ; Loreau et al. 2001), mais l'idée qu'une diversité importante de plantes induit une productivité de biomasse plus importante date de Darwin (Loreau 2010). Etudier les conséquences d'une perte de biodiversité a suscité un grand intérêt afin d'évaluer les conséquences écologiques potentielles du fort déclin actuel de la biodiversité. Cette perte est une conséquence de l'augmentation des activités humaines



sur les écosystèmes (Chapin et al. 2000). Il est maintenant reconnu que les écosystèmes fournissent un panel de « services écologiques » qui sont cruciaux au bien être des humains et au développement durable (*Millenium Ecosystem Assessment*, MA 2005). Ces services écologiques sont une conséquence directe du fonctionnement normal des écosystèmes. Il est alors pertinent de se demander si les écosystèmes appauvris peuvent, pour certaines fonctions, devenir moins efficaces que les systèmes les plus riches en espèces, et donc perdre par la suite leur capacité à délivrer des services écologiques.

Une des premières études montrant la relation entre la biodiversité et le fonctionnement des écosystèmes fut lors d'une expérience aux USA qui montrait qu'une diminution du nombre d'herbacées sur une parcelle engendrait une utilisation moins efficace des nutriments du sol, aboutissant à une faible quantité de biomasse produite par les plantes (Tilman et al. 1996). De très nombreux auteurs ont étudié cette possible relation biodiversité - fonctionnement des écosystèmes en milieu terrestre ou aquatique, aussi bien sur les plantes, que sur les champignons, les bactéries... (Cardinale et al. 2006a et b; Tachlowicz et al. 2007). Le résultat général qui en ressort est qu'une diminution de la diversité réduite expérimentalement diminue l'efficacité des communautés à capter les ressources et à les convertir en nouveau tissu biologique. Il existe donc une relation positive entre la biodiversité et la productivité d'un écosystème. Cette relation est suggérée être engendrée via quatre mécanismes primaires : (i) l'effet « *sampling* », qui propose que la production de biomasse augmente avec la richesse spécifique à cause de la probabilité d'augmenter le nombre d'espèces hautement productives, (ii) la facilitation (dans le cas où des espèces modifient un environnement, ce qui va faciliter l'installation d'une autre espèce), (iii) la complémentarité des niches (dans le cas où deux espèces ne partagent pas les mêmes ressources, menant à de très faibles compétitions entre elles (Vanelslander et al. 2009) et (iv) l'effet « sélection » de trait fonctionnel particulier qui affecte la capacité compétitive de certaines espèces (Loreau et al 2001).

Concernant les communautés algales, à partir de différentes combinaisons de biodiversité dans des communautés de diatomées benthiques (de 1 à 8 espèces), Vanelslander et al. (2009) observent un effet hautement positif de la biodiversité sur la production que les auteurs attribuent en partie à des effets de complémentarité positive (facilitation et complémentarité des niches). Par exemple, ils observent qu'une espèce de diatomée, *Cylindrotheca closterium*, présente une augmentation de sa production de biomasse en réponse à une substance sécrétée par une autre espèce de diatomée. Inversement, lors d'une étude en canal expérimental, malgré une faible diversité algale, les communautés de biofilm présentent des valeurs de productivité similaires aux pics de biomasse enregistrés pour les biofilms colonisés *in situ* (Boulêtreau et al. 2010). Une étude propose une relation positive de la production de biomasse avec la

diversité des espèces au sein de bassins versants fréquemment perturbés (Cardinale et al. 2005). La relation diversité - fonction est donc reliée également au type d'habitat. Passy et Legendre (2006) observent un pic du biovolume des algues pour des niveaux de diversité intermédiaires au sein de communautés benthiques alors que ce pic ne s'observe qu'à de faibles niveaux de diversité au sein des communautés planctoniques. Certaines études ne montrent aucune relation entre la biodiversité et la production d'algues au sein de biofilm (Hillebrand 2003). Passy et Legendre (2006) suggèrent que ce manque de relation est lié à l'utilisation de supports artificiels qui sous-estiment et qui sont non représentatifs des biofilm naturels. Cette relation peut également varier avec l'échelle spatiale mais également l'histoire de la communauté, tous ces paramètres pouvant générer une variété de relations biodiversité - fonction (unimodale, linéaire etc...) (Passy et Legendre 2006). Matthiessen et al. (2010) trouvent une corrélation positive entre la richesse et la biomasse algale au premier stade de succession. Ces variations de la nature de la relation biodiversité - productivité peuvent être une conséquence de la variété des paramètres utilisés pour la mesure de la productivité (Passy et Legendre 2006).

U

#### **II.2.4 Conclusion et perspectives**

Ce travail expérimente, à notre connaissance, le premier prototype de RAB qui présente une source lumineuse modulable interne pour la production de biofilm phototrophe. Ce système supporte de nombreux autres avantages par rapport aux RAB actuellement décrits dans la littérature : une meilleure connaissance des conditions hydrodynamiques, un nombre et une surface des coupons relativement importante (0,16 m<sup>2</sup>) permettant ainsi une quantité importante d'analyses et de production de biomasse (**Tableau 15**).

Malgré tout, ce prototype présente quelques points faibles :

- la présence des néons dans un cylindre étanche provoque des variations importantes de température (de 20 à 30°C). Une maîtrise de la température à l'intérieur du cylindre contenant les néons nous semble nécessaire, assuré par exemple grâce à un dispositif de renouvellement de l'air depuis la partie inférieure du cylindre ;
- l'absence de contact entre le milieu de culture et l'atmosphère et un temps de résidence de l'eau de quelques heures occasionnent parfois des conditions extrêmes en oxygène (sursaturation) et en carbone inorganique (fortes valeurs de pH). Pour s'affranchir de ces problèmes, un réservoir externe avec recirculation de l'eau contenue dans l'entrefer permettrait de dégazer l'oxygène dissous et de réguler le pH (il faut éviter de rajouter des capteurs dans l'entrefer, sous peine d'y perturber l'écoulement).

Type de bioréacteur	Gjatelma et al. 1994	Neu et Lawrence 1997	Lawrence et al. 2000	Paule et 2011 (cette étude)
Diamètre externe du cylindre interne (mm)	100,5	100	64	220
Diamètre interne du cylindre externe (mm)	116,6	112,5	85	257
Surface d'un support de colonisation (mm <sup>2</sup> )	3196	3150	1000	5000
Nombre de supports de colonisation	12 lames de polycarbonate	12 lames de polycarbonate	12 lames de polycarbonate	32 lames de polyéthylène à haute densité
Entrefers (mm)	8,05	6,25	11	18,5
Hauteur du bioréacteur (mm)	192,5	205	115	297
Volume utile (L)	0,67	0,650	0,500	5,04
Intensité et qualité de la lumière modulables	NON	NON	NON	OUI
Taux de dilution (h <sup>-1</sup> )	3	19,4	28	0,32
Inoculum	Stock de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Thiosphaera pantotropha</i> et / ou <i>Pseudomonas pickettii</i>	Eau de rivière	Eau de rivière	Suspension filtrée de biofilms phototrophes

**Tableau 15** – Comparaison des principales caractéristiques entre les RAB décrits dans la littérature et le RAB expérimenté pour la première fois dans le cadre de cette étude.

En résumé, l'utilisation d'un tel dispositif de RAB nous a permis de suivre la dynamique de la structure des communautés bactériennes et algales en absence de perturbation, sous des conditions expérimentales stables dans un souci d'évaluer la part du déterminisme auto-gène dans la dynamique des biofilms phototrophes. Dans les premiers jours de culture, plus particulièrement durant la phase d'inoculation, la colonisation, un mécanisme aléatoire, est supposée être influencée par les conditions environnementales (facteurs allogènes). Ceci est illustré partiellement par la présence d'espèces algales typiques de milieu riche en nutriments. Une identification des taxons bactériens reliée à leur autoécologie aurait pu nous permettre de vérifier cette influence des facteurs allogènes sur les communautés bactériennes durant la phase d'inoculation. Très rapidement après cette phase d'inoculation, les successions écologiques sont contrôlées uniquement par les facteurs autogènes.

En ce qui concerne les communautés bactériennes, malgré des structures d'inocula au départ différentes, avec des intensités lumineuses (130 et 180  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) et des procédures d'inoculation différentes, la trajectoire des successions écologiques suit la même tendance, comprenant une évolution temporelle de la trajectoire suivie par une stabilisation des communautés à environs 3-4 semaines de développement associée à un nombre de taxons identiques. Est-ce le modèle classique suivi par les communautés bactériennes en absence de perturba-

tion? Quelles que soient la composition et la diversité des communautés algales, et malgré une forte interdépendance physique et des interactions entre ces deux compartiments?

En ce qui concerne les communautés algales, quelles que soient la procédure d'inoculation et l'intensité lumineuse, le nombre d'espèces algales au sein des biofilms les plus matures est de 6 à 7 espèces. Ce nombre est-il le seuil minimal pour la préservation de l'intégrité d'un biofilm ou correspond-il à un équilibre final entre espèces suite à des processus de compétition et, dans ce cas là, suit un modèle de déterministe autogène?

### **II.2.5 Article 3**

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

SciVerse ScienceDirect

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/watres](http://www.elsevier.com/locate/watres)

## A photosynthetic rotating annular bioreactor (Taylor–Couette type flow) for phototrophic biofilm cultures

A. Paule<sup>a,b</sup>, B. Lauga<sup>c</sup>, L. Ten-Hage<sup>a,b</sup>, J. Morchain<sup>d,e,f</sup>, R. Duran<sup>c</sup>, E. Paul<sup>d,e,f</sup>, J.L. Rols<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Université de Toulouse, UPS, INP, EcoLab (Laboratoire d'écologie fonctionnelle et environnement), 118 route de Narbonne, F-31062 Toulouse, France

<sup>b</sup> CNRS, EcoLab, F-31062 Toulouse, France

<sup>c</sup> Equipe Environnement et Microbiologie, Institut Pluridisciplinaire de Recherche sur l'Environnement et les Matériaux - IPREM, UMR 5254 CNRS/UPPA, IBEAS, Université de Pau et des Pays de l'Adour, BP1155, F-64013 Pau, France

<sup>d</sup> Université de Toulouse, INSA, LISBP, 135 Avenue de Rangueil, F-31077 Toulouse, France

<sup>e</sup> INRA, UMR792, Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, F-31400 Toulouse, France

<sup>f</sup> CNRS, UMR5504, F-31400 Toulouse, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 11 April 2011

Received in revised form

1 September 2011

Accepted 3 September 2011

Available online 14 September 2011

#### Keywords:

Rotating annular bioreactor

Taylor–Couette type flow

T-RFLP

Phototrophic biofilm

Microbial community

Photobioreactor

### ABSTRACT

In their natural environment, the structure and functioning of microbial communities from river phototrophic biofilms are driven by biotic and abiotic factors. An understanding of the mechanisms that mediate the community structure, its dynamics and the biological succession processes during phototrophic biofilm development can be gained using laboratory-scale systems operating with controlled parameters. For this purpose, we present the design and description of a new prototype of a rotating annular bioreactor (RAB) (Taylor–Couette type flow, liquid working volume of 5.04 L) specifically adapted for the cultivation and investigation of phototrophic biofilms. The innovation lies in the presence of a modular source of light inside of the system, with the biofilm colonization and development taking place on the stationary outer cylinder (onto 32 removable polyethylene plates). The biofilm cultures were investigated under controlled turbulent flowing conditions and nutrients were provided using a synthetic medium (tap water supplemented with nitrate, phosphate and silica) to favour the biofilm growth. The hydrodynamic features of the water flow were characterized using a tracer method, showing behaviour corresponding to a completely mixed reactor. Shear stress forces on the surface of plates were also quantified by computer simulations and correlated with the rotational speed of the inner cylinder. Two phototrophic biofilm development experiments were performed for periods of 6.7 and 7 weeks with different inoculation procedures and illumination intensities. For both experiments, biofilm biomasses exhibited linear growth kinetics and produced 4.2 and 2.4 mg cm<sup>-2</sup> of ash-free dry matter. Algal and bacterial community structures were assessed by microscopy and T-RFLP, respectively, and the two experiments were different but revealed similar temporal dynamics. Our study confirmed the performance and multipurpose nature of such an innovative photosynthetic bioreactor for phototrophic biofilm investigations.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

\* Corresponding author. Université de Toulouse, UPS, EcoLab (Laboratoire d'écologie fonctionnelle et environnement), 118 route de Narbonne, F-31062 Toulouse, France. Tel.: +33 0 6 24 38 19 04; fax: +33 0 5 61 55 60 96.

E-mail address: [rols@cict.fr](mailto:rols@cict.fr) (J.L. Rols).

0043-1354/\$ – see front matter © 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

doi:10.1016/j.watres.2011.09.007

## 1. Introduction

Environmental phototrophic biofilms are microbial aggregates occurring on solid substrates and consisting of heterotrophic micro- and meio-organisms and phototrophic micro-organisms embedded in an extracellular polymeric substance matrix. The structure and functioning of microbial communities from phototrophic biofilms are mediated by abiotic factors such as nutrient availability (Hillebrand and Sommer, 2000a), light (Boston and Hill, 1991), substrate types (Murdock and Dodds, 2007), hydrodynamics (Battin et al., 2003), and by biotic interactions such as competition (Jackson et al., 2001) or predation (Bourassa and Cattaneo, 1998). Biofilm development has been demonstrated to be associated with population succession processes over biofilm maturation, both for the algal (McCormick and Stevenson, 1991) and the bacterial (Jackson et al., 2001; Lyautey et al., 2005) compartments.

To understand how the abiotic and biotic factors (alone or combined) influence the microbial community structure, its dynamics and the biological succession processes during phototrophic biofilm development, the best approach is to use laboratory-scale systems simulating environmental conditions under different levels of experimental control.

Various large and small-scale laboratory systems designed to investigate phototrophic biofilms are described in the literature (e.g. Battin et al., 2003; Singer et al., 2006). Among them, rotating annular bioreactor (RAB) designs have been suggested as a powerful tool to study the effects of environmental change on biofilm development (Neu and Lawrence, 1997). It has been shown that the hydrodynamic conditions at local level influence the composition and the structure of biofilms (Besemer et al., 2007). The geometry of RABs allows to provide a constant shear stress distribution and cultivation of biofilm under turbulent flow environments (Characklis, 1990). While RABs are described as completely mixed reactors for the liquid phase, a previous study showed heterogeneity in the growth of biofilm related to reactor geometry (Gjaltema et al., 1994). In the last decade, Lawrence et al. (2000) have developed a RAB (liquid working volume of 0.5 L) for the cultivation of phototrophic biofilms, used to investigate the various effects of environmental change occurring in a river (Chénier et al., 2003; Lawrence et al., 2004). The main shortcomings of this RAB are its small size which limits the number of possible analyses and replicates, the external illumination, and the biofilm growing on the rotating inner cylinder.

The objectives of our study were (i) to design and describe a new prototype of RAB (Taylor–Couette type flow) specifically intended for the cultivation and investigation of phototrophic biofilms adapted from an RAB design for biological waste water treatment (Coufort et al., 2005), (ii) to assess the applicability of this prototype in phototrophic biofilm production and (iii) to analyze the phototrophic biofilm dynamics. Innovations of our modified RAB were the presence of a modular source of light inside the system and the biofilm colonization on the stationary outer cylinder. Two cultivation experiments were performed for periods of 6.7 and 7 weeks with different inoculation procedures and illumination intensities.

## 2. Material and methods

### 2.1. Experimental setup

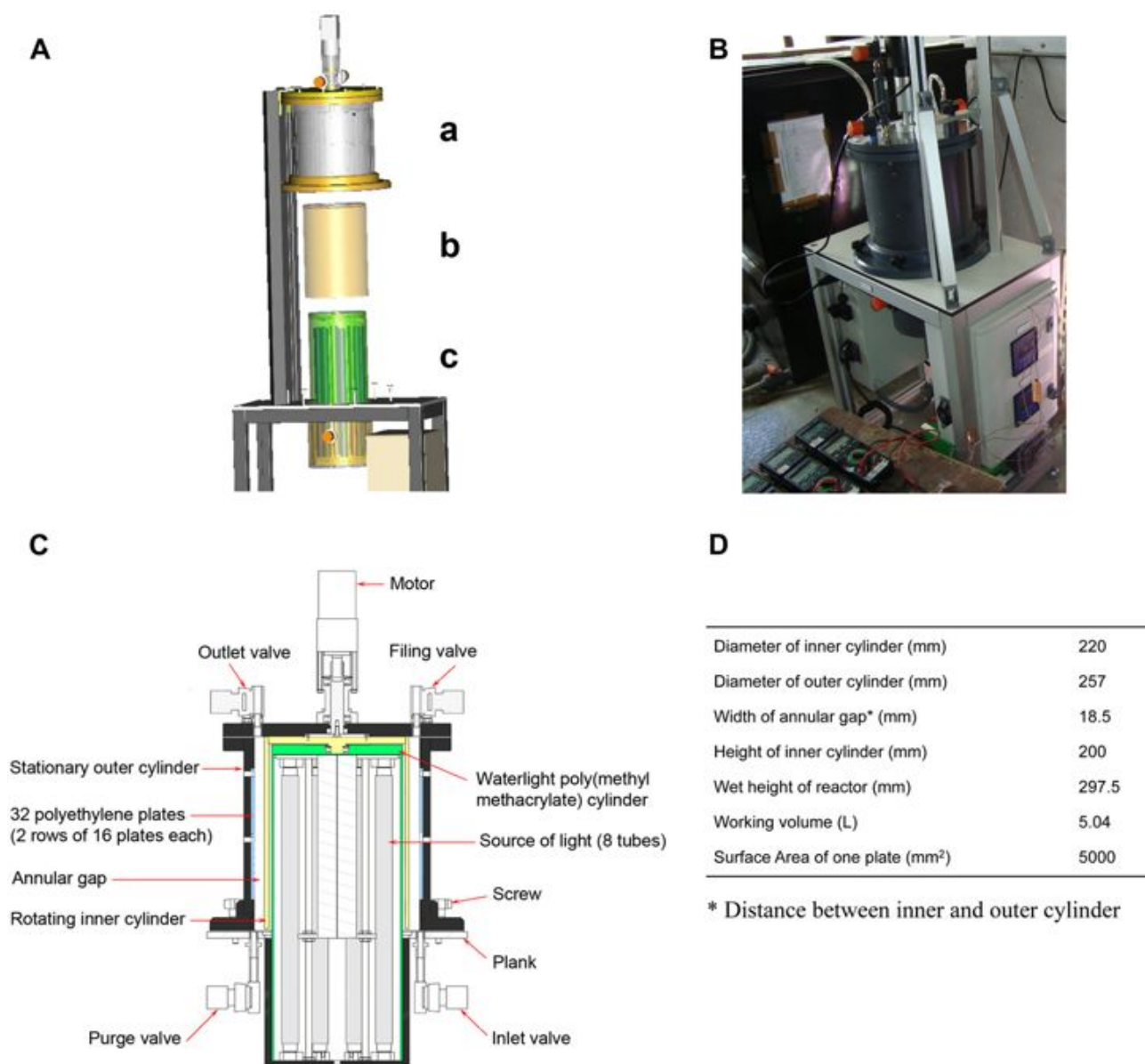
Phototrophic biofilm culture experiments were conducted in a new prototype of a photosynthetic rotating annular bioreactor (RAB) with Taylor–Couette type flow (Arias, Toulouse, France).

#### 2.1.1. RAB characteristics

The RAB consisted of two concentric cylinders, a stationary outer cylinder made of polyvinyl chloride and a rotating inner cylinder made of poly(methyl methacrylate) (PMMA) (Fig. 1A and B). A schematic diagram and the geometric characteristics of the RAB are given in Fig. 1C and D, respectively. This prototype presents the specificity of having (i) a modular source of light inside the system, protected by an internal water-tight cylinder made of PMMA and adjusted by changing the quality and number of the fluorescent tubes (1–8) and the frequency of light/dark cycles, and (ii) a flow generated in the annular gap (width 18.5 mm) through the rotation of the inner cylinder modulated by different motor speeds. The inside of the external cylinder supports 2 rows of 16 removable polyethylene plates or sampling units ( $l \times h = 50 \times 100$  mm; 5 mm wide) for biofilm sampling. The total surface available for the biofilm colonization of plates in the RAB is  $0.16 \text{ m}^2$ . To limit the occurrence of edge effects on the development of biofilm, the rows of plates were positioned at half height in the bioreactor. The plates were curved to avoid perturbation of the flow. To prevent biofilm growth on the back, upper part and leading edge of the plates, these surfaces were covered by adhesive bands during the experiments which were removed before the biofilm analyses. All bioreactor components were cleaned, with diluted detergent (Decon, 10%) for the plates, the outer cylinder and the port, or with hydrogen peroxide (30%) for the inner cylinders, and then rinsed with demineralized water. To prevent unwanted biofilm formation that could attenuate the light intensity and modify its spectrum, the surfaces of the rotating inner and internal water-tight cylinders were cleaned manually once a week. This step of 15 min required to collect the liquid contained in the RAB before opening, and allowed, if necessary, to collect some plates for biofilm analyses. Once finished, the bioreactor was closed and refilled with the collected liquid.

#### 2.1.2. RAB hydrodynamic behaviour

The RAB was operated at 80 rpm, which corresponds to a Reynolds number  $Re = r_i \cdot \Omega \cdot (r_e - r_i) / \nu = 17,040$  and Taylor number  $Ta = Re \cdot [(r_e - r_i) / r_i]^{1/2} = 6970$  where  $r_i$  is the inner cylinder radius (m),  $r_e$  is the outer cylinder radius (m),  $\Omega$  is the angular speed ( $\text{rad s}^{-1}$ ) of the inner cylinder, and  $\nu$  is the cinematic viscosity of the fluid ( $\text{m}^2 \text{ s}^{-1}$ ) (tap water). According to the literature, this value of Taylor number indicates a turbulent vortex flow with stacked axisymmetric toroidal vortices (Desmet et al., 1996). Bioreactor with Taylor–Couette type flow exhibits different flow regimes (e.g. Couette, vortex flow, turbulent vortex flow, turbulent flow...) depending on the rotational speed of the inner cylinder. In the RAB designed



**Fig. 1** – Setup of the photosynthetic rotating annular reactor (RAB) with Taylor–Couette type flow. (A) 3D representation of different parts composing the RAB, a : the stationary outer cylinder, b : the rotating inner cylinder and c : the light source protected by an internal water-tight cylinder, (B) photograph of RAB, (C) schematic diagram of RAB and (D) geometric characteristics of RAB.

for the present work, the objective was to work with turbulent vortex flow with spatial periodicity and rotational speed of the inner cylinder high enough to avoid the settling of microorganisms in the annular gap. In this context, the rotational speed of the inner cylinder was set to at least 80 rpm. The RAB hydrodynamic was studied experimentally at the reactor scale by the tracer method and local flow properties were obtained through computational fluid dynamics (CFD) simulation.

**2.1.2.1. Residence time distribution.** The general mixing behaviour in the RAB was investigated experimentally using the pulse tracer method (10 mL of NaCl solution at  $0.16 \text{ g mL}^{-1}$ )

to determine the residence time distribution (RTD). The experiment was conducted for two different rotational speeds, 80 and 170 rpm, and the inlet throughput (tap water at  $20^\circ \text{C}$ ) was supplied at  $Q = 26 \text{ mL min}^{-1}$  for a working volume in the RAB of  $V = 5.04 \text{ L}$ . The conductivity of the fluid was recorded at the outlet for 15 h (corresponding to 5 times the average residence time) with a specific probe (conductivity meter 524, CRISON, SELI, probe response time of 2 s) located in an agitated cell (30 mL) positioned at the outlet valve, in absence of biofilm and without illumination in the RAB.

RTD curves, defined as dimensionless concentration ( $E(\theta)$ ) versus dimensionless time ( $\theta$ ), were obtained from the outlet conductivity concentration data:

$$E(\theta) = c(t)/c(0) \quad (1)$$

where  $\theta$  is given by the ratio  $t/\tau$  with  $\tau = V/Q$ ,  $c(t)$  and  $c(0)$  are respectively the tracer concentrations at time  $t$  and time 0 for which  $c(0)$  results from an instantaneous mixing of the injected tracer. The experimental RTD curves were compared with the RTD curve obtained from a mathematical model of reactor as described by Sugiharto et al. (2009).

**2.1.2.2. Computational study of hydrodynamics.** Numerical simulation was performed to evaluate the flow pattern within the annular space and the characteristic turbulent scales. The mean wall shear stress on the external cylinder and the axial average velocity profiles in the annular gap were extracted from the simulations. The computational study was performed using the CFD software Fluent (6.2) at the rotational speeds of 80 and 170 rpm. The first step was to draw the grid and mesh the two-dimensional domain using the Fluent pre-processor Gambit®. The simulations were run as described by Coufort et al. (2005), i.e. Reynolds Averaged Navier–Stokes equations combined with the  $k-\epsilon$  Reynolds Stress Model, 2D-axisymmetric model in the steady state.

## 2.2. Experimental design

Initially, the bioreactor was run in batch culture mode for a seeding period to allow the micro-organisms to become attached before the continuous culture mode started.

### 2.2.1. Seeding procedures

The two biofilm cultures were achieved using two different seeding procedures. Seeding was conducted for 48 h, once for culture 1 and twice for culture 2. For culture 2, the two seeding phases were separated by a 24-hour period where the RAB operated in continuous culture mode. During the seeding phases, the bioreactor ran in closed recirculation, connected to an aquarium (10 L) where the inoculum was incubated. The aquarium was illuminated by fluorescent lamps including one cool daylight (F18W/GRO, Sylvania, Germany) and one fluora (F18W/54, Gt Britain) tubes, supplying average illumination values of  $32 \pm 3 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$  with light/dark periods of 16 h/8 h. The inoculum was obtained by removing epilithic biofilms by scraping with a toothbrush, previously treated with NaOH 1N, from (i) glass slides as previously described (Paule et al., 2009) placed in the experimental channel of our laboratory for culture 1 or (ii) various river stones for culture 2. Biofilm suspensions were homogenized (tissue homogenizer at 13,500 rpm, Ultra Turrax, T25) and filtered through a 250  $\mu\text{m}$  and then 100  $\mu\text{m}$  pore size filter (VWR) to reduce the part of the macro fauna and coarse sediments from the natural biofilms. The end of seeding phase was defined as the start of the experiment (day 0).

### 2.2.2. Experimental conditions

The experiment design used a thermostated reservoir (150 L, model CV 150, Japy) at 4 °C, equipped with a peristaltic pump (520S/R2 220 T/MN pump with silicon tubes ID  $\times$  OD = 1.6  $\times$  2.4 mm) which fed the RAB continuously with a synthetic culture medium. The inlet throughput was 26 mL min<sup>-1</sup>, which corresponded to a hydraulic residence time in the RAB of 3.23 h. The synthetic culture medium consisted of tap water supplemented with nutrients (SiO<sub>2</sub>, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> and NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) to favour the growth of biofilm and avoid nutrient limitation. Nutrient concentrations were measured as described by Paule et al. (2009). The physical-chemical parameters (temperature, pH and dissolved oxygen concentration) were recorder using probes located in the agitated cell (30 mL) positioned at the outlet valve of the reactor. Temperature and pH were measured with a pH meter 296 WTW (electrodes sentix H 8481 HD, SCHOTT). Dissolved oxygen concentrations were measured with an oxy 296 oxymeter WTW (trioxmatic 701 sensor, WTW). Dissolved organic carbon (DOC) concentrations were measured on acidified water samples (4  $\mu\text{L}$  of HCl 6N) and analyzed using a carbon analyser at 680 °C (Shimadzu, Model TOC 5000H). Table 1 summarizes the chemistry of the feed waters for both cultures. For culture 2, the pH of the culture medium was adjusted to 7.0 using sulphuric acid (95%).

The inside of the RAB was illuminated by fluorescent lamps including cool daylight (Osram L15W/865 Luminux, Germany) and fluora (Osram L15W/77, Germany) tubes in equal proportions, with light/dark periods of 16 h/8 h. Fluora tubes emit in the visible red, which enhances photosynthesis. At the center of the cylinder containing neon tubes, a cylinder of PMMA is positioned to improve the distribution of the light. Two neon tubes were used for culture 1 and 4 for culture 2. The illumination was measured as air photosynthetically active radiation (PAR) irradiance level by using a flat quantum sensor (model LI-189, LI-COR, Inc - Lincoln - Nebraska) and average recorded values were  $130 \pm 20$  and  $180 \pm 10 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$  for cultures 1 and 2 respectively. The PAR irradiance level was measured in the air because of the small size of the annular gap, and at a distance from the rotating inner cylinder equivalent to the annular gap. The values of illumination were chosen in this study in response to two constraints. The number of neon tubes (2 and 4) is a good compromise to maintain illumination homogeneity (the fewer lamps are used, the less uniform the light field is) and to prevent an increase of temperature generated by the presence of neon tubes (the RAB is not thermostated).

### 2.2.3. Biofilm characterization

The development of biofilm was monitored for 6.7 (culture 1) and 7 (culture 2) weeks. Biofilm cultures were carried out between June 11 and July 30, 2008 for culture 1 and between

**Table 1 – Physical-chemical characteristics of the synthetic water used to feed the rotating annular bioreactor during cultures 1 (C1) and 2 (C2). DOC = dissolved organic carbon concentration.**

	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> -P (mg L <sup>-1</sup> )	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N (mg L <sup>-1</sup> )	SiO <sub>2</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	Conductivity ( $\mu\text{S cm}^{-1}$ )	DOC (mg L <sup>-1</sup> )	pH
C1	0.357 $\pm$ 0.03	6.3 $\pm$ 0.1	13.1 $\pm$ 0.7	311 $\pm$ 29	0.6 $\pm$ 0.2	8.0 $\pm$ 0.5
C2	0.356 $\pm$ 0.02	4.2 $\pm$ 0.2	10.9 $\pm$ 2.9	368 $\pm$ 5	1.1 $\pm$ 0.3	7.1 $\pm$ 0.2



July 23 and September 16, 2009 for culture 2. At each sampling date, 3 plates were randomly sampled to follow the biofilm development. Access to the plates required opening the bioreactor and removing working fluid. Biofilms were removed from plates by scraping with a microscope slide previously treated with alcohol. Each plate represented one replicate. Biofilms were suspended in 50 mL (culture 1) or 90 mL (culture 2) of tap water previously filtered through a 0.2  $\mu\text{m}$  pore size filter (cellulose acetate membrane, Whatman) and homogenized (tissue homogenizer at 13,500 rpm, Ultra Turrax, T25). Biofilm suspension was aliquoted for the analyses of biomass descriptors, algal diversity and bacterial community structure by T-RFLP. Sampled plates were substituted by clean plates in the RAB and the newly placed plates were excluded from the following samplings.

**2.2.3.1. Biomass descriptors.** From an aliquot of initial biofilm suspension, the dry mass (DM) (aliquot of 30 mL), the ash-free dry mass (AFDM) and the chlorophyll *a* (aliquot of 10 mL) were measured as described by Paule et al. (2009).

**2.2.3.2. Algal diversity.** Algal diversity was estimated from a pool of 3 aliquots of 5 mL of homogenized biofilm suspension that was preserved in formalin solution (3%) and kept in darkness at 4 °C until counting and identification. The total density and abundance percentages were determined with an inverted microscope (Axiovert 10, Zeiss, West Germany) (Utermöhl, 1958).

**2.2.3.3. Microbial community structure.** After centrifugation (12,000 g at 4 °C for 20 min, Heraeus Multifuge) of an aliquot of 20–50 mg dry mass of the initial biofilm suspension (Lyautey et al., 2005), the pellet was stored at –80 °C until further analysis. Genomic DNA extraction was performed on the pellet using a DNeasy Plant Mini Kit according to the manufacturer's protocol (Qiagen Laboratories). The integrity of the extracted DNA was checked as described by Paule et al. (2009).

The 16S rRNA genes were amplified by PCR and the bacterial community structure was studied by T-RFLP as described by Bruneel et al. (2006) with slight modifications. The fluorescent labelled primers FAM 8F (5'-6-carboxy-fluorescein-phosphoramidite-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') (Eurogentec, 295 Liege, Belgium) (Lane, 1991) and HEX 1489R (5'-hexa-chloro-fluorescein-phosphoramidite-TAC CTT GTT ACG ACT TCA-3') (Invitrogen, Carlsbad, USA) (Weisburg et al., 1991), described as universal within the bacterial domain, were used. The reaction mixture for PCR was made in a 50  $\mu\text{L}$  volume containing 30 ng of template DNA, 25  $\mu\text{L}$  AmpliTaq Gold 360 Master Mix (Applied Biosystems) and 0.5  $\mu\text{L}$  of each primer. Amplification was carried out using an Applied Biosystems thermocycler with the following sequence: a 5 min hot start at 95 °C, followed by 35 cycles consisting of denaturation (45 s at 95 °C), annealing (45 s at 55 °C) and extension (1 min at 72 °C), and a final extension at 72 °C for 10 min. Restriction digestion was performed with HinfI.

### 2.3. Data analysis

T-RFLP profiles from the two cultures were compared by a web-based tool, T-Align (<http://inismor.ucd.ie/~talign/>) as

previously described by Smith et al. (2005) with the confidence interval of 0.5. Peaks, defined as Terminal Restriction Fragments (T-RFs), were scored as present or absent from T-RFLP profiles. The difference in physical-chemical characteristics and the difference in AFDM, chlorophyll *a* and the number of T-RFs between biofilm samples were assessed with the Mann Whitney test using SPSS software 13.0. Differences were considered statistically significant at  $p \leq 0.05$ .

To assess changes over time in the bacterial community structure from each culture, a Principal Component Analysis (PCA) was performed from the T-RF binary data for each biofilm culture using Primer v6 software (PrimerE, Ltd, Luton, United Kingdom). Peaks < 0.5% of the total area were excluded from the analysis and T-RFs that differed in size by 0.5 bp or less were considered to be identical. This baseline of 0.5% was defined in accordance with the approaches of Osborne et al. (2006).

Statistical analyses of PCA were run using an analysis of similarity (ANOSIM) via Past software 2.06 (Hammer et al., 2001) on Bray Curtis similarity matrices generated from binary data. This analysis generates a global R value in the range from 0 (completely random pattern) to 1 (completely separated groups) (Clarke, 1993). The global R value was considered statistically significant at  $p < 0.05$  uncorrected.

## 3. Results

### 3.1. Biofilm culture conditions

Throughout the experiments and associated with daily variations and photosynthetic processes, the temperature, pH and dissolved oxygen concentration values ranged from 19 to 30 °C, from 7.5 to 10, and from 4 to 18 mg L<sup>-1</sup>, respectively.

According to residual nutrient concentration values measured at the outlet of the RAB (data not shown), nutrients added in the synthetic culture medium were sufficient to support biofilm growth.

### 3.2. RAB hydrodynamic behaviour

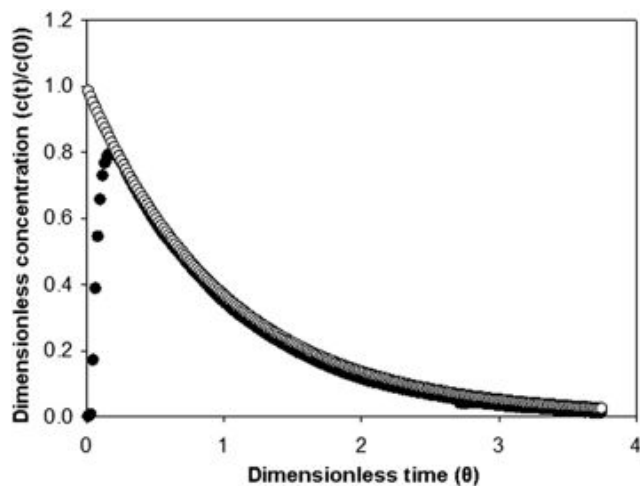
This section describes the characterization of the hydrodynamic behaviour of the flow in the annular space between the inner and outer cylinders through both experimental and numerical studies, performed at two rotational speeds: 80 and 170 rpm. Similar results were observed for both rotational speeds and only the data corresponding to 80 rpm are presented here.

#### 3.2.1. RTD experiment

Fig. 2 compares the RTD curves obtained with experimental data and predicted model simulation for one completely mixed reactor. The experimental and predicted model curves are similar. The experimental mean residence times were 209.9 and 220.8 min for rotational speeds of 80 and 170 rpm respectively.

#### 3.2.2. Computational study of hydrodynamics

For the rotational speed of 80 rpm, Fig. 3 shows a contour plot of local velocity in the annular space computed at the scale of



**Fig. 2 – Comparison between experimental (black dots) and predicted (white dots) Residence Time Distribution (RTD) curves at 80 rpm rotational speed and 26 mL min<sup>-1</sup> inlet flow. Predicted curve corresponds to model with a completely mixed reactor.**

two vortices, together with the outer cylinder wall shear stress for the same conditions (the dotted curve in Fig. 3). The presence of vortices produced a gradient of velocity at local scale on the walls of the cylinders. Consequently, the wall shear stress, which is directly related to the velocity gradient, was clearly non-uniform along the plate. In the zone of convergence of two vortices near the plate, the shear stress was maximal and a radial flow formed from plate to inner cylinder. The two vortices separated near the plate and the shear stress was minimal when the radial flow reached the plate.

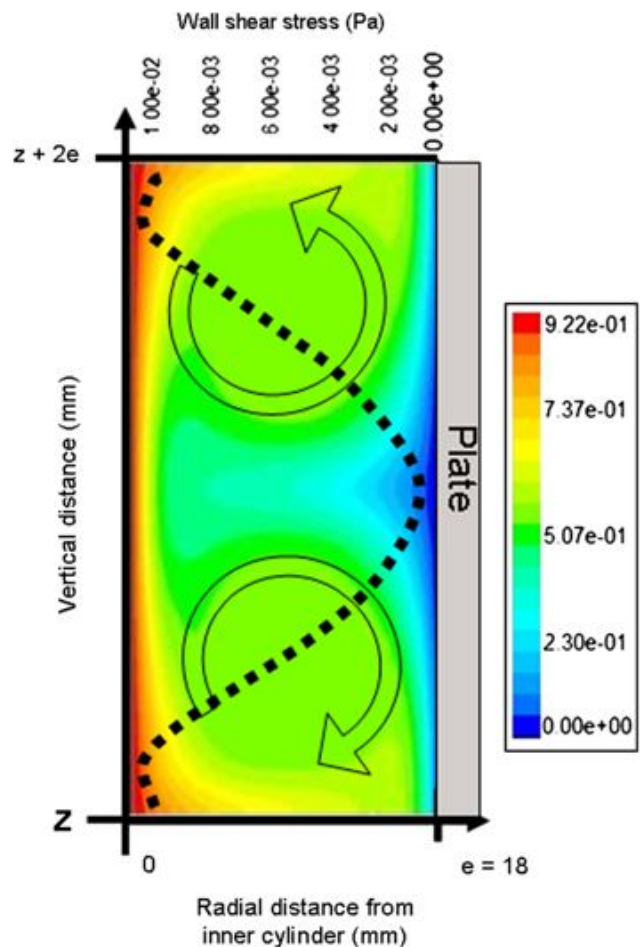
The diameter of an individual vortex is approximately equal to the annular gap and thus the number of stacked vortices was 5.4 across the height of one plate. The magnitude of the wall shear stress along plates increased with the rotational speed of the inner cylinder ( $r^2 = 0.99$ ). The mean values of shear stress were calculated as described by Coufort et al. (2005) and were found to be 1.11 and 4 Pa at rotational speeds of 80 and 170 rpm respectively.

Fig. 4 presents the average tangential velocity profile at a rotational speed of 80 rpm. The profile shows a decrease in tangential velocity across the inner and outer cylinders, which is characteristic of a turbulent vortex flow (Coufort et al., 2005). As a result, tangential velocity is about 0.3 m s<sup>-1</sup> at the plate wall when rotational speed is 80 rpm and 0.7 m s<sup>-1</sup> for 170 rpm (data not shown).

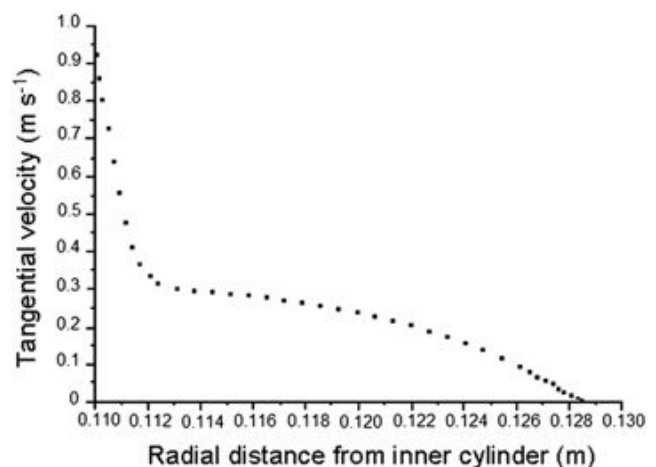
### 3.3. Biofilm analyses

#### 3.3.1. Biomass descriptors

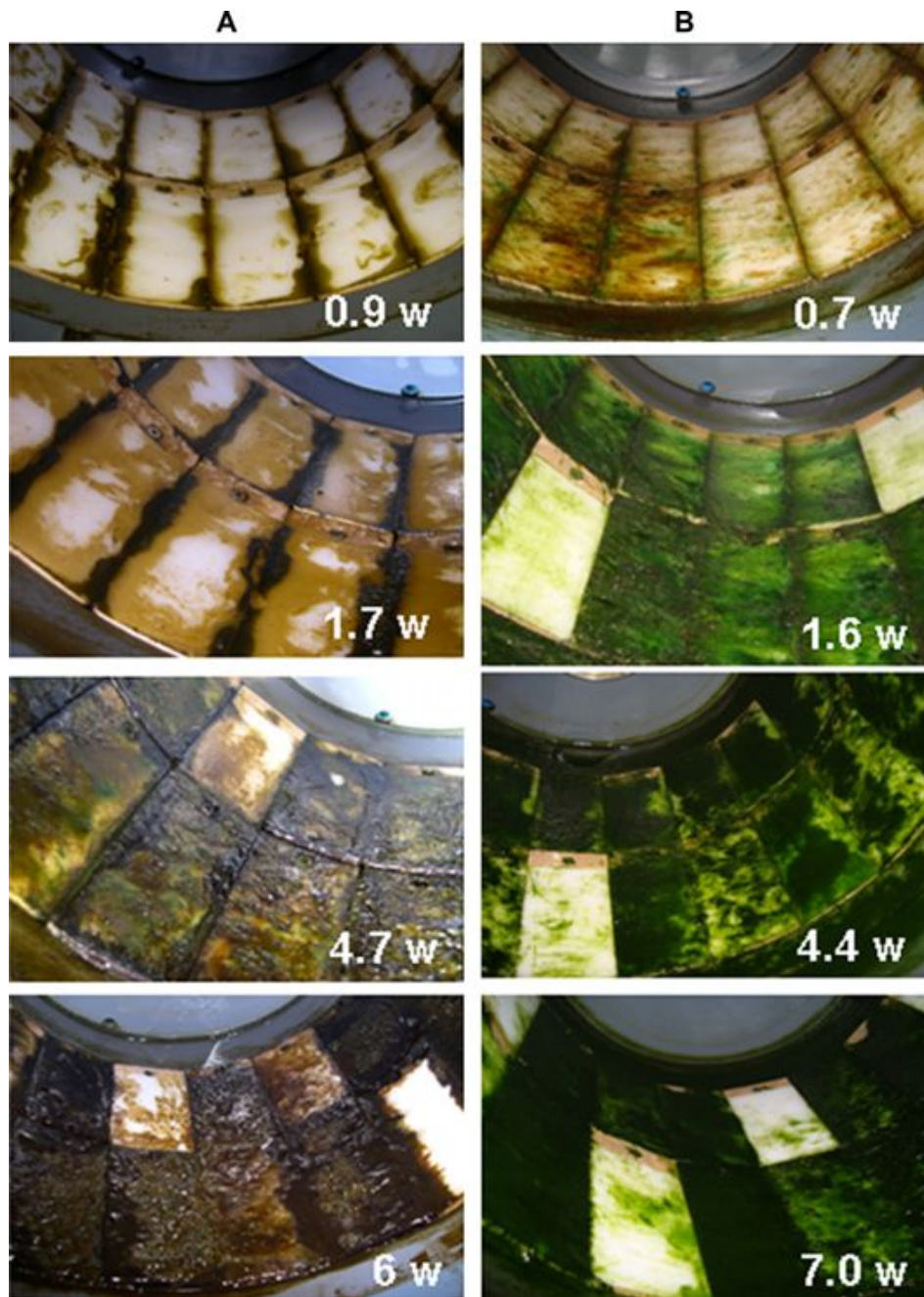
Fig. 5 illustrates the biofilm colonization of plates over both experiments. The first colonization states occurred on the ridges of plates. Biofilm biomass as expressed by AFDM and chlorophyll a presented similar linear growth patterns, giving a biomass peak of 4.2 and 2.4 mg AFDM cm<sup>-2</sup> and 0.05 and



**Fig. 3 – Contour plot of velocity magnitude field (m s<sup>-1</sup>) in the annular space between inner (left) and outer (right) cylinders computed by CFD at rotational speed of 80 rpm, and the corresponding wall shear stress along plates placed inside the outer cylinder (e is the width of the annular gap).**



**Fig. 4 – Profile of tangential velocity along a line of constant height in the annular space between the inner (left) and outer (right) cylinders computed by CFD for a rotational speed of 80 rpm.**

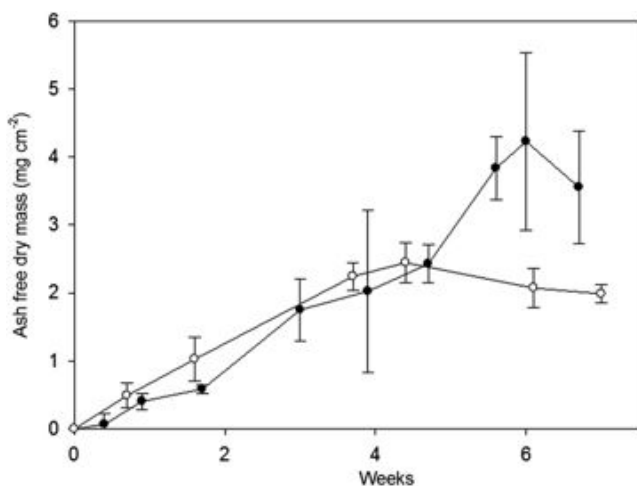


**Fig. 5** – Photographic images of colonized plates on the internal surface of the external cylinder of the RAB during culture 1 (A) and culture 2 (B). Each plate has dimensions  $50 \times 100 \text{ mm}^2$ . Numbers indicate biofilm age in weeks. White and partially colonized plates correspond to newly placed plates after sampling.

0.03 mg chlorophyll *a*  $\text{cm}^{-2}$  after 6 and 4.4 weeks of incubation for cultures 1 and 2 respectively (Figs. 6 and 7). This growth phase was followed by a plateau (Mann Whitney  $p > 0.05$ ), then, for culture 2, by a slight loss of biomass (visible on the illustration of Fig. 5) (Mann Whitney,  $p < 0.05$ ). Both variables (AFDM and chlorophyll *a*) were significantly correlated for the two cultures (C pearson = 0.95,  $p < 0.01$  and C pearson = 0.93,  $p < 0.01$ , for cultures 1 and 2 respectively). The AFDM/DM ratio ranged from 39.5 to 62.1%, indicating biofilms poor in detritus and sedimentary particles (data not shown).

### 3.3.2. Algal diversity

Two seeding procedures were tested using inocula of different origins. The inoculum from artificial biofilm (experimental channel) used for culture 1 presented lower species richness (7 species) than the inoculum from natural biofilm (river) used for culture 2 (27 species). Moreover, the two inoculum types had different algal community compositions (Fig. 7). Inoculum from artificial biofilm was dominated by Cyanobacteria (95.4%) composed essentially of *Leptolyngbya* spp. (88.5%), and inoculum from natural biofilm was dominated by Diatoms



**Fig. 6 – Temporal evolution of photosynthetic biofilm biomass expressed as mg cm<sup>-2</sup> of ash-free dry mass (AFDM) during the growth period in bioreactor for culture 1 (black dots) and culture 2 (white dots).**

(86.3%), composed essentially of *Navicula tripunctata* (O.F. Müller) Bory (23.2%), *Nitzschia* spp. (19.4%) and *Achnanthes* spp. (12.3%).

The species richness was relatively low and constant during culture 1 (from 5 to 7) although the species richness decreased over time during culture 2 (from 27 to 8). The 6.7-week mature biofilm from culture 1 was mainly composed of Diatoms (98.6%), especially *Nitzschia palea* (Kutz.) W. Smith (92.6%) and the mature biofilm from culture 2 was essentially composed of green algae (95.5%) especially *Scenedesmus* (74.9%) and *Ankistrodesmus/Monoraphidium* (9.9%). Six of the ten Chlorophyceae that composed the biofilm of culture 2 are known to present planktonic ecotypes.

### 3.3.3. Bacterial community structure

The dynamics of the bacterial community structure were determined by T-RFLP throughout the experiments. A total of

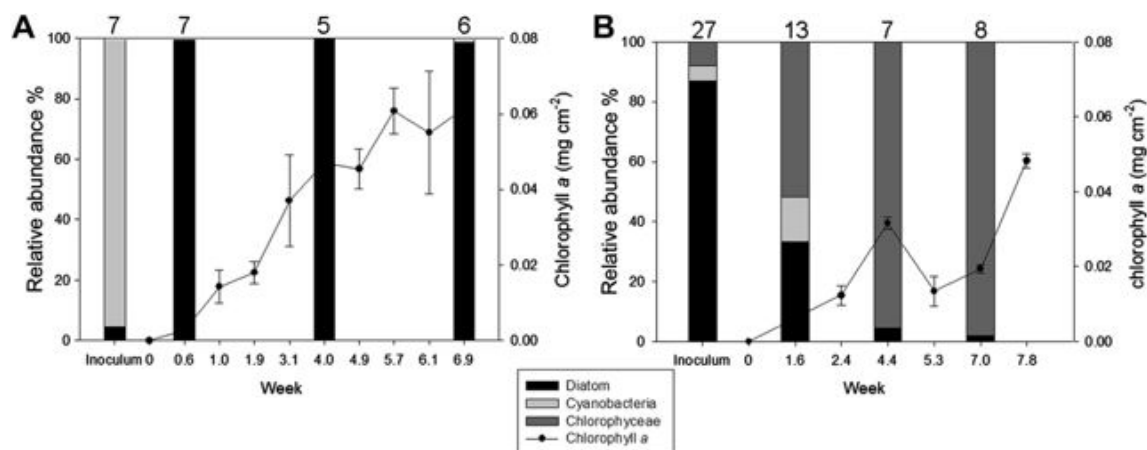
35 different T-RFs per culture for all sample times were identified with an average number per sample ranging from 12 to 25 and 12 to 23 T-RFs, for cultures 1 and 2 respectively. Principal component analysis (PCA) was performed on the T-RF binary data for each biofilm culture (Fig. 8). The two axes accounted for 21.2 and 18.6% of the total variance for culture 1, and 30.6 and 18.1% for culture 2. Good homogeneity was observed among replicates, particularly for culture 2, suggesting little spatial variability during the culture course in the bioreactor. This analysis was strengthened by the similar trends observed with PCAs built with the first and third axes. The first three axes accounted for 65.5 and 50.2% of the variation of T-RFLP patterns for cultures 1 and 2 (data not shown) respectively.

During both cultures, the bacterial community structure changed according to colonization time, based on sample clustering corresponding to a similarity of 55% (circle from Fig. 8) (culture 1 : global R = 0.776 and pairwise R ranged from 0.63 to 0.8,  $p < 0.05$ ; culture 2 : global R = 0.998 and pairwise R ranged from 0.997 to 1,  $p < 0.05$ ), followed by a stable phase after 3 weeks for culture 1 (global R = 0.435,  $p < 0.05$ ) and 4.4 weeks for culture 2 (global R = 0.51,  $p < 0.05$ ). Bacterial community composition rapidly diverged from the initial bacterial community (global R = 0.895 and 0.754, for cultures 1 and 2 respectively,  $p < 0.05$ ). A PCA including T-RF of cultures 1 and 2 showed that the profiles were distributed along the first axis (28.9%) according to the origin of the inoculum (data not shown). PCA showed similar temporal variations of bacterial community structures during the biofilm development irrespective of the inoculum type.

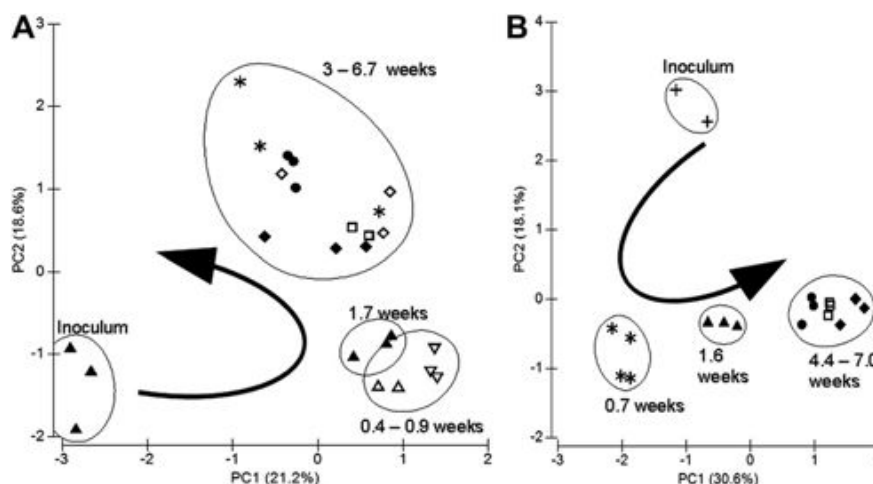
## 4. Discussion

### 4.1. Growth dynamics of phototrophic biofilms

In environmental phototrophic biofilms, growth basically occurs through, firstly, an accretion phase related to colonization and growth processes (increase of AFDM resulting in a biomass peak) and, secondly, an ageing phase (Biggs, 1996).



**Fig. 7 – Temporal evolution of algal taxa number and their percentage abundance, and chlorophyll a as mg cm<sup>-2</sup> of chlorophyll a during the biofilm growth period in RAB for cultures 1 (A) and 2 (B). The species richness is given for each sample at the bottom of each bar.**



**Fig. 8** – Changes in bacterial community structure over time assessed by Principal Component Analysis (PCA) based on the T-RFLP data for (A) culture 1 and (B) culture 2. Circles correspond to a similarity of 55%.

In the present experiments, linear growth phases were observed to reach AFDM peaks of 4.2 and 2.4 mg cm<sup>-2</sup> after 6 and 4.4 weeks for cultures 1 and 2 respectively, followed by an ageing phase for culture 2. During the first step of each experiment, the colonization by suspended biomasses preferentially occurs on the substrate ridges. At the junction between two plates, the presence of gap was responsible for a recirculating flow near the solid surface. This stationary zone can act as a trap where biomass can accumulate, which could favour biofilm growth.

Typically, the first species to colonize the substrate are heterotrophic bacteria and algal with fast growth rate and small cells, followed by the settlement and colonization of slow growth and large cells species (Biggs et al., 1998; Sekar et al., 2002; Roeselers et al., 2007). Thus, Cyanobacteria are considered as late colonizers, with a slow growth rate (Sekar et al., 2002). This could explain their fast disappearance during both cultivations and their recurrence in the 6.7-week-old biofilm during culture 1. The use of a more diversified inoculum (natural) and longer seeding phase for culture 2 did not seem to enrich the algal community. As observed in most experiments performed at laboratory scale (Boulétreau et al., 2010), biofilms at the end of the experiment exhibited poor algal specific richness, of 6 and 7 species for cultures 1 and 2 respectively. As a result, the minimal number of algal species to preserve an integral biofilm in this RAB seemed to be a final number of 6 or 7 species. The use of a single short seeding phase in the present work (48 h or twice 48 h) may have limited the adhesion of micro-organisms or only selected pioneer algal species and could thus be inherent to this poor diversity. The choice of constant experimental conditions during biofilm development did not favour environmental changes as observed in a natural environment (Biggs, 1996). It is known that, in an undisturbed environment (e.g. constant hydrodynamic conditions), autogenic processes appear and the more competitive species dominate (competitive exclusion), which can explain the poor algal diversity and lead to self detachment (Boulétreau et al., 2006) as observed during culture 2 at 4.4 weeks of colonization. It has been suggested

that initial high diversity is caused by the arrival of new micro-organisms, while ensuing competition decreases diversity in late successional stages (Sekar et al., 2002). In our RAB, the absence of arrival of new micro-organisms throughout experiment may have caused competition processes even during the first steps of colonization. In microcosm studies, the continuous seeding processes enable the natural conditions to be reproduced but can interact with the disturbance under study (Tili et al., 2008).

The settings of the variables (temperature, light intensity, nutrient content, and flow rate), chosen to favour the growth of biofilms can be very selective for some species. For instance temperatures between 0 and 25 °C increased species richness and diversity and temperatures above 30 °C decreased species richness (DeNicola, 1996). Moreover, previous studies have shown that nutrient ratios (N, P and Si) greatly influence the composition of algal communities (Hillebrand and Sommer, 2000b) and that the enrichment of the medium favours the dominance of single species (Hillebrand and Sommer, 2000a).

End-of-experiment biofilms were strongly dominated either by *N. palea* (Kutz.) W. Smith. or *Scenedesmus* genus for culture 1 and culture 2, respectively. *N. palea* (Kutz.) W. Smith. and the *Scenedesmus* genus are eutrophic and polysaprobic species, which reveal nutrient-rich waters with strong conductivity (Tison et al., 2004; Peña-Castro et al., 2004). This is consistent with the physical-chemical characteristics of the culture medium used. *Scenedesmus* genus is a planktonic species and the seeding phase conducted in suspension could have induced its selection. The time taken to reach the AFDM peak was shorter for culture 2 than for culture 1 and was followed by a slight biomass removal leading to the ageing phase. Zippel and Neu (2005) concluded that green-algal-dominated biofilms presented a less stable and compact structure caused by a faster growth rate. The authors observed that fast development induced the formation of poorly diversified biofilms, probably explained by an economy and partition of resources (Zippel and Neu, 2005). One possible reason why algal diversity is small can be attributed to taxonomical analyses based on morphotypes. Many different

species can fall into the same category and can induce an under-estimation of specific richness.

Bacterial communities from both cultures changed markedly over the development of the biofilms. Despite differences in the inoculum communities, the succession was similar for both cultures associated with different trajectories. Since there was no addition of micro-organisms after the seeding phase, the temporal changes for algal and bacterial communities observed in the present study do not correspond to ecological succession processes occurring over natural biofilm maturation for either the algal (McCormick and Stevenson, 1991) or bacterial (Lyautey et al., 2005) compartments but are related to different algal species and T-RF dominance variations.

The primers used in this study have been designed to target specifically the Bacteria domain. Our *in silico* searches using the RDP database (Cole et al., 2009) indicated that both primers (8F and 1489R) can potentially target Cyanobacteria. Among the *in silico* targeted organisms, around 5% corresponded to cyanobacteria. Hence, the use of these primers in the current study could over-estimate non phototrophic bacteria richness.

## 4.2. Rotating annular bioreactor

**4.2.1. Improvements and advantages compared to other RAB**  
Previous studies have suggested that the rotating annular bioreactor (RAB) can be an appropriate system to study the effects of various environmental factors on biofilm development (e.g. Neu and Lawrence, 1997; Chénier et al., 2003). Considering all critical points associated with RAB presented in the literature, the objective of this work was first to design an innovative bioreactor having a modular light source inside the system and second to have a good knowledge of hydrodynamic conditions as assessed using the numerical approach. Computer simulations allow us to confirm a turbulent vortex flow inside the annular gap with the presence of stacked vortices. We observed shear stress and velocity gradients at the scale of the vortices, and the distribution of shear stress described a periodic variation along the height of the bioreactor. As observed by Desmet et al. (1996), the presence of these vortices allows a faster real axial dispersion process than the plug-flow hydrodynamic type, which leads to well mixed liquid phase without of nutrient concentration gradients inside the annular gap, as verified by the tracer method. Variability between plates ( $n = 3$ ) for the same sampling time was relatively low ( $\leq 30\%$ ) for biomass analysis, and their percentage of homology was  $\geq 60\%$  for T-RFLP analysis, indicating low spatial variability of biofilm colonization and growth inside the RAB.

In ecological research, it is necessary to use controlled experiments with large replication to correct for the well known heterogeneity within biofilms (Wimpenny et al., 2000). Our prototype was therefore designed with numerous, large supports associated with a large liquid working volume (5.04 L). In fact, the 32 plates provided a total colonization surface of  $0.16 \text{ m}^2$  in the present study as against the 12 plates providing  $0.0132 \text{ m}^2$  of colonization surface in Lawrence et al. (2000), or the 20 plates with  $0.00187 \text{ m}^2$  in Declerck et al. (2009). We used plates made of polyethylene, suggested to be

applicable to the growth of bacterial (Yu et al., 2010) or phototrophic (Szlauer-Lukaszewska, 2007) biofilms. Their plastic nature and flexibility made them easy to curve so as to fit the external cylinder geometry, thus limiting the disturbance on the flow. The plate fixation design allowed quick and easy sampling without destruction of the sampled biofilms.

The geometry, current velocity and continuous culture mode of our prototype made it possible (i) to limit the development of phytoplankton and thus the competition processes between phototrophic biofilm and planktonic biomass, (ii) to limit potential erosion from recirculation of particle or sloughed biofilm fragments, and (iii) to avoid the settling of larger biofilm grazers in such an environment with fast rotation of the water column.

### 4.2.2. Shortcomings and potential improvements

The design of our RAB prototype leads to particular operating conditions for the phototrophic biofilm development. First, flow on the plates is produced by the rotation of the inner cylinder, and not directly by the circulation of the water through the system. The consequence is the RAB functioning as a partial closed flow through system without water contact with atmosphere, and with a water residence time of a few hours. The uncoupling between flow velocity on plates and medium flow rate gives unnatural operating conditions. For example, increases of pH (up to 10) or dissolved oxygen concentration (up to oversaturation of 200%) were obtained with daily variations and photosynthetic processes. These conditions may cause temporary inorganic carbon limitation, reactive oxygen damage, and selection of algal and bacterial species. To circumvent these shortcomings, a new version of the RAB must integrate pH control and oxygen stripping, for example with an external loop to prevent the modification of the flow pattern in the bioreactor. Second, the temperature is not controlled inside the bioreactor, and values up to  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  were obtained at the end of a diurnal period, or when the number of neon tubes was increased. Our RAB contains 3 cylinders, so the best way to control the temperature would be to thermoregulate the atmosphere inside the cylinder containing the neon tubes. Third, it can be suspected that a heterogenous distribution of light inside the RAB occurred, the total number of neon tubes being small and including two types of fluorescent lamps. This technical flaw can be circumvented by using opaque material placed inside the internal water-tight cylinder and in front of the lamps.

### 4.2.3. Towards a promising tool

In spite of some improvements needed on this prototype, our study presents the applicability and the performance of a new prototype of rotating annular bioreactor (Taylor–Couette flow type) which can be considered as a highly suitable tool for the cultivation, investigation and understanding of a variety of ecological concepts, including the specific richness–resistance relationship, or the coupling between hydrodynamic level/chemical compounds and structure/function of phototrophic biofilms.

As recorded in a previous study in microcosm (Boulêtreau et al., 2010), despite a poorly diversified algal community, the phototrophic biofilm exhibited high biomass production. This leads us to wonder about the effect of poor algal diversity

on the biomass production of phototrophic biofilm. A major challenge of the last decade has been to understand the relationship between diversity loss and ecosystem processes (Loreau et al., 2001). Numerous studies have shown that species-rich communities produce more biomass than species-poor communities (Zhang and Zhang, 2006). In future experiments, it could be interesting to assess the stability and resistance of these poorly diversified algal communities obtained in the prototype when a disturbance (e.g. toxic pollutants) is imposed on them. Various works have observed greater sensitivity to disturbance for poorly diversified communities (Zhang and Zhang, 2006).

Generally, it is difficult to individualize the main factors influencing epilithic biofilm development and several sources of stresses can have synergistic effects or the inverse. This prototype can bring new perspectives for characterizing the effect of a single factor (e.g. hydrodynamic). Through the ability to modulate the experimental conditions, and by the choice of a particular parameter adapted to algal ecology, the prototype can permit future investigations for the formation and cultivation of artificial biofilms as has recently been reported in the literature (Hayashi et al., 2010).

## 5. Conclusion

We propose an improved RAB featuring an embedded modular source of light and the possibility to accurately control the hydrodynamic conditions. These characteristics ensure better control of the operating conditions in comparison with other RABs. Additionally, the larger size of the bioreactor permits numerous samples of biomasses to be taken along the course of experiments to ensure replicates and long term cultures. Further improvements of our RAB version would be beneficial however, including technical solutions for temperature control, homogenous distribution of light inside the system, pH control and oxygen stripping, and operating conditions with a less selective culture medium and a continuous supply of biomass inoculum. Still, our RAB may be useful for the cultivation and experimental study of phototrophic biofilms. This approach is complementary to experimental and observational studies carried out at more complex and realistic scales such as 'open' channel and *in situ* investigations. Hence, RAB-based experiments can make a significant contribution to our understanding of the mechanisms which mediate the structure and functions of phototrophic biofilm communities.

## Acknowledgements

This work was funded by the French National Programme EC2CO – Environmental Microbiology - and by the Midi-Pyrénées Council Programme of the Pyrenean working community. We are grateful to the ARIAS (Toulouse) company, especially J.-J. Bertrand, for manufacturing the rotating annular bioreactor. We thank J.-L. Druilhe for the electrical device for continuous physical-chemical measurement, S. Karama for assistance with the T-RFLP method, S. Mastrorillo

for field assistance, and E. Mazeau for the computational study of hydrodynamics. We also thank D. Dalger and T. Louis for bioreactor handling assistance, and E. Lyautey for revising the correcting English of the manuscript.

## REFERENCES

- Battin, T.J., Kaplan, L.A., Newbold, J.D., Cheng, X., Hansen, C., 2003. Effects of current velocity on the nascent architecture of stream microbial biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* 69 (9), 5443–5452.
- Besemer, K., Singer, G., Limberger, R., Chlup, A.-K., Hochedlinger, G., Hödl, I., Baranyi, C., Battin, T.J., 2007. Biophysical controls on community succession in stream biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* 73 (15), 4966–4974.
- Biggs, B.J.F., 1996. Patterns in benthic algae of stream. In: Stevenson, R.J., Bothwell, M.L., Lowe, R.L. (Eds.), *Algal Ecology. Freshwater Benthic Ecosystem*. Academic Press, San Diego, pp. 31–56.
- Biggs, B.J.F., Stevenson, R.J., Lowe, R.L., 1998. A habitat matrix conceptual model for stream periphyton. *Archiv Für Hydrobiologie* 143 (1), 21–56.
- Boston, H.L., Hill, W.R., 1991. Photosynthesis-light relations of stream periphyton communities. *Limnology and Oceanography* 36 (4), 644–656.
- Boulêtreau, S., Garabétian, F., Sauvage, S., Sánchez-Pérez, J.-M., 2006. Assessing the importance of a self-generated detachment process in river biofilm models. *Freshwater Biology* 51 (5), 901–912.
- Boulêtreau, S., Sellali, M., Elozeigi, A., Nicaise, Y., Bercovitz, Y., Moulin, F., Eiff, O., Sauvage, S., Sánchez-Pérez, J.-M., Garabétian, F., 2010. Temporal dynamics of river biofilm in constant flows: a case study in a riverside laboratory flume. *International Review of Hydrobiology* 95 (2), 156–170.
- Bourassa, N., Cattaneo, A., 1998. Control of periphyton biomass in Laurentian streams (Québec). *Journal of the North American Benthological Society* 17 (4), 420–429.
- Bruneel, O., Duran, R., Casiot, C., Elbaz-Poulichet, F., Personné, J.-C., 2006. Diversity of microorganisms in Fe–As-rich acid mine drainage waters of Carnoulès, France. *Applied and Environmental Microbiology* 72 (1), 551–556.
- Characklis, W.G., 1990. Laboratory biofilm reactor. In: Characklis, W.G., Marshall, K.C. (Eds.), *Biofilms*. John Wiley and Sons, New York, pp. 55–89.
- Chénier, M.R., Beaumier, D., Roy, R., Driscoll, B.T., Lawrence, J.R., Greer, C.W., 2003. Impact of seasonal variations and nutrient inputs on nitrogen cycling and degradation of hexadecane by replicated river biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* 69 (9), 5170–5177.
- Clarke, K.R., 1993. Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. *Australian Journal of Ecology* 18 (1), 117–143.
- Cole, J.R., Wang, Q., Cardenas, E., Fish, J., Chai, B., Farris, R.J., Kulam-Syed-Mohideen, A.S., McGarrell, D.M., Marsh, T., Garrity, G.M., Tiedje, J.M., 2009. The ribosomal database project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Research* 37 (suppl 1), D141–D145.
- Coufort, C., Bouyer, D., Liné, A., 2005. Flocculation related to local hydrodynamics in a Taylor–Couette reactor and in a jar. *Chemical Engineering Science* 60 (8–9), 2179–2192.
- Declerck, P., Behets, J., Margineanu, A., van Hoef, V., De Keersmaecker, B., Ollevier, F., 2009. Replication of *Legionella pneumophila* in biofilms of water distribution pipes. *Microbiological Research* 164 (6), 593–603.

- DeNicola, D.M., 1996. Periphyton responses to temperature at different ecological levels. In: Stevenson, R.J., Bothwell, M.L., Lowe, R.L. (Eds.), *Algal Ecology - Freshwater Benthic Ecosystems*. Academic Press, San Diego, pp. 31–56.
- Desmet, G., Verelst, H., Baron, G.V., 1996. Local and global dispersion effects in Couette–Taylor flow-II. Quantitative measurements and discussion of the reactor performance. *Chemical Engineering Science* 51 (8), 1299–1309.
- Gjaltema, A., Arts, P.A.M., van Loosdrecht, M.C.M., Kuenen, J.G., Heijnen, J.J., 1994. Heterogeneity of biofilms in rotating annular reactors: occurrence, structure, and consequences. *Biotechnology and Bioengineering* 44 (2), 194–204.
- Hammer, Y., Harper, D.A.T., Ryan, P.D., 2001. Past: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4 (1), 4–9.
- Hayashi, S., Jang, J.E., Itoh, K., Suyama, K., Yamamoto, H., 2010. Construction of river model biofilm for assessing pesticide effects. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 60 (1), 44–56.
- Hillebrand, H., Sommer, U., 2000a. Diversity of benthic microalgae in response to colonization time and eutrophication. *Aquatic Botany* 67 (3), 221–236.
- Hillebrand, H., Sommer, U., 2000b. Effect of continuous nutrient enrichment on microalgae colonizing hard substrates. *Hydrobiologia* 426 (1), 185–192.
- Jackson, C.R., Churchill, P.F., Roden, E.E., 2001. Successional changes in bacterial assemblage structure during epilithic biofilm development. *Ecology* 82 (2), 555–566.
- Lane, D.J., 1991. rRNA sequencing. In: Stachenbradt, E. (Ed.), *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. Wiley, Chichester, pp. 115–175.
- Lawrence, J.R., Chénier, M.R., Roy, R., Beaumier, D., Fortin, N., Swerhone, G.D.W., Neu, T.R., Greer, C.W., 2004. Microscale and molecular assessment of impacts of nickel, nutrients, and oxygen level on structure and function of river biofilm communities. *Applied and Environmental Microbiology* 70 (7), 4326–4339.
- Lawrence, J.R., Swerhone, G.D.W., Neu, T.R., 2000. A simple rotating annular reactor for replicated biofilm studies. *Journal of Microbiological Methods* 42 (3), 215–224.
- Loreau, M., Naeem, S., Inchausti, P., Bengtsson, J., Grime, J.P., Hector, A., Hooper, D.U., Huston, M.A., Raffaelli, D., Schmid, B., Tilman, D., Wardle, D.A., 2001. Biodiversity and ecosystem functioning: current knowledge and future challenges. *Science* 294 (5543), 804–808.
- Lyautey, E., Jackson, C.R., Cayrou, J., Rols, J.-L., Garabétian, F., 2005. Bacterial community succession in natural river biofilm assemblages. *Microbial Ecology* 50 (4), 589–601.
- McCormick, P.V., Stevenson, R.J., 1991. Mechanisms of benthic algal succession in lotic environments. *Ecology* 72 (5), 1835–1848.
- Murdock, J.N., Dodds, W.K., 2007. Linking benthic algal biomass to stream substratum topography. *Journal of Phycology* 43 (3), 449–460.
- Neu, T.R., Lawrence, J.R., 1997. Development and structure of microbial biofilms in river water studied by confocal laser scanning microscopy. *FEMS Microbiology Ecology* 24 (1), 11–25.
- Osborne, C.A., Rees, G.N., Bernstein, Y., Janssen, P.H., 2006. New threshold and confidence estimates for terminal restriction fragment length polymorphism analysis of complex bacterial communities. *Applied and Environmental Microbiology* 72 (2), 1270–1278.
- Paule, A., Lyautey, E., Garabétian, F., Rols, J.-L., 2009. Autogenic versus environmental control during development of river biofilm. *Annales de Limnologie-International Journal of Limnology* 45 (1), 1–10.
- Peña-Castro, J.M., Matínez-Jerónimo, F., Esparza-García, F., Cañizares-Villanueva, R.O., 2004. Phenotypic plasticity in *Scenedesmus incrassatulus* (Chlorophyceae) in response to heavy metals stress. *Chemosphere* 57 (11), 1629–1636.
- Roeselers, G., van Loosdrecht, M.C.M., Muyzer, G., 2007. Heterotrophic pioneers facilitate phototrophic biofilm development. *Microbial Ecology* 54 (3), 578–585.
- Sekar, R., Nair, K.V.K., Rao, V.N.R., Venugopalan, V.P., 2002. Nutrient dynamics and successional changes in a lentic freshwater biofilm. *Freshwater Biology* 47 (10), 1893–1907.
- Singer, G., Besemer, K., Hödl, I., Chlup, A., Hochedlinger, G., Stadler, P., Battin, T.J., 2006. Microcosm design and evaluation to study stream microbial biofilms. *Limnology and Oceanography: Methods* 4, 436–447.
- Smith, C.J., Danilowicz, B.S., Clear, A.K., Costello, F.J., Wilson, B., Meijer, W.G., 2005. T-Align, a web-based tool for comparison of multiple terminal restriction fragment length polymorphism profiles. *FEMS Microbiology Ecology* 54 (3), 375–380.
- Sugiharto, S., Su'ud, Z., Kurniadi, R., Wibisono, W., Abidin, Z., 2009. Radiotracer method for residence time distribution study in multiphase flow system. *Applied Radiation and Isotopes* 67 (7–8), 1445–1448.
- Szlauer-Lukaszewska, A., 2007. Succession of periphyton developing on artificial substrate immersed in polysaprobic wastewater reservoir. *Polish Journal of Environmental Studies* 16 (5), 753–762.
- Tison, J., Giraudel, J.L., Coste, M., Park, Y.-S., Delmas, F., 2004. Use of unsupervised neural networks for ecoregional zoning of hydrosystems through diatom communities: case study of Adour-Garonne watershed (France). *Archiv Für Hydrobiologie* 159 (3), 409–422.
- Tlili, A., Dorigo, U., Montuelle, B., Margoum, C., Carluer, N., Gouy, V., Bouchez, A., Bérard, A., 2008. Responses of chronically contaminated biofilms to short pulses of diuron: an experimental study simulating flooding events in a small river. *Aquatic Toxicology* 87 (4), 252–263.
- Utermöhl, H., 1958. Zur vervollkommnung der quantitativen phytoplankton methodik. *Mitteilungen Internationale Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie* 9, 1–38.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., Lane, D.J., 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *The Journal of Bacteriology* 173 (2), 697–703.
- Wimpenny, J., Manz, W., Szewzyk, U., 2000. Heterogeneity in biofilms. *FEMS Microbiology Reviews* 24 (5), 661–671.
- Yu, J., Kim, D., Lee, T., 2010. Microbial diversity in biofilms on water distribution pipes of different materials. *Water Science and Technology* 61 (1), 163–171.
- Zhang, Q.-G., Zhang, D.-Y., 2006. Species richness destabilizes ecosystem functioning in experimental aquatic microcosms. *Oikos* 112 (1), 218–226.
- Zippel, B., Neu, T.R., 2005. Growth and structure of phototrophic biofilms under controlled light conditions. *Water Science and Technology* 52 (7), 203–209.



## II.3 Conclusions du chapitre

Ce chapitre nous a permis d'apprécier l'importance relative des facteurs environnementaux *versus* les facteurs autogènes sur la structuration des communautés bactériennes durant le développement des biofilms phototrophes à travers l'étude *in situ* de la première partie de ce chapitre. Le contrôle par les facteurs environnementaux prédomine durant les premiers stades de développement du biofilm suivi par une prédominance des facteurs autogènes. Ces deux types de facteurs vont contrôler les successions écologiques des espèces menant à une trajectoire particulière propre à chaque agrégat. Cette trajectoire peut toutefois être modifiée avec la modification des facteurs environnementaux, observée ici par l'expérience de transplantation sans pour autant « retrouver » complètement la trajectoire des biofilms autochtones : soit parce que l'état de développement du biofilm était d'un état d'avancement tel que les facteurs autogènes prédominaient déjà sur les facteurs environnementaux, signifiant que les 3 semaines de colonisation initiales permettaient le développement d'un biofilm « mature » du point de vue des communautés bactériennes, soit parce que la période de post-transplantation (2,5 semaines) était trop courte pour permettre une ressemblance parfaite avec les communautés autochtones. Ce design expérimental, basé sur une expérience de transplantation, est aujourd'hui de plus en plus utilisé pour apprécier la résilience des communautés après une perturbation (pollution par des pesticides ou des métaux, Dorigo et al. 2010a et b ; Rotter et al. 2011). Comme nous avons pu l'observer durant cette étude, les expériences *in situ* sont délicates, et présentent quelques limites car de nombreux paramètres coexistent ensemble et notamment l'évolution temporelle et l'état de maturation du biofilm rarement pris en compte durant les expériences. Il est important dans ce type d'expérimentation de réaliser une très bonne caractérisation biologique et physique des sites d'études, mais également d'intégrer le biofilm dans sa globalité, et à différents niveaux d'organisations biologiques, algues, bactéries, brouteurs, etc... (Lawrence et al. 2002).

Les caractéristiques physico-chimiques des sites d'études sont très contrastées, ainsi le transfert d'un site à l'autre que subit le biofilm durant l'expérience de transplantation peut être considéré comme un stress. Ce design expérimental peut être utilisé dans un objectif d'évaluation des différentes réponses possibles des communautés face à une perturbation (résistance, adaptation...), en fonction des différents stades de développement, c'est-à-dire de l'importance relative des facteurs environnementaux *versus* les facteurs autogènes, dans un contexte d'étude de la relation structure des communautés - fonctionnement des écosystèmes.

Lors de la deuxième partie de ce chapitre, nous avons cherché à évaluer le déterminisme autogène exercé sur les communautés de biofilms. Dans ce contexte, un prototype de RAB a été développé et des conditions environnementales stables ont été appliquées. Par ce choix

expérimental, nous cherchions à limiter l'influence des facteurs allogènes sur la croissance du biofilm. La stabilité des conditions opératoires était accentuée par l'utilisation d'un système fermé pour limiter les relations avec l'atmosphère, l'utilisation de supports artificiels, l'alimentation par de l'eau du réseau, l'absence de recirculation de l'eau pour limiter les phénomènes d'immigration et d'émigration et d'abrasion. Les biofilms présentaient une faible diversité des communautés algales ainsi qu'une stabilité rapide des communautés bactériennes (3 semaines) et Eucaryotes (1,7 semaines). Ces résultats sont cohérents avec une phrase de Villeneuve et al. (2010) « *The physical heterogeneity inherent to streams promotes biodiversity* ». De fortes quantités de biomasse sont observées à l'issue des deux cultures malgré les compositions algales et bactériennes différentes. La productivité de biomasse ne semble donc ni sensible à la composition en communautés, ni liée au nombre d'espèces comme souvent souligné (Loreau et al. 2001). Ceci pourrait-il être expliqué, comme le suggèrent Passy et Legendre (2006), par l'utilisation de supports artificiels qui sélectionnent les espèces entraînant ainsi un biais ? Des études complémentaires d'autres fonctions plus spécifiques (exemple, dénitrification, biodégradation d'une molécule organique) autre que la production primaire pourraient être intéressantes. Le nombre de 6-7 espèces algales par culture en fin de croissance peut-il être considéré comme le nombre d'espèces minimal pour le maintien de l'intégrité d'un biofilm, quelles que soient la composition des communautés et les conditions opératoires ?

Ce prototype de bioréacteur RAB, malgré quelques modifications techniques (citées plus haut) à adapter présente de nombreux avantages :

- une capacité à produire du biofilm phototrophe, en grande quantité, pour réaliser de nombreuses analyses ;
- une possibilité ultérieurement de jouer sur l'importance relative des facteurs allogènes *versus* autogènes, et d'améliorer nos connaissances sur les mécanismes de succession écologiques ;
- l'utilisation du RAB couplé à des descripteurs fonctionnels pour relier les successions écologiques à des fonctions, par exemple des fonctions pouvant rendre des services écologiques, et analyser la relation biodiversité - fonction ;
- un des points forts de notre RAB est le contrôle des conditions hydrodynamiques et la bonne connaissance des caractéristiques de l'écoulement (profils de vitesse et contraintes de cisaillement à la paroi). L'hydrodynamique contrôle la structure physique du biofilm, un biofilm qui se développe sous un environnement présentant de fortes vitesses de courant est souvent très adhérent au support de colonisation et d'épaisseur fine, il est considéré également résistant aux perturbations (Stevenson et al. 2006). Ainsi ce type de bioréacteur permettra d'approcher les corrélations entre l'hydrodynamique et

la structure physique du biofilm (épaisseur, compacité, élasticité, comparaison des activités des couches superficielles et des couches profondes) et entre l'hydrodynamique et les processus de maturation du biofilm (trajectoires de succession écologique, sensibilité aux polluants et potentiel de dégradation des polluants). Une perspective de recherche consisterait à développer une série de mini-bioréacteurs en intégrant les propriétés de notre prototype.

Les deux études de ce chapitre confirment bien les résultats de travaux antérieurs sur les biofilms épilithiques (Lyautey 2005) montrant l'intérêt des concepts de successions écologiques pour décrire les variations temporelles et la structuration des communautés bactériennes et algales des biofilms phototrophes.

Comme cela est souligné dans la partie « **Synthèse bibliographique** », les pesticides constituent une source de pollution diffuse qui contamine toutes les eaux continentales (Konstantinou et al. 2006). Les biofilms phototrophes, par leur ressemblance physiologique avec les plantes, sont des cibles possibles des herbicides. Connaissant le rôle fonctionnel clef des biofilms par leurs nombreuses contributions au fonctionnement général des écosystèmes aquatiques (production primaire, minéralisation de la matière, biodégradation de polluants organiques...), affecter l'intégrité des biofilms revient à endommager le fonctionnement général des écosystèmes aquatiques, d'où l'importance de comprendre l'influence potentielle des herbicides sur les biofilms phototrophes. De plus, les biofilms phototrophes, particulièrement la fraction diatomique, sont utilisés comme bio-indicateurs de l'état écologique des écosystèmes en termes de pollution organique (métaux et niveau trophique) (Coste et al. 2009). Des études récentes ont pu fournir des résultats encourageant suggérant la pertinence des diatomées comme outil d'évaluation des risques de pollution par les herbicides (Roubeix et al. 2011b; Rimet et Bouchez 2011).

Un herbicide aura-t-il plus d'effet lorsque l'influence des facteurs allogènes est prédominante sur la structuration des communautés ou durant des degrés de maturation plus importants qui sont influencés principalement par les facteurs autogènes? A quel moment du développement du biofilm est-il plus pertinent de l'utiliser comme bio-indicateur? D'après les conclusions des deux sous parties du chapitre 2, la logique voudrait que le biofilm phototrophe soit le plus sensible lors de ces premiers stades de développement, au moment où les micro-organismes interagissent principalement avec la colonne d'eau. Dans ce cas là, nous pouvons nous interroger sur la pertinence de l'utilisation des biofilms phototrophes dans la bio-indication d'une exposition à des pesticides.

Parmi les grandes questions écologiques, une concerne la nature de la relation entre la stabilité d'un écosystème et la biodiversité d'une communauté (MacCann 2000). Il est gé-

néralement souligné qu'une grande richesse en espèces permettrait une plus grande stabilité de la communauté et une résistance plus importante face à une perturbation. Dans ce cas, pour les biofilms phototrophes peu diversifiés cultivés dans le RAB, quel serait leur niveau de tolérance face à une perturbation telle que l'exposition à un pesticide? Zhang et Zhang (2006) enregistrent une résistance plus importante à une variation de température lorsque la communauté algale est la plus diversifiée. A l'inverse, Villeneuve et al. (2010) n'observent pas de résistance particulière pour leurs communautés de biofilms les moins diversifiées vis-à-vis d'une contamination par les herbicides.

Il nous semble donc important d'intégrer les concepts de successions écologiques et de biodiversité abordés dans le chapitre précédent aux études écotoxicologiques et de bio-indication, ce qui fera l'objet de notre prochain chapitre.

# Importance relative des facteurs allogènes et autogènes dans la réponse de biofilms phototrophes à un herbicide – différentes approches expérimentales en microcosmes

---

Questions :

- Les réponses structurelles et fonctionnelles des communautés microbiennes de biofilms phototrophes à l'exposition à un herbicide tel que l'alachlore dépendent-elles de l'histoire du biofilm ? Rôle des facteurs allogènes et du degré de maturation du biofilm (du stade précoce au stade mature).

*Ce chapitre se déroule en trois sous-parties, chacune correspondant à une des trois stratégies expérimentales différentes en microcosmes. Dans les deux premières parties, nous avons étudié la toxicité de l'alachlore, soit sur des biofilms phototrophes « matures » cultivés in situ et d'origines différentes, soit sur des biofilms phototrophes « jeunes », durant leurs premiers stades de développement, cultivés en mini-bioréacteurs photosynthétiques. Dans une troisième partie, la toxicité de l'alachlore a été évaluée cette fois en intégrant à la fois les premiers stades de développement des biofilms phototrophes ainsi que des niveaux de maturation plus avancés. Cette dernière partie est réalisée avec des biofilms phototrophes cultivés en bioréacteur prototype RAB. Ce chapitre fait l'objet de trois articles en préparation (**Articles 4, 5 et 6**).*

## III.1 Contexte scientifique

Comme souligné dans le chapitre « **Synthèse bibliographique** », les pesticides constituent une source de pollution diffuse importante qui contamine une bonne partie des milieux lotiques du monde entier (par exemple Konstantinou et al. 2006). Pour les nombreuses raisons citées auparavant, affecter l'intégrité des biofilms phototrophes au sein des milieux lotiques peut revenir à endommager le fonctionnement général de ces écosystèmes. Dans ce contexte, il est essentiel d'évaluer la toxicité des pesticides sur les biofilms phototrophes à l'échelle des communautés et de comprendre les mécanismes qui sous-tendent les réponses structurelles et fonctionnelles de ces communautés microbiennes. D'autre part, de récentes études ont pu fournir des résultats encourageant suggérant la pertinence des diatomées comme outil d'évaluation révélateur d'une exposition aux herbicides (Roubeix et al. 2011b; Rimet et Bouchez 2011). Nous disposons donc là de processus et d'indicateurs dont il faut évaluer les possibles corrélations.

Le chapitre précédent confirmait les résultats de travaux antérieurs sur les biofilms épilithiques naturels (Lyautey 2005) montrant l'intérêt du concept de successions écologiques pour décrire les variations temporelles de structuration des communautés bactériennes et algales des biofilms phototrophes. Ces résultats, comme souligné par Lyautey (2005), ont pu « montrer l'importance des facteurs environnementaux et l'occurrence de successions écologiques au cours du développement d'un biofilm phototrophe, car la structure du biofilm est également gouvernée par le temps et la maturation de l'agrégat ». Le stade de maturation du biofilm est donc bien un facteur prédominant qui résulte de trajectoires d'évolution de la structure des communautés (histoire du biofilm en lien avec son environnement). Il a été montré lors d'études antérieures, que l'installation de certaines fonctions (nitrification et dénitrification) dans le biofilm est fortement corrélée à la biomasse (Teissier et Torres 2002), laissant penser à une installation programmée, spécifique d'un degré de maturation du biofilm (apparition de niches écologiques favorables) et alors indépendante des facteurs extérieurs au biofilm (Lyautey 2005).

Les processus de maturation sont liés à des changements de la structure et de la composition des communautés de biofilms, avec apparition de différents microhabitats et de gradients physico-chimiques.

Qu'en est-il de la réponse des communautés d'un biofilm phototrophe et de leur sensibilité vis-à-vis d'un herbicide? Un herbicide aura-t-il plus d'effet lorsque l'influence des facteurs allogènes est prédominante sur la structuration des communautés ou durant des degrés de maturation plus importants qui sont influencés principalement par les facteurs autogènes? Guasch et al. (1997) observaient des changements saisonniers dans la réponse des biofilms

phototrophes en présence d'atrazine, un inhibiteur de la photosynthèse (famille des triazines). En hiver, sous des conditions environnementales la toxicité de l'atrazine était inversement reliée à l'âge du biofilm, alors qu'en été cette relation n'était plus observée. Une des explications proposée par les auteurs à cette absence de relation en été, était la présence de fluctuations des conditions environnementales (température d'eau, oxygène dissous) associées aux variations des flux d'eau qui pouvaient masquer les effets de l'herbicide. Dans ce contexte, à quel moment du développement du biofilm est-il plus pertinent de l'utiliser comme bio-indicateur ? D'après les conclusions des deux sous-parties du chapitre précédent, la logique voudrait que le biofilm phototrophe soit le plus sensible lors de ces premiers stades de développement, au moment où les micro-organismes agrégés interagissent principalement avec la colonne d'eau. C'est ce que nous nous proposons de tester à l'aide de différentes stratégies expérimentales en microcosmes.

## **III.2 Influence de l'histoire sur la réponse structurelle et fonctionnelle de biofilms phototrophes post-exposés à l'alachlore**

Résumé de l'article intitulé « **Structural responses of natural phototrophic biofilms to alachlor exposure in microcosms** » par A. Paule, A. Lamy, V. Roubeix, F. Delmas, E. Paul et J.L. Rols. (Article 4)

### **III.2.1 Approche expérimentale**

Cette étude comprend une première phase de culture de biofilms phototrophes *in situ* suivie par une approche écotoxicologique en microcosmes. Pour la phase de culture *in situ*, des supports artificiels (coupons en polyéthylène) sont positionnés durant 4 semaines sur deux sites d'étude **M** et **S** (cf. **partie I Matériel et méthodes**), aux caractéristiques physico-chimiques différentes. en termes de facies, pollution par les phytosanitaires, vitesse de courant etc... (cf. **partie I Matériel et méthodes**). Le choix s'est porté sur des supports artificiels principalement pour contrôler le degré de maturation des biofilms. A l'issue des 4 semaines de culture *in situ*, les communautés de ces biofilms se définissent comme une image transitoire de processus écologiques contrôlés par des facteurs autogènes et allogènes, résultant de trajectoires différentes et propres à chaque site d'étude. Une fois collectés, les coupons sont transférés à l'intérieur de microcosmes pour les tests écotoxicologiques. Deux tests identiques sont réalisés pour les biofilms des deux sites à des périodes décalées. Durant

les expériences en microcosmes, les biofilms subissent une première phase d'acclimatation de 7 jours (cf. **partie I Matériel et méthodes**), suivie par une phase de contamination avec 10 ou 30  $\mu\text{g.L}^{-1}$  d'alachlore durant 23 jours. Trois coupons (3 réplicats) sont prélevés régulièrement dans les microcosmes afin de caractériser structurellement (MSSC, chlorophylle *a*, PCR-DGGE) et fonctionnellement (Biolog) les communautés algales et bactériennes des biofilms et rechercher un effet associé à la présence de l'alachlore.

### III.2.2 Principaux résultats

Durant les 4 semaines d'incubation des supports artificiels *in situ*, les deux sites **M** et **S** présentent bien des différences physico-chimiques, associées à des niveaux de concentrations en nitrates et en silice, et des valeurs de conductivité plus élevées pour le site **M**. Les biofilms du site **S** se caractérisent par des quantités de matières sèches sans cendre plus élevées (0,4  $\text{mg.cm}^{-2}$ ) que les biofilms du site **M** (0,31  $\text{mg.cm}^{-2}$ ), mais inversement avec des teneurs en chlorophylle *a* plus faibles (respectivement 4,3 et 6,7  $\mu\text{g.cm}^{-2}$ ). Malgré un problème technique lors de la préparation des solutions nutritives additionnées au milieu aqueux des microcosmes, les conditions physico-chimiques restent identiques durant une même expérience.

La phase d'acclimatation de 7 jours n'engendre pas de modification significative au niveau des concentrations en MSSC et chlorophylle *a*, signifiant une absence de croissance de la part des biofilms, et cela malgré le confinement en microcosme, susceptible de stimuler la croissance, en présence de fortes concentrations en nutriments et une température plus élevée que lors des conditions *in situ*. Nous pouvons supposer que les biofilms collectés *in situ* peuvent être considérés comme « matures » et contrôlés principalement par des facteurs autogènes. Ces observations sont cohérentes avec ce que suggéraient Dorigo et al. (2010a), la colonisation d'un support vierge ainsi que l'établissement d'une communauté dite « mature », en équilibre avec son environnement chimique peut prendre de 2 (Hoagland et al. 1982) et 4 semaines (Eulin et Le Cohu 1998).

La toxicité de l'alachlore est évaluée à travers différents paramètres (descripteurs structurels), à deux temps d'incubation de 12 et 23 jours.

. Les effets sur les descripteurs de biomasse : Pour le biofilm provenant du site **M**, aucun impact de l'alachlore sur les teneurs en MSSC et chlorophylle *a* n'est observé. Pour le biofilm provenant du site **S**, nous obtenons des niveaux de MSSC plus faibles aux deux concentrations d'alachlore testées (10 et 30  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ).

. Les effets sur la structure bactérienne évaluée par la méthode de typage moléculaire, la PCR-DGGE : Le nombre d'OTUs moyen au cours des différentes conditions de l'expérience en microcosmes est de 18 à 25 pour le biofilm issu du site **M** et de 20 à 33 pour celui



issu du site **S**. La diversité bactérienne, évaluée par le nombre d'OTUs, ne présente pas de variation au cours de l'expérience correspondant au site **M**. Alors qu'une diminution de la diversité est perceptible à l'issue de 12 jours d'incubation pour l'expérience du site **S** révélant un effet de l'alachlore aux deux concentrations testées. Si nous comparons par site les différentes structures de l'ensemble des traitements par une analyse de NMDS (cf. **partie II Matériel et méthodes**), il apparaît que deux facteurs ont pu influencer la structuration des communautés au sein des microcosmes : le temps d'incubation associé aux variations temporelles du biofilm et la présence de l'alachlore.

Les effets sur les communautés de diatomées évaluées par comptage au microscope puis révélés par une analyse en composante principale (ACP) : Les communautés de diatomées des biofilms du site **M** ne présentent pas de modification induite par la présence de l'alachlore en termes de structure ou de composition, mais elles sont fortement influencées par le facteur temps d'incubation. Il en va de même pour le site **S**, avec une exception pour les échantillons exposés à  $30 \mu\text{g.L}^{-1}$  qui sont caractérisés à l'issue de 23 jours d'incubation par une augmentation significative de l'abondance de l'espèce de diatomées *Achnantheidium minutissimum* (ADMI), ainsi que du nombre de déformations au sein de cette population (22 %). La diatomée *A. minutissimum* est une espèce pionnière et indicatrice d'une bonne qualité d'eau (Coste et al. 2009), elle est connue pour être généralement tolérante aux pollutions trophiques (Roubeix et al. 2011a) et aux herbicides du type triazines (Munoz et al. 2001 ; Seguin et al. 2001).

Les effets sur les profils d'utilisation des différentes sources de carbones : Pour les communautés bactériennes issues du site **M**, nous observons une augmentation non significative du nombre de sources de carbone utilisées pour les biofilms traités avec  $30 \mu\text{g.L}^{-1}$  d'alachlore, à 23 jours d'incubation (d'une moyenne de  $12,5 \pm 0,8$  à  $19,3 \pm 2,5$  sources de carbone). Inversement, les communautés bactériennes issues du site **S** ne présentent pas de variation dans le nombre de sources de carbone utilisées. Par une comparaison par site des profils d'utilisation de différentes sources de carbone regroupées par guildes via une analyse en composantes principales, il est mis en évidence une influence prépondérante des variations temporelles du biofilm associées au temps d'incubation plutôt qu'une influence associée à la présence de l'alachlore.

Le comportement de l'alachlore durant les deux expériences **M** et **S** n'est pas le même. Au cours de l'expérience **M**, la courbe de concentrations de l'alachlore au cours du temps suit une disparition exponentielle décroissante, ce qui a permis d'utiliser un modèle de premier ordre afin d'estimer un temps de demi-vie de la molécule entre 13 et 13,5 jours pour les

microcosmes avec ou sans biofilm contaminés à  $10 \mu\text{g.L}^{-1}$  et 12,5 et 7,5 pour les microcosmes avec ou sans biofilms à  $30 \mu\text{g.L}^{-1}$ , respectivement.

Pour l'expérience **S**, le comportement de l'alachlore était identique pour l'ensemble des traitements, microcosmes avec ou sans biofilm, à 10 ou  $30 \mu\text{g.L}^{-1}$ . Les premiers jours de contamination, les concentrations en alachlore diminuaient, suivi par une augmentation puis de nouveau une disparition (**Figure 3, Article 4**). Ce type d'évolution ne permettait pas d'estimer des valeurs de temps de demi-vie. Les analyses de l'alachlore au sein des échantillons d'eau de rivière utilisée pour remplir les microcosmes sont en cours.

### **III.2.3 Résultats complémentaires**

La Glutathione S-Transférase (GST), comme déjà précisé, est une enzyme de phase II présente chez les Procaryotes et les Eucaryotes et qui participe à la détoxification de divers polluants (**cf. partie I Synthèse bibliographique**). Les GST catalysent des réactions de conjugaison du Glutathione, un tripeptide. Les GST catalysent la réaction de conjugaison entre une molécule endogène et un toxique aboutissant à sa détoxification. Cette enzyme a été suggérée comme contribuant à la biodégradation des herbicides de la famille des chloroacétanilides dans les sols et les eaux de surface (Field et Thurman 1996 ; Knapp et al. 2003). Dans le cadre de cette étude, son activité a été mesurée dans les biomasses des échantillons de biofilms issus de l'expérience du site **M** uniquement (**Figure 58**) (pour l'expérience du site **S**, les mesures sont en cours de réalisation) afin d'évaluer les conséquences de la présence de l'alachlore sur l'activité de la GST. D'après la (**Figure 58**), l'activité de la GST est plus importante pour les échantillons de biofilms exposés à une plus forte concentration en alachlore ( $30 \mu\text{g.L}^{-1}$ ). L'activité de cette enzyme semble être dose dépendante, car pour une plus faible concentration en alachlore ( $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ ), l'activité de la GST est significativement plus faible comparée au traitement à  $30 \mu\text{g.L}^{-1}$  d'alachlore. La résistance des communautés des biofilms phototrophes est-elle reliée à la capacité des communautés à augmenter la synthèse et l'activité de leur GST ? Nous pouvons supposer qu'une augmentation de l'activité de la GST engendre une biotransformation de l'alachlore au sein du biofilm. En milieu aquatique et terrestre, la GST est connue pour catalyser des réactions de conjugaison qui métabolisent l'alachlore en produits de dégradation, OA et ESA, notamment. Il serait intéressant de croiser cette augmentation de l'activité de la GST avec des dosages d'OA et ESA. Cette augmentation de l'activité de GST pourrait donc expliquer en partie la résistance des communautés des biofilms phototrophes du site **M**, pour l'ensemble des descripteurs mesurés dans le cadre de cette étude. Dans ce contexte, nous pouvons nous demander pourquoi les communautés de site **S** exposées à l'alachlore sont-elles moins résistantes que celles de l'expérience avec le site

M, vu que les GST sont des enzymes présentes dans la plupart des organismes terrestres et aquatiques? La capacité à résister ou non à un herbicide de la famille des chloroacétanilides ne serait-elle pas uniquement due à la possible détoxification du polluant par les GST? La résistance des communautés du biofilm collecté au site M est-elle liée à une forte activité de métabolisation liée à l'activité GST, ce qui diminue la biodisponibilité de l'herbicide et ainsi sa toxicité?

Dans la littérature, une étude compare l'activité de la GST de plusieurs espèces d'algues vertes suite à une exposition au pyrène. Les auteurs observaient que l'intensité de l'activité de la GST était espèce-dépendante (Lei et al. 2003). Parmi les 4 espèces d'algues vertes étudiées, une diminution importante de l'activité de GST était observée pour *Scenedesmus quadricauda*, l'espèce la plus sensible au pyrène. Inversement, l'activité des GST augmentait significativement avec la concentration en pyrène pour les espèces *Scenedesmus platydiscus* et *Selenastrum capricornutum*. Ces deux espèces se trouvaient être les plus résistantes au pyrène et présentaient une efficacité plus importante dans la métabolisation du pyrène.

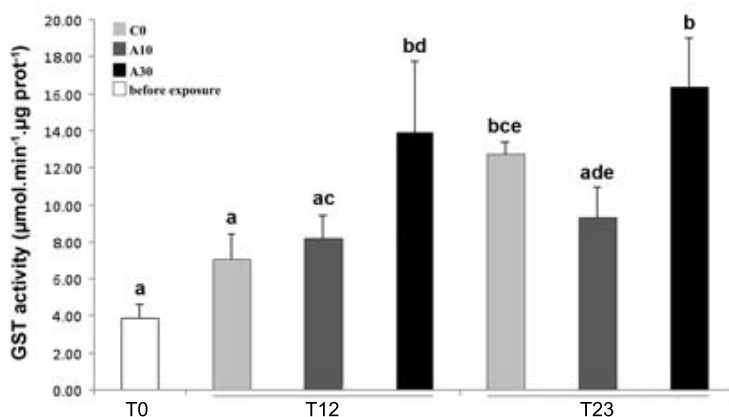


Figure 58 – Moyenne des valeurs d'activités de la GST selon les différents traitements expérimentaux pour l'expérience avec le biofilm collecté au site M

Ceci demanderait des informations supplémentaires au sujet de l'impact d'un herbicide de la famille des chloroacétanilides sur les enzymes GST, mais l'intensité de l'activité des GST pourrait être un bio-marqueur non spécifique d'une contamination (Cairrao et al. 2004).

### III.2.4 Conclusion et perspectives

L'objectif principal de cette étude était d'évaluer la réponse d'une exposition à l'alachlore de deux biofilms naturels d'origines et d'histoires différentes, se caractérisant par une composition, une structure et des valeurs de biomasse différentes. Au cours de la phase d'incubation en microcosmes, les teneurs en MSSC des deux types de biofilms n'augmentent pas de manière significative, et ce malgré la présence de fortes concentrations en nutriments et

de températures élevées. Aussi pouvons-nous supposer que les biofilms collectés après 4 semaines de culture *in situ* sont « matures » ? Avec un tel degré de maturation, les biofilms ne présenteraient alors que très peu d'interactions avec la colonne d'eau. Ainsi les changements susceptibles d'être observés au niveau des communautés ne devraient être le résultat que de successions autogéniques.

Malgré des degrés de maturation identiques, ces deux biofilms réagissent différemment à la présence de l'herbicide. Le biofilm phototrophe provenant du site **M**, connu pour être globalement le plus pollué en termes de pesticides et nitrates, semble être le moins influencé par la présence de l'alachlore en microcosmes. Alors que le biofilm provenant du site **S**, considéré le moins pollué, semble plus réactif à l'alachlore. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cette différence de réponse :

. L'épaisseur et la structure physique du biofilm. Les deux sites de collecte présentent des valeurs de vitesses de courant différentes, de  $0,045 \text{ m.s}^{-1}$  pour le site **M** à en moyenne  $2 \text{ m.s}^{-1}$  pour le site **S**, durant la période de production **in situ** sur les supports artificiels. La vitesse de courant influence la structure physique du biofilm, en d'autres termes son architecture (Battin et al. 2003b) mais également la quantité de biomasse et l'épaisseur. A de faibles vitesses de courant, les biofilms présentent des architectures plus ouvertes et moins compacts par rapport à des vitesses de courant plus fortes (Stevenson et al. 1996). Il a été montré que des biofilms de rivières épais sont plus résistants à l'effet toxique du cuivre, du zinc et du cadmium que les biofilms plus jeunes et donc plus fins (Admiraal et al. 1999; Ivorra et al. 2000). Une accumulation limitée du zinc au sein de biofilms épais semble être associée à une variation des conditions de pH et une diminution du nombre de liaisons entre les exsudats du biofilm et les métaux (Sabater et al. 2002), ainsi l'épaisseur du biofilm peut être considérée comme une barrière protectrice face à la toxicité des métaux lourds.

. La présence d'espèces tolérantes. Cette hypothèse prévaut pour le site **M** qui est exposé à des cycles de pollution par les pesticides, ce qui peut induire une sélection d'espèces. Une des difficultés rencontrée lors des expériences écotoxicologiques est de connaître l'état de contamination par des pesticides, souvent un mélange de molécules (Chèvre et al. 2006) de l'environnement dans lequel les biofilms ont été produits avant de tester les effets potentiels d'un polluant (Chèvre et al. 2006; Knauer et al. 2010). En effet, comme décrit par le concept de PICT (Tlili 2010), des communautés qui sont en contact avec une molécule peuvent acquérir une tolérance vis-à-vis de celle-ci ou d'une molécule de la même famille. Une des approches possibles pour combiner les expériences écotoxicologiques avec l'identification des risques de contaminations des eaux par un mélange de pesticides est l'utilisation d'outils spécifiques pour la réalisation d'échantillonnages passifs (Vercaene-Eairmal 2010; Pesce et al. 2011).

Parmi ces échantillonnages passifs, les POCIS (« *Polar Organic Chemical Integrative Samplers* ») sont des outils qui permettent d'évaluer la présence de polluants polaires organiques dans les eaux douces, qui présentent un  $\log K_{ow}$  allant de 0 à 4, et pouvant appartenir à différentes classes (hormones, détergents ioniques, etc. . .).

Ces deux premiers points sont liés à l'histoire du biofilm, c'est-à-dire à la trajectoire qu'il a suivi durant son développement, et qui est contrôlée par un ensemble de successions allogènes et/ou autogènes, pour aboutir à une structure ou image transitoire particulière et propre à chaque site.

Lors de cette étude, seulement la composition des communautés de diatomées a été analysée. Or il a été suggéré que les algues vertes étaient plus sensibles à des contaminations par des pesticides que les diatomées et les cyanobactéries comme observé durant des expositions à une seule molécule par Nyström et al. 2002 pour les triazines et par Mohr et al. 2008 pour les chloroacétanilides. Ce qui montre l'importance d'intégrer lors d'expériences écotoxicologiques le plus grand nombre de descripteurs de natures et de niveaux d'intégrations biologiques différents. Les biofilms collectés sur le site **M** contiennent un plus grand nombre de diatomées que ceux du site **S**, que l'on suppose lié aux caractéristiques physico-chimiques du site. Le facteur lumière est un paramètre important lors du développement du biofilm, certains auteurs ont suggéré que sous des conditions de plus faibles intensités lumineuses, les biofilms étaient dominés par les diatomées (Sekar et al. 2002). Le site **M** présente un faciès beaucoup plus fermé avec une canopée de part et d'autre du ruisseau beaucoup plus développée qu'au niveau du site **S**, ce qui a pu favoriser le développement des diatomées. Cela reste à vérifier mais il est possible d'expliquer que la tolérance des biofilms à l'alachlore pourrait provenir de la dominance des diatomées au sein de la fraction phototrophe.

. Les conditions opératoires des microcosmes. Ces conditions présentent quelques similitudes avec les caractéristiques physico-chimiques du site **M**, notamment les fortes concentrations en nitrates et la vitesse de courant faible. La structure physique du biofilm collecté au site **S** a pu être fragilisée, le rendant ainsi plus vulnérable à une perturbation, ici l'exposition à un herbicide, malgré la phase d'acclimatation.

D'un point de vue général, quelle que soit l'origine du biofilm phototrophe, l'évolution temporelle liée à la maturation du biofilm au cours de sa production *in situ* a joué un rôle prépondérant durant nos expériences en microcosmes. Il est très difficile d'évaluer correctement les causes des effets que l'on mesure, du fait des contributions concomitantes entre les conditions environnementales et les variations temporelles dans la structuration des biofilms phototrophes. Même s'il est possible de réduire les variations environnementales en travaillant sous des conditions opératoires plus ou moins contrôlées, limiter les interactions au sein du

biofilm reste impossible. Il est important de considérer d'une manière précise ces interactions lors des études écotoxicologiques, qui sont susceptibles d'interagir ou de masquer les effets d'une perturbation, comme observé dans cette étude pour la structure des communautés bactériennes et les profils d'utilisation de différentes sources de carbone.

Il est intéressant de noter que les paramètres mesurés dans le cadre de cette étude présentent des sensibilités différentes. Par exemple, pour le biofilm collecté sur le site **S**, les effets sur les descripteurs de biomasse sont détectables dès 12 jours pour l'exposition à  $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ , alors que les effets sur les diatomées ne sont détectables qu'à partir de 23 jours et seulement à la plus forte concentration en alachlore ( $30 \mu\text{g.L}^{-1}$ ). Une analyse par typage moléculaire des Eucaryotes aurait pu être intéressante, afin d'évaluer leurs comportements face à la présence de l'alachlore. Il est primordial de considérer les deux types de paramètres structurels et fonctionnels.

. Le comportement de l'alachlore. Les différences de comportement de l'alachlore durant les deux expériences font que globalement les concentrations atteignent des niveaux plus faibles et plus rapidement lors de l'expérience **M**, ce qui pourrait également expliquer leur plus haute tolérance observée au cours de l'exposition, malgré les concentrations en alachlore identiques en fin d'exposition (**Figure 3, Article 4**). Ces résultats suggèrent que les biofilms collectés au site **S** présentent une plus grande capacité d'adsorption de l'alachlore que les biofilms du site **M**. Inversement les biofilms collectés sur le site **M** semblent présenter une plus grande capacité de biodégradation que les biofilms collectés sur le site **S**. Ces hypothèses sont à vérifier notamment par le dosage des métabolites de l'alachlore en phase aqueuse et le dosage de l'alachlore dans la matrice des biofilms. Ces deux fonctions sont étroitement liées à la composition algale et bactérienne et des EPS ainsi qu'à la structure physique des biofilms, elles-mêmes liées aux conditions physico-chimiques de leurs sites d'incubation, en d'autres termes gouvernées par leurs propres histoires. L'adsorption et la biodégradation sont deux des multiples processus qui gouvernent la persistance des pesticides. Un polluant adsorbé ou biodégradé perd de sa biodisponibilité et de sa toxicité. Ainsi, ces deux mécanismes peuvent également expliquer la variété de réponses des communautés de biofilm observés dans le cadre de cette étude, exposées à un même herbicide.

Les diatomées sont communément utilisées comme bio-indicateurs des pollutions trophiques mais des études supplémentaires sont nécessaires pour comprendre la sensibilité des diatomées aux polluants comme les pesticides et leur utilisation comme bio-indicateurs de ce type de pollution (Roubeix et al. 2011b; Rimet et Bouchez (2011). Dans le cadre de notre étude, l'utilisation des diatomées comme descripteurs ne semble pas être pertinente. Basé sur la composition et la taxonomie des diatomées, aucun effet de l'alachlore n'a été détecté. Au

cours de cette étude, la composition de la communauté de diatomées est gouvernée principalement par l'évolution temporelle de l'agrégat ce qui est cohérent avec les observations faites par Rimet et Bouchez, 2011. Il semble d'après les résultats de cette étude qu'une contamination à l'alachlore montre des effets pertinents sur la forme des frustules plutôt que sur la composition des espèces. Les travaux de Roubeix et al. (2011a) enregistraient des changements des communautés des diatomées exposées au métolachlore, associés notamment à une diminution significative de l'abondance relative d'*A. minutissimum* pour de fortes concentrations en métolachlore ( $30 \mu\text{g.L}^{-1}$ ), alors que son abondance avait tendance à augmenter lors de notre étude pour des concentrations identiques en alachlore. Les chloroacétanilides sont des herbicides qui vont altérer la membrane cellulaire par l'inhibition de l'élongation des acides gras (Böger et al. 2000). Etant donné que la formation des frustules des diatomées nécessite une vésicule intracellulaire spéciale et l'exocytose de la silice biogénique (Roubeix et al. 2011a), toute modification de la membrane des cellules peut se répercuter sur la formation des frustules. Roubeix et al. (2011a) détectaient également un nombre de déformations plus important lors d'une exposition de 21 jours à  $30 \mu\text{g.L}^{-1}$  de métolachlore.

Il est intéressant de noter que le descripteur structurel lié à la forme des frustules (i) est peu sensible parce que les déformations apparaissent seulement à de fortes concentrations en alachlore ( $30 \mu\text{g.L}^{-1}$ , niveau en alachlore rarement détecté dans les eaux de surface) et à l'issue de 23 jours d'exposition, et (ii) ne semble pas applicable à tous les morphotypes d'une même espèce comme le cas dans cette étude, le morphotype d'*A. minutissimum* du biofilm provenant du site **S** présente des déformations contrairement au morphotype d'*A. minutissimum* du biofilm provenant du site **M**. Des études antérieures ont pu affirmer que l'apparition de diatomées qui présentent des déformations au niveau de leurs frustules peut être liée soit à une carence en silice (Debenest et al. 2010), soit souvent associée à des contaminations par les métaux lourds (Cattaneo et al. 2004; Morin et al. 2008). Cependant les études reliant une contamination par un herbicide à l'apparition de frustules déformées sont encore rares (Debenest et al. 2008; Schmitt-Jansen et Altenburger 2005; Morin et al. 2010; Roubeix et al. 2010). Malgré tout, l'apparition de diatomées aux frustules déformées a pu être associée à la présence d'herbicides qui présentent différents modes d'action, inhibition de l'élongation des acides gras (métolachlore, Roubeix et al. 2011a), de la photosynthèse (Debenest et al. 2008) ou de l'expression des gènes (maleique hydrazide, Schmitt-Jansen et Altenburger 2005).

### **III.2.5 Article 4**





## Structural responses of natural phototrophic biofilms to alachlor exposure in microcosms

A. Paule<sup>1,2</sup>, A. Lamy<sup>1,2</sup>, V. Roubeix<sup>3</sup>, F. Delmas<sup>3</sup>, E. Paul<sup>4,5,6</sup> & J.L. Rols<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Université de Toulouse; UPS, INP; EcoLab (Laboratoire d'écologie fonctionnelle et environnement); 118 route de Narbonne, F-31062 Toulouse, France

<sup>2</sup> CNRS; EcoLab; F-31062 Toulouse, France

<sup>3</sup> Cemagref, UR REQE, 50 avenue de Verdun, F-33612 Cestas, France

<sup>4</sup> Université de Toulouse; INSA; LISBP, 135 Avenue de Rangueil, F-31077 Toulouse, France

<sup>5</sup> INRA, UMR792, Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, F-31400 Toulouse, France

<sup>6</sup> CNRS, UMR5504, F-31400 Toulouse, France

### Abstract

Ecotoxicological experiments have been performed in laboratory-scale microcosms to investigate the community-level responses of natural phototrophic biofilms to long term herbicide exposure. The phototrophic biofilms were initially cultivated with artificial substrates placed *in situ* in rivers for 4 weeks at two sites with contrasting physical-chemical characteristics. The first site *M* (Auradé, stream Le Montoussé, Gers, France), considered as the polluted site, was located in an agricultural watershed basin, and the second site *S* (Larroque, river La Save, Haute-Garonne, France), considered as the unpolluted reference site, was located in a forest watershed basin. After an acclimatization phase of 7 days in microcosms, the natural phototrophic biofilms were exposed under controlled conditions to alachlor contamination at 10 and 30  $\mu\text{g L}^{-1}$  during 23 days. Alachlor effects were monitored at different biological organization levels by the combination of biomass descriptors (ash free dry mass, chlorophyll *a*) and structural molecular fingerprinting methods and diatom species composition. Alachlor inhibited the growth of phototrophic biofilms previously cultivated in site *S*. The structural and functional effects on bacterial communities and diatom species were less visible due to the presence of temporal evolution of biofilm during microcosm experiment. An exception was observed after 23 days for the diatoms of biofilms from site *S* exposed to 30  $\mu\text{g L}^{-1}$ , marked by the dominance of *Achnanthydium minutissimum* (K-z.) Czarnecki diatom species and an occurrence of abnormal forms of this specie.

The results suggested that the biofilms collected at our polluted site *M* seemed to be less sensitive to the herbicide exposure than the biofilms collected at our reference site *S*. The fate of alachlor in microcosms exhibited different profiles in according to the cultivation site of biofilm, with a possible dissipation of the molecule with biofilms from site *M*. Our work confirms the difficulty to distinguish the changes induced by the stress occurred by the pesticide toxicity of those induced by the natural temporal evolution of microbial communities in phototrophic biofilms. This study also provides additional knowledge on the promoting use of diatoms as bio-indicators of pesticide contamination.

**Keywords:** Alachlor ; phototrophic biofilms ; bacterial community ; diatoms ; biological succession

### 1. Introduction

The objective of the European Water Framework Directive (WFD, European Commission, 2000) is to implement an assessment of “good chemical and ecological” status for all European river bodies by 2015. This

monitoring leads to the identification of sources of pollution including the pesticides, their persistence and effects on the structure and functioning of aquatic ecosystems. Phototrophic biofilms (aggregates of photoautotrophic and heterotrophic micro-organisms enmeshed in exopolymer matrix) are key functional compartments of lotic medium, by their contribution to primary production and food for invertebrates (Wetzel 1975), food source for aquatic grazers (Feminella and Hawkins 1995), mineralization and element recycling processes (Battin et al. 2003), absorption (Lawrence et al. 2001), and biodegradation of chemical contaminants (Vercaene-Eairmal et al. 2010)

Microbial community structure, responsible of the biofilm functioning, is controlled by allogenic and autogenic factors (Paule et al. 2009). The relative importance of these factors is different in according to their maturation levels. For thin biofilms, the allogenic factors (temperature, pH, light and hydrodynamic...) are predominant, although for thick biofilms, the autogenic factors are predominant (competition to resources, grazing...). These factors monitor the succession of species, resulting in a trajectory and structure particular for each aquatic sites and biofilm maturation level. These different trajectories generate different sensitivity to perturbations. Numerous studies, mainly with photosynthesis inhibitors, show that the responses of phototrophic biofilms to pesticide contamination are of different types (tolerance, resistance, sensitive) (Clement and Newman 1992) and are depending on several factors, such as light historic (Guasch and Sabater 1998), pollution composition (Wendt-Rasch et al 2004), and type of pesticide application (acute or chronic) (Tlili et al. 2011).

The model of toxic molecule used in the present work was alachlor [2-chloro-N-(2, 6-diethylphenyl)-N-(methoxymethyl) acetamide] which is extensively used as a pre-emergence chloroacetanilide herbicide applied to corn and soybeans. This molecule is detected worldwide in surface waters (e.g. Konstantinou et al. 2006; Sanchez-Camazano et al 2005). Chloroacetanilide herbicides are known to inhibit the elongation of very long chain fatty acids in plants and algae (Böger et al. 2000) resulting in impaired cell development and division (Junghans et al. 2003; Vallotton et al. 2008). In our knowledge, the toxicity of alachlor is mainly assessed from single-species acute toxicity test on green algae (Fairchild et al. 1997), cyanobacteria (Singh and Datta 2005), bacteria and protozoa (Bonnet et al. 2007). A small number of studies showed the response of phototrophic biofilm communities (Spawn et al. 1997; Carder and Hoagland 1996).

The objective of this work was to compare the sensitivity of two phototrophic biofilms to 23 days non-inhibitor photosynthesis herbicide exposure in microcosm experiments. The strategy consisted to monitor the experiment with natural phototrophic biofilms cultivated *in situ* at both sites with contrasting physical-chemical characteristics, and generate biofilms exhibiting different histories and biological trajectories. During the microcosm experiments, before the alachlor contamination, an acclimatization phase was performed to limit the bias induced by any stress on biofilm due to changes of environmental conditions. The response of biofilms was evaluated throughout exposure experiment (at 12 and 23 days) by the use of biomass descriptors (AFDM, chlorophyll *a*), diatom community composition and bacterial community structure (PCR-DGGE).

## **2. Material and methods**

### **2.1. *In situ* phototrophic biofilms collection**

#### **2.1.1. Sampling site characteristics**

Two sites were chosen to carry out *in situ* phototrophic biofilm cultures. Site *M* on the Montoussé stream is located in an experimental agricultural watershed basin outlet of 328 ha (Auradé city, South West France, 43x33055.0600N/1x3030.9200E) and site *S* on the Save River is located in a forested watershed basin (Larroque

city, South West France, 43x11043.7700N/00x36028.5900E). As described by Paule et al. (2009), the two sampling sites exhibit different physical-chemical parameters in terms of chemical quality of water, river bed type, flow velocity, and average water depth. Site *M* is reported as highly contaminated by pesticides (Taghavi et al. 2010) and nitrate (Debenest 2007). However alachlor is not used in this agricultural watershed basin. In the present study, site *S* is considered as the unpolluted reference site as opposed to the site *M* considered as the polluted site.

### 2.1.2. Phototrophic biofilms cultures

For the experimental convenience with the microcosm studies, *in situ* cultures on both sites were achieved during different periods. Biofilm *in situ* cultures were carried out during 4 weeks from February 2 to March 1<sup>st</sup>, 2010 at the site *S* and from March 8 to April 8, 2010 at the site *M*, to cover the pesticide application period in the experimental agricultural watershed basin (Taghavi et al. 2010). Artificial substrates were immersed in river water to allow *in situ* phototrophic biofilm colonization and development. The use of artificial substrates permitted (i) to reduce the subjectivity of sample collection, (ii) to ease biofilm scraping, and (iii) to compare two study sites with different physical-chemical characteristics (Cattaneo and Amireault 1992). Moreover, no natural substrate was available at site *M*. Cleaned and smooth polyethylene plates (50 \* 100 \* 5 mm) were chosen as sampling units (1 plate = 1 replicate). Plates were fixed on stainless-steel ramps encircled by a 5-mm mesh wire fence (Figure 1). Each ramp supported 8 plates placed vertically and individually fixed by screw on stainless-steel racks. Three ramps were positioned per sampling site (a total of 24 plates per site), submerged about 20 cm below the water surface, and placed parallel to water flow, in order to avoid sedimentary deposit on the polyethylene plates and to promote micro-organisms fixation.



**Figure 1:** Artificial substrates (polyethylene plates) used for *in situ* production and collection of natural phototrophic biofilms (site *M* on the photography).

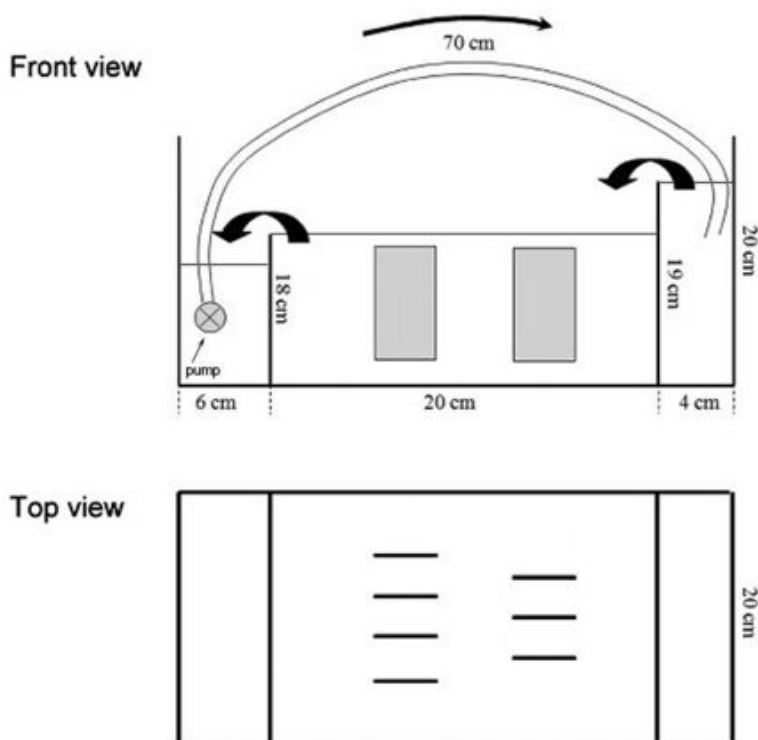
## 2.2. Microcosm study

### 2.2.1. Experimental setup

Microcosms, adjusted from microcosms described by Debenest et al. (2009) with slight modifications, were constituted of glass tanks (300 mm × 200 mm × 200 mm), each of them subdivided into three compartments by vertically glass slides (height: 190 and 180 mm) (Figure 2, front view and top view). Each microcosm was filled with 9.6 L of river water from the corresponding biofilm sampling sites, previously autoclaved and supplemented with nutrients ( $\text{SiO}_2$  at 10 mg L<sup>-1</sup>,  $\text{PO}_4^{3-}$  at 0.7 mg L<sup>-1</sup> and  $\text{NO}_3^-$  at 15 mg L<sup>-1</sup>) to favour the biomass growth and avoid nutrient limitation during the incubation.

A pump (Proflow 600, JBL) was immersed in the last compartment and sent water back in the first compartment to maintain continuous and homogeneous water circulation. Two stainless-steel racks containing a total of 7 colonized polyethylene plates were immersed in the main compartment (Figure 2). The polyethylene plates were

exposed to an overall water velocity of  $0.5 \text{ cm s}^{-1}$ . The artificial illumination was supplied by the presence of one neon tube (fluorescent tube TL-15E 14w, 5500 K, Zoomed Aquatic) positioned at 40 cm above of each microcosm and operated with light / dark period of 12 hours / 12 hours by the use of timer switches. The illumination was measured as air photosynthetically active radiation (PAR) irradiance level by a flat quantum sensor (model LI-189, LI-COR, Inc - Lincoln - Nebraska) at a distance from 40 cm, and average recorded values were  $43.4 \pm 1.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . All microcosms were placed in thermostated chamber at  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ .



**Figure 2:** Schema of one microcosm subdivided into three compartments by vertically glass slides. Water recirculation is realized with a submerged pump. The polyethylene plates (number of 7 plates) are positioned in the main compartment.

### 2.2.2 Experimental design

The microcosms experiment was performed to assess the effect of two nominal different alachlor concentrations, 10 and  $30 \mu\text{g L}^{-1}$  on natural phototrophic biofilms previously collected *in situ*. These alachlor concentrations simulate the sudden increase in river pesticide concentration during flooding events (Spawn et al. 1997). Two 30 days microcosm experiments named *S* (from March 1<sup>st</sup> to March 30, 2010) and *M* (from April 8 to May 7, 2010), were conducted after *in situ* biofilm production at sites *S* and *M*, respectively. For each microcosm experiment: (i) two alachlor treated microcosms were designed to assess the effect of alachlor exposure at 10 and  $30 \mu\text{g L}^{-1}$  on the phototrophic biofilms (two conditions called “A10” and “A30”, respectively), (ii) two alachlor treated microcosms without biofilm were designed as controls to assess the abiotic fate of alachlor at 10 and  $30 \mu\text{g L}^{-1}$  (two conditions called “C10” and “C30”, respectively), and (iii) one untreated microcosm with biofilm was designed as control (C0). This present study did not induce microcosm replications, but pseudo-replications inside each microcosm (Villeneuve et al. 2010). The microcosm experiments were conducted into two phases, an acclimatization phase of biofilm plates for 7 days (from  $T_{-7}$  to  $T_0$ ) to limit the bias induced by any stress on

biofilm due to changes of environmental conditions, followed by an alachlor exposition phase for 23 days (from  $T_0$  to  $T_{23}$ ). At time  $T_0$ , alachlor was added in the four microcosms for treatment at appropriated nominal concentrations and one microcosm was used as control (no added alachlor). The loss of water volume by evaporation in microcosms was compensated by addition of distilled water twice a week.

### 2.2.3. Contamination phase

Alachlor purchased from Sigma-Aldrich (PESTANAL, purity 99%) was dissolved in acetone (NORMAPUR, VWR) to make a stock solution of alachlor ( $1 \text{ g L}^{-1}$ ). Aliquots of this stock solution were then added to microcosms to obtain tested final concentrations. The final concentration of acetone added in each microcosm was less than 0.005 % (v/v).

### 2.2.4. Biofilm sampling procedure

For each microcosms experiment  $M$  and  $S$ , polyethylene plates were randomly sampled at 4 dates throughout microcosms, at the start of experiment before (1 plate at  $T_{-7}$ ) and after (1 plate at  $T_0$ ) the acclimatization phase, at 12 days after the start of the alachlor exposition phase (3 plates / replicates at  $T_{12}$ ), and at 23 days corresponding to the end of microcosm experiment (3 plates / replicates at  $T_{23}$ ). Biofilms were removed from plates by scraping with a microscope blade previously treated with alcohol. Biofilms were suspended in 50 mL of tap water previously filtered through a  $0.2 \mu\text{m}$  pore size filter (cellulose acetate membrane, Whatman) and homogenized (tissue homogenizer at 13,500 rpm, Ultra Turrax, T25). Biofilm suspension was aliquoted for the analyses of biomass descriptors, diatom diversity, and bacterial community structure by PCR-DGGE.

## 2.3. Physico-chemical analysis

Water samples were collected to check the physico-chemical characteristics throughout river phototrophic biofilm cultures and microcosm studies. Temperature, pH, and conductivity values were measured *in situ* with specific probes as described by Paule et al. (2009). Nutrient concentrations ( $\text{SiO}_2$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  and  $\text{NO}_3^-$ ) were measured as described by Paule et al. (2009). For the alachlor residual concentrations, the samples were filtered through Whatman GF/F glass fibre filters ( $0.7 \mu\text{m}$  pore size) and analyzed at “Laboratoire Départemental de l’Eau” (Toulouse, France), using high performance liquid chromatography coupled tandem to mass spectrometry (HPLC-MS-MS, Thermo Fisher, model E-Quan TSQ Quantum ultra) with ionization electron spray source and equipped with a pre-concentration column (Thermo Fisher Hypersil GOLD C18,  $12 \mu\text{m}$  particle size,  $20 \times 2.1 \text{ mm}$ ), by a direct sample injection. The sample volume was 2 mL. The alachlor separation was monitored using a Thermo Fisher Hypersil GOLD C18 ( $3 \mu\text{m}$  particle size,  $50 \times 2.1 \text{ mm}$ ) column.

## 2.4. Biofilm characterization

### 2.4.1. Biomass descriptors

From an aliquot of initial biofilm suspension, the dry mass (DM) and the ash free dry mass (AFDM) (aliquot of 20 mL), and chlorophyll  $a$  (aliquot of 5 mL) were measured as described by Paule et al. (2009).

### 2.4.2. Diatom community composition

Diatom composition was estimated from an aliquot of 5 mL of the initial biofilm suspension homogenized and preserved in formalin solution (3 %) and stored in the dark until analysis at “Cemagref” (Bordeaux, France). Identification and counting of diatoms of 400 frustules were performed as described previously Roubeix et al. (2011).

### 2.4.3. Microbial structure analysis

After centrifugation (12,000 *g* at 4°C for 20 min, Heraeus Multifuge) of an aliquot of 20 to 50 mg dry mass of the initial biofilm suspension, the pellet was stored at -80°C until further analysis (Lyautey et al. 2005). Genomic DNA extraction was performed on the pellet using the DNeasy Plant Mini Kit according to the manufacturer's protocol (Qiagen Laboratories) and the extracted DNA integrity was checked as described by Paule et al. (2009) using the precision Molecular Mass Ruler (Fermentas). The 16S rDNA was amplified using primers 341F-GC and 907R (Muyzer et al. 1997) designed to be specific to most bacteria (Muyzer et al. 1997). Amplification was carried out using an Eppendorf Mastercycler following a protocol described elsewhere (Lyautey et al. 2005) with slight modifications. PCR amplification was conducted in a 50 µL reaction volume containing 0.48 µM of each primer, 2.5 U Taq DNA polymerase (Promega) 1x PCR buffer, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub> (Promega), and 200 µM dNTP (Promega) and 50 ng of extracted DNA as template. Amplified product concentrations were quantified as described previously using precision the Molecular Mass Ruler (Fermentas) (Lyautey et al. 2005). Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) was carried out as described by Paule et al. (2009) using 500 ng of PCR products and a gradient of denaturant ranging from 30 to 70 % (100 % denaturant is 7 M urea and 40 % deionised formamide). For practical purposes (only 20 samples can be processed on each DGGE gel), the 3 replicates of each sample were shared on two different DGGE gels, using common samples between different gels. After electrophoresis, the gel was stained and the gel image captured and analyzed as described previously (Paule et al. 2009).

#### **2.4. Data analysis**

Biomass inhibition (*I*) and the specific growth rate ( $\mu$ ) were calculated for each experimental condition in according to Debenest et al. (2009). Matrix of diatom abundance data and binary data of DGGE profiles were constructed from the Bray-Curtis similarity index and analyzed by non-metric multidimensional scaling (NMDS) analysis as described elsewhere (Paule et al. 2009) with slight modifications. NMDS analyses were performed using Primer v6 software (PrimerE, Ltd, Luton, United Kingdom). Previously, a log-transformation (log) was applied on diatom abundance data. In order to avoid methodological biases due to DGGE inter-gel variability, each gel were analyzed separately. DGGE bands (defined as operational taxonomic units [OTUs]) were scored as present or absent from DGGE gel analysis.

Statistical analyses of NMDS were run using an analysis of similarity (ANOSIM) via PRIMER v6 software (PrimerE, Ltd, Luton, United Kingdom). The analysis of similarity reports global R and p- values. A global R close to 1 indicates a significant effect of incubation site and the p value reflects the statistical significance of the global R (Clarke, 1993). The statistical significance of the global R was considered at  $p < 0.001$ .

The richness value (*S*) was calculated as the number of OTUs for each sample from DGGE data or the number of diatom species from each sample.

After checking of the homogeneity of variances and normality of the data, the difference in physico-chemical parameters between microcosm were tested by ANOVA (confidence interval 95 %), followed by comparison with HSD turkey-test. The difference in biomass descriptors and the number of OTUs among samples during experiments were detected with the Mann Whitney test using SPSS 15.0 software for Windows. Results were considered statistically different at  $p \leq 0.05$ .

### 3. Results

#### 3.1. Physico-chemical parameters

Physico-chemical parameters of river water from both sites (*M* and *S*) are summarised in Table 1. Site *M* recorded higher nitrate and silica concentrations and conductivity values than site *S* ( $p < 0.05$ ). The temperature, pH and orthophosphate concentrations were similar for both sites *M* and *S* ( $p > 0.05$ ).

Site	Temperature (°C)	pH	Conductivity ( $\mu\text{S cm}^{-1}$ )	$\text{NO}_3^-$ ( $\text{mg L}^{-1}$ )	$\text{PO}_4^{3-}$ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	$\text{SiO}_2$ ( $\text{mg L}^{-1}$ )
<i>A</i>	$7.7 \pm 2.8$	$7.8 \pm 0.3$	$859.1 \pm 13.2$	$43.2 \pm 0.8$	$16.3 \pm 28.3$	$8.4 \pm 0.9$
<i>L</i>	$6.2 \pm 2.4$	$7.8 \pm 0.3$	$144.6 \pm 5.2$	$9.9 \pm 2.4$	$4.8 \pm 4.2$	$4.5 \pm 1$

**Table 1:** Physical-chemical characteristics (mean  $\pm$  SD,  $n = 3$ ) of river water for both sites *M* and *S*, during the periods of *in situ* phototrophic biofilm cultures.

Comparison of physico-chemical parameters (Tableau 2) between microcosms at the initial state ( $T_{.7}$ ) revealed low difference ( $p < 0.05$ ) intra and inter both *M* and *S* microcosms experiments. A technical problem in the preparation of nutrient solution induced some no significant difference ( $p > 0.2$ ) of silica concentrations during the *S* microcosms experiment.

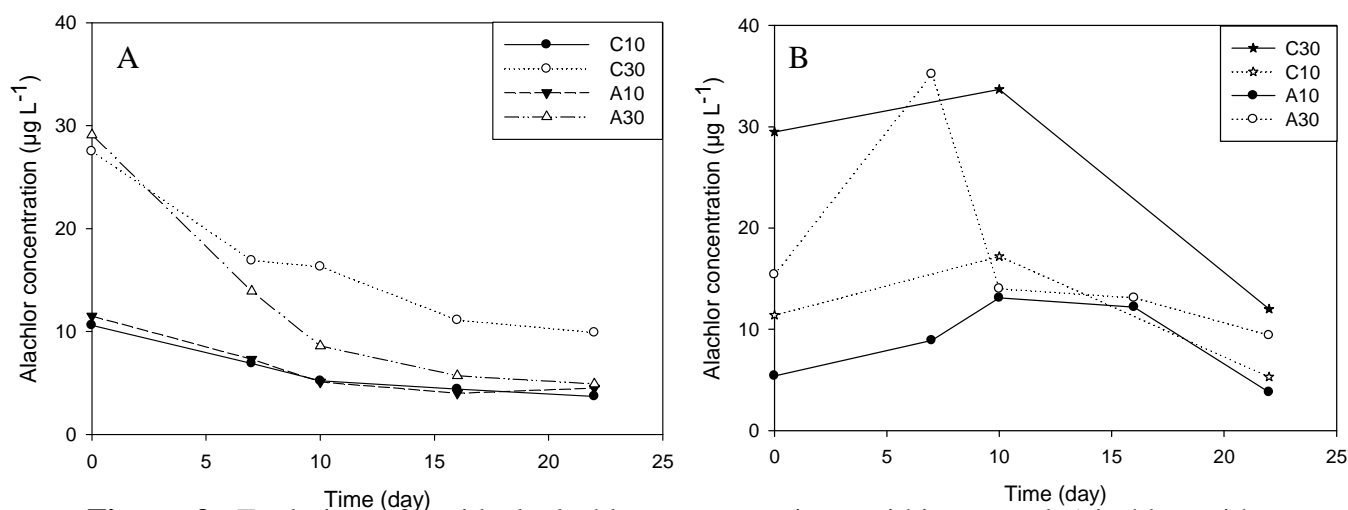
Microcosm experiment	Temperature (°C)	pH	Conductivity ( $\mu\text{S cm}^{-1}$ )	$\text{NO}_3^-$ ( $\text{mg L}^{-1}$ )	$\text{PO}_4^{3-}$ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	$\text{SiO}_2$ ( $\text{mg L}^{-1}$ )
<i>A</i>	$21.6 \pm 0.8$	$8.3 \pm 0.1$	$499.2 \pm 28.9$	$46.7 \pm 2.4$	$570 \pm 89.4$	$10.5 \pm 0.3$
<i>L</i>	$19.6 \pm 0.5$	$8.6 \pm 0.2$	$182.7 \pm 11.6$	$15.7 \pm 0.5$	$671 \pm 90.4$	$35.6 \pm 16.9$

**Table 2:** Mean (SD) of physical-chemical parameters values of water samples collected at the beginning of the experiment ( $T_{.7}$ ) within the five microcosms for each *M* and *S* microcosm experiments.

#### 3.2. Residual alachlor level

Residual alachlor level curves in microcosms for the two sampling sites and for the two alachlor concentration treatments are shown in Figure 3A and B. The curves in Figure 3A indicated an exponential disappearance of alachlor over time for the *M* experiment, thus a first-order model was used to estimate the rate of disappearance and the half-life of alachlor (Stasinakis et al. 2009). At alachlor  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ , the half-lives of alachlor was 13.5 and 13 days for control (without biofilm) and treated microcosms, respectively. At  $30 \mu\text{g L}^{-1}$ , the half-lives of alachlor were 12.5 and 7.5 days for control and treated microcosms, respectively. Figure

3B showed an erratic evolution of alachlor concentrations over time for *S* experiments. The profiles of alachlor fate were identical for all conditions control and treated, associated to different alachlor levels. The residual alachlor concentrations firstly show an increase and then a disappearance. The residual alachlor concentrations at the end of the incubation period were closed between the experiments *M* and *S*, control and treated, and comprised between 3.8 to 5.8  $\mu\text{g L}^{-1}$  and 4.9 to 9.9  $\mu\text{g L}^{-1}$  for treatments at 10 and 30  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectively.

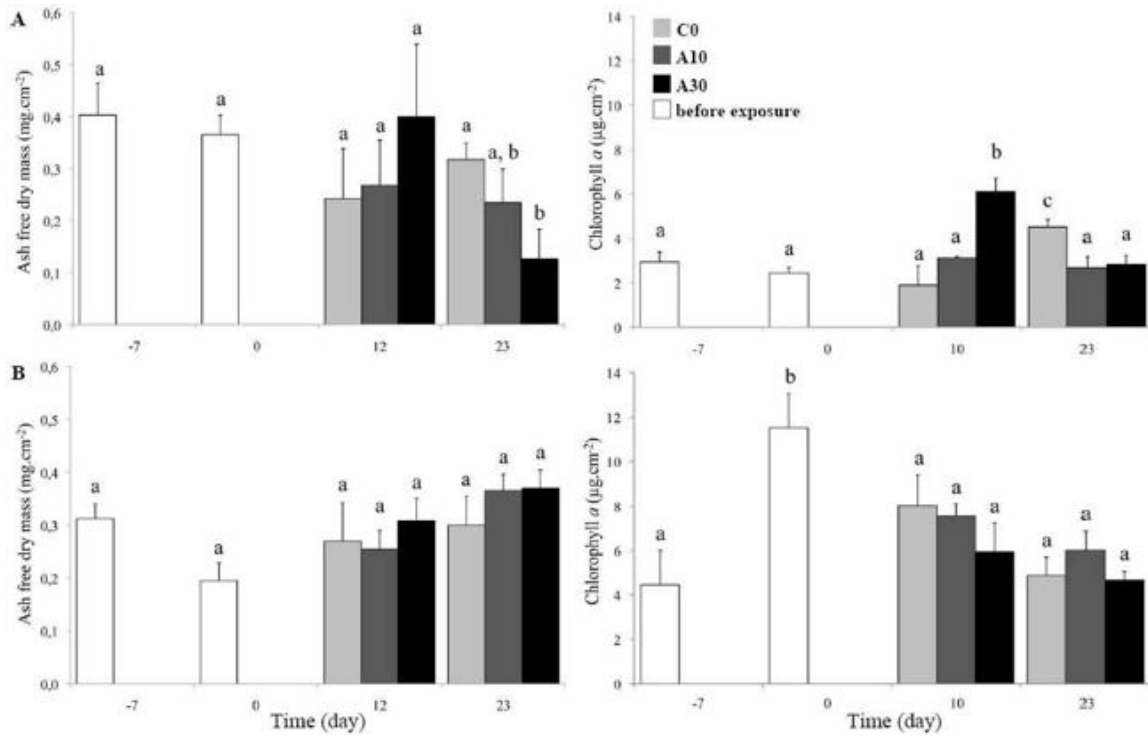


**Figure 3:** Evolution of residual alachlor concentrations within control (alachlor without biofilm, C10 and C30) and treated (biofilms with alachlor, A10 and A30) microcosms over experiments *M* (A) and *S* (B), at sampling dates from 0 to 22 days ( $T_0$ ,  $T_7$ ,  $T_{10}$ ,  $T_{16}$  and  $T_{22}$ ).  $T_0$  indicated the start of the alachlor exposure. Detection limit: 0.005  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

### 3.3. Biomass descriptors

After 4 weeks of river *in situ* development, biofilms from site *S* exhibited higher AFDM levels (0.4  $\text{mg cm}^{-2}$ ) than biofilms from site *M* (0.31  $\text{mg cm}^{-2}$ ) ( $p > 0.05$ ) (Figure 4). Conversely, biofilms collected at site *M* exhibited higher chlorophyll *a* levels (6.7  $\mu\text{g cm}^{-2}$ ) than biofilms collected at site *S* (4.3  $\mu\text{g cm}^{-2}$ ) ( $p > 0.05$ ). The acclimatization phase in microcosms didn't induce significant change of biomass descriptors regardless of experiments considered (*M* and *S*) ( $p > 0.05$ ).





**Figure 4:** Average  $\pm$  SD values ( $n = 3$ ) plot ash free dry mass (AFDM) and chlorophyll *a* during the incubation period for both *M* (A) and *S* (B) microcosms experiments for phototrophic biofilm samples collected before the acclimatization phase (day -7) and throughout microcosm experiments at 0, 12 and 23 days of incubation within control (biofilms without alachlor, C0) and alachlor treated (A10 and A30) microcosms. T<sub>-7</sub> indicated the end of river *in situ* culture and the start of the acclimatization phase and T<sub>0</sub> indicated the start of the alachlor exposure. Parameters indicated by different letters are significantly different ( $p \leq 0.05$ ).

No significant variation induced by alachlor treatment and microcosm incubation period was observed on the chlorophyll *a* and AFDM levels for *M* microcosm experiment. Both variables (AFDM and chlorophyll *a*) were not correlated ( $C_{\text{pearson}} = -0.544$ ,  $p = 0.011$ ) during this experiment.

Inversely, for the *S* microcosms experiment, differences were only observed for both chlorophyll *a* and AFDM levels at 23 days of incubation ( $p < 0.001$ ) for both alachlor concentrations tested (10 and 30  $\mu\text{g L}^{-1}$ ). Biomass growth inhibitions were observed for chlorophyll *a* (55 and 75 % for 10 and 30  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectively) and AFDM (27 and 74 % for 10 and 30  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectively) (data not shown). Both variables (AFDM and chlorophyll *a*) were correlated ( $C_{\text{pearson}} = -0.445$ ,  $p = 0.011$ ).

### 3.4. Bacterial community structure

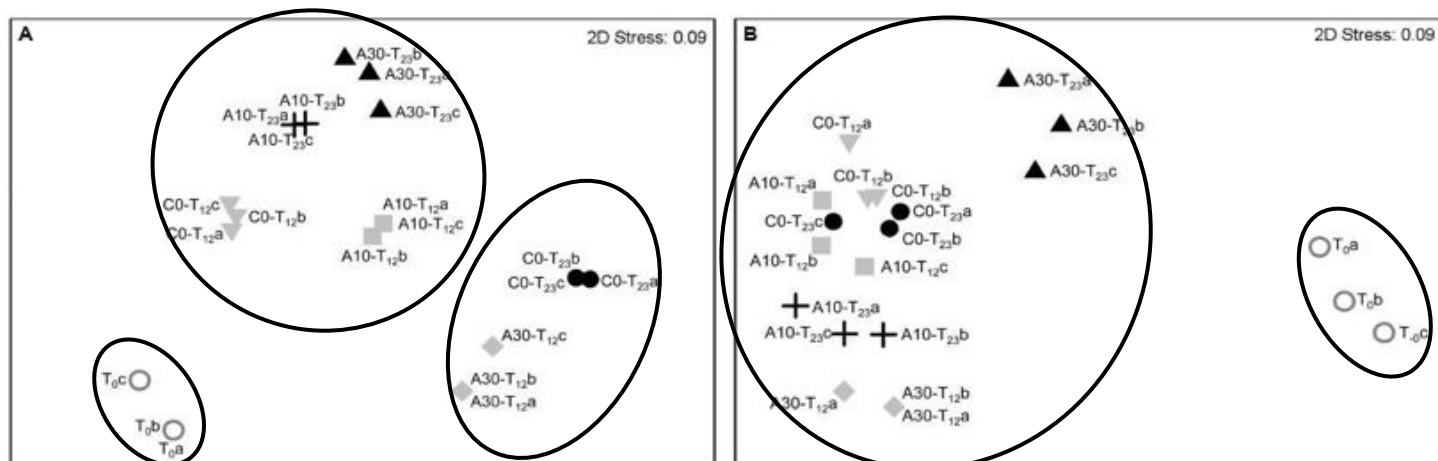
After 4 weeks of river *in situ* development, bacterial community structure of biofilms from sites *M* and *S* exhibited 50 % of homology (data not shown) associated to closed average number of OTUs (24 and 25.3, respectively).

For microcosm experiments, analysis of DGGE banding patterns revealed an average of 47 bands (OTUs) per DGGE gel. The number of OTUs obtained for each experimental conditions are presented in Table 3. The average number of OTUs per sample varied from 33 to 18 and 25 to 18 during the *M* and *S* microcosm experiments, respectively. The number of OTUs observed on the DGGE profiles revealed significant effect of alachlor at 12 days for the *S* experiment ( $p > 0.05$ ).

Microcosm experiment	Condition	T <sub>-7</sub>	T <sub>0</sub>	T <sub>12</sub>	T <sub>23</sub>
<i>A</i>	C0	24.0 ± 0.0	18.3 ± 0.6	21.0 ± 1.0	23.7 ± 1.2
	A10			23.7 ± 1.2	20.7 ± 1.5
	A30			22.0 ± 0.0	21.3 ± 1.5
<i>L</i>	C0	25.3 ± 0.6	20.0 ± 1.7	30.3 ± 0.6	20.3 ± 0.6
	A10			28.6 ± 0.6	31.7 ± 0.6
	A30			20.3 ± 1.2	31.3 ± 2.1

**Table 3:** Number of bands (OTUs) obtained from DGGE pattern analysis (mean ± SD, n = 3) for bacterial communities from biofilms collected at the beginning of the experiment (T<sub>-7</sub>) and throughout *M* and *S* microcosms experiments at 0, 12 and 23 days of incubation (T<sub>0</sub>, T<sub>12</sub> and T<sub>23</sub>) within control (C0) and alachlor treated (A10 and A30) microcosms. T<sub>-7</sub> indicated the end of river *in situ* culture and the start of acclimatization phase and T<sub>0</sub> indicated the start of alachlor exposure.

NMDS analysis carried out on the binary data from DGGE profiles revealed that bacterial communities for both *M* and *S* microcosm experiments were structured by the incubation time (ANOSIM, global R = 1, p = 0.001; global R = 0.98, p = 0.002, for both *M* and *S* experiments, respectively) and alachlor treatment (ANOSIM, global R = 1, p = 0.001; global R = 1, p = 0.001, for both *M* and *S* experiments, respectively) (Figure 5). The stress values of final configuration were 0.09 for both experiments. The proximity between replicates on the plot revealed an important similarity of the DGGE banding patterns. NMDS analysis showed that differentiated bacterial community structures were strongly mediated by both incubation period and alachlor treatment.



**Figure 5:** Two dimensions representation plot of non-metric multidimensional scaling (NMDS) analysis of DGGE banding patterns for bacterial communities from biofilms collected at the beginning of the exposition period ( $T_0$ ) and throughout *M* (A) and *S* (B) microcosm experiments at 12 and 23 days of incubation (gray color for  $T_{12}$  and black color for  $T_{23}$ ) within control (C0) andalachlor treated (A10 and A30) microcosms.  $T_{-7}$  indicated the end of river *in situ* culture and the start of acclimatization phase and  $T_0$  indicated the start ofalachlor exposure. Thick circles correspond to a similarity of 80 %. The letters a, b and c indicate replicates from same experimental condition.

### 3.5. Diatom community structure

A total of 18 diatom species were identified occurring at more than 3 % relative abundance in at least one sample, in all the samples (Table 4) and were considered as characteristic of each developed diatom community.

Microcosm experiment	Day	Condition	ADMI	NLAN	SBRE	ENMI	FCVA	NGRE	NPAL	UULN	FCAP	GMIC	CPLA	PTLA	NDIS	MVAR	ADBI	NRCH	PLFR	GPUM	
A	-7		84.0	-	-	-	0.1	-	-	3.4	0.1	3.4	3.1	1.9	0.3	-	-	-	-	2.0	
	0		83.3	-	0.1	-	0.1	-	-	4.3	-	1.3	5.0	1.3	1.0	-	-	-	-	1.6	
	12	C0	90.1	-	-	-	-	-	-	-	2.8	-	1.3	2.0	2.4	0.3	-	-	-	0.1	0.5
		A10	89.3	-	-	-	-	-	-	-	3.8	-	0.8	1.4	2.1	0.6	-	-	-	0.1	0.9
		A30	88.6	-	-	-	-	0.1	-	0.1	2.6	-	1.4	2.4	1.4	0.5	-	-	-	-	1.5
	23	C0	89.8	-	-	-	-	-	-	0.1	3.8	-	0.5	1.4	2.3	0.1	-	-	-	-	0.8
		A10	88.3	-	-	0.1	-	-	-	0.1	4.5	-	1.4	1.9	1.4	0.3	-	-	-	-	0.9
		A30	89.6	-	0.1	-	0.1	-	-	-	2.6	-	1.3	1.8	1.9	-	-	-	-	-	1.1
	L	-7		3.2 (0.4)	24.4 (0.2)	12.1 (0.2)	7.4 (2.3)	7.3 (3.5)	6.4 (1.2)	4.5 (2.1)	1.5 (1.4)	5.0 (1.1)	1.8 (0.4)	0.9 (0.2)	0.5 (0.0)	1.5 (0.0)	2.4 (0.2)	1.8 (1.8)	2.6 (0.5)	0.9 (0.2)	0.1 (0.2)
0			7.1 (1.6)	17.4 (2.7)	8.8 (0.7)	8.6 (0.5)	6.8 (1.1)	6.4 (0.9)	8.5 (1.4)	0.3 (0.4)	5.8 (3.2)	2.3 (1.1)	1.3 (0.4)	1.3 (0.7)	2.8 (1.1)	2.6 (0.9)	2.9 (0.5)	2.0 (0.0)	1.3 (0.7)	0.4 (0.2)	
12		C0	5.9 (1.2)	16.6 (1.9)	8.8 (1.4)	11.5 (3.5)	6.8 (1.4)	6.9 (2.7)	2.8 (2.5)	1.3 (0.4)	4.6 (1.6)	4.0 (1.1)	1.0 (0.0)	0.5 (0.0)	3.4 (1.2)	2.4 (0.2)	2.0 (1.4)	3.4 (0.5)	2.0 (0.4)	0.5 (0.7)	
		A10	9.5 (1.1)	19.0 (2.8)	14.3 (0.0)	6.5 (0.4)	6.8 (1.4)	4.8 (0.0)	5.0 (0.7)	1.8 (0.0)	5.1 (1.2)	1.9 (0.2)	0.8 (0.4)	0.9 (0.5)	2.1 (0.9)	2.1 (0.2)	2.3 (0.7)	1.4 (0.9)	1.8 (0.0)	0.3 (0.4)	
		A30	5.1 (0.9)	17.9 (2.3)	11.4 (0.2)	7.0 (0.7)	6.9 (2.3)	7.0 (3.9)	6.0 (2.1)	1.4 (0.2)	5.3 (0.7)	2.1 (0.2)	0.5 (0.4)	1.9 (1.9)	2.1 (0.5)	2.9 (0.5)	2.3 (1.1)	2.4 (0.5)	1.6 (0.9)	0.4 (0.5)	
23		C0	8.6 (0.9)	17.1 (0.5)	11.9 (2.3)	6.0 (0.7)	4.5 (1.1)	6.8 (1.4)	4.8 (2.1)	2.1 (0.2)	5.6 (1.2)	2.4 (0.9)	0.8 (0.4)	0.4 (0.2)	2.1 (0.5)	1.8 (1.8)	3.1 (0.5)	1.6 (0.9)	3.3 (1.1)	0.5 (0.4)	
		A10	5.0 (0.7)	21.8 (1.4)	11.0 (3.9)	11.0 (3.2)	6.3 (0.4)	3.6 (0.9)	5.3 (0.4)	3.4 (0.5)	4.3 (1.4)	1.9 (0.9)	1.3 (1.1)	1.3 (0.0)	1.4 (0.9)	3.5 (0.4)	2.6 (0.2)	1.1 (0.9)	1.6 (0.9)	0.0 (0.0)	
		A30	38.5 (12.4)	12.4 (3.0)	5.4 (0.9)	5.4 (3.0)	4.1 (2.3)	3.8 (1.1)	4.8 (1.4)	1.5 (0.7)	2.8 (2.5)	2.0 (0.4)	0.8 (0.4)	0.8 (0.4)	0.8 (0.7)	1.4 (1.6)	0.8 (0.4)	0.6 (0.2)	1.0 (0.7)	0.0 (0.0)	

**Table 4:** Mean (SD) relative abundance of dominant species representing more than 3% relative abundances in at least one sample, in the diatom communities of biofilms collected at the beginning of the experiment ( $T_{-7}$ ) and throughout *M* and *S* microcosms experiments at 0, 12 and 23 days of incubation ( $T_0$ ,  $T_{12}$  and  $T_{23}$ ) within control (C0) andalachlor treated (A10

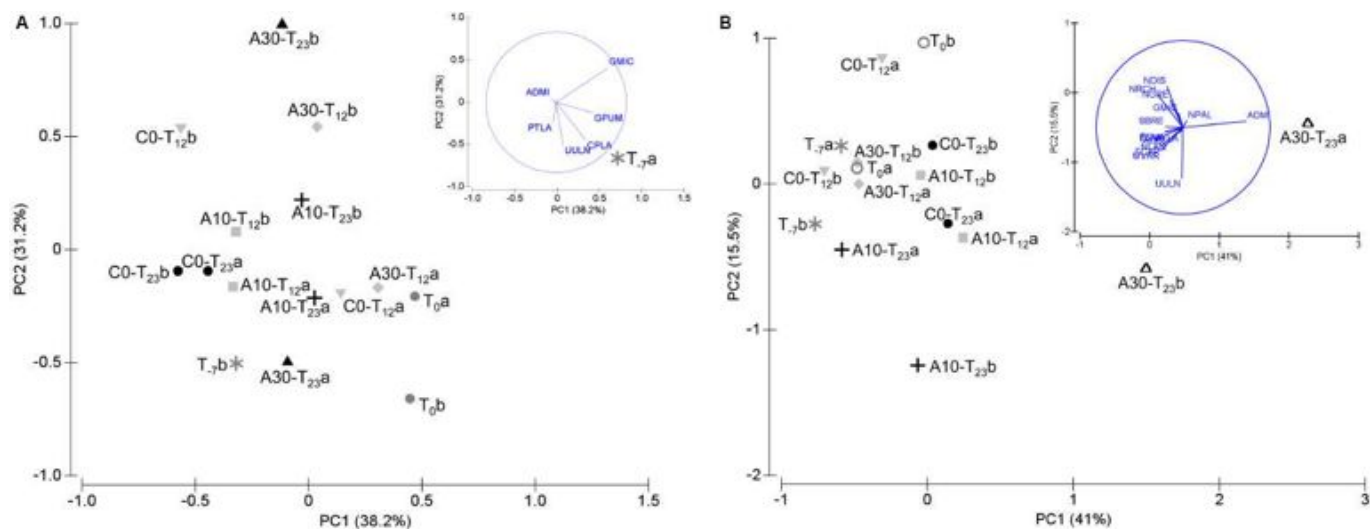
and A30) microcosms. T<sub>-7</sub> indicated the end of river *in situ* culture and the start of acclimatization phase and T<sub>0</sub> indicated the start of alachlor exposure.

ADMI: *Achnanthydium minutissimum* (K<sub>z</sub>.) Czarnecki; NLAN: *Navicula lanceolata* (Agardh) Ehrenberg; SBRE: *Surirella brebissonii* Krammer & Lange-Bertalot var. *brebissonii*; EMIN: *Eunotia minor*; FCVA: *Fragilaria capucina* Desmazieres var. *vaucheriae* (Kutzing) Lange-Bertalot; NIGR: *Nitzschia gracilis* Hantzsch; NPAL: *Nitzschia palea*; UULN: *Ulnaria ulna* (Nitzsch.) Comp<sub>e</sub>; FCAP: *Fragilaria capucina* Desmazieres var. *capucina*; GMIC: *Gomphonema micropus* K<sub>zing</sub> var. *micropus*; CPLA: *Cocconeis placentula*; PTLA: *Planothidium lanceolatum* (Brebisson ex K<sub>zing</sub>) Lange-Bertalot; NDIS: *Nitzschia dissipata* (Kutzing) Grunow var. *dissipata*; MVAR: *Melosira varians* Agardh; ADBI: *Achnanthydium biasoletianum* (Grunow in Cl. & Grun.) Lange-Bertalot; NRCH: *Navicula reichardtiana* Lange-Bertalot var. *reichardtiana*; PLFR: *Planothidium frequentissimum* (Lange-Bertalot) Lange-Bertalot; GPUM: *Gomphonema pumilum* (Grunow) Reichardt & Lange-Bertalot.

Overall, the diatom communities from *S* experiment exhibited higher dominant specie number (18 diatom species) (with relative abundance > 3% at least one sample) (Table 4) than the diatom communities from *M* experiment (13 diatom species). The diatom community from *S* experiment was dominated by *Navicula lanceolata* (Agardh) Ehrenberg (NLAN) (24.4 %) and *Encyonema minutum* (Hilse in Rabh.) D.G. Mann (ENMI) (7.4 %), although the diatom community from *M* experiment was mainly dominated by *Achnanthydium minutissimum* (K<sub>z</sub>) Czarnecki (ADMI) (84 %). ADMI diatom species observed in the samples of both *M* and *S* experiments exhibited different morphotypes and were considered as different in the NMDS analysis. For the *M* experiment, dominant diatom species composition and proportions did not differ significantly between control and treated biofilms (Figure 6) (ANOSIM, global R = -0.389, p = 0.667). Similarly, diatom community didn't present temporal variations (ANOSIM, global R = -0.333, p = 0.92) with the dominant presence of ADMI (*Achnanthydium minutissimum* (Kütz.) Czarnecki) (relative abundance average of 89 % over study) (Table 4).

For communities from *S* experiment, diatom structure seemed to be conditioned by both the age of maturation during the incubation and alachlor treatment (ANOSIM, incubation time: global R = 0.389, p = 0.018; alachlor treatment: global R = 0.583, p = 0.074). Similar results were observed for the *S* experiment with the presence of *Achnanthydium minutissimum* (K<sub>z</sub>) Czarnecki (ADMI), *Navicula lanceolata* (Agardh) Ehrenberg (NLAN), *Surirella brebissonii* Krammer & Lange-Bertalot var. *brebissonii* (SBRE), *Eunotia minor* (ENIM), *Fragilaria capucina* Desmazieres var. *vaucheriae* (Kutzing) Lange-Bertalot (FCVA), *Nitzschia gracilis* Hantzsch (NIGR) and *Nitzschia palea* (NPAL), excepted after 23 days of incubation for the initial 30 µg L<sup>-1</sup> alachlor concentration which tended to shift the structure (Figure 6). These communities were characterised by increasing abundances of ADMI (38.5% average) (Table

4 and Figure 6) and the occurrence of higher proportion of abnormal forms of ADMI diatom frustules ( $19.1 \pm 2.7\%$ ).



**Figure 6:** Results of Principal Component Analysis (PCA) with projection of the variables (diatom species) on the component planes (blue circle and write) carried out on log-transformed diatom abundance data from biofilms collected at the beginning of the experiment ( $T_{.7}$ ) and throughout *M* and *S* microcosms experiments at 0, 12 and 23 days of incubation ( $T_0$ ,  $T_{12}$  and  $T_{23}$ ) within control (C0) andalachlor treated (A10 and A30) microcosms.  $T_{.7}$  indicated the end of river *in situ* culture and the start of acclimatization phase and  $T_0$  indicated the start ofalachlor exposure. Specie identifications: refer to caption of Table 4 for the letters meaning. The letters a, b and c indicate replicates from same experimental condition.

#### 4. Discussion

The objective of the present study was to evaluate the response of natural phototrophic biofilms with different histories and origins toalachlor contamination in microcosm. Biofilms were produced *in situ* on artificial supports (polyethylene plates) for 4 weeks at two sites with contrasting physical-chemical characteristics. The choice of the two study sites proved to be relevant for the purpose of this work since different environmental conditions were recorded during the *in situ* incubation period. Site *M*, located in an agricultural watershed basin, was characterized by high levels of pH, conductivity, and nitrate concentrations. Site *S*, located in a forested watershed basin, was mainly characterized by its higher total phosphorus concentrations, as reported previously by Paule et al. (2009). The natural biofilms collected *in situ* exhibited similar biomass levels (AFDM and chlorophyll *a*) and number of OTUs but different profiles of bacterial community structure, and diatom specie composition. The

AFDM and chlorophyll *a* levels in this study are consistent with levels recorded on glass slide supports at both same sites in a previous study (Paule et al. 2009). Artificial supports made of polyethylene were preferentially chosen for the *in situ* production of biofilm (Paule et al. 2011) to limit the occurrence intra-site heterogeneity (Townsend 1989), to facilitate the collect of biofilms, their transfer and their fixation in the microcosms and to control the maturation and the age of biofilms.

In river, the occurrence of the chemical exposure and physical perturbation and the complex interactions between the biofilm and its environment (Geiszinger et al. 2009) suggest the necessity of laboratory approaches to evaluate the response of biofilm to perturbation. Jurgensen and Hoagland (1990) observed that the changes of hydrodynamic conditions were the predominant factor influencing the phototrophic biofilm structure compared to pulse atrazine exposure. Lynch et al. (1985) showed similar results for seasonal variations compared to atrazine contamination.

The ecotoxicological experiment has been preferentially realized in microcosm under stable and controlled experimental conditions to limit the variations of environmental conditions which may interfere with the response of phototrophic biofilms exposed to alachlor. The choice of the exposure period length (23 days) was based half-life values in aquatic medium (e.g. in Graham et al. 2000; Ensz et al. 2003). During the period of incubation in the microcosms, the maintaining of physical-chemical characteristics for each experiment revealed that the changes observed within biofilms may be probably caused by the herbicide exposure. The initial river water used was characterized by high concentrations of phosphates ( $>500 \mu\text{g L}^{-1}$  of  $\text{PO}_4^{3-}$ ) and nitrogen levels ( $> 15 \text{ mg L}^{-1}$  of  $\text{NO}_3^-$ ), which could be considered as eutrophic trophic level (Dodds et al. 1998). The physical-chemical conditions were reproducible both over time and between units of common and different treatments. Residual alachlor concentrations detected within control microcosm revealed the presence of alachlor in the river water from both sites *M* and *S*, despite the absence of alachlor use in the agricultural watershed basin of site *M* and the low pesticide contamination well known at site *S* (Debenest 2007).

#### **4.1. No microbial response during the acclimatization phase**

Some authors observed a lower response of biofilms to perturbation if communities have previously been perturbed by a stress (Kasai 1999; Niderlehner and Cairns 1992; Tlili et al. 2008). In this context, the strategy was to monitor an acclimatization phase to limit the bias induced by any biofilm stress due to changes of environmental conditions. Pesce et al. (2006) observed no significant biofilm response to the herbicide presence during the first six days.

The authors supposed that this latency phase reflected the time for acclimatization of biofilm to new experimental conditions. In the present study, no change of biofilm was recorded in terms of biomass (AFDM and chlorophyll *a*) despite the confinement of biofilm in the microcosms with high nutrient concentrations and temperature values which could stimulate the growth and to lead to modifications of interaction between prokaryotic and eukaryotic micro-organisms, such as competition for the resources (Caron 1994). This absence of modification during the acclimatization phase could indicate that the biofilms collected *in situ* exhibited mature development state and, then mainly controlled by autogenic factors.

#### **4.2. Alachlor contamination during the microcosm experiment**

Initial alachlor concentrations measured in the microcosms were closed to nominal concentrations. Despite an identical finality of the alachlor levels, the comportment and kinetic profiles were different between the both experiments *M* and *S*.

For the *M* experiment, alachlor concentrations followed similar profiles of removal whatever treatments and initial concentrations associated to different kinetics. The removal of alachlor observed in the microcosm without biomass (C10 and C30) exhibited half-lives of 13.5 and 12.5 days, which could reflect photodegradation, adsorption to microcosm material, and volatilization mechanisms (Chesters 1989). Spawn et al. (1996) with the 21-day exposure duration observed a declining of alachlor concentration. The authors underline that this observation was consistent with the 15 days hydrolysis half-life of alachlor (Chiron et al. 1995). Loss of alachlor in microcosms without biofilm are unlikely not due to biodegradation mechanisms because the river water used for the microcosms were previously autoclaved. At alachlor  $30 \mu\text{g L}^{-1}$ , the difference observed between the treatments with and without biomass, indicated an impact of the presence of biofilm on the fate of alachlor, with lower half-lives of 7.5 days. This loss detected in presence of biofilm may be caused by biodegradation and adsorption mechanisms. In aquatic medium, alachlor is well known to be mainly transformed by micro-organisms. Moreover no change of the amount of biomass was detected over time. No difference was recorded for the  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  initial concentration, the half-life values were closed with or without biomass in the microcosms, reflecting no effect of the presence of biofilm on the chimiodynamic of alachlor.

For the *S* experiment, the fate of alachlor in absence of biofilm followed identical profiles over time whatever the concentration tested. After the addition of alachlor, we observed an increase, then decrease. The dramatic decrease may illustrate adsorption mechanism of alachlor by the biofilm and the phase of increase which was not observed for the *M* experiment may reflect the mix between the added alachlor (nominal concentration of 10 and

30  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) and the initial alachlor concentration from river water (5  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) and the release of alachlor by biofilms. This release by the biofilm could be associated to detachment of biomass as observed on value plot of ash free dry mass. At alachlor 10  $\mu\text{g L}^{-1}$ , the difference with or without biofilms are only recorded the first days supposing adsorption mechanisms, and at alachlor 30  $\mu\text{g L}^{-1}$ , the residual alachlor levels are continuously lower over time in presence of biofilm than the residual alachlor level in absence of biofilm. The decrease of residual alachlor levels in the first days of contamination may reflect adsorption phenomena.

The supposed biodegradation over time should be verified by the analysis of metabolites such as OA (*Oxanilic Acid*) and ESA (*Ethane Sulfonic Acid*), well known in the literature as transformation products by micro-organisms (Graham et al. 2000). The results seem to suggest that the biofilms collected at site *S* presented higher absorption capacity than the biofilms from site *M*. Inversely the biofilms collected at site *M* seemed to present a higher biodegradation capacity than the biofilms from site *S*. The capacity of adsorption may be induced by several parameter including physical structure, compactness, composition of exopolymer... (Duong et al. 2010), and the biodegradation capacity may depend on composition of species. This high absorbent power may hypothetically improve the toxicity of alachlor by closer contact between micro-organisms and pollutants. The fate and the partition of herbicide are very important in potential toxicity of pollutant.

#### **4.3. Impact at community-level of alachlor on phototrophic biofilms**

Our result suggested that the AFDM of biofilm from only site *S* was damaged by the alachlor presence at both tested concentrations observed at 12 and 23 days. This result is in coherence with previously studies (Spawn et al. 1997) which recorded lower chlorophyll *a* levels at alachlor concentrations of 10  $\mu\text{g L}^{-1}$  and inhibition of growth. The nature of effect is associated to the action mode of alachlor (Böger et al. 2003).

In this work, bacterial and diatom specie communities are controlled by both biofilm maturation and alachlor presence. It is difficult to distinguish the effects caused by these two factors. Alachlor didn't induce change in the diatom specie composition excepted for the alachlor 30  $\mu\text{g L}^{-1}$  treatments at 23 days, which is characterized by an increase of *Achnantheidium minutissimum* (ADMI) diatom abundance accompanied by the increase of abnormal frustule forms. ADMI diatoms are colonisers and motile life-forms, indicators of good water quality, and known to be tolerant to herbicide at low herbicide concentrations and sensitive to high herbicide concentrations level (Pérès et al. 1996; Morin et al. 2009; Roubex et al. 2011), as observed in the present study. Moreover, in consistence with our results, Roubex et al. (2011) observed significant abnormal frustule forms number at higher alachlor



contamination levels. It is interesting to note that the ADMI diatom specie detected in the samples of biofilms collected to site *M*, exhibited different morphotypes and tolerant to alachlor. Thus, it seems important to consider the different morphotypes of diatom species in the ecotoxicological studies and their use as bio-indicators of pesticide pollution.

In the present work, despite maturation levels supposed similar, the biofilms of two sites *M* and *S* presented different responses to alachlor presence. The biofilm from site *M*, with a poor water quality, seemed to be less influenced by the presence of alachlor. Inversely, the biofilm from site *S*, with a good water quality, seemed to be the most reactive to alachlor. Moreover, the chiodynamic of alachlor was different in according to site of incubation.

Several hypotheses could explain this difference : (i) the composition, thickening, cohesion, composition of EPS, (ii) the presence of tolerant species, and (iii) the operating conditions which were similar between site *M* and microcosms (as indicated by the flow and nitrogen concentrations). The presence of alachlor and the pesticide pollution such as metolachlor (similar herbicide family to alachlor) well known at site *M* could induce co-tolerance processes to alachlor during our experiments assigned to PICT (pollution-induced community tolerance) concept as described by previous studies, driving to a selection of tolerant species (Pesce et al. 2010). The physical structure and the presence or not of tolerant species are linked to the trajectory of biological evolution in biofilms followed during their developments leading to a structure influenced by autogenic and allogenic factors. Previous studies showed that biofilms produced under fast current, as the case of biofilm from site *S*, were highly compact and often more resistant to perturbations (Stevenson 1996).

In the present study, the sensitivity of descriptors was different. For the *S* experiment, the effects on the biofilm growth are detected via the descriptors of biomass at 12 days and for both concentrations. The effects of alachlor on the diatom communities are detected at 23 days and at higher alachlor levels. No change on species composition was revealed although experiment which could be explained by the decrease of residual alachlor concentration over time.

## 5. Conclusion

As most of long term ecotoxicological experiments, it is difficult to distinguish the effects of natural maturation and growth of the effects of perturbation. In the present study, the response of biofilm seems to depend on the trajectory and history of biofilms, but it is impossible to associate the response to contrasting physical-chemical characteristics. This study shows the importance of operating conditions and experimental design during ecotoxicological experiment in microcosms. Moreover, this work improves complementary data in the use of

diatoms as bio-indicator of pesticide pollution, and the interest to consider the different morphotypes of species. In according to Sabater et al. (2007), descriptors of biomass are generally more pertinent to visualize the short term effect, although descriptors of structure preferentially revealed the long term effects. To evaluate the toxicity of pollutant, it is important to associate combinations of descriptors of different biological organization levels (organisms, populations and communities), integrating histories, the fate of herbicide and the action mode of molecule.

### **Acknowledgements**

This work was funded by the French National Programme EC2CO – Environmental Microbiology - and by the Midi-Pyrénées Council Programme of the Pyrenean working community. We thank J. Ferriol and D. Dalger for assistance with the DGGE and water chemistry analysis, respectively. We also thank the “Association des Agriculteurs d’Auradé” for the access to site *M*.

### III.3 Réponse du biofilm phototrophe à un herbicide durant ses premiers stades de développement

Résumé de l'article en préparation « **Comparative responses of river biofilms at the community-level to common organic solvent and herbicide exposure** » par A. Paule, V. Roubéix, G.D.W. Swerhone, B. Lauga, R. Duran, F. Delmas, E. Paul, J.R. Lawrence et J.L. Rols. (Article 5)

#### III.3.1 Approche expérimentale

Des cultures de biofilms ont été réalisées en mini-bioréacteurs photosynthétiques du type bioréacteur annulaire rotatif durant 5 semaines. Ces mini-bioréacteurs, présentés dans la **partie II Matériel et méthodes**, sont bien connus pour être de très bons outils dans l'évaluation des effets d'un stress sur le développement du biofilm de rivière (Lawrence et al. 2000). Trois conditions différentes ont été testées, en triplicats (**cf. partie II Matériel et méthodes**), un contrôle (sans exposition à l'alachlore) et deux expositions à 1 et 10  $\mu\text{g.L}^{-1}$  d'alachlore durant toute la culture, y compris durant la première phase de colonisation des supports. Les mini-bioréacteurs sont alimentés en continu avec de l'eau de rivière (South Saskatchewan River, Canada) à un débit de 500  $\text{mL.j}^{-1}$  à l'aide de pompes péristaltiques. A l'issue des 5 semaines de culture, les biofilms sont analysés d'un point de vue structurel (microscopie confocale, biomasse, chlorophylle *a*, DGGE et T-RFLP, composition en diatomées) et fonctionnel (Biolog, production primaire). Le choix des 5 semaines pour la durée de l'expérimentation est fondé sur une étude antérieure (Lawrence et al. 2000), et sur l'étude précédente qui laisse penser que cet âge de biofilm permet d'atteindre sa maturité.

Pour la mise en œuvre d'expérimentations en écotoxicologie, de part leurs propriétés souvent hydrophobes, les pesticides sont dans la plupart des cas dissous dans un solvant organique (méthanol, acétone...). C'est ce mélange pesticide et solvant organique qui est ensuite additionné au milieu de culture utilisé lors des expériences. Peu d'études intègrent, parmi les conditions testées en parallèle, un traitement avec le solvant organique seul. La présence du solvant peut ainsi engendrer différents effets sur les communautés, antagonistes ou synergiques, et biaiser ou même masquer les effets d'un polluant (Stratton 1985 ; El Jay 1996a). La plupart des études sur les solvants organiques se focalisent sur les effets induits sur des monocultures d'algues (algues bleu-vertes, Stratton 1985 ; algues vertes, El Jay 1996b, Ma et Chen 2005) des communautés phytoplanctoniques (Bérard 1996). Ces études sont souvent associées à des mesures de valeurs d' $\text{EC}_{50}$ , et très rarement réalisées à l'échelle des

communautés. A notre connaissance aucune étude n'a été faite sur l'impact du méthanol à cette concentration là sur les biofilms phototrophes à l'échelle des communautés.

Durant cette étude, en parallèle des traitements à l'alachlore, certains mini-bioréacteurs sont contaminés avec  $25 \mu\text{g.L}^{-1}$  (0,025 % v/v) de méthanol. Les conditions expérimentales restent par ailleurs les mêmes que pour le traitement avec l'alachlore. De même, les coupons des mini-bioréacteurs sont prélevés à 5 semaines pour caractériser les biofilms phototrophes.

### **III.3.2 Principaux résultats et discussion**

L'alachlore engendre des effets concentration-dépendantes sur les communautés comme préalablement souligné lors de précédentes études (Spawn et al. 1997) :

- . A  $1 \mu\text{g.L}^{-1}$ , la présence de l'alachlore induit une réduction significative de la biomasse totale. L'ensemble des autres paramètres, qu'ils soient fonctionnels ou structurels, ne présentent pas de changement ;

- . A  $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ , les communautés d'algues, de bactéries et de cyanobactéries présentent des abondances relatives plus faibles tout en gardant des proportions entre elles similaires aux biofilms non traités. Concernant l'analyse des 5 lectines, les proportions sont différentes laissant suggérer des changements dans la composition (Neu et al. 2005). Malgré tout, aucun effet significatif de l'alachlore n'apparaît sur la structure des communautés bactériennes (par DGGE ou T-RFLP), ni aucune perte ou gain de groupes fonctionnels (Biolog). La disparition ou l'apparition d'espèces redondantes ou le manque de sensibilité de ce paramètre de mesure (De Liphay et al. 2004) pourraient expliquer cette absence de changement dans le profil d'utilisation des sources de carbone.

La quantité de biomasse algale, de cyanobactéries et les niveaux de chlorophylle *a* sont légèrement plus faibles pour les biofilms traités au méthanol par rapport aux biofilms non traités (contrôle). Inversement, le compartiment bactérien semble répondre positivement à la présence du méthanol, illustré par une production bactérienne et des quantités de biomasses bactériennes plus importantes. Cette stimulation des bactéries peut être causée par une diminution de la compétition avec les algues impactées par le solvant, ou tout simplement en réponse à une augmentation du niveau de carbone organique, par rapport aux niveaux contenus dans les eaux de rivière. Un changement de la composition dans le cadre de ces 5 lectines décrites ici, est observé dans les biofilms traités pour converger vers une dominance d'*Ulex europaeae*. La structure bactérienne ne subit pas de changement significatif, malgré une tendance qui montre une divergence des communautés entre les biofilms traités au méthanol et les biofilms contrôles ou traités à l'alachlore. En ce qui concerne les profils d'utilisation

des sources de carbone, seul un substrat ( $\beta$ -méthyl-D-glucoside) est affecté significativement par la présence du méthanol.

D'un point de vue écologique, le méthanol au même titre que l'alachlore peut engendrer des modifications au niveau de la qualité du biofilm comme source de nourriture des biofilms. Les modifications au niveau des lectines peuvent par exemple provoquer des changements dans la capacité des biofilms à se protéger, à adsorber ou dégrader des molécules.

Les deux types de perturbations étudiées dans le cadre de ce travail, l'exposition continue à l'alachlore ou au méthanol, semblent engendrer des communautés microbiennes différentes. Leurs trajectoires d'évolution ont divergé, aboutissant à des structures différentes. Ainsi, la présence d'un solvant peut donc interférer avec l'herbicide testé lors d'expériences écotoxicologiques. Il aurait été intéressant de caractériser les biofilms à des temps intermédiaires, afin de définir le moment à partir duquel les communautés divergent dans leurs structures.

### **III.3.3 Conclusion et perspectives**

Cette étude tente d'évaluer les effets potentiels de l'alachlore à deux concentrations différentes sur la croissance du biofilm phototrophe, de son stade précoce jusqu'à sa maturité. L'alachlore présente un effet concentration-dépendante avec une inhibition préférentielle pour les communautés bactériennes quelle que soit la concentration considérée. L'alachlore semble affecter la croissance des biofilms sans en modifier la structure et les proportions relatives entre communautés algales et bactériennes. Il nous est impossible d'évaluer l'impact de l'alachlore en termes de successions écologiques, car une seule caractérisation du biofilm a été faite à l'issue des 5 semaines d'incubation. Vu la convergence des communautés, il semblerait que les trajectoires d'évolution soient identiques en présence ou en absence d'alachlore.

Les espèces de diatomées dominantes retrouvées dans l'ensemble de nos échantillons sont *Diatoma tenuis* (DITE) et *Fragilaria tenera* (FTEN). Ces espèces, dites espèces « coloniales », ont été répertoriées par Rimet et Bouchez (2011) pour appartenir aux guildes « *High-profile* ». Ce guildes regroupe les espèces de diatomées à haute stature, incluant des espèces filamenteuses, ramifiées, formant des chaînes, des tubes, ou pédonculées. A l'opposé de nos observations, Rimet et Bouchez (2011) montraient que les diatomées qui appartiennent à ce groupe voyaient leur abondance diminuer au sein des microcosmes contaminés. Les taxa de ce groupe sont connus pour ne pas être adaptés à résister aux turbulences de l'eau ni à une pression des brouteurs (Passy 2007), mais présentent une grande capacité à utiliser les nutriments dissous de l'eau. L'eau alimentant (*South Saskatchewan river Canada*) les mini-bioréacteurs présente de très faibles concentrations en nutriments (Chénier et al. 2003),

ce qui a pu induire une forte compétition entre les taxa favorisant ainsi les taxa les plus aptes à utiliser les nutriments dissous. La composition en espèces des biofilms est également influencée par les mécanismes d'émigration et d'immigration qui apparaissent sur le support de colonisation (Stevenson et Peterson 1991). La présence de ces espèces au sein des communautés planctoniques qui alimentent les mini-bioréacteurs via l'eau de rivière, et donc qui ensemencent continuellement les biofilms, pourrait expliquer l'absence de modification au niveau des communautés de diatomées des biofilms produits. Nous pouvons supposer que les espèces de diatomées endommagées par l'alachlore ont pu se détacher des supports de colonisation ou limiter leur adhésion. Cette hypothèse est cohérente avec les plus faibles épaisseurs et quantités de biomasse mesurées dans les mini-bioréacteurs exposés à l'alachlore.

D'un point de vue écologique, un biofilm ayant une quantité de biomasse plus faible peut modifier son appétence vis-à-vis des brouteurs. De même, les modifications de composition des exopolymères, pour les 5 lectines utilisées, observées pour les biofilms traités à  $10 \mu\text{g.L}^{-1}$  n'engendrent pas de modification dans leurs capacités à dégrader certaines sources de carbone, mais peut être n'est ce pas le cas pour toutes les fonctions ? Il serait intéressant d'évaluer l'impact de l'alachlore sur d'autres fonctions (production primaire, dénitrification...) réalisées par ces biofilms. Les algues peuvent être impactées soit directement, soit indirectement. L'impact observé sur la composante algale peut être de nature indirecte à la suite d'une diminution de la biomasse bactérienne inhibée par l'alachlore, entraînant une diminution de la compétition, et un accès facilité aux nutriments. Globalement, l'impact de l'alachlore semble limité pour les paramètres mesurés dans le cadre de cette étude, de plus une contamination en continu sur 5 semaines, à des concentrations de 1 et de  $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ , est rarement observée dans un environnement lotique. Les concentrations de l'ordre de  $10 \mu\text{g.L}^{-1}$  d'alachlore sont détectées principalement suite à des épisodes de crues. Aussi se pose-t-il la question du véritable impact de l'alachlore sur le fonctionnement général d'un écosystème dans un contexte lotique naturel.

Ainsi il est difficile de conclure, la molécule d'alachlore a-t-elle réellement très peu d'effet ou la démarche expérimentale de cette étude est-elle à revoir ? De par leur mode d'action, des études ont pu démontrer que les herbicides de la famille des chloroacétanilides présentent une toxicité moins importante que pour certaines autres familles (Junghans et al. 2003; isoproturon, Debenest et al. 2009). Le choix des descripteurs est très important lors des études écotoxicologiques (Debenest et al. 2009). Les descripteurs utilisés dans le cadre de cette étude, autres que les descripteurs de biomasse, ne sont peut-être pas adaptés au mode d'action des chloroacétanilides.

Lors de cette étude, nous avons également rencontré des problèmes avec le comportement chimiodynamique de l'alachlore. Cette molécule, de par ses caractéristiques (**cf. partie I, chapitre 3**), est considérée comme relativement bien soluble et peu sujette à la photodégradation et modérément adsorbée. Or malgré des concentrations en entrée des mini-bioréacteurs proches des valeurs nominales (1 et 10  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ), les concentrations enalachlore enregistrées en sortie des mini-bioréacteurs sont inférieures au seuil de détection de l'analyse ( $< 0,02 \mu\text{g.L}^{-1}$ , **cf. partie II Matériel et méthodes**) dans l'ensemble des mini-bioréacteurs en présence ou non de biofilm. Ces résultats suscitent de nombreuses interrogations : quels sont les mécanismes qui ont entraîné la disparition de la molécule entre l'entrée et la sortie des mini-bioréacteurs ? La photodégradation, l'adsorption sur le biofilms (quantité de biomasse faible dans cette étude) ou sur les dispositifs expérimentaux, l'hydrolyse ? En sachant que nos dispositifs expérimentaux sont alimentés en continu et de ce fait contaminés en continu par de l'alachlore et que le temps de séjour de l'eau au sein des dispositifs est très court de l'ordre de 1 jour. L'adsorption est un mécanisme rapide de quelques heures mais la biodégradation (Graham et al. 2000) et l'hydrolyse (Spawn et al. 1997) nécessitent souvent plusieurs jours. La dissipation probable, mais pas totale car nous observons des effets sur la biomasse pour les mini-bioréacteurs contaminés enalachlore, a pu limiter les effets, et finalement refléter une contamination plus faible que celle attendue. Le dosage des deux métabolites OA et ESA sur des échantillons à l'issue des 5 semaines de culture n'ont révélé aucune trace de ces deux métabolites. La biodégradation n'est donc pas le facteur responsable de la disparition de la molécule. Afin de vérifier les hypothèses d'un mécanisme de photodégradation ou d'adsorption, l'expérience (5 semaines) été de reproduite un an après avec les différentes conditions suivantes : (i) un traitement sans micro-organisme à l'obscurité et à la lumière, (ii) un traitement avec des micro-organismes. Les analyses du suivi de l'alachlore en entrée et en sortie et de la qualité de l'eau d'alimentation utilisée sont en cours de réalisation.

#### III.3.4 Article 5





## Comparative responses of river biofilms at the community-level to common organic solvent and herbicide exposure

A. Paule<sup>1,2</sup>, V. Roubeix<sup>3</sup>, G.D.W. Swerhone<sup>4</sup>, B. Lauga<sup>5</sup>, R. Duran<sup>5</sup>, F. Delmas<sup>3</sup>, E. Paul<sup>6,7,8</sup>, J.R. Lawrence<sup>4</sup> & J.L. Rols<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Université de Toulouse; UPS, INP; EcoLab (Laboratoire d'écologie fonctionnelle et environnement); 118 route de Narbonne, F-31062 Toulouse, France

<sup>2</sup> CNRS; EcoLab; F-31062 Toulouse, France

<sup>3</sup> Cemagref, UR REQE, 50 avenue de Verdun, F-33612 Cestas, France

<sup>4</sup> Environment Canada, Saskatoon, Saskatchewan, Canada

<sup>5</sup> Equipe Environnement et Microbiologie, Institut Pluridisciplinaire de Recherche sur l'Environnement et les Matériaux - IPREM, UMR 5254 CNRS/UPPA, IBEAS, Université de Pau et des Pays de l'Adour, BP1155, F-64013 Pau, France

<sup>6</sup> Université de Toulouse; INSA; LISBP, 135 Avenue de Rangueil, F-31077 Toulouse, France

<sup>7</sup> INRA, UMR792, Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, F-31400 Toulouse, France

<sup>8</sup> CNRS, UMR5504, F-31400 Toulouse, France

### Abstract

Ecotoxicological experiments have been performed at laboratory-scale under controlled conditions to investigate the community-level responses of river biofilm to chloroacetanilide herbicide (alachlor) and organic solvent (methanol) exposure through early stages of its development referenced to control. Triplicate rotating annular bioreactors, inoculated by river water, have been used to cultivate the river biofilms under the influence of 1 and 10  $\mu\text{g L}^{-1}$  of alachlor and 25  $\mu\text{g L}^{-1}$  of methanol (0.025 % v/v). For this purpose, the functional (thymidine incorporation and carbon utilization spectra) and structural responses of microbial communities were assessed after 5 weeks of development. Structural aspects included biomass (chlorophyll *a*, confocal laser scanning microscopy) and composition (fluor-conjugated lectin binding, molecular fingerprinting methods and diatom species composition). The addition of alachlor resulted in a significant reduction of bacterial biomass (by confocal analyses) at 1  $\mu\text{g L}^{-1}$ ; and at 10  $\mu\text{g L}^{-1}$  it induced a reduction of total lectin-binding, algal, bacterial and cyanobacterial biomass (by confocal microscopy) without composition changes, altered biofilm thickness or thymidine incorporation. In contrast, methanol treatment resulted in an increase of bacterial biomass and thymidine incorporation as well changes in dominant lectin-binding suggested changes of the exopolymer composition. Chlorophyll *a* and cyanobacterial biomass (by confocal microscopy) were also altered by methanol. As observed for the alachlor treatments, the methanol didn't induce change in community composition.

This study suggested that the concentration-dependent effect of alachlor mainly remains limited to biomass and growth inhibition without apparent changes of ecological succession trajectories and functional characteristics. Our work also establishes that the presence of methanol may hypothetically influence the results of ecotoxicological bioassays by potential direct toxic effects on the river biofilm community or acting antagonistically, synergically or masking the effects of the target compound.

**Keywords:** Rotating annular bioreactor; organic solvent; response to herbicide; community-level; molecular fingerprinting; confocal microscopy.

## 1. Introduction

In freshwater ecosystems, pesticides are one of the major sources of pollution (Kreuger 1998). Residual pesticides applied to crops migrate from agricultural lands to surface and ground waters by mechanisms including surface run-off (Papadopoulou-Mourkidou et al. 2004). This contamination can pose significant toxicological risks to resident aquatic organisms (Battaglin and Fairchild 2002). River biofilms, microbial aggregates composed of heterotrophic micro- and meio-organisms and phototrophic micro-organisms embedded in an exopolymeric matrix, are the first aquatic non-target organisms which interact with pesticides. These aggregates contribute to most of the primary production (Wetzel 1975), food source for aquatic grazers (Feminella and Hawkins, 1995), mineralization and element recycling processes (Battin et al. 2003), absorption (Lawrence et al. 2001), and biodegradation of chemical contaminants (Vercaene-Eairmal et al. 2010). Due to their shared physiological characteristics with plants, the algae in river biofilms are susceptible to be biologically and biochemically perturbed by herbicides, thus resulting in damage to overall ecosystem functioning.

A variety of studies including microcosms, mesocosms, and *in situ* (e.g. Dorigo et al. 2010; Tlili et al. 2008; Rimet and Bouchez 2011) are available that consider the response of river biofilm communities to herbicide exposure. Numerous direct or indirect effects have been recorded depending on the chemical and the structural or functional endpoint observed (Villeneuve et al. 2011a), seasonal changes (Dorigo et al. 2004), community composition (Guasch et al. 1997), herbicide level and frequency (Tlili et al. 2008 and 2011), nutrient available (Tlili et al. 2010) and current velocity (Villeneuve et al. 2011b). Moreover, it is difficult to distinguish between the response of communities to herbicide exposure and that of other environmental factors (Roubeix et al. 2010). Alachlor [2-chloro-N-(2, 6-diethylphenyl)-N-(methoxymethyl) acetamide] is extensively used as a pre-emergence chloroacetanilide herbicide applied to corn and soybeans, as a result it is detected worldwide in surface waters (Konstantinou et al. 2006).

Chloroacetanilide herbicides are known to inhibit the elongation of very long chain fatty acids in plants and algae (Böger et al. 2000) resulting in impaired cell development (Junghans et al. 2003; Vallotton et al. 2008). Unlike herbicides which inhibit photosynthesis (e.g. triazines or phenylureases), the most commonly studied chloroacetanilide herbicides (e.g. Dorigo et al. 2004; Villeuneuve et al. 2011a) can also have direct effects on bacteria (Foley et al. 2008). The literature mainly provides EC<sub>50</sub> values from single-species acute toxicity test on green algae (Fairchild et al. 1997), cyanobacteria (Singh and Datta 2005), bacteria and protozoa (Bonnet et al. 2007). A small number of studies examined the effects of alachlor on aquatic benthic algae (Spawn et al. 1997; Carder and Hoagland 1998).

Ecotoxicological experiments are the best way to apprehend the potential toxicity of pesticides on the river biofilms. In most studies, the use of organic solvents to dissolve low solubility-water pesticides prior to addition into experimental systems is often unavoidable. These solvents can affect the microbial communities and antagonistically or synergically interact with the tested molecules and even mask their effects (e.g. Stratton 1985; El Jay 1996a). Among the possible organic solvents, methanol is often considered as slightly or moderately toxic (e.g. Cho et al. 2009). Most studies have focused on the acute toxicity of methanol in single-species bioassays, including blue-green algae (Stratton 1985), green algae (El Jay 1996b; Okumura et al. 2001; Ma and Chen 2005), and on natural phytoplankton assemblages (Bérard 1996). The authors recorded various effects depending on the species and operating conditions. El Jay (1996b) observed a decrease of *Selenestrum capricornutum* biomass at 0.1 % (v/v) of methanol, although some authors recorded an increase of *Chlorella* species and

*Scenedesmus obliquus* biomass when exposed to methanol at up to 0.1 % (Kotzabasis et al. 1999; Navakoudis et al. 2007; Hunt et al. 2010). To our knowledge, there are no report concerning the potential toxicity of methanol for river biofilm communities (integrating both bacterial and algal compartments), thus additional studies are necessary to investigate consequences of organic solvent during ecotoxicological experiments.

In this context, our work consists to ecotoxicological experiments in a rotating annular bioreactor under controlled conditions in order to (i) assess the community-level response to alachlor herbicide and methanol exposure through the early stages of colonisation of river biofilm referenced to control communities, and (ii) illustrate the potential consequences of herbicide exposure on ecosystem functioning and (iii) examine the risk of interference between a herbicide and an organic solvent during ecotoxicological experiments. The response of communities was assessed by multimetric approach including both structural (biomass and composition) and functional descriptors.

## **2. Material and Methods**

### **2.1 Microcosm Operation**

The experimental set-up and reactor design for biofilm development has been described in detail previously (Lawrence et al. 2000, 2004). Natural river water (South Saskatchewan River, Saskatoon, SK, Canada) was used as inoculum and as a source of carbon and nutrients. Nutrient levels were assessed as described by Chénier et al. (2003). The reactors (water volume of 500 mL) were maintained at  $21 \pm 2^\circ\text{C}$ . The water was pumped through the reactors at a rate of 500 mL per day (giving a mean residence time of 24 h) via a multichannel peristaltic pump (Watson Marlow, Wilmington, MA). Replicated (3X) treatments included addition of alachlor purchased from Chem Service, Inc. (USA, purity 98 %) at 1 or  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  and methanol (analytic grade, Fisher Scientific, Nepean, ON, Canada) at  $25 \mu\text{g L}^{-1}$  (0.025 % v/v). Alachlor concentrations used were selected to be in the range detected in river environments (Konstantinou et al. 2006). Alachlor was dissolved in methanol to make a stock alachlor solution. Aliquots of this stock solution were used to contaminate reactors at tested final concentrations after evaporation to dryness of organic solvent by placing the required amount on a clean glass slide with subsequent dissolution in sterile river water in 2 L glass bottles connected to the reactors via a peristaltic pump. The bottles were closed and maintained in the dark to avoid photodegradation processes, on a rotary shaker. Alachlor and methanol were continuously added directly to the individual replicate reactors using a peristaltic pump from a fresh 2L bottle prepared every 15 days. Control reactors were operated that received river water alone. Biofilms were grown under treatment and control conditions in bioreactors for a period of 5 wks (from May 10, 2010 to June 15, 2010), at which time coupons were removed for immediate analysis (CLSM, microscopic, radioisotope, chlorophyll *a* and Biolog studies), frozen at  $-80^\circ\text{C}$  and stored for subsequent DNA extraction and molecular analyses.

### **2.2. Structural descriptors**

#### **Chlorophyll *a* analyses**

Biofilms strips ( $10 \text{ cm}^2$ ) were scraped using a sterile silicone rubber spatula to remove the biofilm, Chl *a* was extracted using 90 % boiling ethanol (Nusch 1980) and analysed fluorometrically using a Turner Designs Model 10-AU digital fluorometer (Turner Designs, Sunnyvale, CA) (Waiser and Robarts 1997).

#### **Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) and Image analysis**

Examination of all stained and control materials was carried out with an MRC 1024 confocal laser scanning microscope (formerly Bio-Rad, now Zeiss, Jena, Germany) attached to a Microphot SA microscope (Nikon,

Tokyo, Japan). Slides from each of the replicate reactors were cut into 1 cm<sup>2</sup> pieces and mounted in small Petri dishes by using Dow Corning #3140 acid-free silicone (WPI, Inc., Sarasota, FL.) and then stained and analysed as described in detail in Lawrence et al. (2004). Digital image analysis of the confocal laser scanning microscopy (CLSM) optical thin sections was used to determine such parameters as biofilm depth, bacterial cell area (biomass), exopolymer biomass, cyanobacterial biomass, and total photosynthetic biomass at various depths.

#### **Exopolymer analyses**

Lectins with fluorescein isothiocyanate or TRITC labeling were purchased from Sigma (St. Louis, MO.). Cy5 labeling was performed by using a commercial labeling kit according to the instructions (Research Organics, Cleveland, OH.). The lectins *Arachis hypogaea*, *Canavalia ensiformis*, *Glycine max*, *Triticum vulgare* and *Ulex europaeus* were used alone or in combination for *in situ* analyses of polymer composition as described by Neu et al. (2001). Image analyses and calculations of lectin binding volumes were carried out by using the equations of Neu et al. (2001).

#### **Diatom community Analyses**

Relative abundance of diatom species enumerated, were estimated. Diatom composition was estimated from an aliquot of 5 mL of the biofilm suspension homogenate, preserved in formalin solution (3 %) and stored in the dark until analysis at “Cemagref” (Bordeaux, France). Identification and counting of diatoms of 400 frustules were performed as described previously by Roubeix et al. (2011).

#### **Community DNA extraction and amplification, and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analyses**

For each treatment bioreactor, two frozen (-80°C) polycarbonate strips were aseptically cut (2 cm<sup>2</sup>) and transferred to a 50 mL polypropylene tube (Falcon, Becton Dickinson, Franklin Lanes, NJ.). Microbial cells from the frozen biofilm samples were removed from the polycarbonate strip with a sterile metal scraper, and total DNA was extracted using the Powersoil DNA isolation kit (Mo Bio Laboratories, Inc., Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer’s instructions with the following modifications. Briefly, the samples were put into the bead beater three times for 30 s at 5.5 m s<sup>-1</sup> and cooled for 10 min between each time beaten. Samples were cooled again before centrifugation.

The 16S rRNA genes were amplified by PCR using the universal Bacteria primers 341F-GC and 907R (Muyzer et al. 1997) to perform by DGGE as described by Lawrence et al. (2009) with slight modifications. PCR amplification was conducted in a 50 µL reaction volume containing 3.5 µL of DNA template, 2µL of each appropriate primer, 1.25 U Taq DNA polymerase (New England Biolabs Ipswich, MA.), 10x PCR buffer, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM dNTP and 600 µg mL<sup>-1</sup> BSA. A touchdown PCR program using the PTC-200 thermocycler (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, ON) consisted of an initial denaturation step of 94°C for 5 min, followed by 10 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 66°C (decreasing in each cycle by 1°C) for 45 s, and an elongation step of 72°C for 1 min. Following these steps, another 20 cycles of 95°C for 1 min, annealing at 56°C for 1 min, and elongation at 72°C for 1 min, with a final elongation step of 72°C for 10 min, were performed. The correctly-sized PCR product was verified by electrophoresis on agarose gels following a protocol described elsewhere (Lawrence et al. 2009).

After the specificity and size of the amplified products were checked on agarose gels, the PCR product was separated by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) using an Ingeny phorU2 system (Ingeny, Leiden, the Netherlands) as described in Lawrence et al. (2009). Aliquots (50 µL) of PCR product were mixed with 4 µL

of loading dye buffer and resolved on a 6 % (w/v) polyacrylamide gel in 1 x TAE buffer, using denaturing gradients from 44 to 60 % (100% denaturant contains 7 M urea and 40 % deionized formamide). Electrophoresis was carried out at 60V for 30 min, then 100 V for 18 h at 60°C. After electrophoresis, the gel was stained with SYBR Green I (1:10000 dilution; Molecular Probes, Eugene, OR, USA) for 15 min with gentle agitation and photographed using the AlphaImager 3300 gel documentation and image analysis system (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA.).

### **Community DNA extraction and amplification, and terminal fragment length polymorphism (T-RFLP) analyses**

For each treatment bioreactor, two frozen (-80°C) polycarbonate strips were sampled and aseptically cut into three pieces (3 cm<sup>2</sup>). Each piece (a total of 6 pieces by treatment bioreactor) was inserted into a 5 mL PowerWater® Bead tube (Mo Bio Laboratories, Inc., Carlsbad, CA, USA), and total DNA from each piece was separately extracted by using a Power Water DNA isolation kit (Mo Bio Laboratories, Inc., Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions.

The 16S rRNA genes were amplified by PCR and the bacterial community structure was studied by T-RFLP as described by Bruneel et al. (2006) with slight modifications. The fluorescent labelled primers FAM 8F (5'-6-carboxy-fluorescein-phosphoramidite-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') (Eurogentec, 295 Liège, Belgium) (Lane 1991) and HEX 1489R (5'-hexa-chloro-fluorescein-phosphoramidite- TAC CTT GTT ACG ACT TCA-3') (Invitrogen, Carlsbad, USA) (Marchesi et al. 1998) described as universal within the Bacteria domain, were used. Reaction mixture for PCR was performed in a 50 µL volume containing 5 µL of template DNA, 25 µL AmpliTaq Gold 360 Master Mix (Applied Biosystems) and 0.5 µL from each primer. Amplification was carried out using an Applied Biosystems thermocycler by using the following: a 5 min hot start at 95°C, followed by 35 cycles consisting of denature (45 s at 95°C), anneal (45 s at 55°C), and extension (1 min at 72°C) and a final extension at 72°C for 10 min. Restriction digestion was performed with HaeIII and HinfI. T-RFLP profiles were aligned by a web-based tool, T-Align (<http://inismor.ucd.ie/~talign/>) as previously described by Smith et al. (2005) with the confidence interval of 0.5.

### **2.3. Functional descriptors**

#### **Carbon Utilization Spectra**

Carbon utilization spectra were determined for biofilm subsamples from each replicate reactor (3 strips) using commercial Eco-plates (Biolog, Hayward, CA) as described previously (Lawrence et al. 2004, 2009).

#### **Radioisotope Analyses**

Biofilm strips (5 cm<sup>2</sup>) were scraped using a sterile silicone rubber spatula to remove and suspend the biofilm. Subsequently, incorporation of thymidine as a measure of bacterial production was realised using tritiated thymidine following the standard protocol of Robarts and Wicks (1989). All negative controls were killed with formaldehyde at 0.4 % final concentration.

### **2.4. Alachlor Analyses**

Water samples were collected (5 mL) to confirm the concentration of alachlor in the reactor influent (in the bottle) and effluent, and analysed by high performance liquid chromatography coupled tandem to mass spectrometry (HPLC-MS-MS, Thermo Fisher, model E-Quan TSQ Quantum ultra) with ionization electron spray source by a sample direct injection at "Laboratoire Départemental de l'Eau" (Toulouse, France) and equipped with a pre-concentration column (Thermo Fisher Hypersil GOLD C18, 12 µm particle size, 20 x 2.1

mm). The injection volume was 2 mL. Thealachlor separation was monitored using a Thermo Fisher Hypersil GOLD C18 (3  $\mu\text{m}$  particle size, 50 x 2.1 mm) column. The residual concentration ofalachchlor was evaluated every 15 days in both reactor influent and effluent.

## 2.5. Experimental Design and Statistical Analyses

The experimental design consisted of an untreated control (C0),alachchlor at 1 (A1) and 10 (A10)  $\mu\text{g L}^{-1}$  and methanol at 25 (M25)  $\mu\text{g L}^{-1}$  treatments. Each treatment had 3 identical replicate reactors randomly assigned to it on the reactor bench (replications). Furthermore, each analysis was done on subsamples of randomly selected biofilm coupons from among the 12 identical coupons in each replicate reactor. Confocal laser scanning microscopy imaging was done at 5 random locations at 5 positions on transects across the 1  $\text{cm}^2$  piece of the biofilm coupon. Subsampling for other analyses (thymidine incorporation and carbon utilization) was also carried out using randomly selected subsamples from among the 12 identical coupons in each replicate reactor.

The number of carbon sources utilized by the bacteria communities from untreated and treated-biofilms was calculated as the sum of the number of wells exhibiting absorbance greater than 0.25 OD (Foley et al. 2008). Analysis of variance (MiniTab, State College, PA) for the analyses of carbon utilization and the Mann Whitney test (SPSS software 13.0) for the analyses of thymidine incorporation and chlorophyll *a* were used to detect significant differences among sample means at  $p \leq 0.05$ .

DGGE gels were processed by generating a band, defined as Operational Taxonomic Units (OTUs) matching table as described in Lawrence et al. (2009). Peaks, defined as Terminal Restriction Fragments (T-RFs) were scored as present or absent from T-RFLP profiles. Peaks < 0.5 % of the total area were excluded from T-RFLP profiles analysis and the T-RFs that differed in size by 0.5 bp or less were considered to be identical. Baseline of 0.5% was defined in accordance with Osborne et al. (2006). The T-RFLP and DGGE binary data and diatom species enumeration data were exported and analysed by Principal Component Analysis (PCA) with R.2.2.1 software for windows using the ade4 package. Statistical analyses of PCA scores generated from the first two axes were run using an analysis of similarity (ANOSIM) via Past software 2.06 (Hammer et al. 2001) on Bray Curtis similarity matrices generated from binary data. This analysis generates a global R value between 0 (completely random pattern) and 1 (completely separated groups) (Clarke 1993). The statistical significance of the global R was considered at  $p < 0.05$  uncorrected.

## 3. Results

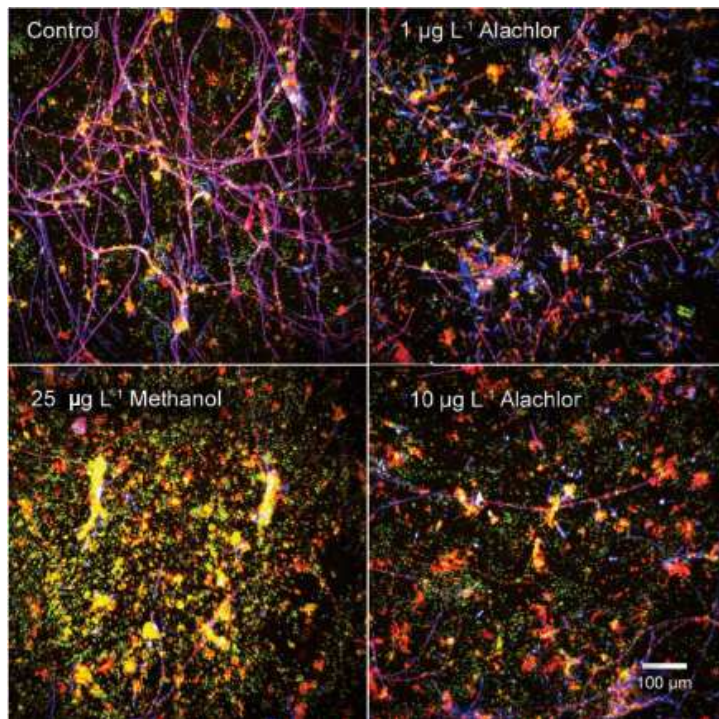
### 3.1 Alachlor concentrations

Alachchlor concentrations of reactor influents for both treatments at 1 and 10  $\mu\text{g L}^{-1}$  were of  $0.81 \pm 0.02$  and  $8.4 \pm 0.8 \mu\text{g L}^{-1}$ , respectively. The values ofalachchlor measured were close to the nominal concentrations for both tested treatment.

### 3.2 Effects ofalachchlor and methanol treatments on the structure and architecture of river biofilm

A visual comparison of the response of biofilm toalachchlor and methanol treatments is presented in Figure 1. Control biofilm had cyanobacteria as a major component. In contrast the cyanobacteria appeared to be fewer in the treated-biofilms in the presence of methanol at 25  $\mu\text{g L}^{-1}$  oralachchlor at 10  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Methanol treated-biofilm was dominated by bacteria with a

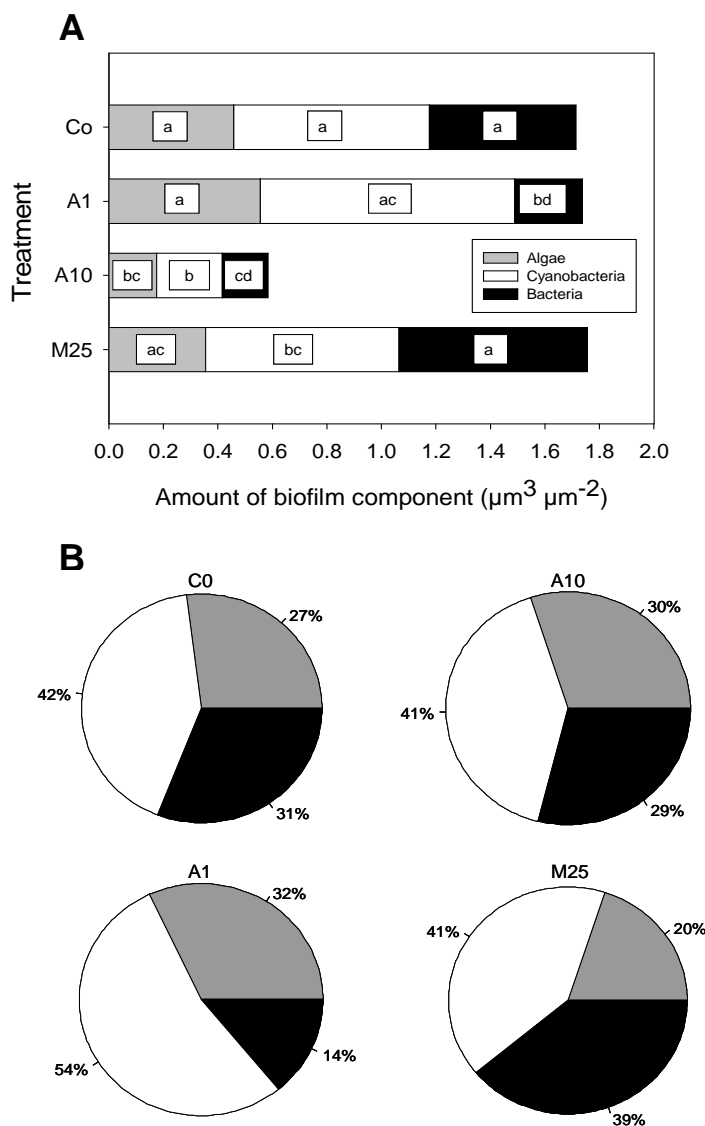
shift into a colony forming growth habit whereas biofilms in the presence of  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  of alachlor exhibited fewer bacteria with a more diffuse distribution. No difference was apparent for the algal component relative to control and between each treatment.



**Figure 1:** Representative CLSM photomicrographs of control, alachlor-treated at 1 or  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ , and methanol-treated at  $25 \mu\text{g L}^{-1}$  river biofilm communities. The color wheel shows bacteria (green), cyanobacteria (pink), and algae (blue).

Quantitative comparisons are summarised in Figure 2A. The addition of alachlor  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  (A1) only resulted in a reduction of the bacterial biomass ( $p < 0.05$ ). The treated-biofilms with alachlor  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  (A10) exhibited significantly lower amounts of bacterial, algal and cyanobacterial biomass compared to control biofilms, and the other treatments ( $p < 0.05$ ) (A1 and M25). No significant effect of methanol was observed compared to control ( $p > 0.05$ ), except a marginal change in the cyanobacterial biomass ( $p = 0.013$ ). The proportional analyses presented in Figure 2B illustrate the general shift in heterotrophic and phototrophic communities as a consequence of alachlor and methanol treatment. Untreated-biofilms exhibited 42 % cyanobacteria with the remainder equally divided between algal and bacterial biomass (27 and 31 %, respectively). The addition of  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  of alachlor resulted in a reduction of bacterial biomass to 14 % with a concomitant increase in cyanobacteria (54 %). The presence of methanol at  $25 \mu\text{g L}^{-1}$  resulted in a slight increase of the bacterial biomass percentage (39 %). Despite the trend of increased of bacterial biomass in the  $25 \mu\text{g L}^{-1}$

methanol treated-biofilms observed in the visual comparison (Fig.1) relative to other conditions (treated and untreated), this difference was not significant in terms of quantitative comparisons (Fig.2A).



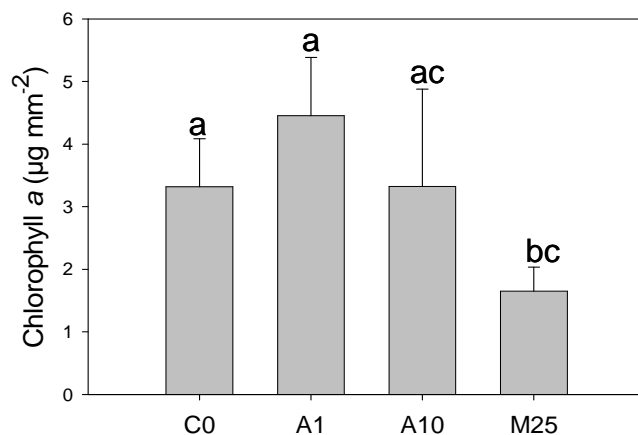
**Figure 2:** Results of image of confocal laser micrographs illustrating the effect ofalachlor and methanol on the amount of algae, cyanobacteria, and bacteria in the river biofilm communities, by treatment: control (C0),alachlor 1 µg L<sup>-1</sup> (A1),alachlor 10 µg L<sup>-1</sup> (A10) and methanol 25 µg L<sup>-1</sup> (M25). (A) Parameters indicated by different letters are significantly different ( $p \leq 0.05$ ). (B) Proportional illustration on the relative abundances of algae, cyanobacteria, and bacteria.

The amount of chlorophyll *a* did not show a difference betweenalachlor treated-biofilms and control biofilms (Figure 3). Values ranged from 3.32 to 4.45 µg mm<sup>-2</sup> of chlorophyll *a* (10 µg L<sup>-1</sup>,  $p = 0.513$ ; 1 µg L<sup>-1</sup>,  $p = 0.127$ ). The methanol treated-biofilms had a marginally lower



amount of chlorophyll *a* relative to control biofilm ( $1.65 \mu\text{g mm}^{-2}$ ,  $p = 0.05$ ) but exhibited similar values relative to treated-biofilms atalachlor  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  ( $p = 0.127$ ).

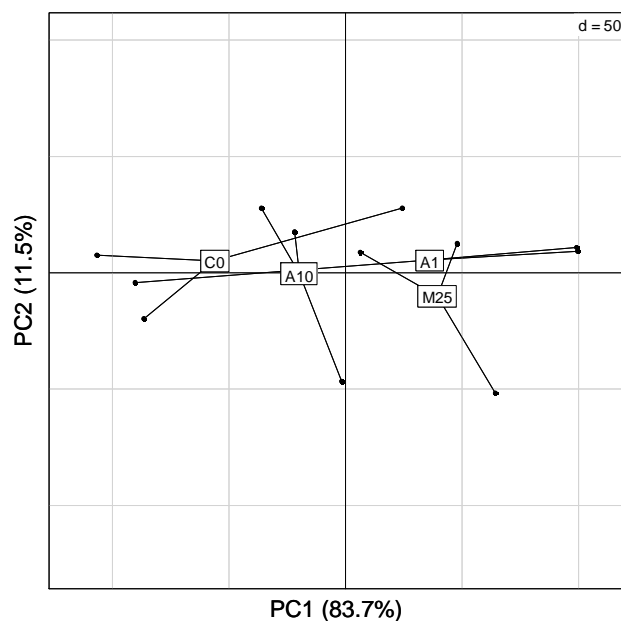
The biofilm thickness, grouped by treatment type were as follows: control,  $61 \pm 31 \mu\text{m}$ ; at  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  ofalachlor,  $51 \pm 24 \mu\text{m}$ ; at  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  ofalachlor,  $44 \pm 25 \mu\text{m}$ ; and at  $25 \mu\text{g L}^{-1}$  methanol,  $60 \pm 30 \mu\text{m}$ . The biofilm thickness at  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ alachlor was significantly different from the control ( $p = 0.013$ ) but not from the other treatments ( $p > 0.05$ ).



**Figure 3:** Average  $\pm$  SD ( $n = 3$ ) value plots of chlorophyll *a* for river biofilm communities according to the different experimental conditions: control (C0),alachlor  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  (A1),alachlor  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  (A10) and methanol  $25 \mu\text{g L}^{-1}$  (M25). Parameters indicated by different letters are significantly different at  $p \leq 0.05$ .

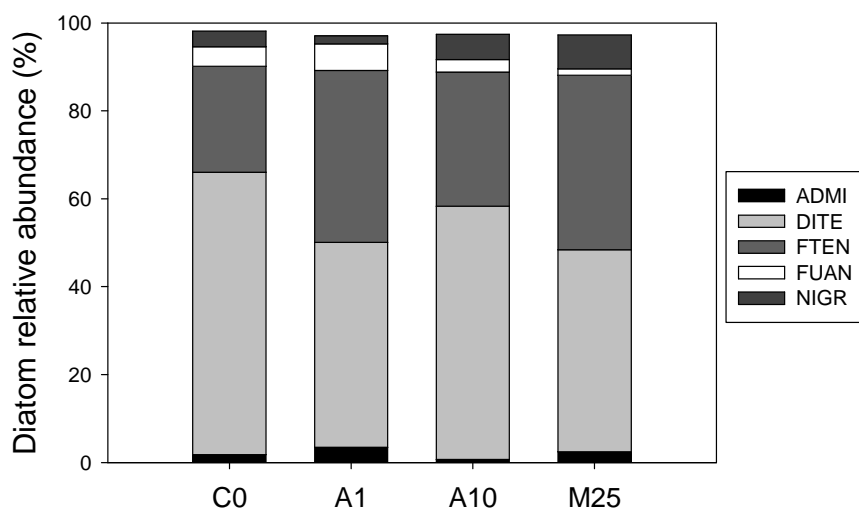
### 3.3. Effects ofalachlor and methanol treatments on the diatom community composition

A principal component analysis (PCA) was performed based on total diatom species enumeration data for untreated andalachlor and methanol treated-biofilms (Figure 4). The two axes accounted for 83.7 and 11.5 % of the total variance. This analysis is strengthened by similar trends observed with PCAs built with the first and third axes. The first three axes accounted for respectively 99.1 % of the variation. Methanol andalachlor treatments did induce no significant changes in diatom composition (Global ANOSIM  $R = 0.1636$  and significance level  $p = 0.16$ ).



**Figure 4:** Effects of treatments on diatomic community structure assessed by Principal Component Analysis (PCA) based on the diatom species enumerated data. Experimental conditions : control (C0), alachlor  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  (A1), alachlor  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  (A10) and methanol  $25 \mu\text{g L}^{-1}$  (M25).

The average species richness of treated and untreated-biofilms were  $9.8 \pm 0.4$  species. No significant difference in species richness was observed between experimental conditions ( $p > 0.05$ ). Among a total of 21 diatom species identified, in each experimental condition, 5 dominant species had a relative abundance  $> 2\%$  and were considered as characteristic of each developed diatom community. Dominant diatom species composition and proportions did not differ significantly between treated or untreated-biofilms with the presence of *Achnantheidium minutissimum* (Kütz.) Czarnecki (ADMI) (2.1 %), *Diatoma tenuis* Agardh (DITE) (53.6 %), *Fragilaria tenera* (W.Smith) Lange-Bertalot (FTEN) (33.4 %), *Fragilaria* (Ulnaria) *ulna Sippen angustissima* (Grun.) Lange-Bertalot (FUAN) (3.7 %), and *Nitzschia gracilis* Hantzsch (NIGR) (4.7 %) ( $p > 0.05$ ) (Figure 5). No significant abnormal frustule morphologies were observed in response of alachlor or methanol treatments (data not shown).

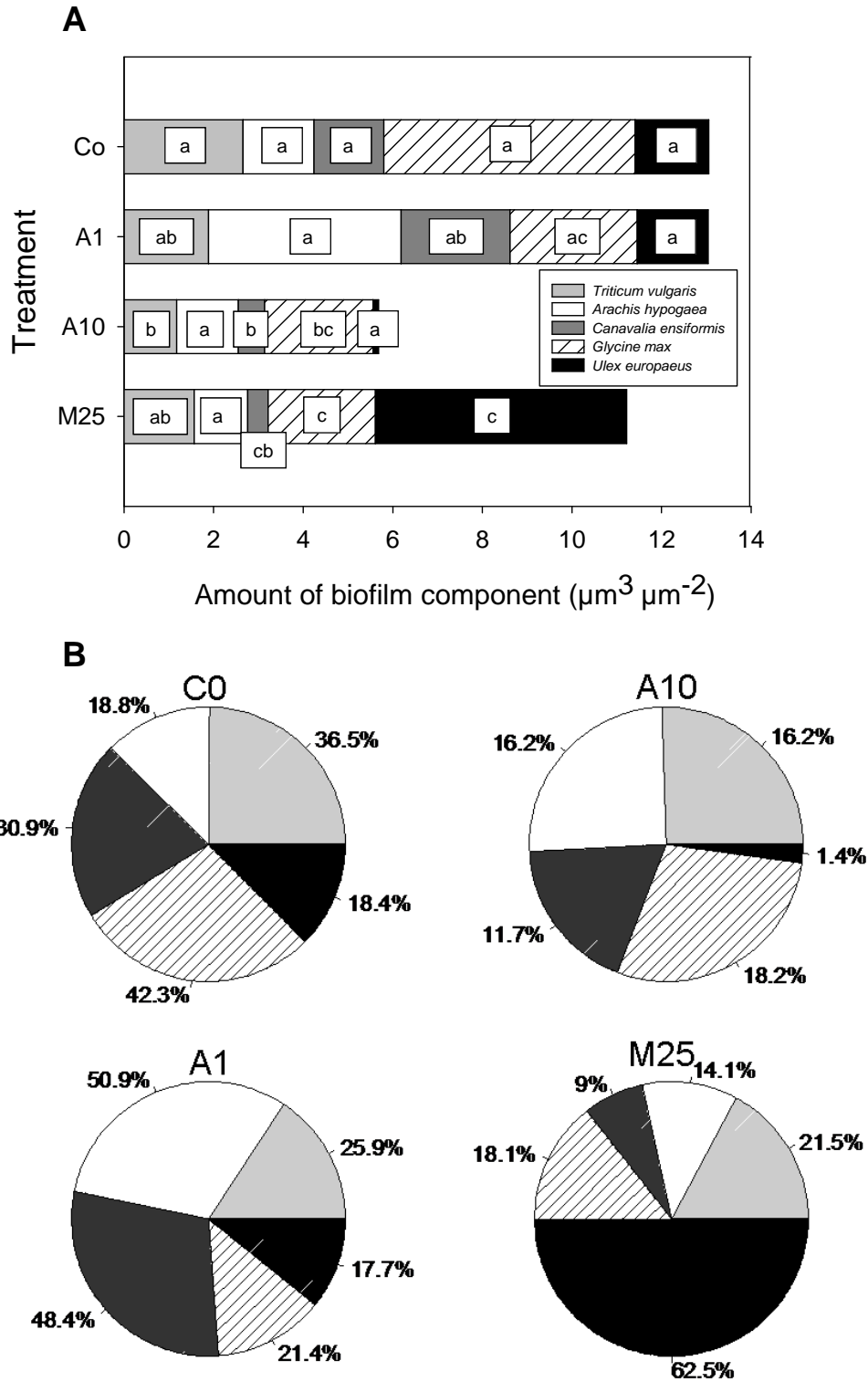


**Figure 5:** Impact of alachlor and methanol on the relative abundance (%) (mean value,  $n = 3$ ) of major diatom species ( $> 2\%$ ) from each diatom communities, by treatment : control (C0), alachlor  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  (A1), alachlor  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  (A10) and methanol  $25 \mu\text{g L}^{-1}$  (M25).

ADMI: *Achnantheidium minutissimum* (Kütz.) Czarnecki, DITE: *Diatoma tenuis* Agardh, FTEN: *Fragilaria tenera* (W.Smith) Lange-Bertalot, FUAN: *Fragilaria (Ulnaria) ulna Sippen angustissima* (Grun.) Lange-Bertalot, and NIGR: *Nitzschia gracilis* Hantzsch.

### 3.4. Effects of alachlor and methanol treatments on the composition and structure of bacterial community

The application of *in situ* lectin-binding analyses was used to examine changes in exopolymer (EPS) composition in response to the addition of alachlor or methanol during river biofilm development (Figure 6). No significant difference was observed for the binding pattern of the five lectin panel between untreated-biofilms and treated-biofilms with  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  of alachlor ( $p > 0.05$ ). The presence of alachlor  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  resulted in a significant reduction of the amount of binding of four-lectins (*T. vulgaris*, *C. ensiformis*, *G. max* and *U. europaeus*) ( $p < 0.05$ ). These changes result in different proportions of lectin binding relative abundance compared to control biofilms as illustrated by Figure 6B. The addition of methanol resulted in a shift to *Ulex europaeus*-dominated biofilms accompanied by a reduction of *C. ensiformis* and *G. max*, although untreated-biofilms were dominated by lectin-binding with *Glycine max*. Lectin-binding of *Arachis hypogaea* did not change regardless treatment.



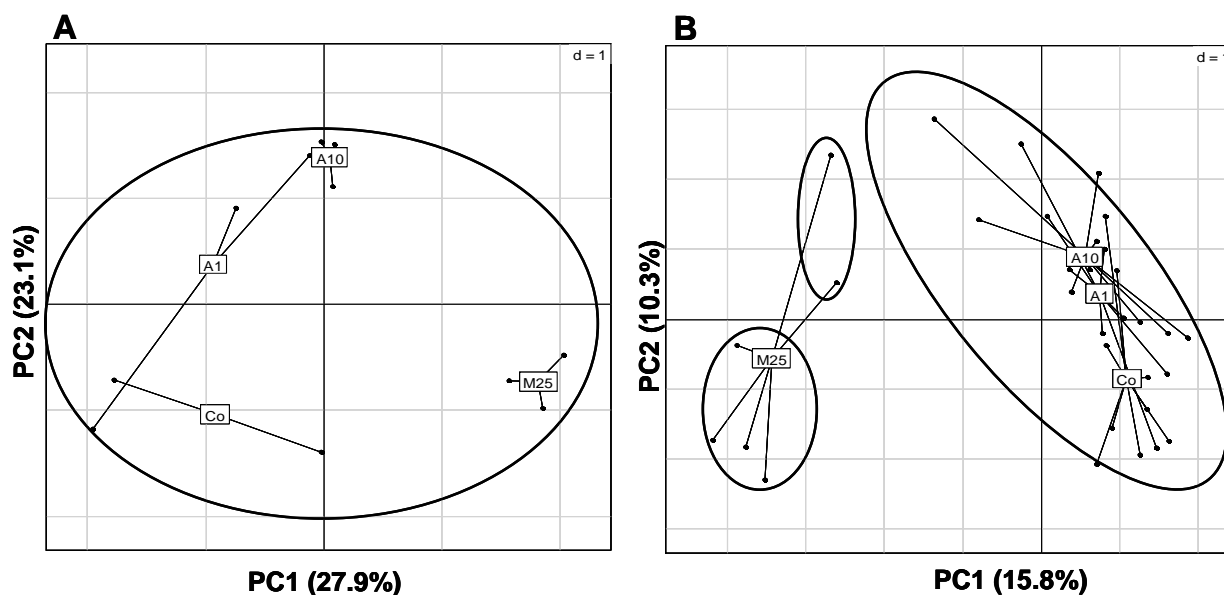
**Figure 6:** Results of image of confocal laser micrographs illustrating the effect of alachlor and methanol on river biofilm lectin-binding, determined by *in situ* lectin binding analyses, by treatment: control (C0), alachlor 1 µg L<sup>-1</sup> (A1), alachlor 10 µg L<sup>-1</sup> (A10) and methanol 25 µg L<sup>-1</sup> (M25). (A) Parameters indicated by different letters are significantly different ( $p \leq 0.05$ ). (B) Proportional illustration on the relative abundances of lectin-binding types.

The response of bacterial communities to the addition of methanol or alachlor was assessed by both DGGE and T-RFLP fingerprinting molecular methods.

DGGE banding patterns revealed a total of 38 OTUs. The addition of alachlor at both concentrations did not affect the number of OTUs ( $p < 0.05$ ) which exhibited an average number of  $21.3 \pm 2$ . For methanol treated-communities, the average number of OTUs per sample was significantly higher ( $28.3 \pm 1.5$ ) compared to the control and the other treatments ( $p > 0.05$ ). T-RFLP profiles revealed a total of 91 T-RFs irrespective the restriction enzyme used. No effect of methanol and alachlor treatments was observed on the number of T-RFs ( $p > 0.05$ ) regardless of restriction enzyme used.

Principal component analyses (PCA) was performed on the OTUs or T-RFs binary data for each fingerprinting molecular analysis to evaluate the change in bacterial communities in response to alachlor and methanol exposure (Figure 7). The two axes accounted for 27.9 and 23.1 % of the total variance and 15.8 and 10.3 % for the DGGE and T-RFLP analysis, respectively. These analyses were strengthened by the similar trends observed with PCAs built with the first and third axes (data not shown). The first three axes accounted for respectively 69.9 and 32.8 % of the variation of DGGE and T-RFLP.

Both PCAs revealed no significant difference between the bacterial community structures of control and treated-biofilms (for DGGE analysis: Global ANOSIM  $R = 0.3735$  and significance level  $p = 0.0072$ ; for T-RFLP analysis: Global ANOSIM  $R = 0.3374$  and significance level  $p = 0.0001$ ). Based on sample clustering corresponding to a similarity of 60 %, for DGGE data, the samples were regrouped in a cluster composed of both bacterial communities from untreated and treated-biofilms, whereas two distinct clusters were observed for the PCA of T-RFLP data, methanol treated biofilms versus untreated and alachlor treated-biofilms. Both PCAs showed similar patterns. Despite the absence of significant difference and high similarity between control and treated-communities, the methanol treated-bacterial communities appeared different from control and alachlor treated-communities.



**Figure 7:** Effects of treatments on bacterial community structure assessed by Principal Component Analysis (PCA) based on the DGGE data (A) and the T-RFLP data (B). Circles correspond to a similarity of 60 %. Squares represent the gravity center of the plots for each group. Experimental conditions : control (C0),alachlor 1  $\mu\text{g L}^{-1}$  (A1),alachlor 10  $\mu\text{g L}^{-1}$  (A10) and methanol 25  $\mu\text{g L}^{-1}$  (M25).

### 3.5. Effects ofalachlor and methanol treatments on physiological states of bacterial community

Physiological states of untreated and treated-biofilm communities were assessed by the determination of their production as measured by their thymidine incorporation rates and their ability to utilize different carbon sources.

The biofilms treated withalachlor 1  $\mu\text{g L}^{-1}$  did not show any change in their thymidine incorporation rate relative to control ( $1.18 \pm 0.23$  and  $1.07 \pm 0.23$   $\text{mg C m}^{-2} \text{d}^{-1}$  respectively,  $p = 0.513$ ). Methanol treatment marginally stimulated the thymidine incorporation rate which was  $1.62 \pm 0.02$   $\text{mg C m}^{-2} \text{d}^{-1}$  ( $p = 0.05$ ). The incorporation rate for thealachchlor treatment at 10  $\mu\text{g L}^{-1}$  was lower compared to control biofilms and all other treatments ( $0.65 \pm 0.15$   $\text{mg C m}^{-2} \text{d}^{-1}$ ,  $p = 0.05$ ).

Following 7 days of incubation, the untreated-biofilm as well as treated-biofilms used a similar average number of carbon sources of  $27.5 \pm 0.5$  (ANOVA,  $p > 0.05$ ). Assessment of carbon utilization spectra revealed no difference betweenalachchlor treated-biofilms (1 and 10  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) relative to untreated (data not shown) (ANOVA,  $p > 0.05$ ). For the methanol treated-biofilm, the capacity to use the  $\beta$ -methyl-D-glucoside (carbohydrate) compounds was significantly different relative to control (ANOVA,  $p = 0.036$ ).

The addition of alachlor or methanol did not induced significant change in utilization capacities of the carbon source guilds relative to control biofilms ( $p > 0.05$ ) and all other treatments (Mann Whitney,  $p > 0.05$ ). In addition, no carbon source type was preferentially used by either control or treated-biofilms.

#### **4. Discussion**

The primary objective of our study was to assess the response of developing river biofilm communities to chronic alachlor exposure (5 weeks) at realistic levels of environmental contamination (1 and 10  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) (Sanchez-Camazano, 2005). To limit the variations of environmental parameters (light, hydrodynamic...) which may interfere with the response of biofilm to herbicide exposure (e.g. Guasch et al. 1997; Guasch and Sabater 1998), ecotoxicological experiments have been performed in rotating annular bioreactors. These bioreactors have been suggested as a powerful tool to study the effects of environmental changes on river biofilm development under stable and uniform environmental conditions (Chénier et al. 2003; Lawrence et al. 2004). Inoculation by river water was continuous to mimic the natural mechanisms of microbial emigration (Stevenson and Peterson 1991). The South Saskatchewan River is known to exhibit minor pesticide pollution (0.153 and 0.974  $\mu\text{g L}^{-1}$  of cumulative herbicide concentrations to May and June 21, 2010, Environment Canada 2010). Alachlor is not registered for use in Canada since 1985 and thus is not supposed to occur in South Saskatchewan River. Nevertheless, metolachlor, a chloroacetanilide compound having similar structure and toxicological mechanisms to alachlor, was detected at average concentrations of 23.7  $\text{ng L}^{-1}$ , in water samples from South Saskatchewan River (including south of Saskatoon and near the confluence of the Red Deer River) during our bioreactor experiments (Environment Canada 2010). It could induce co-tolerance processes to alachlor during our experiments assigned to PICT (pollution-induced community tolerance) concept as described by previous studies, driving to a selection of tolerant species (Pesce et al. 2010).

The choice of the experimental period length (5 weeks) was based on previous experiments to produce biofilms amenable to all types of analyses (Lawrence et al. 2000). The exposure was performed on the early stages of biofilm development during which the biofilm communities are mainly influenced by allogenic factors, leading to strong exchanges with the water column (Paule et al. 2009) and thus are likely more sensitive to chemicals.

Alachlor is an organic material, and may be used by organisms as a nutrient source. Some studies have shown that alachlor may generate changes in microbial community composition resulting in selection of bacteria able to metabolize the herbicide (Stamper and Tuovinen 1998). Knapp et al. (2003) hypothesised that the algal compartment could also have a capacity

to degrade alachlor in freshwater environments. These mechanisms could influence the fate of alachlor in the bioreactor.

#### **4.1. Community-level response to herbicide exposure**

The addition of alachlor at a concentration of  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  induced a reduction of bacterial biomass relative to control. All other structural or functional descriptors didn't seem to be significantly affected at this concentration. In contrast, the  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  alachlor concentration had a stronger influence on the development of river biofilms. The amount of phototrophic, heterotrophic, and specific lectin-binding biomass as well as bacterial production were lower relative to control and  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  alachlor. Despite this biomass reduction, relative abundance of algae, bacteria and cyanobacteria exhibited proportions similar to the untreated-biofilms. However, the treatment induced different proportions in the lectin-binding suggesting changes in community composition. This marked concentration dependent effect is in agreement with previous works. Spawn et al. (1997) stated that alachlor exposure for 21 days led to a reduction of the algal biomass as measured by chlorophyll *a* up to  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  and changes in algal community structure and density up to  $30 \mu\text{g L}^{-1}$ . Foley et al. (2008) underlined that acetochlor exposure (96 h), which has similar toxicological mechanisms to alachlor, did not result in significant impact on bacterial community structure analysed by DGGE at environmental concentrations ( $1$  and  $5 \mu\text{g L}^{-1}$ ).

Changes in lectin-binding patterns are consistent with changes observed in the amounts of biofilm component biomass, and can indicate changes in bacterial community structure and loss or gain of functional groups (Neu et al. 2005). In the current study, despite changes in the lectin-binding pattern at  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  alachlor, no significant impact was observed on bacterial structure (fingerprinting methods) and function (carbon utilization spectra), except for overall metabolic potential as measured by the bacterial production rate. On the other hand, changes in exopolymer composition in response to  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  alachlor contamination, could lead to protection of bacteria through sorption of the pollutant, thus it retarded the penetration within biofilms as supposed by Lawrence et al. (2006) in response to heavy metal contamination.

Alachlor may initially directly affect bacterial development and by a cascade of reactions affect algal development at only higher concentrations (i.e.,  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ ). In fact, close relationships are well known between the bacterial and algal compartments (Haack and McFeters 1982), or damages independently the both bacterial and algal developments. In this case, algae could exhibit a higher tolerance level than bacteria. Vallotton et al. (2008) have observed that exclusive dark light exposure during metolachlor contamination has no effect



on algal reproduction and therefore essential processes for cell division occur already prior to the dark phase.

In our study the reactors were continuously inoculated by river water, thus communities were in close interaction with neighbouring micro-organisms via immigration and emigration mechanisms (Stevenson and Peterson 1991). Arrival of new micro-organisms not previously exposed to alachlor may settle and / or replace species already installed and probably affected by alachlor. As a consequence, the community response to alachlor exposure may be masked or mitigated.

Ecologically, this reduction of the amount of algal and bacterial biomasses could impair the quality of biofilm as a food resource for the aquatic grazers. Furthermore, we observed a reduction and modification of the exopolymer as indicated by the lectin binding assays, the EPS is well known as a reservoir and buffer barrier (Congestri et al. 2006). Changes of the EPS composition may alter the efficiency of biofilm to absorb various molecules such as herbicides (Lawrence et al. 2001) or energetic carbon sources (Freeman and Lock 1995). In addition, these changes may change the community contribution to mineralization and element recycling and thus its role in the processes of water quality renewal, and increase its sensitivity to perturbations.

Over all our results indicate that primarily alachlor appeared to slow the growth of biofilms and preferentially inhibited the bacteria regardless of concentration. However, there was not a significant impact on the trajectory of community development in terms of composition and function as assessed by carbon utilization spectra and molecular analyses. Chloroacetanilide herbicides are known to inhibit the elongation of very-long-chain fatty acids found in membrane lipids of algae (Böger et al. 2000), and thus damage cell normal development, and inhibit cell division.

Our results will lead us to wonder about the real impact of alachlor exposure on the functioning of ecosystem at environmentally realistic concentrations.

#### **4.2. Pertinence to use river biofilms associated to multimetric approaches as bio-indicators**

A multimetric approach was applied in these studies including structural, functional, physiological, microscopic and molecular analysis to gain a better understanding of the consequence of herbicide contamination on the colonization and development of river biofilm communities. This type of approach is well known to be a powerful tool in the various investigations on river biofilm communities (Foley et al. 2008; Montuelle et al. 2010). The ability of each method to assess the response of river biofilm to contaminants and their

experimental limits has well been established in the literature (e.g. Lawrence and Neu 2003; Foley et al. 2008). Chlorophyll *a* is one of parameters most used to investigate the response of algal biomass to pesticide exposure (e.g. Spawn et al. 1997). For our work, the microscopic technique as a measure of biomass seems to be the possibly most sensitive for low biomass amounts. Noack et al. (2003) preferentially used chlorophyll *a* as endpoint rather than microscopic to assess the effects of metazachlor on river biofilm, because of potential bias associated with the presence of biofilm tri-dimensional structure.

The results obtained by DGGE data were in accordance with those obtained by T-RFLP data. As observed for numerous studies, T-RFLP method provided a greater sensitivity and discrimination between samples than DGGE method (Okubo and Sugiyama 2009).

Our results indicated no impact of alachlor on functional activity, as measured by carbon utilization spectra. Some works have reported a high variability between replicates, which prevents the determination of significant effects of treatment (Baath et al. 1998). Research progress will require application of additional functional descriptors, including the use of newer molecular tools such as real time PCR to determine the expression of target genes coding for enzymes implicated in various river biofilm functions (e.g., denitrification, Chénier et al. 2003) or metatranscriptomic analyses (Yergeau et al. 2010).

Diatoms often constitute a major component of the algal communities of river biofilms (Blinn et al. 1980), and are used to assess water quality in terms of organic and nutrient pollution by a variety of biotic indices (Coste et al. 2009). Thus, we decided to observe only diatom species in our river biofilm samples. Moreover, recent studies have provided encouraging results suggesting that diatoms could be a pertinent tool in herbicide risk assessment (Roubeix et al. 2010; Rimet and Bouchez 2011). In our study, diatom species observed are benthic. The two most abundant diatoms, *D. tenuis* (DITE) and *F. tenera* (FTEN) both exhibit colonial life-forms and are known to be a high-profile guild. Rimet and Bouchez (2011) observed that these high-profile guilds tend to decrease as nutrient and organic loads increase and recorded a reduction in their abundance in pesticide-contaminated mesocosms, which is not coherent with our results. This leads us to wonder about the pertinence to use diatoms as bio-indicators of pesticide pollution. *A. minutissimum* (ADMI), *F. (Ulnaria) ulna Sippen angustissima* and *N. gracilis* are pioneer and motile life-forms exhibiting a tolerance to pesticide contamination (Debenest et al. 2010). Characteristics of these diatoms could explain the absence of diatom communities from treated-biofilms to alachlor. Responses of overall microbial communities to herbicides are well known to be influenced by environmental factors (e.g. Guasch et al. 1997). Operating conditions of bioreactors as opposed to natural conditions of South

Saskatchewan River could be a selection pressure stronger for micro-organisms than alachlor contamination.

River biofilms are largely used as bio-indicators of organic pollution, and various studies investigated on river biofilms as bio-indicators of pesticide contamination (Montuelle et al. 2011). As underlined by Montuelle et al. (2010), several points have to be identified to use river biofilms as a power tool of bio-indicators, (i) the choice of metric, more or less sensitive, and take into account different levels (structure, diversity, functional...), (ii) the choice of microcosm and operating conditions, which could drive the response of biofilm and (iii) exposure time and herbicide toxicological mechanisms. Our work may provide further data about capacity of river biofilm to be used as bio-indicators.

#### **4.2. Example of possible interferences between an herbicide and organic solvent in ecotoxicological experiments**

Methanol at  $25 \mu\text{g L}^{-1}$  (0.025 % v/v) chronic exposure (5 weeks) aimed to investigate (i) the potential toxicity of an organic solvent on bacterial and algal communities from river biofilms and (ii) the consequences of its use during ecotoxicological experiments. To our knowledge, no report concerning the potential toxicity of methanol has investigated using aquatic communities integrating both bacterial and algal compartments.

Algal compartment in methanol treated-biofilms exhibited slight changes compared to control. The addition of methanol induced negative impact on the chlorophyll *a* values and the amount of cyanobacterial biomass. No effect was observed on diatom communities in contrast to a review by Walsh and Merrill (1984), which underlined that freshwater green algae and blue-green algae were generally the most tolerant and the diatoms the least tolerant to solvent exposure. In contrast, the bacterial compartment responded positively to the presence of methanol. This may be due to a reduction of competition from phototrophic micro-organisms following a negative impact of methanol. The South Saskatchewan River is carbon limited, and as a consequence, it has typically been highly responsive to additions of potential carbon sources. In opposition, organic solvents have also been shown to cause progressive damage to the cell walls of bacteria, reducing their long-term operational stability as biocatalyst (Vermue et al. 1993). The exopolymer composition as determined by a four-lectin panel indicated a shift to the predominance of *Ulex europaea* binding. However, this was associated with no significant change in bacterial community structure and stimulation of bacterial production. These changes can reflect selection of specific bacterial functional groups (Neu et al. 2005), although we observed little impact on carbon source spectra, with an exception for a source of carbohydrates.

Similar to the effects of alachlor exposure, the changes caused by the methanol, may lead to changes of quality of biofilm as food resource for aquatic grazers and absorption of carbon source and contaminant.

Our results showed a divergence of microbial communities depending upon whether they were exposed to alachlor or methanol treatments. The methanol exposure resulted in a stronger trend to alter bacterial structure and exopolymer composition. This trend was associated with a modification of the trajectory of ecological succession and stimulated bacterial activity, although the alachlor preferentially affects the growth both algal and bacterial biomasses. Nevertheless, some endpoints including cyanobacterial biomass exhibited a reduction regardless of treatment.

## **5. Conclusion**

In summary, our results indicated that effects of alachlor on river biofilm are concentration dependent and appear limited at realistic environmental concentrations. At  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  of alachlor, only the bacterial biomass was perturbed. At  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ , alachlor inhibited phototrophic, heterotrophic growth and quantity of EPS without apparently modifying the trajectory of ecological succession. This study confirmed the necessity in herbicide risk assessment to integrate the community-level, associated with numerous structural and functional descriptors, the history of communities, its state of development, and the action mode of chemical. Future research could provide a better knowledge and standardization of the use of biofilms as bio-indicators (Pesce et al. 2010).

Our work also establishes the potential toxic effects of organic solvents on river biofilm in ecotoxicological experiments and its potential antagonist effects against chemical effect. Finally, it is important of minimize the effect of methanol in the ecotoxicological experiments by using the drying technique is a good approach.

Pesticides are also frequently applied in conjunction with nutrient-rich fertilizers. More research on the interactions between nutrient loadings from fertilizers and toxicity of various pesticides are necessary.

## **Acknowledgements**

This work was funded by a grant for foreign exchange (ATUPS) from the University Paul Sabatier. We are grateful to Environment Canada. We thank S. Karama for assistance with the T-RFLP method and J. Roy for assistance with the DGGE method. We also thank V. Tumber for chlorophyll *a* and bacterial production analyses.

## References

- Baath, E., Diaz-Ravina, M., Frostegard, A., Campbell, C.D., 1998. Effect of metal-rich sludge amendments on the soil microbial community. *Appl. Environ. Microb.* 64, 238–245.
- Bahena, C.L., Martínez, S.S., 2006. Photodegradation of chlorbromuron, atrazine, and alachlor in aqueous systems under solar irradiation. *Int. J. Photoenergy* (Article number 81808), 1–6.
- Battaglin, W., Fairchild, J., 2002. Potential toxicity of pesticides measured in midwestern streams to aquatic organisms. *Wat. Sci. Technol.* 45, 95–103.
- Battin, T.J., Kaplan, L.A., Newbold, J.D., Hansen, C.M.E., 2003. Contributions of microbial biofilms to ecosystem processes in stream mesocosms. *Nature* 426, 439–442.
- Bérard, A., 1996. Effect of organic four solvents on natural phytoplankton assemblages: consequences for ecotoxicological experiments on herbicides. *B. Environ. Contam. Tox.* 57, 183–190.
- Blinn, D.W., Fredericksen, A., Korte, V., 1980. Colonization rates and community structure of diatoms on three different rock substrata in a lotic system. *Eur. J. Phycol.* 15, 303–310.
- Böger, P., Matthes, B., SchmalfuB, J., 2000. Towards the primary target of chloroacetamides - new findings pave the way. *Pest Manag. Sci.* 56, 497–508.
- Bonnet, J.-L., Bonnemoy, F., Dusser, M., Bohatier, J., 2007. Assessment of the potential toxicity of herbicides and their degradation products to nontarget cells using two microorganisms, the bacteria *Vibrio fischeri* and the ciliate *Tetrahymena pyriformis*. Wiley Periodicals, Inc. *Environ. Toxicol.* 22, 78–91.
- Bruneel, O., Duran, R., Casiot, C., Elbaz-Poulichet, F., Personné, J.-C., 2006. Diversity of microorganisms in Fe-As-rich acid mine drainage waters of Carnoulès, France. *Appl. Environ. Microb.* 72, 551–556.
- Carder, J.P., Hoagland, K.D., 1998. Combined effects of alachlor and atrazine on benthic algal communities in artificial streams. *Environ. Toxicol. Chem.* 17, 1415–1420.
- Chénier, M.R., Beaumier, D., Roy, R., Driscoll, B.T., Lawrence, J.R., Greer, C.W., 2003. Impact of seasonal variations and nutrient inputs on the nitrogen cycling and degradation of hexadecane by replicated river biofilms. *Appl. Environ. Microb.* 69, 5170–5177.
- Chesters, G., Simsiman, G.V., Levy, J., Alhajjar, B.J., Fathulla, R.N., Harkin, J.M., 1989. Environmental fate of alachlor and metolachlor. *Rev. Environ. Contam. T.* 110, 1–74.
- Cho, C-W., Thuy Pham, T-P., Kim, S., Kim, Y-R., Jeon, Y-C., Yun, Y-S., 2009. Toxicity assessment of common organic solvents using a biosensor based on algal photosynthetic activity measurement. *J. Appl. Phycol.* 21, 683–689.
- Clarke, K.R., 1993. Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. *Australian J. Ecol.* 18, 117–143.
- Congestri, R., Di Pippo, F., De Philippis, R., Buttino, I., Paradossi, G., Albertano, P., 2006. Seasonal succession of phototrophic biofilms in an Italian wastewater treatment plant: biovolume, spatial structure and exopolysaccharides. *Aquat. Microb. Ecol.* 45, 301–312.
- Coste, M., Boutry, S., Tison-Rosebery, J., Delmas, F., 2009. Improvements of the Biological Diatom Index (BDI): description and efficiency of the new version (BDI-2006). *Ecol. Indicators* 9, 621–650.
- Debenest, T., Silvestre, J., Coste, M., Pinelli, E., 2010. Effects of pesticides on freshwater diatoms. *Rev. Environ. Contam. T.* 203, 87–103.
- Dorigo, U., Bourrain, X., Bérard, A., Leboulanger, C., 2004. Seasonal changes in the sensitivity of river microalgae to atrazine and isoproturon along a contamination gradient. *Sci. Total Environ.* 318, 101–114.
- Dorigo, U., Bérard, A., Rimet, F., Bouchez, A., Montuelle, B., 2010. *In situ* assessment of periphyton recovery in a river contaminated by pesticides. *Aquat. Toxicol.* 98, 396–406.
- El Jay, A., 1996a. Effects of organic solvents and solvent-atrazine interactions on two algae, *Chlorella vulgaris* and *Selenastrum capricornutum*. *Arch. Environ. Con* various studies investigate on river biofilm as bio-indicators of pesticide contamination. *Tox.* 31, 84–90.
- El Jay, A., 1996b. Toxic effects of organic solvents on the growth of *Chlorella vulgaris* and *Selenastrum capricornutum*. *B. Environ. Contam. Tox.* 57, 191–198.
- Environment Canada, 2010. Prairie and Northern Water Quality Monitoring.
- Fairchild, J.F., Ruessler, D.S., Haverland, P.S., Carlson, A.R., 1997. Comparative sensitivity of *Selenastrum capricornutum* and *Lemna minor* to sixteen herbicides. *Arch. Environ. Cont. Tox.* 32, 353–357.
- Feminella, J.W., Hawkins, C.P., 1995. Interactions between stream herbivores and periphyton: a quantitative analysis of past experiments. *J. N. Am. Benthol. Soc.* 14 (4), 465–509.
- Freeman, C., Lock, M.A., 1995. The biofilm polysaccharide matrix: a buffer against changing organic substrate supply? *Limnol. Oceanogr.* 40, 273–278.
- Foley, M.E., Sigler, V., Gruden, C.L., 2008. A multiphasic characterization of the impact of the herbicide acetochlor on freshwater bacterial communities. *ISME J.* 2, 56–66.
- Guasch, H., Muñoz, I., Roses, N., Sabater, S., 1997. Changes in atrazine toxicity throughout succession of stream periphyton communities. *J. Appl. Phycol.* 9, 137–146.
- Guasch, H., Sabater, S., 1998. Light history influences the sensitivity to atrazine in periphytic algae. *J. Phycol.* 34, 233–241.
- Haack, T.K., McFeters, G.A., 1982. Nutritional relationships among microorganisms in an epilithic biofilm community. *Microb. Ecol.* 8, 115–126.
- Hammer, Y., Harper, D.A.T., Ryan, P.D., 2001. Past: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol. Electron.* 4, 4–9.
- Hunt, R.W., Chinnasamy, S., Bhatnagar, A., Das, K.C., 2010. Effect of Biochemical Stimulants on Biomass Productivity and Metabolite Content of the Microalga, *Chlorella Sorokinian*. *Appl Biochem Biotechnol.* 162, 2400–2414.

- Junghans, M., Backhaus, T., Faust, M., Scholze, M., Grimme, L.H., 2003. Predictability of combined effects of eight chloroacetanilide herbicides on algal reproduction. *Pest Manag. Sci.* 59, 1101–1110.
- Knapp, C.W., Graham, D.W., Berardesco, G., deNoyelles Jr, F., Cutak, B.J., Larive, C.K., 2003. Nutrient level, microbial activity, and alachlor transformation in aerobic aquatic systems. *Water Res.* 37, 4761–4769.
- Konstantinou, I.K., Hela, D.G., Albanis, T.A., 2006. The status of pesticide pollution in surface waters (rivers and lakes) of Greece. Part I. Review on occurrence and levels. *Environ. Pollut.* 141, 555–570.
- Kotzabasis, K., Hatzithanasiou, A., Bengoa-Ruigomez, M.V., Kentouri, M., Divanach, P., 1999. Methanol as alternative carbon source for quicker efficient production of the microalgae *Chlorella minutissima*: role of the concentration and frequency of administration. *J. Biotechnol.* 70, 357–362.
- Kreuger, J., 1998. Pesticides in stream water within an agricultural catchment in southern Sweden (1990–1996). *Sci. Total Environ.* 216, 227–251.
- Lane, D. J., 1991. rRNA sequencing, in: Stachenbradt, G.M.E. (Ed.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Wiley, Chichester, pp. 115–175.
- Lawrence, J.R., Swerhone, G.D.W., Neu, T.R., 2000. A simple rotating annular reactor for replicated biofilm studies. *J. Microbiol. Meth.* 42, 215–224.
- Lawrence, J.R., Kopf, G., Headley, J.V., Neu, T.R., 2001. Sorption and metabolism of selected herbicides in river biofilm communities. *Can. J. Microbiol.* 47, 634–641.
- Lawrence, J.R., Neu, T.R., 2003. Microscale analyses of the formation and nature of microbial biofilm communities in river systems. *Rev. Environ. Sci. Bio/Technol.* 2, 85–97.
- Lawrence, J.R., Chénier, M., Roy, R., Beaumier, D., Fortin, N., Swerhone, G.D.W., Neu, T.R., Greer CW., 2004. Microscale and molecular assessment of the impacts of nickel, nutrients and oxygen level on structure and function of river biofilm communities. *Appl. Environ. Microb.* 70, 4326–4339.
- Lawrence, J.R., Zhu, B., Swerhone, G.D.W., Roy, J., Wassenaar, L.I., Topp, E., Korber, D.R., 2009. Comparative microscale analysis of the effects of triclosan and triclocarban on the structure and function of river biofilm communities. *Sci. Total Environ.* 407, 3307–3316.
- Ma, J., Chen, J., 2005. How to accurately assay the algal toxicity of pesticides with low water solubility. *Environ. Pollut.* 136, 267–273.
- Marchesi, J.R., Sato, T., Weightman, A.J., Martin, T.A., Fry, J.C., Hiom, S.J., Wade, W.G., 1998. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Appl. Environ. Microb.* 64, 795–799.
- Montuelle, B., Dorigo, U., Bérard, A., Volat, B., Bouchez, A., Tlili, A., Gouy, V., Pesce, S., 2010. The periphyton as a multimetric bioindicator for assessing the impact of land use on rivers: an overview of the Ardières-Morcille experimental watershed (France). *Hydrobiologia.* 657, 123–141.
- Muyzer, G., Brinkhoff, T., Nübel, U., Santegoeds, C., Schafer, H., Wawer, C., 1997. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology, in: Akkermans, A.D.L., Van Elsas, J.D., De Bruijn, F.J. (Eds.), *Molecular Microbial Ecology Manual*, Kluwer Academic, Dordrecht, pp. 1–27.
- Navakoudis, E., Ioannidis, N.E., Dörnemann, D., Kotzabasis, K., 2007. Changes in the LHCII-mediated energy utilization and dissipation adjust the methanol-induced biomass increase. *Biochim. Biophys Acta* 1767, 948–955.
- Neu, T.R., Swerhone, G.D.W., Lawrence, J.R., 2001. Assessment of lectin-binding analysis for *in situ* detection of glycoconjugates in biofilm systems. *Microbiology* 147, 299–313.
- Neu, T.R., Swerhone, G.D.W., Böckelmann, U., Lawrence, J.R., 2005. Effect of CNP on composition and structure of lotic biofilms as detected with lectin-specific glycoconjugates. *Aquat. Microb. Ecol.* 38, 283–294.
- Noack, U., Geffke, T., Balasubramanian, R., Papenbrock, J., Braune, M., Scheerbaum, D., 2003. Effects of the herbicide metazachlor on phytoplankton and periphyton communities in outdoor mesocosms. *Acta hydrochim. hydrobiol.* 31, 482–490.
- Nusch, E.A., 1980. A Comparison of different methods for chlorophyll and pheopigment analysis. *Ergebn. Limnol.* 14, 14–36.
- Okubo, A., Sugiyama, S.-I., 2009. Comparison of molecular fingerprinting methods for analysis of soil microbial community structure. *Ecol. Res.* 24, 1399–1405.
- Okumura, Y., Koyama, J., Takaku, H., Satoh, H., 2001. Influence of organic solvents on the growth of marine microalgae. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 41, 123–128.
- Osborne, C.A., Rees, G.N., Bernstein, Y., Janssen, P.H., 2006. New threshold and confidence estimates for terminal restriction fragment length polymorphism analysis of complex bacterial communities. *Appl. Environ. Microb.* 72, 1270–1278.
- Papadopoulou-Mourkidou, E., Karpouzas, D.G., Patsias, J., Kotopoulou, A., Milothridou, A., Kintzikoglou, K., Vlachou, P., 2004. The potential of pesticides to contaminate the groundwater resources of the Axios river basin in Macedonia, Northern Greece. Part. Monitoring study in the north part of the basin. *Sci. Total Environ.* 321, 127–146.
- Paule, A., Lyautey, E., Garabétian, F., Rols, J.-L., 2009. Autogenic *versus* environmental control during development of river biofilm. *Ann Limnol.-Int. J. Lim.* 45, 1–10.
- Pesce, S., Margoum, C., Montuelle, B., 2010. *In situ* relationships between spatio-temporal variations in diuron concentrations and phototrophic biofilm tolerance in a contaminated river. *Water Res.* 44, 1941–1949.
- Rimet, F., Bouchez, A., 2011. Use of diatom life-forms and ecological guilds to assess pesticide contamination in rivers: lotic mesocosm approaches. *Ecol. Indic.* 11, 489–499.
- Robarts, R.D., Wicks, R.J., 1989. [Methyl-3H] thymidine macromolecular incorporation and lipid labeling: their significance to DNA labeling during measurements of aquatic bacterial growth rate. *Limnol. Oceanogr.* 34, 213–222.

- Roubeix, V., Mazzella, N., Delmas, F., Coste, M., 2010. *In situ* evaluation of herbicide effects on the composition of river periphytic diatom communities in a region of intensive agriculture. *Vie et Milieu – life and Environment*. 60, 233-241.
- Singh, S., Datta, P., 2005. Growth and survival potentials of immobilized diazotrophic cyanobacterial isolates exposed to common ricefield herbicides. *World J. Microb. Biot.* 21, 441-446.
- Smith, C.J., Danilowicz, B.S., Clear, A.K., Costello, F.J., Wilson, B., Meijer, W.G., 2005. T-Align, a web-based tool for comparison of multiple terminal restriction fragment length polymorphism profiles. *FEMS Microbiol. Ecol.* 54, 375-380.
- Spawn, R., Hoagland, K.D., Siegfried, B., 1997. Effects of alachlor on an algal community from a midwestern agricultural stream. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 785-793.
- Stamper, D.M., Tuovinen, O.H., 1998. Biodegradation of the acetanilide herbicides alachlor, metolachlor, and propachlor. *Crit. Rev. Microbiol.* 24, 1-22.
- Stevenson, R.J., Peterson, C.G., 1991. Emigration and immigration can be important determinant of benthic diatom assemblages in streams. *Freshwater Biol.* 26, 279-294.
- Stratton, G.W., 1985. The influence of solvent type on solvent-pesticide interactions in bioassays. *Arch. Environ. Con. Tox.* 14, 651-658.
- Tlili, A., Dorigo, U., Montuelle, B., Margoum, C., Carluer, N., Gouy, V., Bouchez, A., Bérard, A., 2008. Responses of chronically contaminated biofilms to short pulses of diuron: an experimental study simulating flooding events in a small river. *Aquat. Toxicol.* 87, 252-263.
- Tlili, A., Bérard, A., Roulier, J.L., Volat, B., Montuelle, B., 2010. PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> dependence of the tolerance of autotrophic and heterotrophic biofilm communities to copper and diuron. *Aquat. Toxicol.* 98, 165-177.
- Tlili, A., Montuelle, B., Bérard, A., Bouchez, A., 2011. Impact of chronic and acute pesticide exposures on periphyton communities. *Sci. Total Environ.* 409, 2102-2113.
- Vallotton, N., Moser, D., Eggen, R.I.L., Junghans, M., Chèvre, N., 2008. S-metolachlor pulse exposure on the alga *Scenedesmus vacuolatus*: effects during exposure and the subsequent recovery. *Chemosphere* 73, 395-400.
- Vercaene-Eairmal, M., Lauga, B., Saint Laurent, S., Mazzella, N., Boutry, S., Simon, M., Karama, S., Delmas, F., Duran, R., 2010. Diuron biotransformation and its effects on biofilm bacterial community structure. *Chemosphere* 81, 837-843.
- Vermue, M., Sikkema, J., Verheul, A., Bakker, R., Tramper, J., 1993. Toxicity of homologous series of organic solvents for the Gram-positive bacteria *Arthrobacter* and *Nocardia* sp. and the Gram-negative bacteria *Acinetobacter* and *Pseudomonas* sp. *Biotechnol. Bioeng.* 42, 747-758.
- Villeneuve, A., Larroudé, S., Humbert, J-F., 2011a. Herbicide contamination of freshwater ecosystems: impact on microbial communities, in: Stoytcheva, M. (Ed.), *Pesticides - Formulations, Effects, Fate*, pp. 285-312.
- Villeneuve, A., Montuelle, B., Bouchez, A., 2011b. Effects of flow regime and pesticides on periphytic communities: evolution and role of biodiversity. *Aquat. Toxicol.* 102, 123-133.
- Waiser, M.J., Robarts, R.D., 1997. Impacts of a herbicide and fertilizers on the microbial community of a saline prairie lake. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 54, 320-329.
- Walsh, G.E., Merrill, R.G., 1984. Algal bioassays of industrial and energy process effluents, in: Shubert, L.E. (Ed), *Algae as ecological indicators*. Academic Press, FL, pp. 330-360.
- Wetzel, R.G., 1975. Primary production, in: Whitton, B.A. (Ed.), *River Ecology*. Blackwell Sci. Publ., Oxford, pp. 230-247.
- Yergeau, E., Lawrence, J.R., Waiser, M.J., Korber, D.R. and Greer, C.W. Metatranscriptomic Analysis of the Response of River Biofilms to Pharmaceutical Products, Using Anonymous DNA Microarrays. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 5432-5439.

## III.4 Réponse du biofilm phototrophe à un herbicide selon son degré de maturation

Résumé de l'article en préparation « **Changes in tolerance to herbicide toxicity throughout development stages of phototrophic biofilms cultivated in rotating annular bioreactor** » par A. Paule, V. Roubéix, B. Lauga, R. Duran, F. Delmas, E. Paul et J.L. Rols. (Article 6)

### III.4.1 Approche expérimentale

L'objectif principal de cette étude est d'évaluer la toxicité de l'alachlore à une concentration de  $10 \mu\text{g.L}^{-1}$  sur des communautés de biofilms phototrophes en relation avec leurs niveaux de maturation et l'état structurel de leur biomasse. Pour cela, dans un premier temps, la stratégie expérimentale fut de cultiver en bioréacteur annulaire rotatif (RAB) le biofilm phototrophe (cf. **partie II Matériel et méthodes**) (culture **C2** présentée dans le **chapitre 2**), et de le collecter à deux temps de culture différents (1,6 et 4,4 semaines). Puis ces biofilms subissent des tests écotoxicologiques d'une période de 15 jours. Pour chaque test, des coupons colonisés par du biofilm sont collectés du RAB et transférés soit intacts dans les microcosmes individuels, soit la biomasse est mise en suspension puis inoculée dans les microcosmes en présence d'une lame de verre vierge (nouveau support de colonisation). A l'issue des 15 jours d'exposition en microcosme, les biofilms (des coupons ou des lames) sont collectés et analysés d'un point de vue structurel et fonctionnel.

### III.4.2 Principaux résultats et discussion

Les deux états structuraux des biomasses (intact sur coupon ou en suspension) simulent différents stades de développement, la phase de colonisation des supports artificiels (lames de verre avec suspension de biofilm) et la phase de croissance et d'épaississement (coupons avec biofilm intact). Comme présenté dans les résultats du chapitre 2, la culture en RAB se déroule sous des conditions opératoires stables tout au long de l'expérience, favorisant ainsi le contrôle de la structure des communautés par des facteurs autogènes et la formation de biofilms peu diversifiés en algues (13 espèces à 1,6 semaines et 7 à 4,4 semaines). Les deux temps de culture permettent d'obtenir des niveaux de biomasse différents :  $1,12 \pm 0,28 \text{ mg.cm}^{-2}$  et  $2,45 \pm 0,30 \text{ mg.cm}^{-2}$  de MSSC respectivement à 1,6 et 4,4 semaines de culture. En termes de communautés bactériennes, les biofilms présentent également des structures différentes. Les caractéristiques des biofilms collectés à 1,6 et 4,4 semaines de culture en RAB



répondent pleinement à nos attentes, une perte de diversité avec le temps et des structures bactériennes algales différentes. Un critère supplémentaire justifie également le choix des 4,4 semaines : une culture de biofilms en RAB avait été réalisée antérieurement (culture **C2**, présentée dans le **chapitre 2**) dans des conditions identiques et enregistrait une communauté bactérienne stable à partir de 3-4 semaines, signifiant un arrêt des variations temporelles autogènes du biofilm. Cette phase de stabilité nous intéresse car lors de la phase d'exposition postérieure en microcosme de la première étude de ce **chapitre 3, article 4**, les variations temporelles liées aux successions autogéniques interféraient avec les modifications susceptibles d'être engendrées par la présence de l'alachlore.

Durant les expériences écotoxicologiques en microcosmes, les conditions opératoires sont maintenues constantes pour toutes les situations testées. Ainsi les changements au sein des communautés microbiennes sont à mettre en relation avec la présence de l'alachlore. Au cours de l'incubation dans les microcosmes, une disparition de la molécule de l'alachlore est systématiquement observée, ce qui représente des temps de demi-vie de l'ordre de grandeur des valeurs trouvées dans la littérature en milieu aquatique lorsque que la molécule est biodégradée (Graham et al. 2000b).

Une exposition de 15 jours à l'alachlore n'engendre pas de modification en termes de structure des communautés bactériennes et de diatomées. Seule la biomasse est visiblement impactée, résultant en une forte inhibition pour les biofilms intacts collectés à 1,6 semaines. Tout comme la précédente expérience (**Article 5**), l'impact observé sur la biomasse peut être lié au mode d'action de la molécule qui engendre des dommages au niveau de la croissance des cellules. Durant ces tests écotoxicologiques, deux facteurs paraissent influencer la trajectoire d'évolution des communautés, l'alachlore et le degré de maturation du biofilm, de manière plus ou moins équivalent.

En effet, pour les biofilms maintenus intacts lors de l'exposition, ceux-ci sont influencés principalement par le temps d'incubation. Que que soit le paramètre observé (structurel ou fonctionnel), la maturation du biofilm s'est poursuivie dans les microcosmes. Cette évolution temporelle se matérialise par des niveaux de biomasse plus importants après les 15 jours d'incubation, des structures bactériennes et des profils d'utilisation de source de carbone différents, par contre aucune différence en ce qui concerne la composition des communautés de diatomées. Les expériences avec un biofilm de 4,4 semaines ne montrent *a priori* aucune influence de l'incubation en microcosmes pour les communautés bactériennes et de diatomées. Par contre, les niveaux de biomasse diminuent drastiquement avec ou sans alachlore. Une phase de dégénérescence du biofilm peut expliquer cette diminution. Cette hypothèse se confirme par les valeurs de matière sèche sans cendre des biofilms qui ont poursuivi leur

développement dans le RAB au-delà des 4,4 semaines et qui présentent également une perte de biomasse. Cette dégénérescence en termes de biomasse est plus importante dans les microcosmes que dans le RAB. Le changement d'environnement lors du passage du RAB aux microcosmes a pu fragiliser le biofilm et accentuer ce phénomène. Si l'effet potentiel de l'alachlore n'est pas observé à 4,4 semaines sur le biofilm intact mais uniquement à 1,6 semaines, peut être est-il masqué par le détachement de la biomasse, ce qui revient à dire que l'influence de la maturation du biofilm, c'est à dire des facteurs autogènes, a prédominé sur l'influence de l'alachlore? La phase de stabilité recherchée au départ a été certainement dépassée, il aurait fallu collecter les biofilms dans le RAB vers 3 semaines de culture.

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer les effets observés uniquement sur la biomasse, par rapport à des études antérieures sur l'alachlore ou d'autres molécules appartenant à la même famille qui occasionnent des effets sur les algues et les bactéries :

- La concentration en alachlore choisie de  $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ , et le niveau de contamination qui chute durant l'expérience. Par exemple Spawn et al. (1997) observent des effets de l'alachlore sur les teneurs en chlorophylle *a* à partir de  $30 \mu\text{g.L}^{-1}$  d'alachlore. Roubeix et al. (2011a) enregistrent des modifications dans la composition des communautés de diatomées à partir de concentrations à  $30 \mu\text{g.L}^{-1}$  ;

- La présence d'espèces tolérantes, notamment au niveau des diatomées. Les espèces de diatomées dominantes sont *Nitzschia palea* (NLAP) et *Nitzschia amphibian Grunow f. amphibia* (NAMP), qui sont des espèces hyper-eutrophes, c'est à dire très tolérantes à des milieux riches en nutriments (Roubeix et al. 2011a). NLAP appartient aux espèces motiles et ont été décrites pour être tolérantes ou indifférentes aux pesticides (atrazine, Guasch et al. 1998 ; diuron, azoxystrobin et tébuconazole, Rimet et Bouchez 2011). Bien que pour d'autres études, elles semblaient sensibles au métolachlore mais à partir de  $30 \mu\text{g.L}^{-1}$  (Roubeix et al. 2011a) ;

- La localisation des diatomées : leur emplacement situé au contact du coupon, dans les couches inférieures du biofilm, rend leur accès difficile pour la molécule d'alachlore. Durant la culture du biofilm dans le RAB, les analyses des communautés algales suggèrent que lors des premiers stades de développement, les biofilms se composent principalement de diatomées. Nous pouvons supposer que les diatomées se trouvent être les premières à coloniser le support et à bien se développer pour favoriser par la suite l'installation et le développement des autres espèces (algues vertes) ;

- De fortes vitesses de courant appliquées sur le biofilm durant son développement dans le RAB, pouvant générer un biofilm très compact, limitant ainsi la diffusion de la molécule à l'intérieur du biofilm ;

. Le changement de milieu entre le RAB et les microcosmes, possible source de stress. De nombreuses études ont pu montrer que si les communautés subissent un premier stress, alors elles répondent plus faiblement au second (Niederleher et Cairns 1992 ; Tlili et al. 2008) ;

. La sensibilité plus ou moins importante de certains paramètres mesurés. Concernant les tests écotoxicologiques réalisés sur les suspensions de biomasse, quels que soient l'âge du biofilm collecté au niveau du RAB et le paramètre mesuré, aucun effet de l'alachlore n'est observé. Noack et al. (2003) suggèrent que les effets d'une exposition à  $30 \mu\text{g.L}^{-1}$  de métazachlore sont masqués par l'habilité ou non à coloniser des substrats artificiels (lame de verre). Roubeix et al. (2011a) trouvent que le métolachlore provoque des déformations au niveau des diatomées. Il est possible que ces déformations confèrent à ces diatomées une incapacité à se fixer. Ainsi, une sélection des espèces a pu se faire dans la colonne d'eau. Finalement, l'état en suspension de la biomasse, s'est avéré être le plus résistant.

### III.4.3 Conclusion et perspectives

Cette étude montre bien l'importance du design expérimental lors des tests écotoxicologiques, la nécessité parfois de mettre en place une phase d'acclimatation avant de réaliser une contamination, et de bien définir dès le début le type d'exposition (chronique ou aiguë). Il est important d'intégrer le facteur croissance du biofilm lors de ses phases d'exposition, surtout lorsque l'expérience se déroule sur plusieurs jours ; tenir compte de l'évolution temporelle naturelle du biofilm est primordial. Il existe trois étapes clés durant le développement d'un biofilm : la colonisation d'un support vierge, l'épaississement et la phase de dégénérescence.

L'objectif de cette étude était d'évaluer la réponse du biofilm en fonction de l'étape de son développement.

Les expériences écotoxicologiques réalisées sur des biofilms intègres d'âges 1,6 et 4,4 semaines permettent de déterminer l'influence du niveau de maturation entre un biofilm en phase d'épaississement et un biofilm en fin de phase d'épaississement. Ces deux niveaux de maturation se différencient par leurs compositions et diversités algales et bactériennes.

Les expériences écotoxicologiques réalisées sur des suspensions de biofilms permettent de déterminer l'influence de l'alachlore sur les 15 premiers jours de colonisation des supports. Niveau de maturation et stade de développement confondus, l'alachlore engendrait une perturbation uniquement sur la biomasse des biofilms intacts. En ce qui concerne les structures bactériennes et diatomiques, l'influence prédominante est gouvernée par la dynamique de croissance des biofilms que l'on suppose masquer les effets que pourraient avoir l'alachlore. Cette dynamique de croissance s'exprime différemment suivant à quel stade les communautés se trouvaient en début d'expérience : (i) soit par une augmentation de la quantité de bio-

masse associée à une évolution des communautés bactériennes, (ii) soit par une perte. Cet impact sur la biomasse est cohérent avec le mode d'action de l'alachlore (Böger et al. 2000). Finalement nous ne pouvons pas affirmer si l'alachlore a eu un effet sur les communautés et de quelle intensité, car de nombreux scénarios se présentent à nous :

- . l'alachlore présente réellement une source de perturbation qui a pu être masquée : dans ce cas les effets potentiels ont pu être masqués soit par l'évolution temporelle des communautés, soit par un premier stress affligé aux communautés lors du passage des biofilms du bioréacteur aux dispositifs expérimentaux ou de la mise en suspension ;

- . l'alachlore présente réellement une source de perturbation mais pour des niveaux et des temps d'exposition plus importants.

- . l'alachlore ne présente que très peu d'effet soit parce que les communautés sont tolérantes (associé à l'idée de capacité de biodégradation) soit par son mode d'action peu toxique (comparé aux inhibiteurs de la photosynthèse).

La composition des diatomées est largement utilisée comme indicateur de l'état écologique de l'eau, en termes de pollution trophique. Rimet et al. (2009) enregistreraient le temps de colonisation comme facteur le plus influençant sur les communautés des diatomées lors de leur étude en microcosme. Malgré tout, certaines études en microcosme ont pu montrer que la composition des diatomées pouvait être affectée par les pesticides aussi bien en microcosmes (Pérès et al. 1996 ; Schmitt-Jansen and Altenburger 2005) qu'*in situ* (Dorigo et al. 2004 ; Morin et al. 2009).

#### **III.4.4 Article 6**

## **Changes in tolerance to herbicide toxicity throughout development stages of phototrophic biofilms cultivated in rotating annular bioreactor**

A. Paule<sup>1,2</sup>, V. Roubeix<sup>3</sup>, B. Lauga<sup>4</sup>, R. Duran<sup>4</sup>, F. Delmas<sup>3</sup>, E. Paul<sup>5,6,7</sup> & J.L. Rols<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Université de Toulouse; UPS, INP; EcoLab (Laboratoire d'écologie fonctionnelle et environnement); 118 route de Narbonne, F-31062 Toulouse, France

<sup>2</sup> CNRS; EcoLab; F-31062 Toulouse, France

<sup>3</sup> Cemagref, UR REQE, 50 avenue de Verdun, F-33612 Cestas, France

<sup>4</sup> Equipe Environnement et Microbiologie, Institut Pluridisciplinaire de Recherche sur l'Environnement et les Matériaux - IPREM, UMR 5254 CNRS/UPPA, IBEAS, Université de Pau et des Pays de l'Adour, BP1155, F-64013 Pau, France

<sup>5</sup> Université de Toulouse; INSA; LISBP, 135 Avenue de Rangueil, F-31077 Toulouse, France

<sup>6</sup> INRA, UMR792, Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, F-31400 Toulouse, France

<sup>7</sup> CNRS, UMR5504, F-31400 Toulouse, France

### **Abstract**

Ecotoxicological experiments have been performed in laboratory-scale microcosms to investigate the sensitivity of phototrophic biofilm communities to pesticides, in relation with the states of biofilm maturation (age of the phototrophic biofilms) and biomass structure (intact biofilm versus suspension). The phototrophic biofilms were initially cultivated in a prototype of rotating annular bioreactor (RAB) of Taylor-Couette type flow under constant operating conditions and collected after 1.6 and 4.4 weeks of culture. Alachlor effects were monitored at different biological organization levels by the combination of biomass descriptors (ash free dry mass, chlorophyll *a*) and structural molecular fingerprinting methods and diatom species composition. The present work indicates measurable effects of alachlor on phototrophic biofilm biomass in terms of ash dry free mass on the intact biofilm accompanied by the inhibition of primary production. This effect was coherent with the action mode of the molecule. The tridimensional structure didn't specially confer to biofilm a particular protection as barrier and alachlor did not perturb the biofilm during the first state of colonisation, despite strong interactions with the water column well known at this state of development. The absence of change in the structure and physiological states will indicate that the function of biofilm are not damaged resulting in unperturbed overall ecosystem functioning. This study contributes to a better knowledge of pollutants toxicity on the phototrophic biofilm and its use as bioindicator of pesticide contamination of aquatic ecosystems.

### **Keywords**

Phototrophic biofilm; microcosm; biological succession; structure and function; T-RFLP; alachlor; toxicity.

### **1. Introduction**

Pesticides are one of the most important source of pollution for continental aquatic environments (Kreuger 1998). By mechanisms including surface run-off, residual pesticides applied to agricultural lands migrate to surface and ground waters (Devault, 2007). In some surface waters, phototrophic biofilms, microbial aggregates

composed of heterotrophic micro- and meio-organisms and phototrophic micro-organisms embedded in an exopolymeric matrix, are the first aquatic non-target organisms which interact with pesticides. These aggregates are considered as a key compartment of aquatic environment by their contribution to most of the primary production (Wetzel 1983), food resource for aquatic grazers (Feminella and Hawkins, 1995), mineralization and element recycling processes (Battin et al. 2003a), absorption (Lawrence et al. 2001), and biodegradation of chemical contaminants (Vercraene-Eairmal et al. 2010). Due to their shared physiological characteristics with plants, the algae in phototrophic biofilms are susceptible to be biologically and biochemically perturbed by herbicides, thus resulting in damage to overall ecosystem functioning. By numerous studies, in field, microcosm or mesocosm, the sensitivity of phototrophic biofilms has been recorded depending on the chemical and the structural or functional endpoint observed (Villeneuve et al. 2010), the trophic status (Pratt and Barreiro 1998) the seasonal changes (Dorigo et al. 2004), the community composition (Guasch et al. 1997), the exposition to herbicide level and frequency (Tlili et al. 2008 and 2011a), the phosphorus gradient (Tlili et al. 2010) and the current velocity (Villeneuve et al. 2010).

A major challenge of the last decade has been to understand the relationship between diversity loss and ecosystem processes (Loreau et al. 2001). Numerous studies have shown that species-rich communities produce more biomass than species-poor communities (Zhang and Zhang 2006). Moreover, in according to “Biodiversity-stability hypothesis” (McCann 2000), more the community is diversified and more she is stable against any stress and contains many interactions between organisms (Villeneuve et al. 2011b). On the early stages of the phototrophic biofilm development, the microbial communities are mainly influenced by allogenic factors, leading to strong exchanges with the water column (Paule et al. 2009) and thus are likely more sensitive to chemicals.

The model of toxic molecule used in the present work was alachlor herbicide [2-chloro-N-(2, 6-diethylphenyl)-N-(methoxymethyl) acetamide] which is extensively used as a pre-emergence chloroacetanilide herbicide applied to corn and soybeans. This molecule is detected worldwide in surface waters (e.g. Sanchez-Camazano et al 2005; Konstantinou et al. 2006). Chloroacetanilide herbicides are known to inhibit the elongation of very long chain fatty acids in plants and algae (Böger et al. 2000) resulting in impaired cell development (Junghans et al. 2003; Vallotton et al. 2008). In our Knowledge, the toxicity of alachlor is mainly assessed from single-species acute toxicity test on green algae (Fairchild et al. 1997), cyanobacteria (Singh and Datta 2005), bacteria and protozoa (Bonnet et al. 2007), and these studies provide  $EC_{50}$  values. A small number of studies showed the response of phototrophic biofilm communities (Spawn et al. 1997; Carder and Hoagland 1998).

The main objectives of our work was to assess the sensitivity of phototrophic biofilm communities to pesticides, in relation with the states of biofilm maturation (age of the phototrophic biofilms) and biomass structure (intact biofilm versus suspension). Phototrophic biofilms were cultivated in a prototype of rotating annular bioreactor (RAB) of Taylor-Couette type flow under constant operating conditions (Paule et al. 2011) and collected after 1.6 and 4.4 weeks of culture. It is known that, in an undisturbed environment (e.g. constant hydrodynamic conditions), autogenic processes appear and the more competitive species dominate (competitive exclusion), which can explain the poor algal diversity obtained. Ecotoxicological experiments were performed in microcosms with intact biofilms or suspension in contact with alachlor. At the end of exposition period, the response of communities was assessed by multimetric approach including both structural (biomass and composition) and functional descriptors.

## 2. Material and Methods

### 2.1. Phototrophic biofilm collection

Phototrophic biofilms have been produced in a laboratory prototype of rotating annular bioreactor (RAB) of Taylor-Couette type flow, as firstly described by Paule et al. (2011). The RAB was operated at a rotational speed of the inner cylinder of 80 rpm, and continuously fed with a synthetic culture medium consisting of tap water supplemented with nutrients ( $\text{NO}_3^- \text{-N} = 4.2 \pm 0.2 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $\text{PO}_4^{3-} \text{-P} = 0.356 \pm 0.02 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $\text{SiO}_2 = 10.9 \pm 2.9 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $\text{DOC} = 1.1 \pm 0.3 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 7.1 \pm 0.2$ , conductivity =  $368 \pm 5 \mu\text{S cm}^{-1}$ , hydraulic residence time in RAB = 3.23 h). The inside of the RAB was illuminated by fluorescent lamps including two cool daylight (Osram L15W/865 Luminux, Germany) and two fluora (Osram L15W/77, Germany) tubes, giving an air photosynthetically active radiation (PAR) irradiance level of  $180 \pm 10 \mu\text{mol s}^{-1} \text{ m}^{-2}$  (flat quantum sensor, model LI-189, LI-COR, Inc - Lincoln - Nebraska), with light / dark periods of 16 hours / 8 hours. Seeding procedure of the removable polyethylene plates in the RAB integrated two seeding phases conducted each for 48 hours in closed recirculation, connected to an illuminated aquarium (10 litres) where the inoculum was incubated (suspension of natural phototrophic biofilms collected from various river stones and filtered through a 250 and then 100  $\mu\text{m}$  pore size filter (VWR). The two seeding phases were separated by a 24-hour period where the RAB operated in continuous culture mode, fed with the synthetic culture medium. The end of seeding phase was defined as the start of the phototrophic biofilm culture in RAB (week 0).

During the culture in RAB, a sampling of 9 colonized plates was realized after 1.6 and after 4.4 weeks of biofilm development (experimental conditions called “1.6 and 4.4 weeks”). Among these 9 plates of each sampling time, 6 plates were used directly for the microcosm study (experimental condition called “Plates with intact biofilm”). The last set of 3 plates was scraped with a microscope slide previously treated with alcohol 95 % in order to avoid all trace of DNA and the biofilm from each plate was suspended in 90 mL of filter sterilized river water (0.2  $\mu\text{m}$  pore size filter, cellulose acetate membrane, Whatman) and homogenised (tissue homogenizer at 13,500 rpm, Ultra Turrax, T25). Each biofilm suspension homogenate was subdivided into aliquots, a first 45 mL subsample for the analyses of biomass descriptors (AFDM and chlorophyll *a*), diatom abundance, T-RFLP and carbon utilization assays (Biolog), and a second 45 mL subsample, centrifuged (12,000 g for 20 min at 4°C and resuspended in a average volume of 3.5 mL) as inoculum source for the microcosm study (experimental condition called “Slides with suspension”).

### 2.2. Microcosm setup

To assess the impact ofalachlor on the microbial biomasses from phototrophic biofilms, experiments were realized with microcosms containing sampling plates from RAB, exhibiting a structured three-dimensional biofilm, or inoculated with a suspension from sampling plate biofilm. The microcosms system consisted of glass beakers of 500 mL (VWR). Each beaker was initially filled with 300 mL of synthetic culture medium similar to culture medium feeding the RAB but with a twice of each nutrients concentration to avoid nutrient limitation. The choice of the same culture medium composition allowed to avoid nutrient limitation and to limit the stress for the microbial communities. Some beakers were contaminated with a nominal concentration of 10  $\mu\text{g L}^{-1}$  ofalachlor, a representative environmental concentration detected in surface water (Sanchez-Camazano et al 2005; Kuster et al 2008), and the other untreated were kept as controls. Alachlor purchased from Sigma-Aldrich (purity 99%) was dissolved in acetone to make a stockalachlor solution. Aliquots of this stock solution were then added to treated microcosms to obtain tested final concentration. The final concentration of solvent added in each

beaker was less than 0.005 %. Before addition of biofilm or suspension, the beakers were incubated for 5 hours to obtain stable water chemical conditions in the microcosms.

Experiment was monitored for 15 days in triplicates. All the beakers were maintained in thermostated chamber at 20°C on rotary shakers, and illuminated by 4 cool daylight fluorescent tubes (F18W/GRO, Sylvania, Germany), which were positioned 30 cm above beakers. The system operated with 16 h light cycles by the use of timer switches. The illumination was measured as air PAR irradiance level by a flat quantum sensor (model LI-189, LI-COR, Inc - Lincoln - Nebraska) at a distance from rotary shakers equivalent to the mid-height of a beaker (50 cm from the fluorescent tubes), and average recorded values were  $37 \pm 4 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ .

### **2.3. Experimental schedule**

To resume, experimental conditions during the microcosm study included two biofilm development period lengths in the RAB (“1.6 weeks” and “4.4 weeks” giving different maturation levels of phototrophic biofilms) and two biomass structural states (biofilm and suspension).

For each biofilm age, experimental design was conducted as follows: the 6 colonized plates were sampled from the RAB and immediately transferred in 6 beakers. Moreover, each subsample of biofilm homogenate (10 mL) was subdivided and equally inoculated (3-5 mL) in 6 other beakers which previously contained clean glass slides. Thus the amount of biofilm homogenate inoculated by beaker was (data) mg AFDM L<sup>-1</sup> for 1.6 and 4.4 weeks biofilm ages, respectively. For each experimental condition (biofilm and suspension), each group of 6 beakers included 3 replicate control beakers withoutalachlor and 3 replicates contaminated withalachlor 10 µg L<sup>-1</sup>. All the beakers were closed by the lid of a Petri dish, with an opening for the path of glass slides and plates. Plastic racks placed on the lid of Petri dishes kept the substrates completely immersed in the beakers. The size of the beakers used allowed the positioning of one plate or one glass slide per beaker.

After 5 and 15 days of incubation, water samples (100 mL) from each microcosm were collected to evaluate thealachlor residual concentrations and the physico-chemical characteristics. The loss of water volume by evaporation was compensated by addition of distilled water. At the end of experiments, the totality of glass slides and plates were sampled to assess the biofilm response toalachlor exposure. Each plate or slide represented one replicate. Biofilms were removed from plates and slides by scraping with a microscope slide previously treated with alcohol. Biofilms were suspended in 50 mL (biofilm from slides) or 90 mL (biofilm from plates) of tap water previously filtered through a 0.2 µm pore size filter (cellulose acetate membrane, Whatman) and homogenized (tissue homogenizer at 13,500 rpm, Ultra Turrax, T25). From these homogenates (50 or 90 mL), aliquots were taken for analyses of biomass descriptors, diatom composition by microscopic counting, bacterial community structure by T-RFLP, and carbon utilization assays.

### **2.4. Physico-chemical parameters**

Water conductivity, temperature, dissolved oxygen concentration and nutrient concentrations including nitrates, silica, and orthophosphates, and dissolved organic carbon (DOC) concentrations were measured as described by Paule et al. (2011). For the measurement of residualalachlor concentrations, the samples (5 mL) were filtered through Whatman GF/F glass fibre filters (0.7 µm pore size) and analyzed at “Laboratoire Départemental de l’Eau” (Toulouse, France), using high performance liquid chromatography coupled tandem to mass spectrometry (HPLC-MS-MS, Thermo Fisher, model E-Quan TSQ Quantum ultra) with ionization electron spray source and equipped with a pre-concentration column (Thermo Fisher Hypersil GOLD C18, 12 µm particle size, 20 x 2.1



mm), by a direct sample injection. The sample volume was 2 mL. The alachlor separation was monitored using a Thermo Fisher Hypersil GOLD C18 (3  $\mu\text{m}$  particle size, 50 x 2.1 mm) column.

## **2.4. Biofilm characterizations**

### **2.5.1. Biomass descriptors**

From the biofilm suspension homogenate, the dry mass (DM) and the ash free dry mass (AFDM) (aliquot of 5 mL or more), and chlorophyll *a* were measured as described by Paule et al. (2009).

### **2.5.2. Diatom composition**

Diatom composition was estimated from an aliquot of 5 mL of the biofilm suspension homogenate, preserved in formalin solution (3 %) and stored in the dark until analysis at “Cemagref” (Bordeaux, France). Identification and counting of diatoms of 400 frustules were performed as described previously by Roubeix et al. (2011).

### **2.5.3 Carbon source utilization profiles**

Community level analysis of carbon source utilization profiles for all experimental conditions were evaluated by using commercial Eco-plates (Biolog, Hayward, CA, USA) (Konopka et al. 1998). Each microplate was inoculated with 100  $\mu\text{L}$  of an aliquot of biofilm suspension homogenate previously filtered on polycarbonate filter (0.3  $\mu\text{m}$  pore size, GS 25 mm, Whatman) and then incubated in the dark at 20°C for 7 days. Each microplate was used for one experimental condition (3 replicates). The absorbance was measured every day at 590 nm using a multi well plate reader (Spectro Max plus 384, Molecular Device). For every absorbance value, the controls were subtracted. For statistical analysis, the net absorbances at 168 hours of incubation were used. The substrates were grouped by guild following their chemical structure (Choi and Dobbs 1999): amines, amino acids, carbohydrates, carboxylic acids, polymers and phenolic compounds.

### **2.5.4. Bacterial community structure**

After centrifugation (12,000 *g* at 4°C for 20 min, Heraeus Multifuge) of an aliquot of 20 to 50 mg dry mass of the biofilm suspension homogenate (Lyautey et al. 2005b), the pellet was stored at -80°C until further analysis. Genomic DNA extraction was performed on the pellet using a DNeasy Plant Mini Kit according to the manufacturer’s protocol (Qiagen Laboratories). The integrity of the extracted DNA was checked as described by Paule et al. (2009).

The 16S rRNA genes were amplified by PCR and the bacterial community structure was studied by T-RFLP as described by Paule et al. (2011). Restriction digestion was performed with HaeIII, HinfI and Hpa. T-RFLP profiles were aligned by a web-based tool, T-Align (<http://inismor.ucd.ie/~talign/>) as previously described by Smith et al. (2005) with the confidence interval of 0.5.

## **2.6. Data analysis**

The difference in physico-chemical characteristics and the difference in AFDM, chlorophyll *a* and the number of T-RFs between biofilm samples were assessed with the Mann Whitney test using SPSS software 13.0. Differences were considered statistically significant at  $p \leq 0.05$ .

To assess changes in the bacterial community structure in microcosms, a Principal Component Analysis (PCA) was performed from the log-transformed T-RF abundance data. A hierarchical cluster analysis was performed based on the log-transformed diatom abundance data. PCA and hierarchical cluster analyses were realized on the samples clustered following biomass structure state (intact biofilm *versus* suspension), using Primer v6 software (PrimerE, Ltd, Luton, United Kingdom). Peaks < 0.5 % of the total area were excluded from the analysis and T-RFs that differed in size by 0.4 bp or less were considered to be identical. As described by Leflaive et al. (2005),

a PCA was conducted on the “pi” values defined as the sum of optical density (OD) of each guild previously multiplied by a correcting factor, and subdivided by the sum of all guilds. This correcting factor corresponded to the number of substrates in the largest guild divided by the number of substrates of each guild and allowed standardization of the weighting of the different guilds.

Statistical analyses of PCA were run using an analysis of similarity (ANOSIM) via primer v6 software on Bray Curtis similarity matrices generated from T-RF abundance or “pi” value data. This analysis generates a global R value in the range from 0 (completely random pattern) to 1 (completely separated groups) (Clarke 1993). The global R value was considered statistically significant at  $p < 0.05$  uncorrected.

### 3. Results

#### 3.1. Characterisation of phototrophic biofilms collected in RAB

The number of T-RFs was  $14.8 \pm 4.4$  and  $10.7 \pm 0.6$  for 1.6 and 4.4 weeks-old biofilms, respectively. The 1.6 weeks-old biofilm exhibited lower AFDM values ( $1.12 \pm 0.28 \text{ mg cm}^{-2}$ ) than 4.4 weeks-old biofilm ( $2.45 \pm 0.30 \text{ mg cm}^{-2}$ ) ( $p > 0.05$ ), but exhibited similar chlorophyll *a* values of average  $13 \pm 3 \mu\text{g cm}^{-2}$  (Figure 1, for T0 conditions). The 1.6 weeks-old biofilm was composed of 33 % *Diatoms*, 51.7 % *Chlorophyceae*, and 14.9 % *Cyanobacteria* with the following dominant species: 31.5 % of *Nitzchea*, 28 % of *Scenedesmus* and *Desmodesmus* and 13 % of *Lynbdya* spp. In contrast, 4.4 weeks-old biofilm was composed of 4.1 % *Diatoms* (only *Nitzchia*) and 95.5 % of *Chlorophyceae* with the dominant species 74.9 % of *Scenedesmus*. Moreover the 1.6 weeks-old biofilm exhibited higher specific algal richness (13) than the 4.4 weeks-old biofilm (7).

#### 3.2. Physico-chemical parameters in microcosms

Physico-chemical parameters measured in water samples from control and alachlor treated microcosms during both ecotoxicological experiments are presented in Table 1. Values of pH and conductivity were relatively homogenous throughout the experiment irrespective of the experimental conditions. For temperature, incidentally higher values were observed after 5 days of incubation in some microcosms, and were corrected immediately. Although, a decrease of nitrate and orthophosphate levels was recorded, an increase in DOC was detected throughout the times of incubation. Similarly, a residual alachlor concentration reduction was observed over time. Observations are similar between the both experiments “1.6 weeks” and “4.4 weeks”.

Biofilm age	Sample	Day	pH	Temperature (°C)	Conductivity ( $\mu\text{S cm}^{-1}$ )	DO ( $\text{mg L}^{-1}$ )	DOC ( $\text{mg L}^{-1}$ )	$\text{NO}_3\text{-N}$ ( $\text{mg L}^{-1}$ )	$\text{SiO}_2$ ( $\text{mg L}^{-1}$ )	$\text{PO}_4\text{-P}$ ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Alachlor ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	
1.6 weeks	Co-plate	5	10.6	21.1	401.3	17.2	4.6	5.6	24.1	0.009	n.a.	
		15	10.9	20.5	386	21.5	10.4	0.03	20.7	0.009	n.a.	
	A10-plate	5	10.4	23.1	385	16.6	4.4	5.1	21.8	0.006	5.7	
		15	10.5	20.2	334.7	19.6	11.1	0.01	20.2	0.008	0.25	
	Co-slide	5	11.1	28.2	422.3	n.a.	4.5	4.9	35.4	0.002	n.a.	
		15	10.0	21.4	420.3	n.a.	6.7	0.04	37	0.004	n.a.	
	A10-slide	5	11.3	27.8	395.3	n.a.	4.7	3.01	28.7	0.006	7.8	
		15	10.8	22	391	n.a.	7.4	0.09	33.5	0.004	0.69	
	4.4 weeks	Co-plate	5	10.8	27.5	385.3	n.a.	6.9	1.9	18.7	0.002	n.a.
			15	9	23	418	n.a.	15.1	0.1	40.8	0.009	n.a.
A10-plate		5	10.8	28	357.3	n.a.	6.1	2.4	11.5	0.022	7	
		15	9.6	21.1	379	n.a.	15.6	0.1	28.4	0.009	0.08	
Co-slide		5	10.9	22.4	376.7	15.6	3.1	4.2	25.3	0.007	n.a.	
		15	10.4	20.3	371	17.6	5.4	0.02	26.7	0.004	n.a.	
A10-slide		5	10.5	21.8	379	18.6	3.4	3.9	24.7	0.005	9.3	
		15	10.7	20.3	346	17.2	6.5	0.02	25.4	0.006	0.68	

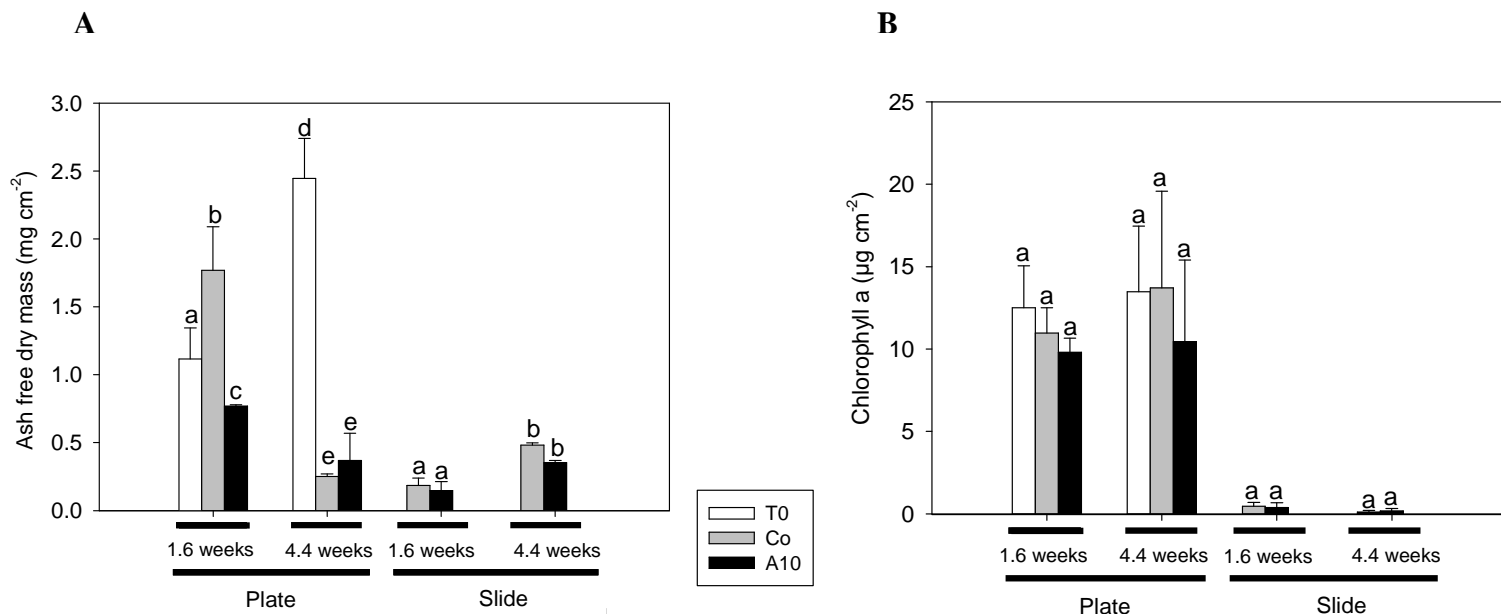
**Table 1:** Physico-chemical characteristics throughout ecotoxicological experiments (mean  $\pm$  SD) measured at 5 and 15 days of microcosms incubation for all different experimental conditions (1.6 or 4.4 weeks biofilms, plates with intact biofilm from RAB or slides with suspension of unstructured biofilm biomasses from RAB plates, control (Co) or treated by alachlor  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  (A10)). DOC: dissolved organic carbon concentration; DO: dissolved oxygen concentration; ESA: Alachlor ethanesulfonic acid and OA: Alachlor oxanilic acid. Quantification limits: Alachlor  $4 \text{ pg g}^{-1}$ , ESA  $9 \text{ pg g}^{-1}$ , OA  $20 \text{ pg g}^{-1}$ ; n.a.: not analysed.

### 3.3. Phototrophic biofilms response to alachlor exposure in microcosms

#### 3.3.1. Biomass descriptors

The Figure 1 presents the impact of alachlor exposure on the biomass descriptors (AFDM and chlorophyll *a*) for the different experimental conditions. The biofilms sampled in the control and alachlor treated microcosms at the end of both experiment “1.6 weeks” and “4.4 weeks” exhibited AFDM values ranged from  $0.25$  to  $1.75 \text{ mg cm}^{-2}$  and from  $0.15$  to  $0.45 \text{ mg cm}^{-2}$ , and chlorophyll *a* values ranged from  $9.5$  to  $13.5 \mu\text{g cm}^{-2}$ , and from  $0.05$  to  $0.1 \mu\text{g cm}^{-2}$  for the experimental conditions called “Plates with intact biofilms” and “Slides with suspension”, respectively. Alachlor induced significant effects on AFDM for the experimental conditions “1.6 weeks and Plates with intact biofilm” (Mann Whitney,  $p < 0.05$ ), associated to processes of loss of biomass and/or inhibition of the growth (Figure 1A). No significant effect of alachlor was observed on the chlorophyll *a* irrespective of the structural state of biomasses

(biofilm or suspension) incubated at the start of experiment (Mann Whitney,  $p > 0.05$ ) (Figure 1B). Biofilms of the experimental conditions “4.4 weeks and Plates with intact biofilm” sampled at the end of the microcosm experiment exhibited high loss of biomass irrespective of treated and control microcosms due to the microcosm incubation period ( $p < 0.05$ ).



**Figure 1:** Plots of AFDM (A) and chlorophyll *a* (B) values ( $\pm$  SD,  $n = 3$ ) after 15 days of incubation in the control (Co) and exposed to alachlor  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  (A10) microcosms according to the different experimental conditions (1.6 and 4.4 weeks: ages of biofilms when collected in the RAB, plates with intact biofilm from RAB or slides with suspension of unstructured biofilm biomasses from RAB plates). “T0” indicated the date where fresh biofilm plates were sampled after 1.6 and 4.4 weeks of biofilm development in the RAB.

### 3.3.2. Bacterial communities

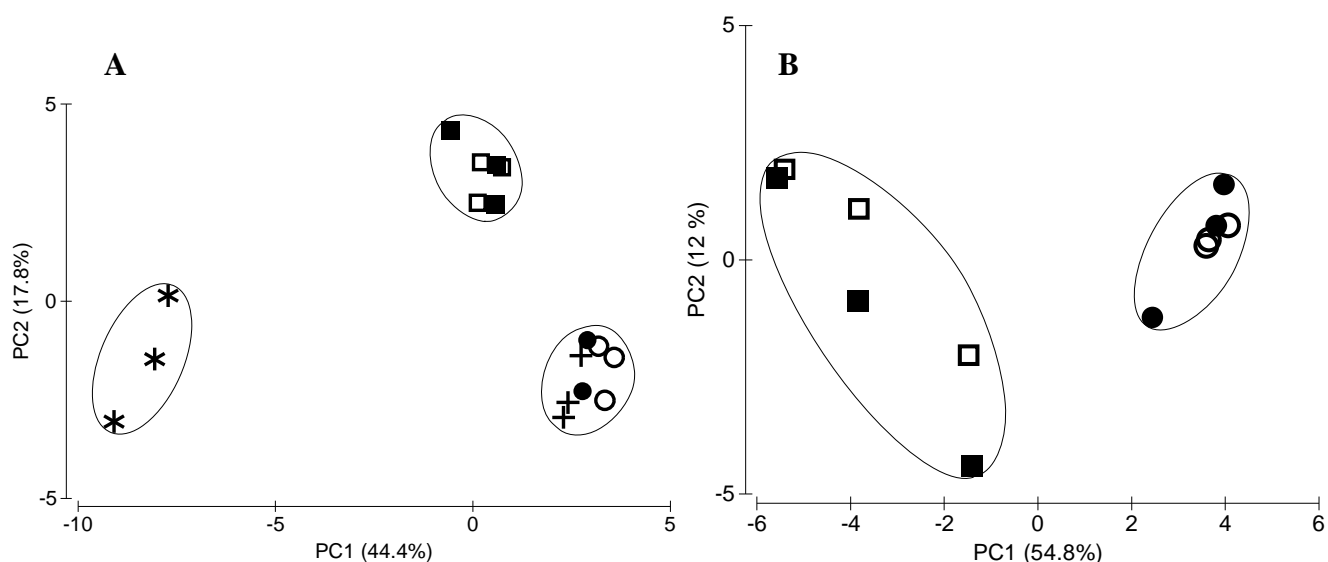
The response of bacterial communities from phototrophic biofilms exposed to alachlor in according to its level of maturation and structural state were determined by T-RFLP. The three restriction enzymes used in this study provided an average number of T-RFs per sample ranged from 70 to 97 for the bacterial communities from “Slides with suspension”.

No significant alachlor effect was observed on the T-RFs numbers irrespective the experimental conditions ( $p > 0.05$ ). Principal component analysis (PCA) was performed on the T-RF log-transformed abundance data in according to the structural state of biomasses incubated at the start of experiment (Figure 2). The two axes accounted for 44.4 and 17.8 % of the total variance for the experimental condition “Plates with intact biofilm” (Figure 2A) and for 54.8 and 12 % for the experimental condition “Slides with suspension” (Figure 2B). This analysis was strengthened by the similar trends observed with PCAs built with the first and third axes. The first three axes accounted for 74.7 and 71.5 % of the variation of T-RFLP

patterns for both experimental conditions “Plates with intact biofilm” and “Slides with suspension”, respectively (data not shown).

For the experimental condition “Plates with intact biofilm” (Figure 2A), PCA shows temporal variations of bacterial communities from 1.6 weeks-old biofilm through microcosm study (ANOSIM, global  $R = 1$ ,  $p = 0.01$ ). But no temporal variation was observed for the 4.4 weeks-old biofilm incubated on plates. For the experimental condition “Slides with suspension” (Figure 2B), the profiles of bacterial community structure were distributed according to the maturation level of biofilms incubated (1.6 *versus* 4.4 weeks) (ANOSIM, global  $R = 0.981$ ,  $p = 0.01$ ).

No change of the bacterial community structure was induced by thealachlor exposure compared to the control, irrespective of the maturation level (1.6 and 4.4 weeks) and structural state of biomasses incubated at the start of microcosm experiment (Figure 2A, ANOSIM,  $R = 0.122$ ,  $p = 0.25$ ) (Figure 2B, ANOSIM, global  $R = -0.093$ ,  $p = 0.71$ ).



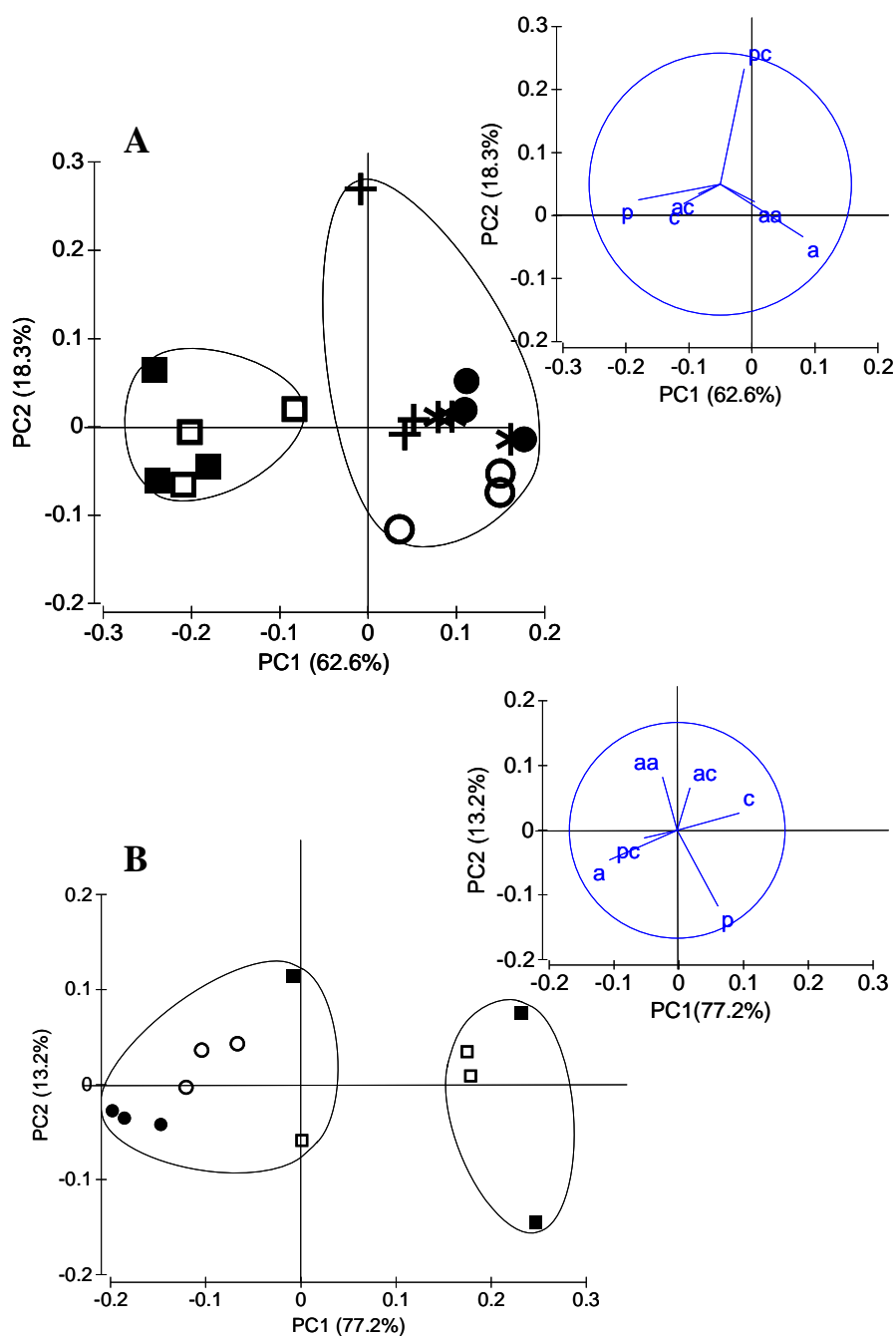
**Figure 2:** Changes in the bacterial community structure assessed by Principal Component Analysis (PCA) based on the T-RFLP data after 15 days of incubation in the control (white symbols  $\square$  and  $\circ$ ) and exposed toalachlor  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  (black symbols  $\blacksquare$  and  $\bullet$ ) microcosms according to the different experimental conditions (1.6 weeks (squares  $\square$  and  $\blacksquare$ ) and 4.4 weeks (circles  $\circ$  and  $\bullet$ ) biofilms, plates with intact biofilm from RAB (A) or slides with suspension of unstructured biofilm biomasses from RAB plates (B). Symbols “star” and “cross” in (A) design the results for fresh biomasses sampled after 1.6 and 4.4 weeks of biofilm development in the RAB, respectively. Big circles correspond to a similarity between samples of 70 %.

### 3.3.3. Carbon source utilization profiles

PCAs were performed on the guild categorization of total activity of different microbial communities in according to the structural state of biomasses incubated at the start of experiment (Figure 3). The two axes accounted for 62.6 and 18.3 %, and 77.2 and 13.2 % of the total variance for the “Plates with intact biofilm” and for the “Slides with suspension», respectively. This analysis was strengthened by the similar trends observed with PCAs built with the first and third axes. The first three axes accounted for 90.2 and 95 % of the variation of T-RFLP patterns for the conditions “Plates with intact biofilm” and “Slides with suspension”, respectively (data not shown).

No significant effect of alachlor was observed on the carbon source utilization profiles irrespective of the different experimental conditions considered (Figure 3A, ANOSIM,  $R = 0.093$ ,  $p = 0.2$ ) (Figure 3B, ANOSIM, global  $R = 0.278$ ,  $p = 0.9$ ). For the biofilms of the experimental condition “Slides with suspension”, the communities from 1.6 weeks-old biofilm exhibited a tendency to use the carboxylic acids and carbohydrates although the communities from 4.4 weeks-old biofilm preferentially seemed to use the amines and phenolic compounds (Figure 3B).

As consistent with the analysis of bacterial community structure (Figure 2), the PCA in according to the experimental condition “Plates with intact biofilm” showed temporal variations of bacterial communities from 1.6 weeks-old biofilm through incubation (ANOSIM, global  $R$ ) accompanied by changes in the preferential utilization of carbon source (Figure 3A) . Conversely, no significant temporal variation was observed for the bacterial communities from 4.4 weeks-old biofilm.



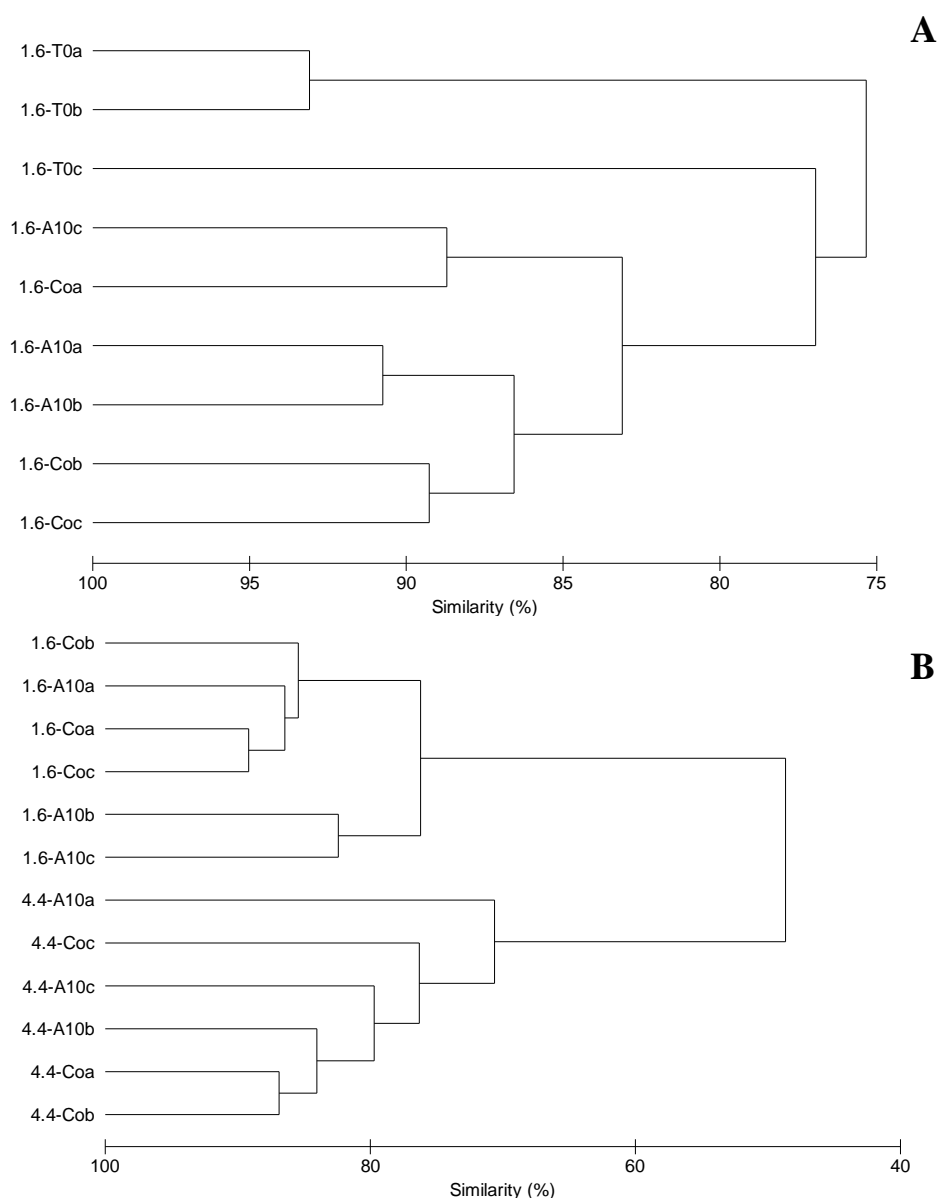
**Figure 3:** Results of the Principal Component Analysis (PCA) carried out on the carbon source group utilized (net optical density at 168 h) by microbial communities after 15 days of incubation in the control (white symbols  $\square$  and  $\circ$ ) and exposed to alachlor  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  (black symbols  $\blacksquare$  and  $\bullet$ ) microcosms according to the different experimental conditions (1.6 weeks (squares  $\square$  and  $\blacksquare$ ) and 4.4 weeks (circles  $\circ$  and  $\bullet$ ) biofilms, plates with intact biofilm from RAB (A) or slides with suspension of unstructured biofilm biomasses from RAB plates (B). Symbols “star” and “cross” design the results for fresh biomasses sampled after 1.6 and 4.4 weeks of biofilm development in the RAB, respectively. Big circles correspond to a similarity between samples of 70 %. For (A) and (B), projection of the variables (carbon source guild) on the component planes with a: amines; aa: amino acids; c: carbohydrates; ac: carboxylic acids; p: polymers; pc: phenolic compounds.

### 3.3.4. Diatom communities

Among a total of 10 diatom species identified throughout the microcosm experiments, 10 and 7 dominant species had a relative abundance  $> 1\%$ , for the diatom communities from “Plates with intact biofilm” and “Slides with suspension”, respectively, and were considered as the characteristics of each diatom communities (Figure 4). The dominant species were similar between the diatom community native to the “suspension and intact biofilms” (Figure 4A and B). For the diatom communities of the experimental condition “Slides with suspension” (Figure 4B), compositions were divergent depending on maturation level of biofilms incubated (1.6 and 4.4 weeks) (ANOSIM, global  $R = 1$ ,  $p = 0.01$ ). The diatom communities from 1.6 weeks-old biofilm were mainly composed by NPAL, NAMP and EMIN, and the communities from 4.4 weeks-old biofilm were essentially composed by EMIN and NPAL associated to different proportions (Table 2). Diatom communities which were collected at the end of microcosm experiment exhibited no significant change induced byalachlor exposure, irrespective of structural state and maturation level of biofilms incubated at the start of microcosm experiment (experimental condition “Plates with intact biofilm”: ANOSIM, global  $R = 0.185$ ,  $p = 0.14$ ) (experimental condition “Slides with suspension”: ANOSIM, global  $R = 0.074$ ,  $p = 0.5$ ).

For the experimental condition “Plates with intact biofilm”, no temporal variation was observed through incubation, with diatom communities mainly composed of NPAL (82 to 87 %) (Table 2). For this experimental condition, the senescence quality of biofilms samples from 4.4 weeks-old biofilm didn't allow to count and identify the diatom species. Data from these samples were thus not included in the analysis. No significant abnormal form of diatom communities was observed in response toalachlor treatments (data not shown).





**Figure 4:** Cluster of the similarity in taxonomic composition of diatom communities after 15 days of incubation in the control (Co) and exposed toalachlor  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  (A10) microcosms in triplicates (a, b and c) according to the different experimental conditions (1.6 weeks (1.6) and 4.4 weeks (4.4) biofilms, plates with intact biofilm from RAB (**A**) or slides with suspension of unstructured biofilm biomasses from RAB plates (**B**)). “T0” indicated the date where fresh biofilm plates were sampled after 1.6 and 4.4 weeks of biofilm development in the RAB. The senescence quality of biofilms samples from 4.4 week-old biofilm in (A) didn’t allow to count and identify the diatom species. The letters a, b and c indicate replicates from same experimental condition.

Sample	Biofilm age	Condition	NPAL	NAMP	EMIN	GPAR	EOMI	ESBM	DIAT	MAPE	GGRA	NAPE	CPLA	GTRU
Plate	1.6 weeks	T0	87.8	3.0	1.8	2.8	-	1.9	-	0.3	1.5	0.3	0.2	-
		Co	82.8	2.6	6.5	1.8	-	3.4	2.3	-	-	0.1	-	0.1
		A10	82.2	5.2	5.6	2.0	-	2.3	1.6	-	-	0.1	0.3	0.4
Slide	1.6 weeks	Co	67.7	6.5	15	5.3	-	2.0	0.3	1.3	0.9	-	0.3	0.3
		A10	71.2	6.6	8.8	6.3	-	3.2	0.8	0.3	0.2	1.5	0.2	0.2
	4.4 weeks	Co	32.5	58.0	-	1.3	6.0	-	-	0.6	-	-	0.3	0.1
		A10	33.3	54.4	-	1.2	8.4	-	-	0.6	0.3	-	0.3	-

**Table 2:** Mean ( $\pm$  SD) ( $n=3$ ) relative abundance of dominant species representing more than 1% relative abundances in all samples, of diatom communities after 15 days of incubation in the control (Co) and exposed toalachlor  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  (A10) microcosms according to the different experimental conditions (1.6 and 4.4 weeks biofilms, plates with intact biofilm from RAB, slides with suspension of unstructured biofilm biomasses from RAB plates), NPAL: *Nitzschia palea*; NAMP: *Nitzschia amphibia*; EMIN: *Eunotia minor*; GPAR: *Gomphonema parvulum*; EOMI: *Eolimna minima*; ESBM: *Eolimna subminuscula*; DIAT: not identified; MAPE: *Mayamaea atomus*; GGRA: *Gomphonema gracile*; NAPE: *Navicula atomus*; CPLA: *Cocconeis placentula*; GTRU: *Gomphonema truncatum*. “T0” indicated the date where fresh biofilm plates were sampled after 1.6 and 4.4 weeks of biofilm development in the RAB. The senescence quality of biofilms samples from 4.4 weeks old biofilms didn’t allow to count and identify the diatom species.

#### 4. Discussion

The objectives of the present study were to assess thealachlor toxicity on microbial communities of phototrophic biofilm in relation with its maturation level and biomass structural states. In this context, phototrophic biofilm was cultivated in RAB, and collected at two development period lengths, 1.6 and 4.4 weeks. Ecotoxicological experiments were realized with microcosms which contained sampling plates from RAB, exhibiting a structured three-dimensional biofilm, or inoculated with a suspension of biofilms from sampling plates. Both structural states simulated different biofilm development stages, the phase of colonization of micro-organisms on artificial substrates (Slides with suspension) and the phase of biofilm growth and thickening (Plates with intact biofilm).

Phototrophic biofilm grown in RAB under stable operating conditions (Paule et al. 2011), was preferred to the use of natural phototrophic biofilms collected *in situ*. Thus the growth of biofilms was mainly drive by autogenic factors, and favoured the development of algal poorly-diversified biofilm (13 and 7 species, respectively for 1.6 and 4.4 weeks-old biofilms). In terms of bacterial communities, both biofilms cultivated in the RAB exhibited different structure and function (carbon source utilization). The characteristics of phototrophic biofilms used for the ecotoxicological experiments presented successful compared to our needs. The choice of sampling dates (1.6 and 4.4 weeks) of phototrophic biofilm was based on the

dynamic of phototrophic biofilm growth occurring in previous study in this RAB (Paule et al. 2011). The biofilm growth is defined by an accretion phase related to colonization and growth processes and characterized by an increase of AFDM resulting in a biomass peak (Biggs 1996). Moreover, the bacterial community structure assessed by T-RFLP shifted according to colonization time followed by a stable phase after 3 weeks of culture (Paule et al. 2011).

During the microcosm experiments, factors which influence the growth of phototrophic biofilms were maintained constant (light, temperature, hydrodynamic), thus the difference recorded between controls (Co) and alachlor-treated (A10) microcosms are supposed to be caused by the presence of alachlor. Levels of alachlor in the treated microcosms decreased over time at both experiments (“1.6 and 4.4 weeks”) (rajouter half-life time microcosms/literature). In aquatic ecosystem, the fate of alachlor is influenced by different mechanisms, volatilization, photodegradation (Chesters et al. 1989), biodegradation (Graham et al. 1999), and rarely the adsorption (Laabs et al. 2007). The biotransformation is well known to be the main factor mediating the persistence of alachlor in the natural environment (Stamper and Tuovinen 1998). Diatoms often constitute a major component of the algal communities of river biofilms (Blinn et al. 1980), and are used to assess water quality in terms of organic and nutrient pollution by a variety of biotic indices (Coste et al. 2009). Thus, we decided to observe only diatom species in our phototrophic biofilm samples. Moreover, recent studies have provided encouraging results suggesting that diatoms could be a pertinent tool in herbicide risk assessment (e.g. Roubex et al. 2011b; Rimet and Bouchez 2011).

No significant change caused by the alachlor exposure for 15 days was observed in the present study in terms of bacterial and diatom community structure. Only the biomass was impacted for the conditions “1.6 weeks and Plates with intact biofilm” and “4.4 weeks and Slides with suspension”, associated to processes of inhibition of the growth. This observation is coherent with the mode of alachlor action. The chloroacetanilide herbicides are well known to inhibit the elongation of unsaturated chain fatty acid in plants and algae (Böger et al. 2000), thus to inhibit the cell development. Spawn et al. (1997) observed similar results on the biomass, a significant negative effect by 21 days of  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  alachlor (chlorophyll *a* and AFDM), accompanied of changes of dominant algae at higher level of alachlor ( $30 \mu\text{g L}^{-1}$ ).

In our knowledge, few studies have investigated the toxicity of alachlor at community –level on phototrophic biofilms (e.g. Spawn et al. 1997; Carder and Hoagland 1996), whereas some studies have explored the impact of metolachlor or acetochlor, other chloroacetanilide herbicides (e.g. Roubex et al. 2011a; Debenest et al. 2009; Noack et al. 2003).

Tolerance of microbial communities to alachlor when structured in biofilms may be explained by (i) the presence of tolerant species, (ii) the presence of other perturbation appeared during the exposition, as observed by Tlili et al. (2008), communities which previously seem to have been impacted by other stresses (here changes of operating conditions) often respond weakly to second stress (Niederlehner and Cairns 1992; Tlili et al. 2008), (iii) a shorter exposure period associated to the disappearance of alachlor level over time (iv) the thickness of biofilm which may act as a protection barrier and limiting transfers (Wicke et al., 2008), and (v) strong nutrient concentrations. Dominant diatom species, *Nitzschia palea* (NLAP) and *Nitzschia amphibian* Grunow f. *amphibia* (NAMP) are well known to be hyper-eutraphentic species and thus tolerant to rich-nutrient culture medium (Roubeix et al. 2011a et b). NLAP exhibited to be a motile guild (Rimet et Bouchez 2011) was recorded resistant to atrazine exposure (Guasch et al. 1998; Downing et al. 2004), exhibited an abundance increase with pesticide contamination (diuron, azoxystrobin and tebuconazole, Rimet et al. 2011) and to seem indifferent to diuron exposure in other study (Roubeix et al. 2011). Whereas, during a metolachlor exposure, the authors underlined low abundance level for *Nitzschia palea* and may be considered sensitive to metolachlor (Roubeix et al. 2011). Jurgensen and Hoaglang (1990), observed that the changes of hydrodynamic conditions mainly influenced phototrophic biofilms compared to pulse atrazine exposure. Lynch et al. (1985) showed similar results for seasonal variations compared to atrazine contamination. It is difficult to distinguish between the response of communities to herbicide exposure and that of other environmental factors and stresses (Villeneuve et al. 2010). The low algal diversity of biofilms did not confer more sensitivity to intact biofilm, and prevent to continue its growth illustrated by an increase of AFDM values and temporal changes of bacterial community structure and function during the incubation period for biofilm collected at 1.6 weeks.

Villeneuve et al. (2010) underlined that biofilm from their heterogeneous mesocosms were not more resistant to herbicide than biofilms from their homogeneous mesocosms.

Intact biofilms from the experiment “4.4 weeks” were mainly affected by incubation period, illustrated by a high loss of AFDM irrespective treatments (Co and A10), which could suggest an aging phase occurred during the microcosm experiments (Biggs 1996) in according with the senescence quality of samples. This aging phase could mask the effect induced by alachlor in our study. During the dynamic of phototrophic biofilm growth, in absence of perturbation (undisturbed conditions), the autogenic factors predominant appear and induce an autogenic detachment (Boulêtreau et al. 2006) but rarely observed in natural environmental (Biggs 1996). In the most case, perturbations including hydrodynamic perturbations provoke this

detachment. Pesticides occur most frequently during event of high flow. This leads us to wonder about the effect relevance of alachlor on the phototrophic biofilm in natural condition. Concerning the biofilm of slides from suspensions, a selection of alachlor tolerant species before their fixation on glass slides can explain the absence of measurable effect. As observed by Noack et al. (2003) during contamination experiments by metazachlor, we can supposed that ability to growth on artificial substrates (glass slides) highly conditioned the structure and function of biofilm compared to alachlor presence. Despite the algal poorly-diversified communities from suspension inoculated in the microcosms and the contamination by herbicide, the colonisation and growth of biofilms were achieved. Finally, state of development the most sensitive to the water column seem here the less affected by the presence of herbicide.

## **5. Conclusion**

In conclusion, the present work indicates that exposure to alachlor miming contamination level occurred during events in river of high water only induced measurable effects on phototrophic biofilm biomass in terms of AFDM on the intact biofilm accompanied by the inhibition of primary production. This effect was coherent with the action mode of the molecule. The tridimensional structure didn't specially confer to biofilm a particular protection as barrier and alachlor did not perturb the biofilm during the first state of colonisation, despite strong interactions with the water column well known at this state of development. Ecologically, this reduction of the amount of algal biomasses could impair the quality of biofilm as a food resource for the aquatic grazers. Furthermore, the absence of change in the structure and physiological states will indicate that the function of biofilm are not damaged resulting in unperturbed overall ecosystem functioning. Future research could be realized for the study of additional functional descriptors, including the use of newer molecular tools such as real time PCR to determine the expression of target genes coding for enzymes implicated in various river biofilm functions (e.g., denitrification, Chénier et al. 2003). It will be interesting to investigate the effect of herbicide exhibiting different action mode (isoproturon, diuron) on similar design experiment.

Our results showed the difficult to distinguish the impact of pesticide and that of other perturbations, such as operating conditions, age of biofilm. In natural environment, the occurrences of herbicide can often to be accompanied by other perturbations including to high nutrient level or hydrodynamic perturbations. Thus, in the ecotoxicological experiment, it is essential to integrate the presence of stress during pesticide contamination.

This study contributes to a better knowledge of pollutants toxicity on the phototrophic biofilm and its use as bioindicator of pesticide contamination of aquatic ecosystems. A multitude of effects induced by the pesticides are observed in the literature and it is necessary to have a better standardization (Sabater et al. 2007).

### **Acknowledgements**

This work was funded by the French National Programme EC2CO – Environmental Microbiology - and by the Midi-Pyrénées Council Programme of the Pyrenean working community. We thank J- L. Druilhe for the electrical device for continuous physico-chemical measurement in RAB, S. Karama for assistance with the T-RFLP method and S. Mastrotillo for field assistance. We also thank D. Dalger and T. Louis for bioreactor handling assistance.

## III.5 Conclusion et perspectives du chapitre 3

Ce chapitre est plus axé sur une approche « écotoxicologique » alors que le précédent était axé sur une approche « écologique ». Les notions de dynamique de croissance et de successions écologiques qui s'installent durant la maturation d'un biofilm, ont été explorées dans le sous-chapitre 2 et ont constitué le fil conducteur des 3 expériences écotoxicologiques réalisées dans le cadre de ce chapitre. D'une manière générale, cette approche écotoxicologique nous a permis de formuler les conclusions suivantes :

(i) ce chapitre confirme d'un **point de vue analytique** la nécessité d'intégrer une analyse à différents **niveaux d'organisation biologique** (organismes, populations, communautés. . .) associée à une combinaison de paramètres structurels et fonctionnels, et en intégrant l'histoire du biofilm, son stade de maturation, et la persistance et l'action du polluant testé.

Le choix des paramètres de mesure sont à adapter en fonction du mode d'action de la molécule et des effets que l'on souhaite observer, effets réversibles ou non par exemple. Comme souligné par Sabater et al. (2007), les descripteurs de biomasse sont les plus pertinents pour observer les effets à court terme alors que les descripteurs structurels sont souvent révélateurs des effets à long terme. Ce chapitre nécessiterait la mesure de descripteurs fonctionnels et structurels supplémentaires pour certaines expériences, incluant par exemple la mesure de la structure des Eucaryotes (par DGGE ou T-RFLP sur du 18S), le comptage et la détermination des algues, certaines fonctions qualifiées de « service écologique » (e.g. production primaire, biodégradation. . .), pour une discussion écologique plus pertinente. Augmenter le nombre et la diversité des descripteurs peut permettre l'amélioration de la détermination et de la distinction des effets de l'alachlore par rapport aux effets engendrés par les autres facteurs externes et les successions temporelles des populations. En effet, les périodes d'exposition à l'alachlore durant les deux expériences réalisées en batch (23 et 15 jours) (**Articles 4 et 6**) sont telles que l'évolution temporelle des biofilms s'est poursuivie, masquant ainsi les effets potentiels engendrés par l'herbicide. D'après les descripteurs mesurés, si nous essayons de déterminer le stade de développement au moment de l'exposition des biofilms testés, en se basant sur le modèle de l'évolution de la biomasse élaboré par Biggs (1996), (1) pour l'**article 6**, les biofilms de 1,6 semaines se situent au niveau de la phase exponentielle du modèle, gouvernée principalement par des facteurs allogènes, (2) toujours pour l'**article 6**, les biofilms de 4,4 semaines entamaient leur phase d'autodétachement et (3) pour l'**article 4**, nous supposons avoir des biofilms « matures » qui ont également atteint leur niveau de biomasse maximum. Quelle que soit l'expérience et le biofilm considéré, l'influence temporelle est prépondérante sur les changements de structure des communautés bactériennes et

des communautés de diatomées. Chacun de ces biofilms cités plus haut ont poursuivi leur maturation.

Ce chapitre confirme bien la pertinence des études en microscopie confocale, ce qui permet d'obtenir une évolution de la biomasse plus affinée que les analyses de chlorophylle *a* et de matière sèche sans cendre. Les inconvénients d'une telle technique résident dans le biais apporté par une fraction phototrophe trop importante et dans la nécessité d'analyser un biofilm peu épais. Cette étude suggère que pour une molécule de la famille des chloroacétanilides, en accord avec leur mode d'action, les paramètres de biomasse qualifiés de descripteurs globaux sont en phase avec leur mode d'action. Ces descripteurs présentent une grande sensibilité dans la réponse à une exposition à un chloroacétanilide (Spawn et al. 1997 ; Debenest et al. 2009), par rapport à des expositions aux herbicides, inhibiteurs de la photosynthèse (Montuelle et al. 2010).

(ii) la **persistance** et le **comportement** de la molécule testée sont très importants dans l'impact potentiellement induit par le polluant et semble difficile à prédire. Suivant s'il est présent dans la colonne d'eau ou dans la matrice du biofilm, la toxicité de l'herbicide peut être différente. De nombreux mécanismes gouvernent le comportement de l'alachlore en milieu aquatique (Chester et al. 1989), la photodégradation, l'hydrolyse, l'adsorption sur du matériel biologique ou non, la biodégradation, etc... Malgré de nombreuses précautions, par l'utilisation de verre pour limiter les phénomènes d'adsorption sur les dispositifs expérimentaux, l'utilisation de traitements expérimentaux utilisés pour tester les voies abiotiques de disparition des molécules, il est toujours délicat de prédire le comportement d'une molécule et surtout de l'anticiper et de le contrôler. C'est une difficulté que nous avons souvent rencontrée durant ces trois expériences d'écotoxicologie. D'après la littérature, le problème est récurrent, dans une grande partie des cas les explications données par les auteurs pour expliquer la disparition du polluant au sein de leurs microcosmes sont multiples sans toujours être vérifiées (Spawn et al. 1997 ; Debenest et al. 2009). L'idéal serait de réaliser la combinaison suivante (Tlili et al. 2008) : doser la molécule en phase aqueuse et au sein du biofilm et doser les principaux produits ou métabolites de biodégradation. Durant ces travaux de recherche, le dosage des principaux produits de biodégradation de l'alachlore ont été réalisés sur certains échantillons, à ce jour d'autres échantillons sont en cours d'analyse, afin de vérifier ou exclure les mécanismes de biodégradation (**Articles 1, 4, et 5**). En contact avec le biofilm, la molécule peut soit être adsorbée dans la matrice (Lawrence et al. 2001) ou soit être biodégradée (Pesce et al. 2009 ; Vercraene-Eairmal et al. 2010). Dans les deux cas, la molécule perd sa biodisponibilité et devient potentiellement moins toxique pour les organismes aquatiques. Suivant son degré de maturation, le biofilm n'aura pas la même influence sur la molécule



suivant son épaisseur et suivant s'il est contrôlé principalement par des facteurs allogènes ou autogènes. Une des composantes du biofilm responsable de l'adsorption des polluants, pesticides ou métaux est la matrice d'exopolymères. Cette composante, par son rôle fonctionnel et structurel clef au sein des biofilms (Battin et al. 2003a) comme rappelé dans la **partie I Synthèse bibliographique**, mérite toute notre attention d'un point de vue écologique. Les EPS contiennent également de nombreuses enzymes et permettent une certaine cohésion de l'architecture du biofilm. Toute perturbation peut engendrer des changements de leur composition et de leur proportion comme observé pour l'**article 5**. Ecologiquement, ces changements peuvent modifier certaines fonctions à l'échelle du biofilm (rétention des pesticides, de la matière organique, etc. . .) et se répercuter à l'échelle d'un écosystème. L'étude des EPS semble un descripteur plus sensible que l'évaluation de la structure des communautés bactériennes par typage moléculaire (**Article 5**). L'absence d'étude de la composition ou de la structure des EPS est une des lacunes que nous pouvons reprocher à ce travail de thèse. Il pourrait être envisagé de doser par exemple les EPS (Battin et Sengschmitt 1999), ainsi que de mesurer systématiquement l'épaisseur du biofilm comme réalisé lors de l'étude en mini-bioréacteurs (Battin et al. 2003b). La mesure de l'épaisseur peut être un bon indicateur de la réponse d'un biofilm à une exposition à un herbicide, comme observé dans le cadre de l'expérience en mini-bioréacteurs où les biofilms exposés à  $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  d'alachlore présentaient des niveaux d'épaisseurs plus faibles. Morin et al. (2010) soulignaient que les biofilms originaires de sites considérés comme « clean » apparaissaient être plus adhérents au support de colonisation. Les auteurs proposaient d'utiliser comme indicateur les types d'adhésion au substrat en réponse à une exposition au pesticide. Guasch et al. (2003) observaient une influence de la physiologie des communautés sur leur tolérance vis-à-vis d'une contamination par l'atrazine. Les algues faiblement attachées étaient plus sensibles à l'atrazine que les biofilms plus compacts, à même niveau de biomasse. Ces observations rejoignent les résultats de Stevenson et al. (1996) qui concluait que des biofilms fermement attachés présentent des sensibilités moindres aux perturbations.

(iii) Présence supposée des **mécanismes de biodégradation** durant les deux expériences en microcosmes (**bécher + aquarium, Articles 4 et 6**), par la détection en fin d'exposition de OA et ESA, non présents en début d'exposition. Montuelle et al. (2011) précisait qu'une augmentation de la tolérance était accompagnée par une forte capacité de biodégradation du polluant, et que cela pouvait être apparenté à un type de réponse adaptative (Torang et al. 2003). Ce qui est cohérent avec les résultats de ces trois expériences, très peu d'effets sont détectés suite à la présence de l'alachlore (**Articles 4, 5 et 6**).

(iv) Globalement, à travers les 3 expériences écotoxicologiques de ce chapitre, une même tendance au sujet de la toxicité de l'alachlore apparaît. L'alachlore affecte assez le biofilm, soit en inhibant sa croissance si la contamination se déroule dès les premiers stades de production du biofilm (**Article 5**), soit par une perte de biomasse dans les stades plus avancés de production du biofilm (**Articles 4 et 6**). Dans tous les cas, écologiquement la conséquence directe d'une baisse des niveaux de biomasse sera ressentie par les brouteurs. De plus, l'analyse par microscopie confocale révèle que cette perte de biomasse est susceptible d'engendrer des changements de proportions des bactéries/cyanobactéries et algues, pouvant générer des changements d'appétence du biofilm vis-à-vis des brouteurs. Les impacts observés sur la croissance du biofilm sont tout à fait consistant avec le mode d'action des herbicides de la famille des chloroacétanilides. Les chloroacétanilides sont connus pour inhiber la synthèse de l'élongation des acides gras chez les algues et les bactéries (Böger et al. 2000). Les acides gras rentrent dans la formation des membranes cellulaires. A première vue, l'alachlore semble n'avoir que très peu d'effets sur les communautés microbiennes des biofilms, dans le cadre des descripteurs qui ont été mesurés, comparé à des herbicides de modes d'action différents. Debenest et al. (2009), en comparant la toxicité d'un herbicide de la famille des chloroacétanilides, le métolachlore, avec un herbicide inhibiteur de la photosynthèse, l'isoproturon, enregistraient une toxicité plus importante de la part de l'isoproturon (urée substituée). La biomasse est habituellement considérée comme un descripteur peu pertinent, qualifiée de descripteurs « grossiers » pour la mise en évidence de la toxicité potentielle d'un herbicide, particulièrement les inhibiteurs de la photosynthèse (Montuelle et al. 2010). Ces descripteurs sont également très sensibles à la quantité de lumière (Villeneuve et al. 2010) et aux conditions hydrodynamiques (Battin et al. 2003b). Roubeix et al. (2011a) qui n'observaient pas d'impact du métolachlore, expliquaient que durant la contamination, les espèces tolérantes remplacent progressivement les espèces sensibles, ce qui expliquerait que les effets sur la biomasse ne puissent être visibles tant que les espèces sensibles sont susceptibles d'être remplacées, et qu'il fallait attendre la limite de tolérance des espèces les plus tolérantes et les plus compétitrices de la communauté. Cette explication se base sur la notion d'espèce redondante. Une disparition d'espèce n'entraînera pas forcément la disparition de la fonction à laquelle l'espèce contribue, si cette fonction est présente chez d'autres espèces tolérantes à la perturbation. Ainsi le choix des descripteurs fonctionnels est également important lors des expériences écotoxicologiques, la stratégie est de mesurer une variété de fonctions pour couvrir le maximum d'effet. Durant la phase d'acclimatation, l'absence de changement de la quantité de biomasse (MSSC et chlorophylle *a*) peut être attribuée à un état de développement des biofilms que l'on peut qualifier de « mature ». Durant ce stade de maturation, les

biofilms ont atteint des niveaux de biomasses maximales et sont gouvernés principalement par des facteurs autogènes.

Ce chapitre montre bien l'importance d'intégrer la dynamique de croissance des biofilms. A notre connaissance, peu d'études ont évalué la réponse des communautés microbiennes des biofilms à une exposition en intégrant sa croissance, la plupart se limitant à l'échelle d'un cycle de croissance. Guasch et al. (1997) ont évalué les effets des variations saisonnières sur la sensibilité d'un biofilm à l'atrazine, ce qui recouvrait un pas de temps plus important. Les processus internes au biofilm se sont avérés dans certains cas prendre plus d'importance que d'autres facteurs, comme vis-à-vis des ressources (Romani et Sabater 2000 ; Sekar et al. 2002), ou vis-à-vis du broutage (Schmid Araya et Schmid 2000).

Les changements dus à la présence d'un herbicide peuvent être masqués par des changements dus à l'évolution temporelle naturelle du biofilm. C'est ce que nous observons pour les communautés bactériennes et les communautés de diatomées. La structuration des communautés est principalement gouvernée par l'évolution temporelle du biofilm, et les effets de l'alachlore sur les communautés sont soit absents, soit masqués.

Ce travail intègre la **notion de bio-indication, soit à l'échelle des communautés de diatomées, soit à l'échelle plus globale de l'agrégat**. Afin de déterminer la qualité des eaux de surface, les diatomées sont utilisées en routine, au même titre que les macrophytes, les invertébrés ou les poissons (Geizinger et al. 2009). Plusieurs indices ont été développés et mandatés sous la directive cadre Européenne (WFD, European commission 2000), BDI (Coste et al. 2009) ou IPS (Coste, 1982). Ces indices sont basés sur la sensibilité des espèces, leurs abondances et leurs compositions et plus adaptés pour évaluer la qualité trophique des cours d'eau. Ces indices présentent quelques inconvénients, l'identification des espèces est longue et parfois difficile, certaines espèces présentent des morphotypes très proches, et le nombre de facteurs gouvernant la structure des communautés microbiennes génère un discernement difficile entre les deux types de pollution, trophique et par les pesticides.

De nombreuses études ont pu montrer leur sensibilité vis-à-vis des pesticides sans pour encore prétendre à leur efficacité dans la détection des effets des pesticides (Dorigo et al. 2005). Certaines espèces de diatomées sont enregistrées comme sensibles aux pesticides, *A. minutissimum*, *Eolimna minima*, ou *Navicula lanceolata* (Morin et al. 2009). Inversement certaines espèces de diatomées qualifiées de tolérantes, ont déjà été répertoriées sous des concentrations en herbicides supérieures à  $5 \mu\text{g.L}^{-1}$  (Pérès et al. 1996 ; Morin et al. 2009). De nombreuses hypothèses ont été proposées ces dernière années, sur la relation pollution par les pesticides et diatomées (Rimet et Bouchez 2010), telles que l'effet protecteur contre les polluants de la matrice d'exopolymères pour des diatomées vivant dans un mucus comme

les taxa *Encyonema* et *Frustulia*, l'augmentation des taxa de petites tailles en réponse à une contamination (Morin 2006), l'augmentation de l'abondance des taxa pionniers (Rimet et Bouchez, 2011), ou encore les taxa qui sont adaptés à exploiter plus facilement des ressources dissoutes sont des espèces plus sensibles aux pesticides. De nombreuses études ont montré qu'une contamination par les métaux engendrait une réduction de la taille des cellules (Morin 2006). L'écotoxicologie basée sur la composition en diatomées à l'échelle de l'espèce ne permet pas d'obtenir une tendance très nette. Les espèces tolérantes enregistrées par Guasch et al. (1998) ne sont pas forcément les mêmes que celles enregistrées par Dorigo et al. (2004). Les différences peuvent être expliquées par la composition en espèces présentes au début de l'expérience, les variations saisonnières, le niveau de colonisation, ou encore l'aspect analytique (présence de morphotypes identiques). Certaines espèces sont dites cryptiques, ce qui les rend difficile à différencier (Rimet et Bouchez 2011). Guasch et al. (1998) concluaient qu'il semble encore difficile de définir la tolérance d'une communauté basée sur la composition des espèces de diatomées.

Dans ce contexte, de récentes études se sont focalisées sur la taille des cellules, ou alors la forme de vie des diatomées (Berthon et al. 2011), il a été montré également que les diatomées motiles diminuaient au bénéfice des diatomées pédonculées lorsque les espèces sont déplacées d'un site pollué à un site non pollué (Rimet et al. 2009). Quand aux espèces pionnières, elles sont considérées comme de bons indicateurs d'une contamination, observé par exemple pour le Zinc (Morin et al. 2007) et le Cuivre (Sabater et al. 2002).

Dans ce contexte, de nombreuses études ont investi des métriques autres que la sensibilité et l'abondance pour évaluer la relation avec la qualité de l'eau. Les traits biologiques des diatomées incluant la forme de vie (« *life-forms* »), la taille des cellules, les guildes écologiques (« *ecological guilds* ») pourraient être des profils écologiques robustes (Berton et al. 2011; Rimet et Bouchez 2011). Associée à ces traits biologiques, l'identification serait ainsi limitée. Par traits biologiques, nous pouvons considérer les formes de vie (coloniales, formant des tubes, pionnière, mobile et *stalked*) puis la classe des tailles, et enfin les guildes écologiques (Rimet et Bouchez 2011). Les guildes écologiques sont définis comme un groupe d'espèces qui vivent dans un même environnement, tout en étant adaptées différemment à un facteur biotique (Berton et al. 2011). Passy (2007) a décrit 3 guildes possibles, « *low profile* » (regroupement d'espèce de petites tailles), « *high profile* », qui regroupe les espèces plus larges ou qui tendent vers une forme de colonie (filamenteuse...) et enfin « *motile guild* », regroupant les espèces à mouvements rapides (*Navicula*, *Nitzschia*). Etant donné l'absence d'effet observé sur la communauté des diatomées, si nous nous basons sur la composition, et l'espoir donné aux paramètres de la « forme de vie » des diatomées comme futur descripteur de la

bio-indication, il est intéressant d'explorer dans le cadre de nos études en microcosmes si les « formes de vie » des diatomées dominantes dans nos échantillons peuvent être une explication à leur tolérance. Prenons le cas de la première étude de ce chapitre (**Article 4**), la diatomée dominante des communautés de biofilms qui semble tolérante (site **S**) est *A. minutissimum* (une abondance moyenne de 84 %), qualifiée par Rimet et Bouchez (2011) d'espèce colonisatrice, et appartenant au guildes « *light profile* ». Lors de leurs expériences, l'abondance des taxa de ce guildes augmente dans les microcosmes contaminés. Dans le cadre de notre étude, pour les diatomées dominantes du site **S**, dont les biofilms sont les plus sensibles, *A. minutissimum*, *Navicula lanceolata* et *Surirella brebissonii*, *N. lanceolata* et *S. brebissonii* sont des taxa appartenant au guildes « *motile* » (**Tableau 4, article 4**). D'après Rimet et Bouchez (2011), l'abondance de ces taxa augmentaient également dans leurs microcosmes contaminés. Maintenant prenons le cas des troisièmes études (**Article 6**), pour l'ensemble des échantillons, les deux espèces de diatomées dominantes sont *Nitzschia amphibia* et *Nitzschia palea*, appartenant au guildes « *motile* » comme pour les taxa précédemment cités. Guasch et al. (1998) qualifiaient *Navicula menisculus*, *Navicula lanceolata* et *N. palea* de taxa tolérants à l'atrazine. Il est intéressant de noter que *A. minutissimum* est une colonisatrice, et que cette catégorie regroupe des espèces capables de résister à de sévères « insultes chimiques » pour reprendre l'expression de Rimet et Bouchez (2011). *A. minutissimum* voyait son abondance diminuer en contact avec le métolachlore (Roubeix et al. 2011a) pour de fortes concentrations ( $30 \mu\text{g.L}^{-1}$ ). Enfin pour la deuxième étude (**Article 5**), les deux espèces dominantes sont, comme précédemment, *A. minutissimum* et *Diatoma tenuis*. *D. tenuis* appartenant au guildes de la catégorie « *high profile* » (considéré comme sensible aux pesticides), coloniale et pédonculée (**Figure 5, article 5**). Les taxa pédonculés sont connus pour être les meilleurs dans l'exploitation des nutriments dissous. Peut être qu'avec l'utilisation d'eau de rivière très pauvre en nutriment dans le cadre de cette étude, cette espèce était avantagée.

Il semble en effet intéressant de considérer la « forme de vie » des diatomées comme paramètres d'évaluation de la toxicité d'un polluant et surtout intègre la communauté dans son ensemble et non espèce par espèce. Des études complémentaires sont à réaliser afin de consolider ces premiers résultats sur un herbicide de la famille des chloroacétanilides. Plusieurs études conduites en micro, mésocosmes et *in situ* utilisant également la composition taxonomie classique (Pérès et al. 1996 ; Guasch et al. 1998 ; Dorigo et al. 2004 ; Morin et al. 2009) ont trouvé des résultats comparables : les taxa sélectionnés par les pesticides tendent à être des taxa appartenant au guildes « *motile* ».

La suite des recherches consisterait à réaliser 3 approches : (i) répéter ces expériences en mésocosmes ou microsomes pour valider les résultats obtenus dans le cadre de ce travail

avec un meilleur contrôle des concentrations enalachlore et une diversité plus importante du nombre de descripteurs, (ii) travailler à plus large échelle avec des données concernant la liste des diatomées, données chimiques, etc..., afin de tester *in situ* les hypothèses sur l'utilisation des biofilms phototrophes dans la bio-indication mise en place en laboratoire et (iii) travailler à l'échelle d'un bassin versant pilote afin de valider ce type de bio-indicateurs. Pourquoi lors de nos 3 expérimentations, le seuil de tolérance comme défini par Clement et Newman (2002) des communautés bactériennes n'a-t-il pas été atteint ? La réponse est à rechercher parmi (i) le mode d'action de l'alachlore qui le rend faiblement toxique, (ii) sa biodégradation potentielle par une enzyme, la GST présente chez les Procaryotes et les Eucaryotes, (iii) les interactions antagonistes ou synergiques des effets de l'alachlore avec les effets d'autres facteurs biotiques (immigration, **Article 5** ; évolution temporelle, **Articles 4 et 6**) ou avec les effets d'une autre perturbation (transfert des biofilms vers les microcosmes), et (iv) la disparition de l'alachlore au cours du temps pour les expériences en batch (**Articles 4 et 6**), ce qui illustre une contamination de type « épisode de crue ». Finalement de nombreuses questions restent encore ouvertes malgré le choix de travailler en microcosmes pour simplifier le système. Dans ce contexte, pour s'affranchir des changements liés à la dynamique temporelle de l'agrégat et augmenter le niveau de réalisme de cette approche écotoxicologique, la stratégie consisterait peut-être à cultiver les biofilms *in situ* le long d'un gradient de pollution et d'y appliquer des descripteurs fonctionnels ou structurels (production primaire, typage moléculaire etc. . . ).

# Conclusion générale et perspectives





Comme suggéré par Battin et al. (2003a), le biofilm peut s'apparenter à un paysage microbien " *to emphasize their spatially explicit dimension, and to lay the foundation for a unifying theoretical basis that supports and guides the relationships between biodiversity, ecosystem function and the effects of scales (composition, structure or function)*". En milieu aquatique, les communautés microbiennes benthiques des biofilms phototrophes semblent être de bons outils dans la compréhension de cette relation par :

- leur caractère ubiquiste,
- leur variété de biodiversité et de fonctions,
- leur capacité à intégrer rapidement tous changements environnementaux.

Notre étude a démarré d'un exemple de « service écologique », la biodégradation potentielle d'un herbicide, l'alachlore, réalisée en milieu aquatique par différentes communautés microbiennes (**Article 1**). Il s'est avéré que les trois communautés, provenant d'habitats différents (biofilms phototrophes de ruisseau et de fleuve et flocs de boues activées de station d'épuration), favorisent la disparition de l'herbicide en phase aqueuse. Cette disparition a comme conséquence directe une perte de la biodisponibilité de la molécule, limitant ainsi les risques de toxicité potentiels sur les organismes aquatiques, d'où ce qualificatif de « service écologique ». L'apparition des métabolites au sein des microcosmes nous a permis de vérifier l'hypothèse de la biodégradation, qui semble d'intensité similaire entre les communautés. La communauté qui présente la biomasse la plus élevée est responsable d'un taux de disparition plus important, pouvant traduire des phénomènes d'adsorption qui se rajoutent à la biodégradation effective. Ces résultats nous amènent à poser une question fondamentale : comment trois structures microbiennes provenant d'habitats différents peuvent porter une fonction similaire de biodégradation de l'alachlore ? Plusieurs tentatives de réponse sont possibles : (i) cette fonction est liée à certains micro-organismes ubiquistes des environnements aquatiques, comme c'est le cas pour les organismes nitrifiants ou dénitrifiants, (ii) les herbicides de la famille des chloroacétanilides sont connus pour être dégradés lors de réactions de conjugaison catalysées par une enzyme non spécifique, la Glutathione S-transférase présente chez la plupart des micro-organismes, (iii) cette fonction est associée à la maturation des communautés microbiennes, en quelque sorte programmée, elle suit un déterminisme autogène, comme le cas du potentiel de dénitrification qui apparaît dans un biofilm épais et mature (Lyautey 2005), ou encore (iv) la présence de cette fonction dépend de la composition de la communauté qui peut être associée à une certaine capacité de résistance vis-à-vis des effets de la molécule. En d'autres termes, la fonction de biodégradation est-elle contrôlée par des facteurs allogènes ou par des facteurs autogènes ?

Ainsi au cours de ce travail de recherche, à travers une compilation de différentes études *in situ* et différentes stratégies expérimentales conduites en microcosmes, nous avons contribué à l'amélioration des connaissances sur l'origine des fonctions qualifiées de « service écologique ».

Dans un premier temps, l'objectif était de comprendre les mécanismes par lesquels nous avons pu aboutir à l'image transitoire des deux communautés microbiennes de biofilms testées pour la biodégradation de l'alachlore. L'expérience réalisée *in situ* (**Article 2**) nous a confirmé l'influence de deux types de facteurs sur la structuration des biofilms, les facteurs allogènes et les facteurs autogènes (Lyautey 2005) qui contrôlent les successions des populations au sein de la communauté. Les facteurs allogènes, associés à des facteurs externes au biofilm et illustrant les différentes conditions environnementales des sites d'incubation, influencent principalement la structure des biofilms dans les premières étapes de leur développement alors que les facteurs autogènes, internes et propres au biofilm, deviennent prédominants essentiellement lorsque le biofilm est « mature ». La structure de l'agrégat est à la fois gouvernée par l'espace et par le temps (c'est-à-dire par la maturation). Le choix d'une stratégie de transplantation entre deux sites aux caractéristiques physico-chimiques contrastées, a provoqué la modification de la trajectoire des successions écologiques sans pour autant atteindre complètement la structure des communautés « autochtones » traduisant soit (i) une période de pré-transplantation trop longue aboutissant à un biofilm influencé principalement par les facteurs autogènes, soit (ii) une période post-transplantation trop courte pour atteindre le Climax, ou soit (iii) une double influence des facteurs allogènes et autogènes.

L'atteinte d'un bon état écologique des eaux de surface, un des objectifs de la Directive Cadre Européenne, nécessite un rétablissement (« *recovery* » en anglais) des écosystèmes aquatiques perturbés par les activités anthropiques. Le « *recovery* » d'un écosystème peut se définir comme la capacité pour un écosystème aquatique à retrouver l'état qu'il avait avant l'application de la perturbation. A travers ce phénomène de « *recovery* » des écosystèmes, la notion de résilience des communautés est à prendre en compte. C'est dans cette optique que de nombreuses études ont vu le jour, basées sur un *design* expérimental qui utilise une approche de transplantation pour tester la résilience *in situ* de communautés suite à une exposition dans des sites pollués (e.g. Teixeira et al. 2008 ; Mouton et al. 2009 ; Dorigo et al. 2010 ; Morin et al. 2010). C'est une stratégie particulièrement intéressante car elle permet d'intégrer l'influence de la maturation du biofilm sur sa structuration et les notions de trajectoire de successions écologiques. Travailler *in situ* rend difficile la possibilité de dissocier les facteurs allogènes des facteurs autogènes, et d'évaluer par la suite la part du déterminisme autogène sur la fonction de biodégradation de l'alachlore. Le seul moyen de dissocier ces deux facteurs est de s'éloigner

---

de l'environnement de la rivière et faire abstraction des facteurs externes pour se focaliser uniquement sur la croissance et la dynamique propre du biofilm et ne s'intéresser qu'à la notion d'agrégat. Comme souligné par des travaux antérieurs sur la dynamique de croissance des communautés de biofilms phototrophes *in situ* (Boulêtreau 2007), la maturation des communautés est gérée par deux fonctions, une fonction de croissance associée à une forte activité phototrophe, peu sensible à la lumière et contrôlée essentiellement par des facteurs externes, puis une fonction de perte de biomasse (minéralisation, autodétachement) engendrée par une activité bactérienne hétérotrophe. Cette dernière phase est basée sur le recyclage d'une partie des ressources accumulées dans le biofilm et dépendante de la température et de la présence ou pas de perturbations. Afin que ce phénomène de maturation mène à un autodétachement, aucune altération ne doit apparaître, ce qui est rarement le cas en rivière où les changements des conditions hydrodynamiques notamment, sont susceptibles de réinitialiser la croissance du biofilm. Dans une optique de supprimer toutes perturbations potentielles lors de la croissance de biofilm, notre stratégie fut de choisir un prototype de bioréacteur expérimenté au sein du laboratoire EcoLab pour la première fois dans le cadre de cette thèse, le bioréacteur annulaire rotatif (**Article 3**).

Dans ce cadre expérimental, seul l'épaississement de l'agrégat devient le moteur des propriétés structurelles et fonctionnelles, en contrôlant les successions des populations. Les biofilms produits se sont avérés être peu diversifiés en terme de diversité algale, mais présentent des successions écologiques amenant à des trajectoires d'évolution des structures des communautés et des biomasses finales différentes.

Malgré le caractère stochastique de l'étape de colonisation des biofilms ainsi que l'utilisation des inocula de nature et de diversité différentes, les diversités algales des biofilms sont identiques au terme de 7 semaines de culture. Plusieurs conclusions ressortent de cette étude :

- Dans un tel type de bioréacteur, le nombre final d'espèces algales ainsi que les successions des populations sont régis par un déterminisme autogène dans un environnement dépourvu de toute perturbation ;
- La biomasse, associée à une fonction de la communauté phototrophe, ne semble pas être uniquement gouvernée par un déterminisme autogène mais également par la composition de la communauté algale. A des communautés algales différentes sont associées des vitesses de croissance différentes aboutissant à des structures physiques différentes (biofilm plus ou moins compact, dense...). Une communauté de biofilm riche en diatomées présente une structure plus compacte qu'un biofilm riche en algues vertes. Qu'en est-il des fonctions apparentées aux communautés hétérotrophes (e.g. fonctions de biodégradation d'un herbicide), sont-elles gouvernées par la composition et donc par

---

des facteurs allogènes (lumière, nutriments, immigration, émigration...) ou sont-elles gouvernées par la maturation de l'agrégat ? Une réponse pourra être partiellement apportée par la mesure de différentes fonctions associées aux communautés hétérotrophes, incluant la biodégradation d'un polluant, ou encore leur capacité à utiliser différentes sources de carbone (Biolog) ;

- L'hypothèse du rôle primordial de la biodiversité dans la productivité des communautés (Loreau et al. 2001) n'est pas vérifiée ici, nous obtenons des niveaux de biomasses, avec des biofilms peu diversifiés, aussi importantes que ceux enregistrés antérieurement pour des biofilms plus riches en espèces algales.

## Intégrer l'écologie des communautés aux approches de l'écotoxicologie

Les résultats et analyses qui touchent à l'écologie des communautés nous montrent l'intérêt de tenir compte des successions écologiques et de leurs trajectoires dans la structuration des biofilms phototrophes, mais également la part d'influence des facteurs allogènes et auto-gènes dans l'évaluation du bon fonctionnement des écosystèmes. L'influence de la maturation du biofilm sur la stabilité de sa structure modifie sa sensibilité et sa tolérance à une perturbation et, par de là, sa capacité potentielle à « épurer » les eaux de surface. Ce qui revient à intégrer à l'échelle de l'agrégat ses différents stades de maturation (biofilms jeunes ou matures, fins ou épais) et son histoire. L'intégration de ces deux traits durant l'analyse de la réponse des communautés à une exposition à un herbicide a été réalisée à travers 3 approches expérimentales en microcosmes.

D'une manière générale, ces travaux nous ont permis de formuler les conclusions suivantes :

- Globalement, l'alachlore, susceptible d'affecter directement ou indirectement les communautés microbiennes, semble avoir un impact particulièrement marqué sur les descripteurs de biomasse comme la chlorophylle *a* et la matière sèche sans cendre. Ces descripteurs sont par exemple souvent considérés comme peu sensibles à des contaminations par des inhibiteurs de la photosynthèse (Montuelle et al. 2011). Ce qui rend notre travail de recherche original, c'est le choix de l'herbicide testé. La plupart des études écotoxicologiques travaillent préférentiellement sur des molécules inhibitrices de la photosynthèse, qui présentent des effets directs uniquement sur les communautés phototrophes, permettent une quantification et une détection plus rapide et plus facile des effets que ce soit au niveau des communautés phototrophes (par exemple mesure

- de la photosynthèse) ou des communautés hétérotrophes impactées uniquement par des effets indirects ;
- Un effet dose important sur la biomasse quelle que soit la stratégie expérimentale utilisée (**Articles 4, 5 et 6**). Pour des concentrations en alachlore proches des concentrations détectées dans les eaux de surface, les effets sont limités ;
  - Les sensibilités à l’alachlore de la part de biofilms considérés comme « matures » sont différentes. La sensibilité a-t-elle une origine et une explication liées à la composition de la communauté, en d’autres termes à l’influence des facteurs allogènes ? Cette hypothèse reste à vérifier. Lors de résultats préliminaires, il est apparu que la tolérance du biofilm le moins sensible pouvait être expliquée par une augmentation de l’activité de la GST. Cottingham et al. (1993) ont observé également une corrélation entre l’activité de la GST et la tolérance, mais pas entre la quantité de GST et la tolérance chez le maïs. Dans ce cas, la tolérance ne viendrait pas exclusivement de la composition en espèces mais serait gouvernée par l’induction de l’activité de la GST. Quels sont les mécanismes qui induisent cette augmentation de l’activité de la GST en présence de l’alachlore et limite ainsi sa toxicité vis-à-vis des communautés ? Pourquoi si cette enzyme est présente chez les procaryotes et les eucaryotes, certaines communautés de biofilms phototrophes dans cette étude ou lors d’études antérieures (Spawn et al. 1997 ; Roubex et al. 2011a) restent-elles sensibles aux chloroacétanilides ?
  - Deux notions importantes non abordées dans le cadre de ce travail de recherche, mais à intégrer lors de prochains travaux, sont la structure physique et l’architecture du biofilm (élasticité, compacité, cohésion...) et sa composition en exopolymères (EPS). Ces deux paramètres peuvent influencer la capacité du biofilm à adsorber la molécule dans sa matrice, ce qui augmente ou pas les surfaces de contact. Les EPS sont le siège d’activités enzymatiques à l’origine de nombreuses fonctions dont certaines susceptibles d’être qualifiées de « service écologique ». Evaluer l’impact d’un polluant sur les EPS présente donc un intérêt écologique pertinent. La structure physique et l’architecture du biofilm sont en grande partie gouvernées par l’hydrodynamique (Battin et al. 2003b). Par l’expérience en mini-bioréacteurs (**Article 5**), il a été montré que l’alachlore pouvait engendrer des effets sur la composition de certaines lectines, ce qui peut modifier la cohésion du biofilm et son appétence vis-à-vis des brouteurs. Battin et al. (2003b) enregistraient une utilisation des substrats organiques plus importante pour des biofilms colonisés sous de fortes vitesses de courant. Les auteurs attribuaient ces observations à la résistance diffusive plus forte durant les traitements à vitesse de courant rapide. La couche limite externe est plus mince avec un débit rapide, mais avec une résistance

---

interne de diffusion plus forte en raison de l'épaisseur réduite et la densité de surface. De même Stevenson et al. (1996) stipulait que des communautés algales colonisant des milieux à forts débits présentaient une structure étroitement adhérente aux supports de colonisation et compacte alors que des communautés algales colonisant des milieux à faibles débits présentaient une architecture très aérée. Vu la très bonne connaissance des conditions hydrodynamiques des écoulements (profil de vitesse et contraintes de cisaillement) appliquées à la surface des biofilms cultivés au sein de notre bioréacteur RAB, il serait intéressant d'associer une dynamique de croissance du biofilm avec l'étude de son architecture et de sa structure physique en parallèle des mesures de différentes fonctions apparentées à la fois aux communautés hétérotrophes (exemple, fonction de biodégradation) et phototrophes (production primaire) et de leurs tolérances à l'alachlore ;

- L'hypothèse biodiversité - stabilité décrite par MacCellan (2000), qui souligne qu'une communauté diversifiée est d'autant plus stable qu'elle présente une tolérance plus importante face à une perturbation. Une partie de nos résultats (**Article 4**) ne montre pas de tolérance particulière à l'alachlore pour des biofilms faiblement diversifiés en termes de communauté algale. Kaufman (1982) observait que les communautés obtenues dans un environnement hautement variable étaient plus tolérantes que celles provenant d'un environnement stable. Cette hypothèse va dans le sens que les communautés dans un habitat perturbé naturel sont pré-adaptées à des perturbations et ainsi sont plus résistantes à des pressions anthropiques ;
- Une des difficultés récurrentes rencontrées durant les 3 expériences en microcosmes est de vouloir associer un changement de la communauté à la présence de l'alachlore. Il est très difficile d'affirmer si l'alachlore ne présente pas d'effet sur la structure des communautés algales ou bactériennes ou si ses effets potentiels sont masqués par d'autres facteurs. Pour les expériences réalisées en microcosmes (**Articles 4 et 6**), les conséquences d'un transfert des biofilms entre leur lieu de production (*in situ* ou le RAB) et les microcosmes des expériences écotoxicologiques interagissent très souvent avec les conséquences potentielles que peut avoir l'alachlore sur les communautés. En effet ce transfert peut générer un stress, rendant les communautés beaucoup moins sensibles à un second stress, dans notre cas l'exposition à un herbicide et cela malgré l'intégration d'une phase d'acclimatation lors des deux expériences. Le *design*, l'approche expérimentale et le choix des conditions opératoires sont importants.
- L'évolution temporelle est également un facteur critique lors de nos expériences en microcosmes. Les changements induits par la dynamique de croissance du biofilm masquent

---

le plus souvent les effets de l'alachlore, et cela quel que soit le stade de maturation testé. Ainsi l'évolution temporelle de l'agrégat a une influence prépondérante sur la structure des communautés bactériennes et de diatomées ;

- Le dernier facteur difficilement contrôlable lors de nos expériences est le comportement de la molécule. Pour les deux expériences en batch, l'exposition imposée aux communautés de biofilms s'apparente finalement à des expositions de quelques jours et peuvent illustrer des types d'exposition souvent enregistrés *in situ* durant des épisodes de crues. Plusieurs mécanismes sont susceptibles de participer à la disparition de l'alachlore, photodégradation, volatilisation, biodégradation, adsorption sur la biomasse ou les surfaces des microcosmes. Malgré certaines précautions, il est délicat de contrôler l'ensemble de ces mécanismes, surtout que d'une expérience à l'autre, le comportement des molécules de la famille des chloroacétanilides peut varier. Roubéix et al. (2011a) ne détectaient pas de dissipation du métolachlore durant leur expérience de 20 jours en microcosmes, inversement Debenest et al. (2009) observaient une disparition. Laabs et al. (2007) ainsi que Bohuss et al. (2005) n'expliquaient pas plus de 1 % de la disparition de l'acétolachlore ou de l'alachlore par des mécanismes d'adsorption, alors que certains de nos résultats suggèrent des phénomènes importants d'adsorption (**Articles 1 et 4**). D'un point de vue analytique, le suivi du comportement de l'alachlore dans les dispositifs de laboratoire peut être amélioré. Par exemple, une technique couramment utilisée est la méthode de radiorespirométrie (exemple, Lawrence et al. 2001 ; Pesce et al. 2010), qui mesure la quantité de CO<sub>2</sub> produit à l'issue de la biodégradation de la molécule. Cette méthode est couplée à l'utilisation de la molécule d'alachlore radiomarquée. De même pour évaluer l'adsorption potentielle d'une molécule, il est possible d'utiliser la microscopie à balayage par transmission de rayons X (STXM, « *Scanning Transmission X-ray Microscope* ») (Dynes et al. 2006), cette technique mesure la répartition spatiale d'une molécule dans le biofilm. Dans le cadre de ce travail, quelques échantillons de biofilms exposés à l'alachlore, de quelques heures à plusieurs semaines ont été analysés par G. Swerhone et J.R. Lawrence (Environnement Canada). Des analyses complémentaires sont à réaliser car pour le moment, il nous est impossible de différencier piégés dans une cellule diatomique, les lipides de l'alachlore. Il est nécessaire de prendre certaines précautions en intégrant par exemple des traitements expérimentaux pour éliminer l'ensemble des hypothèses de la disparition de la molécule par voies non biologiques (photolyse, photodégradation...), réaliser systématiquement le dosage de la molécule testée dans la biomasse des biofilms, et détecter les principaux métabolites connus. Il nous semble important, en amont des expériences écotoxicologiques,

de connaître parfaitement bien les paramètres biotiques (biodégradation, adsorption) ou abiotiques (lumière, température...) susceptibles d'influencer le polluant testé ainsi que leur niveau de pertinence. La notion de successions écologiques est également à prendre en compte dans l'évaluation du comportement de l'alachlore. Des études sur les métaux ont déjà pu le souligner, le stade de maturation lié à l'épaississement du biofilm gouverne les mécanismes de bioaccumulation des polluants (Duong et al. 2010).

## Des approches expérimentales en microcosmes vers une stratégie d'approche *in situ*

Il existe de nombreuses études écotoxicologiques, décrivant la réponse des biofilms phototrophes aux herbicides. Chaque expérience présente son propre *design* expérimental, tels que le dispositif expérimental, les descripteurs structurels ou fonctionnels, les conditions opératoires, le niveau biologique intégré, le polluant, les concentrations en polluant etc... Tout ceci rend difficile, voir même impossible, la comparaison de ces études. Chacun y va de sa conclusion en essayant d'expliquer tant bien que mal les différences ou les similarités d'une expérience à l'autre. Les expériences en microcosmes, très utilisées ces dernières années, ont l'avantage de présenter un bon compromis entre le réalisme, mais aussi la complexité, des études réalisées *in situ*, et la simplification à l'extrême des bio-essais monospécifiques. L'époque des « cosmes » a apporté dans l'étude des relations communautés - polluants une première compréhension nécessaire des effets de certains polluants vis-à-vis de communautés suivant leur mode d'action. Mais pour être pertinent d'un point de vue écologique, et répondre aux exigences de la Directive Cadre Européenne sur le bon état écologique et si nous souhaitons comprendre à quel niveau une perturbation peut engendrer des changements dans le fonctionnement des écosystèmes, les expériences en microcosmes sont limitées pour relier l'écologie des communautés au fonctionnement des écosystèmes. Depuis quelques années, la tendance est un retour aux études *in situ*. Travailler à des niveaux de complexité plus importants permet :

- De mieux intégrer le biofilm dans son environnement, et de ne plus le voir seulement comme un agrégat, mais en interaction avec des niveaux biologiques supérieurs, les brouteurs, etc.(Lawrence et al. 2002) ;
- D'intégrer la notion de multi-perturbations, le cas des épisodes de crue, durant lesquels l'hydrodynamique, la lumière, les particules en suspension et des concentrations en pesticides se côtoient (Villeneuve et al. 2011b et c) ;



- 
- De faire abstraction de certaines contraintes liées aux études en microcosmes. Travailler au niveau d'un gradient de pollution peut limiter les difficultés à distinguer entre les effets relatifs des pressions de sélection dues à la pollution par les xénobiotiques et celles résultant des facteurs environnementaux dits de « confusion » (Molander 1991). Il est important de caractériser une « *base-line Tolerance* » (Molander 1991) ;
  - Un des objectifs de l'ingénierie écologique est la réhabilitation des écosystèmes. La plupart des études mettant en évidence les mécanismes de résilience des communautés de biofilms sont réalisées dans le cadre de techniques de transplantation utilisées comme lors de notre première expérience *in situ* (**Article 2**). En effet, l'avantage de ces techniques, c'est leur réalisme, elles permettent d'intégrer un ensemble de paramètres, des niveaux biologiques différents, et les multi-perturbations que subissent constamment les communautés.

Mais travailler *in situ* implique de construire une stratégie d'échantillonnage et d'acquisition de données physico-chimiques importante, couplée à des analyses multivariées, afin de comprendre l'influence des facteurs sur la structuration des biofilms (Villeneuve et al. 2011c).

## Vers un modèle de bio-indication ?

Pour répondre aux enjeux de la Directive Cadre Européen qui souhaite réintégrer un bon état écologique et surveiller l'état des milieux aquatiques, il est important de définir ce qu'est un bon état écologique. Pour cela, la communauté scientifique s'est tournée vers l'utilisation de bio-indicatrices de la qualité de l'eau.

Les diatomées des biofilms sont largement utilisées comme bio-indicateurs de la qualité des eaux, qui sont souvent basées sur la composition (indice BID, Coste et al. 2009). De nombreuses études ont pu mettre en évidence un lien entre la forme anormale des frustules et la présence de métaux (Morin et al. 2009). De même, quelques études récentes concernent la relation entre la forme anormale des frustules et la présence des pesticides, pour différents modes d'action, inhibiteur de la photosynthèse (Schmitt-Jansen et Altenburger 2005), de l'expression des gènes (maleichydrazide, Debenest et al. 2008) et de la synthèse de lipides (métolachlore, Roubéix et al. 2011a). De récentes études se sont penchées sur les communautés bactériennes des biofilms, les suggérant pertinentes comme indicatrices de qualité des eaux douces (Lear et al. 2010). Certains de nos résultats s'inscrivent dans cette optique d'utiliser *a posteriori* l'apparition de formes anormales des diatomées comme une indication de la présence d'une pollution par les pesticides (**Article 4**). Nos 3 expériences en microcosmes suggèrent bien la faible pertinence et sensibilité de la composition des diatomées comme indicateur soit parce que (i) l'alachlore sélectionne les diatomées sensibles avant même leurs

fixations sur les supports de colonisation, (ii) soit la composition est un paramètre assez peu sensible à de faibles concentrations en alachlore et dépendante du temps d'exposition ( $30 \mu\text{g.L}^{-1}$ , **Article 4**), comme observé pour une étude antérieure sur le métolachlore (famille des chloroacétanilides) (Roubeix et al. 2011a). Certaines espèces présentent un seuil de tolérance élevé que d'autres. Généralement les espèces dominantes des communautés de diatomées au sein des biofilms utilisés pour les expériences sont reconnues pour être tolérantes aux herbicides. Rimet et Bouchez (2011) proposaient d'utiliser le mode de vie des diatomées (mobile, pionnière, colonisatrice...) comme indicateur de pollution. Par exemple, les auteurs qualifiaient les espèces pionnières et très mobiles comme tolérantes aux herbicides (Rimet et Bouchez 2011). D'après nos résultats (**Article 4**), il est important d'intégrer également l'analyse au niveau du morphotype. En effet, pour une même espèce de diatomées (*A. minutissimum*), les deux morphotypes ne présentent pas le même comportement, un morphotype présentant des formes anormales de leurs frustules à de fortes concentrations en alachlore. Des études supplémentaires seraient à réaliser dans ce sens.

Les bio-indicateurs sont traditionnellement basés sur la mesure d'indicateurs structuraux comme la qualité de l'eau (mesure analytique), la composition de différents organismes (invertébrés, diatomées...). Ces choix de base pour les bio-indicateurs excluent les indicateurs relatifs à de grandes fonctions contribuant au bon fonctionnement des écosystèmes (production primaire, dégradation de la matière). L'avantage de tels indicateurs est de fournir directement une image de la qualité du fonctionnement ou du dysfonctionnement de l'écosystème (Garabetian 2007).

La sensibilité des biofilms à une pollution et leur réponse rapide est maintenant bien établie (Sabater et al. 2006), il reste à réaliser des recherches pour trouver des critères de bio-indication. Ceci pourrait être une association de métriques de structure, diversité et fonction (Eisman et Montuelle 1999; Lawrence et al. 2003) afin de refléter les multiples dimensions des communautés au service des écosystèmes. Il est important de relier des métriques de fonction liés aux communautés photo-autotrophes (production primaire) et aux communautés hétérotrophes (biodégradation).

Des contaminations chroniques à long terme de l'ordre de  $1 \mu\text{g.L}^{-1}$  induisent des changements plus importants sur la structure des communautés bactériennes que des contaminations de  $14 \mu\text{g.L}^{-1}$  à court terme, suggérant une adaptation de la communauté (Tlili et al. 2008). C'est basé sur cette notion de tolérance, que le concept PICT a vu le jour (voir la synthèse de Tlili 2011, avantages et défauts de ce concept). Ce concept fait état que la tolérance d'une communauté à un contaminant est reliée à son exposition antérieure à ce contaminant ou à d'autres contaminants qui appartiennent à la même famille.

Nos 3 expériences écotoxicologiques participent à l'amélioration de nos connaissances des effets d'un herbicide, inhibiteur de l'élongation des acides gras, sur les communautés de biofilms phototrophes à travers différents descripteurs de mesure, qu'il sera nécessaire d'élargir, pour une meilleure identification et distinction de la toxicité de ce type d'herbicide.

Pour être capable d'évaluer les effets d'un polluant afin de surveiller, de réhabiliter ou/et d'obtenir une image parfaite de l'état écologique d'un écosystème, plusieurs facteurs sont à prendre en compte nécessitant une approche interdisciplinaire, au croisement de l'écologie des communautés, du fonctionnement des écosystèmes et de la chimiodynamique des polluants. Chaque facteur représente une partie de cette mosaïque, dont seulement une partie fut mentionnée dans le cadre de nos différentes stratégies expérimentales (**Figure 60**).

Ce travail de thèse s'inscrit dans une optique de désigner et proposer des bio-indicateurs pour la détection rapide de pollution, la résilience d'un écosystème, et les conséquences sur les « services écologiques », dans un souci d'obtenir une image parfaite de l'état écologique des écosystèmes. Beaucoup de questions restent encore ouvertes, mais de nombreux travaux, dont ce travail de thèse, désignent les biofilms phototrophes comme :

- de très bons candidats comme modèle d'étude pour une meilleure connaissance des relations biodiversité - fonction des écosystèmes, pour l'analyse des effets des perturbations anthropiques et leur contribution fonctionnelle aux services écologiques rendus ;
- de bons outils prometteurs en tant que bio-indicateurs de la qualité des eaux lorsqu'ils sont associés à une approche multimétrique. Mais la validation de ce type d'outil reste encore à vérifier, à travers de multiples expériences *in situ*, afin de mieux comprendre comment se hiérarchisent les facteurs environnementaux les uns par rapport aux autres dans l'objectif de différencier au mieux les impacts des pesticides des impacts des autres facteurs, et pour d'autres types de perturbations, changements climatiques, pollution par les métaux, les pesticides ou les nouvelles molécules émergentes (résidus médicamenteux). Il est indispensable d'intégrer la dynamique naturelle du biofilm, sa variabilité et sa sensibilité à l'ensemble des différents facteurs biotiques et abiotiques qui conditionnent sa structure et qualifiés de « facteurs de confusion » lors de l'évaluation de la présence d'une pollution (Dorigo et

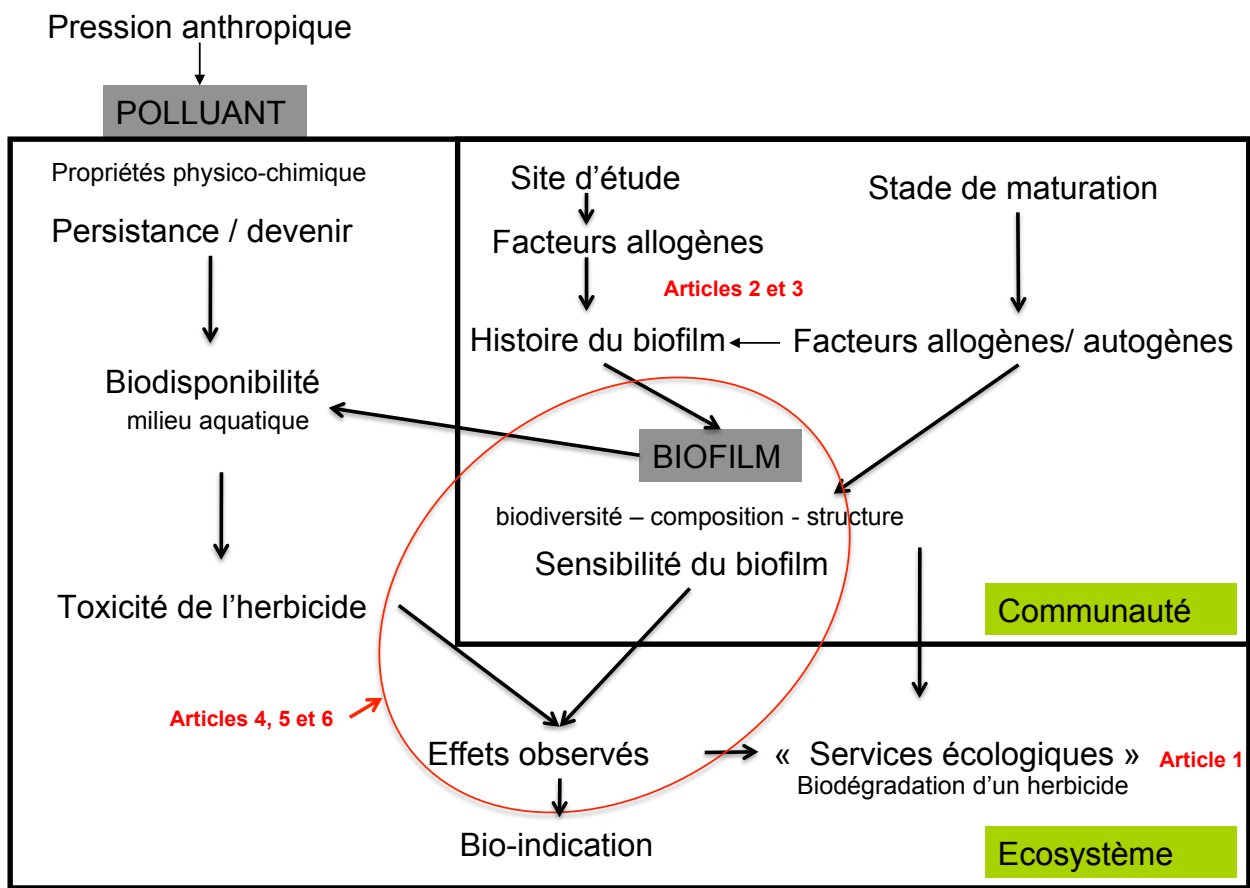


Figure 60 – Les concepts et leurs relations abordées dans le cadre de ce travail de recherche

al. 2009).

Dans un objectif de pertinence écologique et comme montré au cours de ce travail de thèse, il est important d'intégrer à la notion de biofilm, la dimension temporelle en le considérant comme une entité dynamique afin de tenir compte du concept de succession écologique (Prach et Walker 2011).

# Annexe

Famille chimique	Substance active	Hydrosolubilité (mg L <sup>-1</sup> )	Log K <sub>oc</sub>
Triazoles	Tebuconazole	32	3,7
	Flusilazole	900	NR
	Cyproconazole	140	2,91
	Epoxyconazole	NR	3,44
Toluidines	Trifuraline	1	4,83
	Pendimethaline	0,3	5,18
Urée Substituées	Linuron	81	3
	Isoproturon	55	2,25
	Chlorotoluron	70	2,2
	Monolinuron	735	2,25
Chloro S Triazines	Tetbuthylazine	8,5	3,2
	Atrazine desethyl	6	2,75
	Simazine	6	2
S triazines	Hexazinone	298	1,19
	Aclonifen	2,5	4,37

**Tableau 16** – Liste des molécules de pesticides recherchés et leurs principales caractéristiques physico-chimiques. K<sub>oc</sub> désigne le coefficient de partage carbone organique / eau. Il donne indication sur l'aptitude de la molécule à s'adsorber sur la matière organique. NR = Donnée Non répertoriée

## Protocole de dosage de l'alachlore et de ses deux métabolites de l'alachlore (H. Preud'hommes)

### 1.1. Material

An Acquity UPLC system (Waters Corp., Milford, MA) including a binary solvent pump, a cooled autosampler, an Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub> column, 50 mm x 2.1 mm (1.7 μm particles, Waters) with a matching Vanguard precolumn was used.

The detectors were: a diode-array UV detector (Acquity) used at 265 nm, a XevoTQ (quadrupole-T-wave-quadrupole in scan wave mode) MS with an orthogonal Z-spray-electrospray interface (Waters, Milford, MA). A hybrid mass spectrometer ESI - QTOF (QSTAR XL, Sciex, ON, Canada) was used in the method development.

### 1.2. Procedures

#### 1.2.1. Chromatographic separation

The parameters studied included: mobile phase composition (H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN containing 0.1% of HCOOH or CH<sub>3</sub>COOH), LC-gradients and column (Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub> column: 2.1mm x 50mm, particle size 1.7 μm). Because of the target analytes and the detection in ESI<sub>neg</sub> / ESI<sub>pos</sub> mode, it was decided not to work with an ion-pairing agent, such as trifluoroacetic acid (TFA) or heptafluorobutyric acid (HFBA).

Mobile phase was a mixture of water (A) and acetonitrile (B), both containing 0.1% HCOOH. The elution gradient (non-linear hyperbole) was: 0 min (5% B), 0.2 min (10% B), 1.8 min (28% B), 2.5 min (80% B), 3.2 min (80% B), and 4 min (5% B) for 1 min. The gradient steps after 2.5 min served to clean and re-equilibrate the column to guarantee the repeatability of the analysis. Total analysis time was 5 min, column equilibration included. The injected volume was 25 μL (or 50μL if a sample was diluted). The flow rate was 0.65 ml/min, the column temperature was 45°C and the autosampler temperature was 5°C.

#### 1.2.2. Mass spectrometric conditions

MS/MS data acquisition was performed with the electrospray source operating in negative mode (ESI<sub>neg</sub>) under the MRM conditions listed in Supplementary Data file. The optimized values for the Xevo TQ MS instrument were: capillary voltage 2.50 kV in negative mode and 3,5kV in

positive mode; source temperature 150°C; desolvation temperature 400°C; extractor voltage 3V; RF lens 0.4 V. Nitrogen was used as both the nebulizing gas and the desolvation gas. Cone gas and desolvation gas flows were set at 20 L/h flow and 1000 L/h respectively. Argon was used as collision gas with a pressure of  $2 \times 10^{-3}$  mbar in the T-wave cell. Dwell times of 0.040 s/scan for Alachlor and 0.080 s/scan for ESA and OA, were selected. The Masslynx software (Waters Corp., Milford, MA) was used to process data. Quantification was based on peak area.



# Bibliographie

- Abate, G., Masini, J. C., 2005. Sorption of atrazine, propazine, deethylatrazine, deisopropylatrazine and hydroxyatrazine onto organovermiculite. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 16 (5), 936–943.
- Abrantes, N., Pereira, R., Goncalves, F., 2010. Occurrence of pesticides in water, sediments, and fish tissues in a lake surrounded by agricultural lands : Concerning risks to humans and ecological receptors. *Water Air and Soil Pollution* 212 (1-4), 77–88.
- Admiraal, W., Barranguet, C., van Beusekom, S. A. M., Bleeker, E. A. J., van den Ende, F. P., van der Geest, H. G., Groenendijk, D., Ivorra, N., Kraak, M. H. S., Stuijzand, S. C., 2000. Linking ecological and ecotoxicological techniques to support river rehabilitation. *Chemosphere* 41 (1-2), 289–295.
- Admiraal, W., Blanck, H., Buckert-De Jong, M., Guasch, H., Ivorra, N., Lehmann, V., Nystrom, B. A. H., Paulsson, M., Sabater, S., 1999. Short-term toxicity of zinc to microbenthic algae and bacteria in a metal polluted stream. *Water Research* 33 (9), 1989–1996.
- Aga, D. S., Thurman, E. M., 2001. Formation and transport of the sulfonic acid metabolites of alachlor and metolachlor in soil. *Environmental Science & Technology* 35 (12), 2455–2460.
- Albanis, T. A., Hela, D. G., Sakellarides, T., Konstantinou, I. K., 1998. Monitoring of pesticide residues and their metabolites in surface and underground waters of imathia (n. greece) by means of solid-phase extraction disks and gas chromatography. *Journal of Chromatography A* 823 (1-2), 59–71.
- Aloi, J., 1990. A critical review of recent freshwater periphyton field methods. *Canal Journal fish Aquatic sciences* 47, 656–670.
- Amann, R. I., Ludwig, W., Schleifer, K. H., 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial-cells without cultivation. *Microbiological Reviews* 59 (1), 143–169.
- Andersen, R., Kawachi, M., 2005. Traditional microalgae isolation techniques. In : Andersen, R. (Ed.), *Algal culturing techniques*. Elsevier, San Diego.
- Anderson-Glenna, M. J., Bakkestuen, V., Clipson, N. J. W., 2008. Spatial and temporal variability in epilithic biofilm bacterial communities along an upland river gradient. *Fems Microbiology Ecology* 64 (3), 407–418.
- Ansara-Ross, T. M., Wepener, V., Van den Brink, P. J., Ross, M. J., 2008. Probabilistic risk assessment of the environmental impacts of pesticides in the crocodile (west) marico catchment, north-west province. *Water Sa* 34 (5), 637–644.
- APHA, 1992. *Standart methods forthe examination of water and wastewater*. American Public Health Association, Washington.
- Araya, R., Tani, K., Takagi, T., Yamaguchi, N., Nasu, M., 2003. Bacterial activity and community composition in stream water and biofilm from an urban river determined by fluorescent in situ hybridization and dge analysis. *Fems Microbiology Ecology* 43 (1), 111–119.
- Augspurger, C., Karwautz, C., MuBmann, M., Daims, H., Battin, T., 2010. Drivers of bacterial colonization patterns in stream biofilms. *FEMS Microbial Ecology* 72, 47–57.
- Austin, A. P., Harris, G. E., Lucey, W. P., 1991. Impact of an organophosphate herbicide (glyphosate) on periphyton communities developed in experimental streams. *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 47 (1), 29–35.
- Azam, F., Fenchel, T., Field, J. G., Gray, J. S., Meyerreil, L. A., Thingstad, F., 1983. The ecological role of water-column microbes in the sea. *Marine Ecology-Progress Series* 10 (3), 257–263.

- Azim, M., Beveridge, M., van Dam, A., Verdegen, M., 2005. Periphyton and aquatic production : an introduction. In : Azim, M., Beveridge, M., van Dam, A., Verdegen, M. (Eds.), *Periphyton : Ecology, Exploitation, and Management*. CABI Publishing, Cambridge, MA, USA, pp. 1–13.
- Bahena, C. L., Martinez, S. S., 2006. Photodegradation of chlorbromuron, atrazine, and alachlor in aqueous systems under solar irradiation. *International Journal of Photoenergy*, 1–6.
- Barbiero, R. P., 2000. A multi-lake comparison of epilithic diatom communities on natural and artificial substrates. *Hydrobiologia* 438 (1-3), 157–170.
- Barcelo, D., Sabater, S., 2010. Water quality and assessment under scarcity : Prospects and challenges in mediterranean watersheds. *Journal of Hydrology* 383 (1-2), 1–4.
- Barranguet, C., Van Beusekom, S., Veuger, B., Neu, T., Manders, E., Sinke, J., Admiraal, W., 2004. Studying undisturbed autotrophic biofilms : still a technical challenge. *Aquatic Microbial Ecology* 34, 1–9.
- Barranguet, C., van den Ende, F. P., Rutgers, M., Breure, A. M., Greijdanus, M., Sinke, J. J., Admiraal, W., 2003. Copper-induced modifications of the trophic relations in riverine algal-bacterial biofilms. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22 (6), 1340–1349.
- Barranguet, C., Veuger, B., Van Beusekom, S. A. M., Marvan, P., Sinke, J. J., Admiraal, W., 2005. Divergent composition of algal-bacterial biofilms developing under various external factors. *European Journal of Phycology* 40, 1–8.
- Barriuso, E., Calvet, R., Schiavon, M., Soulas, G., 1996. Les pesticides et les polluants organiques des sols - Transformations et dissipation.
- Batissou, I., Crouzet, O., Besse-Hoggan, P., Sancelme, M., Mangot, J. F., Mallet, C., Bohatier, J., 2009. Isolation and characterization of mesotrione-degrading bacillus sp from soil. *Environmental Pollution* 157 (4), 1195–1201.
- Battaglin, W., Fairchild, J., 2002. Potential toxicity of pesticides measured in midwestern streams to aquatic organisms. *Water Science and Technology* 45 (9), 95–102.
- Battaglin, W. A., Furlong, E. T., Burkhardt, M. R., Peter, C. J., 2000. Occurrence of sulfonylurea, sulfonamide, imidazolinone, and other herbicides in rivers, reservoirs and ground water in the midwestern united states, 1998. *Science of the Total Environment* 248 (2-3), 123–133.
- Battin, T. J., Kaplan, L. A., Newbold, J. D., Hansen, C. M. E., 2003a. Contributions of microbial biofilms to ecosystem processes in stream mesocosms. *Nature* 426 (6965), 439–442.
- Battin, T. J., Kaplan, L. A., Newbold, J. D., Cheng, X. H., Hansen, C., 2003b. Effects of current velocity on the nascent architecture of stream microbial biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* 69 (9), 5443–5452.
- Battin, T. J., Sengschmitt, D., 1999. Linking sediment biofilms, hydrodynamics, and river bed clogging : Evidence from a large river. *Microbial Ecology* 37 (3), 185–196.
- Belanger, F. C., Laramore, C., Bonos, S., Meyer, W. A., Day, P. R., 2000. Development of improved turfgrass with herbicide resistance and enhanced disease resistance through transformation. In : *Fate and Management of Turfgrass Chemicals*. Vol. 743 of *Acs Symposium Series*. pp. 325–329.
- Belanger, S. E., Bowling, J. W., Lee, D. M., LeBlanc, E. M., Kerr, K. M., McAvoy, D. C., Christman, S. C., Davidson, D. H., 2002. Integration of aquatic fate and ecological responses to linear alkyl benzene sulfonate (las) in model stream ecosystems. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 52 (2), 150–171.
- Bérard, A., 1996. Effect of organic four solvents on natural phytoplankton assemblages : Consequences for ecotoxicological experiments on herbicides. *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 57 (2), 183–190.

- Bérard, A., Pelte, T., Menthon, E., Druart, J. C., Bourrain, X., 1998. Characterisation of phytoplankton from two limnic systems contaminated by a herbicidal photosynthetic inhibitor. the pict method (pollution-induced community tolerance) : application and significance. *Annales de Limnologie-International Journal of Limnology* 34 (3), 269–282.
- Berthon, V., Bouchez, A., Rimet, F., 2011. Using diatom life-forms and ecological guilds to assess organic pollution and trophic level in rivers : a case study of rivers in south-eastern france. *Hydrobiologia* 673 (1), 259–271.
- Besemer, K., Singer, G., Limberger, R., Chlup, A. K., Hochedlinger, G., Hodl, I., Baranyi, C., Battin, T. J., 2007. Biophysical controls on community succession in stream biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* 73 (15), 4966–4974.
- Bian, H. T., Chen, J. W., Cai, X. Y., Liu, P., Wang, Y., Huang, L. P., Qiao, X. L., Hao, C., 2009. Dechlorination of chloroacetanilide herbicides by plant growth regulator sodium bisulfite. *Water Research* 43 (14), 3566–3574.
- Biggs, B., 2000. New zealand periphyton guideline : detecting, monitoring and managing enrichment of streams. Ministry of the Environment, 121.
- Biggs, B., Stokseth, S., 1996. Hydraulic habitat suitability for periphyton in rivers. *Regulated Rivers-Research and Management* 12 (2-3), 251–261.
- Biggs, B., Thomsen, H., 1995. Disturbance of stream periphyton by perturbations in shear stress : time to structural failure and differences in community resistance. *Journal of Phycology* 31, 233–241.
- Biggs, B. J. F., 1996. Patterns in benthic algae of streams. In : Stevenson, R. J., Bothwell, M. L., Lowe, R. L. (Eds.), *Algal ecology : freshwater benthic ecosystems*. Academic Press, San Diego, pp. 31–56.
- Biggs, B. J. F., Close, M. E., 1989. Periphyton biomass dynamics in gravel bed rivers : the relative effects of flows and nutrients. *Freshwater Biology* 22, 209–231.
- Biggs, B. J. F., Stevenson, R. J., Lowe, R. L., 1998. A habitat matrix conceptual model for stream periphyton. *Archiv Fur Hydrobiologie* 143 (1), 21–56.
- Binet, F., Kersante, A., Munier-Lamy, C., Le Bayon, R. C., Belgy, M. J., Shipitalo, M. J., 2006. Lumbricid macrofauna alter atrazine mineralization and sorption in a silt loam soil. *Soil Biology & Biochemistry* 38 (6), 1255–1263.
- Blackwood, C. B., Marsh, T., Kim, S. H., Paul, E. A., 2003. Terminal restriction fragment length polymorphism data analysis for quantitative comparison of microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology* 69 (2), 926–932.
- Blanchoud, H., Farrugia, F., Mouchel, J. M., 2004. Pesticide uses and transfers in urbanised catchments. *Chemosphere* 55 (6), 905–913.
- Blanck, H., 2002. A critical review of procedures and approaches used for assessing pollution-induced community tolerance (pict) in biotic communities. *Human and Ecological Risk Assessment* 8 (5), 1003–1034.
- Blanck, H., Wangberg, S. A., 1988. Validity of an ecotoxicological test system-short-term and long-term effects of arsenate on marine periphyton communities in laboratory systems. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 45 (10), 1807–1815.
- Blanco, S., Ector, L., Becares, E., 2004. Epiphytic diatoms as water quality indicators in spanish shallow lakes. *Vie Et Milieu-Life and Environment* 54 (2-3), 71–79.
- Blinn, D., Fredericksen, A., Korte, V., 1980. Colonization rates and community structure of diatoms on three different rock substrata in a lotic system. *British Phycological Journal* 15 (4), 303–310.

- Böger, P., Matthes, B., Schmalfuss, J., 2000. Towards the primary target of chloroacetamides - new findings pave the way. *Pest Management Science* 56 (6), 497–508.
- Bohuss, I., Rekasi, T., Szikora, S., Barkacs, K., Zaray, G., Acs, E., 2005. Interaction of acetochlor and atrazine with natural freshwater biofilms grown on polycarbonate substrate in lake velence (hungary). *Microchemical Journal* 79 (1-2), 201–205.
- Bonnet, J., Bonnemoy, F., Dusser, M., Bohatier, J., 2007. Assessment of the potential toxicity of herbicides and their degradation products to nontarget cells using two microorganisms, the bacteria vibrio fishcheri and the ciliate tetrahymena pyriformis. *Environmental Toxicology* 22, 78–91.
- Bonnineau, C., Bonet, B., Corcoll, N., Guasch, H., 2011. Catalase in fluvial biofilms : a comparison between different extraction methods and example of application in a metal-polluted river. *Ecotoxicology* 20, 293–303.
- Bonnineau, C., Guasch, H., Proia, L., Ricart, M., Geiszinger, A., Romani, A. M., Sabater, S., 2010. Fluvial biofilms : A pertinent tool to assess beta-blockers toxicity. *Aquatic Toxicology* 96 (3), 225–233.
- Boston, H., Hill, W., 1991. Photosynthesis-light relations of stream periphyton communities. *Limnology and Oceanography* 36 (4), 644–656.
- Bothwell, M., 1985. Phosphorus limitation of lotic periphyton growth rates : an intersite comparison using continuous-flow troughs (thompson river system, british columbia). *Limnology and Oceanography* 30, 527–542.
- Bothwell, M., 1993. Algal-nutrient dynamics. In : Lamberti, G., Steinman, A. (Eds.), *Research in artificial stream : applications, uses, and abuses*. Vol. 12. *Journal of the North American Benthological Society*, pp. 327–333.
- Boudou, A., Ribeyre, F., 1997. *Aquatic ecotoxicology : from the ecosystem to the cellular and molecular levels*. *Environmental health perspectives* 105 Suppl 1, 21–35.
- Boulêtreau, S., Garabetian, F., Sauvage, S., Sanchez-Perez, J. M., 2006. Assessing the importance of a self-generated detachment process in river biofilm models. *Freshwater Biology* 51 (5), 901–912.
- Boulêtreau, S., 2007. *Déterminisme des fonctions d'accrétion et de détachement du biofilm phototrophe en milieu naturel : études expérimentale et numérique des facteurs de contrôle de la biomasse en rivière*. Ph.D. thesis, Université Paul Sabatier Toulouse.
- Boulêtreau, S., Mastrorillo, S., Garabetian, F., 2010a. Le compartiment microbien, un modèle pertinent pour étudier l'effet des changements globaux. applications aux écosystèmes d'eau douce et biofilms de rivière. Conférence.
- Boulêtreau, S., Sanchez-Pérez, J.-M., Sauvage, S., Lyautey, E., Garabetian, F., 2010b. Détachement autogène : un contrôle de la dynamique des biofilms phototrophes en rivière sensible à la température. Conférence.
- Boulêtreau, S., Sellali, M., Elosegi, A., Nicaise, Y., Bercovitz, Y., Moulin, F., Eiff, O., Sauvage, S., Sanchez-Perez, J. M., Garabetian, F., 2010c. Temporal dynamics of river biofilm in constant flows : A case study in a riverside laboratory flume. *International Review of Hydrobiology* 95 (2), 156–170.
- Bruneel, O., Duran, R., Casiot, C., Elbaz-Poulichet, F., Personne, J. C., 2006. Diversity of microorganisms in fe-as-rich acid mine drainage waters of carnoules, france. *Applied and Environmental Microbiology* 72 (1), 551–556.
- Brümmer, I. H. M., Felske, A., Wagner-Dobler, I., 2003. Diversity and seasonal variability of beta-proteobacteria in biofilms of polluted rivers : Analysis by temperature gradient gel electrophoresis and cloning. *Applied and Environmental Microbiology* 69 (8), 4463–4473.

- Burns, A., Ryder, D., 2001. Potential for biofilms as biological indicators in Australian riverine systems. *Ecological Management & Restoration* 2, 53–63.
- Cairns, J., 1983. Are single species toxicity tests alone adequate for estimating environmental-hazard. *Hydrobiologia* 100, 47–57.
- Cairrao, E., Couderchet, M., Soares, A., Guilhermino, L., 2004. Glutathione-s-transferase activity of fucus spp. as a biomarker of environmental contamination. *Aquatic Toxicology* 70 (4), 277–286.
- Calvet, R., Barriuso, E., Benoit, P., Charnay, M., Coquet, Y., 2005. Conséquences agronomiques et environnementales. France Agricole Edition.
- Caquet, T., Lagadic, L., Jonot, O., Baturo, W., Kilanda, M., Simon, P., LeBras, S., Echaubard, M., Ramade, F., 1996. Outdoor experimental ponds (mesocosms) designed for long-term ecotoxicological studies in aquatic environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 34 (2), 125–133.
- Caquet, T., Lagadic, L., Sheffield, S. R., 2000. Mesocosms in ecotoxicology (1) : Outdoor aquatic systems. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, Vol 165 165, 1–38.
- Caracciolo, A. B., Giuliano, G., Grenni, P., Guzzella, L., Pozzoni, F., Bottoni, P., Fava, L., Crobe, A., Orru, M., 2005. Degradation and leaching of the herbicides metolachlor and diuron : a case study in an area of northern Italy. *Environmental Pollution* 134 (3), 525–534.
- Carballa, M., Smits, M., Etchebehere, C., Boon, N., Verstraete, W., 2011. Correlations between molecular and operational parameters in continuous lab-scale anaerobic reactors. *Applied Microbiology and Biotechnology* 89 (2), 303–314.
- Carder, J. P., Hoagland, K. D., 1998. Combined effects of alachlor and atrazine on benthic algal communities in artificial streams. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17 (7), 1415–1420.
- Cardinale, B. J., Palmer, M. A., Ives, A. R., Brooks, S. S., 2005. Diversity-productivity relationship in streams vary as a function of the natural disturbance regime. *Ecology* 86, 716–726.
- Cardinale, B. J., Srivastava, D. S., Duffy, J. E., Wright, J. P., Downing, A. L., Sankaran, M., Jouseau, C., 2006a. Effects of biodiversity on the functioning of trophic groups and ecosystems. *Nature* 443 (7114), 989–992.
- Cardinale, B. J., Weis, J. J., Forbes, A. E., Tilmon, K. J., Ives, A. R., 2006b. Biodiversity as both a cause and consequence of resource availability : a study of reciprocal causality in a predator-prey system. *Journal of Animal Ecology* 75 (2), 497–505.
- Caron, D. A., 1994. Inorganic nutrients, bacteria, and the microbial loop. *Microbial Ecology* 28 (2), 295–298.
- Carr, G. M., Morin, A., Chambers, P., 2005. Bacteria and algae in stream periphyton along a nutrient gradient. *Freshwater Biology* 50, 1337–1350.
- Cattaneo, A., Amireault, M. C., 1992. How artificial are artificial substrata for periphyton? *Journal of the North American Benthological Society* 11 (2), 244–256.
- Cattaneo, A., Couillard, Y., Wunsam, S., Courcelles, M., 2004. Diatom taxonomic and morphological changes as indicators of metal pollution and recovery in lac dufault (quebec, Canada). *Journal of Paleolimnology* 32 (2), 163–175.
- Cattaneo, A., Kalff, J., 1980. The relative contribution of aquatic macrophytes and their epiphytes to the production of macrophyte beds. *Limnology and Oceanography* 25 (2), 280–289.
- Cattaneo, A., Kerimian, T., Roberge, M., Marty, J., 1997. Periphyton distribution and abundance on substrata of different size along a gradient of stream trophy. *Hydrobiologia* 354, 101–110.

- Cattaneo, A., Roberge, G., 1991. Efficiency of a brush sampler to measure periphyton in streams and lakes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 48 (10), 1877–1881.
- Cavalier, T. C., Lavy, T. L., Mattice, J. D., 1991. Persistence of selected pesticides in groundwater samples. *Ground Water* 29 (2), 225–231.
- Cavigelli, M. A., Robertson, G. P., 2000. The functional significance of denitrifier community composition in a terrestrial ecosystem. *Ecology* 81 (5), 1402–1414.
- Cedergreen, N., Andersen, L., Olesen, C. F., Spliid, H. H., Streibig, J. C., 2005. Does the effect of herbicide pulse exposure on aquatic plants depend on k-ow or mode of action? *Aquatic Toxicology* 71 (3), 261–271.
- Chapin, F. S., Zavaleta, E. S., Eviner, V. T., Naylor, R. L., Vitousek, P. M., Reynolds, H. L., Hooper, D. U., Lavorel, S., Sala, O. E., Hobbie, S. E., Mack, M. C., Diaz, S., 2000. Consequences of changing biodiversity. *Nature* 405 (6783), 234–242.
- Characklis, W. G., 1990. Laboratory biofilm reactor. In : Characklis, W. G., Marshall, K. C. (Eds.), *Biofilms*. New York, pp. 55–89.
- Chen, X. Y., Daniell, T. J., Neilson, R., O'Flaherty, V., Griffiths, B. S., 2010. A comparison of molecular methods for monitoring soil nematodes and their use as biological indicators. *European Journal of Soil Biology* 46 (5), 319–324.
- Chenier, M. R., Beaumier, D., Roy, R., Driscoll, B. T., Lawrence, J. R., Greer, C. W., 2003. Impact of seasonal variations and nutrient inputs on nitrogen cycling and degradation of hexadecane by replicated river biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* 69 (9), 5170–5177.
- Chesters, G., Simsman, G. V., Levy, J., Alhajjar, B. J., Fathulla, R. N., Harkin, J. M., 1989. Environmental fate of alachlor and metolachlor. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 110, 1–74.
- Chèvre, N., Edder, P., Ortelli, D., Tatti, E., Erkman, S., Rapin, F., 2008. Risk assessment of herbicide mixtures in a large european lake. *Environmental Toxicology* 23 (2), 269–277.
- Chèvre, N., Loepe, C., Singer, H., Stamm, C., Fenner, K., Escher, B. I., 2006. Including mixtures in the determination of water quality criteria for herbicides in surface water. *Environmental Science & Technology* 40 (2), 426–435.
- Chirnside, A., Ritter, W., Radosevich, M., 2007. Isolation of a selected microbial consortium from a pesticide-contaminated mix-load site soil capable of degrading the herbicides atrazine and alachlor. *Soil Biology & Biochemistry* 39, 3056–3065.
- Chiron, S., Abian, J., Ferrer, M., Sanchezbaeza, F., Messeguer, A., Barcelo, D., 1995. Comparative photo-degradation rates of alachlor and bentazone in natural-water and determination of breakdown products. *Environmental Toxicology and Chemistry* 14 (8), 1287–1298.
- Choi, K. H., Dodds, F. C., 1999. Comparison of two kinds of biologic microplates (gn and eco) in their ability to distinguish among aquatic microbial communities. *Journal of Microbiological Methods* 36, 203–213.
- Clark, G. M., Goolsby, D. A., 2000. Occurrence and load of selected herbicides and metabolites in the lower mississippi river. *Science of the Total Environment* 248 (2-3), 101–113.
- Clarke, K. R., 1993. Nonparametric multivariate analyses of changes in community structure. *Australian Journal of Ecology* 18 (1), 117–143.
- Clay, S. A., Clay, D. E., Moorman, T. B., 2004. Comparison of atrazine and alachlor sorption, mineralization, and degradation potential in surface and aquifer sediments. In : *Pesticide Decontamination and Detoxification*. Vol. 863 of *Acs Symposium Series*. pp. 199–212.

- Clements, F., 1916. Plant succession : an analysis of the development of vegetation. Carnegie Institution of Washington.
- Clements, W., Newman, M., 2002. Community Ecotoxicology. Wiley and Sons, Chichester.
- Clements, W. H., Rohr, J. R., 2009. Community responses to contaminants : using basic ecological principles to predict ecotoxicological effects. *Environmental Toxicology and Chemistry* 28 (9), 1789–1800.
- Clifford, H. F., Casey, R. J., Saffran, K. A., 1992. Short-term colonization of rough and smooth tiles by benthic macroinvertebrates and algae (chlorophyll-a) in 2 streams. *Journal of the North American Benthological Society* 11 (3), 304–315.
- Cole, J. R., Wang, Q., Cardenas, E., Fish, J., Chai, B., Farris, R. J., Kulam-Syed-Mohideen, A. S., McGarrell, D. M., Marsh, T., Garrity, G. M., Tiedje, J. M., 2009. The ribosomal database project : improved alignments and new tools for rna analysis. *Nucleic Acids Research* 37, D141–D145.
- Coste, M., 1982. Etude des méthodes biologiques d'appréciation quantitative de la qualité des eaux. Rapport Q.E. Lyon A.F., Bassin Rhône-Méditerranée-Corse, Cemagref, 218.
- Coste, M., Boutry, S., Tison-Rosebery, J., Delmas, F., 2009. Improvements of the biological diatom index (bdi) : Description and efficiency of the new version (bdi-2006). *Ecological Indicators* 9 (4), 621–650.
- Costerton, J., Cheng, K., Geesey, G., Ladd, T., Nickel, J., Dasgupta, M., Marrie, T., 1987. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annual review of microbiology* 41, 435–464.
- Costerton, J., Lewandowski, Z., Cadwell, D., Korber, D., Lappin-Scott, H., 1995. Microbial biofilms. *Annual Review microbiology* 49, 711–445.
- Cottingham, C. K., Hatzios, K. K., Meredith, S. A., 1993. Comparative responses of selected corn (zea-mays l) hybrids to eptc and metolachlor. *Weed Research* 33 (2), 161–170.
- Couderchet, M., Rumbolz, J., Kring, F., Boger, P., 1995. Characteristics of a metazachlor-resistant scenedesmus acutus cell-line. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 52 (3), 222–233.
- Couderchet, M., Schmalfluss, J., Boger, P., 1998. A specific and sensitive assay to quantify the herbicidal activity of chloroacetamides. *Pesticide Science* 52 (4), 381–387.
- Coufort, C., 2004. Etude expérimentale de la floculation en réacteur de taylor-couette : influence de l'hydrodynamique sur les phénomènes d'agrégation et de rupture. Ph.D. thesis, Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse.
- Coufort, C., Bouyer, D., Line, A., 2005. Flocculation related to local hydrodynamics in a taylor - couette reactor and in a jar. *Chemical Engineering Science* 60, 2179–2192.
- Crawford, C. G., 2001. Factors affecting pesticide occurrence and transport in a large midwestern river basin. *Journal of the American Water Resources Association* 37 (1), 1–15.
- Culp, J. M., Lowell, R. B., Cash, K. J., 2000a. Integrating mesocosm experiments with field and laboratory studies to generate weight-of-evidence risk assessments for large rivers. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19 (4), 1167–1173.
- Culp, J. M., Podemski, C. L., Cash, K. J., Lowell, R. B., 2000b. A research strategy for using artificial stream microcosms in ecotoxicology : integrating experiments at different level of biological organization with field data. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery* 7, 167–176.
- Daam, M. A., Rodrigues, A. M. F., Van den Brink, P. J., Nogueira, A. J. A., 2009a. Ecological effects of the herbicide linuron in tropical freshwater microcosms. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72 (2), 410–423.

- Daam, M. A., Van den Brink, P. J., Nogueira, A. J. A., 2009b. Comparison of fate and ecological effects of the herbicide linuron in freshwater model ecosystems between tropical and temperate regions. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72 (2), 424–433.
- Dahl, B., Blanck, H., 1996. Toxic effects of the antifouling agent irgarol 1051 on periphyton communities in coastal water microcosms. *Marine Pollution Bulletin* 32 (4), 342–350.
- Dahllof, I., 2002. Molecular community analysis of microbial diversity. *Current Opinion in Biotechnology* 13 (3), 213–217.
- Dahm, C. N., Grimm, N. B., Marmonier, P., Valett, H. M., Vervier, P., 1998. Nutrient dynamics at the interface between surface waters and groundwaters. *Freshwater Biology* 40 (3), 427–451.
- Dale, V. H., Beyeler, H. C., 2001. Challenges in the development and use of biological indicators. *Ecological Indicators* 1, 3–10.
- Dalton, M. S., Frick, E. A., 2008. Fate and transport of pesticides in the ground water systems of southwest georgia, 1993-2005. *Journal of Environmental Quality* 37 (5), S264–S272.
- Danilov, R. A., Ekelund, N. G. A., 2001. Comparison of usefulness of three types of artificial substrata (glass, wood and plastic) when studying settlement patterns of periphyton in lakes of different trophic status. *Journal of Microbiological Methods* 45, 167–170.
- Davey, M. E., O'Toole, G. A., 2000. Microbial biofilms : from ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64 (4), 847–867.
- Davies, D., 2000. Physiological events in biofilm formation. In : Allison, D., Gilbert, P., Lappin-Scott, H., Wilson, M. (Eds.), *Community structure and co-operation in biofilms*. Cambridge University Press, pp. 129–166.
- de Liphay, J. R., Johnsen, K., Albrechtsen, H. J., Rosenberg, P., Aamand, J., 2004. Bacterial diversity and community structure of a sub-surface aquifer exposed to realistic low herbicide concentrations. *Fems Microbiology Ecology* 49 (1), 59–69.
- de Liphay, J. R., Tuxen, N., Johnsen, K., Hansen, L. H., Albrechtsen, H. J., Bjerg, P. L., Aamand, J., 2003. In situ exposure to low herbicide concentrations affects microbial population composition and catabolic gene frequency in an aerobic shallow aquifer. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 461–467.
- Debenest, T., 2007. Caractérisation de l'impact des pollutions agricoles sur les diatomées benthiques. Ph.D. thesis, Université Bordeaux I.
- Debenest, T., Pinelli, E., Coste, M., Silvestre, J., Mazzella, N., Madigou, C., Delmas, F., 2009. Sensitivity of freshwater periphytic diatoms to agricultural herbicides. *Aquatic Toxicology* 93 (1), 11–17.
- Debenest, T., Silvestre, J., Coste, M., Pinelli, E., 2010. Effects of pesticides on freshwater diatoms. In : *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, Vol 203. Vol. 203 of *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. Springer, New York, pp. 87–103.
- Debenest, T., Sivestre, J., Coste, M., Delmas, F., Pinelli, E., 2008. Herbicide effects on freshwater benthic diatoms : Induction of nucleus alterations and silica cell wall abnormalities. *Aquatic Toxicology* 88 (1), 88–94.
- Delorenzo, M., Serrano, L., 2007. Individual and mixture toxicity of three pesticides ; atrazine, chlorpyrifos, and chlorothalonil to the marine phytoplankton species *dunaliella tertiolecta*. *Journal of Environmental Science and Health* 38 (5), 529–538.
- DeLorenzo, M. E., Scott, G. I., Ross, P. E., 1999. Effects of the agricultural pesticides atrazine, deethylatrazine, endosulfan, and chlorpyrifos on an estuarine microbial food web. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18 (12), 2824–2835.



- DeLorenzo, M. E., Scott, G. I., Ross, P. E., 2001. Toxicity of pesticides to aquatic microorganisms : A review. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20 (1), 84–98.
- DeNicola, D. M., 1996. Periphyton responses to temperature at different ecological levels. In : Stevenson, R. J., Bothwell, M. L., Lowe, R. L. (Eds.), *Algal Ecology - Freshwater Benthic Ecosystems*. Academic Press, San Diego, pp. 149–181.
- Dermont, G., 2002. Impact des activités agricoles sur la qualité des eaux du bassin de la garonne. Master's thesis, Université Paul Sabatier Toulouse 3.
- Devault, D., 2007. Approche spatio-temporelle de la contamination par les herbicides de pré-levée du biotope de la garonne moyenne. Ph.D. thesis.
- Dodds, W., Jones, J., Welch, E., 1997. Suggested classification of stream trophic state : distributions of temperate stream types by chlorophyll, total nitrogen, and phosphorus. *Water Research* 32 (5), 1455–1462.
- Dodds, W. K., 2003. The role of periphyton in phosphorus retention in shallow freshwater aquatic systems. *Journal of Phycology* 39 (5), 840–849.
- Dodds, W. K., Hutson, R. E., Eichen, A. C., Evans, M. A., Gudder, D. A., Fritz, K. M., Gray, L., 1996. The relationship of floods, drying, how and light to primary production and producer biomass in a prairie stream. *Hydrobiologia* 333 (3), 151–159.
- Dodds, W. K., Jones, J. R., Welch, E. B., 1998. Suggested classification of stream trophic state : Distributions of temperate stream types by chlorophyll, total nitrogen, and phosphorus. *Water Research* 32 (5), 1455–1462.
- Dodds, W. K., Smith, V. H., Lohman, K., 2002. Nitrogen and phosphorus relationships to benthic algal biomass in temperate streams. *Canal Journal Fish Aquatic sciences* 59, 865–874.
- Dorigo, U., Berard, A., Bouchez, A., Rimet, F., Montuelle, B., 2010a. Transplantation of microbenthic algal assemblages to assess structural and functional recovery after diuron exposure. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 59 (4), 555–563.
- Dorigo, U., Berard, A., Rimet, F., Bouchez, A., Montuelle, B., 2010b. In situ assessment of periphyton recovery in a river contaminated by pesticides. *Aquatic Toxicology* 98 (4), 396–406.
- Dorigo, U., Bourrain, X., Bérard, A., Leboulanger, C., 2004. Seasonal changes in the sensitivity of river microalgae to atrazine and isoproturon along a contamination gradient. *The science of the Total Environment* 318, 101–144.
- Dorigo, U., Leboulanger, C., 2001. A pulse-amplitude modulated fluorescence-based method for assessing the effects of photosystem ii herbicides on freshwater periphyton. *Journal of Applied Phycology* 13 (6), 509–515.
- Dorigo, U., Leboulanger, C., Berard, A., Bouchez, A., Humbert, J. F., Montuelle, B., 2007. Lotic biofilm community structure and pesticide tolerance along a contamination gradient in a vineyard area. *Aquatic Microbial Ecology* 50 (1), 91–102.
- Dorigo, U., Lefranc, M., Leboulanger, C., Montuelle, B., Humbert, J. F., 2009. Spatial heterogeneity of periphytic microbial communities in a small pesticide-polluted river. *Fems Microbiology Ecology* 67 (3), 491–501.
- Dorigo, U., Volatier, L., Humbert, J. F., 2005. Molecular approaches to the assessment of biodiversity in aquatic microbial communities. *Water Research* 39 (11), 2207–2218.

- Downing, H. W., Delorenzo, M. E., Fulton, M. H., Scott, G. I., Madden, C. J., Kucklick, J. R., 2004. Effects of the agricultural pesticides atrazine, alachlor, and endosulfan on south florida microbial assemblages. *Ecotoxicology* 13, 245–260.
- Duineveld, B. M., Rosado, A. S., van Elsas, J. D., van Veen, J. A., 1998. Analysis of the dynamics of bacterial communities in the rhizosphere of the chrysanthemum via denaturing gradient gel electrophoresis and substrate utilization patterns. *Applied and Environmental Microbiology* 64 (12), 4950–4957.
- Dunbar, J., Ticknor, L. O., Kuske, C. R., 2000. Assessment of microbial diversity in four southwestern united states soils by 16s rRNA gene terminal restriction fragment analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 66 (7), 2943–2950.
- Duong, T., Morin, S., Coste, M., Herlory, O., Feurtet-Mazel, A., Boudou, A., 2010. Experimental toxicity and bioaccumulation of cadmium in freshwater periphytic diatoms in relation with biofilm maturity. *Science of the Total Environment* 408, 552–562.
- Duong, T. T., Morin, S., Herlory, O., Feurtet-Mazel, A., Coste, M., Boudou, A., 2008. Seasonal effects of cadmium accumulation in periphytic diatom communities of freshwater biofilms. *Aquatic Toxicology* 90 (1), 19–28.
- Dynes, J. J., Lawrence, J. R., Korber, D. R., Swerhone, G. D. W., Leppard, G. G., Hitchcock, A. P., 2006. Quantitative mapping of chlorhexidine in natural river biofilms. *Science of the Total Environment* 369 (1-3), 369–383.
- Eismann, F., Montuelle, B., 1999. Microbial methods for contaminants effects assessment in sediment. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 159, 41–93.
- ElJay, A., 1996a. Effects of organic solvents and solvent-atrazine interactions on two algae, *Chlorella vulgaris* and *Selenastrum capricornutum*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 31 (1), 84–90.
- ElJay, A., 1996b. Toxic effects of organic solvents on the growth of *Chlorella vulgaris* and *Selenastrum capricornutum*. *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 57 (2), 191–198.
- Elliott, J. A., Cessna, A. J., Nicholaichuk, W., Tollefson, L. C., 2000. Leaching rates and preferential flow of selected herbicides through tilled and untilled soil. *Journal of Environmental Quality* 29 (5), 1650–1656.
- Engebretson, J. J., Moyer, C. L., 2003. Fidelity of select restriction endonucleases in determining microbial diversity by terminal-restriction fragment length polymorphism. *Applied and Environmental Microbiology* 69 (8), 4823–4829.
- Enrich-Prast, A., 2006. Effects of pesticides on nitrification in aquatic sediment. *Brazilian Journal of Biology* 66, 405–412.
- Ensz, A. P., Knapp, C. W., Graham, D. W., 2003. Influence of autochthonous dissolved organic carbon and nutrient limitation on alachlor biotransformation in aerobic aquatic systems. *Environmental Science & Technology* 37 (18), 4157–4162.
- Enwall, K., Hallin, S., 2009. Comparison of t-rflp and dgge techniques to assess denitrifier community composition in soil. *Letters in Applied Microbiology* 48 (1), 145–148.
- Eulin, A., Le Cohu, R., 1998. Epilithic diatom communities during the colonization of artificial substrates in the river Garonne (France). comparison with the natural communities. *Archiv Für Hydrobiologie* 143 (1), 79–106.
- Fairchild, J. F., Ruessler, D. S., Carlson, A. R., 1998. Comparative sensitivity of five species of macrophytes and six species of algae to atrazine, metribuzin, alachlor, and metolachlor. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17 (9), 1830–1834.

- Fairchild, J. F., Ruessler, D. S., Haverland, P. S., Carlson, A. R., 1997. Comparative sensitivity of *selenastrum capricornutum* and *lemna minor* to sixteen herbicides. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 32 (4), 353–357.
- Faust, M., Altenburger, R., Backhaus, T., Blanck, H., Boedeker, W., Gramatica, P., Hamer, V., Scholze, M., Vighi, M., Grimme, L. H., 2001. Predicting the joint algal toxicity of multi-component s-triazine mixtures at low-effect concentrations of individual toxicants. *Aquatic Toxicology* 56 (1), 13–32.
- Fava, L., Bottoni, P., Crobe, A., Funari, E., 2000. Leaching properties of some degradation products of alachlor and metolachlor. *Chemosphere* 41 (9), 1503–1508.
- Fechner, L., 2010. Acquisition de tolérance et modification de structure des communautés périphytiques : une réponse précoce à la pression urbaine dans les milieux aquatiques. Ph.D. thesis, Université Paris-Est.
- Feminella, J. W., Hawkins, C. P., 1995. Interactions between stream herbivores and periphyton : A quantitative analysis of past experiments. *Journal of the North American Benthological Society* 14 (4), 465–509.
- Feng, P. C. C., 1991. Soil transformation of acetolachlor via glutathione conjugation. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 40 (2), 136–142.
- Ferrer, I., Thurman, E. M., Barcelo, D., 1997. Identification of ionic chloroacetanilide-herbicide metabolites in surface water and groundwater by hplc/ms using negative ion spray. *Analytical Chemistry* 69 (22), 4547–4553.
- Field, J. A., Thurman, E. M., 1996. Glutathione conjugation and contaminant transformation. *Environmental Science & Technology* 30 (5), 1413–1418.
- Fierer, N., Nemergut, D., Knight, R., Craine, J. M., 2010. Changes through time : integrating microorganisms into the study of succession. *Research in Microbiology* 161 (8), 635–642.
- Fleeger, J. W., Carman, K. R., Nisbet, R. M., 2003. Indirect effects of contaminants in aquatic ecosystems. *Science of the Total Environment* 317 (1-3), 207–233.
- Flemming, H., Wingender, J., Mayer, C., Körstgens, V., Borchard, W., 2000. Cohesiveness in biofilm matrix polymers. In : Allison, D., Gilbert, P., Lappin-Scott, H., Wilson, M. (Eds.), *Community structure and co-operation in biofilms*. Cambridge University Press, pp. 167–198.
- Flemming, H. C., 1995. Sorption sites in biofilms. *Water Science and Technology* 32 (8), 27–33.
- Flemming, H. C., Wingender, J., 2001. Relevance of microbial extracellular polymeric substances (epss) - part i : Structural and ecological aspects. *Water Science and Technology* 43 (6), 1–8.
- Fletcher, M., Marshall, K. C., 1982. Bubble contact angle method for evaluating substratum interfacial characteristics and its relevance to bacterial attachment. *Applied and Environmental Microbiology* 44 (1), 184–192.
- Flipo, N., Rabouille, C., Poulin, M., Even, S., Tusseau-Vuillemin, M. H., Lalande, M., 2007. Primary production in headwater streams of the seine basin : The grand morin river case study. *Science of the Total Environment* 375 (1-3), 98–109.
- Foley, M., Sigler, V., Gruden, C., 2008. A multiphasic characterization of the impact of the herbicide acetochlor on freshwater bacterial communities. *International Society for Microbial Ecology* 2, 56–66.
- Foreman, W. T., Majewski, M. S., Goolsby, D. A., Wiebe, F. W., Coupe, R. H., 2000. Pesticides in the atmosphere of the mississippi river valley, part ii - air. *Science of the Total Environment* 248 (2-3), 213–226.

- Forney, L. J., Liu, W., Guckert, J. B., Kumagai, Y., Namkung, E., Nishihara, T., Larson, R. L., 2001. Structure of microbial communities in activated sludge : potential implications for assessing the biodegradability of chemicals. *Ecotoxicology and Environment Safety* 49, 40–53.
- Francoeur, S. N., Biggs, B. J. F., 2006. Short-term effects of elevated velocity and sediment abrasion on benthic algal communities. *Hydrobiologia* 561, 59–69.
- Franqueira, D., Cid, A., Torres, E., Orosa, M., Herrero, C., 1999. A comparison of the relative sensitivity of structural and functional cellular responses in the alga *Chlamydomonas eugametos* exposed to the herbicide paraquat. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 36 (3), 264–269.
- Freeman, C., Lock, M. A., 1995. The biofilm polysaccharide matrix - a buffer against changing organic substrate supply. *Limnology and Oceanography* 40 (2), 273–278.
- Friberg-Jensen, U., Wendt-Rasch, L., Woin, P., Christoffersen, K., 2003. Effects of the pyrethroid insecticide, cypermethrin, on a freshwater community studied under field conditions. i. direct and indirect effects on abundance measures of organisms at different trophic levels. *Aquatic Toxicology* 63 (4), 357–371.
- Fromin, N., Hamelin, J., Tarnawski, S., Roesti, D., Jourdain-Miserez, K., Forestier, N., Teyssier-Cuvelle, S., Gillet, F., Aragno, M., Rossi, P., 2002. Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (dgc) fingerprinting patterns. *Environmental Microbiology* 4, No. 11, 634–643.
- Galassi, S., Provini, A., Mangiapan, S., Benfenati, E., 1996. Alachlor and its metabolites in surface water. *Chemosphere* 32 (2), 229–237.
- Gao, D., Tao, Y., 2011. Current molecular biologic techniques for characterizing environmental microbial community. *Frontiers of Environmental Science & Engineering in China* 6, 82–97.
- Gao, X., Olapade, O. A., Leff, L. G., 2005. Comparison of benthic bacterial community composition in nine streams. *Aquatic Microbial Ecology* 40, 51–60.
- Garabetian, F., 2006. Agrégats microbiens aux interfaces aquatiques : structure et rôle dans les processus biogéochimiques.
- Garabetian, F., 2009. Des biofilms témoins et acteurs du fonctionnement de la rivière. Ecole thématique CNRS.
- Gardenas, A. I., Simunek, J., Jarvis, N., van Genuchten, M. T., 2006. Two-dimensional modelling of preferential water flow and pesticide transport from a tile-drained field. *Journal of Hydrology* 329 (3-4), 647–660.
- Garland, J., Mills, A., 1991. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization. *Applied and environmental microbiology* 57 (8), 2351–2359.
- Garland, J. L., 1997. Analysis and interpretation of community-level physiological profiles in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology* 24, 289–300.
- Geiszinger, A., Bonnineau, C., Faggiano, L., Guasch, H., Lopez-Doval, J. C., Proia, L., Ricart, M., Ricciardi, F., Romani, A., Rotter, S., Munoz, I., Schmitt-Jansen, M., Sabater, S., 2009. The relevance of the community approach linking chemical and biological analyses in pollution assessment. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 28 (5), 619–626.
- Gerecke, A. C., Scharer, M., Singer, H. P., Muller, S. R., Schwarzenbach, R. P., Sagesser, M., Ochsenein, U., Popow, G., 2002. Sources of pesticides in surface waters in Switzerland : pesticide load through waste water treatment plants-current situation and reduction potential. *Chemosphere* 48 (3), 307–315.
- Ghigo, J. M., 2001. Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. *Nature* 412 (6845), 442–445.

- Ghosh, M., Gaur, J. P., 1998. Current velocity and the establishment of stream algal periphyton communities. *Aquatic Botany* 60, 1–10.
- Giacomazzi, S., Cochet, N., 2004. Environmental impact of diuron transformation : a review. *Chemosphere* 56 (11), 1021–1032.
- Gish, T. J., Sadeghi, A., Wienhold, B. J., 1995. Volatilization of alachlor and atrazine as influenced by surface litter. *Chemosphere* 31 (4), 2971–2982.
- Gjaltema, A., Arts, P. A. M., Van Loosdrecht, M. C. M., Kuenen, J. G., Heijnen, J. J., 1994. Heterogeneity of biofilms in rotating annular reactors : Occurrence, structure, and consequences. *Biotechnology And Bioengineering* 44, 194–204.
- Godillot, R., Caussade, B., Ameziane, T., Capblancq, J., 2001. Interplay between turbulence and periphyton in rough open-channel flow. *Journal of Hydraulic Research* 39 (3), 227–239.
- Goldsborough, L. G., Robinson, G. G. C., 1986. Changes in periphytic algal community structure as a consequence of short herbicide exposures. *Hydrobiologia* 139 (2), 177–192.
- Gonod, L. V., Martin-Laurent, F., Chenu, C., 2006. 2,4-d impact on bacterial communities, and the activity and genetic potential of 2,4-d degrading communities in soil. *Fems Microbiology Ecology* 58 (3), 529–537.
- Gouy, V., Garon-Bouchez, C., Ravanel, P., Tissut, M., 2001. Les produits phytosanitaires : de la parcelle au cours d'eau.
- Graham, D. W., Miles, D., DeNoyelles, F., Smith, V. H., 1999a. Development of small outdoor microcosms for studying contaminant transformation rates and mechanisms under various water column conditions. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18 (6), 1124–1132.
- Graham, D. W., Miley, M. K., Denoyelles, F., Smith, V. H., Thurman, E. M., Carter, R., 2000. Alachlor transformation patterns in aquatic field mesocosms under variable oxygen and nutrient conditions. *Water Research* 34 (16), 4054–4062.
- Graham, W. H., Graham, D. W., Denoyelles, F., Smith, V. H., Larive, C. K., Thurman, E. M., 1999b. Metolachlor and alachlor breakdown product formation patterns in aquatic field mesocosms. *Environmental Science & Technology* 33 (24), 4471–4476.
- Grenni, P., Gibello, A., Caracciolo, A. B., Fajardo, C., Nande, M., Vargas, R., Sacca, M. L., Martinez-Inigo, M. J., Ciccoli, R., Martin, M., 2009. A new fluorescent oligonucleotide probe for in situ detection of s-triazine-degrading rhodococcus wratislaviensis in contaminated groundwater and soil samples. *Water Research* 43 (12), 2999–3008.
- Guasch, H., Admiraal, W., Sabater, S., 2003. Contrasting effects of organic and inorganic toxicants on freshwater periphyton. *Aquatic Toxicology* 64 (2), 165–175.
- Guasch, H., Ivorra, N., Lehmann, V., Paulsson, M., Real, M., Sabater, S., 1998. Community composition and sensitivity of periphyton to atrazine in flowing waters : the role of environmental factors. *Journal of Applied Phycology* 10 (2), 203–213.
- Guasch, H., Lehmann, V., van Beusekom, B., Sabater, S., Admiraal, W., 2007. Influence of phosphate on the response of periphyton to atrazine exposure. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 52 (1), 32–37.
- Guasch, H., Munoz, I., Roses, N., Sabater, S., 1997. Changes in atrazine toxicity throughout succession of stream periphyton communities. *Journal of Applied Phycology* 9 (2), 137–146.
- Guasch, H., Sabater, S., 1998. Light history influences the sensitivity to atrazine in periphytic algae. *Journal of Phycology* 34 (2), 233–241.

- Guash, H., Marti, E., Sabater, S., 1995. Nutrient enrichment effects on biofilm metabolism in a mediterranean stream. *Freshwater Biology* 33 (3), 373–383.
- Guckert, J., 1993. Artificial streams in ecotoxicology. In : Lamberti, G., Steinman, A. (Eds.), *Research in artificial streams : applications, uses and abuses*. Vol. 12. Journal of National American Benthology Society, pp. 350–356.
- Guimont, M., 2005. Devenir des pesticides dans le sols en fonction de l'état d'humidité et du mode de circulation de l'eau dans le sol. Ph.D. thesis.
- Guo, L., Bicki, T. J., Felsot, A. S., Hinesly, T. D., 1993. Sorption and movement of alachlor in soil modified by carbon-rich wastes. *Journal of Environmental Quality* 22 (1), 186–194.
- Gurney, S. E., Robinson, G. G. C., 1989. The influence of 2 atrazine herbicides on the productivity, biomass and community composition of fresh-water march periphyton. *Aquatic Botany* 36 (1), 1–22.
- Guyon, E., 2001. Hydrodynamique physique.
- Guzzon, A., Bohn, A., Diociaiuti, M., Albertano, P., 2008. Cultured phototrophic biofilms for phosphorus removal in wastewater treatment. *Water Research* 42 (16), 4357–4367.
- Hagstrom, A., Larsson, U., Horstedt, P., Normark, S., 1979. Frequency of dividing cells, a new approach to the determination of bacterial - growth rates in aquatic environments. *Applied and Environmental Microbiology* 37 (5), 805–812.
- Hamala, J. A., Kollig, H. P., 1985. The effects of atrazine on periphyton communities in controlled laboratory ecosystems. *Chemosphere* 14 (9), 1391–1408.
- Hammer, Y., Harper, D. A. T., Ryan, P. D., 2001. Past : paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol. Electron.*
- Hayashi, S., Jang, J., Itoh, K., Suyama, K., Yamamoto, H., 2010. Construction of river model biofilm for assessing pesticide effects. *Arch Environ Contam Toxicol.*
- Headley, J. V., Gandrass, J., Kuballa, J., Peru, K. M., Gong, Y. L., 1998. Rates of sorption and partitioning of contaminants in river biofilm. *Environmental Science & Technology* 32 (24), 3968–3973.
- Hess, F. D., 1980. A chlamydomonas algal bioassay for detecting growth inhibitor herbicides. *Weed Science* 28 (5), 515–520.
- Heydens, W. F., Wilson, A. G. E., Kraus, L. J., Hopkins, W. E., Hotz, K. J., 2000. Ethane sulfonate metabolite of alachlor : Assessment of oncogenic potential based on metabolic and mechanistic considerations. *Toxicological Sciences* 55 (1), 36–43.
- Hill, B. H., Willingham, W. T., Parrish, L. P., McFarland, B. H., 2000. Periphyton community responses to elevated metal concentrations in a rocky mountain stream. *Hydrobiologia* 428 (1-3), 161–169.
- Hill, H. L., Ryon, M. G., Schilling, E. M., 1995. Light limitation in a stream ecosystem : responses by primary producers and consumers 76 (4), 1297–1309.
- Hillebrand, H., 2003. Opposing effects of grazing and nutrients on diversity. *Oikos* 100 (3), 592–600.
- Hillebrand, H., 2005. Light regime and consumer controm of autotrophic biomass. *Journal of Ecology* 93, 758–769.
- Hillebrand, H., Sommer, U., 2000a. Effect of continuous nutrient enrichment on microalgae colonizing hard substrates. *Hydrobiologia* 426, 185–192.

- Hillebrand, H., Sommer, U., 2000b. Diversity of benthic microalgae in response to colonization time and eutrophication. *Aquatic Botany* 67, 221–236.
- Hitchcock, A. P., Dynes, J. J., Lawrence, J. R., Obst, M., Swerhone, G. D. W., Korber, D. R., Leppard, G. G., 2009. Soft x-ray spectromicroscopy of nickel sorption in a natural river biofilm. *Geobiology* 7 (4), 432–453.
- Hoagland, K. D., Carder, J. P., Spawn, R., 1996. Effects of organic toxic substances. In : Stevenson, R. J., Bothwell, M. L., Lowe, R. L. (Eds.), *Algal Ecology : Freshwater benthic ecosystems*. Academic Press, San Diego, pp. 469–496.
- Hoagland, K. D., Roemer, S. C., Rosowski, J. R., 1982. Colonization and community structure of 2 periphyton assemblages, with emphasis on the diatoms (bacillariophyceae). *American Journal of Botany* 69 (2), 188–213.
- Horner, R., Welch, E., Seeley, M., Jacoby, J., 1990. Responses of periphyton to changes in current velocity, suspended sediment and phosphorus concentration. *Freshwater Biology* 24 (2), 215.
- Horz, H. P., Yimiga, M. T., Liesack, W., 2001. Detection of methanotroph diversity on roots of submerged rice plants by molecular retrieval of pmoa, mmox, mxaf, and 16s rna and ribosomal dna, including pmoa-based terminal restriction fragment length polymorphism profiling. *Applied and Environmental Microbiology* 67 (9), 4177–4185.
- Huber, A., Bach, M., Frede, H., 2000. Pollution of surface water with pesticides in germany : modeling non-point source inputs. *Agriculture Ecosystems and Environment* 80, 191–204.
- Ivorra, N., Bremer, S., Guasch, H., Kraak, M. H. S., Admiraal, W., 2000. Differences in the sensitivity of benthic microalgae to zn and cd regarding biofilm development and exposure history. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19 (5), 1332–1339.
- Ivorra, N., Hettelaar, J., Kraak, M. H. S., Sabater, S., Admiraal, W., 2002. Responses of biofilms to combined nutrient and metal exposure. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21 (3), 626–632.
- Jackson, C., 2003. Changes in community properties during microbial succession. *Oikos* 101, 444–448.
- Jackson, C. R., Churchill, P. F., Roden, E. E., 2001. Successional changes in bacterial assemblage structure during epilithic biofilm development. *Ecology* 82 (2), 555–566.
- Jankowski, C., 2007. Suivi de la qualité des eaux du bassin versant communal d'Aurad (gers) de 1996 à 2005. Tech. rep., Master 1 Eaux, Sols, Environnement.
- Janssen, M., Tramper, J., Mur, L. R., Wijffels, R. H., 2003. Enclosed outdoor photobioreactors : light regime, photosynthetic efficiency , scale-up, and future prospects. *Biotechnology and Bioengineering* 81 (2), 193–210.
- Jefferson, K., 2004. What drives bacteria to produce a biofilm. *FEMS Microbial Ecology* 236, 163–173.
- Jones, J. G., 1974. Methods for observation and enumeration of epilithic algae directly on surface of stones. *Oecologia* 16 (1), 1–8.
- Junghans, M., Backhaus, T., Faust, M., Scholze, M., Grimme, L. H., 2003. Predictability of combined effects of eight chloroacetanilide herbicides on algal reproduction. *Pest Management Science* 59 (10), 1101–1110.
- Junghans, M., Backhaus, T., Faust, M., Scholze, M., Grimme, L. H., 2006. Application and validation of approaches for the predictive hazard assessment of realistic pesticide mixtures. *Aquatic Toxicology* 76 (2), 93–110.
- Junk, J. W., Bayley, P. B., Sparks, R. E., 1989. The flood pulse concept in river floodplain systems. *Canadian Special Publications of Fisheries and Aquatic Sciences* 106, 110–127.

- Jurgensen, T. A., Hoagland, K. D., 1990. Effects of short-term pulses of atrazine on attached algal communities. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 19 (4), 617–623.
- Kalkhoff, S. J., Kolpin, D. W., Thurman, E. M., Ferrer, I., Barcelo, D., 1998. Degradation of chloroacetanilide herbicides : the prevalence of sulfonic and oxanilic acid metabolites in Iowa groundwaters and surface waters. *Environmental Science & Technology* 32 (11).
- Kapustka, L. A., Williams, B. A., Fairbrother, A., 1996. Evaluating risk predictions at population and community levels in pesticide registration - hypotheses to be tested. *Environmental Toxicology and Chemistry* 15 (4), 427–431.
- Kasai, F., 1999. Shifts in herbicide tolerance in paddy field periphyton following herbicide application. *Chemosphere* 38 (4), 919–931.
- Kasai, F., Hanazato, T., 1995. Effects of the triazine herbicide, simetryn, on fresh-water plankton communities in experimental ponds. *Environmental Pollution* 89 (2), 197–202.
- Katagi, T., 2006. Behavior of pesticides in water-sediment systems. In : *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, Vol 187. Vol. 187 of *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. pp. 133–251.
- Katagi, T., 2010. Bioconcentration, bioaccumulation, and metabolism of pesticides in aquatic organisms. In : *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, Vol 204. Vol. 204 of *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. pp. 1–132.
- Kaufman, L., 1982. Stream aufwuchs accumulation : disturbance frequency ans stress resistance and resilience. *Oecologia* 52, 57–63.
- Kent, A., Smith, D., Benson, B., Triplett, E., 2003. Web-based phylogenetic assignment tool for analysis of terminal restriction fragment length polymorphism profiles of microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology* 69 (11), 6768–6776.
- Kimbrough, R. A., Litke, D. W., 1996. Pesticides in streams draining agricultural and urban areas in colorado. *Environmental Science & Technology* 30 (3), 908–916.
- Kirchman, D. L., Rich, J. H., 1997. Regulation of bacterial growth rates by dissolved organic carbon and temperature in the equatorial pacific ocean. *Microbial Ecology* 33 (1), 11–20.
- Kloeke, F. V., Geesey, G. G., 1999. Localization and identification of populations of phosphatase-active bacterial cells associated with activated sludge flocs. *Microbial Ecology* 38 (3), 201–214.
- Knapp, C. W., Graham, D. W., Berardesco, G., deNoyelles, F., Cutak, B. J., Larive, C. K., 2003. Nutrient level, microbial activity, and alachlor transformation in aerobic aquatic systems. *Water Research* 37 (19), 4761–4769.
- Knauer, K., Leimgruber, A., Hommen, U., Knauert, S., 2010. Co-tolerance of phytoplankton communities to photosynthesis ii inhibitors. *Aquatic Toxicology* 96 (4), 256–263.
- Knott, N. A., Underwood, A. J., Chapman, M. G., Glasby, T. M., 2004. Epibiota on vertical and on horizontal surfaces on natural reefs and on artificial structures. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 84 (6), 1117–1130.
- Kolpin, D. W., Barbash, J. E., Gilliom, R. J., 2000. Pesticides in ground water of the united states, 1992-1996. *Ground Water* 38 (6), 858–863.
- Kolpin, D. W., Thurman, E. M., Goolsby, D. A., 1996. Occurrence of selected pesticides and their metabolites in near-surface aquifers of the midwestern united states. *Environmental Science & Technology* 30 (1), 335–340.



- Kolpin, D. W., Thurman, E. M., Linhart, S. M., 1998. The environment occurrence of herbicides : the importance of degradates in ground water. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 35, 385–390.
- Konopka, A., Olivier, O., Turco, R., 1998. The use of carbon substrate utilization patterns in environmental and ecological microbiology. *Microbial Ecology* 35, 103–115.
- Konstantinou, I. K., Hela, D. G., Albanis, T. A., 2006. The status of pesticide pollution in surface waters (rivers and lakes) of greece. part i. review on occurrence and levels. *Environmental Pollution* 141 (3), 555–570.
- Kostel, J. A., Wang, H., Amand, A. L. S., Gray, K. A., 1999. 1. use of a novel laboratory stream system to study the ecological impact of pcb exposure in a periphytic biolayer. *Water Research* 33 (18), 3735–3748.
- Kralj, K., Plenkovc-Moraj, A., Gligora, M., Primc-Habdija, B., Sipos, L., 2006. Structure of periphytic community on artificial substrata : influence of depth, slide orientation and colonization time in karstic lake visovacko, croatia. *Hydrobiologia* 560, 249–258.
- Kreuger, J., 1998. Pesticides in stream water within an agricultural catchment in southern sweden, 1990-1996. *Science of the Total Environment* 216 (3), 227–251.
- Krieger, K. A., Baker, D. B., Kramer, J. W., 1988. Effects of herbicides on stream aufwuchs productivity and nutrient-uptake. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 17 (3), 299–306.
- Kucera, T., Horakova, H., Sonska, A., 2008. Toxic metal ions in photoautotrophic organisms. *Photosynthetica* 46 (4), 481–489.
- Kuster, M., de Alda, M. J., Hernando, M. D., Petrovic, M., Martin-Alonso, J., Barcelo, D., 2008. Analysis and occurrence of pharmaceuticals, estrogens, progestogens and polar pesticides in sewage treatment plant effluents, river water and drinking water in the llobregat river basin (barcelona, spain). *Journal of Hydrology* 358 (1-2), 112–123.
- Laabs, V., Amelung, W., Fent, G., Zech, W., Kubiak, R., 2002. Fate of c-14-labeled soybean and corn pesticides in tropical soils of brazil under laboratory conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (16), 4619–4627.
- Laabs, V., Wehrhan, A., Pinto, A., Dores, E., Amelung, W., 2007. Pesticide fate in tropical wetlands of brazil : An aquatic microcosm study under semi-field conditions. *Chemosphere* 67 (5), 975–989.
- Labrou, N. E., Karavangeli, M., Tsaftaris, A., Clonis, Y., 2005. Kinetic analysis of maize glutathione s-transferase i catalysing the detoxification from chloroacetanilide herbicides. *Planta* 222 (1), 91–97.
- Lamberti, G., 1996. The role of periphyton in benthic food webs. In : Stevenson, R., Bothwell, M., Lowe, R. (Eds.), *Algal ecology freshwater benthic ecosystems*. Academix Press, San Diego.
- Lane, C. M., Taffs, K. H., Corfield, J. L., 2003. A comparison of diatom community structure on natural and artificial substrata. *Hydrobiologia* 493 (1-3), 65–79.
- Lanyi, K., Dinya, Z., 2005. Photodegradation study for assessing the environmental fate of some triazine-, urea- and thiolcarbamate-type herbicides. *Microchemical Journal* 80 (1), 79–87.
- Laviale, M., 2006. Effet des polluants sur les communautés péiphytiques naturelles apport des mesures de fluorescence chlorophyllienne en lumière modulée (pam). Ph.D. thesis, Université des Sciences et Technologies de Lille 1.
- Laviale, M., Prygiel, J., Creach, A., 2010. Light modulated toxicity of isoproturon toward natural stream periphyton photosynthesis : A comparison between constant and dynamic light conditions. *Aquatic Toxicology* 97 (4), 334–342.

- Lawrence, J., Neu, T., 2003. Microscale analyses of the formation and nature of microbial biofilm communities in river systems. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 2, 85–97.
- Lawrence, J., Zhu, B., Swerhone, G., Roy, J., Wassenaar, L., Topp, E., Korber, D., 2009. Comparative microscale analysis of the effects of triclosan and triclocarban on the structure and function of river biofilm communities. *Science of the Total Environment* 407, 3307–3316.
- Lawrence, J., Zhu, B., Swerhone, G., Topp, E., Roy, J., Wassenaar, L., Rema, T., Korber, D., 2008. Community-level assessment of the effects of the broad-spectrum antimicrobial chlorhexidine on the outcome of river microbial biofilm development. *Applied and Environment Microbiology* 74 (11), 3541–3550.
- Lawrence, J. R., Chenier, M. R., Roy, C. R., Beaumier, D., Fortin, N., Swerhone, G. D. W., Neu, T. R., Greer, C. W., 2004. Microscale and molecular assessment of impacts of nickel, nutrients, and oxygen level on structure and function of river biofilm communities. *Applied and Environmental microbiology* 70, No. 7, 4326–4339.
- Lawrence, J. R., Kopf, G., Headley, J. V., Neu, T. R., 2001. Sorption and metabolism of selected herbicides in river biofilm communities. *Canadian Journal of Microbiology* 47 (7), 634–641.
- Lawrence, J. R., Scharf, B., Packroff, G., Neu, T., 2002. Microscale evaluation of the effects of grazing by invertebrates with contrasting feeding modes on river biofilm architecture and composition. *Microbial Ecology* 43, 199–207.
- Lawrence, J. R., Swerhone, G. D. W., Neu, T. R., 2000. A simple rotating annular reactor for replicated biofilm studies. *Journal of Microbiological Methods* 42, 215–224.
- Lear, G., Anderson, M., Smith, J., Boxen, K., Lewis, G., 2008. Spatial and temporal heterogeneity of the bacterial communities in stream epilithic biofilms. *FEMS Microbiol Ecology* 65, 463–473.
- Lear, G., Dong, Y. M., Lewis, G., 2010. Comparison of methods for the extraction of dna from stream epilithic biofilms. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* 98 (4), 567–571.
- Leboulanger, C., Rimet, F., de Lacotte, M. H., Berard, A., 2001. Effects of atrazine and nicosulfuron on freshwater microalgae. *Environment International* 26 (3), 131–135.
- Lee, T. H., Kurata, S., Nakatsu, C. H., Kamagata, Y., 2005. Molecular analysis of bacterial community based on 16s rDNA and functional genes in activated sludge enriched with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-d) under different cultural conditions. *Microbial Ecology* 49 (1), 151–162.
- Leflaive, J., Buffan-Dubau, E., Ten-Hage, L., 2008. Algal bioactive compounds reduce net oxygen fluxes of artificial diatom biofilms. *Aquatic Microbial Ecology* 51, 275–284.
- Leflaive, J., Cereghino, R., Danger, M., Lacroix, G., Ten-Hage, L., 2005. Assessment of self-organizing maps to analyze sole-carbon source utilization profiles. *Journal of Microbiological Methods* 62 (1), 89–102.
- Lei, A. P., Wong, Y. S., Tam, N. F. Y., 2003. Pyrene-induced changes of glutathione-S-transferase activities in different microalgal species. *Chemosphere* 50 (3), 293–301.
- Leira, M., Sabater, S., 2005. Diatom assemblages distribution in catalan rivers, ne Spain, in relation to chemical and physiographical factors. *Water Research* 39 (1), 73–82.
- Liang, L. N., Hu, J. T., Chen, D. Y., Zhou, Q. F., He, B., Jiang, G. B., 2004. Primary investigation of heavy metal contamination status in molluscs collected from chinese coastal sites. *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 72 (5), 937–944.
- Liboriussen, L., Jeppesen, E., 2003. Temporal dynamics in epipelagic, pelagic and epiphytic algal production in a clear and a turbid shallow lake. *Freshwater Biology* 48 (3), 418–431.

- Licursi, M., Gomez, N., 2009. Effects of dredging on benthic diatom assemblages in a lowland stream. *Journal of Environmental Management* 90 (2), 973–982.
- Liu, H., Xiong, M., 2009. Comparative toxicity of racemic metolachlor and s-metolachlor to *Chlorella pyrenoidosa*. *Aquatic Toxicology* 93 (2-3), 100–106.
- LloydJones, G., Lau, P. C. K., 1997. Glutathione s-transferase-encoding gene as a potential probe for environmental bacterial isolates capable of degrading polycyclic aromatic hydrocarbons. *Applied and Environmental Microbiology* 63 (8), 3286–3290.
- Lock, M., Wallace, R., Costerson, J., Ventullo, R., Charlton, S., 1984. River epilithon : toward a structural-functional model. *Oikos* 42 (1), 10–22.
- Locke, M. A., Gaston, L., Zablotowicz, M., 1996. Alachlor biotransformation and sorption in soil from two soybean tillage systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44 (4), 1128–1134.
- Loisel, P., Harmand, J., Zemb, O., Latrille, E., Lobry, C., Delgenes, J. P., Godon, J. J., 2006. Denaturing gradient electrophoresis (dgc) and single-strand conformation polymorphism (sscp) molecular fingerprintings revisited by simulation and used as a tool to measure microbial diversity. *Environmental Microbiology* 8 (4), 720–731.
- Loos, R., Gawlik, B. M., Locoro, G., Rimaviciute, E., Contini, S., Bidoglio, G., 2009. Eu-wide survey of polar organic persistent pollutants in European river waters. *Environmental Pollution* 157 (2), 561–568.
- Lopez-Doval, J. C., Ricart, M., Guasch, H., Romani, A. M., Sabater, S., Munoz, I., 2010. Does grazing pressure modify diuron toxicity in a biofilm community? *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 58 (4), 955–962.
- Loreau, M., 2010. Linking biodiversity and ecosystems : towards a unifying ecological theory. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences* 365 (1537), 49–60.
- Loreau, M., Naeem, S., Inchausti, P., Bengtsson, J., Grime, J. P., Hector, A., Hooper, D. U., Huston, M. A., Raffaelli, D., Schmidt, B., Tilman, D., Wardle, D. A., 2001. Biodiversity and ecosystem functioning : current knowledge and future challenges. *Science* 294.
- Lowe, R. L., Guckert, J. B., Belanger, S. E., Davidson, D. H., Johnson, D. W., 1996. An evaluation of periphyton community structure and function on tile and cobble substrata in experimental stream mesocosms. *Hydrobiologia* 328 (2), 135–146.
- Luna, G., Dell'Anno, A., Danovaro, R., 2006. Dna extraction procedure : a critical issue for bacterial diversity assessment in marine sediments. *Microbial Ecology* 8 (2), 308–320.
- Lurling, M., Roessink, I., 2006. On the way to cyanobacterial blooms : Impact of the herbicide metribuzin on the competition between a green alga (*Scenedesmus*) and a cyanobacterium (*Microcystis*). *Chemosphere* 65 (4), 618–626.
- Luttenton, M. R., Baisden, C., 2006. The relationships among disturbance, substratum size and periphyton community structure. *Hydrobiologia* 561, 111–117.
- Lyautey, E., 2005. Caractérisation, dynamique et facteurs de contrôle des communautés bactériennes de biofilms de rivière. Ph.D. thesis, Université Paul Sabatier Toulouse.
- Lyautey, E., Jackson, C. R., Cayrou, J., Rols, J. L., Garabetian, F., 2005a. Bacterial community succession in natural river biofilm assemblages. *Microbial Ecology* 50 (4), 589–601.
- Lyautey, E., Lacoste, B., Ten-Hage, L., Rols, J. L., Garabetian, F., 2005b. Analysis of bacterial diversity in river biofilms using 16s rDNA PCR-DGGE : methodological settings and fingerprints interpretation. *Water Research* 39 (2-3), 380–388.

- Lyautey, E., Teissier, S., Charcosset, J. Y., Rols, J. L., Garabetian, F., 2003. Bacterial diversity of epilithic biofilm assemblages of an anthropised river section, assessed by dgge analysis of a 16s rdna fragment. *Aquatic Microbial Ecology* 33 (3), 217–224.
- Lynch, T. R., Johnson, H. E., Adams, W. J., 1985. Impact of atrazine and hexachlorobiphenyl on the structure and function of model stream ecosystems. *Environmental Toxicology and Chemistry* 4 (3), 399–413.
- MA, 2005. Millenium ecosystem assesment. ecosystem and human well-being : synthesis. Tech. rep., Island Press, Washington DC.
- Ma, J. Y., Chen, J. M., 2005. How to accurately assay the algal toxicity of pesticides with low water solubility. *Environmental Pollution* 136 (2), 267–273.
- Mac Cann, K., 2000. The diversity-stability debate. *Nature* 405, 228–233.
- Macleod, F. A., Guiot, S. R., Costerton, J. W., 1990. Layered structure of bacterial aggregates produced in an upflow anaerobic sludge bed and filter reactor. *Applied and Environmental Microbiology* 56 (6), 1598–1607.
- Madrigal, I., Benoit, P., Barriuso, E., Real, B., Dutertre, A., Moquet, M., Trejo, M., Ortiz, L., 2007. Pesticide degradation in vegetative buffer strips : Grassed and tree barriers : Case of isoproturon. *Agrociencia* 41 (2), 205–217.
- Mainstone, C. P., Parr, W., 2002. Phosphorus in rivers - ecology and management. *Science of the Total Environment* 282, 25–47.
- Majewski, M. S., Foreman, W. T., Goolsby, D. A., 2000. Pesticides in the atmosphere of the mississippi river valley, part i - rain. *Science of the Total Environment* 248 (2-3), 201–212.
- Marchesi, J. R., Sato, T., Weightman, A. J., Martin, T. A., Fry, J. C., Hiom, S. J., Wade, W. G., 1998. Design and evaluation of useful bacterium-specific pcr primers that amplify genes coding for bacterial 16s rrna. *Applied and Environmental Microbiology* 64 (2), 795–799.
- Marsh, T. L., 1999. Terminal restriction fragment length polymorphism (t-rflp) : an emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplification products. *Current Opinion in Microbiology* 2 (3), 323–327.
- Martiny, A. C., Jorgensen, T. M., Albrechtsen, H. J., Arvin, E., Molin, S., 2003. Long-term succession of structure and diversity of a biofilm formed in a model drinking water distribution system. *Applied and Environmental Microbiology* 69 (11), 6899–6907.
- Matthiessen, B., Ptacnik, R., Hillebrand, H., 2010. Diversity and community biomass depend on dispersal and disturbance in microalgal communities. *Hydrobiologia* 653 (1), 65–78.
- McCaig, A. E., Glover, L. A., Prosser, J. I., 2001. Numerical analysis of grassland bacterial community structure under different land management regimens by using 16s ribosomal dna sequence data and denaturing gradient gel electrophoresis banding patterns. *Applied and Environmental Microbiology* 67 (10), 4554–4559.
- McClellan, K., Altenburger, R., Schmitt-Jansen, M., 2008. Pollution-induced community tolerance as a measure of species interaction in toxicity assessment rid a-1497-2010. *Journal of Applied Ecology* 45 (5), 1514–1522.
- McCormick, P. V., Cairns, J., 1994. Algae as indicators of environmental change. *Journal of Applied Phycology* 6 (5-6), 509–526.
- McCormick, P. V., Stevenson, R. J., 1991. Mechanisms of benthic algal succession in lotic environments. *Ecology* 72 (5), 1835–1848.

- Mehel, A., 2006. Etude expérimentale d'un [é]coulement diphasique de taylor couette. Ph.D. thesis, Nantes.
- Meier, P., O'Connor, D., Dilks, D., 1983. Artificial substrata for reducing periphytic variability on replicated samples. In : Wetzel, R. (Ed.), *Periphyton of freshwater ecosystems*. Junk, W., The Hague, the Netherlands, pp. 283–286.
- Miller, P. L., Chin, Y. P., 2005. Indirect photolysis promoted by natural and engineered wetland water constituents : Processes leading to alachlor degradation. *Environmental Science & Technology* 39 (12), 4454–4462.
- Mills, N. E., Semlitsch, R. D., 2004. Competition and predation mediate the indirect effects of an insecticide on southern leopard frogs. *Ecological Applications* 14 (4), 1041–1054.
- Miralles, G., 2007. Devenir d'une contamination pétrolière dans les sédiments côtiers infra-littoraux et son impact sur les communautés bactériennes. Ph.D. thesis.
- Moeseneder, M. M., Arrieta, J. M., Muyzer, G., Winter, C., Herndl, G. J., 1999. Optimization of terminal-restriction fragment length polymorphism analysis for complex marine bacterioplankton communities and comparison with denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* 65 (8), 3518–3525.
- Mohr, S., Feibicke, M., Berghahn, R., Schmiediche, R., Schmidt, R., 2008. Response of plankton communities in freshwater pond and stream mesocosms to the herbicide metazachlor. *Environmental Pollution* 152 (3), 530–542.
- Montuelle, B., Dorigo, U., Berard, A., Volat, B., Bouchez, A., Tlili, A., Gouy, V., Pesce, S., 2010. The periphyton as a multimetric bioindicator for assessing the impact of land use on rivers : an overview of the ardisres-morcille experimental watershed (France). *Hydrobiologia* 657 (1), 123–141.
- Morin, S., 2006. Bioindication des effets des pollutions métalliques sur les communautés de diatomées benthiques - approches in situ et expérimentales. Ph.D. thesis, Université Bordeaux I.
- Morin, S., Bottin, M., Mazzella, N., Macary, F., Delmas, F., Winterton, P., Coste, M., 2009. Linking diatom community structure to pesticide input as evaluated through a spatial contamination potential (phytopixal) : A case study in the neste river system (south-west france). *Aquatic Toxicology* 94 (1), 28–39.
- Morin, S., Duong, T. T., Dabrin, A., Coynel, A., Herlory, O., Baudrimont, M., Delmas, F., Durrieu, G., Schafer, J., Winterton, P., Blanc, G., Coste, M., 2008. Long-term survey of heavy-metal pollution, biofilm contamination and diatom community structure in the riou mort watershed, south-west france. *Environmental Pollution* 151 (3), 532–542.
- Morin, S., Pesce, S., Tlili, A., Coste, M., Montuelle, B., 2010. Recovery potential of periphytic communities in a river impacted by a vineyard watershed. *Ecological Indicators* 10 (2), 419–426.
- Morin, S., Vivas-Nogues, M., Duong, T. T., Boudou, A., Coste, M., Delmas, F., 2007. Dynamics of benthic diatom colonization in a cadmium/zinc-polluted river (riou-mort, france). *Fundamental and Applied Limnology* 168 (2), 179–187.
- Morris, C. E., Bardin, M., Berge, O., Frey-Klett, P., Fromin, N., Girardin, H., Guinebretiere, M. H., Lebaron, P., Thiery, J. M., Troussellier, M., 2002. Microbial biodiversity : Approaches to experimental design and hypothesis testing in primary scientific literature from 1975 to 1999. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66 (4), 592–+.
- Mosich, T., Bunn, S., Davies, P., 2001. The relative importance of shading and nutrients on algal production in subtropical streams. *Freshwater Biology* 46, 1269–1278.
- Moss, J. A., Nocker, A., Lepo, J. E., Snyder, R. A., 2006. Stability and change in estuarine biofilm bacterial community diversity. *Applied and Environmental Microbiology* 72 (9), 5679–5688.

- Mouton, A. M., Van der Most, H., Jeuken, A., Goethals, P. L. M., De Pauw, N., 2009. Evaluation of river basin restoration options by the application of the water framework directive explorer in the zwalm river basin (flanders, belgium). *River Research and Applications* 25 (1), 82–97.
- Munoz, I., Real, M., Guasch, H., Navarro, E., Sabater, S., 2001. Effects of atrazine on periphyton under grazing pressure. *Aquatic Toxicology* 55, 239–249.
- Murdock, J. N., Dodds, W. K., 2007. Linking benthic algal biomass to stream substratum topography. *Journal of Phycology* 43, 449–460.
- Muyzer, G., Brinkhoff, T., Nubel, U., Santegoeds, C., Schafer, H., Wawer, C., 1997. Denaturing gradient gel electrophoresis (dgge) in microbial ecology. In : Kowalchuk, G., De Bruijn, F. (Eds.), Head, I.M. Akkermans, D. Van Elsa, J.D. Kluwer Academic, Dordrecht, pp. 1–27.
- Muyzer, G., Smalla, K., 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (dgge) and temperature gradient gel electrophoresis (tgge) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* 73 (1), 127–141.
- Navarro, A., Tauler, R., Lacorte, S., Barcelo, D., 2008. Occurrence and transport of pesticides and alkylphenols in water samples along the ebro river basin. *Journal of Hydrology* 383 (1-2), 18–29.
- Navarro, A., Tauler, R., Lacorte, S., Barcelo, D., 2010. Occurrence and transport of pesticides and alkylphenols in water samples along the ebro river basin. *Journal of Hydrology* 383 (1-2), 18–29.
- Neu, T. R., Lawrence, J. R., 1997. Development and structure of microbial biofilms in river water studied by confocal laser scanning microscopy. *FEMS Microbiology Ecology* 24, 11–25.
- Neu, T. R., Swerhone, G. D. W., Bockelmann, U., Lawrence, J. R., 2005. Effect of cnp on composition and structure of lotic biofilms as detected with lectin-specific glycoconjugates. *Aquatic Microbial Ecology* 38 (3), 283–294.
- Niederlehner, B. R., Cairns, J., 1992. Community response to cumulative toxic impact - effects of acclimation of zinc tolerance of aufwushs. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 49 (10), 2155–2163.
- Nikkila, A., Kukkonen, J. V. K., 2001. Effects of dissolved organic material on binding and toxicokinetics of pyrene in the waterflea daphnia magna. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 40 (3), 333–338.
- Nikolaev, Y. A., Plakunov, V. K., 2007. Biofilm - "city of microbes" or an analogue of multicellular organisms? *Microbiology* 76 (2), 125–138.
- Noack, U., Geffke, T., Balasubramanian, R., Papenbrock, J., Braune, M., Scheerbaum, D., 2003. Effects of the herbicide metazachlor on phytoplankton and periphyton communities in outdoor mesocosms. *Acta hydrochim. hydrobiol.* 31, 482–490.
- Novick, N. J., Alexander, M., 1985. Cometabolism of low concentrations of propachlor, alachlor, and cycloate in sewage and lake water. *Applied and environmental microbiology* 49 (4), 737–743.
- Novick, N. J., Mukherjee, R., Alexander, M., 1986. Metabolism of alachlor and propachlor in suspensions of pretreated soils and in samples from groundwater aquifers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 34 (4), 721–725.
- Nunan, N., Daniell, T. J., Singh, B. K., Papert, A., McNicol, J. W., Prosser, J. I., 2005. Links between plant and rhizoplane bacterial communities in grassland soils, characterized using molecular techniques. *Applied and Environmental Microbiology* 71 (11), 6784–6792.
- Nyholm, N., Kallqvist, T., 1989. Methods for growth-inhibition toxicity tests with fresh-water algae. *Environmental Toxicology and Chemistry* 8 (8), 689–703.

- Nyström, B., Becker-van Slooten, K., Berard, A., Grandjean, D., Druart, J. C., Leboulanger, C., 2002. Toxic effects of irgarol 1051 on phytoplankton and macrophytes in lake geneva. *Water Research* 36 (8), 2020–2028.
- Nyström, B., Paulsson, M., Almgren, K., Blank, H., 2000. Evaluation of the capacity for development of atrazine tolerance in periphyton from a swedish freshwater site as determined by inhibition of photosynthesis and sulfolipid synthesis. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19 (5), 1324–1331.
- Ochoa, J.-C., Coufort, C., Escudié, R., Liné, A., Paul, E., 2007. Influence of non-uniform distribution of shear stress on aerobic biofilms. *Chemical Engineering Science* 62, 3672–3684.
- Odum, E. P., 1985. Trends expected in stressed ecosystems. *Bioscience* 35 (7), 419–422.
- Ohmura, N., Kataoka, K., Shibata, Y., Makino, T., 1997. Effective mass diffusion over cell boundaries in a taylor-couette flow system. *Chemical Engineering Science* 52 (11), 1757–1765.
- Okubo, A., Sugiyama, S., 2009. Comparison of molecular fingerprinting methods for analysis of soil microbial community structure. *Ecological Research* 24 (6), 1399–1405.
- Olapade, O. A., Leff, L. G., 2005. Seasonal response of stream biofilm communities to dissolved organic matter and nutrient enrichments. *Applied and Environmental Microbiology* 71 (5), 2278–2287.
- Onbasli, D., Aslim, B., 2009. Investigation of effects of various organic pollutants upon the exopolysaccharides (epss) produced by some pseudomonas spp. strains. *New Biotechnology* 25, S267–S267.
- Osano, O., Admiraal, W., Klamer, H. J. C., Pastor, D., Bleeker, E. A. J., 2002. Comparative toxic and genotoxic effects of chloroacetanilides, formamidines and their degradation products on vibrio fischeri and chironomus riparius. *Environmental Pollution* 119 (2), 195–202.
- Osano, O., Nzyuko, D., Tole, M., Admiraal, W., 2003. The fate of chloroacetanilide herbicides and their degradation products in the nzoia basin, kenya. *Ambio* 32 (6), 424–427.
- Osborne, C. A., Rees, G. N., Bernstein, Y., Janssen, P. H., 2006. New threshold and confidence estimates for terminal restriction fragment length polymorphism analysis of complex bacterial communities. *Applied and Environmental Microbiology* 72 (2), 1270–1278.
- Paerl, H. W., Pinckney, J. L., 1996. A mini-review of microbial consortia : Their roles in aquatic production and biogeochemical cycling. *Microbial Ecology* 31 (3), 225–247.
- Palmisano, A. C., Schwab, B. S., Maruscik, D. A., Ventullo, R. M., 1991. Seasonal-changes in mineralization of xenobiotics by stream microbial communities. *Canadian Journal of Microbiology* 37 (12), 939–948.
- Papadopoulou-Mourkidou, E., Karpouzas, D., Patsias, J., Kotopoulou, A., Milothridou, A., Kintzikoglou, K., Vlachou, P., 2004a. The potential of pesticides to contaminate the groundwater resources of the axios river basin in macedonia, northern greece. part i.monitoring study in the north part of the basin. *Science of the Total Environment* 321, 127–146.
- Papadopoulou-Mourkidou, E., Karpouzas, D. G., Patsias, J., Kotopoulou, A., Milothridou, A., Kintzikoglou, K., Vlachou, P., 2004b. The potential of pesticides to contaminate the groundwater resources of the axios river basin in macedonia, northern greece. part i. monitoring study in the north part of the basin. *Science of the Total Environment* 321 (1-3), 127–146.
- Passy, S. I., 2007. Diatom ecological guilds display distinct and predictable behavior along nutrient and disturbance gradients in running waters. *Aquatic Botany* 86 (2), 171–178.
- Passy, S. I., Legendre, P., 2006. Are algal communities driven toward maximum biomass ? *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 273 (1601), 2667–2674.

- Paule, A., Lyautey, E., Garabetian, F., Rols, J. L., 2009. Autogenic versus environmental control during development of river biofilm. *Annales de Limnologie-International Journal of Limnology* 45 (1), 1–10.
- Pavlic, Z., Stjepanovic, B., Horvatic, J., Persic, V., Puntaric, D., Culig, J., 2006. Comparative sensitivity of green algae to herbicides using erlenmeyer flask and microplaque growth-inhibition assays. *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 76, 883–890.
- Payraudeau, S., Junker, P., Imfeld, G., Gregoire, C., 2009. Characterizing hydrological connectivity to identify critical source areas for pesticides losses. In : 18th World Imacs Congress and Modsim09 International Congress on Modelling and Simulation : Interfacing Modelling and Simulation with Mathematical and Computational Sciences. pp. 1879–1885.
- Pères, F., Florin, D., Grollier, T., FeurtetMazel, A., Coste, M., Ribeyre, F., Ricard, M., Boudou, A., 1996. Effects of the phenylurea herbicide isoproturon on periphytic diatom communities in freshwater indoor microcosms. *Environmental Pollution* 94 (2), 141–152.
- Pesce, S., 2006. Effets de pesticides sur l'activité et la diversité des communautés microbiennes d'un milieu lotique récepteur. études in situ et expérimentales. Ph.D. thesis, Université Blaise Pascal.
- Pesce, S., Batisson, I., Bardot, C., Fajon, C., Portelli, C., Montuelle, B., Bohatier, J., 2009a. Response of spring and summer riverine microbial communities following glyphosate exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72 (7), 1905–1912.
- Pesce, S., Fajon, C., Bardot, C., Bonnemoy, F., Portelli, C., Bohatier, J., 2006. Effects of the phenylurea herbicide diuron on natural riverine microbial communities in an experimental study. *Aquatic Toxicology* 78 (4), 303–314.
- Pesce, S., Lissalde, S., Lavieille, D., Margoum, C., Mazzella, N., Roubeix, V., Montuelle, B., 2010. Evaluation of single and joint toxic effects of diuron and its main metabolites on natural phototrophic biofilms using a pollution-induced community tolerance (pict) approach. *Aquatic Toxicology* 99 (4), 492–499.
- Pesce, S., Martin-Laurent, F., Rouard, N., Montuelle, B., 2009b. Potential for microbial diuron mineralisation in a small wine-growing watershed : from treated plots to lotic receiver hydrosystem. *Pest Management Science* 65 (6), 651–657.
- Pesce, S., Morin, S., Lissalde, S., Montuelle, B., Mazzella, N., 2011. Combining polar organic chemical integrative samplers (pocis) with toxicity testing to evaluate pesticide mixture effects on natural phototrophic biofilms. *Environmental Pollution* 159 (3), 735–741.
- Phillips, P. J., Wall, G. R., Thurman, E. M., Eckhardt, D. A., Vanhoesen, J., 1999. Metolachlor and its metabolites in tile drain and stream runoff in the canajoharie greek watershed. *Environmental Science & Technology* 33 (20), 3531–3537.
- Planas, C., Caixach, J., Santos, F. J., Rivera, J., 1997. Occurrence of pesticides in spanish surface waters. analysis by high resolution gas chromatography coupled to mass spectrometry. *Chemosphere* 34 (11), 2393–2406.
- Pokrovsky, O. S., Feurtet-Mazel, A., Martinez, R. E., Morin, S., Baudrimont, M., Duong, T., Coste, M., 2010. Experimental study of cadmium interaction with periphytic biofilms. *Applied Geochemistry* 25 (3), 418–427.
- Portillo, M. C., Gonzalez, J. M., 2008. Statistical differences between relative quantitative molecular fingerprints from microbial communities. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* 94 (2), 157–163.
- Postle, J. K., Rheineck, B. D., Allen, P. E., Baldock, J. O., Cook, C. J., Zogbaum, R., Vandenbrook, J. P., 2004. Chloroacetanilide herbicide metabolites in wisconsin groundwater : 2001 survey results. *Environmental Science & Technology* 38 (20), 5339–5343.



- Pothuluri, J. V., Moorman, T. B., Obenhuber, D. C., Wauchope, R. D., 1990. Aerobic and anaerobic degradation of alachlor in samples from a surface-to-groundwater profile. *Journal of Environmental Quality* 19 (3), 525–530.
- Potter, T. L., Carpenter, T. L., 1995. Occurrence of alachlor environmental degradation products in groundwater. *Environmental Science & Technology* 29 (6), 1557–1563.
- Prach, K., Walker, L. R., 2011. Four opportunities for studies of ecological succession. *Trends in Ecology & Evolution* 26 (3), 119–123.
- Prado, R., Rioboo, C., Herrero, C., Cid, A., 2009. The herbicide paraquat induces alterations in the elemental and biochemical composition of non-target microalgal species. *Chemosphere* 76 (10), 1440–1444.
- Pratt, J., Barreiro, R., 1998. Influence of trophic status on the toxic effects of herbicide : a microcosm study. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 35, 404–411.
- Pratt, J., Bowers, N., Niederlehner, B., Cairns, J., 1988. Effects of atrazine on freshwater microbial communities. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 17 (4), 449–457.
- Preston-Mafham, J., Boddy, L., Randerson, P., 2002. Analysis of microbial community functional diversity using sole-carbon-source utilisation profiles – a critique. *FEMS Microbiology Ecology* 42, 1–14.
- Prygiel, J., Coste, M., 1993. The assessment of water quality in the artois-picardie water basin (france) by the use of diatom indices. *Hydrobiologia* 269/270, 343–349.
- Pyl'nik, S. V., Dueck, J. H., Min'kov, L. L., 2007. Equilibrium thickness of a biofilm. *Theoretical Foundations of Chemical Engineering* 41 (4), 430–435.
- Rabiet, M., Margoum, C., Gouy, V., Carlier, N., Coquery, M., 2010. Assessing pesticide concentrations and fluxes in the stream of a small vineyard catchment - effect of sampling frequency. *Environmental Pollution* 158 (3), 737–748.
- Ramette, A., 2007. Multivariate analyses in microbial ecology. *Fems Microbiology Ecology* 62 (2), 142–160.
- Rand, G. M., Clark, J. R., Holmes, C. M., 2000. Use of outdoor freshwater pond microcosms : I. microcosm design and fate of pyridaben. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19 (2), 387–395.
- Rasmussen, K., Lewandowski, Z., 1998. Microelectrode measurements of local mass transport rates in heterogeneous biofilms. *Biotechnology and Bioengineering* 59 (3), 302–309.
- Rebich, R. A., Coupe, R. H., Thurman, E. M., 2004. Herbicide concentrations in the mississippi river basin - the importance of chloroacetanilide herbicide degradates. *Science of the Total Environment* 321 (1-3), 189–199.
- Redfield, R. J., 2002. Is quorum sensing a side effect of diffusion sensing? *Trends in Microbiology* 10 (8), 365–370.
- Relyea, R., Hoverman, J., 2006. Assessing the ecology in ecotoxicology : a review and synthesis in freshwater systems. *Ecology Letters* 9 (10), 1157–1171.
- Relyea, R. A., 2009. A cocktail of contaminants : how mixtures of pesticides at low concentrations affect aquatic communities. *Oecologia* 159 (2), 363–376.
- Reynolds, C. S., Descy, J. P., Padisak, J., 1994. Are phytoplankton dynamics in rivers so different from those in shallow lakes. *Hydrobiologia* 289 (1-3), 1–7.
- Ricart, M., Barcelo, D., Geiszinger, A., Guasch, H., de Alda, M. L., Romani, A. M., Vidal, G., Villagrasa, M., Sabater, S., 2009. Effects of low concentrations of the phenylurea herbicide diuron on biofilm algae and bacteria. *Chemosphere* 76 (10), 1392–1401.

- Ricart, M., Guasch, H., Barcelo, D., Brix, R., Conceicao, M. H., Geislinger, A., de Alda, M. J. L., Lopez-Doval, J. C., Munoz, I., Postigo, C., Romani, A. M., Villagrana, M., Sabater, S., 2010. Primary and complex stressors in polluted mediterranean rivers : Pesticide effects on biological communities. *Journal of Hydrology* 383 (1-2), 52–61.
- Ricciardi, F., Bonnineau, C., Faggiano, L., Geislinger, A., Guasch, H., Lopez-Doval, J., Munoz, I., Proia, L., Ricart, M., Romani, A., Sabater, C., 2009. Is chemical contamination linked to the diversity of biological communities in rivers? *Trends in Analytical Chemistry* 28, 592–602.
- Rier, S. T., Stevenson, J., 2002. Effects of light, dissolved organic carbon, and inorganic nutrients on the relationship between algae and heterotrophic bacteria in stream periphyton. *Hydrobiologia* 489, 179–184.
- Rier, S. T., Stevenson, R. J., LaLiberte, G. D., 2006. Photo-acclimation response of benthic stream algae across experimentally manipulated light gradients : A comparison of growth rates and net primary productivity. *Journal of Phycology* 42 (3), 560–567.
- Rimet, F., Bouchez, A., 2011. Use of diatom life-forms and ecological guilds to assess pesticide contamination in rivers : Lotic mesocosm approaches. *Ecological Indicators* 11 (2), 489–499.
- Rimet, F., Cauchie, H. M., Hoffmann, L., Ector, L., 2005. Response of diatom indices to simulated water quality improvements in a river. *Journal of Applied Phycology* 17 (2), 119–128.
- Rimet, F., Ector, L., Cauchie, H. M., Hoffmann, L., 2009. Changes in diatom-dominated biofilms during simulated improvements in water quality : implications for diatom-based monitoring in rivers. *European Journal of Phycology* 44 (4), 567–577.
- Robarts, R. D., Wicks, R. J., 1989. [methyl-h-3]thymidine macromolecular incorporation and lipid labeling-their significance to dna labeling during measurements of aquatic bacterial growth rate. *Limnology and Oceanography* 34 (1), 213–222.
- Roberts, S., Sabater, F., Beardall, J., 2004. Benthic microalgal colonization in streams of differing riparian cover and light availability. *Journal of Phycology* 40, 1004–1012.
- Rodriguez-Cruz, S., Lacorte, S., 2005. Degradation of alachlor in natural and sludge-amended soils, studies by gas and liquid chromatography coupled to mass (gc-ms and hplc-ms). *Journal Agricultural and Food Chemistry* 53, 9571–9577.
- Roeselers, G., Van Loosdrecht, M., Muyzer, G., 2007. Heterotrophic pioneers facilitate phototrophic biofilm development. *Microbial Ecology* 54, 578–585.
- Roeselers, G., Zippel, B., Staal, M., van Loosdrecht, M., Muyzer, G., 2006. On the reproducibility of microcosm experiments - different community composition in parallel phototrophic biofilm microcosms. *Fems Microbiology Ecology* 58 (2), 169–178.
- Rohr, J. R., Crumrine, P. W., 2005. Effects of an herbicide and an insecticide on pond community structure and processes. *Ecological Applications* 15 (4), 1135–1147.
- Rohr, J. R., Sager, T., Sesterhenn, T. M., Palmer, B. D., 2006. Exposure, postexposure, and density-mediated effects of atrazine on amphibians : Breaking down net effects into their parts. *Environmental Health Perspectives* 114 (1), 46–50.
- Rols, J. L., Garabetian, F., 2004. Biofilms de rivières : structure et fonctionnement d'un modèle d'agrégat microbien.
- Romani, A., Guash, H., Munoz, I., Ruana, J., Vilalta, E., Schwartz, T., Emtiazi, F., Sabater, S., 2004. Biofilm structure and function and possible implications for riverine doc dynamics. *Microbial Ecology* 47, 316–328.
- Romani, A. M., Fund, K., Artigas, J., Schwartz, T., Sabater, S., Obst, U., 2008. Relevance of polymeric matrix enzymes during biofilm formation. *Microbial Ecology* 56 (3), 427–436.

- Romani, A. M., Sabater, S., 2000. Influence of algal biomass on extracellular enzyme activity in river biofilms. *Microbial Ecology* 40 (1), 16–24.
- Romani, A. M., Vazquez, E., Butturini, A., 2006. Microbial availability and size fractionation of dissolved organic carbon after drought in an intermittent stream : Biogeochemical link across the stream-riparian interface. *Microbial Ecology* 52 (3), 501–512.
- Rossini, L., Jepson, I., Greenland, A. J., Gorla, M. S., 1996. Characterization of glutathione s-transferase isoforms in three maize inbred lines exhibiting differential sensitivity to alachlor. *Plant Physiology* 112 (4), 1595–1600.
- Rotter, S., Sans-Piche, F., Streck, G., Altenburger, R., Schmitt-Jansen, M., 2011. Active bio-monitoring of contamination in aquatic systems-an in situ translocation experiment applying the pict concept. *Aquatic Toxicology* 101 (1), 228–236.
- Roubeix, V., Mazzella, N., Delmas, F., Coste, M., 2010. In situ evaluation of herbicide effects on the composition of river periphytic diatom communities in a region of intensive agriculture. *Vie Et Milieu-Life and Environment* 60 (3), 233–241.
- Roubeix, V., Mazzella, N., Mechin, B., Coste, M., Delmas, F., 2011a. Impact of the herbicide metolachlor on river periphytic diatoms : Experimental comparison of descriptors at different biological organization levels. *Annales de Limnologie-International Journal of Limnology* 47 (3), 239–249.
- Roubeix, V., Mazzella, N., Schouler, L., Fauvelle, V., Morin, S., Coste, M., Delmas, F., Margoum, C., 2011b. Variations of periphytic diatom sensitivity to the herbicide diuron and relation to species distribution in a contamination gradient : implications for biomonitoring. *Journal of Environmental Monitoring* 13 (6), 1768–1774.
- Ryu, C. S., Kim, M. S., Kim, B. W., 2003. Photodegradation of alachlor with the tio<sub>2</sub> film immobilised on the glass tube in aqueous solution. *Chemosphere* 53 (7), 765–771.
- Sabater, S., Acuna, V., Giorgi, A., Guerra, E., Munoz, I., Romani, A., 2005. Effects of nutrient inputs in a forested mediterranean stream under moderate light availability. *Archiv Fur Hydrobiologie* 163 (4), 479–496.
- Sabater, S., Navarro, E., Guasch, H., 2002. Effects of copper on algal communities at different current velocities. *Journal of Applied Phycology* 14 (5), 391–398.
- Sanchez-Camazano, M., Lorenzo, L. F., Sanchez-Martin, M. J., 2005. Atrazine and alachlor inputs to surface and ground waters in irrigated corn cultivation areas of castilla-leon region, spain. *Environmental Monitoring and Assessment* 105, 11–24.
- Sanson, G. D., Stolk, R., Downes, B. J., 1995. A new method for characterizing surface-roughness and available space in biological-systems. *Functional Ecology* 9 (1), 127–135.
- Satoh, A., Vudikaria, L. Q., Kurano, N., Miyachi, S., 2005. Evaluation of the sensitivity of marine microalgal strains to the heavy metals, cu, as, sb, pb and cd. *Environment International* 31 (5), 713–722.
- Schloss, P. D., Hay, A. G., Wilson, D. B., Walker, L. P., 2003. Tracking temporal changes of bacterial community fingerprints during the initial stages of composting. *Fems Microbiology Ecology* 46 (1), 1–9.
- Schmalzfuss, J., Matthes, B., Mayer, P., Boger, P., 1998. Chloroacetamide mode of action, i : Inhibition of very long chain fatty acid synthesis in *scenedesmus acutus*. *Zeitschrift Fur Naturforschung Section C-a Journal of Biosciences* 53 (11-12), 995–1003.
- Schmid-Araya, J. M., Schmid, P. E., 2000. Trophic relationships : integrating meiofauna into a realistic benthic food web. *Freshwater Biology* 44 (1), 149–163.

- Schmitt-Jansen, M., Altenburger, R., 2005. Toxic effects of isotroturon on periphyton communities - a microcosm study. *Estuarine Coastal and Shelf Science* 62 (3), 539–545.
- Schmitt-Jansen, M., Altenburger, R., 2008. Community-level microalgal toxicity assessment by multiwavelength-excitation pam fluorometry. *Aquatic Toxicology* 86 (1), 49–58.
- Schottler, S. P., Eisenreich, S. J., Capel, P. D., 1994. Atrazine, alachlor, and cyanazine in a large agricultural river system. *Environmental Science & Technology* 28 (6), 1079–1089.
- Schwab, A. P., Splichal, P. A., Banks, M. K., 2006. Adsorption of atrazine and alachlor to aquifer material and soil. *Water Air and Soil Pollution* 177 (1-4), 119–134.
- Schwarzenbach, R. P., Escher, B. I., Fenner, K., Hofstetter, T. B., Johnson, C. A., von Gunten, U., Wehrli, B., 2006. The challenge of micropollutants in aquatic systems. *Science* 313 (5790), 1072–1077.
- SCOR-Unesco, 1966. Determination of photosynthetic pigments in sea water. *Monigr. Oceanogr* 1.
- Scribner, E. A., Battaglin, W. A., Goolsby, D. A., Thurman, E. M., 2000a. Changes in herbicide concentrations in midwestern streams in relation to changes in use, 1989-1998. *Science of the Total Environment* 248 (2-3), 255–263.
- Scribner, E. A., Thurman, E. M., Zimmermann, L. R., 2000b. Analysis of selected herbicide metabolites in surface and ground water of the united states. *Science of the Total Environment* 248 (2-3), 157–167.
- Seguin, F., Druart, J. C., Le Cohu, R., 2001. Effects of atrazine and nicosulfuron on periphytic diatom communities in freshwater outdoor lentic mesocosms. *Annales de Limnologie-International Journal of Limnology* 37 (1), 3–8.
- Sekar, R., Nair, K. V. K., Rao, V. N. R., Venugopalan, V. P., 2002. Nutrient dynamics and successional changes in a lentic freshwater biofilm. *Freshwater Biology* 47 (10), 1893–1907.
- 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, 97–108.
- Selim, H. M., Zhou, L., Xue, S. K., 2002. Alachlor transport during transient water flow in unsaturated soils. *Soil Science Society of America Journal* 66 (6), 1773–1783.
- Serra, A., Corcoll, N., Guasch, H., 2009. Copper accumulation and toxicity in fluvial periphyton : The influence of exposure history. *Chemosphere* 74 (5), 633–641.
- Sette, L. D., Costa, L. A. M. A., Marsaioli, A. J., Manfio, G. P., 2004. Biodegradation of alachlor by soil streptomycetes. *Applied Microbiology Biotechnology* 64, 712–717.
- Sigee, D., 2005. *Freshwater Microbiology. Biodiversity and dynamic interactions of microorganisms in the aquatic environment.* John Wiley and Sons, Chichester, UK.
- Singer, G., Besemer, K., Hodl, I., Chlup, A., Hochedlinger, G., Stadler, P., Battin, T. J., 2006. Microcosm design and evaluation to study stream microbial biofilms. *Limnology and Oceanography-Methods* 4, 436–447.
- Singer, G., Besemer, K., Schmitt-Kopplin, P., Hodl, I., Battin, T. J., 2010. Physical heterogeneity increases biofilm resource use and its molecular diversity in stream mesocosms. *Plos One* 5 (3).
- Singh, R., Paul, D., Jain, R. K., 2006. Biofilms : implications in bioremediation. *TREND in Microbiology* 14, No. 9.
- Singh, S., Datta, P., 2005. Growth and survival potentials of immobilized diazotrophic cyanobacterial isolates exposed to common ricefield herbicides. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 21 (4), 441–446.

- Smalla, K., Oros-Sichler, M., Milling, A., Heuer, H., Baumgarte, S., Becker, R., Neuber, G., Kropf, S., Ulrich, A., Tebbe, C. C., 2007. Bacterial diversity of soils assessed by dge, t-rflp and sscp fingerprints of pcr-amplified 16s rna gene fragments : Do the different methods provide similar results? *Journal of Microbiological Methods* 69 (3), 470–479.
- Smith, C. J., Danilowicz, B. S., Clear, A. K., Costello, F. J., Wilson, B., Meijer, W. G., 2005. T-align, a web-based tool for comparison of multiple terminal restriction fragment length polymorphism profiles. *Fems Microbiology Ecology* 54 (3), 375–380.
- Smits, J. D., Riemann, B., 1988. Calculation of cell production from [h-3]thymidine incorporation with fresh-water bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 54 (9), 2213–2219.
- Smucker, N. J., DeForest, J. L., Vis, M. L., 2009. Different methods and storage duration affect measurements of epilithic extracellular enzyme activities in lotic biofilms. *Hydrobiologia* 636 (1), 153–162.
- Solomon, K. R., Baker, D. B., Richards, R. P., Dixon, D. R., Klaine, S. J., LaPoint, T. W., Kendall, R. J., Weisskopf, C. P., Giddings, J. M., Giesy, J. P., Hall, L. W., Williams, W. M., 1996. Ecological risk assessment of atrazine in north american surface waters. *Environmental Toxicology and Chemistry* 15 (1), 31–74.
- Sorensen, S. R., Aamand, J., 2003. Rapid mineralisation of the herbicide isoproturon in soil from a previously treated danish agricultural field. *Pest Management Science* 59 (10), 1118–1124.
- Spawn, R. L., Hoagland, K. D., Siegfried, B. D., 1997. Effects of alachlor on an algal community from a midwestern agricultural stream. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16 (4), 785–793.
- Spiegelman, D., Whissell, G., Greer, C. W., 2005. A survey of the methods for the characterization of microbial consortia and communities. *Canadian Journal of Microbiology* 51 (5), 355–386.
- Stachowicz, J. J., Bruno, J. F., Duffy, J. E., 2007. Understanding the effects of marine biodiversity on communities and ecosystems. In : *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics*. Vol. 38 of *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics*. pp. 739–766.
- Stamper, D. M., Tuovinen, O. H., 1998. Biodegradation of the acetanilide herbicides alachlor, metolachlor, and propachlor. *Critical Reviews in Microbiology* 24 (1), 1–22.
- Stanford, J. A., Ward, J. V., 1988. The hyporheic habitat of river ecosystems. *Nature* 335 (6185), 64–66.
- Stasinakis, A. S., Kotsifa, S., Gatidou, G., Mamais, D., 2009. Diuron biodegradation in activated sludge batch reactors under aerobic and anoxic conditions. *Water Research* 43 (5), 1471–1479.
- Steinman, A. D., Mulholland, P. J., Beauchamp, J. J., 1995. Effects of biomass, light, and grazing on phosphorus cycling in stream periphyton communities. *Journal of the North American Benthological Society* 14 (3), 371–381.
- Steinman, A. D., Mulholland, P. J., Hill, W. R., 1992. Functional-responses associated with growth form in stream algae. *Journal of the North American Benthological Society* 11 (2), 229–243.
- Stevenson, C., Peterson, C., 1991. Emigration and immigration can be important determinance of benthic diatom assemblages in stream. *Freshwater Biology* 26, 279–294.
- Stevenson, R., Bothwell, M., Lowe, R., 1996. *Algal Ecology Freshwater Benthic Ecosystems*, academic press Edition. *Groundwater Ecology*.
- Stevenson, R. J., 1983. Effects of current and conditions simulating autogenically changing microhabitats on benthic diatom immigration. *Ecology* 64 (6), 1514–1524.
- Stevenson, R. J., 1997. Scale-dependent determinants and consequences of benthic algal heterogeneity. *Journal of the North American Benthological Society* 16 (1), 248–262.

- Stevenson, R. J., Pan, Y., 1999. Assessing ecological conditions in rivers and streams with diatoms. In : Stoermer, E., Smol, J. (Eds.), *The diatoms : applications to environmental and earth Sciences*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 11–40.
- Stevenson, R. J., Peterson, C. G., 1989. Variation in benthic diatom (bacillariophyceae) immigration with habitat characteristics and cell morphology. *Journal of Phycology* 25 (1), 120–129.
- Stevenson, R. J., Peterson, C. G., Kirschtel, D. B., King, C. C., Tuchman, N. C., 1991. Density-dependent growth, ecological strategies, and effects of nutrients and shading on benthic diatoms succession in streams. *Journal of Phycology* 27 (1), 59–69.
- Stratton, G. W., 1984. Effects of the herbicide atrazine and its degradation products, alone and in combination, on phototrophic microorganisms. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 13 (1), 35–42.
- Stratton, G. W., 1985. The influence of solvent type on solvent pesticide interactions in bioassays. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 14 (6), 651–658.
- Sugiharto, S., Su'ud, Z., Kurniadi, R., Wibisono, W., Abidin, Z., 2009. Radiotracer method for residence time distribution study in multiphase flow system. *Applied Radiation and Isotopes* 67, 1445–1448.
- Sultana, M., Asaeda, T., Manatunge, J., Ablimit, A., 2004. Colonisation and growth of epiphytic algal communities on *potamogeton perfoliatus* under two different light regimes. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 38, 585–594.
- Sun, H. L., Sheets, T. J., Corbin, F. T., 1990. Transformation of alachlor by microbial communities. *Weed Science* 38 (4-5), 416–420.
- Sutherland, I. W., 2001. The biofilm matrix - an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends in Microbiology* 9 (5), 222–227.
- Szabo, K. E., Makk, J., Kiss, K. T., Eiler, A., Acs, E., Toth, B., Kiss, A. K., Bertilsson, S., 2008. Sequential colonization by river periphyton analysed by microscopy and molecular fingerprinting. *Freshwater Biology* 53, 1359–1371.
- Szlauer-Lukaszewska, A., 2007. Succession of periphyton developing on artificial substrate immersed in polysaprobic wastewater reservoir.
- Taghavi, L., Merlina, G., Probst, J. L., 2011. The role of storm flows in concentration of pesticides associated with particulate and dissolved fractions as a threat to aquatic ecosystems case study : the agricultural watershed of save river (southwest of france). *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* (400).
- Taghavi, L., Probst, J. L., Merlina, G., Marchand, A. L., Durbe, G., Probst, A., 2010. Flood event impact on pesticide transfer in a small agricultural catchment (montousse at aurade, south west france). *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 90 (3-6), 390–405.
- Tang, J. X., Hoagland, K. D., Siegfried, B. D., 1997. Differential toxicity of atrazine to selected freshwater algae. *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 59 (4), 631–637.
- Teissier, S., Torre, M., 2002. Simultaneous assessment of nitrification and denitrification on freshwater epilithic biofilms by acetylene block method. *Water Research* 36 (15), 3803–3811.
- Teixeira, H., Salas, F., Neto, J. M., Patriicio, J., Pinto, R., Verissimo, H., Garcia-Charton, J. A., Marcos, C., Perez-Ruzafa, A., Marques, J. C., 2008. Ecological indices tracking distinct impacts along disturbance-recovery gradients in a temperate ne atlantic estuary - guidance on reference values. *Estuarine Coastal and Shelf Science* 80 (1), 130–140.
- Tessier, D. M., Clark, J. M., 1995. Quantitative assessment of the mutagenic potential of environmental degradative products of alachlor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43 (9), 2504–2512.

- Thurman, E. M., Goolsby, D. A., Aga, D. S., Pomes, M. L., Meyer, M. T., 1996. Occurrence of alachlor and its sulfonated metabolite in rivers and reservoirs of the midwestern united states : The importance of sulfonation in the transport of chloroacetanilide herbicides. *Environmental Science & Technology* 30 (2), 569–574.
- Tilman, D., 1996. Biodiversity : Population versus ecosystem stability. *Ecology* 77 (2), 350–363.
- Tilman, D., Wedin, D., Knops, J., 1996. Productivity and sustainability influenced by biodiversity in grassland ecosystems. *Nature* 379 (6567), 718–720.
- Tissier, C., Morvan, C., Bocquené, G., Gossel, H., James, A., Marchand, M., 2005. Les substances prioritaires de la directive cadre sur l'eau (dce). IFREMER.
- Tlili, A., 2010. Signification écologique de la tolérance acquise des communautés microbiennes des biofilms de rivières à une contamination d'origine anthropique. Ph.D. thesis, Université Claude Bernard Lyon I.
- Tlili, A., Bérard, A., Roulier, J. L., Volat, B., Montuelle, B., 2010. Po(4)(3-) dependence of the tolerance of autotrophic and heterotrophic biofilm communities to copper and diuron. *Aquatic Toxicology* 98 (2), 165–177.
- Tlili, A., Dorigo, U., Montuelle, B., Margoum, C., Carluer, N., Gouy, V., Bouchez, A., Berard, A., 2008. Responses of chronically contaminated biofilms to short pulses of diuron - an experimental study simulating flooding events in a small river. *Aquatic Toxicology* 87 (4), 252–263.
- Tlili, A., Marechal, M., Bérard, A., Volat, B., Montuelle, B., 2011a. Enhanced co-tolerance and co-sensitivity from long-term metal exposures of heterotrophic and autotrophic components of fluvial biofilms. *Science of the Total Environment* 409 (20), 4335–4343.
- Tlili, A., Montuelle, B., Bérard, A., Bouchez, A., 2011b. Impact of chronic and acute pesticide exposures on periphyton communities. *Science of the Total Environment* 409 (11), 2102–2113.
- Tomlin, C., 1995. *The Pesticide Manual*.
- Torang, L., Nyholm, N., Albrechtsen, H. J., 2003. Shifts in biodegradation kinetics of the herbicides mepp and 2,4-d at low concentrations in aerobic aquifer materials. *Environmental Science & Technology* 37 (14), 3095–3103.
- Townsend, C. R., 1989. The patch dynamics concept of stream community ecology. *Journal of the North American Benthological Society* 8 (1), 36–50.
- Townsend, S. A., Gell, P. A., 2005. The role of substrate type on benthic diatom assemblages in the daly and roper river of the australian wet/dry tropics. *Hydrobiologia* 548, 101–115.
- Vallaëys, T., Topp, E., Muyzer, G., Macheret, V., Laguerre, G., Rigaud, A., Soulas, G., 1997. Evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis in the detection of 16s rdna sequence variation in rhizobia and methanotrophs. *Fems Microbiology Ecology* 24 (3), 279–285.
- Vallotton, N., Ilda, R., Eggen, L., Escher, B. I., Kraysenbuhl, J., Chèvre, N., 2008a. Effect of pulse herbicidal exposure on *scenedesmus vacuolatus* : A comparison of two photosystem ii inhibitors. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27 (6), 1399–1407.
- Vallotton, N., Moser, D., Eggen, R. I. L., Junghans, M., Chèvre, N., 2008b. S-metolachlor pulse exposure on the alga *scenedesmus vacuolatus* : Effects during exposure and the subsequent recovery. *Chemosphere* 73 (3), 395–400.
- Van den Brink, P. J., Crum, S. J. H., Gylstra, R., Bransen, F., Cuppen, J. G. M., Brock, T. C. M., 2009. Effects of a herbicide-insecticide mixture in freshwater microcosms : Risk assessment and ecological effect chain. *Environmental Pollution* 157 (1), 237–249.

- Van den Brink, P. J., Hartgers, E. M., Fettweis, U., Crum, S. J. H., VanDonk, E., Brock, T. C. M., 1997. Sensitivity of macrophyte-dominated freshwater microcosms to chronic levels of the herbicide linuron .1. primary producers. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 38 (1), 13–24.
- Van den Brink, P. J., Hattink, J., Bransen, F., Van Donk, E., Brock, T. C. M., 2000. Impact of the fungicide carbendazim in freshwater microcosms. ii. zooplankton, primary producers and final conclusions. *Aquatic Toxicology* 48 (2-3), 251–264.
- Van Wijngaarden, R. P. A., Brock, T. C. M., Douglas, M. T., 2005. Effects of chlorpyrifos in freshwater model ecosystems : the influence of experimental conditions on ecotoxicological thresholds. *Pest Management Science* 61 (10), 923–935.
- Vandermeulen, H., Dewreede, R. E., 1982. The influence of orientation of an artificial substrate (transite) on settlement of marine organisms. *Ophelia* 21 (1), 41–48.
- Vanelslander, B., De Wever, A., Van Oostende, N., Kaewnuratchadasorn, P., Vanormelingen, P., Hendrickx, F., Sabbe, K., Vyverman, W., 2009. Complementarity effects drive positive diversity effects on biomass production in experimental benthic diatom biofilms. *Journal of Ecology* 97 (5), 1075–1082.
- Vannote, R. L., Minshall, G. W., Cummins, K. W., Sedell, J., J. R., Cushing, C. E., 1980. River continuum concept. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 37 (1), 130–137.
- Vazquez-Rodriguez, G., Goma, G., Rols, J. L., 2003. Activated sludge as inoculum for ready biodegradability testing : Effect of source. *Environmental Technology* 24 (8), 979–987.
- Vazquez Rodriguez, G. A., Garabetian, F., Rols, J. L., 2007. Inocula from activated sludge for ready biodegradability testing : Homogenization by preconditioning. *Chemosphere* 68, 1447–1454.
- Vera, M. S., Lagomarsino, L., Sylvester, M., Perez, G. L., Rodriguez, P., Mugni, H., Sinistro, R., Ferraro, M., Bonetto, C., Zagarese, H., Pizarro, H., 2010. New evidences of roundup(a (r)) (glyphosate formulation) impact on the periphyton community and the water quality of freshwater ecosystems. *Ecotoxicology* 19 (4), 710–721.
- Vera, M. S., Lagomarsino, L., Sylvester, M., Perez, G. L., Rodriguez, P., Mugni, H., Sinistro, R., Ferraro, M., Bonetto, C., Zagarese, H., Pizarro, H., 2011. New evidences of roundup(a (r)) (glyphosate formulation) impact on the periphyton community and the water quality of freshwater ecosystems. *Ecotoxicology* 19 (4), 710–721.
- Vercraene-Eairmal, M., Lauga, B., Saint Laurent, S., Mazzella, N., Boutry, S., Simon, M., Karama, S., Delmas, F., Duran, R., 2010. Diuron biotransformation and its effects on biofilm bacterial community structure. *Chemosphere* 81 (7), 837–843.
- Villeneuve, A., 2008. Effets conjoints de facteurs physiques (lumière et vitesse du courant) et chimiques (pesticides) sur la structure et la composition du périphyton : une approche multi-échelles. Ph.D. thesis.
- Villeneuve, A., Larroudé, S., Humbert, J. F., 2011a. Herbicide contamination of freshwater ecosystem : impact on microbial communities. In : Stoytcheva, M. (Ed.), *Pesticides - Formulations, effects, fate*. pp. 285–312.
- Villeneuve, A., Montuelle, B., Bouchez, A., 2011b. Effects of flow regime and pesticides on periphytic communities : evolution and role of biodiversity. *Aquatic Toxicology* 102, 123–133.
- Villeneuve, A., Bouchez, A., Montuelle, B., 2011c. In situ interactions between the effects of season, current velocity and pollution on a river biofilm. *Freshwater Biology* 56 (11), 2245–2259.
- Villeneuve, A., Montuelle, B., Bouchez, A., 2010. Influence of slight differences in environmental conditions (light, hydrodynamics) on the structure and function of periphyton. *Aquatic Sciences* 72 (1), 33–44.



- Vinten, A. J. A., Artz, R. R. E., Thomas, N., Potts, J. M., Avery, L., Langan, S. J., Watson, H., Cook, Y., Taylor, C., Abel, C., Reid, E., Singh, B. K., 2011. Comparison of microbial community assays for the assessment of stream biofilm ecology. *Journal of Microbiological Methods* 85 (3), 190–198.
- Vis, C., Hudon, C., Cattaneo, A., Pinel-Alloul, B., 1998. Periphyton as an indicator of water quality in the St Lawrence river (quebec, canada). *Environmental Pollution* 101 (1), 13–24.
- Vogt, R. J., Beisner, B. E., Prairie, Y. T., 2010. Functional diversity is positively associated with biomass for lake diatoms. *Freshwater Biology* 55 (8), 1636–1646.
- von Wintzingerode, F., Gobel, U. B., Stackebrandt, E., 1997. Determination of microbial diversity in environmental samples : pitfalls of pcr-based rrna analysis. *FEMS Microbiology Reviews* 21 (3), 213–229.
- Vryzas, Z., Vassiliou, G., Alexoudis, C., Papadopoulou-Mourkidou, E., 2009. Spatial and temporal distribution of pesticide residues in surface waters in northeastern greece. *Water Research* 43 (1), 1–10.
- Vu, B., Chen, M., Crawford, R. J., Ivanova, E. P., 2009. Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. *Molecules* 14 (7), 2535–2554.
- Vuilleumier, S., 1997. Bacterial glutathione s-transferases : What are they good for ? *Journal of Bacteriology* 179 (5), 1431–1441.
- Wang, W. J., Wang, W. H., Zhang, X. L., Wang, D. H., 2002. Adsorption of p-chlorophenol by biofilm components. *Water Research* 36 (3), 551–560.
- Wang, Y.-S., Liu, J.-C., Chen, W.-C., Yen, J.-H., 2008. Characterization of acetanilide herbicides degrading bacteria isolated from tea garden soil. *Microbial Ecology* 55 (3), 435–443.
- Watanabe, K., 2001. Microorganisms relevant to bioremediation. *Current Opinion in biotechnology* 12, 237–241.
- Watermann, F., Hillebrand, H., Gerdes, G., Krumbein, W. E., Sommer, U., 1999. Competition between benthic cyanobacteria and diatoms as influenced by different grain sizes and temperatures. *Marine Ecology-Progress Series* 187, 77–87.
- Watnick, P., Kolter, R., 2000. Biofilm, city of microbes. *Journal of Bacteriology* 182, No. 10, 2675–2679.
- Weber, J. B., Peter, C. J., 1982. Adsorption, bioactivity, and evaluation of soil tests for alachlor, acetolachlor, and metolachlor. *Weed Science* 30 (1), 14–20.
- Weisshaar, H., Böger, P., 1987. Primary effects of chloroacetamides. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 28 (2), 286–293.
- Wellnitz, T., Rader, R. B., 2003. Mechanisms influencing community composition and succession in mountain stream periphyton : interactions between scouring history, grazing, and irradiance. *J. N. Am. Benthol. Soc.* 22 (4), 528–541.
- Wendt-Rasch, L., Van den Brink, P. J., Crum, S. J. H., Woin, P., 2004. The effects of a pesticide mixture on aquatic ecosystems differing in trophic status : responses of the macrophyte *Myriophyllum spicatum* and the periphytic algal community. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 57 (3), 383–398.
- Wetzel, 1983. Opening remarks. In : Wetzel, R. (Ed.), *Periphyton of freshwater ecosystems*. Junk, Boston.
- Wetzel, R., 1993. *Lake and river ecosystems*.
- Wicke, D., Bockelmann, U., Reemtsma, T., 2008. Environmental influences on the partitioning and diffusion of hydrophobic organic contaminants in microbial biofilms. *Environmental Science & Technology* 42 (6), 1990–1996.

- Wimpenny, J., Manz, W., Szewzyk, U., 2000. Heterogeneity in biofilms. *FEMS Microbiology Reviews* 24, 661–671.
- Wolfaardt, G., Lawrence, J., Robarts, R., Caldwell, D., 1995. Bioaccumulation of the herbicide diclofop in extracellular polymer and its utilization by a biofilm community during starvation. *Applied and environmental microbiology* 61 (1), 152–158.
- Wong, P. K., 2000. Effects of 2,4-d, glyphosate and paraquat on growth, photosynthesis and chlorophyll-a synthesis of *scenedesmus quadricauda* berb 614. *Chemosphere* 41 (1-2), 177–182.
- Woodruff, S. L., House, W. A., Callow, M. E., Leadbeater, B. S. C., 1999. The effects of a developing biofilm on chemical changes across the sediment-water interface in a freshwater environment. *International Review of Hydrobiology* 84 (5), 509–532.
- Yannarell, A. C., Triplett, E. W., 2005. Geographic and environmental sources of variation in lake bacterial community composition. *Applied and Environmental Microbiology* 71 (1), 227–239.
- Ylla, I., Borrego, C., Romani, A. M., Sabater, S., 2009. Availability of glucose and light modulates the structure and function of a microbial biofilm. *FEMS Microbial Ecology* 69, 27–42.
- Zablutowicz, R. M., Hoagland, R. E., Locke, M. A., Hickey, W. J., 1995. Glutathione-s-transferase activity and metabolism of glutathione conjugates by rhizosphere bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 61 (3), 1054–1060.
- Zagorc-Koncan, J. Z., 1996. Effects of atrazine and alachlor on self-purification processes in receiving streams. *Water Science and Technology* 33, 181–187.
- ZagorcKoncan, J., 1996. Effects of atrazine and alachlor on self-purification processes in receiving streams. *Water Science and Technology* 33 (6), 181–187.
- Zhang, Q. G., Zhang, D. Y., 2006. Species richness destabilizes ecosystem functioning in experimental aquatic microcosms. *Oikos* 112 (1), 218–226.
- Ziegler, S. E., Lyon, D. R., 2010. Factors regulating epilithic biofilm carbon cycling and release with nutrient enrichment in headwater streams. *Hydrobiologia* 657 (1), 71–88.
- Zippel, B., Neu, T. R., 2005. Growth and structure of phototrophic biofilms under controlled light conditions. *Water Science and technology* 52, 203–209.
- Zippel, B., Rijstenbil, J., Naylor, R., 2007. A flow - lane incubator for studying freshwater and marine phototrophic biofilms. *Journal of Microbiological Methods* 70, 336–345.

# Table des matières

<b>Remerciements</b>	<b>i</b>
<b>Résumé / Abstract</b>	<b>iv</b>
<b>Introduction</b>	<b>xx</b>
Contexte scientifique . . . . .	xx
Les objectifs et l'organisation générale de l'étude . . . . .	xxiii
<b>I Synthèse bibliographique</b>	<b>1</b>
<b>I Modèle biologique d'étude : les biofilms phototrophes de milieux lotiques</b>	<b>2</b>
I.1 Présentation . . . . .	2
I.2 Le développement d'une entité structurale et fonctionnelle dynamique . . . . .	6
I.2.1 Les facteurs influant le développement des biofilms phototrophes . . . . .	6
I.2.1.1 La lumière . . . . .	10
I.2.1.2 Les teneurs en nutriments . . . . .	11
I.2.1.3 Les conditions hydrodynamiques . . . . .	11
I.2.1.4 La température . . . . .	12
I.2.1.5 Les substrats de colonisation . . . . .	13
I.2.1.6 Les facteurs biotiques . . . . .	14
I.2.2 Le concept de succession écologique . . . . .	15
I.2.2.1 Dynamique temporelle de la biomasse . . . . .	15
I.2.2.2 Dynamique temporelle du compartiment algal . . . . .	18
I.2.2.3 Dynamique temporelle du compartiment bactérien . . . . .	18
I.3 Les biofilms phototrophes : compartiment fonctionnel clef des milieux lotiques	19
I.4 Les biofilms phototrophes : un outil pour la Directive Cadre Européenne? . . . . .	20
I.5 Les dispositifs d'investigation des biofilms phototrophes . . . . .	22
<b>II La problématique des pesticides dans l'environnement</b>	<b>24</b>
II.1 La contamination des milieux aquatiques par les pesticides : origines du problème	24
II.2 Impact des pesticides sur les organismes aquatiques en milieu lotique . . . . .	27
II.2.1 Différentes approches utilisées en écotoxicologie . . . . .	27
II.2.2 Cibles biologiques potentielles des pesticides . . . . .	30
II.3 Interactions biofilms phototrophes-pesticides en milieux lotique . . . . .	31
II.3.1 L'importance des biofilms phototrophes en écotoxicologie . . . . .	31
II.3.2 L'impact des pesticides sur les biofilms autotrophes . . . . .	34
II.3.2.1 Comment évaluer la réponse du biofilm phototrophe? . . . . .	34

II.3.2.2	Une variété de réponses possibles . . . . .	37
<b>III</b>	<b>Etude de cas : l'alachlore</b>	<b>43</b>
III.1	Présentation de la molécule d'alachlore . . . . .	43
III.2	Mode d'action de l'alachlore . . . . .	44
III.3	Chimiodynamique de l'alachlore . . . . .	46
III.4	Contamination des eaux de surface par l'alachlore . . . . .	53
III.5	Impact de l'alachlore au sein des milieux aquatiques . . . . .	53
III.6	L'alachlore et les biofilms phototrophes . . . . .	55
III.7	Les arguments du choix de l'alachlore . . . . .	56
<b>II</b>	<b>Matériel et Méthodes</b>	<b>57</b>
<b>I</b>	<b>Sites d'étude et stratégies d'échantillonnage</b>	<b>58</b>
I.1	Choix des sites . . . . .	58
I.2	Présentation des sites . . . . .	59
I.3	Caractéristiques physico-chimiques des stations . . . . .	61
I.4	Dispositifs de collecte des biofilms phototrophes . . . . .	63
<b>II</b>	<b>Stratégies d'approche expérimentale</b>	<b>66</b>
II.1	Approche expérimentale <i>in situ</i> . . . . .	66
II.1.1	Objectif de l'étude . . . . .	66
II.1.2	Déroulement de l'étude . . . . .	66
II.2	Approches expérimentales en microcosmes . . . . .	67
II.2.1	Capacité de biodégradation d'un herbicide par des suspensions de bio- films phototrophes . . . . .	68
II.2.1.1	Objectif de l'expérience . . . . .	68
II.2.1.2	Déroulement de l'expérience . . . . .	68
II.2.2	Réponse des communautés microbiennes de biofilms phototrophes à une exposition à un herbicide . . . . .	71
II.2.2.1	Objectif de l'expérience . . . . .	71
II.2.2.2	Déroulement de l'expérience . . . . .	71
II.2.3	Bioréacteurs annulaires rotatifs . . . . .	73
II.2.3.1	Prototype de bioréacteur annulaire rotatif (RAB) à écoule- ment de type Taylor-Couette . . . . .	75
II.2.3.1.1	Présentation et description générale . . . . .	75
II.2.3.1.2	Choix des conditions expérimentales . . . . .	76
II.2.3.1.2.1	Support de colonisation . . . . .	76
II.2.3.1.2.2	Source lumineuse interne . . . . .	78
II.2.3.1.2.3	Conditions hydrodynamiques . . . . .	81
II.2.3.1.2.3.1	Distribution des temps de séjours . . . . .	85
II.2.3.1.2.3.2	Simulations numériques de l'écoulement . . . . .	85
II.2.3.1.2.4	Inoculum et eau d'alimentation . . . . .	86
II.2.3.1.2.5	Entretien du bioréacteur : nettoyage complet et partiel . . . . .	88

II.2.3.1.3	Validation de la capacité du bioréacteur à produire du biofilm phototrophe . . . . .	88
II.2.3.1.3.1	Phase d'inoculation . . . . .	89
II.2.3.1.3.2	Echantillonnage des coupons . . . . .	90
II.2.3.1.3.3	Analyses physico-chimiques . . . . .	91
II.2.3.1.4	Bioréacteur prototype RAB, une nourrice à biofilms phototrophes . . . . .	92
II.2.3.1.4.1	Objectif de l'expérience . . . . .	92
II.2.3.1.4.2	Déroulement de l'expérience . . . . .	92
II.2.3.1.4.3	Mini-bioréacteurs annulaires rotatifs de laboratoire . . . . .	95
II.2.3.1.4.3.1	Description . . . . .	95
II.2.3.1.4.3.2	Objectif de l'expérience . . . . .	95
II.2.3.1.4.3.3	Déroulement de l'expérience . . . . .	97
<b>III</b>	<b>Volet analytique</b> . . . . .	<b>98</b>
III.1	Analyses physico-chimiques . . . . .	99
III.2	Analyse des pesticides . . . . .	101
III.2.1	Analyses de l'alachlore et de deux de ses métabolites de biodégradation . . . . .	101
III.2.2	Dosage des pesticides . . . . .	101
III.3	Analyses biologiques des biofilms . . . . .	102
III.3.1	Préparation des échantillons de biofilms . . . . .	102
III.3.2	Descripteurs structurels . . . . .	103
III.3.2.1	Descripteurs de biomasse . . . . .	103
III.3.2.1.1	Matière sèche et matière sèche sans cendre . . . . .	103
III.3.2.1.2	Chlorophylle <i>a</i> . . . . .	105
III.3.2.1.3	Index autotrophique et ratio MSSC / MS . . . . .	105
III.3.3	Analyse de la composition algale . . . . .	105
III.3.4	Microscopie confocale à balayage laser . . . . .	106
III.3.5	Structure des communautés bactériennes (DGGE et T-RFLP) . . . . .	106
III.3.5.1	Préparation des échantillons . . . . .	110
III.3.5.2	Extraction de l'ADN génomique total (ADNg) . . . . .	110
III.3.5.3	Amplification par PCR . . . . .	111
III.3.5.3.1	La T-RFLP . . . . .	111
III.3.5.3.2	La DGGE . . . . .	111
III.3.5.4	Exploitation et interprétation des profils . . . . .	112
III.3.6	Descripteurs fonctionnels . . . . .	114
III.3.6.1	Etat physiologique du biofilm . . . . .	114
III.3.6.2	Productions bactériennes . . . . .	115
III.3.6.3	Mesure de l'activité enzymatique de la GST . . . . .	116
<b>IV</b>	<b>Analyses statistiques des données</b> . . . . .	<b>117</b>
IV.1	Les analyses univariées . . . . .	117
IV.2	Le calcul du temps de demi-vie de l'alachlore durant les expériences en microcosmes . . . . .	117
IV.3	Les analyses multivariées . . . . .	118

<b>III</b>	<b>Etudes expérimentales</b>	<b>120</b>
<b>I</b>	<b>Biodégradation d'un herbicide par des communautés bactériennes de biofilms phototrophes : approche expérimentale en microcosme</b>	<b>121</b>
I.1	Contexte de l'étude . . . . .	122
I.2	Approche expérimentale . . . . .	123
I.3	Principaux résultats et discussion . . . . .	124
I.4	Résultats complémentaires à l'article 1 . . . . .	126
I.5	Conclusion et perspectives . . . . .	127
I.6	Article 1 . . . . .	130
<b>II</b>	<b>Comment appréhender les facteurs qui contrôlent les successions écologiques des communautés microbiennes : cas des biofilms phototrophes</b>	<b>150</b>
II.1	Importance des facteurs allo- et autogènes sur les communautés bactériennes durant le développement de biofilms phototrophes . . . . .	151
II.1.1	Contexte de l'étude . . . . .	151
II.1.2	Approche expérimentale . . . . .	152
II.1.3	Principaux résultats et discussion . . . . .	153
II.1.4	Conclusion et perspectives . . . . .	155
II.1.5	Article 2 . . . . .	156
II.2	Déterminisme autogène sur la structuration/dynamique des communautés microbiennes en bioréacteur . . . . .	167
II.2.1	Contexte de l'étude . . . . .	167
II.2.2	Approche expérimentale . . . . .	168
II.2.3	Principaux résultats et discussion . . . . .	169
II.2.4	Conclusion et perspectives . . . . .	174
II.2.5	Article 3 . . . . .	176
II.3	Conclusions du chapitre . . . . .	189
<b>III</b>	<b>Importance relative des facteurs allogènes et autogènes dans la réponse de biofilms phototrophes à un herbicide – différentes approches expérimentales en microcosmes</b>	<b>193</b>
III.1	Contexte scientifique . . . . .	194
III.2	Influence de l'histoire sur la réponse structurelle et fonctionnelle de biofilms phototrophes post-exposés à l'alachlore . . . . .	195
III.2.1	Approche expérimentale . . . . .	195
III.2.2	Principaux résultats . . . . .	196
III.2.3	Résultats complémentaires . . . . .	198
III.2.4	Conclusion et perspectives . . . . .	199
III.2.5	Article 4 . . . . .	203
III.3	Réponse du biofilm phototrophe à un herbicide durant ses premiers stades de développement . . . . .	223
III.3.1	Approche expérimentale . . . . .	223
III.3.2	Principaux résultats et discussion . . . . .	224
III.3.3	Conclusion et perspectives . . . . .	225
III.3.4	Article 5 . . . . .	227

---

III.4 Réponse du biofilm phototrophe à un herbicide selon son degré de maturation	252
III.4.1 Approche expérimentale . . . . .	252
III.4.2 Principaux résultats et discussion . . . . .	252
III.4.3 Conclusion et perspectives . . . . .	255
III.4.4 Article 6 . . . . .	256
III.5 Conclusion et perspectives du chapitre 3 . . . . .	275
<b>Conclusion générale et perspectives</b>	<b>284</b>
Les communautés microbiennes des biofilms phototrophes : modèle d'étude pour appréhender les relations entre diversité / structure et fonctionnement des écosystèmes . . . . .	284
Intégrer l'écologie des communautés aux approches de l'écotoxicologie . . . . .	288
Des approches expérimentales en microcosmes vers une stratégie d'approche <i>in situ</i>	292
Vers un modèle de bio-indication? . . . . .	293
<b>Annexe</b>	<b>297</b>
<b>Bibliographie</b>	<b>301</b>





**AUTHOR:** Armelle PAULE

**TITLE:** Dynamic of microbial communities of phototrophic biofilms with different level of organizations: ecologic successions and responses to herbicide exposition

**ABSTRACT**

The intensive use of pesticides causes many disturbances in aquatic ecosystems, which are well known to offer a range of “ecological services” for society. In terms of ecotoxicology, environmental issue is not limited to the risk assessment of a pollutant toxicity on organisms but it expands to the ability to assess, at the ecosystem scale, the consequences of a disturbance and the use of bio-indicators. In this context, for aquatic ecosystems, phototrophic biofilms provide a particularly relevant model, based on their complex microbial community structures, spatial and temporal dynamics and variety of functions. In a first experiment our results suggested that microbial aggregates from different habitats (activated sludge and phototrophic biofilm) are characterized by comparable potential of an herbicide biodegradation: alachlor. Then using an ecological approach, a manipulation of the structure of phototrophic biofilms microbial communities was explored in "natural" conditions in rivers exhibiting different physicochemical characteristics, and in "controlled" conditions with a photosynthetic bioreactor prototype (Taylor - Couette flow type). These experiments suggested that the microbial community structures are driven by autogenic and allogenic factors, depending upon maturation state. Finally using an ecotoxicological approach, structural and functional responses of phototrophic biofilms exposed to alachlor were evaluated, integrating the maturation stage (autogenic factors) and history (allogenic factors) of phototrophic biofilms. This work allowed us to undertake an ecotoxicological approach integrating the concepts of ecological succession in microbial communities. Our results demonstrate that phototrophic biofilms are promising tools as bio-indicators of water quality when they are characterized by a multi-metric approach including functional and structural descriptors.

**KEY WORDS**

Phototrophic biofilms; diatoms; bacterial community; rotating annular bioreactor; ecological succession; ecotoxicological approach; bioindication





**AUTEUR :** Armelle PAULE

**TITRE :** Dynamique des communautés microbiennes des biofilms phototrophes à différents niveaux d'intégration biologique : des successions écologiques aux réponses à l'exposition à un herbicide

**DIRECTEURS DE THESE :** Etienne PAUL et Jean Luc ROLS

**LIEU ET DATE DE SOUTENANCE :** Toulouse, Université Paul Sabatier, salle des séminaires, bât 4R1, le 10 janvier 2012

---

### **RESUME en français**

Les écosystèmes aquatiques, reconnus pour offrir un éventail de « services écologiques » à la société, sont fortement exposés par l'utilisation massive de pesticides. L'approche écotoxicologique ne se limite pas à l'évaluation des risques de toxicité de pesticides sur les organismes, elle s'élargit à la nécessité d'évaluer, à l'échelle de l'écosystème aquatique, les conséquences de la perturbation sur les communautés et les descripteurs de bio-indication associés. Dans ce contexte, les biofilms phototrophes d'écosystèmes aquatiques constituent un modèle d'étude pertinent de par la complexité des structures de communautés microbiennes, leur dynamique spatiale et temporelle, et la variété des fonctions hébergées. Une première expérience a permis de mettre en évidence que des agrégats microbiens d'habitats différents (floc de boues activés et biofilms phototrophes) présentent un potentiel comparable de biodégradation d'un herbicide, l'alachlore. Puis par une première approche écologique, la manipulation de la structure de communautés microbiennes de biofilms phototrophes a été explorée en conditions « naturelles » dans des rivières, et en conditions « contrôlées » avec un prototype de bioréacteur photosynthétique à écoulement hydrodynamique du type Taylor - Couette. Ces expériences soulignent que la structure des communautés microbiennes résulte de processus de successions écologiques, gouvernés par des facteurs allogènes et/ou autogènes en fonction de leur stade de maturation. Enfin par une seconde approche écotoxicologique, les réponses structurelles et fonctionnelles de biofilms phototrophes exposés à l'alachlore ont été évaluées en intégrant le stade de maturation (facteurs autogènes) et l'histoire (facteurs allogènes) des biofilms phototrophes. Ces travaux nous ont permis d'appréhender l'approche écotoxicologique en intégrant le concept des successions écologiques au sein des communautés microbiennes. Les résultats désignent les biofilms phototrophes comme des outils prometteurs en tant que bio-indicateurs de la qualité des eaux lorsqu'ils sont caractérisés par une approche multi-métrique composée de descripteurs fonctionnels et structurels.

---

### **MOTS-CLES**

Biofilms phototrophes ; diatomées ; communautés bactériennes ; bioréacteur annulaire rotatif ; succession écologique ; approche écotoxicologique ; bioindication

---

**DISCIPLINE ADMINISTRATIVE :** Ecologie Fonctionnelle

### **INTITULE ET ADRESSE DE L'U.F.R. OU DU LABORATOIRE :**

Laboratoire d'écologie fonctionnelle et Environnement (EcoLab) – UMR 5245 (UPS-CNRS-INPT) Université Paul Sabatier, bât. 4R3 b2 – 118 route de Narbonne  
31062 Toulouse cedex 9 - FRANCE