



**HAL**  
open science

**Impact de la saisonnalité et d'une contamination  
pesticide environnementale sur des relations biotiques  
entre la micro-méiofaune et les microalgues d'un biofilm  
d'eau douce**

Julie Neury-Ormanni

► **To cite this version:**

Julie Neury-Ormanni. Impact de la saisonnalité et d'une contamination pesticide environnementale sur des relations biotiques entre la micro-méiofaune et les microalgues d'un biofilm d'eau douce. Ecotoxicologie. Université de Bordeaux, 2019. Français. NNT : 2019BORD0343 . tel-03091966

**HAL Id: tel-03091966**

**<https://theses.hal.science/tel-03091966>**

Submitted on 1 Jan 2021

**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.

THÈSE PRÉSENTÉE  
POUR OBTENIR LE GRADE DE  
**DOCTEUR DE**  
**L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

ÉCOLE DOCTORALE : « SCIENCES ET ENVIRONNEMENTS »  
SPÉCIALITÉ : ECOLOGIE EVOLUTIVE ET FONCTIONNELLE DES  
COMMUNAUTES

Par Julie NEURY-ORMANNI

**Impact de la saisonnalité et d'une contamination pesticide  
environnementale sur des relations biotiques entre la  
micro-méiofaune et les microalgues d'un biofilm d'eau  
douce**

Sous la direction de :

Soizic MORIN

Chargée de recherche, Irstea-Bordeaux

Directrice de thèse

Jacky VEDRENNE

Ingénieur d'étude, Irstea-Bordeaux

Co-encadrant

Irstea – Unité de Recherche Ecosystèmes aquatiques et Changements Globaux

**Soutenance le 12 Décembre 2019**

Membres du jury :

Michèle TACKX

Professeure, Université Paul Sabatier,  
Toulouse

Présidente

Philippe USSEGLIO-POLATERA

Professeur, Université de Lorraine

Rapporteur

Helena GUASCH

Professeure, CEAB-CSIC, Espagne

Rapporteur

Juliette FABURE

Maître de conférences, AgroParisTech

Examineur

Cédric HUBAS

Maître de conférences, MNHN

Examineur

Clarisse MALLET

Maître de conférences, Université Clermont-  
Auvergne

Examineur

# **Impact de la saisonnalité et d'une contamination pesticide environnementale sur des relations biotiques entre la micro-méiofaune et les microalgues d'un biofilm d'eau douce**

**Résumé :** Les pollutions chimiques sont des facteurs de stress pour le milieu aquatique qui est le réceptacle final des microcontaminants (pesticides, médicaments, métaux). Le biofilm est un microécosystème aquatique dans lequel interagissent des microorganismes aux cycles de vie très courts (bactéries, champignons, microalgues, micro-méiofaune) sur un substrat. Certains facteurs saisonniers (lumière, température) ou liés à l'anthropisation (substances dissoutes dont les polluants toxiques) modifient la composition de microalgues, et impactent également les cycles biologiques de la micro-méiofaune. Ces déterminants environnementaux façonnent diversement les communautés périphtiques au long de l'année, directement et indirectement au sein du réseau complexe d'interactions entre les espèces. Le déséquilibre potentiel entre les composantes susceptibles d'être impactées par des polluants (organismes cibles et non cibles) peut menacer la stabilité structurale et fonctionnelle des biofilms. Dans ces travaux de thèse nous avons étudié les effets de l'imidaclopride (insecticide) et du diuron (herbicide) sur les relations biotiques maintenues entre les microalgues et la micro-méiofaune des biofilms. Ces deux pesticides sont régulièrement détectés dans les rivières françaises. Des tests écotoxicologiques à des concentrations environnementales ( $5\mu\text{g.L}^{-1}$ ) ont d'abord été réalisés sur des populations monospèces et des combinaisons de populations de micro-méiofaune (nématodes, chironomes) et de microalgues benthiques (diatomées, algues vertes). La combinaison de stress biotique et chimique a un effet non négligeable sur les individus de notre étude, qu'ils soient producteurs primaires ou consommateurs. En combinant les impacts d'un herbicide et d'un insecticide sur une relation trophique, on peut estimer comment les effets directs de ces pesticides sur leur cible, peuvent indirectement, par le jeu des relations biotiques, affecter les individus des chaînes trophiques supérieures et inférieures. De manière à ne pas écarter l'influence structurante des relations trophiques, nous avons abordé la question de variabilité de la communauté périphtique par l'approche des traits morphofonctionnels liés à l'activité trophique. Pour ce faire, une base de données regroupant les traits morphofonctionnels de la micro-méiofaune a été créée, basée sur le modèle de la base des macroinvertébrés d'eau douce d'Usseglio-Polatera et al. (2000). Les conditions abiotiques qui définissent un habitat varient selon la saisonnalité. Des communautés périphtiques ont été soumises aux variations saisonnières puis à une contamination pesticide. Nos résultats ont démontré que les conditions abiotiques et biotiques saisonnières ont un impact plus fort sur la fonctionnalité du biofilm que la contamination pesticide aux concentrations testées. Les traits morphofonctionnels de la micro-méiofaune évoluent selon les conditions abiotiques saisonnières. En cas de contamination pesticide, le peu d'impact mesuré peut s'expliquer par la redondance des traits morphofonctionnels des espèces de la micro-méiofaune sélectionnées par la pression chimique. Ces travaux de thèse confirment l'importance de la complémentarité des échelles d'étude et des combinaisons de facteurs biotiques et abiotiques dans la recherche en écologie et écotoxicologie.

**Mots clés :** Relation trophique, traits fonctionnels, écotoxicologie

# Seasonality and environmental pesticide concentration impact on biotic relation between microalgae and micro-meiofauna in freshwater biofilm

**Abstract:** Chemical pollutions are stress factors for the aquatic environment, which is the final receptor of microcontaminants (pesticides, pharmaceuticals, metals). Biofilm is an aquatic microecosystem in which short lifecycle microorganisms interact (bacteria, fungi, microalgae, micro-meiofauna) on a substrate. Seasonal (light, temperature) or anthropogenic factors (dissolved substances such as toxic pollutants) modify microalgae composition and also impact micro-meiofauna biological cycles. These environmental determinants diversely shape periphytic community all along the year, directly and indirectly in the complex species interaction network. The potential imbalance between biofilm components, likely to be impacted by pollutants (target and non-target organisms), can threaten structural and functional biofilm stability. In these thesis works, we studied imidacloprid (insecticide) and diuron (herbicide) effect on biotic relationships maintained between periphytic microalgae and micro-meiofauna. These two pesticides are frequently detected in French rivers. Ecotoxicological tests at an environmental concentration ( $5\mu\text{g.L}^{-1}$ ) were firstly realized on monospecies populations and then, on combinations of benthic micro-meiofauna (nematodes, chironomids) and microalgae (diatoms, chlorophytes). Biotic and chemical stress combination showed non-negligible effects on studied species, i.e. primary producers or consumers. By combining herbicide and insecticide impact on trophic relationships, we can estimate how direct pesticide effects on their target indirectly affect other inferior or superior trophic levels. To take into account the structuring influence of trophic relationships, we discussed on periphytic community variability via the morphofunctional trophic activity traits approach. Micro-meiofauna morphofunctional traits database was created following Usseglio-Polatera et al. (2000) works on freshwater macroinvertebrates. Abiotic conditions which define a habitat vary with season. Periphytic communities were submitted to seasonal variations and pesticide contamination. Results demonstrated that abiotic and biotic seasonal conditions have a greater impact on biofilm functionality than pesticide contamination at the concentrations tested. In the case of pesticide contamination, little measured impacts can be explained by morphofunctional traits redundancy of micro-meiofauna species selected by chemical pressure. These thesis works highlight the importance of studying scales complementarity and biotic and abiotic factors combination in ecology and ecotoxicology research.

**Keywords :** Trophic relation, functional traits, ecotoxicology





**Unité de recherche**

**Ecosystèmes Aquatiques et changements globaux**

**(EABX)**

**Ecologie des communautés végétales aquatiques et impact  
des pressions multiples**

**(ECOVEA)**

**Irstea,**

50 avenue de Verdun,

33610 Cestas

France

**Université de Bordeaux,**

351 cours de la Libération,

33400 Talence

France

## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Philippe Usseglio-Polatera, Helena Guasch, Juliette Faburé, Michèle Tackx, Cédric Hubas et Clarisse Mallet pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse. Je remercie mon comité de pilotage : Emmanuel Corcket, Christine Dupuy et Nabil Majdi. Les regards extérieurs apportés lors de ces réunions ont été très novateurs pour le déroulement de cette thèse. Nabil Majdi, un grand merci pour toute cette passion partagée de la méiofaune, ton enthousiasme, les méthodes, les colloques, le numéro spécial 'Freshwater meiofauna'... Et surtout de m'avoir permis de partir en mobilité en Allemagne.

Merci à Frédéric Saudubray et Eric Rochard de m'avoir accueillie au sein d'Irstea et de l'unité EABX. Je remercie notre super animatrice d'équipe Ecovea Juliette Rosebery, merci pour ton soutien et ta gentillesse. Je remercie également l'école doctorale n°304 et notre directeur Frédéric Garabétian pour le catalogue de formation et les événements de doctorants qui m'ont permis de découvrir des sujets très variés. Je remercie l'agence de l'eau et le projet DYLAQ pour leur participation financière. Je tiens aussi à remercier le Labex COTE pour la bourse de mobilité (ANR-10-LABX-45) qui m'a permis de partir me former en écologie de la méiofaune au département d'écologie animal de l'université de Bielefeld.

Je remercie du fond du cœur ma directrice Soizic Morin et mon encadrant Jacky Vedrenne pour m'avoir formé, épaulé, appuyé. Soizic, merci de ta bonne humeur constante, de ton optimisme contagieux, de tes plaisanteries et surtout ton rire chaleureux à l'étage du dessus. Tu m'as donné goût à la recherche dès mes premières semaines de stage au sein d'Irstea en 2014. Désolé si mes bestioles ont mangé tes fabuleuses diatomées... Jacky, merci de ton soutien, ton esprit paternel, ta rigueur (mine de rien je suis beaucoup plus rigoureuse grâce à toi !), tes tableaux excel tous colorés, et avant tout la passion pour les microbestioles. Ces heures passées tous les deux au microscope à observer et identifier ces magnifiques organismes ont été un pur bonheur. Désolé pour les tâches de café un peu partout... Tous les deux vous m'avez appris à prendre de l'assurance, m'avez légué de formidables compétences et avez cru en moi jusqu'au bout. Je n'aurais pas pu rêver meilleur team que nous trois !

Merci à la stagiaire parfaite Margot Wagner pour le travail remarquable qu'elle a accompli avec la base de données et les scripts « pour les nuls » que tu as écrit pour moi ! Tu as fourni un travail essentiel au déroulement de cette thèse. Je remercie toute l'équipe Ecovea et cette bonne ambiance. Merci à Gwilherm d'avoir pataugé avec moi dans l'étang qu'il pleuve, qu'il vente, qu'il gèle et de m'avoir emmené en bateau sur les lacs, Christophe aussi. Merci à Sylvia d'avoir partagé son bureau avec moi et de m'avoir aidé pour des mesures. Merci aux chimistes Nicolas, Mélissa,

Aurélien et Brigitte d'avoir bien voulu analyser l'eau de l'étang et de mes mésocosmes. Merci aux stateux Aurélien, Thibault, David, Marie pour m'avoir débloqué de R ou apporter des idées d'analyses bien des fois ! Merci aussi au reste de l'équipe Floriane, Vincent, Sébastien, Cristina, Nathalie, Julie, Christian, François, les stagiaires (Liess, Anne, Audrey, Jennifer, Elise, Tom) pour l'ambiance de travail, les petits cafés, les réunions, les repas. Ma vie Ecoveaise a été très agréable grâce à vous tous !

Je remercie Walter Traunspurger de m'avoir accueilli au sein de l'équipe 'Animal ecology' de l'université de Bielefeld. Merci à Hendrik, Steffi, Birgit, Henrike, Arne, Christoph, Bianca, grâce à vous j'ai pu caresser des ciliés, des rotifères, des nématodes avec un de mes cils au bout d'une pipette pasteur ! Une expérience extraordinaire ! Mais aussi un grand merci à Sebastian Hoss pour les tests écotoxicologiques sur les nématodes et pour ces fabuleux jours à Starnberg en compagnie de sa petite famille.

Caroline, ma petite bouffée d'air frais ! Merci pour ta joie, ton dynamisme et ta curiosité ! Ce projet avec toi en Allemagne a été une superbe aventure scientifique et sociale !! (Der Computer na na na...) ! Avec tous ces supers moments à la plage, à la montagne, dans le médoc, à Berlin... C'était fantastique !

Merci les blondasses Betty (fleuriste passionnée par Herbert), Marion (esthéticienne fan de Francky Vincent) et Bertille (ma petite godelurette) ; le café des moines, la SETAC à Rome, les bonnes raclettes mensuels avec Léa chou et son Gauthier, le p'tit père Minidoo et ce grand gaillard de Mathieu (Hummmm les enmoladas) ! Sans oublier ce très cher Vincentimes de l'autre côté de l'Atlantique... Grâce à toi, j'ai navigué sur l'étang de Gazinet Cestas ! (Et les caves Renée)

Je remercie mon collègue et ami Jojo l'asticot pour les pauses clopes, les cours de guitare privés (promis cette année je me mets aux barrés) et nos échanges comiques, blasés, chantés. Ces grandes tablées de barbecue dans ton jardin. Sydney et Paul, mes grands conteurs d'actualité le matin dans le train. Charles ce grand poète et nos épopées périurbaines ! Un grand merci à ma Zozo sans qui cette aventure bordelaise n'aurait pas été aussi anarchiquement géniale ! Mélanie, mon héro lors de l'ultime combat contre Word et la mise en page (... grrr...) et merci pour les sushis ! Merci aussi à la team des mots fléchés du midi : Kevin, Fathallah, Elodie, Ariane... Bon le sudoku c'est bien aussi ! Yo Pe, merci pour le plus beau des sourires matinaux !

Merci à mes amis Bordelais, Pao et ses repas fantastiques ; Paul et sa passion pour la bicyclette ! Dans le Nord, Clément et notre première expérience Citizens ! Mais amies d'Allemagne qui sont en fait d'Amérique Latine : Fanny, Sue et Flora.. LAS CHICAS ! A Lidia aussi, mi profesora privada de Español. Mes copinoux de La Rochelle : Leandrounet, Constance ! Romain (Wata ??) !

Les protagonistes : merci à mes petites bestioles trop chouettes qui m'ont extasié au premier regard ! Ce petit monde microscopique comme féérique tout droit sortie d'un Disney ! Merci à tous d'avoir supporté mes incessants monologues sur les prouesses de mes bêtes !

Je remercie ma famille de m'avoir soutenu et d'avoir toujours été présente pour moi, mes frères, Pierre et Paul, ma petite sœur Jade, ma petite belle-sœur Elisa, le Padre, Lili, Papy Michel, Mamie Bibiche, Mamie Kiki, Tonton l'aventurier, Denis (et ses cols), l'incorrigible Rémi, Mathilde et Damien!

Un merci particulier à mon DouDou qui a surmonté mon lunatisme et mon hyperactivité des dernières semaines ! « Je suis pas une kiki hein ! » !

Maman tout ça c'est grâce à toi parce que tu as toujours cru en moi. C'est à toi spécialement que je dédie tout ce travail de thèse.



# Sommaire

<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>13</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>16</b>
<b>INTRODUCTION GENERALE.....</b>	<b>18</b>
CHAPITRE I ETAT DE L'ART.....	22
I.1 Communautés microbiennes benthiques.....	22
I.1.1 Composition du biofilm.....	22
I.1.2 Relation entre micro-méiofaune et microalgues .....	23
I.1.2.1 Microméiofaune : une part négligée du biofilm.....	23
I.1.3 Micro-méiofaune et relation trophique.....	26
I.2 Influence des facteurs environnementaux naturels (saisons) .....	28
I.3 Impact de facteurs environnementaux résultant de l'anthropisation.....	29
I.3.1 Pollutions des eaux aux pesticides .....	29
I.3.2 Impact de l'herbicide diuron sur les communautés microbiennes aquatiques .....	30
I.3.3 Impact de l'insecticide imidaclopride sur les communautés microbiennes aquatiques .....	31
I.3.4 Impact des pesticides sur les relations trophiques d'un écosystème aquatique .....	32
I.4 Intérêt des approches expérimentales pour la compréhension des relations exposition/impact .....	35
CHAPITRE II MATERIELS ET METHODES .....	40
II.1 Matériel biologique, origine et conditions de culture .....	40
II.1.1 Méiofaune .....	40
II.1.1.1 Nématodes .....	40
II.1.1.2 Chironomes.....	41
II.1.2 Microalgues.....	41
II.1.3 Le biofilm.....	42
II.2 Systèmes expérimentaux .....	42
II.2.1 Microcosmes .....	42
II.2.1.1 Piluliers en verre : .....	43
II.2.1.2 Erlenmeyers : .....	43
II.2.1.3 Boîtes de pétri : .....	43
II.2.1.4 Les milieux de cultures .....	44
II.2.2 Tableau récapitulatif des conditions générales des expériences en microcosme : .....	45
II.2.3 Mésocosmes .....	47
II.2.3.1 Le développement du biofilm .....	47
II.2.3.2 Conditions générales .....	47
II.2.3.3 Le milieu de culture:.....	49
II.3 Analyse de l'eau .....	50
II.3.1 Physico-chimie de l'eau .....	50
II.3.1.1 Conditions environnementales initiales.....	50
II.3.1.2 Dosage des matières en suspension .....	51
II.3.1.3 Détermination du titre alcalimétrique.....	51
II.3.2 Les nutriments .....	52

II.3.2.1	Les anions et cations .....	52
II.3.2.2	Dosage de l'Azote Kjeldahl .....	52
II.3.2.3	Dosage du phosphore total.....	53
II.3.2.4	Dosage de la silice.....	53
II.3.2.5	Dosage du carbone organique total .....	53
II.3.3	Pesticides.....	53
II.3.3.1	Analyse des pesticides de l'étang.....	54
II.3.3.2	Quantification du diuron et de l'imidaclopride.....	55
II.4	Descripteurs biologiques .....	55
II.4.1	Préparation du biofilm .....	55
II.4.1.1	Poids sec .....	56
II.4.1.2	Chlorophylle a et groupes algaux.....	57
II.4.1.3	L'indice d'autotrophie.....	58
II.4.2	Identification et comptage.....	59
II.4.2.1	La cellule de Nageotte.....	59
II.4.2.2	Comptage des algues .....	60
II.4.2.3	Comptage des nématodes .....	62
II.4.2.4	Identification de la microméiofaune .....	64
II.4.2.5	Comptage de la microméiofaune.....	66
II.4.3	Descripteurs comportementaux.....	66
II.4.4	La base de données sur les traits morphofonctionnels de la micro-méiofaune.....	68
II.5	Traitement des données.....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
II.5.1	Le modèle linéaire généralisé sur critère d'Akaike .....	71
II.5.2	La courbe principale de réponse .....	71
II.5.3	L'analyse RLQ.....	72
CHAPITRE III INFLUENCE DES PESTICIDES SUR LES ORGANISMES DE LA MICROMEIOFAUNE ET LES		
RELATIONS TROPHIQUES EN CONDITIONS SIMPLIFIEES .....		74
III.1	Introduction générale .....	74
III.2	Impact d'un herbicide et d'un insecticide sur la mortalité de plusieurs espèces de nématodes ..	75
III.2.1	Introduction .....	75
III.2.2	Expériences préliminaires .....	76
III.2.3	Variabilité inter-spécifique de la tolérance des nématodes libres à l'imidaclopride et au diuron .....	77
III.2.4	Conclusions .....	88
III.3	Impact d'un herbicide et d'un insecticide sur les interactions entre la microméiofaune	
potentiellement brouteuse et les microalgues d'eau douce .....		88
III.3.1	Introduction .....	88
III.3.2	Réponses de différentes diatomées à la combinaison de stress biotique et chimique .....	89
III.3.2.1	Introduction.....	89
III.3.2.2	Cinétiques de croissance de diatomées benthiques d'eau douce soumises à une pression	
combinée de compétition microalgale, de prédation et d'exposition à des pesticides.....		90
III.3.2.3	Conclusions.....	112
III.3.3	Comportement alimentaire d'un microbrouteur polluosensible sous pression herbicide et/ou	
insecticide .....		113
III.3.3.1	Introduction.....	113



III.3.3.2	Comportement de broutage (taux d'élimination et sélection) d'un chironome soumis à une pression pesticide .....	114
III.3.3.3	Conclusions.....	130
III.4	Conclusions générales .....	131
CHAPITRE IV TRAITS MORPHOFONCTIONNELS DE LA MICROMEIOFAUNE DES BIOFILMS D'EAU DOUCE		134
IV.1	Introduction .....	134
IV.2	Traits morphofonctionnels de la micro-meiofaune liés à l'activité trophique .....	135
IV.3	Fluctuations saisonnières des traits morpho-fonctionnels de la micro-méiofaune liés à l'activité trophique .....	150
IV.4	Conclusions.....	152
CHAPITRE V EVOLUTION FONCTIONNELLE DU BIOFILM SOUMIS A DE MULTIPLES PRESSIONS NATURELLES ET ANTHROPIQUES .....		154
V.1	De l'échelle individuelle/populationnelle à l'échelle de la communauté .....	154
V.2	Des contraintes abiotiques saisonnières plus structurantes que l'impact chimique .....	156
V.2.1	Introduction .....	156
V.2.2	Evolution saisonnière des communautés et impact des pesticides .....	157
V.2.3	Conclusions .....	162
V.3	Effets saisonniers sur les successions écologiques du biofilm .....	162
V.4	Des relations biotiques structurantes .....	163
V.4.1	Relations diversité/ fonction entre la micro-méiofaune et les microalgues .....	163
V.4.2	Interactions entre organismes : rôle potentiel de la communication moléculaire .....	164
V.5	Abondance versus biomasse .....	165
V.6	Avenir de la base de données des traits morphofonctionnels de la microméiofaune .....	166
<b>CONCLUSION GENERALE .....</b>		<b>170</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>		<b>174</b>
<b>ANNEXES .....</b>		<b>190</b>

## Liste des figures

- ☞ Figure 1: Représentation d'un biofilm mature d'eau douce à partir de microphotographie d'organismes de la micro-méiofaune (un rotifère et un cilié). J. Vedrenne et J. Neury-Ormanni (2017).....23
- ☞ Figure 2: Exemple d'organismes de la microméiofaune d'un biofilm périphytique (Microphotographies : J. Vedrenne et J. Neury-Ormanni (2014)) .....24
- ☞ Figure 3: Conclusion de l'évaluation intégrée mondiale sur les risques des néonicotinoïdes et du fipronil pour la diversité et le fonctionnement des écosystèmes (<http://www.tfps.info/fr/findings/conclusions/>) 32
- ☞ Figure 4: Illustration des effets indirects des contaminants. L'encart 1 montre une communauté de producteurs primaires et des brouteurs communs et rares avant l'ajout d'un toxique. L'encart 2 montre le résultat d'une contamination directe ; une mortalité rapide et sélective des brouteurs communs. Les producteurs primaires bénéficient, indirectement, de la réduction de la communauté de brouteurs associée à la mortalité des brouteurs communs (qui sont responsable d'une forte pression de broutage) et augmentent en abondance (encarts 3 et 4). Deux types d'effet indirect peuvent possiblement conduire à une augmentation d'abondance de brouteurs rares (encart 4). Premièrement, les brouteurs rares peuvent bénéficier de la mortalité des brouteurs communs et augmenter leur taux de broutage sur les producteurs primaires en se libérant de la compétition. Cette augmentation du taux de broutage devrait se produire avant ou en simultané avec l'augmentation des producteurs primaires, engendrant une augmentation de la reproduction et une amélioration de la survie de ces brouteurs, résultant d'une abondante population (encart 4). Deuxièmement, l'encart 3 illustre que l'augmentation de l'abondance des algues (=nourriture) peut se produire rapidement, promouvant une réponse fonctionnelle de la part des brouteurs rares qui dans un sens mène à une réponse numérique (augmentation d'abondance) de ces mêmes brouteurs rares comme le démontre la communauté contaminée finale. Adaptée de Fleeger et al. (2003). .....34
- ☞ Figure 5: Parcours reliant les descripteurs d'intérêt des différents niveaux organisationnels, à travers leurs composantes inhérentes, avec des exemples de trait trouvés dans la littérature. Si  $I$  représente les informations d'intégration complexes ; les composantes définissant la fitness des individus ( $w$ ) déterminent les composantes du taux fini de la population ( $\lambda$ ) par un transfert d'échelle de l'individu à la population ( $I_i - p$ ). La présence et la fréquence des espèces au niveau des communautés englobent les composantes de  $\lambda$  par une intégration complexe (par exemple les interactions biotiques entre les espèces ;  $I_p - c$ ). Enfin, les propriétés fonctionnelles des espèces se répercutent à plus large échelle sur le fonctionnement de l'écosystème ( $I_{c-E}$ ). Adapté de Violle et al. (2007) .....37
- ☞ Figure 6: Photographie présentant les différents microcosmes utilisés pour les expériences en laboratoire, de gauche à droite : les erlenmeyers en enceinte thermorégulée, les piluliers de 5 mL et de 2 mL. ....43
- ☞ Figure 7: Photographie du matériel de colonisation. Une série de cagettes disposée sur un dispositif flottant en PVC en haut à droite, contenant des lames de verres à gauche, immergée à une vingtaine de centimètres en dessous de la surface, en bas à droite. ....47
- ☞ Figure 8: Photographie de la disposition des aquariums dans la salle thermorégulée à gauche, disposition oblique des lames dans les aquariums à droite. ....48
- ☞ Figure 9: Système de filtration de l'eau de l'étang .....49
- ☞ Figure 10: Mesure des paramètres physico-chimiques de base de l'étang de Gazinet-Cestas avec Gwilherm Jan pendant l'expérimentation d'été. ....50

☞	Figure 11: Photographie de lames colonisées par du biofilm en été en haut à droite, du grattage du biofilm avec un rasoir à gauche et du biofilm remis en suspension en bas à droite.....	56
☞	Figure 12: Photographie du système de filtration Buchner utilisé pour la détermination du poids sec et de la chlorophylle a.....	57
☞	Figure 13: Photographie de l'introduction de l'échantillon à compter dans une cellule de Nageotte à gauche et son quadrillage à droite.....	59
☞	Figure 14: Représentation schématique de l'évolution de la densité de cellules et du taux de croissance au cours d'un cycle de croissance. ....	62
☞	Figure 15: Photographie de Jacky Vedrenne et moi-même identifiant la microméiofaune sur le microscope optique à contraste de phase Leica DMLS. ....	65
☞	Figure 16: Schéma des calculs de distance parcourue par les chironomes pendant les expérimentation de choix de nourriture en boîte de pétri. Le rayon R sépare le chironome au centre des patch des algues aux bords de la boîte de pétri et le sixième du périmètre p est la distance entre chaque patch algal (algue 1 patch orange et algue 2 patch vert). ....	67
☞	Figure 17: Logigramme récapitulatif des différents tests appliqués aux données de ce projet de thèse en fonction des questionnements.....	70
☞	Figure 18: Schéma récapitulatif de l'analyse RLQ afin de déterminer le lien entre l'environnement et les traits fonctionnels de la communauté microméiofaunique. ....	72
☞	Figure 19: Schéma du plan expérimental mis en place pour étudier les effets combinés de la compétition microalgale, la prédation et l'exposition à un stress chimique.....	90
☞	Figure 20 : Factors with the strongest impact on the response of the 3 diatoms considered, for the endpoints assessed ( $\mu_{max}$ , $\mu$ , cell density at the stationary phase, and mortality). Percentages of explained variance after selection of the best model (based on AIC values) are provided, together with their statistical significance: <0.001 (***) , <0.01 (**), <0.05 (*), <0.1 (°), <1 ( ). ....	104
☞	Figure 21: Agglutination of <i>P. lanceolatum</i> individuals on mucus secreted by <i>A. bicaudatus</i> observed in PI cultures with Nematodes treatment. Microphotography J. Vedrenne and J. Neury-Ormanni (2016). ....	106
☞	Figure 22 : Clearance rate expressed per milligrams of living chironomids at the end of the experiment per hour as a function of algae and treatment (CS= Solvent control; Diu=Diuron; ID=Imidacloprid + Diuron; Imi=Imidacloprid). Statistical differences were determined by using the Scheirer-Ray-Hare test followed by Dunn's posthoc test ( $p < 0.05$ ). * Significant difference from solvent controls.....	123
☞	Figure 23: Percentage of total time spent on a spot (% of the total duration of the experiment) by chironomid larvae under control conditions, diuron (Diu), mixed (ID) and imidacloprid (Imi) exposures. Statistical differences were determined by using two-way ANOVA ( $p < 0.05$ ). ....	127
☞	Figure 24: Percentage of distance and change (% of control values) performed by chironomid larvae under diuron (Diu), mixed (ID) and imidacloprid (Imi) exposures. * Statistical differences were determined by using a Kruskal-Wallis test ( $p < 0.05$ ). ....	127
☞	Figure 25: Community weighted means (CWM) in percentage (%) for 9 of the 11 morphofunctional traits most directly involved in trophic activity according to the season after 28 days of biofilm colonization. ...	145
☞	Figure 26: Réseau trophique simplifié et fonctions trophiques principales en fonction des saisons. La taille et la largeur des flèches et des cases correspondent aux proportions des traits morphofonctionnels de la micro-méiofaune extraite des CWM calculés à partir des abondances des espèces (Ind.cm-2).....	151

- ☞ Figure 27: Résultats des deux premiers axes de l'analyse RLQ : axe 1 (71%) et axe 2 (19%). (A) Scores des relevés des aquariums de toutes les saisons (H= Hiver, P=Printemps, E=Eté, A=Automne), à chaque temps d'exposition (0=Temps initial, 7= 7 jours d'exposition, 14=14 jours d'exposition). (B) Scores des conditions physico-chimiques et climatiques : (gr\_b) concentration en algues vertes dans le biofilm, (bl\_b) concentration en algues bleues dans le biofilm, (br-b) concentration en algues brunes dans le biofilm, (gr\_w) concentration en algues vertes dans l'eau, (bl\_w) concentration en algues bleues dans l'eau, (br-w) concentration en algues brunes dans l'eau, (Chla\_w) concentration en chlorophylle a dans l'eau, (autotrophy) indice d'autotrophie, (Cond) Conductivité de l'eau, (Temp) Température de l'eau, (pH) pH de l'eau, (O2) Oxygène dissout, (Ptot) Phosphore total, (PPO4) Orthophosphates, (NNorg) Azote organique, (NNO3) Nitrates, (NNO2) Nitrites, (NNH4) Ammonium, (SiO2) Silice, (Cl) Chlorure, (Na) Sodium, (SO4) Sulfates, (Mg) Magnésium, (Ca) Calcium, (K) Potassium. ....158
- ☞ Figure 28: Courbes de réponse principale (PRC) sur les traits morphofonctionnels de la micro-méiofaune liés à l'activité trophique, indiquant les effets de l'imidaclopride (insecticide) et du diuron (herbicide), seuls et en mélange, en fonction des saisons (p-value = 0,074). ....161
- ☞ Figure 29: Schéma illustrant les différences d'estimation de l'importance d'organismes de taille variable entre l'abondance relative représentée à gauche et la biomasse à droite. ....166

## Liste des tableaux

☞	Tableau 1: Taux d'ingestion de diatomées et de bactéries par la micro-méiofaune reportés de la bibliographie (p*=prédateur).....	27
☞	Tableau 2: CL50 du diuron sur différents microorganismes aquatiques, tirées de Giacomazzi (2014).....	31
☞	Tableau 3: Récapitulatif des conditions générales des expériences en microcosmes (Diu : Diuron ; Imi : Imidaclopride ; Nem : Nématodes ; Mix : Compétition interalgale).....	45
☞	Tableau 4 : Présentation des conditions générales des expériences en mésocosmes (T0 : temps initial, Diu : traitement au diuron, Imi : traitement à l'imidaclopride, Imi+Diu : traitement au mélange des deux pesticides).....	48
☞	Tableau 5: Moyenne de la croissance ( $\mu\text{m}$ ) et de la reproduction (juvénile.adulte <sup>-1</sup> ) de <i>C. elegans</i> en fonction du milieu de culture et des traitements pesticides (imidaclopride ou diuron) et inhibition de ces deux critères (%) calculé à partir des données du témoin solvant (n= 6). * significativement différent du témoin solvant (p<0.05). .....	77
☞	Tableau 6: Pesticide effective concentrations, nematode mortality and adults proportions in percentage (values are mean percentage, $\pm$ SE, N = 50) after 48h-exposure to the different treatments: Volvic control, solvent control (Volvic water + 0.5% acetonitrile), diuron (D1 and D2); imidacloprid (I1 and I2). * highlight significant differences in mortality, compared to the solvent control (p-value < 0.05%). .....	84
☞	Tableau 7: Applied treatments and experimental details. Pl: <i>Planothidium lanceolatum</i> , Gg: <i>Gomphonema gracile</i> normal form, Gt: <i>G. gracile</i> teratological form. *: in order to limit the number of experimental conditions, and given that both morphotypes of <i>G. gracile</i> were expected to be similarly impacted by pesticides, toxicity tests with monocultures of this species were only performed on the normal morphotype. ....	98
☞	Tableau 8: Average values ( $\pm$ SE) for growth rates ( $\mu_{\text{max}}$ and $\mu$ ), cell densities reached at the stationary phase and mortality in all the conditions tested. The number of replicate cultures used corresponds to those provided in Table 1, except for †: n=2 due to the contamination of one replicate culture by green algae. n.d.: not determined. Significant differences to the Controls determined by ANOVA: p-values are <0.001 (***), <0.01 (**), <0.05 (*), <0.1 (°).....	102
☞	Tableau 9 : Algae concentration and individual biovolumes ( $\mu\text{m.Ind-3}$ ) in all exposure conditions, for the algae species used.....	120
☞	Tableau 10: Chironomid mortality expressed in percentage (%) as a function of pesticide exposure, depending on the algae provided .....	122
☞	Tableau 11: Physico-chemical conditions in winter (February 2017) and in spring (April 2017) during biofilm development (28 days, weekly samples, n=4)). *significant difference (t-test, p-value < 0.05).....	142
☞	Tableau 12: List of the 35 taxa in the L and Q matrices. ....	142
☞	Tableau 13: List of 23 selected trophic activity traits and corresponding modalities Q matrix. In italics, non-informative traits discarded for CWM treatment. Bold text, informative traits. ....	143

# Introduction générale

## Introduction générale

Actuellement, plus de 90% des cours d'eau français sont contaminés par des pesticides, dont près du tiers présente des concentrations moyennes supérieures à  $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Soes 2015), qui est la concentration au-delà de laquelle les eaux sont considérées comme impropres à la consommation humaine (Décret n°2001-1220 du 20 décembre 2001). En effet, lors des pulvérisations ou de la mise en terre de semences enrobées de pesticides, les substances les plus hydrosolubles ruissellent jusqu'aux milieux aquatiques, les réceptacles finaux des micropolluants (Wang & Liu 2007; Ricart et al. 2009). Les écosystèmes humides et aquatiques font partie des habitats les moins bien conservés (Soes 2015). A des fins de conservation, de restauration et de préservation, le parlement européen a ainsi mis en place la Directive Cadre sur l'Eau (2000/60/CE) afin de déterminer et rétablir la qualité des eaux continentales et côtières d'ici 2021.

Les polluants de tous types (médicaments, pesticides, métaux) peuvent avoir des répercussions sur les communautés aquatiques de l'échelle de l'individu à l'échelle de la communauté puis sur le fonctionnement de l'écosystème en question (Sabater et al. 2007; Segner et al. 2014; Schmitz et al. 2015). Pour les tests écotoxicologiques ou les études de biomonitoring, le biofilm s'est révélé être un excellent modèle biologique (Morin et al. 2016). Cosmopolites, les communautés périphtiques se positionnent à la base du fonctionnement des écosystèmes en termes de production primaire et de recyclage des nutriments et abritent des organismes aux cycles de vies courts avec des durées de génération faibles (Mora-Gómez et al. 2015). La localisation benthique de cet écosystème le rend également vulnérable aux contaminations pesticides, plus fortes dans les eaux interstitielles des sédiments (Magnusson et al. 2013).

Les effets des polluants sur les composantes autotrophes (microalgues) et hétérotrophes (bactéries, champignons et protozoaires) ont été traités en long et en large pour évaluer l'état de santé des écosystèmes en eau douce (Guasch et al. 2016a). Néanmoins la plupart des études sont basées sur des descripteurs individuels et populationnels (densité, biomasse, assemblage d'espèces, taux de croissance) et ne considèrent pas l'influence des relations entretenues entre les différents microorganismes. Les facteurs saisonniers (lumière, température) ou liés à l'anthropisation façonnent diversement les dynamiques conjointes entre les microalgues et leurs consommateurs, notamment la micro-méiofaune (Proia et al. 2011; Neury-Ormanni et al. 2016). Les interactions trophiques sont très structurantes dans ces communautés (Hart 1985; Rakowski & Cardinale 2016). De nombreux facteurs biotiques et abiotiques influencent les populations d'un écosystème et génèrent des réponses variables en fonction des combinaisons de ces facteurs. La complémentarité des échelles biologiques (individu, population, communauté) et trophiques

est importante pour faire le lien entre l'impact des contaminants et les multiples autres stress d'un système aquatique (Nilsen et al. 2019).

Cette thèse consiste à déterminer les effets de différents facteurs (saisonniers et anthropiques) combinés sur la fonctionnalité du biofilm à travers l'étude des relations biotiques (principalement trophiques) entretenues entre les microalgues et la micro-méiofaune, sous diverses conditions. Nous avons choisi d'utiliser l'herbicide diuron et l'insecticide imidaclopride comme polluants chimiques modèles car ces substances sont régulièrement détectées dans les cours d'eau français (Soes 2015) et que leurs effets sur des organismes non-cibles ont déjà été démontrés (Giacomazzi & Cochet 2004; Van Dijk et al. 2013; Van der Sluijs et al. 2015). Ces molécules sont notamment classées prioritaires ou à surveiller pour l'évaluation de la qualité des eaux (Directive 2013/39/UE).

L'objectif de cette thèse était de mettre en évidence, dans un premier temps, l'influence structurante des facteurs biotiques dans la construction d'un écosystème et que l'impact de ces facteurs peut varier lorsque les organismes sont aussi soumis à un stress chimique (à des concentrations environnementales). Puis, dans une seconde partie, le but était de déterminer les effets de facteurs abiotiques saisonniers et d'une pollution chimique sur la fonctionnalité trophique du biofilm, à travers l'élaboration et l'utilisation d'une base de données des traits morphofonctionnels de la micro-méiofaune.

Dans ce contexte, ce manuscrit se décline en cinq chapitres. Le premier chapitre est une synthèse de la bibliographie existante sur les composantes du biofilm étudiées (microalgues et micro-méiofaune) et les relations biotiques qu'elles entretiennent. Les impacts des facteurs naturels saisonniers et ceux résultant de l'anthropisation (pesticides) sur les microorganismes sont abordés. Enfin, nous soulignons l'intérêt de l'approche par les traits fonctionnels pour évaluer la variabilité des propriétés fonctionnelles d'un écosystème et intégrer le jeu des relations entre les divers compartiments trophiques qui composent le biofilm. Le second chapitre présente les matériels et méthodes utilisés dans le cadre des expérimentations effectuées au cours de cette thèse, du microcosme à l'*in situ*. Le chapitre trois regroupe les expérimentations réalisées sur des organismes ou des communautés artificielles en conditions simplifiées de laboratoire. Ces expériences en microcosmes ont permis d'élucider les effets du diuron et de l'imidaclopride, séparément et conjointement, sur des relations biotiques (compétition interalgale, prédation, comportement de broutage) entretenues entre des producteurs primaires et des consommateurs plus ou moins polluo-tolérants du biofilm. Le chapitre 4 présente les travaux réalisés à l'échelle de la communauté. Dans le but d'aborder l'impact de la saisonnalité sur la fonctionnalité du biofilm, une base de données des traits morphofonctionnels de la micro-méiofaune a été créée. Cette base de données a été utilisée pour déterminer les fluctuations des traits morphofonctionnels liés à



l'activité trophique afin de considérer la variabilité des chaînes alimentaires au sein du biofilm en fonction des saisons. Enfin, le chapitre 5 propose une discussion générale autour de l'évolution fonctionnelle du biofilm soumis à de multiples pressions naturelles et anthropiques. Ce chapitre explique l'importance de la complémentarité des organismes et des échelles dans les études écologiques et écotoxicologiques. Nous y abordons les résultats d'expériences mêlant variabilité saisonnière et impact chimique sur les traits morphofonctionnels de la micro-méiofaune. Puis nous proposons des perspectives de recherches sur les relations biotiques entre micro-méiofaune et microalgues, une critique et des propositions d'amélioration quant aux descripteurs utilisés et enfin le devenir de la base de données. Ce manuscrit se termine par une conclusion générale et des annexes avec des résultats supplémentaires.

# Chapitre I

## Etat de l'art

---

## Chapitre I Etat de l'art

### I.1 Communautés microbiennes benthiques

#### I.1.1 Composition du biofilm

Le biofilm est défini comme un amas de cellules agrégées les unes aux autres dans leur propre substance exo-polymérique sur un substrat meuble ou solide (Lappin-Scott & Costerton 2003). Ces amas soumis à diverses contraintes environnementales en termes de localisation (rivière, lac, cours d'eau, flaque d'eau) et de substrat (sable, roche, épiphytes) sont composés d'une panoplie d'assemblage de bactéries, de microalgues (notamment diatomées, chlorophycées, et cyanobactéries), de champignons, de virus, de micro-méiofaune (ciliés, amibes, rotifères, nématodes, gastrotriches, oligochètes) et de larves aquatiques de divers organismes (principalement des chironomes) (Majdi et al. 2012a; Kanavillil & Kurissery 2013) dans des proportions variables, assurant l'ubiquité du biofilm (Mora-Gómez et al. 2015). Un biofilm dont l'assemblage est particulièrement constitué d'organismes autotrophes et qui se développe sur des substrats benthiques est aussi appelé « périphyton » (Larned 2010).

A la base du fonctionnement des écosystèmes aquatiques en termes de production primaire et de recyclage des nutriments, sa structuration en « forêt miniature » en fait un refuge idéal où interagissent de nombreuses espèces de différents règnes (Figure 1). Le biofilm est ainsi le siège de processus auto- et hétérotrophes intervenant dans les cycles biogéochimiques majeurs (Costerton et al. 1994). Cependant, le rôle du biofilm dans les transferts de matière et d'énergie est majoritairement alloué aux productions bactériennes et algales (Weitere et al. 2018). Mais la micro-méiofaune joue un rôle important dans le transfert de nutriments des bactéries aux compartiments trophiques supérieurs, en améliorant le taux de minéralisation du carbone en stimulant la boucle microbienne au travers de la prédation et/ou la consommation des détritiques par les invertébrés brouteurs (Schmid-Araya & Schmid 2000; Majdi et al. 2012a; Weitere et al. 2018).

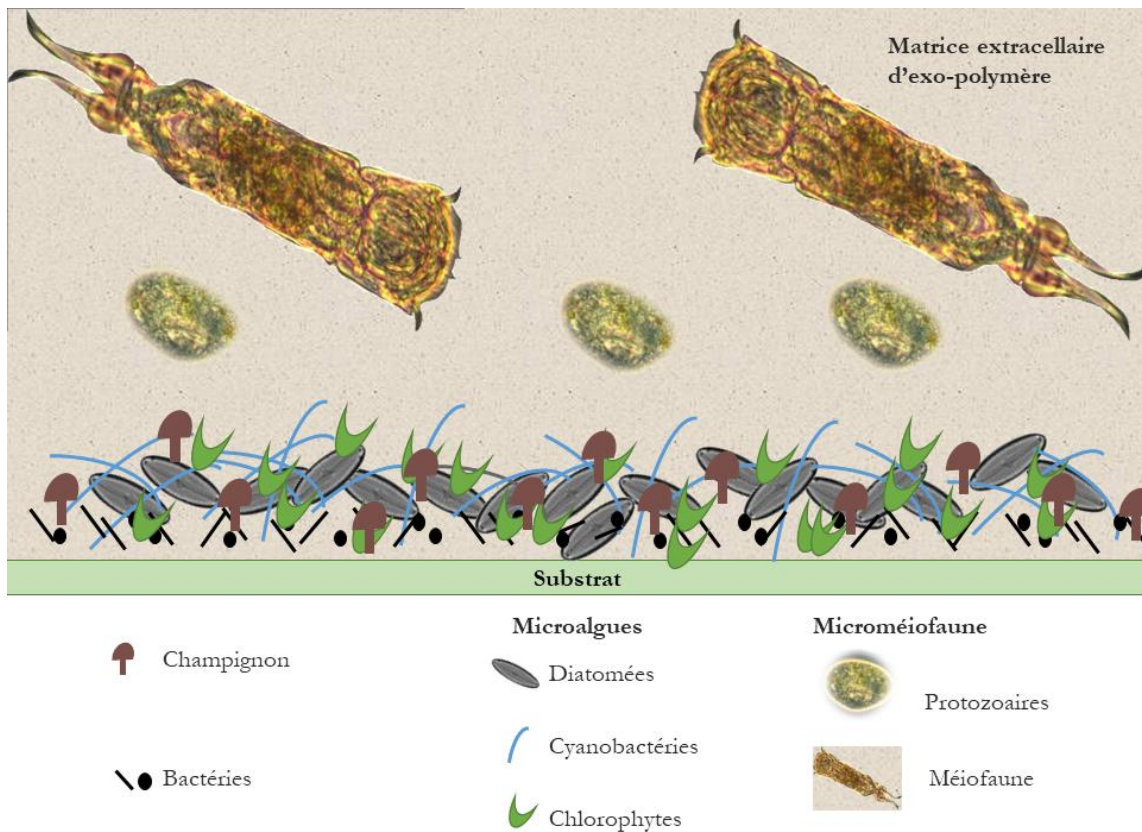


Figure 1: Représentation d'un biofilm mature d'eau douce à partir de microphotographie d'organismes de la micro-méiofaune (un rotifère et un cilié). J. Vedrenne et J. Neury-Ormanni (2017).

## I.1.2 Relation entre micro-méiofaune et microalgues

### I.1.2.1 Microméiofaune : une part négligée du biofilm

La micro-méiofaune a été particulièrement étudiée dans les environnements marins, mais largement négligée dans les études concernant les biofilms d'eau douce (hormis les travaux sur la méiofaune de Gaudes Saez, 2011). Sur les quelques 80 publications au sujet des protozoaires des biofilms recensées par Parry (2004), plus d'un tiers ne faisaient que mentionner leur présence ou leur rôle en tant qu'hôtes d'agents pathogènes. La rareté des études consacrées spécifiquement à la micro-méiofaune depuis les années 1990 (depuis la revue de Bott 1996) s'explique en partie par les contraintes techniques de conservation de ces organismes, de la minutie que demande leur manipulation, de leur identification laborieuse, de la disparition progressive de l'expertise taxonomique.

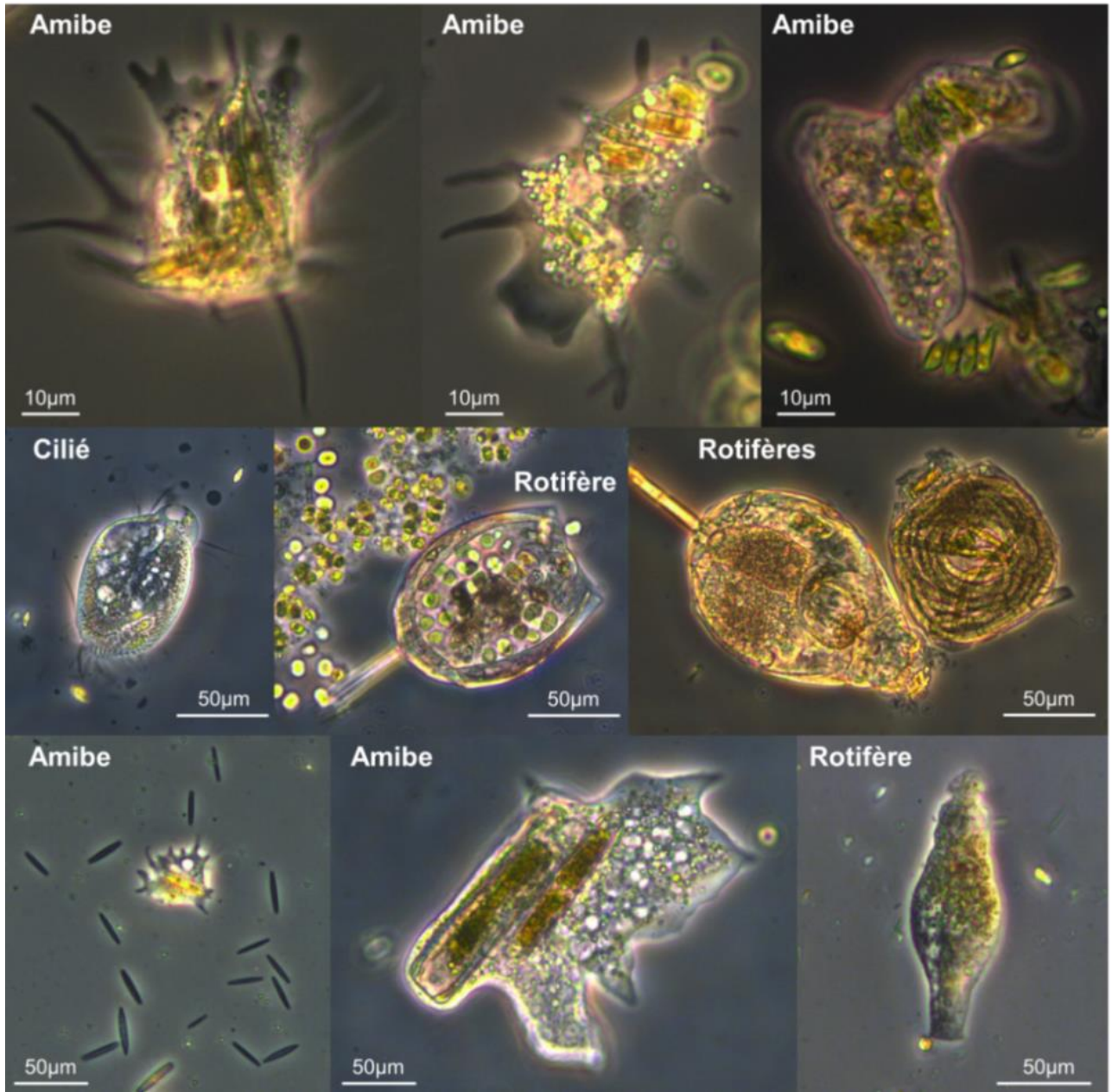


Figure 2: Exemple d'organismes de la microméiofaune d'un biofilm périphytique (Microphotographies : J. Vedrenne et J. Neury-Ormanni (2014))

La micro-méiofaune regroupe des organismes unicellulaires et pluricellulaires dont la taille varie de 2  $\mu\text{m}$  à 2 mm (Artois et al. 2011). Pendant la phase de sélection des espèces appelée phase d'accumulation de la succession écologique (Jackson et al. 2001; Artigas et al. 2012b), les

bactéries, les microalgues et la matrice d'exopolymères qu'elles ont formées sont nutritionnellement attractives pour les protozoaires et petits métazoaires qui viennent s'installer de manière temporaire ou permanente dans le biofilm (Porter 1977; Porter et al. 1985). La caractérisation quantitative de la micro-méiofaune des biofilms de quatre cours d'eau aquitains (Neury-Ormanni et al. 2016), a permis de souligner l'importance numérique (basée sur les effectifs) et la biodiversité élevée de cette composante biologique. En moyenne, la microméiofaune représentait 50% des individus inventoriés dans des biofilms matures, mais pouvait dépasser 97% dans certains cours d'eau. Parmi les taxons inventoriés, 40-60% ont déjà été reportés comme des brouteurs potentiels (De Puytorac et al. 1987; Vedry 1996; Bertrand et al. 2011; Majdi et al. 2012b), et les observations microscopiques ont confirmé que certains individus (amibes, ciliés, rotifères) présentaient un contenu cellulaire algal (Figure 2).

Ces observations ponctuelles (limitées à l'échantillonnage de biofilms matures) ne suffisent pas à chiffrer un taux de broutage, mais objectivent la possibilité d'interactions fortes entre microflore et microméiofaune des biofilms. Des corrélations positives entre les densités de diatomées et de prédateurs sont observées, avec des ratios de 20:1 diatomées/brouteur (amibes, ciliés et rotifères confondus) en conditions de laboratoire (Neury-Ormanni et al. 2016) à 100:1 diatomées/protozoaire dans 4 sites lentiques du Canada (Kanavillil & Kurissery 2013). Les densités de nématodes dans les biofilms épilithiques sont positivement corrélées à la biomasse microalgale des biofilms (Majdi et al. 2011b). L'abondance de copépodes, turbellariés, nématodes et chironomes est fonction de la composition et de la biomasse des algues du biofilm (Caramujo et al. 2008). Malgré la diversité de conditions expérimentales et d'origines géographiques des communautés, ces études confirment les dynamiques conjointes de ces compartiments.



### I.1.3 Micro-méiofaune et relation trophique

Les consommateurs primaires des biofilms d'eau douce sont principalement représentés par la microméiofaune (Weitere et al. 2018). La revue bibliographique réalisée par Neury-Ormanni en 2014 (Tableau 1) souligne une capacité de broutage (en termes quantitatifs) variable selon les environnements considérés et selon les prédateurs présents. Appliquer les taux de prédation des diatomées recensés ici aux inventaires réalisés dans les cours d'eau du Sud-Ouest étudiés, signifierait que la composante diatomique observée est inférieure de plusieurs (1 à 5) ordres de grandeur à la quantité de diatomées ayant été potentiellement broutée. La microméiofaune permanente des biofilms (ciliés, sarcodines, gastrotriches, microturbellariés, rotifères, nématodes, petits oligochètes, cladocères et copépodes harpacticoïdes) dispose d'une panoplie d'organisations buccales adaptées de leur régime alimentaire (De Puytorac et al. 1987; Abebe et al. 2006; Majdi et al. 2012b; Fontaneto & De Smet 2015). Ces taxons se nourrissent des multiples particules de différentes tailles qui composent les biofilms (champignons, diatomées, bactéries et sécrétions extracellulaires) (Pourriot 1957; Schmid-Araya & Schmid 2000; Motta & Uieda 2005) et modulent les dynamiques des communautés périphytiques. En effet, les interactions proie-prédateur dynamisent les écosystèmes (Lubchenco 1978; Hillebrand 2002); la prédation peut maintenir les biofilms dans un état de jeunesse, composés principalement d'espèces pionnières (López-Doval et al. 2009; Guasch et al. 2016b).

Les interactions trophiques sont des éléments majeurs du fonctionnement des écosystèmes. L'herbivorie module les relations de diversité-fonction entre les espèces qui interagissent trophiquement (Rakowski & Cardinale 2016). Le broutage perturbe la distribution, l'abondance et la composition des algues selon la présence de brouteurs sélectifs ou non-sélectifs (Hart 1985; Hamels et al. 2004; Rakowski & Cardinale 2016) et la capacité compétitive des algues (Hart 1985). Par exemple, la larve d'insecte *Leucotrichia* sp. se nourrit préférentiellement des cyanobactéries filamenteuses *Microcoleus* sp. à l'avantage de leurs congénères *Schizotrix* sp. *Microcoleus* étant plus compétitive que *Schizotrix*, cette sélection de la part du brouteur permet à *Schizotrix* de proliférer. D'autres effets 'bottom-up' peuvent être engendrés par les herbivores sur les microalgues. La présence de brouteurs améliore la teneur en nutriments de la communauté périphytique. Ces effets sont modulés par les contraintes abiotiques saisonnières de lumière, de température et d'enrichissement en nutriments dans le milieu (Hillebrand & Kahlert 2001).

Tableau 1: Taux d'ingestion de diatomées et de bactéries par la micro-méiofaune reportés de la bibliographie (p\*=prédateur).

Brouteurs	Milieu	Méthode	Diatomées/cm <sup>2</sup> /h	Diatomées/p*/h	Bactéries/p*/h	Référence
<i>Chilodonella</i> sp., <i>Tritbigmostoma cucullulus</i> (ciliés) <i>Pelomyxa</i> sp (sarcodine)	Canaux expérimentaux	Ingestion de taxons natifs, macrobrouteurs absents	4400	5 (p* = ciliés)	/	McCormick (1991)
		Ingestion de taxons natifs, densité moyenne de macrobrouteurs	4640	6 (p* = ciliés)	/	
		Ingestion de taxons natifs, densité importante de macrobrouteurs	150	3 (p* = ciliés)	/	
<i>Prorodon</i> sp. (cilié)	Estran, port de Boston	Ingestion de coliformes marqués par fluorescence	/	/	704	Epstein & Shiaris (1992)
<i>Bodo</i> sp., <i>Monas</i> sp., <i>Oikomonas</i> sp. (microflagellés)	Etang de la toundra Arctique	Analyse du contenu des vacuoles alimentaires	/	/	~ 8% de la biomasse bactérienne/jour	Fenchel (1975)
Rotifères	Cours d'eau	Ingestion de diatomées (FLD) ou bactéries (FLB) marquées par fluorescence	/	morphotype a= 0 ; morphotype b=13,5	237 - 2125	Borchardt & Bott (1995)
Nématodes	Cours d'eau	FLD ou FLB	/	0	6 - 320	
Méiofaune (co- dominance de ciliés et de rotifères)	Cours d'eau	Changement de densité	/	3-37	3513 - 8981	
Nématodes (Chromadorida bioculata)	Canaux expérimentaux	Comptage sur matériel vivant en flux continu	/	2,4 (58/p*/j)	/	Eßer (2006)



## I.2 Influence des facteurs environnementaux naturels (saisons)

Les microalgues et la microméiofaune entretiennent d'intimes relations biotiques qui structurent les premiers niveaux trophiques et la communauté microbienne benthique. Les relations sont dépendantes des assemblages et des proportions d'espèces dans les communautés. Ces assemblages sont aussi modulés par les conditions abiotiques de l'habitat que partagent ces espèces, qui fluctuent saisonnièrement (Larned 2010). De nombreuses études ont déjà montré que les communautés d'algues réagissent aux variations saisonnières du régime hydrologique, de l'apport en éléments nutritifs, des brouteurs, de la lumière et de la température (Cox 1990; Biggs 1996). Les variations des degrés de limitation des nutriments peuvent être reliées à divers facteurs. Les densités d'invertébrés brouteurs sont généralement plus élevées en été qu'en hiver (Rudnick et al. 1985; Francoeur et al. 1999). La présence de brouteurs améliore les teneurs en nutriments du milieu (cf section I.1.3) (Hillebrand & Kahlert 2001). Les nutriments sont fréquemment les facteurs limitants des communautés pendant la saison estivale. En effet, avec l'augmentation des températures, de l'intensité lumineuse et de la photopériode, les processus de respiration et de photosynthèse sont plus sollicités, donc la demande en nutriment augmente avec le besoin de fixation de carbone (Hershey et al. 2007; Larned 2010). Les fluctuations saisonnières contraignent la communauté à ré-adapter son assemblage. En effet, l'augmentation des températures accélère la colonisation microbienne du biofilm, entraînant par exemple, une plus forte abondance de péritriches (ciliés) se nourrissant de bactéries (Villanueva et al. 2011). Les rotifères sont des organismes abondants des biofilms d'eau douce, leur abondance et leur composition en espèces dépendent nettement du statut trophique du milieu. Par exemple, *Brachionus* sp. était plus abondant lorsque le lac peu profond de Manzana en Egypte était plus eutrophe à la saison estivale (El-Shabrawy & Germoush 2014). Aussi, à cause de la prédation par les poissons pendant la saison de reproduction (printemps, été), les rotifères subissent une grande pression de broutage qui diminue leur densité à cette saison (Gophen 2005). La distribution de taille des protozoaires en fonction des saisons est corrélée au pH, à la quantité d'oxygène dissout et de nutriments dans l'eau. Dans l'écosystème côtier de la baie de Jiaozhou (Chine), étudié par Zhao et al. (2016), il y a plus de petits protozoaires dont les tailles sont inférieures à 20µm en hiver et au printemps ; en été, les organismes entre 37 et 50 µm sont les plus abondants et en automne ce sont les organismes de 19 à 27 µm qui dominent. Les changements de compositions des microalgues et de statut trophique du biofilm en fonction des saisons ont pour conséquences des modifications d'espèces de nématodes et de mode d'alimentation (Majdi et al. 2011b).

En plus des conditions environnementales saisonnières, les variations chimiques du milieu liées à l'anthropisation sont aussi des facteurs de stress des communautés benthiques. Des études ont notamment démontré que les effets d'une pollution aux pesticides ou aux métaux sur les communautés de microalgues sont différents en fonction des saisons (Dorigo et al. 2004; Duong et al. 2008).

## **I.3 Impact de facteurs environnementaux résultant de l'anthropisation**

### **I.3.1 Pollutions des eaux aux pesticides**

On estime que sur la quantité totale de pesticides appliquée contre les mauvaises herbes et les ravageurs, une infime partie (<0.1%) atteint les sites d'action des organismes cibles, la plus grande proportion étant perdue par la dérive des pulvérisations, le ruissellement, la photodégradation (Wang & Liu 2007). Les pollutions chimiques persistantes sont des facteurs de stress pour le milieu aquatique qui est le récepteur final des microcontaminants (pesticides, médicaments, métaux) (Sabater et al. 2007). Actuellement, près de 30% des cours d'eau français où sont effectués les suivis de qualité chimique présentent des concentrations moyennes annuelles en pesticides totaux supérieures à  $0,5 \mu\text{g.L}^{-1}$  (Soes 2015), qui est la concentration au-delà de laquelle les eaux sont considérées comme impropres à la consommation humaine (Décret n°2001-1220 2001). En raison de la présence accrue de ces polluants dans l'environnement, la Directive Cadre sur l'Eau (Directive 2000/60/CE) a pour but de déterminer la qualité des eaux continentales et côtières d'ici 2021 à des fins de préservation ou de restauration, par le biais notamment de la bioindication. En effet, les polluants de tous types vont avoir des effets directs physiologiques ou métaboliques sur des organismes cibles et non cibles et/ou des effets indirects plus écologiques par l'adaptation du phénotype, du sub-individu à la communauté (Sabater et al. 2007; Segner et al. 2014).

### I.3.2 Impact de l'herbicide diuron sur les communautés microbiennes aquatiques

Le diuron est inscrit comme substance prioritaire dans les études et suivis environnementaux par la Commission Européenne (directive 2013/39/UE). Il est l'un des herbicides les plus présents dans l'environnement. Selon le Ministère de la santé et des solidarités (2005), le diuron était sixième sur la liste des pesticides détectés au moins une fois dans les eaux mises en distribution à une concentration supérieure à  $0,1 \mu\text{g.L}^{-1}$  pendant la période 2001 à 2003. En 2011, Le service de l'observation et des statistiques le plaçait comme quatrième pesticide le plus quantifié en France Métropolitaine (Soes 2015). C'est un désherbant qui était principalement utilisé pour le maraichage, la viticulture, les pépinières et servait même à désherber les voies ferrées. Son utilisation a été interdite pour les usages agricoles depuis 2008, cependant la substance active entre encore dans la composition de formulations commerciales d'antifoulings et d'anti-mousse.

Le diuron appartient à la famille des urées substituées. La molécule active de cet herbicide se fixe sur la protéine D1 du photosystème II et bloque le transfert d'électrons vers le photosystème I. Par ce procédé, il inhibe l'activité photosynthétique et entraîne la mort des cellules végétales (Giacomazzi & Cochet 2004). Les microalgues ont une structure cellulaire très proche des plantes terrestres. Elles représentent donc une cible potentielle de cet herbicide dont la solubilité est de  $42\text{mg.L}^{-1}$  (INERIS : <https://substances.ineris.fr/fr/>). A des concentrations inférieures à  $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ , cette substance agit sur l'activité autotrophe du biofilm, abaissant le rendement photosynthétique (Arrhenius et al. 2004), réduit le biovolume des algues (Ricart et al. 2009), change la nature de leurs acides gras (Troton et al. 1986; Demailly et al. 2019). En altérant la communauté des producteurs primaires (bactéries, microalgues, López-Doval et al. 2009; Proia et al. 2011), le diuron déstabilise la structure et le fonctionnement des chaînes alimentaires microbiennes du biofilm (Pesce et al. 2006; Tlili et al. 2008). Le Tableau 2 indique que cette molécule n'est pas sélective et dangereuse pour de nombreux organismes aquatiques non cibles. L'étude de Gallucci et al. (2015), menée sur la méiofaune benthique marine révèle des effets direct du diuron sur la structure de la communauté et un déclin de la richesse spécifique.

Tableau 2: CL50 du diuron sur différents microorganismes aquatiques, tirées de Giacomazzi (2014)

Espèce affectée	CL50
<i>Brachionus calyciflorus</i> (Rotifère)	700 $\mu\text{g.L}^{-1}$
<i>Gammarus pulex</i> (Crustacé)	60 $\mu\text{g.L}^{-1}$
<i>Daphnia longispina</i> (Crustacé)	1 $\mu\text{g.L}^{-1}$
Chlorophyta	0,005 $\mu\text{g.L}^{-1}$

### I.3.3 Impact de l'insecticide imidaclopride sur les communautés microbiennes aquatiques

L'imidaclopride a été interdit en Europe en décembre 2018 (UE 2018/783). Il est le plus soluble des néonicotinoïdes (limite de solubilité dans l'eau : 610  $\text{mg.L}^{-1}$  ; INERIS : <https://substances.ineris.fr/fr/>) et fait partie des pesticides les plus retrouvés dans les cours d'eau français, à des concentrations de l'ordre du microgramme par litre (Soes 2015). Commercialisé en 1991 par Bayer AG et Nihon Tokushu Noyaku Seizo KK, il est utilisé pour contrôler les insectes suceurs-piqueurs des cultures (pucerons, cicadelles, termites, aleurodes) ou les parasites des chiens et des chats (puces) (Tomizawa 2005). En revanche, les niveaux de pollution causés par l'utilisation accrue de ces pesticides systémiques excèdent fréquemment les concentrations minimales pour lesquelles ont été observées des effets indésirables sur des espèces non cibles, ce qui crée à long terme des dommages biologiques et écologiques (Van Dijk et al. 2013; Van der Sluijs et al. 2015). La Figure 3 illustre l'impact des néonicotinoïdes sur divers taxons terrestres et aquatiques. Les invertébrés aquatiques sont les plus affectés à tous les niveaux (individuel, populationnel, communautaire).

L'imidaclopride appartient à la famille d'insecticides neurotoxiques la plus répandue : les néonicotinoïdes (Van Lexmond et al. 2015). Ces pesticides systémiques agissent de manière agoniste sur les récepteurs nicotiques de l'acétylcholine. En ouvrant les canaux cationiques et voltage-dépendants du calcium, ils induisent une excitation continue des synapses, produisant des décharges menant à la paralysie et à l'épuisement des cellules énergétiques (Matsuda et al. 2001; Simon-Delso et al. 2015). La structure des récepteurs nicotiques des insectes est différente de celle des mammifères, ce qui lui confère une toxicité sélective (Tomizawa & Casida 2005; Matsuda et al. 2009). Effectivement, la larve de chironome *Chironomus tentans* présente, par exemple, une LC50 à 96 h de 5,75  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (Stoughton et al. 2008) contre 131  $\mu\text{g.L}^{-1}$  pour les petits crustacés *Gammarus pulex* (Ashauer et al. 2011). Pourtant, une exposition à des pulses de

contamination de  $12 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  pendant 12 h entraîne une diminution de l'activité physique des gammares (Böttger et al. 2013). L'imidaclopride affecte la locomotion des chironomes dès  $2,15 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , ce qui réduit ses capacités d'acquisition de nourriture dans le milieu (Azevedo-Pereira et al. 2011). Dans des conditions de nourriture nutritionnellement pauvre, les espèces non-ciblées par cette substance y sont pourtant plus sensibles (réduction du taux de croissance de *Daphnia magna*, Ieromina et al. 2014). Les multiples impacts de l'imidaclopride sur la mortalité des larves d'insecte ; l'inhibition des capacités locomotrices et donc d'acquisition de nourriture de ces larves, qui sont des habitants réguliers et abondants du biofilm (Caramujo et al. 2008; Majdi et al. 2011a) ; la sensibilité des espèces non-ciblées dans des conditions nutritionnelles particulières risquent d'endommager les communautés benthiques. D'ailleurs, il diminue l'abondance et modifie la structure des invertébrés benthiques (Pestana et al. 2009a; Hayasaka et al. 2012).

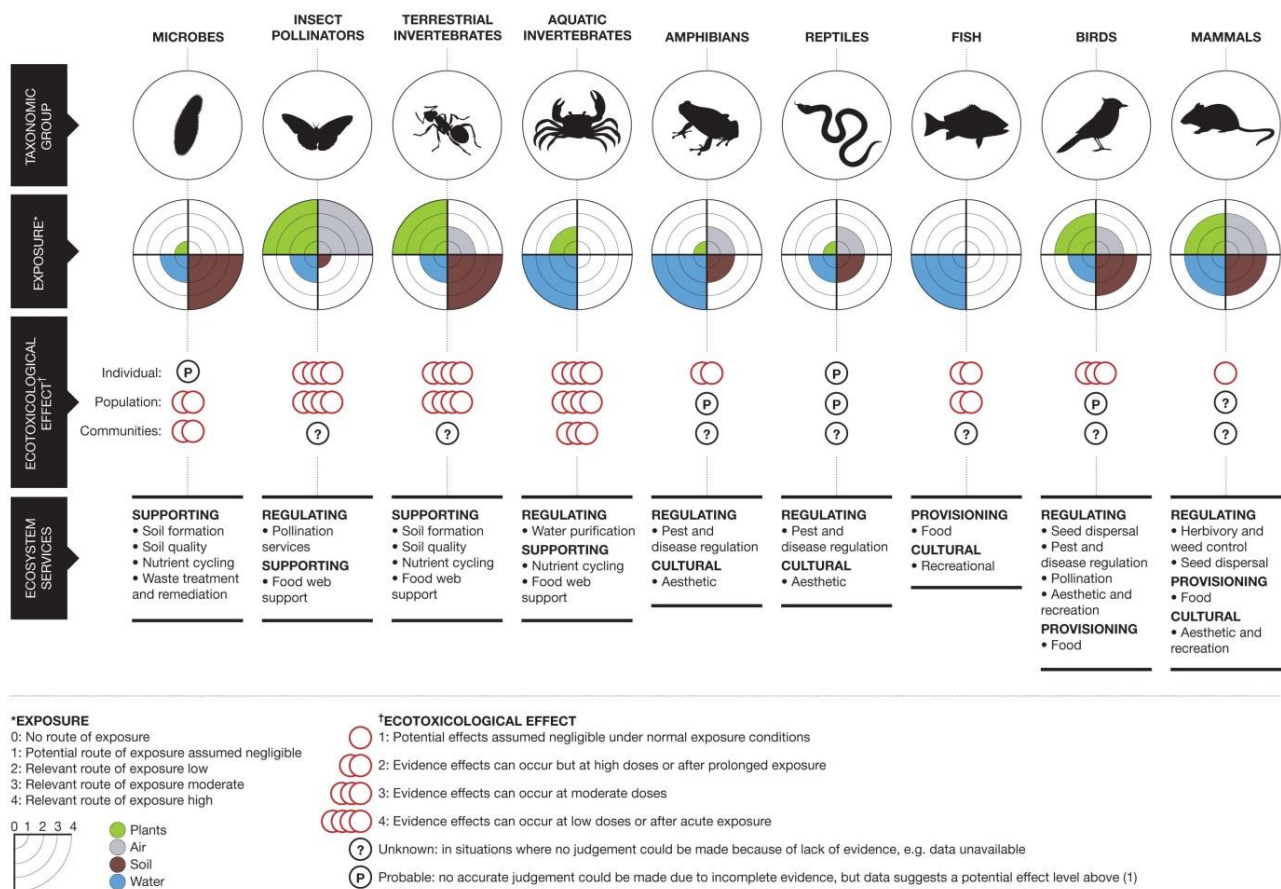


Figure 3: Conclusion de l'évaluation intégrée mondiale sur les risques des néonicotinoïdes et du fipronil pour la diversité et le fonctionnement des écosystèmes (<http://www.tfps.info/fr/findings/conclusions/>)

### I.3.4 Impact des pesticides sur les relations trophiques d'un écosystème aquatique

Les différents stress chimiques précédemment énumérés ont des effets sur les organismes, leur populations et peuvent aussi se répercuter sur les dynamiques conjointes des compartiments

trophiques. Peu d'études ont été, à ce jour, répertoriées sur les impacts des pesticides sur les relations biotiques (principalement trophiques) entretenues au sein des communautés benthiques. Pourtant, l'évaluation des effets des contaminants sur les communautés et *in fine* le fonctionnement de l'écosystème requiert une approche qui extrapole la variabilité des réponses aux contaminants et leur répercussions à l'échelle populationnelle, communautaire et enfin sur la fonctionnalité de l'écosystème (Gessner & Tlili 2016). L'étude de Schrama et al. (2017) a démontré que des espèces pouvaient changer de position trophique sous pression pesticide. En effet, l'escargot d'eau douce, *Lymnaea stagnalis* change de ressource alimentaire lorsqu'il est exposé à une concentration de  $4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de l'insecticide imidaclopride. Dans cette étude, les herbivores réagissent davantage à l'herbicide et aux variations de quantités de nutriments. Ces diverses réponses des organismes suggèrent que les pesticides, en fonction de leur mode d'action (ici, herbicide ou insecticide), agissent différemment sur les fonctions de l'écosystème.

La revue de Fleeger et al. (2003) regroupe plus de 150 publications qui traitent des effets indirects des contaminants sur les écosystèmes aquatiques. Il en ressort généralement que les contaminations induisent des changements de comportements des individus et des populations, de compétitions interspécifiques, des taux de prédation ou broutage, et que ces divers effets biaisent les interprétations des effets directs des contaminants sur ces populations. La Figure 4 indique l'évolution à partir d'un modèle de communauté jusqu'à l'aboutissement, par les liens de cause à effet d'une contamination, sur un modèle de communauté finale contaminée.

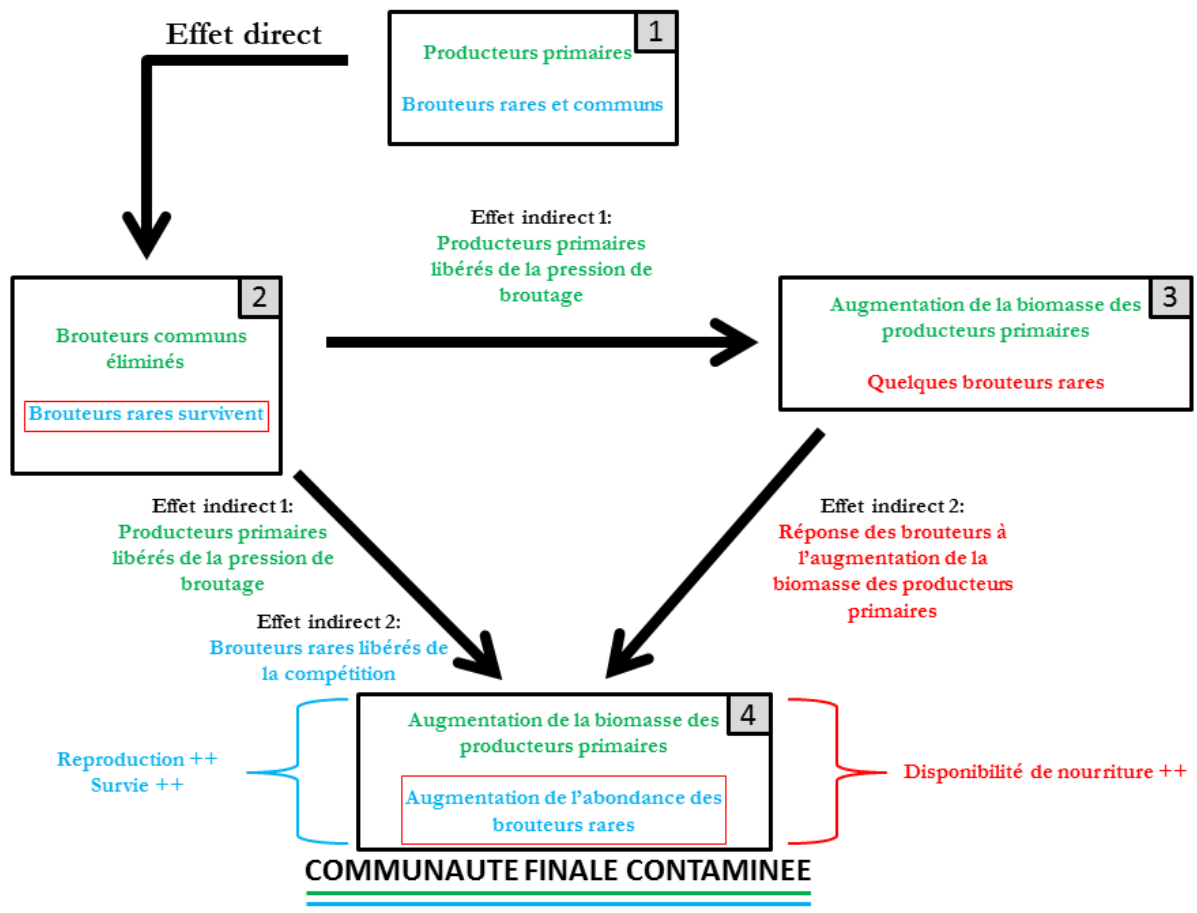


Figure 4: Illustration des effets indirects des contaminants. L'encart 1 montre une communauté de producteurs primaires et des brouteurs communs et rares avant l'ajout d'un toxique. L'encart 2 montre le résultat d'une contamination directe ; une mortalité rapide et sélective des brouteurs communs. Les producteurs primaires bénéficient, indirectement, de la réduction de la communauté de brouteurs associée à la mortalité des brouteurs communs (qui sont responsable d'une forte pression de broutage) et augmentent en abondance (encarts 3 et 4). Deux types d'effet indirect peuvent possiblement conduire à une augmentation d'abondance de brouteurs rares (encart 4). Premièrement, les brouteurs rares peuvent bénéficier de la mortalité des brouteurs communs et augmenter leur taux de broutage sur les producteurs primaires en se libérant de la compétition. Cette augmentation du taux de broutage devrait se produire avant ou en simultané avec l'augmentation des producteurs primaires, engendrant une augmentation de la reproduction et une amélioration de la survie de ces brouteurs, résultant d'une abondante population (encart 4). Deuxièmement, l'encart 3 illustre que l'augmentation de l'abondance des algues (=nourriture) peut se produire rapidement, promouvant une réponse fonctionnelle de la part des brouteurs rares qui dans un sens mène à une réponse numérique (augmentation d'abondance) de ces mêmes brouteurs rares comme le démontre la communauté contaminée finale. Adaptée de Fleeger et al. (2003).



## I.4 Intérêt des approches expérimentales pour la compréhension des relations exposition/impact

Aujourd'hui, de nombreuses approches expérimentales sont possibles et les instruments se développent de manière à faciliter l'expertise de qualité des milieux aquatiques. La caractérisation des effets toxiques et les études de biomonitoring portent principalement sur les *preferenda* environnementaux et les sensibilités aux toxiques variées des organismes (Morin et al. 2016). L'exposition chronique aux contaminants exerce une pression de sélection sur la communauté périphtyque, qui peut être reflétée par des adaptations des espèces (modification de leur tolérance) ou par des changements dans la composition et les abondances relatives des espèces de la communauté. Les modifications structurelles peuvent être mesurées par des descripteurs grossiers (biomasse), ou au travers de changements de composition via l'utilisation de diverses techniques : fluorimétrie ou chromatographie pour la distribution des groupes algaux, observation microscopique pour l'identification des microalgues et de la micro-méiofaune, cytométrie pour la numération des microalgues et bactéries, fingerprint pour la caractérisation des communautés bactériennes. Les techniques de séquençage nouvelle génération (NGS) permettent de plus en plus de décrire des changements de composition pour les différentes classes de microorganismes (Guasch et al. 2016a). Les impacts des contaminants sur les communautés microscopiques des biofilms peuvent être étudiés sous diverses conditions, depuis des expérimentations de laboratoires plus ou moins contrôlées, jusqu'à des expositions *in situ* de communautés plus complexes collectées sur substrats artificiels ou naturels (Morin et al. 2007). Ces multiples échelles d'analyse sont complémentaires et vont combler la part d'incertitude causée par la complexité des interactions et la variabilité des conditions.

Dans la majeure partie des cas, les réponses étudiées au niveau des communautés sont des observations descriptives comme l'abondance, la richesse spécifique, la biomasse, la diversité, la structure de la communauté. Ces données aboutissent à des assemblages de multiples noms d'espèces qui en révèlent généralement peu sur leur fonctionnalité - à moins de trouver des études spécifiques sur ces organismes - et ne permettent pas d'explicitier la causalité des changements fonctionnels d'un écosystème (Bortolus 2008). Ces trente dernières années, l'évaluation de la fonctionnalité d'un écosystème par les traits fonctionnels a nettement évolué. En effet, les traits fonctionnels sont définis comme les critères qui influencent indirectement la fitness des organismes au travers de leur croissance, leur reproduction et leur survie (Violle et al. 2007). Gravel et al. (2016) définissent différentes catégories de traits aux impacts structurants : 'les traits topologiques' (un prédateur donné peut se nourrir d'une proie donnée), 'les traits de consommation' (les réponses numériques et fonctionnelles de la proie et du prédateur) et 'les traits d'histoire de vie' (qui affectent la démographie). Les traits biologiques et écologiques sont



les reflets d'adaptation des espèces à leur habitat qui ont le potentiel de donner une image pertinente des mécanismes structurants les communautés (Violle et al. 2007). La combinaison des propriétés fonctionnelles de chaque espèce de la communauté traduit le fonctionnement global de l'écosystème (Figure 5). Ce type d'approche par les traits morpho-fonctionnels permet de considérer à la fois l'influence des facteurs abiotiques sur la fitness des individus (*preferenda*), sur les traits démographiques de la population et les facteurs biotiques liés à la présence d'autres populations d'espèces dans la communauté (Figure 5). Ainsi les traits de réponses correspondent à tout trait dont l'attribut (ou modalité) varie en fonction des conditions biotiques et abiotiques de l'habitat (Violle et al. 2007). Et les traits d'effet sont ceux qui définissent les effets d'un organisme sur son propre habitat, donc sur les propriétés de la communauté ou de l'écosystème (Violle et al. 2007).

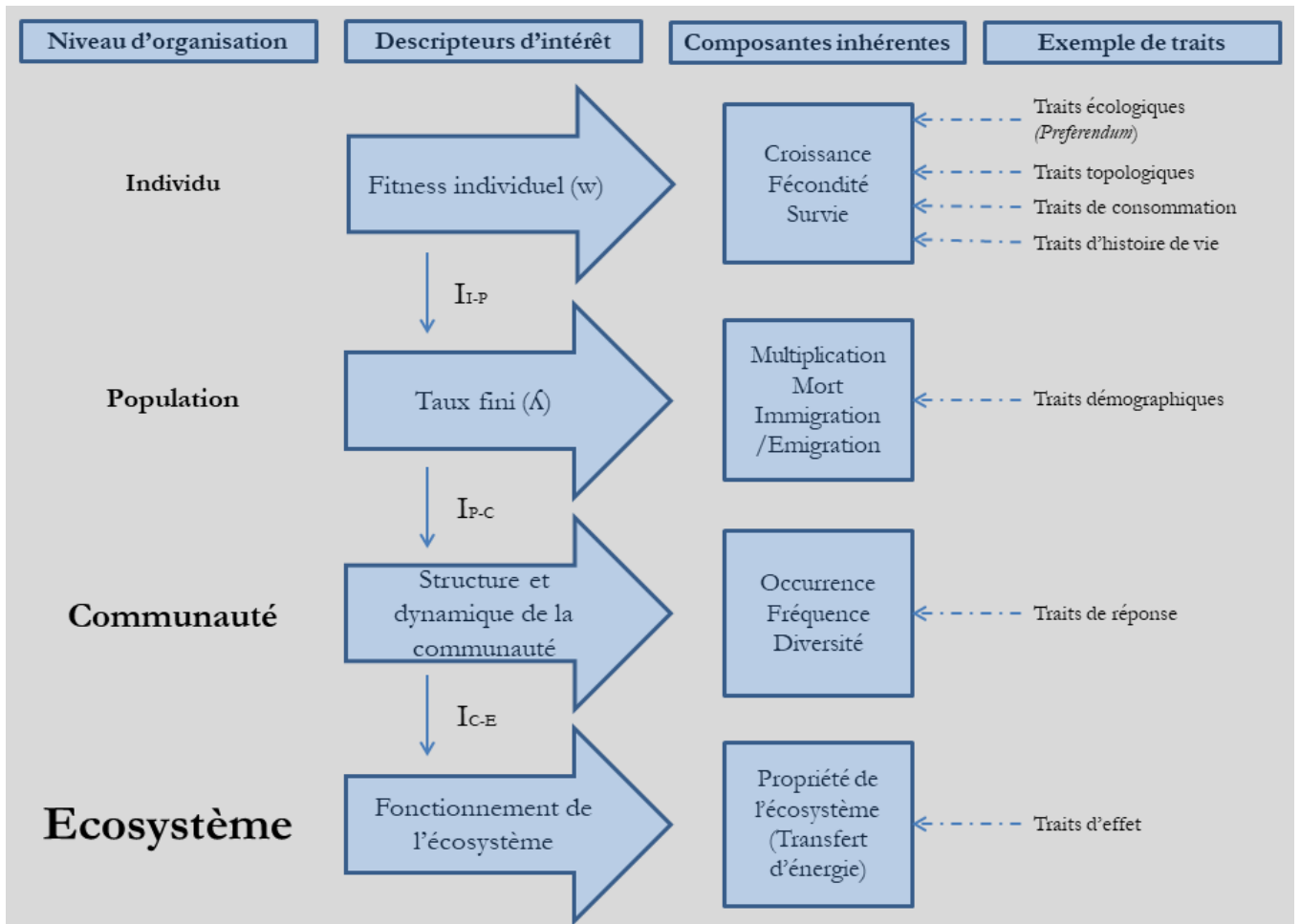


Figure 5: Parcours reliant les descripteurs d'intérêt des différents niveaux organisationnels, à travers leurs composantes inhérentes, avec des exemples de trait trouvés dans la littérature. Si I représente les informations d'intégration complexes ; les composantes définissant la fitness des individus ( $w$ ) déterminent les composantes du taux fini de la population ( $\lambda$ ) par un transfert d'échelle de l'individu à la population ( $I_{I-P}$ ). La présence et la fréquence des espèces au niveau des communautés englobent les composantes de  $\lambda$  par une intégration complexe (par exemple les interactions biotiques entre les espèces ;  $I_{P-C}$ ). Enfin, les propriétés fonctionnelles des espèces se répercutent à plus large échelle sur le fonctionnement de l'écosystème ( $I_{C-E}$ ). Adapté de Violle et al. (2007)



# **Chapitre II**

## **Matériels et Méthodes**

## Chapitre II Matériels et Méthodes

### II.1 Matériel biologique, origine et conditions de culture

#### II.1.1 Méiofaune

##### II.1.1.1 Nématodes

Des cultures de neuf espèces de nématodes, dont cinq aquatiques et quatre terrestres ont été utilisées pour cette thèse.

##### **Nématodes aquatiques :**

- *Aphelenchooides bicaudatus* (Imamura, 1931) Filipjev & Schuurmans Stekhoven, 1941 : ce nématode a été isolé à l'aide d'un micromanipulateur depuis la culture multispécifique ANH1 de l'Irstea de Bordeaux. Cette culture regroupait différents biofilms issus de la Leyre, un cours d'eau tributaire du bassin d'Arcachon, qui ont été collectés en 2014. Il a été utilisé en tant que prédateur potentiel de microalgues (cf section III.3.2).
- *Aphelenchooides cf. parietinus* (Fischer, 1894) : ce nématode est maintenu en culture dans des boîtes de pétri contenant du milieu malt-Agar à l'université de Bielefeld (Allemagne). Il a été utilisé pour des tests écotoxicologiques multi-espèces (cf section III.2.3).
- *Plectus acuminatus* (Bastian, 1865), *P. opisthocirculus* (Andrássy, 1952) and *P. velox* (Bastian, 1865) : collectés dans le lac Constance (Allemagne), ces nématodes sont maintenus en culture dans des boîtes de pétri contenant du milieu Freshwater-Agar à l'université de Bielefeld (Allemagne). Ils ont été utilisés pour des tests écotoxicologiques multi-espèces (cf section III.2.3).

##### **Nématodes terrestres/sédiment :**

- *Caenorhabditis elegans* (Maupas, 1900) : la souche N2 de ce nématode provient de Caenorhabditis Genetics Center (Université du Minnesota, Minneapolis, MN, USA). Il est maintenu sous forme de « dauer larvae » (stade de développement des nématodes, plus résistants aux conditions difficiles) et a été inoculé dans des boîtes de pétri contenant du milieu NGM-Agar pour les expérimentations. C'est un organisme modèle très utilisé notamment en écotoxicologie, qui a donc été utilisé pour les pré-expérimentations des tests écotoxicologiques (cf section III.2.2) et les tests multi-espèces (cf section III.2.3).

- *Diploscapter coronatus* (Cobb, 1893) : ce nématode est maintenu en culture dans des boîtes de pétri contenant du milieu Nutrient-Agar à l'université de Bielefeld (Allemagne). Il a été utilisé pour des tests écotoxicologiques multi-espèces (cf section III.2.3).
- *Pristionchus pacificus* (Sommer, 1996) : ce nématode provient de l'institut Max Planck (Tübingen, Allemagne). Il est maintenu en culture dans des boîtes de pétri contenant du milieu NGM-Agar à l'université de Bielefeld (Allemagne). Il a été utilisé pour des tests écotoxicologiques multi-espèces (cf section III.2.3).
- *Rhomborhabditis regina* (Goodey, 1926) : ce nématode est maintenu en culture dans des boîtes de pétri contenant du milieu NGM-Agar à l'université de Bielefeld (Allemagne). Il a été utilisé pour des tests écotoxicologiques multi-espèces (cf section III.2.3).

Tous les nématodes ont été identifiés par Pr. Walter Traunspurger de l'université de Bielefeld (Allemagne).

#### II.1.1.2 Chironomes

Les chironomes ont été collectés en tamisant (500  $\mu\text{m}$ ) les sédiments de la rivière de Johannesburg (Bielefeld, Allemagne). Ils ont été délicatement ôtés de leur tube sous une loupe binoculaire, puis stockés dans le noir à 22°C. Pour l'identification, une dizaine de chironomes ont été observés frais à la loupe binoculaire puis fixés à l'éthanol présentant une pureté de 75%, entre lame et lamelle au microscope optique. Ne possédant pas les organismes des autres stades (nymphe et insecte), nous avons identifié leur tribu grâce à la clé de détermination des invertébrés d'eau douce (Tachet et al. 2010): ces chironomes appartiennent à la tribu des Tanytarsinae. Ils ont été utilisés en tant que brouteurs dans la section III.3.3.2.

#### II.1.2 Microalgues

- *Planorhynchium lanceolatum* (Brébisson ex. Kützing) Lange-Bertalot : Cette diatomée pennée provient d'une culture souche (TCC615) de l'INRA de Thonon-les-bains (France). Elle a été isolée depuis un biofilm du ruisseau Le Lourdan, à Lentigny (France). Elle est maintenue en culture à l'Irstea de Bordeaux, dans du milieu Dauta. Elle a été utilisée en tant que proie dans les expériences des sections III.3.2 et III.3.3.2.
- *Gomphonema gracile* (Ehrenberg) : Cette diatomée pennée, identifiée par Dr Soizic Morin, présente deux morphotypes : une forme normale symétrique et une forme

tératologique asymétrique. Elles ont été isolées depuis différents biofilms issus de la Leyre et maintenues en culture séparément dans du milieu Dauta à l'Irstea de Bordeaux. Elles ont été utilisées en tant que proies dans les expériences des sections III.3.2 et III.3.3.2.

- *Desmodesmus* sp. (Chodat) An, Friedl & Hegewald: Cette chlorophyte a été maintenue en culture à l'université de Bielefeld pour servir de ressource alimentaire à la méiofaune herbivore. Cette microalgue a été inoculée dans du milieu Dauta pour être utilisée en tant que proie des chironomes dans les expériences de sélection de nourriture et de taux de broutage sous pression pesticide (cf section III.3.3.2.).

### II.1.3 Le biofilm

Les expérimentations à l'échelle de la communauté ont été réalisées sur une communauté benthique d'eau douce modèle, particulièrement utilisée pour les travaux en écotoxicologie : le biofilm (cf section I.1.1). Le biofilm se compose d'une multitude d'espèces de différents règnes (cf Figure 1). Au cours de cette thèse, nous nous sommes particulièrement intéressés aux trois groupes algaux principaux : les algues vertes (chlorophytes), les algues bleues (cyanobactéries) et les algues brunes (diatomées) ; et à la microméiofaune d'une taille comprise entre 15µm et 2mm (ciliés, amibes nues, thécamébiens, héliozoaires, rotifères, nématodes, oligochètes, larves chironomes, daphnies, copépodes, gastrotriche). La présence et la proportion de ces divers organismes varient en fonction des stades de colonisation du biofilm et des saisons.

Des lames de verres ont ainsi été immergées dans l'étang hypereutrophe de Gazinet Cestas (cf section II.2.3.1). Un suivi temporel de colonisation a été effectué pour chaque saison aux jours 7, 14, 21 et 28 de colonisation. Puis, le biofilm considéré mature au bout de 28 jours, les lames ont été transférées dans des aquariums et exposées à des concentrations pesticides environnementales pendant 7 et 14 jours (cf section II.2.3.2).

## II.2 Systèmes expérimentaux

### II.2.1 Microcosmes

Au cours des expérimentations, différents types de microcosmes et de milieux nutritionnels ont été utilisés en fonction des organismes étudiés et des tests effectués. Tous les contenants étaient en verre afin d'éviter au maximum la perte de pesticides par adsorption dans les parois. Les échantillons des expériences en microcosmes ont été prélevés en milieu stérile (bec bunsen)

pour éviter toute contamination extérieure. Les contenants (erlen meyer, pilulier) avec leurs bouchons, les milieux de culture (Dauta, K medium, Volvic) ont été autoclavés, les outils de prélèvement utilisés étaient à usage unique ou rincés à l'éthanol (pureté : 75%).

### II.2.1.1 Piluliers en verre :

Pour les tests écotoxicologiques, des piluliers en verre de 1,5mL à 5mL ont été utilisés (Figure 6). Les bouchons étaient poreux pour favoriser le renouvellement gazeux entre le microcosme et l'air ambiant. Les expériences menées dans ces piluliers ne nécessitaient pas beaucoup de matériel biologique ou n'étaient prélevées qu'au temps initial et au temps final (cf section III.2.2, III.2.3 et III.3.3.2).

### II.2.1.2 Erlenmeyers :

Des erlenmeyers de 150mL contenant du milieu Dauta (Figure 6) ont été utilisés pour les expériences de la section III.3.2.2. En effet, dans cette partie nous souhaitons avoir assez de matériel biologique pour prélever 1mL d'échantillon tous les jours, jusqu'à une durée maximale de 15 jours sans prélever plus de 10% du volume initial. Les bouchons ouattés permettaient les échanges d'air.

### II.2.1.3 Boîtes de pétri :

Des expériences d'observation directe ont été menées sur des larves de chironomes (cf section III.3.3.2). Les boîtes de pétri permettaient de pouvoir observer le comportement de l'individu à l'œil nu. Des photos ont été prises pendant toute la durée de l'expérience.



Figure 6: Photographie présentant les différents microcosmes utilisés pour les expériences en laboratoire, de gauche à droite : les erlenmeyers en enceinte thermorégulée, les piluliers de 5 mL et de 2 mL.



#### II.2.1.4 Les milieux de culture

**Le milieu Dauta** est un milieu de culture qui représente un milieu eutrophe, enrichi en azote et phosphore. Il est préparé selon le protocole proposé par (Dauta 1982) en annexe 1, à partir de solutions de macro- et oligoéléments dans de l'eau distillée, ajustée à un pH de 7,5-8.

**Le K-Medium** est un milieu riche en sels minéraux, largement utilisé dans les tests écotoxicologiques avec *Caenorhabditis elegans*. Il a été préparé selon le protocole de Williams & Dusenbery (1990) avec 2,4 mg.L<sup>-1</sup> de chlorure de potassium et 3,1 mg.L<sup>-1</sup> de chlorure de sodium dans 1 L d'eau déminéralisée.

**La Volvic** est une eau minérale naturelle commercialisée, peu riche en sels minéraux (composition en annexe 2).

## II.2.2 Tableau récapitulatif des conditions générales des expériences en microcosme :

Tableau 3: Récapitulatif des conditions générales des expériences en microcosmes (Diu : Diuron ; Imi : Imidaclopride ; Nem : Nématodes ; Mix : Compétition interalgale)

Organismes	Microcosme	Milieu	Traitements	Durée d'exposition	Stockage	Température	Luminosité J :N
Préexpérimentation : détermination des concentrations à effet d'imidaclopride et de diuron (section III.2.2)							
<i>C. elegans</i>	Pilulier en verre 3mL	K-medium	Témoin Témoin solvant (0,5% acétonitrile) 12 concentrations de diuron de 5µg.L <sup>-1</sup> à 32mg.L <sup>-1</sup> 15 concentrations d'imidaclopride de 2µg.L <sup>-1</sup> à 119mg.L <sup>-1</sup> X 6 réplicats	96h	Enceinte thermorégulée	20°C	Noir
Préexpérimentation : comparaison de la toxicité des substances chimique entre différents milieux de culture (section III.2.2)							
<i>C. elegans</i>	Pilulier en verre 3mL	K-medium ou Volvic	Témoin Témoin solvant Diu 16mg.L <sup>-1</sup> Diu 32 mg.L <sup>-1</sup> Imi 47 mg.L <sup>-1</sup> Imi 119 mg.L <sup>-1</sup> X 5 réplicats	96h	Enceinte thermorégulée	20°C	Noir
Tests écotoxicologique sur la mortalité de plusieurs espèces de nématodes sous pression pesticide (section III.2.3)							
<i>A. cf. parietinus</i> <i>C. elegans</i> <i>D. Coronatus</i> <i>P. acuminatus</i> <i>P. opisthocirculus</i> <i>P. velox</i> <i>P. pacificus</i> <i>R. regina</i>	Pilulier en verre 3mL	Volvic	Témoin Témoin solvant Diu 16mg.L <sup>-1</sup> Diu 32 mg.L <sup>-1</sup> Imi 47 mg.L <sup>-1</sup> Imi 119 mg.L <sup>-1</sup> X 5 réplicats	48h	Enceinte thermorégulée	20°C	Noir

Organismes	Microcosme	Milieu	Traitements	Durée d'exposition	Stockage	Température	Luminosité J :N
Impact d'un insecticide et d'un herbicide sur les relations biotiques méiofaune/microalgues (section III.3.2.2)							
<i>A. bicandatus</i> <i>P. lanceolatum</i> <i>G. gracile</i> (normale et teratologique)	Erlen meyer 150mL	Dauta	Pour chaque algue : Témoin Diu 5µg.L <sup>-1</sup> Imi 5µg.L <sup>-1</sup> Mix Mix + Diu 5 µg.L <sup>-1</sup> Mix + Imi 5 µg.L <sup>-1</sup> Nem Nem + Diu 5 µg.L <sup>-1</sup> Nem + Imi 5 µg.L <sup>-1</sup> Mix + Nem + Diu 5 µg.L <sup>-1</sup> Mix + Nem + Imi 5 µg.L <sup>-1</sup>	Durée de croissance exponentielle des algues testées: 5 à 20 jours	Einceinte thermorégulée	20°C	Photopériode : 16 :8
Impact d'un herbicide et d'un insecticide seul et en mélange sur le taux de broutage d'un chironome (section III.3.3.2)							
Chironomes Tanytarsinae <i>P. lanceolatum</i> <i>G. gracile</i> (normale et teratologique) <i>Desmodesmus</i> sp.	Pilulier en verre 1, 5mL	Volvic	Témoin Témoin solvant Diu 5 µg.L <sup>-1</sup> Imi 5 µg.L <sup>-1</sup> Imi + Diu (5 + 5 µg.L <sup>-1</sup> )	24 h	Salle thermorégulée	22°C	Noir
Impact d'un insecticide et d'un herbicide sur la sélection de nourriture d'un chironome (section III.3.3.2)							
Chironomes Tanytarsinae <i>P. lanceolatum</i> <i>G. gracile</i> (normale et teratologique) <i>Desmodesmus</i> sp.	Boîte de pétri 15mL	Volvic	Témoin solvant Diu 5 µg.L <sup>-1</sup> Imi 5 µg.L <sup>-1</sup> Imi + Diu (5 + 5 µg.L <sup>-1</sup> )	4h	Salle thermorégulée	22°C	Noir

## II.2.3 Mésocosmes

### II.2.3.1 Le développement du biofilm

Des lames en verre (26,5 x 8 cm) vierges ont été disposées parallèlement dans des cagettes en plastiques, immergées à 20cm de la surface à l'aide d'un dispositif flottant (Figure 7) dans l'étang de Gazinet Cestas (Nouvelle Aquitaine, France). La colonisation de ces lames par le biofilm s'effectuait pendant 28 jours aux quatre saisons de l'année : hiver (Février 2017), printemps (Mai 2017), été (Juillet 2018) et automne (Novembre 2018). Cette méthode de collecte de biofilm a servi aux sections IV.2 et I.1.



Figure 7: Photographie du matériel de colonisation. Une série de cagettes disposée sur un dispositif flottant en PVC en haut à droite, contenant des lames de verres à gauche, immergée à une vingtaine de centimètres en dessous de la surface, en bas à droite.

### II.2.3.2 Conditions générales

Dans le but de pouvoir reproduire les conditions les plus réalistes possibles, tout en contrôlant un maximum de variables (températures de l'air et de l'eau, luminosité, photopériode, substances chimiques), les expérimentations en mésocosmes (cf section I.1) ont été réalisées dans une salle thermorégulée. La température a été paramétrée en fonction des données relevées dans

l'eau pendant le mois de colonisation du biofilm dans l'étang et la photopériode a été choisie dépendamment de la saison (Tableau 4).

Ces mésocosmes se présentaient sous la forme d'aquariums rectangulaires de 34 L. Les lames colonisées de biofilm étaient disposées obliquement dans les aquariums pour laisser le plus de surface possible en contact avec l'eau. Une couverture réfléchissante était installée tout autour des aquariums de manière à homogénéiser au maximum l'intensité lumineuse entre les différents traitements (Figure 8).

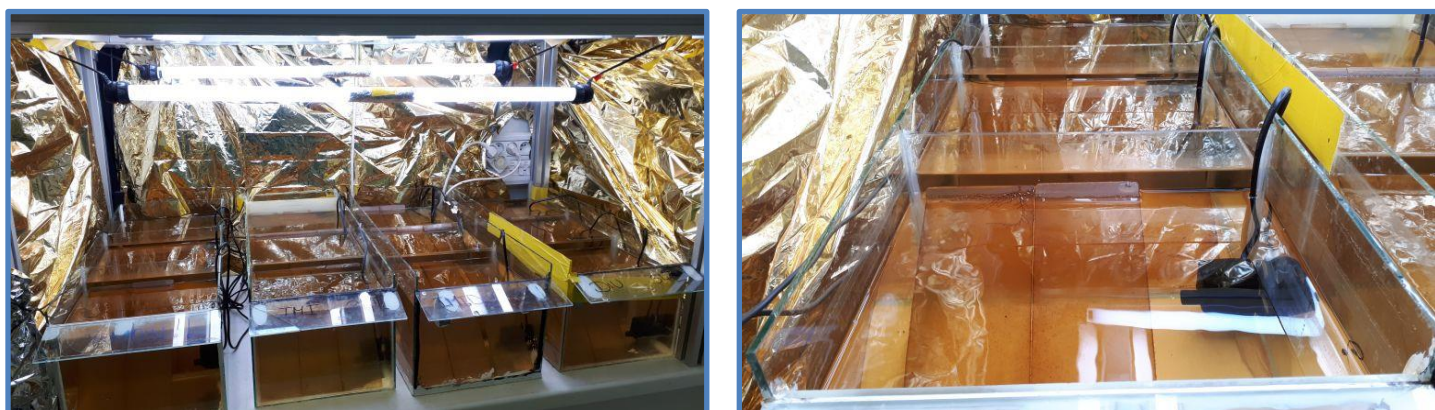


Figure 8: Photographie de la disposition des aquariums dans la salle thermorégulée à gauche, disposition oblique des lames dans les aquariums à droite.

Tableau 4 : Présentation des conditions générales des expériences en mésocosmes (T0 : temps initial, Diu : traitement au diuron, Imi : traitement à l'imidaclopride, Imi+Diu : traitement au mélange des deux pesticides)

Saison	Mois de colonisation	Traitement	Durée d'exposition	Température de l'eau	Photopériode (jour : nuit)
Hiver	Février 2017	Témoin Diu 5 µg.L <sup>-1</sup> Imi 5 µg.L <sup>-1</sup> Imi + Diu (5 + 5 µg.L <sup>-1</sup> )	T0 7 jours 14 jours	12,8 ± 0,6°C	8h:16h
Printemps	Mai 2017	Témoin Diu 5 µg.L <sup>-1</sup> Imi 5 µg.L <sup>-1</sup> Imi + Diu (5 + 5 µg.L <sup>-1</sup> )	T0 7 jours 14 jours	17,3 ± 0,4°C	14h : 10h
Été	Juillet 2018	Témoin Diu 5 µg.L <sup>-1</sup> Imi 5 µg.L <sup>-1</sup> Imi + Diu (5 + 5 µg.L <sup>-1</sup> )	T0 7 jours 14 jours	27,4 ± 0,9°C	16h:8h
Automne	Novembre 2018	Témoin Diu 5 µg.L <sup>-1</sup> Imi 5 µg.L <sup>-1</sup> Imi + Diu (5 + 5 µg.L <sup>-1</sup> )	T0 7 jours 14 jours	15,6 ± 0,9°C	10h:14h



### II.2.3.3 Le milieu de culture:

De manière à réduire le stress induit aux communautés de biofilm qui s'étaient au préalable développées dans l'étang, nous avons décidé d'utiliser l'eau de l'étang pour les expérimentations en aquariums. Pour ce faire, nous avons choisi de filtrer cette eau avec un filet à phytoplancton de maille de 30 $\mu$ m pour éviter des intrants de méiofaune planctonique.

Deux jours avant la mise des lames en aquariums, ou avant les renouvellements d'eau, 150 L d'eau de l'étang étaient prélevés à l'aide d'une pompe. L'eau était ramenée dans de gros bidons de 50 à 100 L, puis filtrée grâce au système illustré Figure 9.

Cette eau filtrée était ensuite stockée au noir pour éviter une croissance algale puis mise en aquarium aux jours de prélèvement des lames. Des analyses physico-chimiques de cette eau ont été effectuées (cf section II.3) pour mesurer au mieux les stress induits à la communauté lors de la migration des lames de l'étang vers les aquariums.

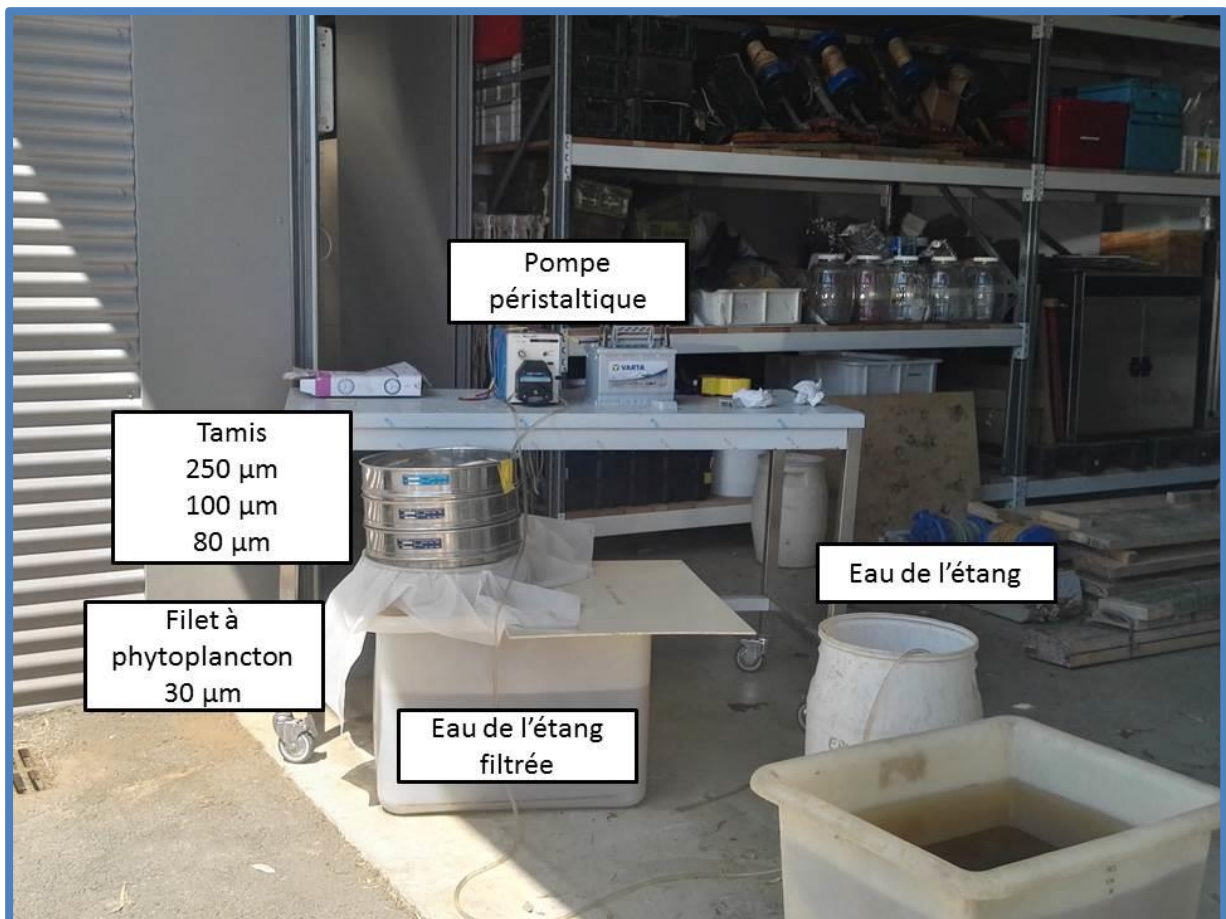


Figure 9: Système de filtration de l'eau de l'étang

## II.3 Analyses de l'eau

### II.3.1 Physico-chimie de l'eau

#### II.3.1.1 Conditions environnementales initiales (*in situ*)

La température de l'air et de l'eau, le pH, la conductivité à 25°C et l'oxygène dissout ont été mesurés dans l'étang deux fois par semaine pendant la durée de colonisation du biofilm et dans les aquariums, à l'aide des sondes dédiées (WTW, Allemagne). Des tinytags (Tinytag Aquatic 2 – TG-4100) ont aussi été installés dans une des cagettes, tout au long de la colonisation dans l'étang et dans l'aquarium témoin pour connaître les variations de températures quotidiennes. Les tinytags enregistrent les températures toutes les 10 minutes. L'intensité lumineuse a aussi été mesurée dans l'étang au niveau de la surface et sous l'eau, à l'emplacement des cagettes et avant chaque expérimentation en mésocosmes, à la surface des aquariums avec un LICOR LI-250 light meter.



Figure 10: Mesure des paramètres physico-chimiques de base de l'étang de Gazinet-Cestas avec Gwilherm Jan pendant l'expérimentation d'été.

### II.3.1.2 Dosage des matières en suspension

Les matières en suspension sont un bon critère de l'évaluation de l'état de santé d'un plan d'eau. En effet, en créant un écran plus ou moins épais, appelé turbidité, elles peuvent jouer sur l'entrée de la lumière dans l'eau et donc sur l'efficacité de la photosynthèse. Il est donc important de les mesurer au cours du développement d'un biofilm dit « photosynthétique » (= algal).

Le dosage des matières en suspension a été réalisé par Mélissa Eon dans le laboratoire de chimie Ecovea. Le protocole de dosage suit la norme de référence NF EN 872 d'avril 1996. A chaque date de prélèvement dans l'étang, 1L d'eau était échantillonné aux abords des cagettes. Ce litre était ensuite filtré au travers de filtres GF/F préalablement pesés et passés au four. Les filtres couverts de matière étaient ensuite séchés à l'étuve à 105°C pendant 1h pour déterminer le poids des matières en suspension. Ensuite, ces mêmes filtres étaient brûlés au four à moufle à 550°C pour obtenir le poids des matières volatiles solubles.

$$PS(mg / ml) = \frac{m_{étuve} - m_{filtre}}{V}$$

$$\text{et } MSSC(mg / ml) = PS \times \left( 1 - \frac{m_{four} - m_{filtre}}{m_{étuve} - m_{filtre}} \right)$$

Avec :

PS : le poids sec des matières en suspension en mg.ml ;

MSSC : La matière sèche sans cendre en mg.ml;

$m_{filtre}$  : masse initiale du filtre vierge en mg ;

$m_{étuve}$  : masse du filtre après filtration de l'échantillon et passage à l'étuve en mg ;

$m_{four}$  : masse du filtre après passage au four en mg ;

V : Volume filtré en ml

### II.3.1.3 Détermination du titre alcalimétrique

Le titre alcalimétrique complet permet de déterminer la dureté d'une eau. Cette analyse a été réalisée par Mélissa Eon en complément des mesures de pH afin de mieux caractériser l'équilibre acido-basique de l'étang. Le protocole de titrage suit le document de référence NF EN ISO 9963-1 de février 1996. Les mesures ont été effectués avec un titreux Easy Pro de chez METTLER TOLEDO équipé d'une électrode combinée pH et titrage en solution aqueuse (EG11BNC).



## II.3.2 Les nutriments

Les éléments nutritifs sont des descripteurs indispensables pour l'étude d'un écosystème comme le biofilm. En effet, cet écosystème abrite des producteurs primaires autotrophes qui ont besoin de ces éléments, en plus de la lumière, en tant que source d'énergie pour la production de biomasse. Le biofilm est aussi riche en diatomées, une microalgue qui utilise la silice dissoute pour former son frustule.

Les paramètres suivants ont été suivis dans l'étang à chaque date d'échantillonnage et dans les aquariums, à T0, avant et après chaque renouvellement d'eau. Pour ce faire, 1 L d'eau a été échantillonné à chacune de ces dates, aux abords des cagettes dans l'étang et dans chaque aquarium pour la partie expérimentale en mésocosmes. Les échantillons ont été stockés au réfrigérateur pendant moins de 24h dans des contenants en plastique avant analyse.

### II.3.2.1 Les anions et cations

Les concentrations en anions ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{PO}_4^-$  et  $\text{SO}_4^-$ ) et en cations ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^+$  et  $\text{Mg}^+$ ), ont été mesurées par Mélissa Eon selon le principe de chromatographie ionique (Methrom compact 881). La chromatographie ionique consiste à séparer les anions et les cations par élution, en fonction de leur affinité. Les limites de quantification sont de  $0,01 \text{ mg.L}^{-1}$  pour  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$  et  $\text{SO}_4^-$ ;  $0,005 \text{ mg.L}^{-1}$  pour  $\text{NO}_2^-$  et  $\text{SO}_4^-$ .

### II.3.2.2 Dosage de l'Azote Kjeldahl

L'Azote Kjeldahl regroupe l'azote organique et l'azote ammoniacal ( $\text{NH}_4$ ). Ce dosage a été réalisé au laboratoire de chimie par Mélissa Eon. Ce titrage s'effectue en trois étapes selon la norme AFNOR NF EN 25663 de janvier 1994. L'échantillon est minéralisé pour obtenir du sulfate d'ammonium. Par la suite, l'ammoniac est libéré et distillé. Enfin le dosage est réalisé par titrimétrie. Nous n'avons pas utilisé l'azote Kjeldahl dans le traitement des données, mais celui-ci nous a servi à déterminer l'azote organique en soustrayant l'azote ammoniacal suivant la formule ci-dessous :

$$N_{org} = N_{kj} - NH_4$$

Avec :

$N_{org}$  : Azote organique en  $\text{mg N.L}^{-1}$  ;

$N_{Kj}$  : Azote Kjeldahl en  $\text{mg N.L}^{-1}$  ;

$NH_4$  : Azote ammoniacal en  $\text{mg N.L}^{-1}$ .

La limite de quantification du NKj est de  $1 \text{ mg.L}^{-1}$ .

### II.3.2.3 Dosage du phosphore total

Le dosage du phosphore total a été effectué par Mélissa Eon selon la norme AFNOR NF T 90.023. Cette méthode permet de mesurer le phosphore dans l'eau sous toutes ses formes. Elle se divise en trois étapes : une première étape de minéralisation du phosphore, une seconde étape de dosage colorimétrique et enfin la lecture au spectrophotomètre à 880nm (UV-1800 Shimadzu). La limite de quantification est de 0,1 mg PO<sub>4</sub>.L<sup>-1</sup>.

### II.3.2.4 Dosage de la silice

Le dosage des silicates solubles a été réalisé avec la méthode de spectrométrie d'absorption moléculaire par Mélissa Eon au laboratoire de chimie. Cette méthode suit la norme AFNOR NF T90-007 de février 2001. Elle se déroule en trois parties. Dans un premier temps, les silicates sont complexés en milieu acide avec le molybdate d'ammonium. Ensuite le complexe moléculaire est réduit avec de l'acide ascorbique. Enfin, la coloration est lue au spectrophotomètre (UV-1800 Shimadzu). La limite de quantification est de 0,05 mg SiO<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>.

### II.3.2.5 Dosage du carbone organique total

Le carbone organique total a été mesuré par Brigitte Delest au laboratoire de chimie. Le plastique risquant de biaiser les résultats du carbone organique, 600mL d'eau ont été prélevés dans un contenant un verre. Les mesures ont été réalisées à l'aide d'un COT-mètre chimique (COT-VW, Shimadzu, Japon). Les échantillons sont d'abord acidifiés puis le carbone organique relargué est oxydé pour former du CO<sub>2</sub>. Le CO<sub>2</sub> gazeux est quantifié avec un détecteur infrarouge (Shimadzu, Japon). La limite de quantification est de 1 mgC.L<sup>-1</sup>.

## II.3.3 Pesticides

Les pesticides ont été dosés pour deux raisons. La première raison a été de déterminer si le biofilm se développait dans un environnement déjà contaminé par les pesticides. Quarante-deux pesticides neutres et anioniques ont été analysés dans les échantillons d'eau provenant de l'étang de Gazinet-Cestas par HPLC-MS/MS.(acétochlore, acétochlore ESA<sup>1</sup>, alachlore, atrazine, azoxystrobine, carbaryl, carbendazime, carbofuran, chlortoluron, cyproconazole, cyprodinil, DCPMU<sup>2</sup>, DCPU<sup>3</sup>, DEA<sup>4</sup>, DET<sup>5</sup>, DIA<sup>6</sup>, dicamba, diclofop, dimétachlore, diméthanamide,

<sup>1</sup> Produit de dégradation de l'acétochlore.

<sup>2</sup> Produit de dégradation du diuron.

<sup>3</sup> Produit de dégradation du diuron.

<sup>4</sup> Produit de dégradation de l'atrazine.

<sup>5</sup> Produit de dégradation de la terbuthylazine.

diméthoate, dimétomorphe, diuron, epoxiconazole, flurtamone, flusilazole, hexazinone, imidaclopride, IPPMU<sup>7</sup>, IPPU<sup>8</sup>, iodosulfuron, irgarol, isoproturon, kresoxim-methyl, linuron, mecoprop, métazachlore, methomyl, métolachlore, métolachlore OA/ESA<sup>9</sup>, metoxuron, norflurazon, norflurazon-desméthyl, prométryne, pyrimicarb, simazine, spiroxamine, tébuconazole, terbuthylazine, thiodicarb). Le glyphosate a été analysé à part aux vues des différences de préparation des échantillons, selon le protocole de Fauvelle et al. (2017). Dans les expériences en laboratoire, la quantification du diuron et de l'imidaclopride seulement, visait à s'assurer que les concentrations réelles d'exposition étaient proches des concentrations nominales. Ces pesticides ont été quantifiés par l'UPLC-TOF (Ultra-Performance Liquid Chromatography – Time of Flight Mass Spectrometry, Xevo G2-S Tof, Waters) selon la méthode décrite dans (Chaumet et al. 2019). La limite de quantification est  $\leq 20 \text{ ng.L}^{-1}$ .

### II.3.3.1 Analyse des pesticides de l'étang

Une partie des 600mL d'eau prélevé dans le contenant en verre pour le carbone organique a servi à l'analyse des pesticides de l'étang. Ces travaux de détection/quantification des pesticides ont été réalisés par Aurélie Moreira et Bertille Bonnaud. Les échantillons d'eau ont été filtrés au travers de filtre GF/F. Les filtres ont été stockés au congélateur à  $-20^{\circ}\text{C}$  au minimum 12h avant d'être lyophilisés, afin de connaître la masse des matières en suspension contenu dans l'eau analysée. Les échantillons ont été purifiés par SPE (Solid Phase Extraction) à l'aide de cartouches Chromabond HR-X. Une solution de huit étalons internes a été ajoutée à hauteur de 10% du volume final à l'éluat ainsi obtenu. Les échantillons ont été évaporés à l'aide d'un SpeedVac® puis remis en suspension dans 1mL d'une solution d'eau ultra-pure (90%) et d'acétonitrile (10%). Enfin, les pesticides ont été quantifiés par HPLC-MS/MS.

Brigitte Delest et Bertille Bonnaud ont réalisé les dosages du glyphosate selon le protocole de Fauvelle et al. (2017). Les échantillons d'eau sont préalablement filtrés à l'aide de seringue, au travers de filtres (Whatman Spartam,  $\text{Ø } 0,45\mu\text{m}$ ). Les échantillons ont ensuite été préparés pour subir une première étape d'extraction liquide-liquide par centrifugation. La solution ainsi obtenue passe par une deuxième étape d'extraction sur phase solide. La totalité de l'échantillon a été passée au travers de cartouches (OASIS HLB 3CC/60mg) conditionnées au méthanol et à l'acide formique. Puis les cartouches ont été éluées et le reste de solvant a été évaporé sous azote. Enfin, la solution a été transvasée dans des vials de 1mL pour analyse à l'UPLC-MS/MS. La limite de quantification du glyphosate est de  $0,1 \mu\text{g.L}^{-1}$ .

---

<sup>6</sup> Produit de dégradation de l'atrazine.

<sup>7</sup> Produits de dégradation de l'isoproturon.

<sup>8</sup> Produits de dégradation de l'isoproturon.

<sup>9</sup> Produit de dégradation du métolachlore.

### II.3.3.2 Quantification du diuron et de l'imidaclopride

Le dosage du diuron et de l'imidaclopride décrit ci-dessous a été réalisé par Betty Chaumet à l'UPLC-TOF (Chaumet et al. 2019). Ces analyses ont été effectuées pour les expériences en microcosmes (partie 3) et mésocosmes (partie 4). Des volumes d'eau de 5 mL provenant des aquariums ont été prélevés au début et à la fin des expériences, et entre chaque renouvellement d'eau pour les expériences en aquariums. Les échantillons ont été filtrés à l'aide de filtre-seringue. Un volume de 990 $\mu$ L de ce filtrat a été introduit en vial auquel 10 $\mu$ L d'une solution de 8 étalons internes ont été ajoutés. Le diuron, ses principaux métabolites (DCPMU et DCPU) et l'imidaclopride ont ensuite été quantifiés par UPLC-ToF. Les limites de quantification sont de 0,5  $\mu$ g.L<sup>-1</sup>.

## II.4 Descripteurs biologiques

### II.4.1 Préparation du biofilm

Pour les analyses décrites par la suite, le biofilm devait être préparé. Les lames colonisées étaient grattées de chaque côté avec un rasoir (Figure 11). Le biofilm était ainsi remis en suspension (Figure 11) dans de l'eau minérale Ondine ou dans l'eau des aquariums dont il était extrait. Dans ce cas, l'eau des aquariums était filtrée à 0,7  $\mu$ m pour éviter les biais de comptage. Le volume de remise en suspension pouvait varier en fonction de la densité du biofilm (50mL ou 100mL).

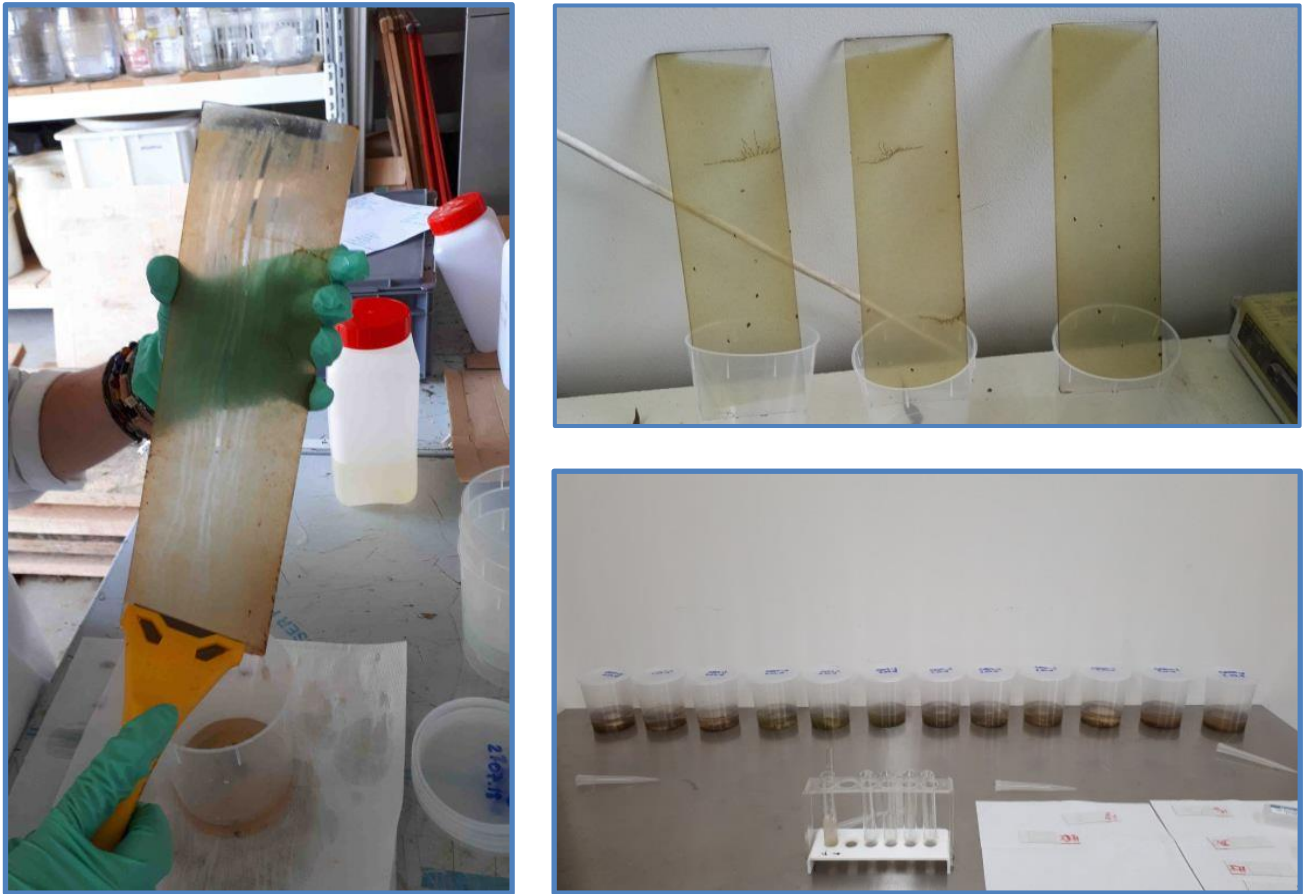


Figure 11: Photographie de lames colonisées par du biofilm en été en haut à droite, du grattage du biofilm avec un rasoïr à gauche et du biofilm remis en suspension en bas à droite.

#### II.4.1.1 Poids sec

Le poids sec du biofilm a été déterminé pour chaque saison au 28<sup>ème</sup> jour de colonisation puis pour chaque traitement en aquarium aux jours 7 et 14 d'exposition. Il permet de rendre compte de l'état de santé du biofilm, d'estimer un effet des saisons ou de la contamination pesticide sur sa durée de maturation, et enfin de calculer l'indice d'autotrophie (cf section II.4.1.3). Un échantillon de 10mL de chaque réplicat de biofilm remis en suspension a été filtré sur Buchner (Figure 12) avec des filtres GF/F (Ø 47 mm Whatman 0,7µm) préalablement pesés. Les filtres ont été congelés à -18°C durant au moins 12h avant d'être lyophilisés (ALPHA 1-2 Dplus CHRIST, Allemagne) puis pesés de nouveau. Le poids sec est obtenu à partir de la formule suivante :

$$PS = \frac{Pb - Pf}{V}$$

*Avec :*

*Pb* : Le poids du filtre avec biofilm lyophilisé en mg

*Pf* : Le poids du filtre en mg

*PS* : Le poids sec exprimé en  $\text{mg.mL}^{-1}$

*V* : Le volume d'échantillon filtré en mL

Le poids sec a ensuite été converti en  $\text{mg.cm}^2$ , sachant que 1mL représente  $8,8\text{cm}^2$  pour la remise en suspension d'une surface de  $440\text{cm}^2$  de biofilm dans 100mL d'eau. Cette méthode a aussi été utilisée pour la pesée des chironomes (cf section III.3.3.2). Dans ce cas le Volume V au dénominateur de la formule a été remplacé par le nombre de chironomes pour chaque traitement ( $n=9$ ).



Figure 12: Photographie du système de filtration Buchner utilisé pour la détermination du poids sec et de la chlorophylle *a*.

#### II.4.1.2 Chlorophylle *a* et groupes algaux

La concentration en chlorophylle *a* du biofilm et les proportions en groupes algaux (bleues, vertes, brunes) ont été déterminés pour chaque saison au 28<sup>ème</sup> jour de colonisation puis entre chaque traitement en aquarium aux jours 7 et 14 d'exposition pour le biofilm et pour l'eau de l'étang et des aquariums. Ces informations ont permis de déterminer si la concentration en chlorophylle était différente en fonction des saisons et des traitements et de calculer l'indice d'autotrophie du biofilm (cf section II.4.1.3). Les proportions en groupes algaux ont été analysées pour identifier les algues dominantes en fonction des saisons et des traitements.

Pour mesurer la concentration en chlorophylle *a*, un échantillon de 10mL de chaque réplicat de biofilm remis en suspension a été filtré sur Buchner (Figure 12) avec des filtres GF/C

(Ø 47 mm, Whatman) préalablement pesés. Les filtres ont été stockés au congélateur à -18°C en attendant d'être analysés. La mesure de la chlorophylle *a* a été réalisée selon la méthode de Lorenzen (NF T90 117 standard; Lorenzen & Jeffrey 1980). La chlorophylle a été extraite des filtres avec de l'acétone à 90%. Puis la coloration a été lue avec un spectrophotomètre (UV-1800 Shimadzu) aux longueurs d'onde suivantes : 630 nm, 647 nm, 664 nm et 750 nm. La concentration en chlorophylle *a* a été calculée à partir des absorbances, selon la formule suivante :

**CHLO A**

$$= \frac{V_{ac} \left( (11,85(A_{0664} - A_{0750})) - (1,54(A_{0647} - A_{0750})) - (0,08(A_{0630} - A_{0750})) \right)}{V_{filtré}}$$

*Avec :*

*CHLO A* : La concentration en chlorophylle *a* en  $\mu\text{g.L}^{-1}$  ;

*V<sub>ac</sub>* : Le volume acétonique en mL ;

*A<sub>0630</sub>/A<sub>0647</sub>/A<sub>0664</sub>/A<sub>0750</sub>* : Les absorbances aux longueurs d'ondes 630 nm, 647 nm, 664 nm et 750 nm, respectivement ;

*V<sub>filtré</sub>* : Le volume d'échantillon filtré en L.

La concentration en chlorophylle *a* a ensuite été convertie en  $\mu\text{g.cm}^2$ , sachant que 1mL représente  $8,8\text{cm}^2$  pour la remise en suspension d'une surface de  $440\text{cm}^2$  de biofilm dans 100mL d'eau.

Les proportions en groupes algaux (bleues, vertes et brunes) ont été déterminées en utilisant un fluorimètre à impulsion d'amplitude modulée (PhytoPAM, Heinz Walz GmbH, Allemagne) à partir d'échantillon de 2mL dans des cuvettes en quartz (Emitter-Detector Unit PHYTO-ED). Cet appareil permet de mesurer la fluorescence réémise par les algues en réponse à un stimulus lumineux d'intensité contrôlée. L'appareil calcule la fluorescence de la chlorophylle totale puis les proportions des différents groupes algaux sont déterminées en fonction des réponses à quatre longueurs d'ondes d'émission. Ils ont été exprimés en pourcentage (%) de la chlorophylle *a* totale.

### II.4.1.3 L'indice d'autotrophie

L'indice d'autotrophie a été calculé afin d'étudier la part d'autotrophes (production primaire) présents dans le biofilm en fonction des saisons et des traitements. Il a été obtenu à partir de la formule suivante :



$$IA = \frac{CHLOA}{PS}$$

Avec :

*IA* : L'indice d'autotrophie ;

*CHLOA* : La concentration en chlorophylle a exprimée en  $\mu\text{g.cm}^{-2}$  ;

*PS* : le poids sec exprimé en  $\text{mg.cm}^{-2}$ .

## II.4.2 Identification et comptage

### II.4.2.1 La cellule de Nageotte

La cellule de Nageotte (Paul Marienfeld GmbH & Co. KG) est un hématimètre qui permet de compter le nombre de cellule contenues dans un volume donné d'une solution. Cette cellule a beaucoup été utilisée pour ces travaux de thèse, notamment pour le comptage des microalgues dans les expériences en microcosme et pour le comptage sur les communautés de la microméiofaune. Les méthodes d'utilisation ont été diverses et seront expliquées dans les parties suivantes (cf section II.4.2.2 et II.4.2.5).

Un volume connu de la solution à compter ( $125\mu\text{L}$ ), préalablement homogénéisée, est introduit entre la surface délimitée par des rigoles et une lamelle (Figure 13). L'échantillon recouvre ainsi un quadrillage de 40 bandes (Figure 13) dont les dimensions sont connues :

- Longueur : 10mm
- Largeur : 0,25mm
- Profondeur : 0,5mm

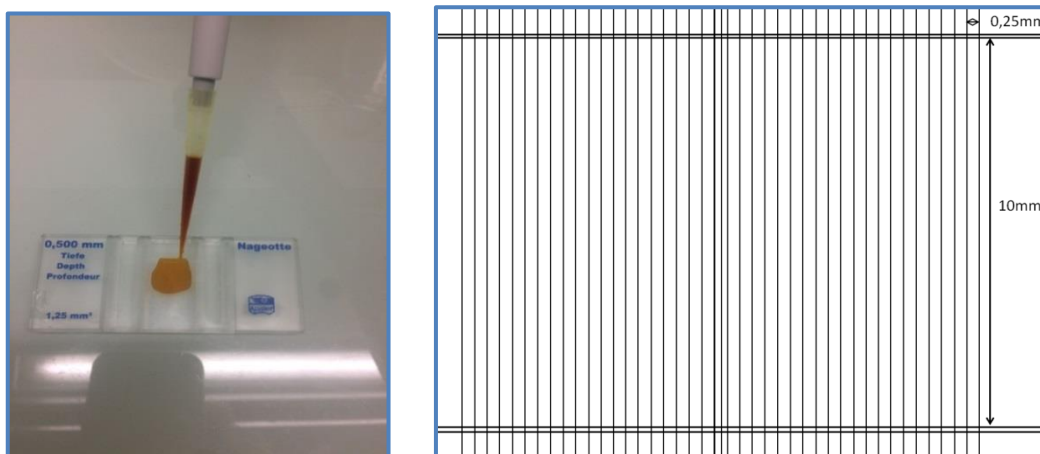


Figure 13: Photographie de l'introduction de l'échantillon à compter dans une cellule de Nageotte à gauche et son quadrillage à droite



Chaque bande a donc un volume de 1,25µL.

La formule de calcul du nombre d'éléments en suspension est donc :

$$N = \left( \frac{n}{1,25b} \right) d$$

*Avec :*

*N : Le nombre d'éléments comptés par µL de liquide (cell.µL<sup>-1</sup> ou Ind.µL<sup>-1</sup>);*

*n : Le nombre d'éléments contenus dans le nombre de bandes comptées ;*

*b : Le nombre de bandes comptées ;*

*d : Le facteur de dilution.*

#### II.4.2.2 Comptage des algues

Dans le but de déterminer les densités d'algues vivantes dans les microcosmes à chaque jour de prélèvement, les échantillons ont été fixés au lugol à 0,5%, puis stockés dans le noir pour éviter la dégradation de chlorophylle et du lugol. Pour la section III.3.3.2, une trentaine de cellules de chaque espèce a été mesurée à l'aide de la fonction « mesure » du logiciel Archimed (Microvision). Une fois la plus grande longueur, la plus grande largeur et la hauteur des microalgues acquises, nous avons utilisé le logiciel Phytobs (Hadoux et al. 2015) pour déterminer leur biovolume (µm<sup>3</sup>). A partir de leur biovolume, nous avons pu déterminer le poids humide de chaque algue. Enfin, en appliquant l'équation de Sladeczek & Sladeczkova (1963), la biomasse d'une cellule a été estimée :

$$Dw = 8 * \frac{Ww}{100}$$

*Avec :*

*Dw : Le poids sec d'une cellule de phytoplancton en µg ;*

*Ww : Le poids humide d'une cellule de phytoplancton en µg.*

Le comptage a été réalisé à x200 au DMLS Leica à contraste de phase, en suivant le protocole de comptage des hématies sur cellule de Nageotte (cf section II.4.2.1). Au minimum 4 bandes (de préférences les bandes des extrémités et celles du milieu) et 40 individus étaient comptés. Dans le cas des diatomées, une distinction entre cellules mortes et vivantes était réalisée au moment du comptage, permettant de calculer la mortalité (en pourcentage) dans les échantillons.

Les dynamiques de croissance des populations de microalgues se décomposent en deux (ou trois) étapes : une phase de latence éventuellement, et une phase de croissance exponentielle suivie d'une phase stationnaire (Figure 14).

Les densités de cellules sont calculées avec la formule décrite en II.4.2.1. L'expression générale de la cinétique de croissance fait intervenir l'évolution de la densité de cellules en fonction du temps ( $[cell]=f(t)$ ), et s'écrit :

$$\frac{d[cell]}{[cell]} = \mu \times dt$$

Avec,

$[cell]$  : densité de cellules vivantes (en nombre de cellules.mL<sup>-1</sup>);

$dt$  : temps (en jours);

$\mu$  : taux de croissance en div.jour<sup>-1</sup>.

Le taux de croissance maximal ( $\mu_{max}$ , calculé comme la pente sur la durée de phase exponentielle), la durée de la croissance exponentielle et le jour d'atteinte du plateau peuvent être déterminés à partir des coefficients de corrélation les plus forts. Le taux de croissance moyen ( $\mu$ ) entre le T0 et la date d'atteinte de la phase stationnaire et le taux de croissance maximal au cours de la phase exponentielle ( $\mu_{max}$ ) peuvent également être calculés par une régression simple, par le biais des équations suivantes :

$$\mu = \frac{\ln[cell]_{plateau} - \ln[cell]_{t0}}{\text{date d'atteinte du plateau}}$$

$$\mu_{max} = \frac{\ln[cell]_{plateau} - \ln[cell]_{début de phase expo}}{\text{date d'atteinte du plateau} - \text{date de début de phase expo}}$$

Le nombre de cellules vivantes atteint à la phase stationnaire (plateau) et la mortalité au plateau peuvent être calculés en moyennant les concentrations cellulaires à partir du premier jour d'atteinte du plateau.

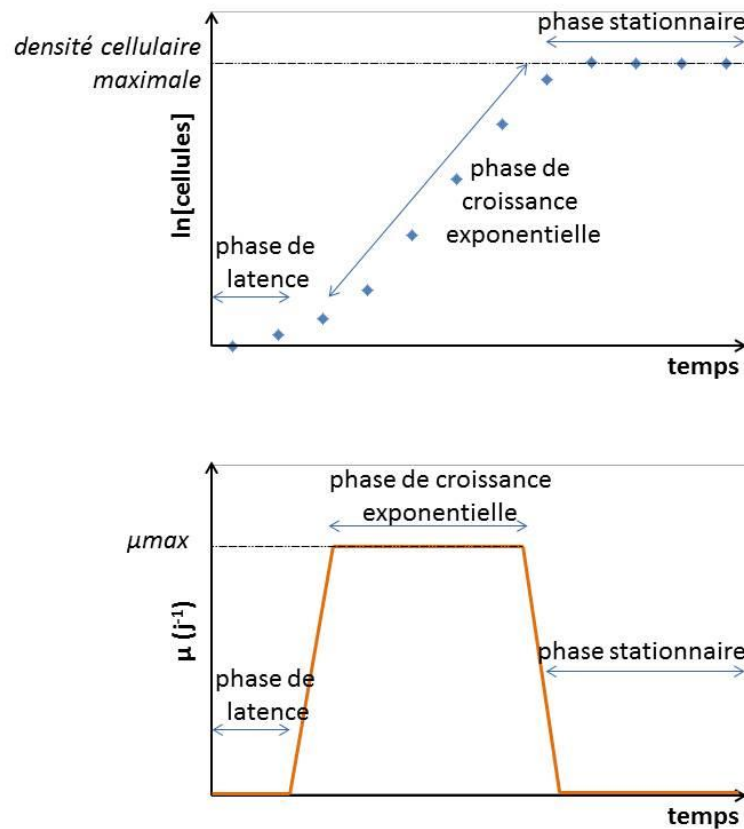


Figure 14: Représentation schématique de l'évolution de la densité de cellules et du taux de croissance au cours d'un cycle de croissance.

### II.4.2.3 Comptage des nématodes

En fonction des critères étudiés, différents comptages ont été réalisés sur les nématodes. Pour les tests sur les effets des pesticides sur la reproduction et la croissance de *C. elegans* (cf section III.2.2), ou la vérification *a posteriori* de la présence d'*Aphelenchoides bicandatus* dans les microcosmes (cf section III.3.2.2) les comptages ont été effectués sur des nématodes fixés. Pour les tests sur la mortalité, les comptages ont été effectués sur des nématodes vivants (cf section III.2.3).

#### **Le comptage des nématodes fixés :**

Deux types de comptages ont été effectués sur des nématodes fixés.

Selon le schéma décrit dans Traunspurger et al. (1997), approuvé pour la norme ISO 10872 (2010), après 96h d'incubation, les nématodes ont été fixés au rose Bengale et chauffés à 85°C pendant 15 minutes. La totalité du volume a été versée dans une lentille concave quadrillée. Les cinq nématodes du début de l'expérience, devenus adultes ont été prélevés et déposés entre lame et lamelle pour être mesurés afin d'en déterminer la croissance et le genre en fonction des

concentrations en pesticides. Les juvéniles nés pendant l'expérience, ont été comptés à x25 au microscope optique pour étudier l'effet des pesticides sur la reproduction (cf section III.2.2).

Formule de la croissance :

$$Cr = Lad - Ljuv$$

*Avec :*

*Cr : la croissance exprimée en  $\mu m$  ;*

*Lad : La longueur des adultes à la fin de l'expérience en  $\mu m$ ;*

*Ljuv : La moyenne de la longueur des 30 juvéniles mesurés au début de l'expérience en  $\mu m$ .*

Formule de la reproduction :

$$Rep = \frac{F2}{Nt - Nm}$$

*Avec :*

*Rep : Le nombre de descendants par femelle nématode ;*

*F2 : Le nombre de juvéniles dans l'échantillon (nématode de seconde génération),*

*Nt : Le nombre total de nématodes de première génération,*

*Nm : Le nombre de mâles de la première génération.*

Ce sont les pourcentages d'inhibition de ces deux descripteurs qui ont été étudiés comme réponse aux pesticides en utilisant la formule suivante :

$$I = 100 - \frac{X(\text{traitement})}{X(\text{témoin})} * 100$$

*Avec :*

*I = Le pourcentage d'inhibition ;*

*X : la moyenne des croissances ou des reproductions calculées pour un traitement.*

A la fin de chaque expérimentation avec des nématodes de la section III.3.2.2, le volume restant de culture était fixé au lugol à 0,5%, passé aux ultrasons de manière à décrocher complètement les diatomées et les nématodes des parois de l'erlenmeyer, et mis à décanter dans des colonnes de sédimentation. Après 90h de décantation et élimination du surnageant, le décantât était réparti dans plusieurs chambres de sédimentation pour faciliter l'observation microscopique. Les nématodes étaient comptés à l'objectif x10, au microscope optique inversé (Olympus IX70), en balayant l'ensemble de la lame. Ces travaux de comptage ont été réalisés par Jacky Vedrenne.

**Le comptage des nématodes vivants :**

La totalité du pilulier a été versée dans une lentille en verre. Les nématodes y ont été comptés à la loupe binoculaire. Lorsque les nématodes étaient immobiles, ils subissaient un léger stimulus à l'aide d'une petite aiguille. S'ils ne répondaient pas, ils étaient comptés comme morts. Le comptage a été effectué en discriminant les morts des vivants et les adultes des juvéniles.

**Formule pour la proportion d'adultes dans l'échantillon :**

$$Ad = \frac{Nad}{Ntot} * 100$$

*Avec :*

*Ad : Le pourcentage d'adulte dans l'échantillon ;*

*Nad : Le nombre d'individus adultes ;*

*Ntot : Le nombre total d'individus.*

**Formule de la mortalité :**

$$Mort = \frac{Nmort}{Ntot} * 100$$

*Avec:*

*Mort : La mortalité (en %) ;*

*Nmort : Le nombre d'individus morts ;*

*Ntot : Le nombre total d'individus.*

**II.4.2.4 Identification de la microméiofaune**

L'identification de la microméiofaune (cf section IV.2, I.1 et V.2) a été réalisée par Jacky Vedrenne et moi-même sur du matériel biologique frais (i.e. le jour 1 après échantillonnage), au microscope optique à contraste de phase DMLS Leica, incluant une caméra Baumer associé au logiciel de traitement de photo/vidéo Archimed (Microvision). Ce logiciel permet de prendre des photos ou des vidéos au microscope, de traiter les images ou vidéos acquises et de mesurer les individus sur les photos à l'aide de diverses fonctions de mesures.

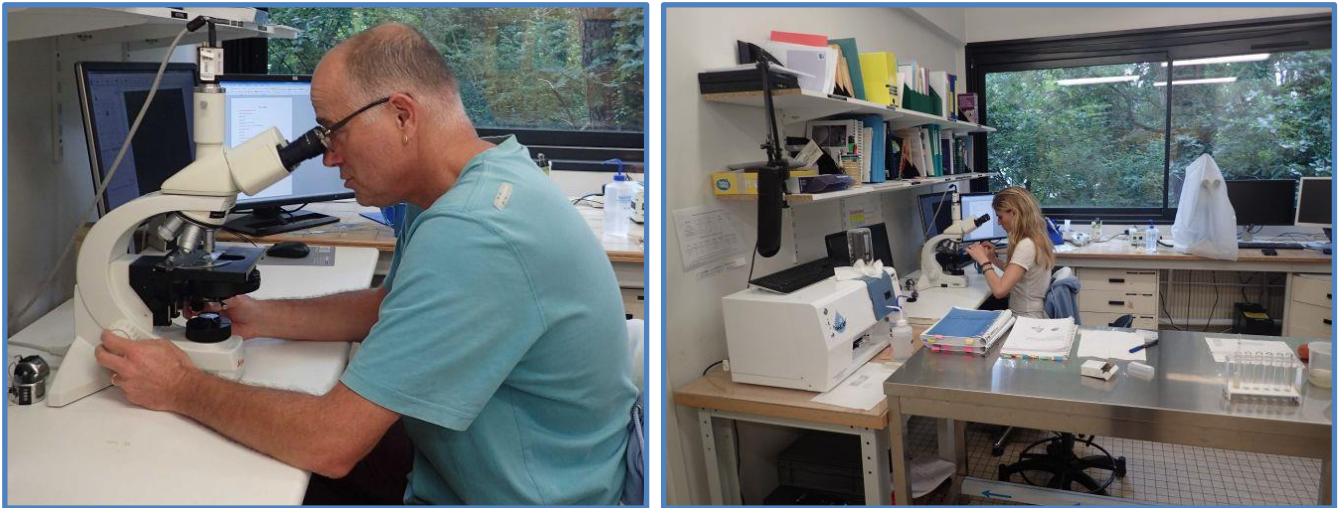


Figure 15: Photographie de Jacky Vedrenne et moi-même identifiant la microméiofaune sur le microscope optique à contraste de phase Leica DMLS.

L'identification était réalisée en deux étapes. Lors de la première étape, une goutte de biofilm remis en suspension était déposée entre lame et lamelle puis observée. L'observation sur matériel frais donne des informations quant à la manière de se déplacer des individus et leur comportement dans le biofilm et évite la déformation des individus provoquée par un fixateur. Dans un second temps, l'échantillon était mélangée à du psyllium dilué à 1/7<sup>ème</sup>. Le psyllium est une graine de plantain qui rend le liquide plus visqueux, réduisant ainsi les capacités locomotrices des individus, facilitant leur identification taxonomique. Ceci fut très utile notamment pour l'observation des ciliés. En effet, certains de ces protozoaires peuvent être très rapides mais il est nécessaire de pouvoir zoomer sur le ou les noyaux, certains des organites (vésicules contractrices) ou encore l'organisation de l'appareil buccal de ces organismes unicellulaires pour pouvoir les identifier au genre voire à l'espèce.

Différentes sources bibliographiques ont été mobilisées en fonction des types d'organismes à identifier. Les organismes complexes appartenant à la méiofaune dont les tailles étaient supérieures à 500  $\mu\text{m}$  comme les oligochètes, les larves de chironomes, les vers plats et les petits gastéropodes ont pu être identifiés jusqu'au genre (ou à la tribu pour les chironomes) grâce aux clés de détermination des invertébrés d'eau douce (Tachet et al. 2010). Les rotifères, également constitutifs de la méiofaune mais plus petits que les précédents (70 à 300 $\mu\text{m}$ ), ont été identifiés dans le biofilm principalement d'après la base de données internet « Rotifer World Catalog », (<http://rotifera.hausdernatur.at/>, 2019). Le biofilm était aussi peuplé d'amibes de diverses sortes : des amibes dites « nues », des amibes à thèques appelées « thécamébiens » et des amibes centriques entourées d'axopodes « les héliozoaires ». Pour la détermination de ce groupe d'unicellulaires, nous avons suivi les clés de détermination de la base de donnée internet « Arcella Microworld » (<https://www.arcella.nl/>, 2019). Enfin les ciliés étaient aussi très présents dans le

biofilm. Ce groupe présentait la diversité spécifique la plus riche dans le biofilm. Pour l'identification de ces organismes, nous avons utilisé la collection complète des livres de taxonomie de Wilhelm Foissner : sa clé de détermination (Foissner 1996) et les volumes auxquels elle renvoie (Foissner et al. 1991; 1992; 1993; 1994; 1995).

#### II.4.2.5 Comptage de la microméiofaune

Une fois l'identification terminée, le comptage était effectué sur une cellule de Nageotte et se déroulait en plusieurs étapes. Dans un premier temps, deux premiers balayages à x50 et x100 étaient effectués sur la totalité du volume (125µL), sans prendre en compte le quadrillage pour compter les plus gros organismes de la méiofaune (100 µm à 2mm : chironomes, rotifères, oligochètes, vers plats, ciliés ou amibes de plus grande taille). Dans un second temps, l'ensemble des 40 bandes, correspondant à un volume de 50µL, était scrupuleusement balayé à x200 pour compter les espèces de la microfaune, de plus petite taille (15µm à 100µm). Puis la densité d'individus était calculée (cf section II.4.2.1) en fonction du volume compté en Ind.mL<sup>-1</sup>, puis convertie en Ind.cm<sup>-2</sup>. Les données de comptage de la microméiofaune en fonction des saisons et des traitements ont été répertoriées dans une table d'abondance appelée matrice L (cf section 0). Les abondances relatives des espèces ont été calculées pour chaque saison, pour être transcrites ensuite en abondances de traits morphofonctionnels, en utilisant la base de données sur les traits morphofonctionnels de la microméiofaune spécifiquement créée au cours de cette thèse (cf section II.4.4).

### II.4.3 Descripteurs comportementaux

Dans le cadre de l'expérience de la section III.3.3.2, nous avons souhaité décrire l'effet des pesticides sur le comportement de nutrition de larves de chironomes. Pour ce faire, nous avons choisi d'observer les réponses de descripteurs comportementaux : le taux d'élimination des algues par ces potentiels brouteurs, la sélection nutritive à partir du temps passé par les chironomes sur chaque patch algal et du nombre de changements entre patches et l'influence des pesticides sur le comportement locomoteur en calculant la distance parcourue par chaque chironome.

Formule du taux d'élimination de Ribes et al. (1998) :

Le taux de croissance  $K$  des algues, exprimé en h<sup>-1</sup>:

$$K = \frac{\ln\left(\frac{C1}{C0}\right)}{t1 - t0}$$

Avec  $C_0$  et  $C_1$  ; la concentration algale convertie en biomasse (cf section II.4.2.2) au début ( $t_0$ ) et à la fin de l'expérience ( $t_1$ ).

Le coefficient de broutage  $g$ , exprimé en  $h^{-1}$ :

$$g = Kc - Ka$$

Avec  $Kc$ , le taux de croissance des algues avec chironomes et  $Ka$ , sans chironome.

Le taux d'élimination par les chironomes  $F$ , exprimé en  $mg^{-1}.h^{-1}$  :

$$F = \frac{g}{b}$$

Avec  $b$ , la biomasse des chironomes vivants à la fin de l'expérience, en  $mg$ .

Le temps passé par les chironomes sur chaque patch algal a été obtenu en comptant le nombre de fois que les chironomes ont été retrouvés sur un patch différent de l'observation précédente et en sommant les minutes obtenues. Le nombre de changements correspond au nombre de fois que le chironome change de patch algal entre chaque observation. Pour calculer la distance parcourue par le chironome, nous avons estimé que la distance entre 2 patches équivalait à 1 sixième de périmètre de la boîte de pétri de rayon  $R$  (Figure 16). Par exemple, au temps  $t_1$ , le chironome se trouvait sur l'algue 1, puis quelques minutes plus tard, ce dernier a changé de place pour se positionner sur l'algue 2 au temps  $t_2$ , parcourant la distance  $p$ .

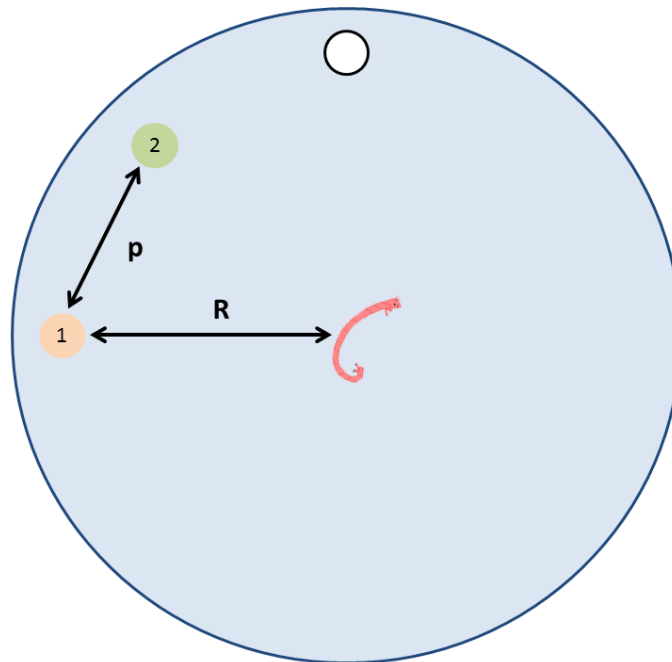


Figure 16: Schéma des calculs de distance parcourue par les chironomes pendant les expérimentation de choix de nourriture en boîte de pétri. Le rayon  $R$  sépare le chironome au centre des patch des algues aux bords de la boîte de pétri et le sixième du périmètre  $p$  est la distance entre chaque patch algal (algue 1 patch orange et algue 2 patch vert).



$$D(t_0 - t_1) = R$$

$$D(t_1 - t_2) = \frac{1}{3} * \pi * R$$

$$Dt = D(t_0 - t_1) + D(t_1 - t_2)$$

*Avec :*

*D(t0-t1) : La distance parcourue entre le temps initial (t0) et le premier temps d'observation (t1),*

*D(t1-t2) : La distance parcourue entre le temps initial (t1) et le premier temps d'observation (t2),*

*R : Le rayon de la boîte de pétri,*

*Dt : la distance totale parcourue entre t0 et t2.*

#### II.4.4 La base de données sur les traits morphofonctionnels de la micro-méiofaune

Dans le but d'étudier l'évolution fonctionnelle de la microméiofaune du biofilm soumise à de multiples pressions naturelles et anthropiques, nous avons créé une base de données regroupant leurs traits morphofonctionnels. Elle a été écrite en anglais pour permettre une plus ample diffusion et compte 49 espèces et 36 traits morphofonctionnels. Les espèces ont été prioritairement choisies en fonction de leur abondance relative dans nos échantillons à chaque saison. Les traits morphofonctionnels sont inspirés de la base de données de Usseglio Polatera et al. (2000) sur les traits morphofonctionnels des macroinvertébrés d'eau douce. Ils sont composés de traits écologiques comme la distribution générale, les microhabitats, les saisons et les préférences physico-chimiques (courant, statut trophique, type d'eau, salinité, température, saprobité, pH) et de traits biologiques comme le cycle de vie (stade aquatique, taux de croissance, stratégie de survie), la morphologie générale (longueur, largeur, forme du corps), les traits d'histoire de vie (la relation au substrat, le style de vie), la physiologie générale (organe respiratoire) ; et les traits d'aspect comportementale de nutrition (nourriture, régime alimentaire, type trophique, mode d'alimentation, taille de proie assimilable, taille de la bouche, position de la bouche, organe et mode de capture), de relation (aux microalgues), de locomotion (organe de locomotion, vitesse de déplacement) et de reproduction (mode de reproduction).

Cette base de données se présente sous un format excel et est composé de trois onglets. Le premier onglet concerne les informations relatives aux créateurs de cette base et le journal dans lequel elle sera publiée en matériel supplémentaire. Le second onglet présente la base de traits. Le vocabulaire a été simplifié car cette base regroupe des organismes unicellulaires et pluricellulaires. Chaque information est reliée à une référence numérotée. Ces références sont organisées dans le troisième onglet du fichier excel. Il peut s'agir de littérature existante (publications, site internet)

ou d'observations faites sur nos propres échantillons pendant la phase d'identification des organismes. Cette base de données a servi à construire la matrice Q, une table regroupant les traits morphofonctionnels liés à l'activité trophique (cf section IV.2). Pour la construction de cette table, seize traits ont été sélectionnés avant analyse : les traits pour lesquels les informations étaient manquantes, et ceux pour lesquels il n'y avait pas de variation entre les taxons choisis ou non informatifs, ont été écartés. La qualité « non-informative » a été déterminée en réalisant un test d'indépendance (test du Chi carré) entre la variable espèce et chaque variable caractérisant un trait fonctionnel. De cette manière, le trait « microhabitat » s'est révélé non discriminant pour les différentes espèces ( $P = 0,94$ ) et a donc été écarté.

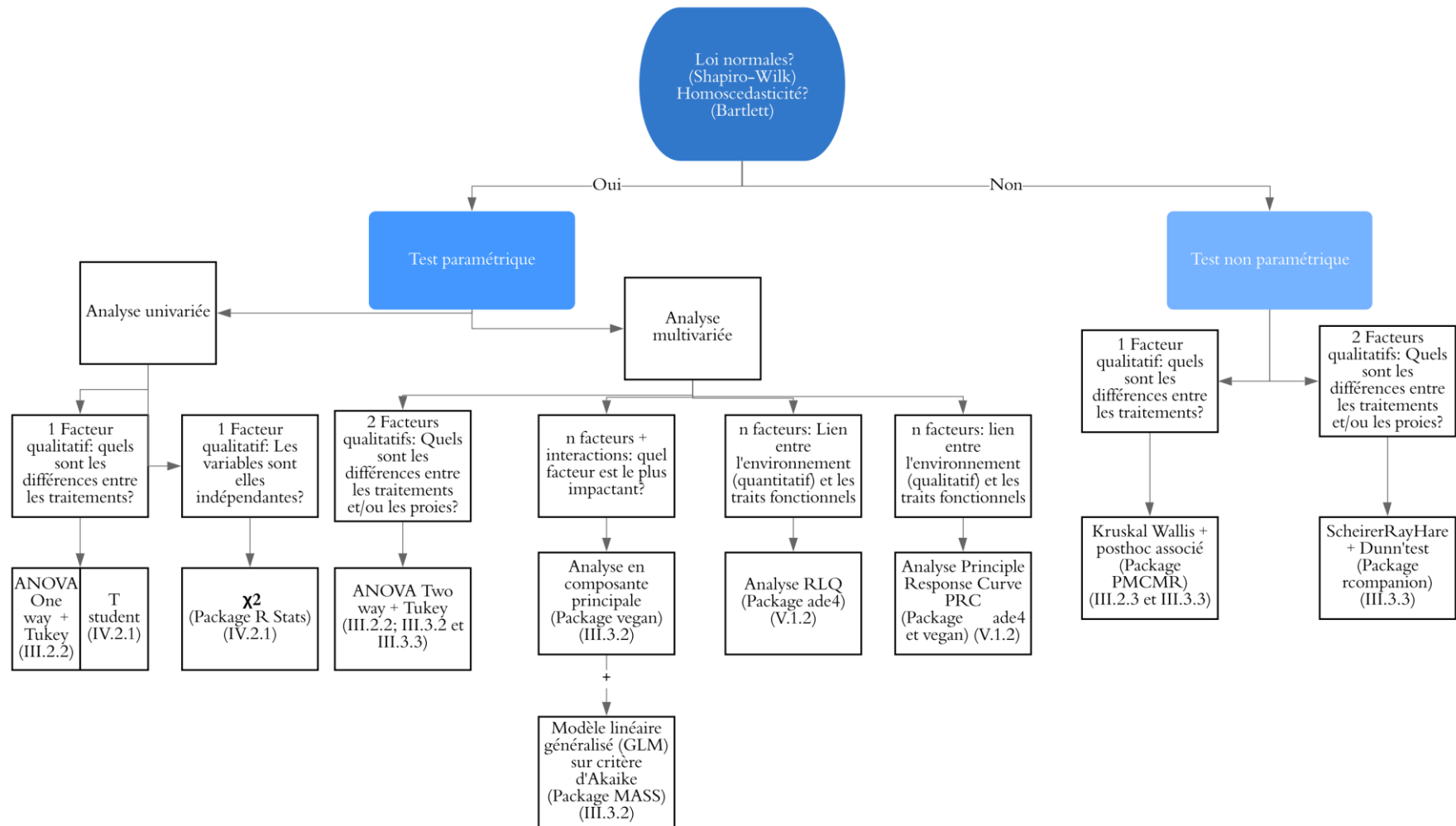


Figure 17: Logigramme récapitulatif des différents tests appliqués aux données de ce projet de thèse en fonction des questionnement

## II.5 Traitement des données

Toutes les données ont été soumises aux test de Bartlett et de Shapiro Wilk. La figure 17 présente la démarche de sélection des tests utilisés pour traiter les données. Les parties suivantes ne présentent que les analyses multivariées.

### II.5.1 Le modèle linéaire généralisé sur critère d'Akaike

Le modèle linéaire généralisé (GLM) est une régression linéaire ordinaire principalement utilisée pour sa capacité à prendre en compte des interactions entre les facteurs explicatifs. Les modèles linéaires ont été réalisés à partir du package « MASS » sur R. Ils ont permis de mettre en évidence les facteurs qui expliquaient le plus la variance des variables explicatives dans des situations où les conditions expérimentales faisaient jouer un à plusieurs facteurs en interaction (cf section III.3.2.2). Le meilleur modèle linéaire a été sélectionné d'après sa valeur d'AIC (Critère d'Information d'Akaike), qui permet de mesurer la qualité statistique d'un modèle et de l'ajuster de manière à avoir le moins de perte d'information possible.

### II.5.2 La courbe principale de réponse

La courbe principale de réponse (PRC : Principal Response Curve) est une méthode d'analyse multivariée qui permet d'observer les réponses d'une communauté à un stress en fonction du temps. Elle est basée sur une analyse de redondance à plusieurs temps (Van den Brink & Braak 1999). Des PRC ont été conduite avec les package « ade4 » et « vegan » sur R, sur les données de la section V.2.2, pour observer les effets de chaque traitement pesticide en fonction du temps d'exposition pour chaque saison ; les effets de chaque traitement pesticide après 14 jours d'exposition en fonction des saisons. Usuellement, les données utilisées dans cette analyse sont des données de comptage. Dans notre cas, nous avons récupéré les scores des CWM (Community Weighted Mean ; section IV.2) repropotionnés des traits morphofonctionnels de la microméiofaune pour obtenir une courbe de réponse principale basée sur la redondance des traits en fonction du traitement et du temps d'exposition (ou saison).

### II.5.3 L'analyse RLQ

Une analyse sous contrainte à trois tableaux de type RLQ a été réalisée pour mettre en relation l'environnement et les traits morphofonctionnels de la micro-méiofaune (Figure 18). Les matrices L et Q ont été obtenues à partir des données d'abondance (cf section II.4.2.5) et de la base de données des traits morphofonctionnels de la microméiofaune (cf section II.4.4), respectivement. La matrice R répertorie les données des variables environnementales. Pour ce faire, des analyses en composantes principales (ACP) étaient réalisées sur les deux matrices explicatives (R et Q) en pondérant les lignes par le score obtenu pour ces mêmes lignes par l'analyse factorielle des correspondances (AFC) de la matrice L. Pour la matrice L, la moyenne de l'abondance de chaque espèce a été faite à partir des répliques afin de faire correspondre strictement les relevés entre les matrices R et L. Cette analyse a été menée à l'aide du package « ade4 » (Chessel *et al.*, 2004; Dray & Dufour 2007; Dray *et al.*, 2007).

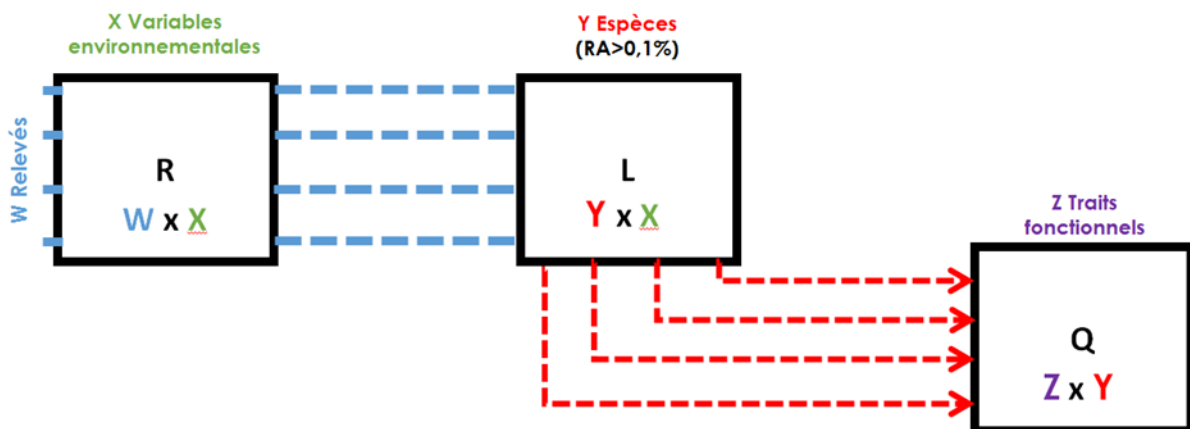


Figure 18: Schéma récapitulatif de l'analyse RLQ afin de déterminer le lien entre l'environnement et les traits fonctionnels de la communauté microméiofaunique.

**Chapitre 3 : Influence des pesticides sur les organismes de la micro-méiofaune et les relations trophiques en conditions simplifiées**

## Chapitre III Influence des pesticides sur les organismes de la microméiofaune et les relations trophiques en conditions simplifiées

### III.1 Introduction générale

En 2013, près de 30% des cours d'eau français où étaient effectués les suivis de qualité chimique présentaient des concentrations moyennes annuelles en pesticides totaux supérieures à  $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Soes 2015), qui est la concentration au-delà de laquelle les eaux sont considérées comme impropres à la consommation humaine (Décret n°2001-1220 2001). La pollution toxique (à plus forte raison en conditions de multistress) induit des effets directement mesurables, mais également indirects liés à des déséquilibres dans les interactions biologiques (au sein de la communauté microbienne, et/ou entre niveaux trophiques). La complémentarité des organismes étudiés permettrait de répondre à des enjeux forts liés à l'évaluation appropriée du risque écotoxique et à la préservation de la biodiversité aquatique. La complémentarité des échelles (individu, population, communauté) est importante pour faire le lien entre l'impact des contaminants et les multiples autres stress d'un système aquatique (Nilsen et al. 2019). En effet, de nombreux facteurs biotiques et abiotiques influencent les populations d'un écosystème et génèrent des réponses variables en fonction des combinaisons de ces facteurs. Les tests écotoxicologiques en conditions contrôlées permettent de discriminer les impacts de ces différents facteurs et d'analyser leur effet combiné. Les impacts des facteurs abiotiques sont analysés d'abord sur des populations monospèces. Puis, l'influence des facteurs biotiques est mise en évidence par l'étude des relations biotiques sur une communauté simplifiée.

Dans ce chapitre, des expériences en microcosmes ont été réalisées afin d'observer de potentielles relations biotiques entretenues au niveau du biofilm et les effets des pesticides séparément et conjointement sur ces relations. Pour ce faire, nous avons sélectionné deux prédateurs potentiels que l'on retrouve abondamment et qui co-occurrent dans les communautés benthiques d'eau douce : les nématodes et les larves de chironomes (Traunspurger 2000; Caramujo et al. 2008; Majdi et al. 2017). Les effets du diuron et de l'imidaclopride sur la communauté des nématodes étant très peu connus, nous avons réalisé des tests écotoxicologiques, basés sur un critère de mortalité, sur plusieurs espèces de nématodes des sols et des sédiments aquatiques. Ensuite, nous avons testé les effets combinés de facteurs biotiques et abiotiques : 1) sur les dynamiques de croissance des algues en utilisant un organisme modèle de brouteur très peu sensible aux substances utilisées, le nématode *Aphelenchoides bicaudatus* ; 2) sur le comportement alimentaire d'organismes plus sensibles à la contamination, les larves de

chironomes de la tribu des Tanytarsinae. Les algues utilisées comme source de nourriture ont été choisies en raison de leur fréquente présence dans les communautés benthiques et des connaissances que nous avons déjà à Irstea au sujet de leur sensibilité au diuron et à l'imidaclopride.

## III.2 Impact d'un herbicide et d'un insecticide sur la mortalité de plusieurs espèces de nématodes

### III.2.1 Introduction

Les nématodes « libres » représentent les taxons les plus divers et les plus abondants dans les sols et les sédiments aquatiques (Traunspurger 1996; Traunspurger 2000; Duffy et al. 2007). Ils sont ubiquistes et occupent une place d'intérêt à la base de la chaîne trophique (Majdi et al. 2011a). Ces organismes ont été vastement étudiés dans les milieux marins et d'eaux douces (Traunspurger 1996; Traunspurger 1997; Moens et al. 2006) et sont très utilisés en écotoxicologie (NEMASPEAR, (Höss et al. 2017)). *Caenorhabditis elegans* est un organisme modèle réputé dans la détermination du risque en écotoxicologie (Traunspurger et al. 1997; Hägerbäumer et al. 2018). De précédents tests basés sur l'inhibition de sa reproduction ont démontré une faible toxicité de l'imidaclopride (EC50= 519 ±113 mg.L-1 ; Gomez-Eyles et al. 2009) et du diuron (EC50= 100 mg.L-1; Martin et al. 2009). Cependant, des changements d'abondance dans les communautés méiofauniques exposées à l'imidaclopride (Hayasaka et al. 2012) et une érosion de diversité au sein de communautés de nématodes exposées au diuron (Gallucci et al. 2015) ont été observés, suggérant une sensibilité « espèce-spécifique » de la part des nématodes.

Ainsi, le but de cette étude était de comparer la sensibilité de plusieurs espèces de nématodes « libres » et de l'organisme modèle *Caenorhabditis elegans* au diuron et à l'imidaclopride, basée sur un critère de mortalité sur 48h. Huit espèces de nématodes des sols et des rivières ont donc été exposées à différentes concentrations de ces pesticides. Le mode d'action de ces pesticides ne ciblant pas les nématodes, une faible toxicité de ces composés sur les nématodes était attendue ; pour cette raison des doses élevées de pesticides ont été utilisées.



### III.2.2 Expériences préliminaires

Toutes les pré-expériences nécessaires à la mise en place de l'expérience principale ont été réalisées avec le nématode modèle *C. elegans*. Ces expériences préalables ont été menées pour déterminer une gamme pertinente de concentrations efficaces de pesticides. Premièrement, un essai biologique standard a été réalisé avec *C. elegans*, selon le schéma décrit dans Traunspurger et al. (1997), approuvé pour la norme ISO 10872 (2010). En résumé, cinq juvéniles de *C. elegans* (L1) d'âge synchronisé ont été conservés dans 1 mL de milieu K (cf section II.2.1.4) avec  $10^9$  cellules.mL<sup>-1</sup> de bactéries (*E. coli* OP50) comme source de nourriture. Ils ont été exposés pendant 96 h au milieu K comme témoin, au milieu K avec 0,5% d'acétonitrile comme témoin solvant, à 12 concentrations d'imidaclopride nominales allant de 5,0 µg.L<sup>-1</sup> à 119,2 mg.L<sup>-1</sup> et à 15 concentrations nominales de diuron comprises entre 2,0 µg.L<sup>-1</sup> et 32,8 mg.L<sup>-1</sup> selon une gamme semi-exponentielle. Huit réplicats par condition ont été réalisés. La croissance a été estimée en mesurant la taille des organismes au début et à la fin de l'expérience. La reproduction a été déterminée en comptant les juvéniles à la fin de l'expérience. Aucune toxicité significative n'a été constatée, même aux concentrations les plus élevées. Pour l'imidaclopride, l'inhibition de la croissance et de la reproduction à la concentration la plus élevée (119,2 mg.L<sup>-1</sup>) était de  $8,0 \pm 2,3\%$  et  $31,3 \pm 20,2\%$ , respectivement. Pour le diuron, l'inhibition de la croissance et de la reproduction à la concentration la plus élevée (32,8 mg.L<sup>-1</sup>) était de  $11,9 \pm 0,8$  et  $44,1 \pm 2,4\%$ , respectivement. Lors du test suivant de sélection d'un milieu commun pour la réalisation des tests multi-espèces, nous avons donc décidé de nous concentrer sur les deux concentrations de pesticides les plus élevées testées (47,7 et 119,2 mg.L<sup>-1</sup> pour l'imidaclopride et 16,4 et 32,8 mg.L<sup>-1</sup> pour le diuron).

Les expériences multi-espèces ne pouvaient pas être menées dans le milieu K, car la richesse en sels aurait pu créer un biais pour les espèces habituellement maintenues en culture dans un milieu peu minéralisé. Par conséquent, des tests ont été menés avec *C. elegans* exposé aux concentrations les plus élevées d'imidaclopride (47,7 et 119,2 mg.L<sup>-1</sup>) et de diuron (16,4 et 32,8 mg.L<sup>-1</sup>) à la fois dans le milieu K et de la Volvic® (eau commerciale faiblement minéralisée), pour valider l'utilisation de ce milieu pour les tests. Pour cette seconde pré-expérience, six réplicats ont été établis par condition: témoin Volvic, témoin solvant Volvic, Volvic-imidaclopride (47,7 et 119,2 mg.L<sup>-1</sup>) et Volvic-diuron (16,4 et 32,8 mg.L<sup>-1</sup>); témoin milieu K, témoin solvant milieu K, milieu K-imidaclopride (47,7 et 119,2 mg.L<sup>-1</sup>) et milieu K-diuron (16,4 et 32,8 mg.L<sup>-1</sup>). Avec Volvic (Tableau 5), la reproduction était significativement inhibée à la plus forte concentration de diuron ( $82,3 \pm 3,3\%$  d'inhibition par rapport au témoin solvant,  $p < 0,05$ ), alors qu'elle n'en inhibait que  $11,1 \pm 13,3\%$  dans le milieu K. A l'inverse, la croissance était inhibée avec les concentrations les plus élevées d'imidaclopride et de diuron significativement dans le

milieu K ( $10,6 \pm 1,2\%$  et  $12,4 \pm 2,5\%$  respectivement) et non significativement dans la Volvic ( $9,3 \pm 4,2\%$  et  $14,0 \pm 2,3\%$  respectivement). Ces résultats suggèrent une possible interaction entre le milieu K et les pesticides, réduisant leur toxicité vis-à-vis des nématodes. Ces expériences préliminaires ont permis d'appréhender le comportement des pesticides dans les deux différents milieux testés et de déterminer les concentrations qui seront utilisés pour l'expérience multi-espèce (cf section III.2.3). Nous avons donc conduit notre expérience multi-espèces sur la mortalité, à des concentrations encore plus fortes que celles testées durant ces expériences préliminaires, dans de la Volvic. Notre choix s'est arrêté sur le critère de mortalité car les huit espèces de nématodes testées présentent des durées de croissance et des stades de développement très divers.

Tableau 5: Moyenne de la croissance ( $\mu\text{m}$ ) et de la reproduction (juvénile.adulte<sup>-1</sup>) de *C. elegans* en fonction du milieu de culture et des traitements pesticides (imidaclopride ou diuron) et inhibition de ces deux critères (%) calculé à partir des données du témoin solvant (n= 6). \* significativement différent du témoin solvant (p<0.05).

Milieu	Traitement	Croissance moyenne ( $\mu\text{m}$ )	Inhibition de croissance (%)	Reproduction moyenne (juv.adulte <sup>-1</sup> )	Inhibition de reproduction (%)
K-medium	Témoin	1161,3±24,3	/	34,5±28,0	/
	Témoin solvant	1072,3±20,7	0±1,9	35,0±10,1	0±28,8
	Imidaclopride (47,7 mg.L <sup>-1</sup> )	989,4±30,3	7,7±2	30,1±5,4	14±10,9
	Imidaclopride (119,2 mg.L <sup>-1</sup> )	958,6±17*	10,6±1,2*	34,1±6,2	2,6±12,5
	Diuron (16,4 mg.L <sup>-1</sup> )	999,8±9,2	6,8±0,6	41,6±8,4	-18,9±17
	Diuron (32,8 mg.L <sup>-1</sup> )	939,3±37,8*	12,4±2,5*	31,1±6,6	11,1±13,3
Volvic	Témoin	1107,2±19,1	/	50,6±19,1	/
	Témoin solvant	949,8±54,7	0±5,8	30,0±8,4	0±28
	Imidaclopride (47,7 mg.L <sup>-1</sup> )	988,0±23,5	-4±1,8	22,7±1,7	24,3±4
	Imidaclopride (119,2 mg.L <sup>-1</sup> )	861,0±56,7	9,3±4,2	18,3±7,3	39±17,2
	Diuron (16,4 mg.L <sup>-1</sup> )	914,6±59,3	3,7±4,4	14,6±3,9	51,3±9,2
	Diuron (32,8 mg.L <sup>-1</sup> )	816,6±30,6	14±2,3	5,3±1,4*	82,5±3,3*

### III.2.3 Variabilité inter-spécifique de la tolérance des nématodes libres à l'imidaclopride et au diuron

Article soumis à *Invertebrate Biology*, sous la référence : 'Neury-Ormanni, J., Doose, C., Majdi, N., Vedrenne, J., Morin, S., Höss, S., Traunspurger W. (submitted). Tolerance of free-living nematode species to imidacloprid and diuron'. Accepted le 13/09/2019.

## Tolerance of free-living nematode species to imidacloprid and diuron

Julie Neury-Ormanni<sup>1</sup>, Caroline Doose<sup>2</sup>, Nabil Majdi<sup>3</sup>, Jacky Vedrenne<sup>1</sup>, Soizic Morin<sup>1</sup>, Sebastian Höss<sup>4</sup>, Walter Traunspurger<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Irstea, UR EABX. 50 avenue de Verdun, 33612 Cestas cedex, France

<sup>2</sup> INRS, centre ETE. 490 rue de la Couronne, G1K 9A9 Québec, Canada

<sup>3</sup> Bielefeld University, Animal Ecology, Konsequenz 45, 33615 Bielefeld, Germany

<sup>4</sup> ecossa, Giselastr. 6, 82319 Starnberg, Germany

### Abstract

The neonicotinoid imidacloprid and the herbicide diuron are long-lived pesticides commonly detected in European rivers. Both have lethal as well as sublethal effects on aquatic invertebrates dwelling in streambeds. Here, we performed lethality tests using imidacloprid and diuron using seven species of widespread free-living nematodes and the model organism *Caenorhabditis elegans*. Our results indicated that nematodes were relatively tolerant to both pesticides, and only two species (*Diploscapter coronatus* and *Plectus opisthocirculus*) showed mortality at high nominal concentrations of imidacloprid (119 mg.L<sup>-1</sup>) and diuron (33 mg.L<sup>-1</sup>). The changes observed in nematode community structure after imidacloprid and diuron exposure may have been related to trade-offs between sensitivity to toxicants and changes in competitive abilities of the species. While the former can be tested using single-species tests, we recommend that the latter be tested in further experiments using multi-species communities. Our results suggest that the presence of these pesticides could favor nematodes over other meiofaunal groups found in freshwater sediments.

**Keywords:** invertebrates, pesticides, mortality, ecotoxicology

## Introduction

Imidacloprid and diuron are amongst the most frequently detected pesticides in European rivers at concentrations of micrograms per liter (Masiá et al. 2015; Münze et al. 2015; Soes 2015; Christoffels et al. 2016). Both are known to adversely affect many aquatic organisms such as meiofauna and microalgae (Pestana et al. 2009a; Pestana et al. 2009b; Ricart et al. 2009; Pisa et al. 2015). Since both chemicals are very persistent with DT50s (time to 50% degradation) in sediments of about 130 days for imidacloprid and >30 days for diuron (data from INERIS, <https://www.ineris.fr/fr>), thus causing a potential threat for sediment-dwelling organisms. It might be expected that resident animal populations with short generation times from a few days to months, such as nematodes, could face a higher risk of long-term chronic contamination from being exposed to these chemicals in their habitat.

The neonicotinoid insecticide imidacloprid (included in the European Watchlist, Van der Sluijs et al. 2015) was massively used by farmers and gardeners in the European Union until 2018 (245.2 tons of imidacloprid were sold in France in 2017; data from the National database of pesticides sold (BNV-D)), owing to its effectiveness in controlling insect pests. The active molecule acts on nicotinic acetylcholine receptors, creating continuous excitation of synapses, driving to the paralysis and death of animals (Matsuda et al. 2001; Simon-Delso et al. 2015). Aquatic invertebrates are known to be threatened by neonicotinoids at scales ranging from individuals to communities (Bonmatin et al. 2015; Van der Sluijs et al. 2015). A review by Tomizawa & Casida (2005) highlighted that imidacloprid has a selective toxicity because of the different structures in nicotinic receptors between insects and mammals; this has been questioned by recent studies which proved its risk for non-target species as well (Pisa et al. 2015). For the standard toxicity test organism *Daphnia magna*, a LC50 (lethal concentration 50%) of 17 mg.L<sup>-1</sup> was reported for imidacloprid (Song et al. 1997). However, some invertebrate groups (like nematodes) might have divergent capacities to deal with imidacloprid owing to structural differences in their nicotinic receptors (Tornøe et al. 1995).

The phenylurea herbicide diuron (priority substance in the European Water Framework Directive, directive 2000/06/EC) is allowed in Europe but considered a dangerous substance. It has been prohibited in agricultural use since 2008 in France, but it is still used by individuals or companies to get rid of mosses growing on roofs or as an antifouling ship coating. Around 14.6 tons of diuron were sold between 2015 and 2017 in France for agricultural use, despite the prohibition (data from the National database of pesticides sold (BNV-D)). Diuron inhibits the electron transfer between photosystems I and II within the photosynthetic apparatus leading to plant cell death (Giacomazzi & Cochet 2004). Despite being an herbicide, ecotoxicological

studies have already shown that diuron can threaten many non-target aquatic organisms such as *Daphnia longispina* at environmentally relevant concentrations (LC50 = 1 µg.L<sup>-1</sup>; Pisa et al., 2015).

Free-living nematodes are extremely diverse and presumably the most abundant multicellular animals dwelling in soils and aquatic sediments (Traunspurger 1996; 2000; Duffy et al. 2007). In ecotoxicology, the nematode species *Caenorhabditis elegans* is a relevant model organism to predict the hazards of chemical substances towards other nematode species (Hägerbäumer et al. 2015), including the dangers of pesticides (Meyer & Williams 2014). *Caenorhabditis elegans* toxicity testing, based on the inhibition of reproduction on agar medium, showed a low toxicity of imidacloprid (EC50 of 519±113 mg.L<sup>-1</sup>; Gomez-Eyles et al. 2009) and of diuron (EC50 of 100 mg.L<sup>-1</sup>; Martin et al. 2009) compared to freshwater macrofauna such as oligochaete, insect larvae or daphnids (Pisa et al. 2015) and microalgae (Ricart et al. 2009).

However, in studies considering meiofaunal communities, the abundances of water surface-dwelling species changed in mesocosms contaminated with imidacloprid (Hayasaka et al. 2012). Similarly, Gallucci et al. (2015) demonstrated significant impacts of diuron on nematode communities in terms of alteration of density, species richness and diversity.

The aim of this study was to compare the toxic effects of imidacloprid and diuron on several species of free-living nematodes, as representatives of ubiquitous belowground animals at the base of food webs. We performed a multispecies short-term toxicity test using seven common aquatic and terrestrial free-living nematode species and their representative model *C. elegans* (Traunspurger et al. 1997; Hägerbäumer et al. 2018). Nematodes were exposed to a wide range of concentrations of imidacloprid and diuron. Given that the mode of action of both pesticides is not targeted towards nematodes, we expected that imidacloprid would have low toxicity on them, mainly because their nicotinic receptors differ from those of insects (Tornøe et al. 1995). For diuron, we also anticipated low lethality of diuron on nematodes because the predicted EC50s for *C.elegans* are relatively high in comparison to other aquatic organisms (Pisa et al. 2015).

## Methods

### Growing conditions of nematodes

We selected seven species of free-living bacterivorous nematodes based on their broad occurrence in aquatic and terrestrial biotopes, as well as the model organism.

*Caenorhabditis elegans* (Maupas, 1900) N2 strain was obtained from the Caenorhabditis Genetics Center (University of Minnesota, Minneapolis, MN, USA) and maintained as stocks of dauer larvae (an alternative juvenile stage that occurs in response to a lack of food). Dauer larvae

were inoculated one month before the start of the experiment on nematode growth medium agar (Brenner 1974) seeded with *Escherichia coli* (OP50), according to standard procedures (Lewis & Fleming 1995).

*Plectus acuminatus* (Bastian, 1865), *P. opisthocirculus* (Andrássy, 1952) and *P. velox* (Bastian, 1865) were isolated from natural field populations collected in lake Constance, Germany, and were maintained in freshwater agar (1.7 % agar prepared in filtered water from an artificial pond in Bielefeld, Germany). *Escherichia coli* OP50 (except for *P. velox*) and the bacterial microbiome they carried along during inoculation served as food.

*Aphelenchoides cf. parietinus* (Fischer, 1894) individuals were isolated from natural field sites collected in lake Constance, Germany, and maintained in malt-agar (1.7% agar prepared in Volvic water amended with 0.5 g.L<sup>-1</sup> yeast extract as food).

*Diploscapter coronatus* (Cobb, 1893) was isolated from municipal wastewater treatment plant of Ingolstadt, Germany, and maintained in nutrient-agar (1.5% agar, amended with 0.5 g.L<sup>-1</sup> peptone from caseine, 0.3 g.L<sup>-1</sup> yeast extract, 0.1 g.L<sup>-1</sup> NaCl and 1 mg.L<sup>-1</sup> cholesterol). *E. coli* OP50 served as food.

*Pristionchus pacificus* (Sommer, 1996) PS312 strain from the Max Planck Institute (Tübingen, Germany) and *Rhomborhabditis regina* (Goodey, 1926) were isolated from the body cavity of beetle larvae (laboratory of Tübingen, Germany) and maintained in NGM-agar, like *C. elegans*.

All species have been maintained in Bielefeld laboratory for at least 10 years at 20 °C in the dark.

## Chemicals

Stock solutions of imidacloprid (n°CAS: 138261-41-3, purity: 99.5%, Ehrenstorfer GmbH) and diuron (n°CAS: 330-54-1, purity: 99%, Ehrenstorfer GmbH) were prepared in acetonitrile (n°CAS: 75-05-8, purity: 99.97%, Biosolve) at final concentrations of 70 g.L<sup>-1</sup> and 20 g.L<sup>-1</sup>, respectively. Exposure solutions were then obtained after dilutions of stock solutions in ultrapure water (final acetonitrile concentration ≤ 0.5%).

### Multispecies mortality bioassay

Individuals of 8 different nematode species were exposed for 48 h (Hägerbäumer et al. 2018) to two concentrations of imidacloprid (35 mg.L<sup>-1</sup> (I1) and 350 mg.L<sup>-1</sup> (I2)) and of diuron (10 mg.L<sup>-1</sup> (D1) and 100 mg.L<sup>-1</sup> (D2)), which is below their solubility limits. Ten individuals of different growth stages were randomly isolated and incubated in glass vessels in 1 mL Volvic with the respective imidacloprid and diuron concentrations, solubilized in acetonitrile in such a way as not to exceed 0.5% of the final volume. A solvent control treatment conducted with 0.5% of acetonitrile was added to the Control treatment (Volvic water only). Five replicates were considered for each. No food was added during the experiment. After inoculation, vessels were stored in the dark for 48h at 20°C. Then, the content of each vessel was poured into small counting chambers; living nematodes were carefully counted, separating juveniles and adults under a dissecting microscope at 50 fold magnification. Dead individuals were scored when no response was observed to a stimulus applied with a thin needle.

### Data analysis

Mortality percentages were calculated for each species under the different treatments. As the data did not follow a normal distribution (Shapiro-Wilk test), we used the non-parametric Kruskal-Wallis test by ranks and its associated post hoc test to check if the age distribution was consistent across treatments and to identify significant differences in mortality between control and solvent controls and then between solvent control and the tested concentrations (D1, D2, I1 and I2). A p-value of 0.05 was considered significant. Statistical analyses were performed under R environment, using the package PMCMR (Pohlert 2014).

### Results

The age distribution in each replicate was consistent between treatments for each species (see Tableau 6). Mortality was similar in both controls (Volvic and solvent controls) for most species (e.g.  $df = 1$ ,  $\chi^2 = 8.0 \times 10^{-2}$ ,  $p = 0.9$ ). There were significant differences between control and solvent control for *Plectus opisthocirculus* (e.g.  $df = 1$ ,  $\chi^2 = 7.8$ ,  $p < 0.05$ ). Because solvent was used to solubilize chemicals in each treatment, we decided to use solvent control as a reference for effect comparison. In the solvent controls, mortality was <10% for most species; however high numbers of dead *Rbomborhabditis regina* (21.7%±4.3 SD) and *Plectus velox* (13.6±3.3%) were found at the end of the experiment. These two species did not meet the validity criteria in quality assurance requirements and standardized guidelines (OECD, 1992, 2004) requiring >90% survival in the controls.

After 48 hours of exposure, all nematode species were found to be tolerant to the lowest concentrations of imidacloprid and of diuron tested (Tableau 6), based on the mortality criterion. However, the lethality of the highest concentrations of imidacloprid and of diuron was significantly higher than control in two out of the eight nematode species tested: *Diploscapter coronatus* (lethality of  $47.6 \pm 11.3$  % under D2 – e.g.  $df = 2$ ,  $\chi^2 = 7.8$ ,  $p < 0.05$  - and  $27.1 \pm 5.6$  % – e.g.  $df = 2$ ,  $\chi^2 = 6.6$ ,  $p < 0.05$ -. under I2); and *Plectus opisthocirculus* (lethality of  $28 \pm 10.8$  % under D2 – e.g.  $df = 2$ ,  $\chi^2 = 8.5$ ,  $p < 0.05$ -. and  $51.1 \pm 7.5$  % under I2– e.g.  $df = 2$ ,  $\chi^2 = 11.1$ ,  $p < 0.05$ -.).



Tableau 6: Pesticide effective concentrations, nematode mortality and adults proportions in percentage (values are mean percentage,  $\pm$ SE, N = 50) after 48h-exposure to the different treatments: Volvic control, solvent control (Volvic water + 0.5% acetonitrile), diuron (D1 and D2); imidacloprid (I1 and I2). \* highlight significant differences in mortality, compared to the solvent control (p-value < 0.05%).

Treatment Pesticide exposure (mg.L <sup>-1</sup> )	Volvic control		Solvent control		D1		D2		I1		I2	
	/		/		10		100		35		350	
Nematode species	% mortality	adults proportion (%)	% mortality	adults proportion (%)	% mortality	adults proportion (%)	% mortality	adults proportion (%)	% mortality	adults proportion (%)	% mortality	adults proportion (%)
<i>Caenorhabditis elegans</i> (terrestrial)	2.2 $\pm$ 2.5	75.2 $\pm$ 7.7	7.3 $\pm$ 5.2	66.2 $\pm$ 8.2	1.8 $\pm$ 2.0	60.9 $\pm$ 10.4	0.0 $\pm$ 0.0	74.1 $\pm$ 7.5	2.2 $\pm$ 2.5	51.8 $\pm$ 11.3	0.0 $\pm$ 0.0	70.9 $\pm$ 6.7
<i>Diploscapter coronatus</i> (terrestrial and aquatic)	6.1 $\pm$ 4.3	66.4 $\pm$ 9.8	4.9 $\pm$ 3.4	42.4 $\pm$ 10.3	15.3 $\pm$ 7.9	56.6 $\pm$ 15.1	<b>47.6<math>\pm</math>11.3*</b>	58.2 $\pm$ 8.0	25.2 $\pm$ 11.8	50.6 $\pm$ 9.9	<b>27.1<math>\pm</math>5.6*</b>	40.8 $\pm$ 8.3
<i>Pristionchus pacificus</i> (terrestrial)	5.7 $\pm$ 4.4	85.7 $\pm$ 4.8	0.0 $\pm$ 0.0	74.5 $\pm$ 4.4	13.5 $\pm$ 7.1	75.0 $\pm$ 14.0	13.5 $\pm$ 4.7	66.5 $\pm$ 3.3	7.5 $\pm$ 7.2	61.2 $\pm$ 11.4	9.1 $\pm$ 4.4	62.1 $\pm$ 13.0
<i>Rhomborhabditis regina</i> (terrestrial)	12.4 $\pm$ 5.7	77.6 $\pm$ 6.5	21.7 $\pm$ 4.3	83.2 $\pm$ 6.3	50.0 $\pm$ 15.9	74.0 $\pm$ 8.9	37.7 $\pm$ 13.1	65.8 $\pm$ 16.2	30.3 $\pm$ 12.2	85.7 $\pm$ 7.2	38.3 $\pm$ 5.8	77.1 $\pm$ 3.8
<i>Aphelenchoides cf. parietinus</i> (aquatic)	0.0 $\pm$ 0.0	91.3 $\pm$ 4.6	5.0 $\pm$ 3.4	92.8 $\pm$ 3.3	4.0 $\pm$ 2.7	76.2 $\pm$ 4.3	0.0 $\pm$ 0.0	74.6 $\pm$ 7.5	0.0 $\pm$ 0.0	83.6 $\pm$ 6.4	14.4 $\pm$ 10.3	72.8 $\pm$ 15.3
<i>Plectus acuminatus</i> (aquatic)	7.3 $\pm$ 5.1	0.0 $\pm$ 0.0	8.0 $\pm$ 8.9	0.0 $\pm$ 0.0	10.2 $\pm$ 3.2	2.2 $\pm$ 2.5	10.2 $\pm$ 5.8	0.0 $\pm$ 0.0	14.0 $\pm$ 6.3	6.9 $\pm$ 4.8	13.0 $\pm$ 3.9	0.0 $\pm$ 0.0
<i>Plectus opisthocirculus</i> (aquatic)	14.1 $\pm$ 2.7	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	13.4 $\pm$ 4.3	0.0 $\pm$ 0.0	<b>28.0<math>\pm</math>10.8*</b>	0.0 $\pm$ 0.0	20.6 $\pm$ 7.9	0.0 $\pm$ 0.0	<b>51.1<math>\pm</math>7.5*</b>	0.0 $\pm$ 0.0
<i>Plectus velox</i> (aquatic)	8.5 $\pm$ 7.2	9.2 $\pm$ 5.0	13.6 $\pm$ 3.3	17.6 $\pm$ 4.2	9.2 $\pm$ 4.7	9.3 $\pm$ 4.7	13.2 $\pm$ 6.7	25.6 $\pm$ 7.8	6.3 $\pm$ 4.6	9.7 $\pm$ 5.7	14.9 $\pm$ 8.0	13.2 $\pm$ 6.5

## Discussion

Here, we were able to demonstrate that imidacloprid and diuron only weakly altered the survival of nematodes throughout the experiment. Both substances are large hydrophilic molecules (logKow: 0.57 and 2.80 for imidacloprid and diuron, respectively; data from INERIS) that may only penetrate the nematode hydrophobic cuticle with difficulty (Fonseca & Fehlaue-Ale 2012). The uptake of these chemicals through ingestion would be unlikely considering the feeding behaviour (retaining particles, throwing water) of *C. elegans* a study showed the efficiency of using liposomes to ensure oral administration of hydrophilic substances (Shibamura et al. 2009). The insecticide imidacloprid has a selective action on insect nicotinic acetylcholine receptors (nAChR) (Tomizawa & Casida 2005). The structure and combination of nAChR determine affinity to neurotoxins such as imidacloprid and are different between nematodes and insects (Matsuda et al. 2009), presumably explaining why all nematode species in this study showed a tolerance to imidacloprid which was much greater than that of insects (Tornøe et al. 1995).

In general, nematodes in our study were exceptionally tolerant to diuron and imidacloprid (Table 1) compared to other organisms such as chironomids (insect larvae) or daphnids (crustaceans). Even at the highest diuron concentration (D2 = 100 mg.L<sup>-1</sup>; Tableau 6), almost all tested nematodes were not impacted, whereas *Daphnia pulex* and *Chironomus riparius* showed 96h-LC50 of 17.9 mg.L<sup>-1</sup> (Nebeker & Schuytema 1998) and 24h-LC50 of 10 mg.L<sup>-1</sup> (Knauf & Schulze 1972), respectively. The same pattern was observed for imidacloprid (I2=350 mg.L<sup>-1</sup>; Tableau 6). A study by Stoughton et al. (2008) demonstrated that the LC50 of target organisms such as *Chironomus tentans* was 5.75 µg.L<sup>-1</sup> for 96 h. For non-target organisms such as *Daphnia magna*, the LC50 was above that of chironomids (48h-LC50 = 17 mg.L<sup>-1</sup>; Song et al. 1997) but was still twenty times lower than the highest tested effective concentration in nematodes (Tableau 6), confirming the extreme resistance of nematodes and a predominantly insect-selective mode of action for imidacloprid (Tomizawa & Casida 2005).

Nevertheless, different tolerances were also found among the tested nematode species. Six out of the eight nematode species tested in this study appeared tolerant even to the highest concentrations of diuron and imidacloprid tested (Tableau 6), but two species, *Diploscapter coronatus* and *Plectus opisthocirculus*, showed significantly higher mortalities than the others. Potential rationales explaining different sensitivities across nematode species are suggested hereafter but should be tested more rigorously in further studies to assess their significance: (1) Toxic compounds can reach their cellular targets either by ingestion and absorption across the gut wall or by diffusion and transport across the cuticle (Kudelska et al. 2017). Less ornamented cuticles are more permeable (Fonseca & Fehlaue-Ale 2012). Therefore, more ornamented cuticles such

as those of *Caenorhabditis elegans* with many annuli at regular 1 $\mu$ m intervals (Cox et al. 1981) probably constitute a better barrier against micropollutants than those of *Diploscapter coronatus* and *Plectus sp.*, which are only faintly striated at longer intervals (Abebe & Coomans 1997; Abebe et al. 2006). (2) Nematode nAChR receptor structure may vary between species, suggesting diverse sensitivities to neurotoxins amongst nematode species. For example, in Törnøe et al. (1995), nicotine was more potent than acetylcholine at inducing contraction in *C. elegans* but it was a relatively weak agonist on *Ascaris suum* muscle.

In freshwater benthic communities, nematodes are often the most abundant invertebrates (Traunspurger 2000), co-occurring with a lot of other animal groups such as oligochaetes, crustaceans, rotifers and chironomid larvae (Duffy et al. 2007; Caramujo et al. 2008; Majdi et al. 2017). In this study, we showed that most nematode species were tolerant to concentrations of imidacloprid at least 60 times higher than 5.75  $\mu$ g.L<sup>-1</sup>, the chironomid 96h-LC50 value for imidacloprid. Thus, we might reasonably expect the effect of imidacloprid on a typical freshwater benthic community to be potentially positive on nematode dominance, since chironomids are notorious competitors and predators of nematodes (Ptatscheck et al. 2015). In this study, we compared sensitivities with mortality as the end-point criterion. But pesticides may impact other key biological processes such as somatic growth, production of viable offspring, respiration or motility (Kudelska et al. 2017), potentially leading to structural changes within the nematode community under long-term exposures. Höss et al. (2004) showed that abundances of different nematode species are diversely impacted under 4-Nonylphenol and could induce changes in nematode communities. In another study, species richness, diversity and density of nematodes were affected after an exposure time of 5 days to concentrations of diuron >5  $\mu$ g/kg of sediment (Gallucci et al. 2015). Changes in nematode community structure after imidacloprid and diuron exposure may be related to trade-offs between sensitivity to toxicants and changes in competitive abilities of the species. While the former can be tested using single-species tests, like in the present study, we recommend that the latter should be tested in further experiments using multi-species communities.

## **Acknowledgements**

We thank Stefanie Gehner for keeping nematode cultures for this experiment and Hendrik Fueser for his useful tips. We are grateful to the reviewers which gave helpful comments that improved the paper considerably and Emilie Saulinier-Talbot for English corrections. This study was carried out with financial support from the French National Research Agency (ANR) in the context of the Investments for the future Programme, within the Cluster of Excellence COTE (ANR-10-LABX-45).

### III.2.4 Conclusions

Des différences de sensibilité au diuron et à l'imidaclopride existent entre les nématodes. Deux espèces (*Diploscapter coronatus* et *Plectus opisthocirculus*) se sont révélées plus sensibles que les autres mais à des concentrations très élevées (350 mg.L<sup>-1</sup> pour l'imidaclopride et 100 mg.L<sup>-1</sup> pour le diuron), environnementalement non pertinentes. Selon ces résultats, les nématodes sont donc généralement tolérants à ces deux substances. Le critère de réponse étudié ici était la mortalité. Néanmoins, les pesticides peuvent avoir des impacts sur d'autres processus biologiques clés comme la croissance somatique, la production de progénitures viables, la respiration ou la motilité (Kudelska et al. 2017) mais aussi des processus écologiques comme la compétition (espace, ressource alimentaire) avec d'autres organismes potentiellement brouteurs, qui pourraient potentiellement engendrer des changements dans la communauté de nématodes, sous des expositions chroniques.

La plupart des tests écotoxicologiques sont menés sur des réponses intraspécifiques (croissance, reproduction, respiration, motilité). Mais dans la réalité les différentes populations qui partagent leur habitat et forment une communauté entretiennent des relations structurantes qui sont souvent négligées. Dans la partie suivante, nous allons donc étudier l'impact du diuron et de l'imidaclopride sur les relations entre producteurs primaires (microalgues) et consommateurs primaires (méiofaune) des biofilms d'eau douce.

## III.3 Impact d'un herbicide et d'un insecticide sur les interactions entre la microméiofaune potentiellement brouteuse et les microalgues d'eau douce

### III.3.1 Introduction

Dans cette partie, nous avons évalué l'impact d'une contamination pesticide sur des relations proie-prédateur, avec les deux types de contaminants modèles utilisés dans la partie précédente, à mode d'action herbicide (diuron) et insecticide (imidaclopride).

Pour la première étude, nous avons principalement analysé la réponse de différentes espèces de diatomées, présentant des morphotypes variés, à deux types de relations biotiques combinées au stress chimique : la compétition ou coexistence interalgale et la présence d'un potentiel brouteur tolérant sous pression insecticide ou herbicide. Pour la seconde étude, nous sommes centrés sur le comportement d'un brouteur sensible sous pression herbicide et/ou insecticide en termes de taux d'ingestion et de sélection.

## III.3.2 Réponses de différentes diatomées à la combinaison de stress biotique et chimique

### III.3.2.1 Introduction

La méiofaune est un compartiment très représenté dans les biofilms. Des corrélations positives entre les diatomées et de potentiels prédateurs ont été observées, avec des ratios de 20 : 1 (diatomées : brouteurs) en conditions de laboratoire (Neury-Ormanni et al. 2016). La méiofaune benthique et les microalgues présentent des dynamiques conjointes, c'est le cas de nématodes habitant les biofilms, dont la densité augmente avec la biomasse des microalgues (Majdi et al. 2011a). L'espèce de nématode herbivore *Chromadorida bioculata* présente un taux d'ingestion de 58 diatomées/individu/jour (Eßer 2006). Les relations d'herbivorie ont des effets structurants sur les communautés, par effet top-down les brouteurs exercent un contrôle sur les croissances des algues (Hillebrand & Kahlert 2001) et les relations de diversité-fonction (Hart 1985; Rakowski & Cardinale 2016). Les critères d'herbivorie peuvent aider à comprendre le fonctionnement trophique d'un écosystème et la cascade d'effets qu'une contamination chimique pourrait potentiellement engendrer. Le diuron et l'imidaclopride font partie des pesticides que l'on retrouve le plus dans les cours d'eau français (Soes 2015). Des études ont déjà révélées leur dangerosité sur de multiples microorganismes aquatiques cibles et non-cibles à des doses de l'ordre du microgramme par litre (Giacomazzi & Cochet 2004; Pisa et al. 2015; Van der Sluijs et al. 2015). Mais aucune de ces études n'a exploré la réponse des microalgues soumises à une combinaison de pressions abiotique (pollution toxique) et biotique (compétition/coexistence et prédation potentielle).

Afin d'investiguer sur les effets combinés de la compétition microalgale, la prédation et l'exposition à un stress chimique, nous avons conduit une expérience en conditions contrôlées de laboratoire sur des individus isolés de communautés benthiques : le nématode *Aphelenchoides bicaudatus* et les diatomées *Planorbidium lanceolatum* et *Gomphonema gracile* (deux morphotypes : normal et tératologique, de plus grande taille). Les espèces ont été sélectionnées en raison de leur occurrence dans les communautés benthiques d'eau douce. De plus, les nématodes du genre *Aphelenchoides* sp. présentent une faible sensibilité au diuron et à l'imidaclopride, comme démontré en section 3.2.

Dans un premier temps, nous avons déterminé les cinétiques de croissance des algues en culture monospécifique puis en mélange ternaire. Ensuite, nous avons déterminé l'effet de la présence du nématode sur leur croissance, seules et en mélange ternaire ; permettant aussi d'aborder la sélectivité du potentiel prédateur (voir également section III.3.3.2). Enfin, nous avons caractérisé l'impact de l'insecticide (imidaclopride) et de l'herbicide (diuron) sur les algues

en monoculture, en mélange ternaire et en présence de nématodes. Les cultures ont été échantillonnées quotidiennement pour quantifier l'abondance et la mortalité des algues en période de croissance exponentielle.

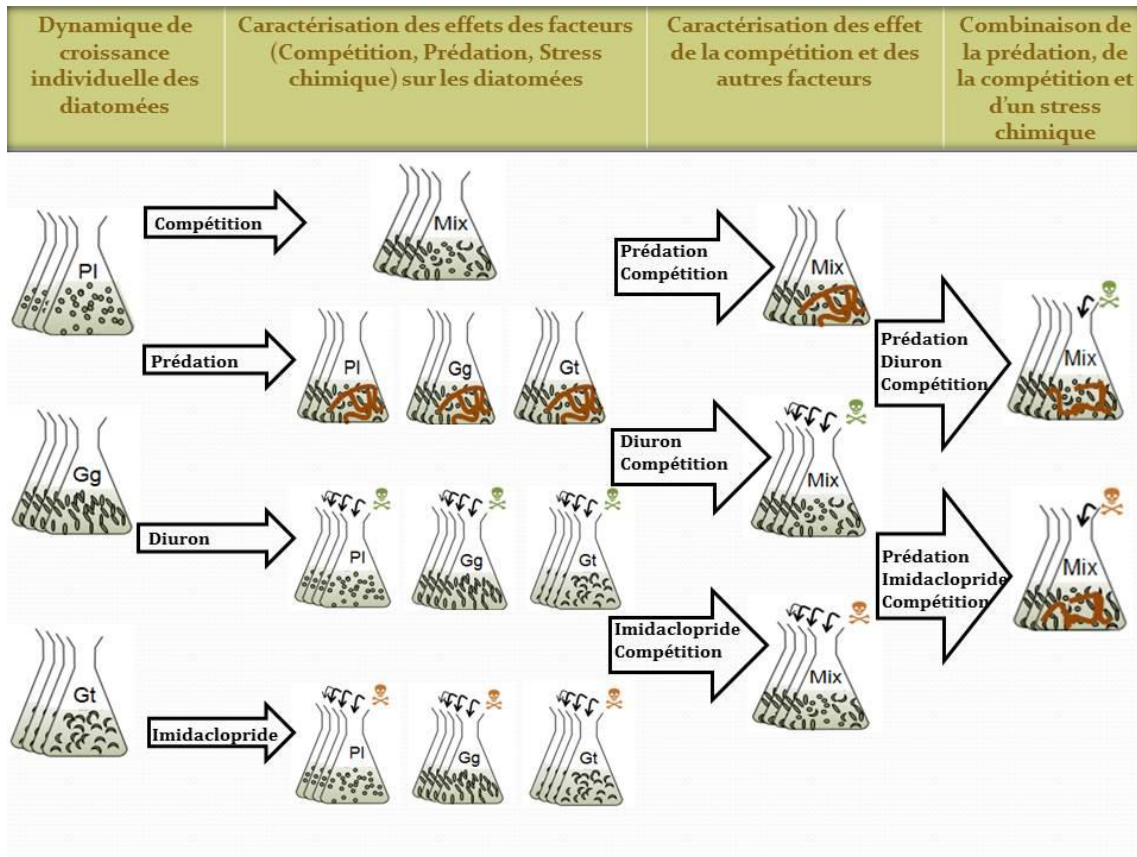


Figure 19: Schéma du plan expérimental mis en place pour étudier les effets combinés de la compétition microalgale, la prédation et l'exposition à un stress chimique

### III.3.2.2 Cinétiques de croissance de diatomées benthiques d'eau douce soumises à une pression combinée de compétition microalgale, de prédation et d'exposition à des pesticides

Article soumis à *Science of the total environment*, pour le numéro spécial « Multiple River Stressors » sous la référence : 'Neury-Ormanni, J., Vedrenne, J., Morin, S. (submitted). Benthic diatom growth kinetic under combined pressures of microalgal competition, predation and chemical stressors. Soumis le 10/01/2020.

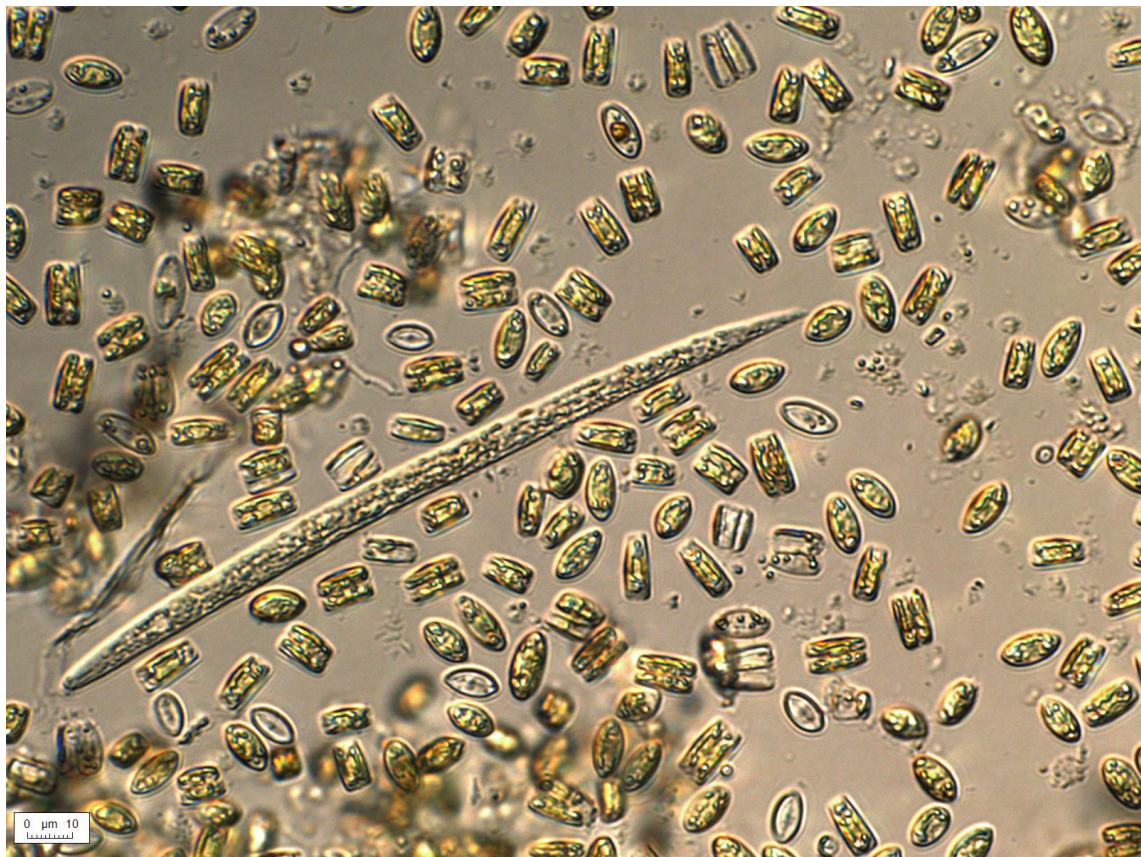


## Benthic diatom growth kinetics under combined pressures of microalgal competition, predation and chemical stressors

Julie Neury-Ormanni<sup>1</sup>, Jacky Vedrenne<sup>1</sup>, Soizic Morin<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Irstea, UR EABX, 50 avenue de Verdun, 33612 Cestas cedex, France

### Graphical abstract



*Aphelenchoides bicaudatus* and *Gomphonema gracile*, lugol fixation. X200 DIC (IX70) (Microphotography J. Vedrenne)

**Key words:** Nematode; diatom; biotic interactions; pesticides; multi stress



## Abstract

Pesticides are increasingly used worldwide to protect crops. However, only a small fraction of pesticides really hit their target organisms, with the remaining fraction reaching the environment by several phenomena such as leaching, and ending up in aquatic ecosystems: the final receptor of micropollutants. Chemical stressors induce changes in taxonomic composition (in density as well as in diversity) of fauna and flora which are now the focus of many biomonitoring studies. But, the combined effects of biotic relationships (competition, predation) and pesticides are rarely accounted for.

We tested four factors (Predation, Competition, Diuron (herbicide) and imidacloprid (insecticide) separately on three distinct morphotypes of two diatoms species: *Planorbulina lanceolatum* and *Gomphonema gracile* (normal and teratogen forms), to quantify the daily growth kinetics of each under varied pressures. The predator used was a nematode, cosmopolitan in soils and aquatic ecosystems (*Aphelenchoides bicaudatus*). We reproduced experiments combining the different factors in binary and ternary combinations. Diuron had lower toxicity than expected, while imidacloprid affected the growth of non-target diatoms. Interalgal competition had marked negative effects on diatom growth kinetics, which increased as supplementary pressures (nematodes and/or pesticides) were added. These results demonstrate that ecological relationships in freshwater biofilms (competition, predation) have a non negligible effect on community composition, population behavior and impacts usually observed without these factors. Multistress conditions including the presence of pesticides in freshwaters are expected to have unpredictable consequences on biodiversity, based on simplified toxicity assays.

## Introduction

In freshwater streams, key biological processes are ensured by biofilms, which are at the basis of food chains and, thus, of ecosystem functioning. They provide important ecosystem services such as primary production, nutrient (carbon, nitrogen, phosphorus) cycling, and provision of food resources for higher trophic levels. Aquatic biofilms are complex ecosystems at the microscale, comprised of microscopic algae, bacteria, protozoans and other micro-meio grazers in constant interaction, together, and with their environment. River biofilms are interfaces that rapidly interact with dissolved substances, resulting in functional and structural responses, and have thus been endorsed as “early warning systems” of disturbances (Sabater et al. 2007; Mora-Gómez et al. 2015). In these micro-ecosystems, the nature and amplitude of responses to environmental stressors vary depending on target organisms, and the overall impacts derive from both direct and indirect effects (Proia et al. 2012). Since biofilms integrate environmental changes and chemical stressors, they have been widely used in biomonitoring. In particular, diatom indices are extensively used in water quality monitoring worldwide, e.g. to support the implementation of the European Water Framework Directive (Morin et al. 2016).

The close spatial relation in biofilms between organisms with very diverse life-strategies gives rise to many biotic interactions: competition for resources, facilitation, refuge provision, syntrophism, and predation by micrograzers. Biotic interactions (competition, predation) are rarely explicitly accounted for in biofilm studies. However, interactions between species have been shown to be a structuring component of the overall diatom community (Bottin et al. 2016) in a country-wide study. Trophic interactions were also shown to modulate diversity-function relationships in primary producer communities (Hart 1985; Rakowski & Cardinale 2016). There is evidence that periphytic meiofauna exerts potential top-down control of benthic algal composition. Indeed, the density of biofilm-dwelling nematodes has been shown to increase with microalgal biomass (Majdi et al. 2011b). Despite evidence of high daily diatom consumption by the nematode *Chromadorina bioculata* (Eßer 2006: feeding rate of 58 diatoms/nematode/day) data on algal ingestion by free-living nematodes remain scarce, especially for biofilms. Prey-predator interactions stimulate ecosystems (Lubchenco 1978), and grazing has a rejuvenating effect on biofilms, by maintaining a dominance of pioneer species (López-Doval et al. 2009; Guasch et al. 2016b). Primary consumers also favour the microbial loop by enhancing oxygen turnover within biofilms (Mathieu et al. 2007) and by improving mineralization rates (feces, bioturbation) (Traunspurger 1997; Schmid-Araya & Schmid 2000; Eßer 2006). Given the fact that the same environmental determinants (light, temperature, dissolved substances including toxic pollutants) drive meiofauna fitness/survival and microalgal community patterns (Kanavillil & Kurissery

2013; Neury-Ormanni et al. 2016), their concomitant dynamics are likely to be affected by environmental changes.

The proliferation of dissolved pollutants such as agricultural pesticides in rivers is a crucial component of global change (Bernhardt et al. 2017). Chronic exposure to pesticides exerts a selection pressure on the periphytic community which may be reflected by species' adaptation and/or changes in the community (Tlili et al. 2011), therefore modifying grazing pressure and food (prey) availability, with unpredictable consequences for biofilm trophic webs. The diverse nature of pesticides, and thus toxic modes of action, may target different components of the biofilms and impact food availability or feeding rates. In fact, combined predation and chemical pressures on biofilm prey and predators have been overlooked. Such multi stress conditions may have diverse consequences: i) microalgae can be directly impacted by herbicides, as well as predation, thus enhancing mortality and possibly selecting for certain taxa with specific characteristics (algal group, morphology...); ii) microalgae can be indirectly favored by pesticides targeting their predators, extending habitat availability. The dynamics and extent of this complex network of biological interactions under multiple contamination scenarios are thus difficult to predict and require dedicated investigations.

In this context, we hypothesized that taxonomic composition would be disturbed by environmental (natural or anthropogenic) changes, in particular by the injection of pesticides. The balance between micro-algae and meiofauna should reflect competition-predation-toxicity trade-offs. To investigate the combined effects of microalgal competition, predation and exposure to chemical substances, we performed laboratory-controlled experiments to explore the dynamics and selectivity of prey-predator relationships in benthic communities.

Simplified laboratory conditions were used to establish causal relationships between the dynamics of diatom growth and the treatments tested (algal competition, predation, pesticide exposure with emphasis on contrasted toxic modes of action). Monocultures and mixed cultures of diatoms were used to discard potential effects related to differential appetite between algal groups. The individual growth kinetics of small *Planorbulina lanceolatum* and two bigger morphotypes of *Gomphonema gracile* (Coquillé & Morin 2019) were established in monospecific cultures and ternary mixture.

The impacts of a herbicide (diuron) and an insecticide (imidacloprid) on their growth were then characterized. These model contaminants were selected given their European occurrence in freshwaters (Masiá et al. 2015; Münze et al. 2015; Soes 2015; Christoffels et al. 2016) and their regulatory status in Europe. Diuron has been classified as a priority substance by the European Commission (directive 2013/39/EC). It is an inhibitor of photosystem II directly

acting on the photosynthesis of microalgae (Ricart et al. 2009; Magnusson et al. 2013; Moisset et al. 2015). Imidacloprid is included in the European Watch List (Carvalho et al. 2015), given its proven toxicity towards aquatic invertebrates.

Finally, microalgae growth dynamics after supplying nematodes with each diet (i.e. algal mono and plurispecific cultures), with or without pesticide stress, were described to elucidate the changes in prey-predator dynamics under toxic exposure. The nematode species *Aphelenchoides bicaudatus* was selected based on its cosmopolitanism in freshwaters and low sensitivity to diuron and imidacloprid (Neury-Ormanni et al. 2019).

In all treatments, the diatoms cultures were sampled daily to quantify their abundance and mortality throughout their exponential growth phase. The relative impacts of the stress factors tested (competition, nematodes and pesticide exposure: Diuron or Imidacloprid) on microalgae populational endpoints were then quantified, alone and in combination.

## Materials and methods

### Biological material

#### Predator: *Aphelenchoides bicaudatus*

The nematode *Aphelenchoides bicaudatus* (Imamura 1931) Filipjev & Schuurmans Stekhoven, 1941 was used in the experiments. It belongs to the Aphelenchoididae (Skarbilovich 1947) and has a worldwide distribution in temperate, tropical, subtropical, and even subpolar regions (Imamura 1931; Eyuaem-Abebe et al. 2006). This terrestrial species is well-adapted to benthic aquatic ecosystems where it colonizes sediment biofilms (Eyuaem-Abebe et al. 2006). *A. bicaudatus* is a stylet-bearing suction-feeder (Majdi et al. 2011b). It preferentially feeds on seedling roots, fungi, mosses (Wood 1973), but also on microalgae (Siddiqui & Taylor 1969).

*A. bicaudatus* specimens used in this experiment were sampled from the multispecific culture ANH1 from Irstea Bordeaux, which originates from diverse biofilms collected in the tributaries of Arcachon bay (Southwest France) in 2014. ANH1 is dominated by filamentous and solitary green algae, phytoflagellates (*Entosiphon*), and occasionally diatoms. Micromeiofauna is abundant, with protozoa (*Cinetochilum sp.*), amoebae, rotifers (*Lecane lunaris*, *Rotaria sp.*) and nematodes (*A. bicaudatus*). Live nematodes (i.e. clearly mobile), 100 to 300µm-long, were isolated from ANH1 using an inverted microscope (Wild, M40) equipped with a micromanipulator (Eppendorf, Injectman NI2), at x5 magnification.

Prey: *Planothidium lanceolatum* and two morphotypes of *Gomphonema gracile*

For the purpose of this study, we used two diatom species corresponding to three different morphotypes, cultured alone and in ternary mixtures in benthic growth mode.

- *Planothidium lanceolatum* (Brébisson ex. Kützing) Lange-Bertalot

Our specimens originated from Le Lourdan stream at Lentigny (eastern France). This culture of the pennate diatom *P. lanceolatum* (Achnanthesiaceae) from the INRA culture collection (strain TCC615) was made-up of small, rounded individuals (3-5µm long, 3-4µm wide).

- *Gomphonema gracile* (Ehrenberg)

The two morphotypes of *G. gracile* (Gomphonemataceae) described in Coquillé & Morin (2019) were used: the normal form and the teratological form. Normal individuals were slightly heteropolar, 15-20µm long, while the teratological ones were boomerang-shaped and larger (20-25µm long).

## **Chemicals**

### Culture medium

The diatom cultures were maintained in Dauta culture medium (Dauta 1982), freshly prepared and autoclaved before the start of the experiments.

### Pesticides

Diuron (3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea) and imidacloprid (1-(6-chloro-3-pyridylmethyl)-N-nitroimidazolidin-2-ylideneamine) were provided by Dr Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Germany). Stock solutions of diuron and imidacloprid were prepared at 200ppm in acetonitrile. Cultures were contaminated directly using stock solutions, at a nominal concentration of 5µg.L<sup>-1</sup>.

## **Experimental setup**

### Culture conditions

Diatoms were cultured in 150mL glass Erlenmeyers. Inoculation of diatom cultures was performed under sterile conditions. The different treatments tested are presented in Table 1. Briefly, Erlenmeyers were inoculated on day 0 with diatoms at a concentration of 30 000cells.mL<sup>-1</sup> (in the case of multispecies cultures, 10 000cells.mL<sup>-1</sup> of each taxon were added), and with about

one hundred nematodes in the predation treatments. This concentration ratio between nematodes and algae was selected based on the data found in the literature, to ensure that enough nematodes were used to observe some effect on diatom growth without being limited by food availability, i.e. prey quantity (Hummon et al. 1978; Borchardt & Bott 1995; Beier & Traunspurger 2001; Eßer 2006). After inoculation, the cultures were incubated in a thermoregulated chamber at a daily mean temperature of  $17^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ , with a 16h/8h day/night photoperiod ( $58\pm 2 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Light variations induced temperature variations throughout the day, from  $14^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  (night) to  $18^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$  (day).

Treatments with diatoms only were performed in quadruplicate, while triplicates were used in the tests using nematodes, given the time required to isolate specimens from their culture of origin (about 4 hours for the hundred nematodes used per replicate).

### Sampling

Experimental durations varied according to the growth kinetics of the diatom species and experiments were terminated when the stationary phase was reached (see Tableau 7). Over the duration of the experiments, 1mL of culture was sampled every working day after homogenization under sterile conditions. At the end of each experiment involving nematodes, the remaining volume of culture was preserved. All samples were immediately fixed with Lugol (final concentration: 0.5%) and stored at  $4^{\circ}\text{C}$  in the dark until enumerations (cf section II.4.2.2 et II.4.2.3). Note that one replicate of the Competition+Imidacloprid+Nematodes treatment was finally discarded because of contamination by green microalgae.

Tableau 7: Applied treatments and experimental details. Pl: *Planothidium lanceolatum*, Gg: *Gomphonema gracile* normal form, Gt: *G. gracile* teratological form. \*: in order to limit the number of experimental conditions, and given that both morphotypes of *G. gracile* were expected to be similarly impacted by pesticides, toxicity tests with monocultures of this species were only performed on the normal morphotype.

Treatment	Diatom species	Diatom concentration on day 0 (cell.mL <sup>-1</sup> )		Number of nematodes on day 0	Number of replicates	Nominal pesticide concentration (µg.L <sup>-1</sup> )	Experimental duration (days)
Monospecific (Control)	Pl	30000		/	4	/	20
	Gg	30000		/	4	/	12
	Gt	30000		/	4	/	12
Diuron	Pl	30000		/	4	5	20
	Gg*	30000		/	4	5	14
Imidacloprid	Pl	30000		/	4	5	24
	Gg*	30000		/	4	5	13
Nematodes	Pl	30000		109-114	3	/	20
	Gg*	30000		111-120	3	/	10
	Gt	30000		117-124	3	/	9-13
Competition	Pl+Gg+Gt	Pl	10 000	/	4	/	14
		Gg	10 000				
		Gt	10 000				
Competition+Diuron	Pl+Gg+Gt	Pl	10 000	/	4	5	14
		Gg	10 000				
		Gt	10 000				
Competition+Imidacloprid	Pl+Gg+Gt	Pl	10 000	/	4	5	14
		Gg	10 000				
		Gt	10 000				
Competition+Nematodes	Pl+Gg+Gt	Pl	10 000	108-121	3	/	14-17
		Gg	10 000				
		Gt	10 000				
Competition+Diuron+Nematodes	Pl+Gg+Gt	Pl	10 000	114-128	3	5	13-17
		Gg	10 000				
		Gt	10 000				
Competition+Imidacloprid+Nematodes	Pl+Gg+Gt	Pl	10 000	110-115	3	5	14
		Gg	10 000				
		Gt	10 000				

## **Biological measurements**

### Diatom enumerations

Diatom densities were determined using a Nageotte counting chamber under an optical microscope (Leica DMLS), at x200 magnification. Live and dead diatoms were recorded, following the protocol described in Morin et al. (2010). Live diatom densities were expressed in cell.mL<sup>-1</sup> of culture medium and used to calculate growth parameters. Mortality was also calculated (in %).

As experimental duration was based on the individual growth kinetics of the species (until the stationary phase was reached), we were able to calculate growth rates (in divisions.day<sup>-1</sup>) based on diatom enumerations converted into ln(cell.mL<sup>-1</sup>). To account for a potential latency phase in some treatments, maximal growth rate ( $\mu_{max}$ ) and mean growth rate ( $\mu$ ) were determined. The maximal growth rate was calculated as the slope of the ln densities against time during the exponential phase, while mean growth rate ( $\mu$ ) corresponded to the slope of ln densities against time between day 0 and the day when the stationary phase was reached.

### Nematode enumerations

The remaining volume of culture with nematodes were ultrasonicated in order to completely detach diatoms and nematodes from the walls of the Erlenmeyers, and finally decanted in sedimentation chambers (Utermöhl method). After 90h of decantation, the supernatant was removed and the pellet was observed at x10 magnification under an inverted microscope (Olympus, IX70). The overall sample was observed, in order to count the remaining nematodes.

## **Data analyses**

Cell densities and mortality data were log-transformed, centred and reduced to achieve normality and homoscedasticity of data distribution, checked with Shapiro-Wilks and Bartlett tests. ANOVAs (Type II tests) were used to identify significant differences between the controls of the treatments for growth rates ( $\mu_{max}$  and  $\mu$ ), carrying capacity (i.e. maximal cell densities during stationary phase) and mortality. The most significant effects of the manipulated factors (Competition, Nematodes and pesticide exposure: Diuron or Imidacloprid) on biological responses were highlighted by performing generalized linear models (GLM) under an R environment with the “MASS” package, selected based on their Akaike Information Criterion value.



## Results

### Enumerations

#### Diatom growth kinetics under control conditions

Under control conditions, the monospecific cultures grew well, with similar  $\mu$  and  $\mu_{\max}$  (Tableau 8). *P. lanceolatum* had lower growth rates, but much higher cell densities at the stationary phase, than *G. gracile* (similar growth rates for both morphotypes). Mortality was higher in *Gomphonema* than in *Planothidium* cultures (ca. 12% in *G. gracile* vs 5% in *P. lanceolatum*).

#### Nematodes

At the end of each experiment with nematodes, the number of individuals enumerated in the remaining volume of culture was much lower than the number of nematodes inoculated (about 10% of the initial concentration). As the recovery procedure was based on gentle shaking of the culture medium before decantation, missing nematodes may not have been detached from the Erlenmeyer walls. The fact that some effects on diatom growth were found in the Nematodes treatments (see results) however confirm that they survived culture conditions.

### Impact of treatments on diatom growth responses

The GLM procedure allowed us to measure the impact of the explicative factors that were tested (Nematode, Competition, Diuron and Imidacloprid) on the responses of each microalga. Responses were very variable between species and depending on the endpoint considered. The respective percentages of variance explained by these factors are described in Figure 20. ANOVAs highlighted the responses under various treatments established as significantly different from the control conditions (Tableau 8). Only responses with  $p$ -value $<0.05$  were considered as significant in the results described below.

#### *Planothidium lanceolatum*

The most influent factor on  $\mu_{\max}$  was the presence of other microalgae (Competition, explaining 41.6% of the variance: Figure 20), causing a significant decrease from  $0.34 \pm 0.01 \text{div.day}^{-1}$  down to  $0.25 \pm 0.01 \text{div.day}^{-1}$  (considering all conditions involving competition). Similarly,  $\mu$  was affected by algal competition (19.3% explained variance), but also imidacloprid exposure (13.5%) and their combination (Competition+Imidacloprid: 15.2%). Divergences

between  $\mu$  and  $\mu_{\max}$  under imidacloprid exposure (Tableau 8) were mainly due to latency before the exponential phase (4 days) observed in this treatment.

Cell density at the stationary phase was markedly lower than control values in the Diuron treatment (Table 2). A significant impact of Competition on cell density at the stationary phase was also observed, for all conditions performed with plurispecific cultures (Tableau 8; Figure 20: *ca.* 88% of variance explained by the Competition factor). Finally, increasing mortality from 5 to >10% was observed in all the Competition treatments (Tableau 8; Figure 20).

### *Gomphonema gracile*

The growth rates ( $\mu$  and  $\mu_{\max}$ ) of both forms of *G. gracile* decreased in the presence of nematodes. In all the treatments where nematodes were added, they decreased by 35%. As for *P. lanceolatum*, an impact of imidacloprid on the overall growth rate ( $\mu$ ) of *G. gracile* normal morphotype, while  $\mu_{\max}$  remained similar to the Controls, highlighted a lag time (1-2 days) before the exponential phase.

Cell densities over the stationary phase increased slightly under Diuron exposure ( $p < 0.05$ , Tableau 8). For both *G. gracile* morphotypes, cell densities decreased in all the treatment combinations including plurispecific conditions (i.e. Competition in combination with Diuron, Imidacloprid and/or Nematodes), while no significant effect was observed in the Competition alone treatment. While Nematodes or Competition alone did not impact mortality much, it increased in the treatments combining these factors for the normal morphotype. Competition and chemical pressure resulted in increased mortality in the teratological morphotype, from 14 to 20%.

Tableau 8: Average values ( $\pm$ SE) for growth rates ( $\mu_{\max}$  and  $\mu$ ), cell densities reached at the stationary phase and mortality in all the conditions tested. The number of replicate cultures used corresponds to those provided in Table 1, except for †: n=2 due to the contamination of one replicate culture by green algae. n.d.: not determined. Significant differences to the Controls determined by ANOVA: p-values are <0.001 (\*\*\*), <0.01 (\*\*), <0.05 (\*), <0.1 (°).

Treatments	<i>P. lanceolatum</i>	<i>G. gracile</i> normal	<i>G. gracile</i> teratological
$\mu_{\max}$ (div.day <sup>-1</sup> )			
Control	0.34 $\pm$ 0.01	0.53 $\pm$ 0.03	0.52 $\pm$ 0.03
Diuron	0.30 $\pm$ 0.05	0.50 $\pm$ 0.05	n.d.
Imidacloprid	0.39 $\pm$ 0.03	0.41 $\pm$ 0.03°	n.d.
Nematodes	0.38 $\pm$ 0.07	0.33 $\pm$ 0.05*	<b>0.34<math>\pm</math>0.01**</b>
Competition	0.27 $\pm$ 0.02°	0.47 $\pm$ 0.06	0.46 $\pm$ 0.05
Competition+Diuron	<b>0.22<math>\pm</math>0.01**</b>	0.63 $\pm$ 0.04	0.57 $\pm$ 0.06
Competition+Imidacloprid	0.24 $\pm$ 0.02*	0.54 $\pm$ 0.02	0.45 $\pm$ 0.04
Competition+Nematodes	<b>0.23<math>\pm</math>0.04*</b>	<b>0.35<math>\pm</math>0.12*</b>	<b>0.37<math>\pm</math>0.07*</b>
Competition+Diuron+Nematodes	0.30 $\pm$ 0.07	<b>0.37<math>\pm</math>0.14*</b>	<b>0.35<math>\pm</math>0.06*</b>
Competition+Imidacloprid+Nematodes	0.28†	0.61†	0.46†
$\mu$ (div.day <sup>-1</sup> )			
Control	0.33 $\pm$ 0.01	0.52 $\pm$ 0.04	0.53 $\pm$ 0.04
Diuron	0.33 $\pm$ 0.05	0.47 $\pm$ 0.05	n.d.
Imidacloprid	<b>0.20<math>\pm</math>0.01**</b>	<b>0.37<math>\pm</math>0.04*</b>	n.d.
Nematodes	0.38 $\pm$ 0.06	<b>0.33<math>\pm</math>0.05*</b>	<b>0.33<math>\pm</math>0.02**</b>
Competition	0.26 $\pm$ 0.03°	0.50 $\pm$ 0.08	0.51 $\pm$ 0.04
Competition+Diuron	<b>0.21<math>\pm</math>0.02**</b>	0.62 $\pm$ 0.02	0.55 $\pm$ 0.05
Competition+Imidacloprid	0.22 $\pm$ 0.02*	0.57 $\pm$ 0.03	0.46 $\pm$ 0.03
Competition+Nematodes	<b>0.21<math>\pm</math>0.06*</b>	<b>0.35<math>\pm</math>0.12*</b>	<b>0.37<math>\pm</math>0.06**</b>
Competition+Diuron+Nematodes	0.28 $\pm$ 0.08	0.37 $\pm$ 0.14°	<b>0.33<math>\pm</math>0.07**</b>
Competition+Imidacloprid+Nematodes	0.26†	0.43†	0.42†°

Treatments	<i>P. lanceolatum</i>	<i>G. gracile</i> normal	<i>G. gracile</i> teratological
Cell density at stationary phase (cell.mL <sup>-1</sup> )			
Control	1 192 325±94 685	465 880±23 934	447 569±37 236
Diuron	<b>457 912±40 118***</b>	<b>638 479±45 229*</b>	n.d.
Imidacloprid	1 598 823±101 130	495 500±25 757	n.d.
Nematodes	926 085±225 109	443 411±26 716	369 111±69 476
Competition	<b>130 740±2 176***</b>	410 810±32 435	349 555±36 998
Competition+Diuron	<b>52 840±5 791***</b>	<b>255 242±31 521***</b>	<b>165 056±8 817***</b>
Competition+Imidacloprid	<b>47 665±3 315***</b>	<b>226 501±7 855***</b>	<b>170 135±7 712***</b>
Competition+Nematodes	<b>81 945±34 153***</b>	<b>217 083±56 066***</b>	<b>137 607±26 208***</b>
Competition+Diuron+Nematodes	<b>68 744±17 890***</b>	<b>162 392±29 210***</b>	<b>175 056±29 313***</b>
Competition+Imidacloprid+Nematodes	<b>34 545†***</b>	<b>160 228†***</b>	<b>143 400†***</b>
Mortality (%)			
Control	5±1	9±1	14±3
Diuron	2±0	8±1	n.d.
Imidacloprid	2±0	<b>1±0**</b>	n.d.
Nematodes	8±3	10±4	13±1
Competition	<b>11±1*</b>	14±1°	16±2
Competition+Diuron	<b>21±3***</b>	11±4	<b>20±1*</b>
Competition+Imidacloprid	<b>15±4***</b>	10±3	<b>20±1*</b>
Competition+Nematodes	<b>18±0***</b>	<b>17±0**</b>	14±2
Competition+Diuron+Nematodes	<b>12±2*</b>	7±2	16±2
Competition+Imidacloprid + Nematodes	<b>12†*</b>	8†	12†

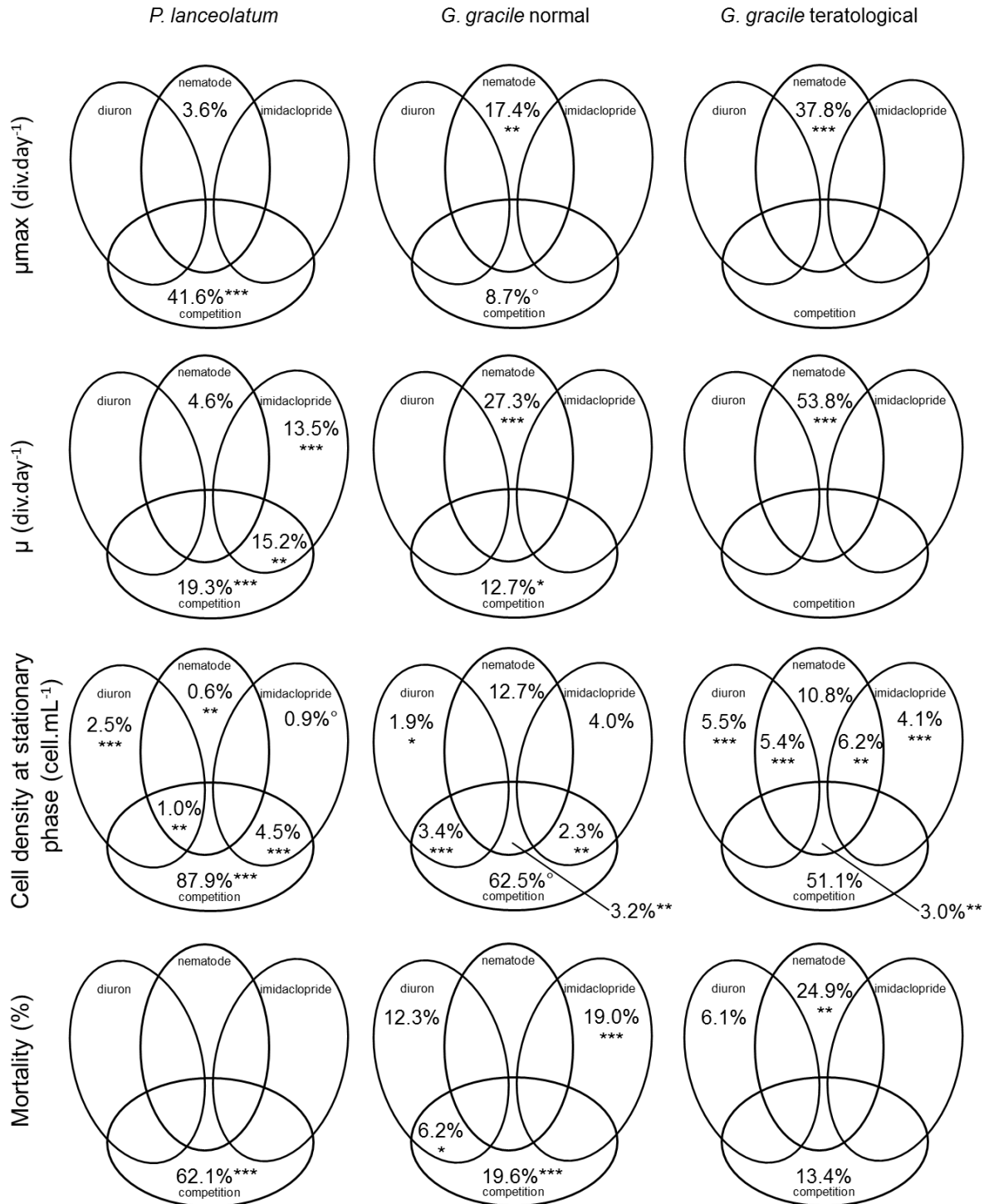


Figure 20 : Factors with the strongest impact on the response of the 3 diatoms considered, for the endpoints assessed ( $\mu_{max}$ ,  $\mu$ , cell density at the stationary phase, and mortality). Percentages of explained variance after selection of the best model (based on AIC values) are provided, together with their statistical significance: <0.001 (\*\*\*), <0.01 (\*\*), <0.05 (\*), <0.1 (°), <1 ( ).

## Discussion

### Impact of single pressures on diatom growth

#### Microalgal competition favors fast-growing taxa

Competition is an ecological process involved in structuring community patterns and modifying population dynamics (Grover 1991). In this study, the variance of diatom responses explained by competition was most often significant and generally amongst the highest percentages obtained (Figure 1). In particular, competition significantly impacted the growth kinetics of *Planothidium lanceolatum* ( $\mu$  and  $\mu_{\max}$ , Tableau 8), and its mortality increased under multispecific conditions. This species belongs to the low profile guild defined by Passy (2007), which encompasses species with low competitive abilities in resource-rich habitats (as *Dautia medium* is). Contrastingly, the growth rates of *Gomphonema gracile*, a high profile species with superior competitive abilities, were less affected by competition, with barely significant responses for the normal morphotype and no effect on the teratological morphotype. This confirms the high growth performance of the latter (Coquillé & Morin 2019), particularly under plurispecific conditions.

Cell densities over the stationary phase were lower than expected in most of the plurispecific conditions, which is explained by the fact that the concentrations of cells inoculated for each taxon were 1/3 of the control (monospecific) densities in the Competition treatment, and that space availability is limited in microcosm experiments. As *G. gracile* had much faster growth kinetics than *P. lanceolatum*, its rapid growth would suggest quick spatial occupation to the detriment of the latter.

#### Nematodes impact diversely growth rates of diatoms

With the aim of assessing the effect of nematodes (*A. bicaudatus*) on the population dynamics of laboratory-grown *G. gracile* and *P. lanceolatum*, the selected densities of nematodes (2,3–3 Ind.cm<sup>-2</sup> bottom surface) were 10 to 20-fold lower than those found in the field (Hummon et al. 1978; Borchardt & Bott 1995; Beier & Traunspurger 2001; Eßer 2006) to ensure *ad libitum* feeding of the nematodes. Contrary to *in situ* conditions, the diatoms were exposed to maximal predation: they had no possible escape or refuge, and populations of *A. bicaudatus* were not curbed in the absence of predators. *A. bicaudatus* is able to absorb microalgal cell content in 2 to 10 seconds as reported by Siddiqui & Taylor (1969) for the chlorophyte *Stichococcus bacillaris* (5–10  $\mu\text{m}$ ). It has been shown that benthic marine nematodes can swallow their own biomass-equivalent in less than 24 hours (Blanchard 1991).

The presence of *A. bicaudatus* decreased the growth rates of *G. gracile* by about 35% (Tableau 8) and generally explained a large part of the variance (Figure 20). In this species, cell associations forming long-chain colonies were observed in the nematode treatments, as a probable defence mechanism. Besides top-down control of diatom populations (Lubchenco 1978; Rakowski & Cardinale 2016), the presence of nematodes could also increase the available resources by regenerating (feces, dead organisms) and dispersing (movement) nutrients (Traunspurger 1997; Eßer 2006). Most free-living nematodes secrete appetent mucus attracting diatoms, ensuring them an ever-accessible “food bank” (Majdi & Traunspurger 2015). In the Nematodes treatment, the growth rates of *P. lanceolatum* were not impacted, and *Planothidium* cells were often observed agglutinated around mucus secretions, suggesting they directly benefited from this nutritive resource (Figure 21). Slightly higher cell sizes of this diatom were also observed in the presence of nematodes, perhaps indicating that sexual reproduction occurred.

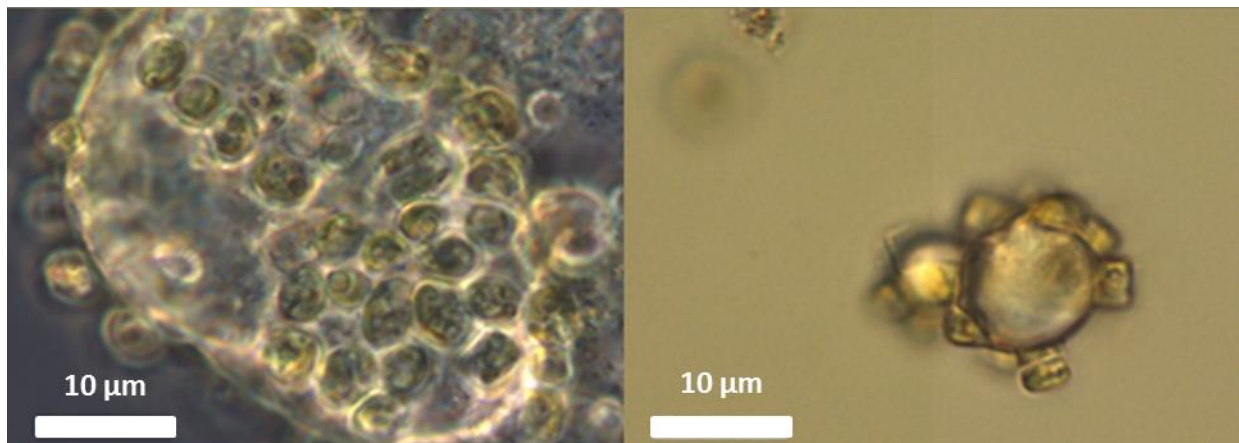


Figure 21: Agglutination of *P. lanceolatum* individuals on mucus secreted by *A. bicaudatus* observed in PI cultures with Nematodes treatment. Microphotography J. Vedrenne and J. Neury-Ormanni (2016).

This difference in nematode impact between the two diatom species is not likely explained by a prey size/morphology constraint for the buccal equipment of *A. bicaudatus*. With its drilling stylet, algal size does not represent a real feeding issue for this nematode. It more likely highlights prey selectivity. Moens et al. (2014) evidenced that the epistrate-feeder nematode *Chromadorella* preferentially fed on larger diatoms, as found in this experiment with the suction-feeder *Aphelenchoides*. For these nematodes, capture and feeding processes are complex and energy-intensive, hence the selection of bigger prey minimizes the energy cost-benefit balance (Moens & Vincx 1997; Moens et al. 2014).



### Marginal effects of diuron on diatom growth under an environmentally realistic concentration

Photosystem II inhibitors such as diuron are known to impact diatoms (e.g. Larras et al. 2012; Magnusson et al. 2012; Moisset et al. 2015). Diuron toxic effects occur very quickly (Morin et al. 2018), prompting the inhibition of photosynthetic activity even at low concentrations (Ricart et al. 2009; Morin et al. 2018). At the nominal concentration tested ( $5\mu\text{g.L}^{-1}$ ), diuron had little impact on the endpoints tested for both diatom species (Tableau 8, Figure 20), while complete growth inhibition was found by Moisset et al. (2015) for exposure to  $10\mu\text{g.L}^{-1}$  diuron. A significant decrease in *P. lanceolatum* cell density at the stationary phase was however observed, while the carrying capacity of *G. gracile* was enhanced (Tableau 8). Note that microscopical observations of the chlorophyll content of both species revealed that chloroplasts were less coloured under Diuron treatment.

### Delayed exponential growth phase under imidacloprid exposure

Imidacloprid is often detected in rivers (with reported concentrations between  $1\text{-}14\mu\text{g.L}^{-1}$ ) and impact several aquatic autotrophic and heterotrophic organisms (Tišler et al. 2009). Bioassays based on freshwater algae growth demonstrated that algae were less sensitive than meiofauna to imidacloprid. However, higher sensitivity of diatoms to imidacloprid compared to green algae has been reported (SERA 2005). As an acetylcholine analogue, imidacloprid likely acts on the proton gradient of the vegetal cell and ATP synthesis, and inhibits phosphorous incorporation within membranes (Tretyn & Kendrick 1991), with consequences on photosynthesis as well as cell division. In this study, imidacloprid at  $5\mu\text{g.L}^{-1}$  was found to impact diatom growth ( $\mu$ ), by delaying the start of the exponential phase by 1-2 days for *G. gracile*, and 4 days for *P. lanceolatum*. Imidacloprid has also been shown to inhibit bacterial diversity in soils (Moghaddam et al. 2011). Given its high solubility in water, we cannot exclude similar consequences on aquatic bacteria, which intimately interact with diatoms and influence their development (Proia et al. 2011).

## **Effects of nematodes and pesticides on multispecific diatom cultures**

### The presence of nematodes modifies diatom competition relationships

In aquatic systems, algal assemblages are mostly driven by physicochemical factors as well as biotic relationships such as competition and predation (Duggins & Dethier 1985). Predator impact *in situ* depends, among others, on feeding preferences and on herbivory pressure in terms of predator abundance and grazing rate (McCormick 1991; Rakowski & Cardinale 2016). The



presence of nematodes did not affect the growth kinetics of *P. lanceolatum*, while *G. gracile*'s growth was significantly reduced in the Nematodes treatment (Tableau 8, Figure 20). While *G. gracile* was not impacted by competition alone (Tableau 8), interactive impacts of Competition and the presence of nematodes were demonstrated on cell densities at stationary phase of this species (Figure 20), but not on the small *P. lanceolatum*. However, mortality increased under these combined pressures for both species. These results are in line with the findings of Guasch et al. (2016b), who found significant top-down control of larger diatom species in biofilms under grazing pressure by aquatic snails.

#### Diuron exposure and interspecific competition interact in *Gomphonema gracile*

In freshwater periphyton, diuron concentrations below  $10\mu\text{g.L}^{-1}$  are enough to cause observable changes in diatom community composition and photosynthesis inhibition (Ricart et al. 2009). While Competition and Diuron acted additively in *P. lanceolatum*, for which no interaction between both factors was highlighted (Figure 20), a significant decrease in growth rates ( $\mu_{\text{max}}$  and  $\mu$ ) was however found, as well as lower cell densities at the stationary phase and increased mortality (Tableau 8). Synergistic effects were found for *G. gracile*: interactions occurred on cell densities at the stationary phase under the Competition+Diuron treatment (Tableau 8). Significant variations of variance were explained by the combination of both factors on cell densities as well as mortality in the normal morphotype of *G. gracile* (Figure 20). Such results are in agreement with the rationale that direct (diuron toxicity) and indirect (biotic relationships) effects shape final community patterns under chemical pressures (Guasch et al. 2012).

#### Modulation of imidacloprid toxicity under plurispecific conditions

Figure 1 shows that interactive effects occurred between Competition and Imidacloprid exposure on diatom growth for *P. lanceolatum* ( $\mu$ , 15.2% of the variance, and cell density at the stationary phase, 4.5% of the variance) as well as in the number of *G. gracile* individuals reached at the stationary phase (2.3% of the variance). In *P. lanceolatum*, the combined exposure to these factors tended to lessen the impact of Imidacloprid on  $\mu$ , by removing the lag phase that was observed before exponential growth. Note, however, that  $\mu_{\text{max}}$  decreased in the Competition+Imidacloprid treatment compared to the individual impacts of both factors, highlighting the extent of plurispecific conditions in controlling the growth of this species. These impacts on growth resulted in significantly lower cell concentrations reached at the stationary phase, compared to single factor exposures.

Under these conditions, the growth rates of *G. gracile* were not significantly different from control values, contrary to the observed decrease in  $\mu$  and  $\mu_{\text{max}}$  exposed to Imidacloprid alone.

However, the carrying capacity was impacted by the combination of Competition+Imidacloprid, while the individual effects of these factors on maximal cell densities were not significant.

We observed that diatoms tended to agglomerate and form polysaccharide spots larger than under control conditions. They formed plurispecific biofilms adhering to the bottom of the Erlenmeyers, suggesting a defence mechanism, rather mutualistic than competitive. The fact that cell numbers at the stationary phase decreased can be partially explained by the incomplete recovery of those benthic aggregates in the samplings. However, increased mortalities were found in the Competition+Imidacloprid, confirming that diatoms were impacted. These results are in agreement with the conclusions drawn by Sabater et al. (2016) that neonicotinoids are highly structuring factors of freshwater diatom communities.

### **Combined impacts of competition, nematodes and pesticides**

Several studies have assessed the impact of herbicides and insecticides on primary producers, in monospecific and plurispecific cultures in the laboratory as well as in field communities (e.g. see review by Guasch et al. 2012). However, the combined effects of pesticides with biotic interactions (competition and predation), as they may occur in the field, have been overlooked.

#### Combined impacts of Competition, Nematodes and Diuron

Diuron can have an impact on multiple trophic compartments in freshwater systems, from diatoms (with half maximal effective concentrations sometimes below  $5\mu\text{g.L}^{-1}$ , Larras et al. 2012) to small invertebrates, with e.g. 48-hr median lethal concentration from 1 to  $2.5\text{mg.L}^{-1}$  for aquatic invertebrates (Giacomazzi & Cochet 2004). However, Neury-Ormanni et al. (2019) demonstrated high tolerance of *A. bicaudatus* to diuron, with mortality below 5% in a 48-hr exposure to  $10\text{mg.L}^{-1}$ . This was confirmed by the present experiments, where Nematodes impact on diatoms did not seem to be impaired by diuron exposure.

Interactive effects of Diuron and Nematodes were found to be significant for the carrying capacity of the teratological morphotype of *G. gracile* (Figure 20). The combination of the three factors (Competition+Diuron+Nematodes) only resulted as significant for maximal cell densities of *P. lanceolatum*, a species for which the individual impacts of each of the factors alone, already significant, were enhanced in the ternary combination of stressors.

Guasch et al. (2016b) showed that grazing stimulated photosynthetic activity in biofilms, while diuron has an inhibitory effect on photosynthesis. Contrary to observations of pale chloroplasts under Diuron only, in the Competition+Diuron+Nematodes experiment the

diatoms presented coloured content, suggesting that grazing stimulatory effects on photosynthesis somewhat counteracted the toxic effect of diuron. Hence, the presence of *A. bicaudatus* may have acted as an antagonist of diuron by compensating for the photosynthetic decrease through nutrient addition in the medium, subsequent to excretion or mucus secretion (Kaehler & Froneman 2002; Majdi & Traunspurger 2015).

#### Combined impacts of Competition, Nematodes and Imidacloprid

Over the three replicates of the treatments combining Competition+Imidacloprid+Nematodes, one was invaded by three species of chlorophytes likely inoculated with the nematodes. This replicate was thus later discarded from data analyses, rendering the conclusions drawn here barely significant. On the first days of the experiment, the green algae accounted for 4% of the microalgae, while after 6 days they dominated (97%), while the diatom species were almost all dead. Chlorophytes have been shown to be less sensitive than diatoms to imidacloprid (SERA 2005).

However, the results obtained for the two remaining replicates allowed us to observe general trends.

No effect of imidacloprid was expected on the viability of *A. bicaudatus* at the concentration used, as no toxicity was previously observed for a concentration of 35mg.L<sup>-1</sup> over 48 hours (Neury-Ormanni et al. 2019). However, longer exposure may have impacted the nematodes, either their survival or feeding activity. Indeed, the growth rates of all diatoms were not significantly lower under the Competition+Imidacloprid+Nematodes treatment than under the controls.

The effects observed on the mortality of *P. lanceolatum* or on the carrying capacity of all diatoms are consistent with previously described effects of Competition in interaction with any other of the factors tested. Hence, competition seemed to have a higher structuring impact on diatom assemblages than predation, even under toxic stress.

## Conclusions and perspectives

Freshwater communities in aquatic ecosystems are driven by multiple interactions between species and trophic levels, such as competition and predation, and may be diversely impacted by environmental conditions, such as pesticide pressure, as assessed here. The three-tiered approach applied in this work allowed to increasingly consider several factors acting as stressors towards microalgae. Competition often had the highest structuring impact on diatom growth rates, in particular for the small *P. lanceolatum*, followed by the presence of nematodes. The latter had a preponderant impact on the growth of *G. gracile*, especially the teratological form which was the largest organism tested in this work. This suggests that the feeding strategy of *A. bicaudatus* was steered towards bigger prey to reduce energy costs spent on feeding (Moens & Vincx 1997; Moens et al. 2014).

Pesticide exposure also impacted diatom growth. The combination of biotic interactions (either Competition or Nematodes) and chemical stressors generally decreased the final cell densities recorded at the stationary phase, with increasing extent as more stressors were cumulated.

Altogether, these results confirm that combined stressors have non-negligible consequences for diatom biodiversity, and that their interactions can hardly be predicted from single-species experiments, given the prevalence of competition relationships.

Further studies are necessary to better characterize the drivers of prey selection, taking into account microalgal and predator traits. Grazing pressure could also depend on diatom densities, and similar experiments could be optimized by testing species responses under low, moderate and high food availability. Complementary information could be obtained through the in-depth characterization of molecular communication (allelopathy) between algae and their predators, and their modulation under toxic pressure. Indeed, odorous compounds secreted by benthic cyanobacteria and diatoms have been shown to provoke attraction or repulsion in aquatic nematodes, among others (Jüttner 2001; Höckelmann et al. 2004; Leflaive & Ten-Hage 2009). Also, nematodes communicate with specific pheromones (Choe et al. 2012).

## Acknowledgements

We are grateful to Emilie Saulnier-Talbot for English grammar. This work was funded by the Adour Garonne Water Agency.

### III.3.2.3 Conclusions

Les écosystèmes aquatiques sont régis par de multiples interactions écologiques intra- et interspécifiques telles que la compétition et la prédation, qui peuvent avoir des effets variables en fonction des conditions abiotiques du milieu (ici, la contamination pesticide). L'objectif de cette étude était dans un premier temps d'étudier l'impact de la présence d'un prédateur sur les cinétiques de croissance de trois morphotypes distincts de diatomées (deux espèces). A partir des différentes étapes exposées dans l'ordre croissant dans la partie « Discussion » de l'article, nous avons pu discriminer les effets de chaque facteur individuellement et conjointement sur les populations de *Gomphonema gracile* et *Planothidium lanceolatum*. Il s'avère que la compétition est un facteur extrêmement structurant pour la plus petite des diatomées testées : *Planothidium lanceolatum*. Cependant, ces algues tirent avantage de la situation en mélange pour se protéger des impacts toxiques, comme dans le cas de l'exposition à l'imidaclopride, et les nématodes semblent également moins voraces sur l'espèce *Gomphonema gracile* (perte d'efficacité de la prédation ? agglomérat de diatomées plus difficiles à capturer ?). En effet, cette dernière (particulièrement le morphotype tératologique) est fortement influencée par la présence de nématodes qui perturbent son taux de croissance en conditions témoin, suggérant qu'ils se nourrissent préférentiellement d'algues de taille plus importante pour économiser l'énergie allouer à leur mode d'alimentation (« suction-feeders ») (Moens & Vincx 1997; Moens et al. 2014). La pression qu'ils exercent sur cette diatomée, et l'enrichissement nutritif qu'ils provoquent dans le milieu par le biais de fèces ou de sécrétion de mucus (Riemann & Helmke 2002; Majdi & Traunspurger 2015), stimulent la croissance d'algues opportunistes comme *Planothidium lanceolatum* (Guasch et al. 2016b; Rakowski & Cardinale 2016). Sous le traitement au diuron, la présence d'*Aphelenchoides bicandatus* réduit l'effet de diuron, les impacts sur la biomasse algale étant modulés par l'addition de nutriments dans le milieu (excrétion, sécrétion de mucus)(Kaehler & Froneman 2002; Majdi et al. 2011a).

### III.3.3 Comportement alimentaire d'un microbrouteur polluosensible sous pression herbicide et/ou insecticide

#### III.3.3.1 Introduction

Nous avons vu dans l'étude précédente que les relations biotiques étaient structurantes en termes de composition et de fitness d'une culture plurispécifique d'algues, et que les réponses des algues à un stress chimique, en termes de cinétique de croissance, étaient différentes si elles étaient en présence d'autres espèces et/ou d'un prédateur potentiel (cf section III.3.2.2). Afin de focaliser sur les réponses des algues et s'assurer du maintien du niveau de prédation tout au long de l'expérience, nous avons choisi un nématode tolérant aux deux substances modèles sélectionnées (conformément aux résultats décrits dans la section III.3.2).

Dans cette nouvelle partie, nous avons étudié les impacts du diuron et de l'imidaclopride, seuls et en mélange binaire sur le comportement alimentaire d'un prédateur. De manière à pouvoir observer des effets directs et indirects, nous avons opté pour un prédateur sensible à l'insecticide : des larves de chironomes. En effet, Stoughton et al. (2008) ont révélé qu'une concentration de 5,75  $\mu\text{g/L}$  d'imidaclopride pouvait tuer plus de 50% d'une population de *Chironomus tentans* après 4 jours d'exposition. Les chironomidés sont fréquents dans les biofilms, ils jouent un rôle important dans le recyclage des nutriments (Bryce & Hobart 1972) et occupent une place clé d'intermédiaire entre les producteurs primaires et les consommateurs secondaires (Tokeshi 1995). En fonction de leur stade de développement, les larves de chironomes se nourrissent sélectivement de diatomées ou d'autres microalgues considérées comme d'une grande qualité nutritionnelle (Lamberti 1984). Cependant, sous une pression pesticide, la nourriture contaminée pourrait impacter la santé des consommateurs par réduction de l'apport nutritionnel (altération de la composition en acides gras, Demailly et al. 2019) ou par un empoisonnement via le transfert trophique de pesticide (Roche et al. 2009), ou les obliger à modifier leurs habitudes alimentaires (Schrama et al. 2017).

Ainsi, nous avons conduit deux expériences complémentaires sous conditions contrôlées en laboratoire. La première étape consistait à déterminer les effets d'un herbicide et d'un insecticide, seuls et en mélange binaire, à des concentrations environnementales ( $5\mu\text{g.L}^{-1}$ ), sur les taux d'ingestion de diatomées et d'algues vertes par un chironome. Sachant que dans un environnement naturel, les chironomes rencontrent un multiple choix de sources alimentaires, nous nous sommes posé la question de sa nourriture préférentielle et enfin si son choix pouvait être influencé par une contamination pesticide. Pour ce faire, nous avons effectué une deuxième expérience de « cafeteria design », inspiré de Weber & Traunspurger (2013). Un chironome était

mis en présence de plusieurs sortes d'algues, exposés aux mêmes traitements que pour l'expérience sur les taux d'ingestion, et nous avons analysé le nombre de fois qu'il changeait d'algues, le temps passé sur chacune et la distance qu'il parcourait pendant le temps d'exposition.

### III.3.3.2 Comportement de broutage (taux d'élimination et sélection) d'un chironome soumis à une pression pesticide

Article soumis à *Science of the total environment*, pour le numéro spécial « Multiple River Stressors » sous la référence : Neury-Ormanni, J., Doose, C., Majdi, N., Vedrenne, J., Traunspurger, W., Morin, S. (submitted). Selective grazing behavior of chironomids on microalgae under pesticide pressure. Soumis le 10/01/2020.

# Selective grazing behaviour of chironomids on microalgae under pesticide pressure

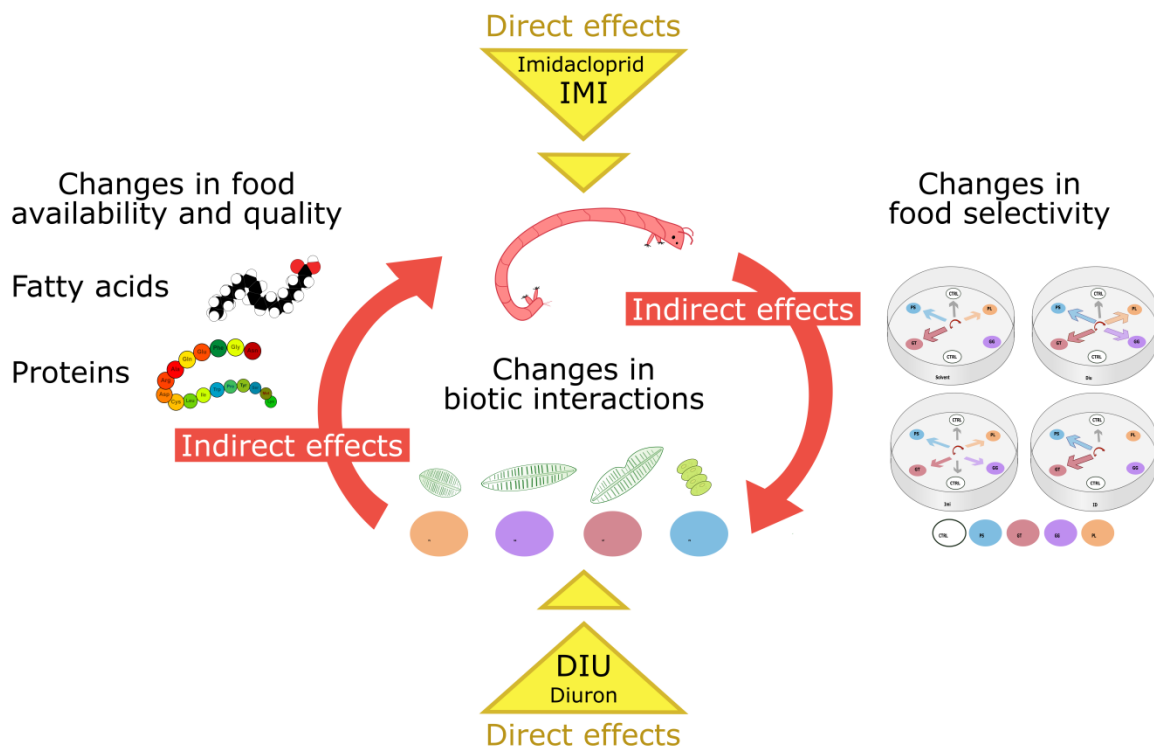
**Julie Neury-Ormanni**<sup>1</sup>, **Caroline Doose**<sup>2</sup>, Nabil Majdi<sup>3</sup>, Jacky Vedrenne<sup>1</sup>, Walter Traunspurger<sup>3</sup>, Soizic Morin<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Irstea, UR EABX. 50 avenue de Verdun, 33612 Cestas cedex, France

<sup>2</sup> INRS, centre ETE. 490 rue de la Couronne, G1K 9A9 Québec, Canada

<sup>3</sup> Bielefeld University, Animal Ecology, Konsequenz 45, 33615 Bielefeld, Germany

## Graphical abstract



**Keywords:** trophic relation, ecotoxicology, pesticide mixture, grazer



## Abstract

The herbicide diuron and the insecticide imidacloprid are amongst the most frequently detected pesticides in French rivers, and each is known to affect many aquatic organisms. However, the question of whether and how both pesticides together might induce multi-stress conditions, which could induce indirect effects such as the modification of biological interactions within freshwater microbial communities has not received much attention. This study was undertaken to determine the effect of diuron and imidacloprid alone and in combination on the feeding behaviour of chironomid larvae.

An initial experiment measured the impact of the different contamination conditions at environmental concentrations ( $5\mu\text{g L}^{-1}$  for each pesticide) on the grazing rate of chironomids on three microalgae species, independently. Two diatom species, *Gomphonema gracile* (two different morphotypes: normal and teratogen) and *Planothidium lanceolatum*, and one green alga *Desmodesmus* sp. were offered as food, during 24h. Each pesticide condition elicited a different grazing rate in chironomids with regards to algal species and their nutritional quality.

In a second experiment (cafeteria), food selectivity of chironomids was determined under similar contamination conditions during 4h: under diuron, larvae switched equally between the microalgae and were as mobile as in the control without pesticide. However, imidacloprid and the pesticide mixture condition altered chironomid movements and grazing behaviour.

These two experiments showed different responses of chironomids to pesticide contamination. Direct effects were observed on food choice and feeding behaviour due to mobility inhibition caused by the effect of imidacloprid on insect larva. Indirect effects of diuron were also noted: by reducing the nutritional quality of algae, this herbicide contamination obliged grazers to become more opportunistic and to switch their original diet.

## Introduction

Due to their solubility in water (INERIS; <https://substances.ineris.fr/fr/>), the fate of most pesticides used in agriculture is to transit into freshwater ecosystems (Wang & Liu 2007). Imidacloprid and diuron are amongst the most frequently detected pesticides in European rivers, where they can be found at concentrations on the order of micrograms per litre (Masiá et al. 2015; Münze et al. 2015; Soes 2015; Christoffels et al. 2016). These pesticides are harmful to many non-target aquatic organisms from primary producers to consumers, destabilizing the structure and function of aquatic ecosystems (Ricart et al. 2009; Ricart et al. 2010; Bonmatin et al. 2015). Concerning their toxic mode of action, the phenylurea herbicide diuron inhibits the photosynthetic apparatus leading to plant cell death (Giacomazzi & Cochet 2004). The neonicotinoid imidacloprid acts on the nicotinic receptors of insects, creating continuous excitation of synapses, leading to paralysis and death (Matsuda et al. 2001; Simon-Delso et al. 2015).

Toxic pollution induces direct measurable effects on the biota, but also indirect effects by altering the nature of biological interactions (within communities and/or in food web interactions). A few studies have measured the indirect effects of pesticide exposure, and we still need to examine the toxicity of the mixture of chemical substances targeting different trophic levels. To fill these knowledge gaps, the study of aquatic biofilms provides several advantages: mostly comprised of sedentary organisms, they respond directly to environmental conditions (Artigas et al. 2012b). Periphytic organisms belong to various biological groups, including microalgae and primary consumers such as chironomid larvae (Majdi et al. 2012a). Chironomids are numerically important in biofilms and they may dominate in terms of biomass when compared to other abundant (but much smaller) meiofaunal invertebrates like nematodes, harpacticoid copepods and rotifers (Majdi et al. 2012a). Chironomids have various diets, some taxa (like Tanypodinae) may be predominantly predators (Schmid-Araya & Schmid 2000), or roughly classified as decomposers. But in fact, it turns out that chironomids are opportunistic (Cummins & Klug 1979) and can feed equally well on algae, fungi, protozoans and smaller meiofauna parts (Naser & Roy 2012; Ptatscheck et al. 2015; Ptatscheck et al. 2017). Chironomids have the potential to affect the biofilm algal community directly through consumption of algal cells (Botts & Cowell 1992). Studies of their gut content demonstrated that chironomids can feed selectively on high-quality food sources (Åkerblom & Goedkoop 2003) as a function of larval stage (Lamberti 1984) and food availability (Vos et al. 2000). Diatoms and other microalgae are considered as highly nutritious food for growing larvae (Lamberti 1984); however, under pesticide pressure, the nutritional quality of contaminated food should decrease (Demailly et al. 2019), thus altering consumers' health by reducing food ingestion rates (Harkey et al. 1994;

Leppänen & Kukkonen 1998) or by poisoning them through biomagnification (Roche et al. 2009). Chironomids play an important role in nutrient recycling within aquatic ecosystems (Bryce & Hobart 1972) and between producers and secondary consumers (Tokeshi 1995).

To better understand the direct and indirect effects of diuron (herbicide) and imidacloprid (insecticide), alone and in combination, on grazing activity in freshwater biofilms, we focused on one chironomid tribe and three microalgae species, commonly found in biofilms. To account for possible selectivity in the diet of chironomid larvae, the diatoms *Gomphonema gracile* (“normal” and “teratogen” morphotypes, (Coquillé & Morin 2019) and *Planotbidium lanceolatum*, and the green alga *Desmodesmus* sp. were used as food supply.

Two complementary experiments were performed. The first experiment aimed to determine the effect of pesticides (diuron and imidacloprid), individually and in combination, on chironomid grazing rate of diatoms and green algae. The second experiment was designed according to Weber & Traunspurger (2013)’s cafeteria design, a food choice experiment conducted on nematodes. Here, the objective was to assess the effect of the pesticides on chironomid feeding behaviour in terms of food choice. Chironomids can detect food by olfaction (Baker & Ball 1995) or chemodetection of algal exudates or extracellular matrices (Fulton & Paerl 1987). They were expected to choose larger algae (as found by (Botts & Cowell 1992) to optimize feeding efficiency (optimization of prey handling time) and to select high-quality food sources (Lamberti 1984; Åkerblom & Goedkoop 2003) even under herbicide pressure. The imidacloprid effect on insect larvae (Stoughton et al. 2008; Azevedo-Pereira et al. 2011) was expected to lead to paralysis or death of chironomids, thus reducing grazing pressure on algae.

## Materials and methods

### Collection and acclimatization of chironomids

Chironomids were collected by sieving freshwater sediment from Johannesbach stream (Bielefeld, Germany), through 1 mm-mesh size, then 0.5 mm-mesh size, in autumn 2017. In the laboratory, chironomids were isolated from their dwelling-tubes and rinsed with mineral water (Volvic). The chironomids collected belonged to the Tanytarsini tribe (Tachet et al. 2010). They presented an individual biomass of  $408.3 \pm 13.3 \mu\text{g}$ .

They were stored in Volvic water, in a dark room, at 20°C. They were starved for 24h before the grazing experiments.

## Algae cultures

Four microalgae cultures were chosen as feeding resources for the experiments: two diatom species: *Planothidium lanceolatum* and *Gomphonema gracile*, the latter with normal and teratogen morphotypes, and one chlorophyte species *Desmodesmus* sp. Algae were grown in 1 L flasks filled with Dauta medium (Dauta 1982), under continuous light to optimize their growth kinetics and to obtain sufficient cell concentrations for the experiments.

## Quantification of grazing

The first experiment was conducted with the goal of determining pesticide effects, alone and in combination, on chironomid grazing rate of the four monocultures of algae. In order to compare ingested biomass, 30 individuals of each algae culture were measured to calculate their biovolume, which was then converted into dry weight (Tableau 9) following (Sladeczek & Sladeczkova 1963) (see II.4.2.2). One chironomid larva was placed in a volume of 1.5mL in a 2mL glass vessel during 24h in the dark, with the algae concentrations provided in Tableau 9, accounting for cell sizes of the taxa (i.e. using lower cell concentrations for larger algae).

Chironomid grazing on algae was measured under different treatments: one control (Volvic), one solvent control (Volvic + 0.05% acetonitrile, corresponding to the concentration of solvent in the pesticide treatments), two contaminated conditions with  $5\mu\text{g.L}^{-1}$  of diuron (Diu) and of imidacloprid (Imi), respectively, and the binary mixture of these chemical substances (ID) with the same environmental concentrations. Every treatment was tested without chironomids to separate the grazing effect from growth/mortality of algae. These different treatments were also tested on chironomids without algae to assess toxicity on the grazer alone. All conditions were performed in 9 experimental replicates. After a 24h-exposure, chironomids were removed from the glass vessels. After verifying that they were still active by means of a stimulus, larvae were frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$ , lyophilized and weighed. To determine the concentration of live algae at the end of the experiment, each replicate was fixed with Lugol (0.5% final concentration) in order to be counted. Algae enumerations were carried-out in a Nageotte chamber (magnification x20) under an optic microscope (Leica microsystems), discriminating dead and live cells. Algal concentration was expressed in  $\text{cell.ml}^{-1}$  and transformed to biovolume, using individual biovolumes calculated from measurements (Tableau 9).

**Tableau 9 : Algae concentration and individual biovolumes ( $\mu\text{m.Ind}^{-3}$ ) in all exposure conditions, for the algae species used**

Algae	Concentration ( $\times 10000 \text{ cell.mL}^{-1}$ )	Individual biovolume ( $\mu\text{m.Ind}^{-3}$ )
<i>Gomphonema gracile</i>	$86 \pm 9.3$	$247.4 \pm 28.3$
<i>Gomphonema gracile</i> teratogen	$86 \pm 13.4$	$461.2 \pm 55.7$
<i>Planorbidium lanceolatum</i>	$130 \pm 16$	$42.5 \pm 3.7$
<i>Desmodesmus</i> sp.	$210 \pm 8.8$	$74.4 \pm 3.0$

### Cafeteria design

In the second experiment, food selectivity of chironomids was assessed under the same treatments as in the first experiment, but with an exposure time of 4h. The experimental design was adapted from the protocol proposed by Weber & Traunspurger (2013). A known volume of each algae culture was filtered to obtain approximately the same algae amount per filter. Spots of  $1.3\text{mm}^3$ , i.e. containing  $6.2 \times 10^4 \text{ cell.mL}^{-1}$ , were cut and disposed in glass Petri dishes ( $\text{Ø} 15 \text{ cm}$ ) at equal distance from the center (at 6.5 cm from the center, see Graphical Abstract). The control spots were made with virgin filters not containing algae (empty patches). Then, Petri dishes were carefully filled with 5mL of the different exposure media in Volvic (solvent control or pesticides as described for the grazing rate experiment). One larva was placed in the middle of each Petri dish. Larvae positions were followed using photos and observation notes, taken every 5 minutes during the first thirty minutes, every 10 minutes during the second 30 minutes and then, every 30 minutes until the end of the experiment ( $n=4$ ).

### Data treatment

#### Clearance rate (Experiment 1):

In order to calculate the clearance rate (elimination rate due to chironomids), the individual algae biovolumes calculated previously were first transformed to wet weight ( $1\mu\text{m}^3 = 0.000001\mu\text{g}$ ) and then to dry weight ( $\text{DW} = 8\% \text{ WW}$ ) (Sladeczek & Sladeczkova 1963). The clearance rate formula used was taken from Ribes et al. (1998) and calculated first by determining the grazing coefficient  $g$  in biomass removal  $\text{h}^{-1}$ :

$$g = Kc - Ka$$

Where the algal growth rates with ( $Kc$ ) and without ( $Ka$ ) chironomids (biomass doublings  $\text{h}^{-1}$ ) are obtained with:

$$K = \frac{\ln\left(\frac{C1}{C0}\right)}{t1 - t0}$$

With  $C_0$  and  $C_1$  the algal concentration converted to total biomass (in  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) at the beginning of the experiment ( $t_0$ ) and end ( $t_1$ ), respectively. Finally, the clearance rate  $F$ , in volume swept clear biomass $^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  was obtained with the formula:

$$F = V \frac{g}{b}$$

With the microcosm volume  $V$  in ml and the dry weight in mg of living chironomid larvae at the end of the experiment.

#### Number of changes, distance covered, and time spent on algal spots (Experiment 2)

In order to understand the feeding behaviour of chironomids during the cafeteria design experiment, the number of food source changes was calculated as well as the distance covered by the organisms to reach them. The number of changes was determined by counting the number of times that chironomids were found in a different algal spot from the one where they were in the last observation. This number of changes was expressed in percentage of control values. Distances were determined by geometric calculations based on Petri dish radius and perimeter. Then, calculated distances were expressed as percentage of the total distance travelled by chironomids under the control conditions. Cumulative time spent on algal spots was calculated by adding the time spent by larvae on each spot over exposure time. The total time on each food source was expressed as percentage of the total exposure time (4h).

#### Data analysis

A Kruskal-Wallis test between Volvic control and solvent control data showed a significant effect of the solvent on clearance rates ( $p\text{-value} < 0.001$ ). Therefore, solvent controls were used as the control for comparison tests. The Scheirer-Ray-Hare statistical test was performed on clearance rates using the R software (rcompanion package). This non-parametrical statistical test was used to examine whether clearance rates were affected by algae species and pesticide exposures. Significant differences in chironomid clearance rates depending on the food provided and on exposure conditions were confirmed by a *post hoc* Dunn's test (FSA package). A Kruskal-Wallis test was also used on the data amassed on the number of changes and the distance covered. Concerning the time spent on algal spots, significant differences between conditions were determined by two-way ANOVA (R Vegan package).

## Results and discussion

### Pesticide impact on chironomid mortality and clearance rates of the different algae

All the chironomids were recovered alive in the control conditions, whatever the alga provided (Tableau 10). For all exposure conditions, mortality was the same for both normal and teratogen *Gomphonema gracile*. Chironomid mortality under diuron treatment was higher with the chlorophyte *Desmodesmus* sp. (22%), than with the three diatoms (11%, Tableau 10). Imidacloprid always killed more than 50% of chironomids, but mortality percentages still increased with diatoms (65%, Tableau 10). The highest mortality percentages of chironomids were recorded under pesticide mixture exposure with normal and teratogen *Gomphonema gracile*, while they were lower than in the imidacloprid treatment alone for *Planothidium lanceolatum* and *Desmodesmus* sp. (33%, Tableau 10).

**Tableau 10: Chironomid mortality expressed in percentage (%) as a function of pesticide exposure, depending on the algae provided**

	<i>Gomphonema gracile</i> normal	<i>Gomphonema gracile</i> teratogen	<i>Planothidium lanceolatum</i>	<i>Desmodesmus</i> sp.
<b>Solvent control</b>	0%	0%	0%	0%
<b>Diuron</b>	11%	11%	11%	22%
<b>Imidacloprid</b>	65%	65%	65%	55%
<b>Diuron + Imidacloprid</b>	100%	100%	33%	33%

No pesticide effect was recorded on *Desmodesmus* sp. growth without chironomids for the 24h-experiment. In contrast, all pesticide treatments reduced *Planothidium lanceolatum* growth rate without chironomids. All growth rates of this alga alone were negative for the 24h-experiment. The solvent control showed a growth rate without chironomids equal to  $-12.89.10^{-3} \pm 0.63.10^{-3} \mu\text{g.h}^{-1}$ . Under imidacloprid, diuron and mixture treatments were equal to  $-62.48.10^{-3} \pm 0.61.10^{-3} \mu\text{g.h}^{-1}$ ,  $-26.42.10^{-3} \pm 0.62.10^{-3} \mu\text{g.h}^{-1}$ ,  $-40.61.10^{-3} \pm 0.82.10^{-3} \mu\text{g.h}^{-1}$ , respectively. For both normal and teratogen *Gomphonema gracile*, growth rates without chironomids decreased under diuron treatment.; from  $17.7.10^{-3} \pm 0.25.10^{-3} \mu\text{g.h}^{-1}$  in the solvent control to  $-6.36.10^{-3} \pm 0.62.10^{-3} \mu\text{g.h}^{-1}$  in diuron.

Diuron affected diatom growth more than chironomid predation did, in concordance with its herbicide mode of action on photosynthesis (Giacomazzi & Cochet 2004). Coupled with the direct effect of imidacloprid, the indirect effect of diuron on food source quality could have

enhanced chironomid mortality under pesticide mixture treatment with *Gomphonema gracile*, independently of its morphotype. The large size of these diatoms compared to the other algae used in the experiment can also make it more difficult to ingest by larvae which have been stunned by imidacloprid.

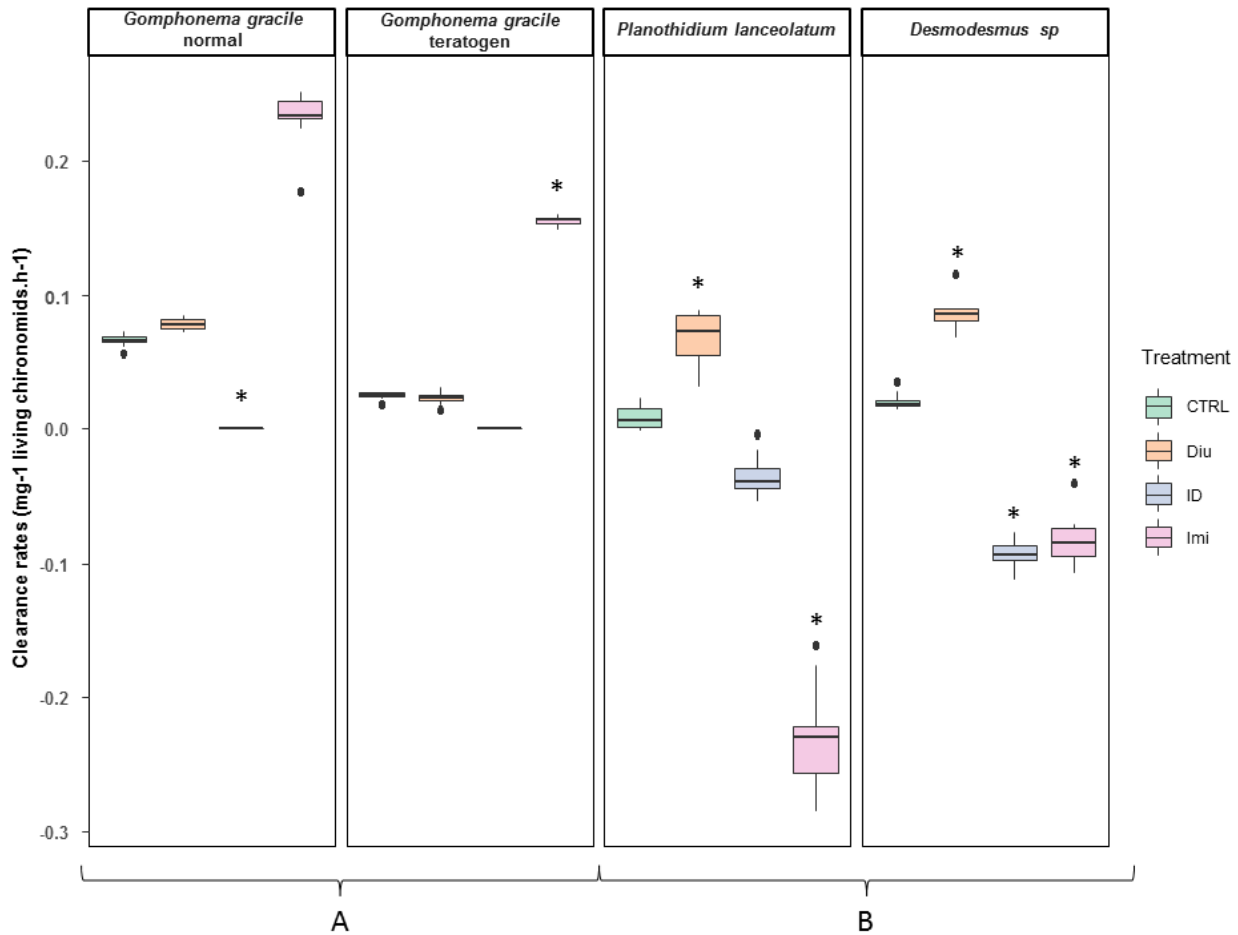


Figure 22 : Clearance rate expressed per milligrams of living chironomids at the end of the experiment per hour as a function of algae and treatment (CS= Solvent control; Diu=Diuron; ID=Imidacloprid + Diuron; Imi=Imidacloprid). Statistical differences were determined by using the Scheirer-Ray-Hare test followed by Dunn's posthoc test ( $p < 0.05$ ).

\* Significant difference from solvent controls



The Scheirer-Ray-Hare test distinguished two algae groups with similar clearance rate tendencies. General clearance rates (Figure 22) were significantly higher for algae group “A” (normal and teratogen *Gomphonema gracile*) and “B” (*Planotbidium lanceolatum* and *Desmodesmus* sp.) ( $p$ -value < 0.05,  $df=3$ ,  $H$ -value=848.3). Moreover, variations in clearance rates under pesticide exposure compared to the solvent control varied depending on the algae. In the case of both *Gomphonema gracile* morphotypes, clearance rates under diuron treatment were not different from those of the solvent control. For both algae in group “A”, clearance rates under imidacloprid were higher than those of the solvent control, but it was only significant with the teratogen *Gomphonema gracile* (Dunn’s test,  $p$ -value < 0.05). Clearance rates under pesticide mixture were lower than the solvent control and equal to 0 for both *Gomphonema gracile*, but only significant for the normal morphotype (Dunn’s test,  $p$ -value < 0.05). For algae belonging to group “B”, clearance rates under diuron treatment were significantly higher than those of the solvent control (Dunn’s test,  $p$ -value < 0.05). For both algae, clearance rates under imidacloprid were significantly lower than the solvent control (Dunn’s test,  $p$ -value < 0.05) and reached negative values. Clearance rates also decreased with the pesticide mixture (to negative values) for both algae, but this was only significant for the green algae *Desmodesmus* sp. (Dunn’s test,  $p$ -value < 0.05).

Chironomid clearance rates were generally different according to the algae size provided as food. Indeed, group “A” pooled larger diatoms, while smaller microalgae were found in group “B” (cf. Tableau 9).

Diuron treatment did not affect clearance rates on both *Gomphonema gracile* forms. Clearance rates on *Planotbidium lanceolatum* and *Desmodesmus* sp. increased under diuron pressure, probably because of a loss of nutritional quality of these algae. Indeed, a  $10\mu\text{g.L}^{-1}$  diuron exposure can induce a decrease of highly unsaturated fatty acids (HUFAs) in diatoms (Demailly et al. 2019). These HUFAs are nutritionally interesting for primary consumers because they can hardly synthesize them *de novo* (Perhar & Arhonditsis 2012). In green algae, such as *Englena gracilis*, diuron was shown to inhibit polyunsaturated fatty acid (PUFA) synthesis and induce changes the nature of their fatty acids (Troton et al. 1986). As expected (Harkey et al. 1994; Leppänen & Kukkonen 1998), diuron contamination led chironomids to increase their algae consumption in order to compensate for the likely nutritional loss, in particular when small microalgae were provided (group “B”) (Ruiz et al. 2018).

The 96-h lethal concentration ( $LC_{50}$ ) of imidacloprid is  $5.75\mu\text{g.L}^{-1}$  for *Chironomus tentans* (Stoughton, 2008). The sensitivity of chironomids to imidacloprid (Tableau 10) could explain the lower clearance rates observed under imidacloprid and pesticide mixture conditions, likely leading to a decrease in grazing pressure. The negative clearance rates for algae in group “B” (Figure 22)

highlighted higher 24-h growth rates with chironomids present under imidacloprid treatment in *Desmodesmus* sp. and *Planothidium lanceolatum* than in the absence of chironomids. These differences can be due to higher biomass productivity of these species under increased nutrient enrichment conditions (e.g. Passy, 2007 for *Planothidium lanceolatum* or Samorì, 2013 for *Desmodesmus communis*). Indeed, the presence of chironomids may have enhanced nutrient enrichment in the microcosms (via death, feces, bioturbation...) (Sterner 1990; Herren et al. 2017). Similar effects observed between imidacloprid and pesticide mixture conditions showed that mixture effect on clearance rates was mainly related to imidacloprid effect on chironomids. In contrast, both *Gomphonema gracile* morphotypes were more heavily grazed under imidacloprid treatment than in the controls. The surprisingly high clearance rate of these cultures (Figure 22) under imidacloprid exposure expressed higher individual weight and higher growth of these diatoms for a reduced number of living larvae (Tableau 10), meaning that contaminated larvae grazed more than uncontaminated larvae. Given the imidacloprid mode of action on insect nicotinic acetylcholine receptors (Matsuda et al. 2001), the excitation led by the contamination could have induced an increase in the clearance rate by chironomids during the excitation stage before they died.

In all chemical treatments, chironomid mortality and clearance rates were different. We expected that diuron would more strongly affect algae (Giacomazzi & Cochet 2004) whereas imidacloprid would more strongly target insect larvae (Simon-Delso et al. 2015). Additionally, the algae species provided had an impact on the biological endpoints assessed. This may derive from species-specific bioaccumulation of pesticides and subsequent transfer along the trophic chain. Bioaccumulation depends on morphological (surface to volume ratio) and biochemical characteristics of algae, such as lipid composition (Tang et al. 1998) and the polarity of chemicals (Rioboo et al. 2002), determining their speed of entrance into the cell and substance affinities with cell components (González-Barreiro et al. 2006).

To sum up the results of the first experiment, we observed different responses of the chironomids to pesticide exposure, in terms of clearance rates and mortality. Indeed, diuron impacted algae more strongly and probably affected their palatability, leading chironomids to increase grazing pressure on less nutritionally interesting algae. Imidacloprid, by targeting insect larvae, increased or inhibited their grazing capacity depending on the food source. Finally, the pesticide mixture effect followed the imidacloprid effect on chironomids, highlighting the prevalence of this chemical in their response to combined herbicide and insecticide exposure.

To go even further, we conducted another experiment by testing the impact of environmental pesticide contamination on chironomid food choice. In the field, food sources

available to chironomids are diversified. Which algae are preferentially selected? And will this trend change under pesticide pressure?

### **Pesticide impact on chironomid food choice**

The time spent by larvae in the control treatment was equally distributed between the Petri dish center and all food sources, except for teratogen *Gomphonema gracile* spots where chironomids were rarely observed (Figure 23). The disinterest for the teratogen diatoms could be explained by morphological factors. This diatom's biomass (Tableau 9) and size were larger than the normal shape (Coquillé & Morin 2019). Moreover, it was the only algae out of the four tested which presented an asymmetric shape (Coquillé & Morin 2019), perhaps complicating ingestion for chironomids. In all treatments, the time spent by larvae on the teratogen diatom spot was statistically lower than all other spots (ANOVA, p-value <0.02, Df=5, F-value=2.82) and this algal spot was only visited by larvae under diuron exposure. Statistical analysis showed no significant differences between conditions, but larvae tended to spend more time on normal *Gomphonema gracile* ( $33 \pm 9.1$  % of time exposure) and *Desmodesmus* sp. spots ( $35.8 \pm 16.1$  % of time exposure) under diuron exposure. Under imidacloprid, the larvae remained at the center of the Petri dishes for long periods of time ( $53.1 \pm 21.9$  % of time exposure). Larvae in the mixed treatment also remained at the center of Petri dishes and also spent more time at the normal *Gomphonema gracile* spot with an average of  $29.5 \pm 20.6$  % and  $38.1 \pm 27.3$  % of time exposure, respectively.

Figure 24 presents the percentage of the number of food source changes and distances travelled by chironomid larvae. Patterns for both distances travelled and numbers of changes (i.e. changes to another food patch) appeared similar under imidacloprid and mixed exposures. In these cases, the number of food source changes was not significantly lower than under the control condition, with  $87.5 \pm 18.6$  and  $81.3 \pm 24.7$  % of the control changes, respectively. However, diuron exposure significantly increased switches to other food patches by  $162.5 \pm 8.3$  % on average, in comparison with the control treatment. Consequently, distances travelled by larvae tended to be higher under diuron (Figure 24) than under imidacloprid and pesticide mixture.

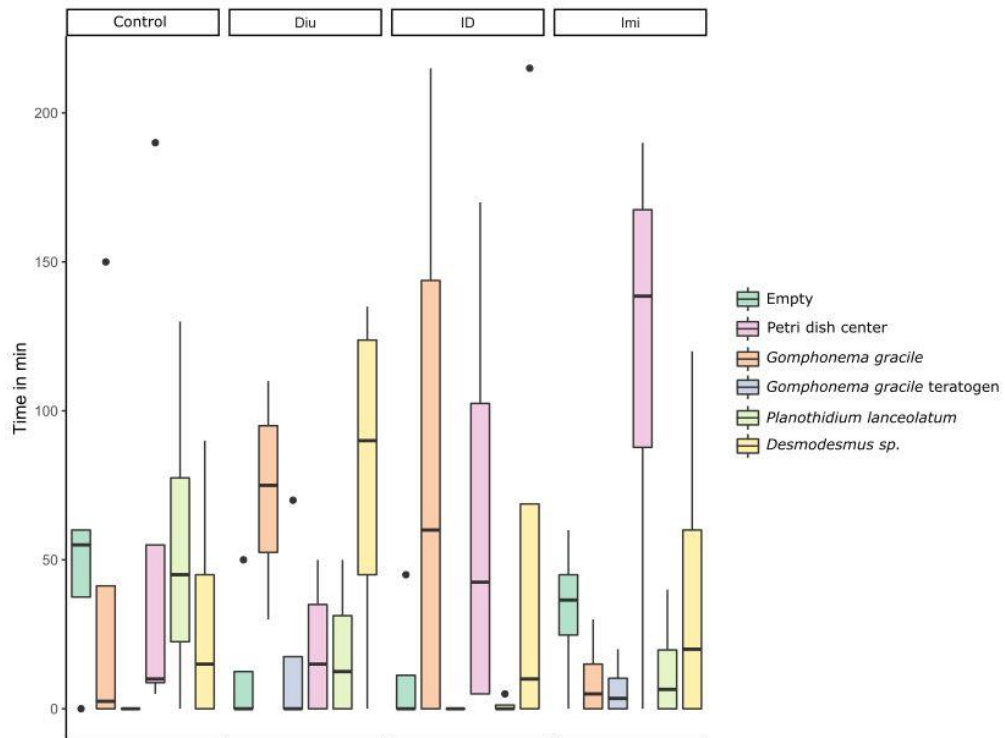


Figure 23: Percentage of total time spent on a spot (% of the total duration of the experiment) by chironomid larvae under control conditions, diuron (Diu), mixed (ID) and imidacloprid (Imi) exposures. Statistical differences were determined by using two-way ANOVA ( $p < 0.05$ ).

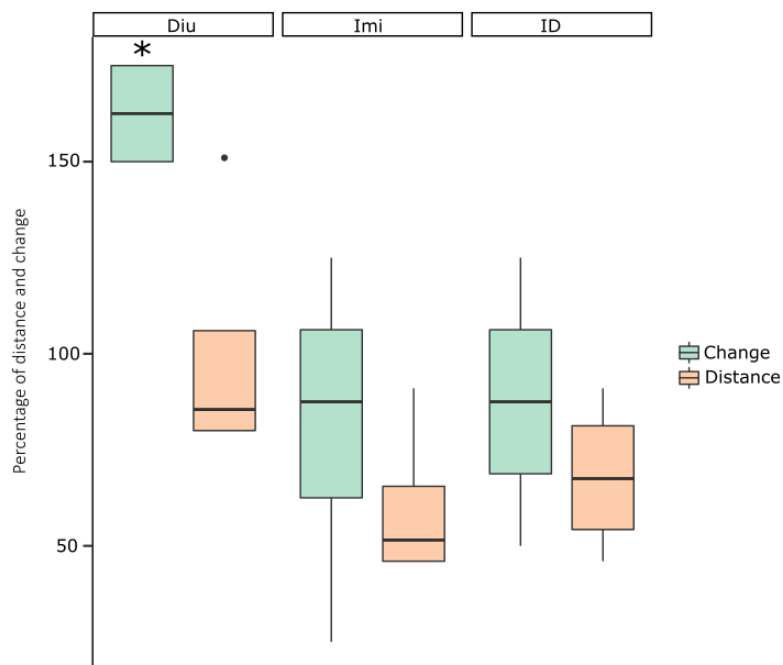


Figure 24: Percentage of distance and change (% of control values) performed by chironomid larvae under diuron (Diu), mixed (ID) and imidacloprid (Imi) exposures. \* Statistical differences were determined by using a Kruskal-Wallis test ( $p < 0.05$ ).

The time spent on algal spots was used as a criterion to determine preferential food ingestion of the chironomids, and the number of changes and distances travelled were assumed to reflect pesticide-induced disturbance of feeding behaviour. Chironomids generally spent more time on diatoms than on green algae, especially on *Planothidium lanceolatum* in the solvent control and *Gomphonema gracile* under contaminated conditions. Diatoms may have been preferred over *Desmodesmus* sp. because of their superior nutritional quality. Indeed, diatoms are protein-rich food (Tenore 1989) as well as HUFA-rich algal groups (Perhar & Arhonditsis 2012). Preference for a diatom species may be the result of interspecific variability in fatty acid profiles (Dunstan et al. 1993; Demailly et al. submitted)

Diuron affected the feeding behaviour of chironomids. Larvae spent more time on the green algae *Desmodesmus* sp. (Figure 23) and regularly changed food source (Figure 24). This more active behaviour is in line with the higher grazing activity found on algae monocultures during the previous experiment (Figure 22). As mentioned previously, diuron modifies fatty acid composition in algae (Troton et al. 1986; Demailly et al. 2019), which has an influence on chironomid food selectivity (Åkerblom & Goedkoop 2003). When food availability is high with a wide choice of food, larvae will select high-quality food with high lipid content; otherwise, they could become opportunistic feeders (Vos et al. 2000). Then, food source diversification could be the consequence of algae palatability loss and satiety of chironomids under diuron pressure.

The concentration of imidacloprid used ( $5\mu\text{g.L}^{-1}$ ) noticeably altered chironomid mobility during the experiments. They spent more time being immobile, travelling smaller distances towards patches of food (Figure 23 and Figure 24), and they showed negative clearance rates on small algae ("B", Figure 22). This outcome is concurrent with the work of Azevedo-Pereira et al. (2011), which resulted in mobility inhibition of *Chironomus riparius* after 96h exposure under an imidacloprid concentration of  $2.15\mu\text{g.L}^{-1}$ .

The pesticide mixture had an intermediate effect, somewhere between diuron and imidacloprid. While the mobility of chironomids under exposure to the mixture again mirrored the imidacloprid effect, in terms of preferred food, chironomids seemed to choose the normal *Gomphonema gracile* and *Desmodesmus* sp., in line with the results obtained under diuron exposure only. Again, imidacloprid was the main factor directly affecting larval capacities, while diuron led their food choice by changing the palatability of algae.

## Conclusion

By investigating the impact of an herbicide and an insecticide, alone and in combination, on the responses of food (algae growth rate) and biological (mortality) and behavioral (mobility, food selection) responses of chironomid larvae, this study provided new insights on the direct

and indirect effects of pesticide contamination on a simplified trophic web. This work showed that diuron and imidacloprid altered the nutritional behaviour of chironomid larvae under concentrations found in the environment. Sensitivity to pesticides was different depending on the considered algae species. Several effects were demonstrated on the grazer: the variability of mortality as a function of algae and pesticide treatment; and diverse behavioural changes. The immobility provoked by imidacloprid led to an inhibition of grazing activity, while diuron provoked a nutritional quality loss of algae that forced chironomids to compensate by switching food source or increasing their grazing activity. Such changes in relationships between algae and grazers could modify benthic community structure and trigger a cascade of indirect contamination effects in aquatic ecosystems.

### **Acknowledgements**

We thank the Animal ecology team of Bielefeld University for their welcome and tips, particularly Henrique Putzki and Christoph Ptatscheck for advice with chironomid experiments; and Benjamin Wilden for helping in cafeteria design set up. We are grateful to Emilie Saulnier-Talbot for English grammar. This study was carried out with financial support from the French National Research Agency (ANR) in the frame of the Investments for the Future Programme, within the Cluster of Excellence COTE (ANR-10-LABX-45) and water agency Adour/Garonne in DYLAQ project.

### III.3.3.3 Conclusions

Cette étude, qui focalisait principalement sur le comportement du brouteur, corrobore l'importance d'étudier les impacts d'une combinaison de facteurs biotiques et abiotiques. L'herbicide (diuron) et l'insecticide (imidaclopride) ont, tous deux, altéré le comportement alimentaire des larves de chironomes à des concentrations environnementales ( $5\mu\text{g.L}^{-1}$ ). Plusieurs effets ont été démontrés sur le brouteur : une mortalité variable en fonction de l'algue ingérée et du traitement pesticide ; et divers changements comportementaux. L'imidaclopride, seul ou en mélange avec le diuron, affectait principalement la mobilité de la larve. L'inhibition de l'activité de broutage était une conséquence de la paralysie ou de la mort du brouteur. Le diuron, en impactant l'appétence des algues (Troton et al. 1986; Demailly et al. 2019), obligeait les chironomes à augmenter leur taux d'ingestion, probablement pour compenser la perte de qualité dans l'apport nutritif par la quantité (Vos et al. 2000). D'ailleurs les résultats de la seconde expérience confirment cette hypothèse de compensation via une diversification de l'apport nutritif. En effet, dans le témoin, les larves montraient une préférence pour les diatomées, qui sont généralement plus riches en protéines et acides gras que leur congénères vertes (Tenore 1989; Demailly et al. submitted). Alors que lorsque le milieu était contaminé au diuron, les larves changeaient activement de source de nourriture et devenaient plus opportunistes.

Ce type de changements comportementaux de choix de nourriture, d'augmentation ou réduction de taux d'ingestion peuvent engendrer une cascade d'effets sur des chaînes trophiques plus complexes et restructurer des communautés entières (Fleeger et al. 2003).

### III.4 Conclusions générales

Dans un premier temps, nous avons considéré les réponses des algues et nous avons analysé comment leur cinétique de croissance était affectée par de multiples facteurs : la présence d'autres algues et/ou d'un potentiel prédateur ; une exposition à un herbicide ou un insecticide ; la combinaison du stress chimique aux relations biotiques de compétition/coexistence et prédation/coexistence. Dans une deuxième partie, nous avons exploré la sensibilité d'un brouteur aux pesticides, en se basant sur sa mortalité puis sur son comportement alimentaire en termes de taux d'ingestion et de sélectivité.

Au regard des résultats obtenus, on peut conclure que la combinaison de stress biotique et chimique a un effet non négligeable sur les individus de notre étude, qu'ils soient producteurs primaires ou consommateurs. En combinant les impacts d'un herbicide et d'un insecticide sur une relation trophique entre producteur primaire et consommateur primaire, on peut déterminer comment les effets directs de ces pesticides sur leur cible, peuvent indirectement, par le jeu des relations biotiques, affecter les individus des chaînons trophiques supérieurs et inférieurs.

Au cours de ce chapitre, nous nous sommes intéressés à l'impact d'une contamination herbicide et insecticide sur des relations trophiques simplifiées en conditions contrôlées de laboratoire. De nombreux facteurs biotiques et abiotiques sont structurants pour les communautés d'un écosystème. Par effet papillon, un simple changement s'opérant au niveau d'une relation trophique de base, peut engendrer une cascade d'évènements menant à la construction d'une nouvelle communauté complètement différente en termes de composition et de fonctionnement.

De nombreux facteurs influencent la construction et l'évolution d'une communauté dans un écosystème. Les conditions abiotiques qui définissent un habitat varient selon la saisonnalité. Une même localisation géographique ne présente en effet pas les mêmes conditions d'une saison à l'autre. La réponse d'une communauté à un stress chimique devrait varier aussi avec la saisonnalité. Dans le chapitre suivant, nous avons donc exploré les réponses de la microméiofaune à plus large échelle d'organisation biologique (structure de la communauté). De manière à ne pas écarter l'influence structurante des relations trophiques, nous avons abordé la question de variabilité de la communauté par l'approche des traits morphofonctionnels liés à l'activité trophique. Cette approche permet de prendre en compte les aspects fonctionnels dans l'écosystème benthique et d'appréhender de manière plus intégrative les relations interspécifiques.





**Chapitre 4 : Traits  
morphofonctionnels de la  
microméiofaune des biofilms  
d'eau douce**

## Chapitre IV      Traits morphofonctionnels de la microméiofaune des biofilms d'eau douce

### IV.1 Introduction

L'approche par les traits morphofonctionnels des organismes pour explorer et comprendre la diversité des formes et des fonctions d'un écosystème est en pleine émergence (Gravel et al. 2016; Weisse et al. 2016). Cette approche prend davantage en compte les relations qui s'établissent entre les organismes que la richesse spécifique. Notamment si l'on s'intéresse aux relations trophiques. En effet, étudier la diversité des modes d'alimentation et les capacités des organismes à trouver leur nourriture considère forcément le facteur biotique de relation entre différents compartiments, ici : microméiofaune/microalgues. Cette méthode permet de pallier les limites inhérentes à la taxonomie en regroupant des organismes possédant les mêmes attributs fonctionnels. Aborder la diversité d'un écosystème du point de vue de sa fonctionnalité présente des avantages. Cela peut réduire les erreurs d'identification et simplifier les informations sur la structure de la communauté (Bortolus 2008), permettant de comparer des écosystèmes à plus large échelle (Violle et al. 2007). Néanmoins, les approches d'écologie fonctionnelle portent plus communément sur d'autres organismes plus grands et plus facilement identifiables avec des traits mieux connus comme les macroinvertébrés (Usseglio-Polatera et al. 2001).

Les premiers travaux traitant des traits fonctionnels ont été conduits sur les plantes (Petchey & Gaston 2006; Violle et al. 2007; Stanca et al. 2013). Puis ce type d'approche a émergé et des bases de données sur les traits fonctionnels ont été créées sur les poissons (Boyle & Horn 2006; Villéger et al. 2010), sur les invertébrés (Usseglio-Polatera et al. 2001) ou sur des communautés de vertébrés terrestres (Luck et al. 2012); principalement sur des types d'organismes facilement identifiables pour lesquels un large ensemble de connaissances existait déjà. Des travaux ont déjà été réalisés sur de plus petits organismes comme Pratt & Cairns (1985) qui ont catégorisé les protozoaires en fonction de leur régime alimentaire, ou plus récemment la classification trophique des ciliés de (Weisse 2017). Mais bien que la micro-méiofaune occupe une place clé dans le flux d'énergie vers les chaînes trophiques supérieures (Elwood & Nelson 1972) et représente une part abondante de la communauté benthique (Neury-Ormanni et al. 2016), ces organismes ont souvent été négligés.

Nous avons donc élaboré dans un premier temps une base de données recensant les traits morphofonctionnels de la microméiofaune sur la base d'une abondante revue de la littérature (base de données consultable à l'adresse (<https://stratus.irstea.fr/d/a36c1b3e32224fd9b182/>)).

Ainsi, l'étude qui suit présente notre progression sur l'alimentation de cette dernière à partir de la littérature et de nos propres observations. Nous avons ajouté un exemple d'utilisation de cette base qui traite la question des variations saisonnières des traits fonctionnels de la microméiofaune liés à l'activité trophique dans un biofilm de milieu hypereutrophe.

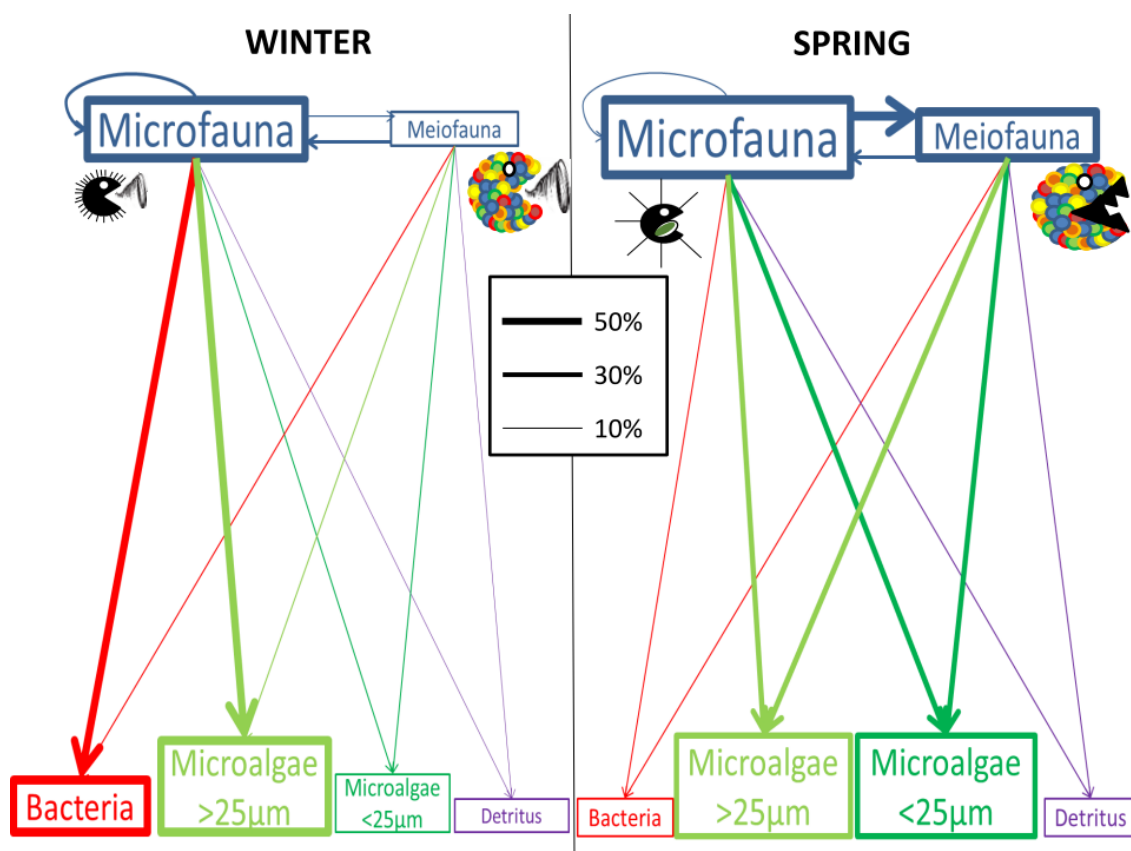
## IV.2 Traits morphofonctionnels de la micro-meiofaune liés à l'activité trophique

Article soumis à *Hydrobiologia* pour un numéro spécial *Meiofauna in freshwater ecosystems*, sous la référence : 'Neury-Ormanni, J., Vedrenne, J., Wagner, M., Jan, G., Morin, S. Micro-meiofauna morphofunctional traits linked to trophic activity.' Accepté le 21/10/2019.

### Micro-meiofauna morphofunctional traits linked to trophic activity

Julie Neury-Ormanni, Jacky Vedrenne, Margot Wagner, Gwilherm Jan, Soizic Morin  
Irstea, UR EABX. 50 avenue de Verdun, 33612 Cestas cedex, France

#### Graphical abstract



**Keywords :** ecology, diversity, microorganisms, biofilm, community

**Abstract**

While the important role of algae and bacteria is widely recognized in freshwater ecosystems, that of minute grazers, despite their high abundance, remains poorly understood. By their consumption of microalgae, their role in the microbial loop, and even their movements in the biofilm, they improve the rejuvenation of this type of ecosystem and have an important function in the connectivity of interfaces. In this study, we approach diversity issues from the standpoint of morphofunctional traits of periphytic micro-meiofauna. We collected and coded morphofunctional characteristics for several micro-meiofauna species from the literature and from our own observations to create a micro-meiofauna morphofunctional traits database inspired by the model of Usseglio-Polatera et al. (2001). This new database of traits may represent an interesting collaborative tool which could be used to improve knowledge on micro-meiofauna and their functional role in the biofilm. We used the information to explore variations in functional traits related to trophic activity among micro-meiofauna communities. Counting data was acquired from biofilms grown in a hypereutrophic pond (Aquitaine, France) in winter and in spring. Community Weight Means (CWM) computed using the database and counting data, revealed Spring food web was more complex than winter food web.

## Introduction

Biofilm is an organic matrix in which cells and extracellular secretions are aggregated on hard (stones, woods, plants) or soft-substrates (sand, mud) in water. It is essentially made of microalgae communities (Chlorophyta, Bacillariohyta, Cyanobacteria), associated with micro-meiofauna (e.g. Hacrobia, Amoebozoa, Cercozoa, Ciliophora, Rotifera, Annelida), aquatic larvae of diverse macroinvertebrates (mainly chironomids), prokaryotic microorganisms, fungi and exopolymeric substances (Lock et al. 1984; Biggs 1990; Kanavillil & Kurissery 2013). Biofilms are hotspots of primary production and nutrient cycling in aquatic ecosystems (Hillebrand & Kahlert 2001; Battin et al. 2016). Its structuration as a “minuscule forest” makes it an ideal refuge where many species interact. Thus, biofilm is an ideal microecosystem for the study of trophic interactions (Canter et al. 2018).

Primary consumers of freshwater biofilms belong to the micro-meiofauna (scale size: 2 $\mu$ m - 2mm; Artois et al. 2011) and include taxa such as protozoans (ciliates, testate amoebas, amoebas, heliozoans) and tiny metazoans (rotifers, oligochaetes, chironomids). Micro-meiofauna makes up the main elements of the microbial food web in aquatic systems (Schmid-Araya & Schmid 2000). Protists, for example, exert an essential link between pico- and nano-plankton and superior trophic levels (Weitere et al. 2018). This key role of energy transfer has already been the object of many studies highlighting the links between bacteria, cyanobacteria, microalgae and macrofauna in diverse aquatic communities, including biofilms (e.g. Elwood & Nelson 1972; Majdi et al. 2012a; Estifanos et al. 2013; Lischke et al. 2015).

Micro-meiofauna population dynamics vary as a function of the composition of primary producers in biofilm (Kathol et al. 2011) and also of abiotic constraints related to seasonal cycles (Majdi et al. 2011a; Schroeder et al. 2012) which modify structure and functioning (Battin et al. 2016). With a longer population doubling time than their prey, primary consumers are more sensitive to environmental changes (Petchey et al. 1999). Despite its potential for bioindication (Jiang et al. 2011), the study of the micro-meiofauna has long been neglected and only limited data is available on population fluctuations, notably temporal (Majdi et al. 2011a; Schroeder et al. 2012; Neury-Ormanni et al. 2016). This study involves the exploration of the seasonal variation of bioecological diversity linked to trophic activity among micro-meiofauna communities.

Studying the diversity of organisms is traditionally done from a taxonomic standpoint, although this can be problematic (Bortolus 2008). Overcoming inherent limitations in taxonomy, diversity issues can be approached via morphological (Stanca et al. 2013) and functional traits (Villéger et al. 2008; Gravel et al. 2016). Trait-based ecology is, for example, used for aquatic protozoan studies (Pratt & Cairns 1985; Weisse et al. 2016; Weitere et al. 2018; Xu et al. 2018). Nevertheless, trait-based approaches are commonly used on larger, more easily identifiable

organisms, such as macroinvertebrates (Cummins & Klug 1979), and for which datasets of species' morphofunctional attributes exist (Tachet et al. 2010).

Within this general context of noticeable lack of interest about the micro-meiofaunal compartment, we followed the example of freshwater macroinvertebrates morphofunctional database of Usseglio-Polatera et al. (2001) to create a micro-meiofauna morphofunctional traits database. This database could represent a very useful tool to improve our knowledge about micro-meiofauna and better consider their role in the freshwater ecosystem. Weitere et al. (2018) conceptualized how biofilm-dwelling micro-meiofauna stands out in terms of horizontal and vertical complexity of food webs and how they mediate energy transfers. This central position should be studied in-depth and this emerging database could become an open source project, disseminated and fed by further studies. Here, we present our progress on the collection and coding of morphofunctional characteristics for several micro-meiofauna species from the literature and how we used it to explore variations in functional traits related to trophic activity among the micro-meiofauna found in a biofilm community from a hypereutrophic pond (Aquitaine, France).

## Materials and methods

### Site sampling

Two experiments were conducted in the hypereutrophic lentic pond of Gazinet-Cestas (South-West France, geographical coordinates: 44°46'30.1" N, 0°41'44.3" W) during two different seasons (February 2017 for winter, April 2017 for spring). We placed plastic baskets containing glass slides (26.5 x 8 cm, Morin et al. 2007) in a floating device placed 20 cm beneath water surface to ensure light availability and avoid sediment contact. After 28 days of colonization, three replicates from the glass slides were sampled and biofilm was suspended in 100 mL of mineral water (Ondine<sup>®</sup>, St Benoît). Samples were aliquoted for subsequent analyses.

### Physicochemical conditions in the pond

Temperature, pH, conductivity and dissolved oxygen were measured twice a week *in situ* with dedicated probes (WTW, Germany). Light intensity in the water at the level of the glass slides was also measured with a LICOR LI-250 light meter. Water chemistry samples were collected near the biofilm development zone at the same time as biofilm sampling. We sampled three liters of pond water: 1 L for cation and anion analysis by ionic chromatography (Metrohm compact 881), total phosphorus analysis (AFNOR NF T 90.023 standard) and Kjeldahl nitrogen (AFNOR NF EN 25663 standard), 1L for suspended matter (NF EN 872 standard), 1L for

neutral and anionic pesticides using HPLC-MS-MS (Thermo Scientific UltiMate 3000 HPLC systems) and organic carbon using a Shimadzu TOC-V WP COT meter (NF EN 1484).

### **Dry weight and chlorophyll *a* measurements**

For dry weight measurements, 10 mL of the 100 mL of suspended biofilm were filtered on previously-weighed ashed GF/F filters ( $\varnothing$  47 mm, pore size: 0.7  $\mu\text{m}$ , Whatman). Then, filters were frozen for at least 12h, lyophilized (ALPHA 1-2 LD plus CHRIST freeze-drier), and then re-weighed. Dry weight data ( $\text{mg}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) were used to standardize chlorophyll concentration data.

For total chlorophyll *a* measurements, 10 mL of the 100 mL suspended biofilm were filtered with previously-weighed ashed GF/C filters ( $\varnothing$  47 mm, Whatman). Filters were frozen and stored until analysis. Then, chlorophyll *a* was measured using a UV-1800 Shimadzu spectrophotometer, according to the Lorenzen method (NF T90 117 standard; Lorenzen & Jeffrey 1980). Proportions of algae groups (blue, green, brown) were estimated using a Pulse Amplitude Modulated fluorimeter (PhytoPAM, Heinz Walz GmbH, Germany), in quartz cuvettes (Emitter-Detector Unit PHYTO-ED).

### **Species identification and counting**

The remaining biofilm sample was used to identify and to count micro-meiofauna individuals with an optic microscope DMLS-LEICA under phase contrast. Species identification was carried out on fresh material, based on taxonomic determination keys such as Foissner et al. (1995, 1994, 1992, 1991); Foissner (1996) for ciliates; Arcella Microworld website (<https://www.arcella.nl/>, 2019) for testate and naked amoebas and heliozoans; Rotifer World Catalog (<http://rotifera.hausdernatur.at/>, 2019) for rotifers, and (Tachet et al. 2010) for oligochaetes. Counting was also carried-out on fresh material, within 2 days of sampling, in a Nageotte chamber at x20 magnification and expressed in  $\text{Ind}\cdot\text{cm}^{-2}$ . For the analysis, all dominant species present during each season were accounted for, as well as taxa with a relative abundance over 0.01% per season, with reliable identification (at genus or species level) and for which we had the most information in the database. Organisms belonged to six principal phyla: Ciliophora, Amoebozoa, Cercozoa, Hacrobia, Rotifera and Annelida (Tableau 12). The L matrix describes the abundance of these taxa for each sample, for a total of 6 samples (3 glass slides collected for each of the 2 seasons).



## Morphofunctional traits database creation and formatting

### Morphofunctional traits database creation

Our database was created following that of Usseglio-Polatera et al. (2001) to allow continuity between macroinvertebrates and micro-meiofauna. We simplified terms to mix microfauna and meiofauna. The database is comprised of 36 morphofunctional traits such as general distribution, microhabitat, season and physicochemical preferences (current, pH tolerance, temperature tolerance, trophic status, salinity, saprobity, water type), life cycle (aquatic stage, population growth rate, survival strategy), general morphology (length, width, body shape), life-history (substrate relation, lifestyle), general physiology (respiratory organs), diet and feeding behaviour (food, feeding mode, diet prey capture mode and organs, trophic type, assimilable prey size, mouth size, mouth position), biotic relation with microalgae from symbiosis to consumption (microalgae relation), locomotion (organs of locomotion, movement speed, substrate relation) and reproduction (reproduction mode). Data for morphofunctional traits were gathered from the existing literature and from direct observations during our survey. Non-determined information is coded with “ND”. All literature used to fill the database and the database itself are presented in supplementary material. The supplementary material is an excel file with three sheets: the first one is informative; the second one is the database and the third one contains the list of numbered references used to fill the database. For some morphological criteria such as body length and width, mouth length and width, when information was not in taxonomy literature, measurements were done on our photos with Archimed (Microvision) integrated image analysis.

### Taxa traits table formatting (matrix Q)

Functional traits of trophic activity (Tableau 13) were selected prior to statistical analysis (23 traits), according to Usseglio-Polatera et al. (2001) and Gravel et al. (2016). We followed the selection criteria of Gravel et al. (2016) to choose appropriate traits linked to trophic activity, by putting aside traits implied in species' specific responses to environmental variations (Optimum temperature, pH tolerance, salinity tolerance). The following categories defined by Gravel et al. (2016) were kept because of their structuring impact: ‘Topological traits’ (a given predator can feed on the given prey species), ‘Consumption traits’ (functional and numerical responses of the prey and the predator) and ‘Life history traits’ (affecting demography and equilibrium abundances). Then, traits with missing information or non-informative traits were discarded. Non-informative traits were determined with the help of an independence test (Fisher's exact test) (Fisher 1935 from Agresti 1992) between each “functional trait” variable. By this mean, the trait “Microhabitat” proved to be non-discriminating for all the selected taxa ( $p$ -value = 0.94) and

was therefore discarded as non-informative. Each taxon that met several modalities for some traits, the Q matrix “traits per taxon”, was included as a binary table.

### **Data analysis**

T-student statistical tests were conducted on physicochemical measurements of the water to determine differences in environmental conditions between winter and spring.

Total chlorophyll *a* concentrations were standardized with dry weight and expressed in micrograms per milligrams of total dry weight. Then, t-student statistical tests were performed to determine differences between winter and spring. Algal group proportions (brown, blue and green) were expressed in percentage of total chlorophyll *a*.

The community-level weighted means of trait values (CWM) were used to compare the functional distance between communities; in both cases, trait values are weighted according to the relative abundance of species (Lavorel et al. 2008). CWM were calculated using the “FD” R package (Laliberté et al. 2014), by using the L and Q data matrices. For each taxon that met several modalities for some traits, CWM sums were re-proportioned and expressed in percentage (%).

## **Results**

### **Physicochemical measurements**

Physicochemical conditions in winter and in spring are presented in Tableau 11. The pH, the amount of organic matter, and total phosphorus were constant throughout both seasons. Organic carbon concentrations seemed higher in spring than in winter but the standard deviation in spring was high. Anions and cations were constant throughout seasons, except for Calcium. Other parameters were significantly different between both seasons. Temperature, suspended matter, organic nitrogen, conductivity and light intensity increased significantly from winter to spring, whereas dissolved oxygen concentrations decreased significantly.

### **Species abundance and species traits tables (Matrices L and Q)**

We identified 32 genera or species in the winter samples and 43 genera or species in the spring samples. According to the method of taxa selection (cf section II.4.2.4), 35 taxa were retained in the L matrix found in Tableau 12. For CWM analysis of the 23 functional traits identified, 16 informative traits with 128 modalities were retained in the Q matrix for the 35 taxa (Tableau 13).

Tableau 11: Physico-chemical conditions in winter (February 2017) and in spring (April 2017) during biofilm development (28 days, weekly samples, n=4). \*significant difference (t-test, p-value < 0.05).

Physico-chemical parameters	Winter	Spring	Physico-chemical parameters	Winter	Spring
Temperature (°C)	8.8±1.35*	15.9±1.43*	Silica (mgSiO <sub>2</sub> .L <sup>-1</sup> )	1.23±0.83	1.87±0.66
pH	6.2±0.1	6.6±0.3	Nitrates (µgN- NO <sub>3</sub> .L <sup>-1</sup> )	0.22±0.45	0.67±0.45
Suspended matter (mg.L <sup>-1</sup> )	45±4*	68±14*	Nitrites (µgN- NO <sub>2</sub> .L <sup>-1</sup> )	0.46±0.91	0.0±0.0
Organic matter (% of Sm)	67.8±8.3	73.7±8.5	Ammonium (mgN-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> .L <sup>-1</sup> )	0.05±0.06	0.01±0.01
Organic nitrogen (mgN.L <sup>-1</sup> )	2.68±0.47*	4.62±0.74*	<b>Calcium (mg Ca<sup>2+</sup>.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>6.91±1.72*</b>	<b>12.87±1.68*</b>
Dissolved organic carbon (mgC.L <sup>-1</sup> )	10±2	22±13	Chlorides (mg Cl.L <sup>-1</sup> )	19.36±0.33	19.55±0.95
Dissolved oxygen (mgO <sub>2</sub> .L <sup>-1</sup> )	7±1*	4±2*	Potassium (mg K <sup>+</sup> .L <sup>-1</sup> )	2.97±0.16	4.1±0.42
Light intensity at the samples level (µmol photon.m <sup>-2</sup> .s <sup>-1</sup> )	34.1±16.9*	78.2±30.5*	Sodium (mg Na <sup>+</sup> .L <sup>-1</sup> )	10.64±0.25	11.16±0.59
Conductivity (µS.cm <sup>-1</sup> )	139±3*	166±11*	Orthophosphate (mg P-PO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> .L <sup>-1</sup> )	0.00	0.00
Total phosphorus (mgP.L <sup>-1</sup> )	0.4±0.1	0.4±0.1	Sulphates (mg SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> .L <sup>-1</sup> )	18.61±1.15	12.47±4.47
			Magnesium (mg Mg <sup>2+</sup> .L <sup>-1</sup> )	1.05±0.42	2.12±0.19

Tableau 12: List of the 35 taxa in the L and Q matrices.

Taxon	Phylum	Taxon	Phylum
<i>Actinophrys sol</i>	Hacrobia	<i>Histiobalanium natans</i>	Ciliophora
<i>Amoeba leningradensis</i>	Amoebozoa	<i>Keratella</i> sp.	Rotifera
<i>Arcella discoidea</i>	Amoebozoa	<i>Lecane lunaris</i>	Rotifera
<i>Arcella gibosa</i>	Amoebozoa	<i>Lecane stokesii</i>	Rotifera
<i>Aspidisca cicada</i>	Ciliophora	<i>Litonotus lamella</i>	Ciliophora
<i>Brachionus quadridentatus</i>	Rotifera	<i>Nais</i> sp.	Annelida
<i>Campanella umbellaria</i>	Ciliophora	<i>Notommata oculifera</i>	Rotifera
<i>Centropyxis aculeata</i>	Amoebozoa	<i>Polychaos dubium</i>	Amoebozoa
<i>Centropyxis aerophila</i>	Amoebozoa	<i>Pristina</i> sp.	Annelida
<i>Cephalodella forficata</i>	Rotifera	<i>Quadrullella variabilis</i>	Amoebozoa
<i>Cinetochilum margaritaceum</i>	Ciliophora	<i>Rotaria rotatoria</i>	Rotifera
<i>Codonella cratera</i>	Ciliophora	<i>Saccamoeba limax</i>	Amoebozoa
<i>Coleps hirtus</i>	Ciliophora	<i>Sphaerastrum fockei</i>	Hacrobia
<i>Collotheca ornata</i>	Rotifera	<i>Stentor roeselii</i>	Ciliophora
<i>Diffugia</i> sp.	Amoebozoa	<i>Trichocerca similis</i>	Rotifera
<i>Euglypha acanthophora</i>	Cercozoa	<i>Trinema lineare</i>	Cercozoa
<i>Euglypha</i> sp.	Cercozoa	<i>Vorticella campanula</i>	Ciliophora
<i>Gastropus hyptopus</i>	Rotifera		

Tableau 13: List of 23 selected trophic activity traits and corresponding modalities Q matrix. *In italics, non-informative traits discarded for CWM treatment. Bold text, informative traits.*

<b>Traits</b>	<b>Modalities</b>
<b>Maximum length</b>	20 – 99 $\mu\text{m}$ ; 100 – 249 $\mu\text{m}$ ; 250 – 999 $\mu\text{m}$ ; 1000 – 20000 $\mu\text{m}$
<b>Food</b>	Filamentous algae; Unicellular algae; Green algae; Filamentous green algae; Unicellular green algae; Bacteria; Ciliates; Cyanobacteria; Detritus; Diatoms; Microalgae; Mineral particles; Small metazoans; Phytoflagellates; Protists; Heterotrophic protists; Rotifers; Sulfurous bacteria; Zooflagellates
<b>Diet</b>	Bacterivorous; Cannibalism; Detritivorous; Herbivorous; Histophage; Macrophage; Microphage; Omnivorous; Predator
<b>Relation to microalgae</b>	None; Commensalism; Primary consumer; Symbiosis
<b>Feeding mode</b>	Absorber/sucker; Crusher; Filterfeeding; Phagocytosis; Scraper
<b>Lifestyle</b>	Colonial; Solitary
<b>Season</b>	Winter; Spring; Summer; Autumn
<b>Assimilable prey size</b>	0 – 20 $\mu\text{m}$ ; 21 – 50 $\mu\text{m}$ ; >50 $\mu\text{m}$ ; Not restricted by predator size
<b>Mouth position</b>	None; Anterior; Lateral; Posterior; Ventral
<b>Prey capture mode/ organs</b>	Deep oral cavity; Oral cilia (Adoral Zone of membranelles (AZM)); Oral cilia (perioral kinetids); Oral cilia (kinetosomes, undulating membrane); Oral cilia (paroral haplokinety); Oral cilia (adoral membrane = pseudo AZM); Oral cilia (Paroral membrane (PA)); Oral cilia (polykinetids); Coronal cilia; Cytopharynx; Cytostome; Extrusome; Infundibulum; Mastax forcipate; Mastax malleate; Mastax ramate; Mastax uncinata; Mastax virgate with long fulcrum; Oral basket; Peristome; Phagotrophy; Pseudopodium / axopodes; Proboscis; Vestibule
<b>General distribution</b>	Anaerobic, sludge or pelagic area; Aphotic; Benthic; Cosmopolitan; Epizoic; Low dissolved oxygen; Interstitial; Pelagic; Periphyton; Photic; Soil
<i>Microhabitat</i>	Biofilm; Mud; Sand; Silt; Land; Mosses; Sphagnum; Sewage sludge; Gravel; Organic detritus; Shoots/roots; Blocks/rocks/stones; Macrophytes; Microphytes
<b>Organs of locomotion</b>	None; Cilium; Cirrus; Coronal cilia; Toe; Pseudopodium / Cytoplasm; Setae
<b>Movement speed</b>	Very slow; Slow; Medium; Fast; Very fast; Null
<b>Reproduction mode</b>	Autogamy; Conjugation; Gametogamy; Fixed isolated eggs; Free isolated eggs; Oviparous; Paratomy; Parthenogenesis; Asexual reproduction; Sexual reproduction; Fission
<b>Survival strategy</b>	None; Diapause; Dormancy; Extrusome; Oviposition; Protection of the body; Zooid
<b>Respiratory organs</b>	Gills; Intestine; Cell membrane; Integumentary system
<b>Substrate relation</b>	Endobenthic; Permanent fixation; Temporary fixation; Walker; Swimmer; Crawling/gliding
<i>Minimum length</i>	Values
<i>Maximum width</i>	Values
<i>Minimum width</i>	Values
<i>Trophic type</i>	Heterotroph; Mixotroph
<i>Trophic status</i>	Oligotrophic; Mesotrophic; Eutrophic; Hypereutrophic; Sewage station

### Functional composition of the communities

Of the 23 traits related to trophic activity, 11 were included in the analysis (traits without redundancy, bringing supplementary information). The distribution and proportions of 9 of the 11 functional traits directly involved in trophic activity for winter and spring in a mature biofilm (age: 28 days) are presented in Figure 25. Trait composition was more diversified and balanced in the winter community (Figure 25). In the spring community, few traits were dominant (Figure 25). For example, for the trait 'Maximal length', 80% of micro-meiofauna organisms were of a size comprised between 20 and 99  $\mu\text{m}$  in spring, while in winter, 33% were of a size comprised between 100 and 249  $\mu\text{m}$  and 45 % were between 250 and 999  $\mu\text{m}$ . In winter, 'Diet' was diversified but bacterivorous and microphage organisms represented 50% of the community. In spring, herbivorous (30%), macrophage (27%) and predator (26%) taxa were dominant. This was reflected by preferential food type: microalgae (39%) and small metazoans (35%). In winter, most of the food consumed was bacteria (25%).

Concerning 'relation to microalgae', in winter, two thirds of the community had a link with microalgae. In spring, almost all identified components of the community presented a relation of consumption (54%) or symbiosis (43%) with microalgae. For these two seasons, symbiosis and consumption were equitably distributed. Dominant feeding mode in winter and spring was completely different. In winter, filter-feeding was dominant while in spring, it was phagocytosis. This proceeded together with the dominant class of 'Assimilable prey size' in spring: not restricted by predator size (79%). Phagotrophy was frequent in winter and in spring. The major difference was in prey capture organs. In winter, these organs were diversified and balanced but all of them were involved in filter-feeding mode with an anterior mouth position (50%), whereas in spring, smaller organisms with 'pseudopodium/axopodes' were dominant (34%) without any mouth. Coronal cilia, pseudopods and cilia constituted the main 'Organs of locomotion' in winter. In spring there were no organs of locomotion.

### Total chlorophyll a concentration and algae group proportions

Total chlorophyll *a* concentration and algae group proportions per season in a mature biofilm (age: 28 days) were measured. The number of autotroph organisms was significantly higher in spring than in winter (t-test,  $p < 0.05\%$ ), with 3.42  $\mu\text{g chlo } a.\text{mg}^{-1}$  DW and 1.56  $\mu\text{g chlo } a.\text{mg}^{-1}$  DW, respectively. In winter, blue and green algae were equitably distributed (40%), with brown algae being less common (20%). In spring, the proportion of blue algae increased to 50% of the total algal community. The proportion of green algae remained constant and that of brown algae decreased to 10%.

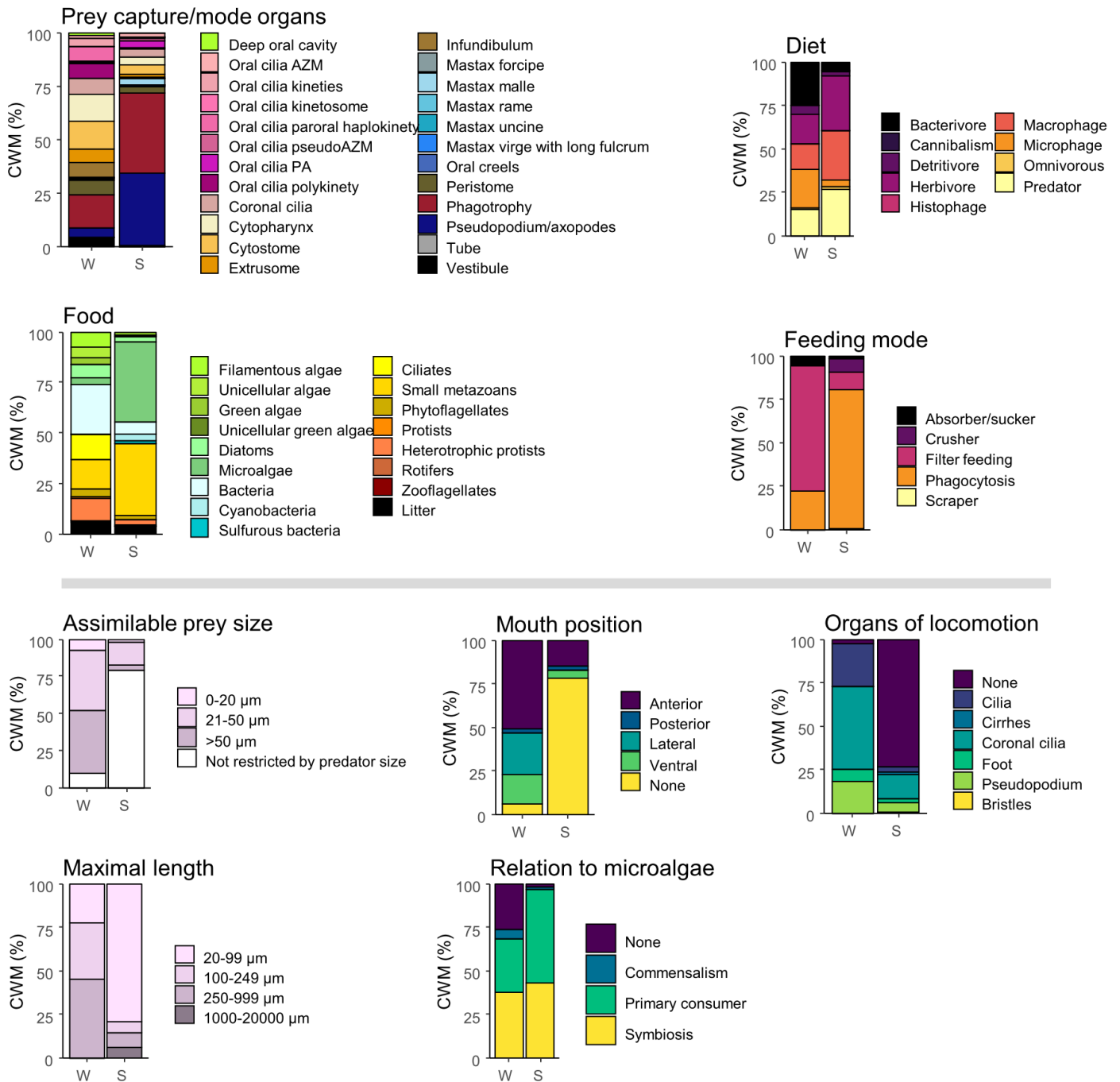


Figure 25: Community weighted means (CWM) in percentage (%) for 9 of the 11 morphofunctional traits most directly involved in trophic activity according to the season after 28 days of biofilm colonization.

## Discussion

### Advantages of morphofunctional traits over taxonomy

Over the last three decades, the use of the morphofunctional traits approach to explore and understand the diversity of forms and functions, how they relate to environmental conditions and some aspects of ecosystem functioning emerged as a new challenge (Violle et al. 2007; Gravel et al. 2016). Indeed, one of the main problems with taxonomy is taxonomical mistakes, especially because of the lack of nomenclatural homogenization of organism names and classification. Taxonomic errors can cause bias in the comparison of community assemblages, compromise the interpretation of experimental results, and generate misinterpretation of the bioindicators of environmental pollution (Bortolus 2008). By morphofunctional traits standpoint instead of a taxonomical one, we can create relevant functional groups by pooling together different organisms with similar functions. This functional groups approach presents some advantages. Studying ecosystems from a morphofunctional point of view reduces taxonomical bias (Pratt & Cairns 1985), and may simplify inferences when one wants to link community structure with ecosystem functions (Levine 2015). It also performs better when one wants to compare communities across different geographical scales (Violle et al. 2007).

### Implementation of the first micro-meiofauna morphofunctional traits database

To our knowledge we propose here the first integrative database of traits for freshwater micro-meiofauna. We assumed that microfauna and meiofauna performed similar functions in the biofilm (Weitere et al. 2018) independently of the number of cells composing their bodies. Traits of protozoans and small metazoans can be very similar such as the coronal cilia as locomotion and feeding criteria for the family of unicellular vorticellids (*Vorticella* sp (Ehrenberg 1831), *Carchesium polypinum* (Linnaeus 1758), *Campanella umbellaria* (Linnaeus 1758)) and pluricellular rotifers of Eurotatoria class (*Brachionus quadridentatus* (Hermann 1783), *Lecane stokesii* (Pell 1890), *Rotaria rotatoria* (Pallas 1766)) (see the database in supplementary material). The present database follows the work of Neury-Ormanni et al. (2016), and shows the importance of microscopic herbivores (2µm to 2mm) in the function of local environment such as biofilm.

The interest of this project is to favour scientists collaborations around micro-meiofauna issues. Additional species and genera will be added gradually and missing information (identified as “ND”) will be filled-in progressively (welcoming data additions by other collaborators). The latest updated version will be provided on demand by the authors. The aim of this database is, firstly, to gather information about micro-meiofauna and facilitate accessibility to taxa information. The identification of some traits could be automatized in the future with the development of microscopy tools. For example, several morphological features could be



measured and categorized by flow imaging cytometers coupled to automated image analysis softwares, such as the FlowCam (Fluid Imaging). Such image classifications based on computer-aided image recognition and particle measurement have already been performed successfully for phytoplankton (Kydd et al. 2018). Behavioural traits such as those related to trophic activity or locomotion could be detected by videomicroscopy. Erken et al. (2012) combined flow cells with videomicroscopy to analyse the feeding strategy of surface gliding heterotrophic flagellates. All those works could be a benefit to supply and/or refine the micro-meiofauna morphofunctional traits database in the future. Secondly, this database could be used as a tool to study traits dynamics and facilitate comparisons between taxonomically different communities at larger scales, temporal or geographical. It may also be helpful to put it in relation with other compartments of the food web, such as primary producers' traits database, and model traits dynamics in trophic relations. Schmitz et al. (2015), for instance, proposed to connect community-level interactions with ecosystem functioning by combining prey species (and associated traits) and consumer species (and associated traits) in a modular trophic unit. This conceptualization could improve consideration of flexibility in morphofunctional traits as a function of species interactions.

### **Seasonal variability of morphofunctional traits of micro-meiofauna in algal biofilms**

In ecology, the relationship between biodiversity and ecosystem functions remains a fundamental question often linked with the structure of the biological community (Paine 1966), or even ecosystem structure. For instance, Martin et al. (2016) showed that fish diversity in rivers impacted habitat properties. In the context of biological structure and bottom-up/top-down control in periphyton, Hillebrand (2002) observed that top-down effects were faster than bottom-up effects. Traits are involved directly in ecosystem functioning via the *preferenda* of each species in terms of abiotic conditions and resource use, and indirectly through their impact on the structure of the food web, and thereby on trophic cascades (Gravel et al. 2016).

The community weighted mean (CWM) is probably the most widely used single trait metric in trait-based ecology research (Muscarella & Uriarte 2016). Meant to represent the most dominant traits of the community, it facilitates comparisons with other functional diversity functions (Pakeman et al. 2008). Here we used the CWM to study 9 of the 11 micro-meiofauna morphofunctional traits related to trophic activity between winter and spring.

Biofilm micro-meiofauna organisms show various feeding modes adapted to their food, from bacteria or microalgae to protozoans, and even small metazoans (Pratt & Cairns 1985; Weitere et al. 2018). Tolerance thresholds to some abiotic parameters contribute to meiofaunal community structure. For example, growth temperature optimum and tolerance range may vary between rotifer species (Bērziņš & Pejler 1989). In the case of biofilms, where main primary



producers are photosynthetic, abiotic parameters (Sekar et al. 2002; Kendrick & Huryn 2015) indirectly affects grazers (Norf & Weitere 2010).

Seasonal variations of climatic and physicochemical parameters seem responsible of micro-meiofauna assemblage change: in this study, assemblages were different between winter and spring as it had already been observed for ciliates in biofilm (Watson et al. 2015), and protozoans in other environments: amoeboids in European peat bogs (Jassey et al. 2016) and ciliates from North German lakes (Pfister et al. 2002). Winter organisms were composed of organisms of different size equitably spread between 20 and 999  $\mu\text{m}$ , moving with cilia and coronal cilia, feeding on little prey size (especially microphage and bacterivorous) with filtering capture mode (oral cilia, coronal cilia) (Figure 25). The dominance of one heliozoan species (*Sphaerastrum fockei* (Archer 1869)) in spring explained the dominance of some functional traits: smaller organisms (20-99 $\mu\text{m}$ ) which feed on prey whose size is not a limiting factor. The abundance of this species (70% of counted micro-meiofauna at 28 days) indirectly caused high scores for phagotrophy, use of pseudopodium/axopodes in capture mode, no mouth and the phagocytosis feeding mode (Figure 25). Despite its dominance, spring community was also composed of bigger organisms than winter (100 – 20000 $\mu\text{m}$ ), feeding on variable prey sizes (especially herbivores, macrophage and predators) (Figure 25).

Total chlorophyll concentration was higher in spring than in winter. Increases in temperature and light intensity (Tableau 11) enhance primary production development (Villanueva et al. 2011). This development was accompanied by an increase of the micro-meiofauna having a link with microalgae in terms of symbiosis and consumption. Organisms filled with symbiotic microalgae such as the rotifer *Itura viridis* (Segers) or the heliozoan *Sphaerastrum fockei* were much preferentially found in spring. Herbivores became more dominant in the spring (Figure 25).

In aquatic environments, biofilms are often dominated by diatoms, whereas cyanobacteria are frequently found as a minor component (Callow 2000). We found the contrary to be true in this study in terms of algae group proportion in winter and in spring (3.3). The share of diatoms decreased from winter to spring, probably due to the increase of grazing pressure. These algae are characterized by a silica frustule (Cox 1996) which can be difficult to digest for generalist organisms such as filter feeders. We note, in spring, the appearance of more specialist feeding modes able to break diatom walls by crushing (10% crushers; Figure 25). We observed a diatom size increase in the samples from winter ( $25\pm 2\mu\text{m}$ ) to spring ( $35\pm 2\mu\text{m}$ ) (microscopy measurements performed on biofilm samples). In parallel, assimilable prey size of micro-meiofauna also increased (Figure 25).

## Conclusions

Results showed a net difference in micro-meiofauna structure and diversity between two seasons within a year (winter and spring 2017) for a given location with associated seasonal abiotic conditions (e.g. light, temperature). Heliozoan dominance in spring was particularly highlighted in this study, explaining the high scores in associated traits (Prey capture/mode organs: phagotrophy, pseudopodium/axopodes; Feeding mode: phagocytosis). Despite the heliozoan dominance, food web topologies were different between spring and winter. Spring food web was more complex than winter food web. In winter, micro-meiofauna rather fed on small preys (filter-feeding), while in spring feeding modes were diversified and not limited by prey size (Graphical abstract).

The database presented in supplementary material is evolutive and will be continuously fed with new data (welcoming addenda by collaborators). Next versions will be available by emailing authors. The aim of this database is, firstly, to gather information about micro-meiofauna and facilitate accessibility to taxa information. Secondly, this database could be used as a tool to study traits dynamics and facilitate comparisons between taxonomically different communities at larger temporal or geographical scales. It may also be helpful to put it in relation to other compartments of the food web, such as primary producers' traits database, and observe traits dynamic in trophic relations. Also, morphofunctional approaches could be advantageously used to highlight which functional traits are impacted by toxic contamination in order to better understand destabilizing ecosystem effects in the context of polluted aquatic systems.

## Acknowledgement

We thank Mélissa Eon and Brigitte Delest, Betty Chaumet and Aurélie Moreira for physico-chemical and toxic analyses; Sylvia Moreira for water chlorophyll measurements. We are grateful to Nabil Majdi, Walter Traunspurger and Jenny Schmid-Araya for inviting us to contribute to the Meiofauna special issue. We thank the reviewers which gave helpful comments that improved the paper considerably and Emilie Saulinier-Talbot for English grammar. This work was partially supported by the Adour-Garonne Water Agency.

### IV.3 Fluctuations saisonnières des traits morpho-fonctionnels de la micro-méiofaune liés à l'activité trophique

L'analyse de la variabilité saisonnière des traits morphofonctionnels de la microméiofaune liés à l'activité trophique sur un biofilm mature a montré qu'il existe une nette différence entre la saison hivernale et la saison printanière en termes de structure et de diversité (cf section IV.2). Pour étudier les fluctuations saisonnières sur une année, les saisons estivales et automnales ont été ajoutées aux analyses. Des lames de verre ont été colonisées par du biofilm pendant 28 jours (cf section II.2.3.1) en été (Juillet 2018) et en automne (Novembre 2018) de l'année suivant les premières expérimentations d'hiver et de printemps (cf section IV.2). Les conditions environnementales ont été relevées aux jours d'échantillonnage (cf section II.3) et la micro-méiofaune a été identifiée et comptée (cf section II.4.2).

La Figure 26 présente les réseaux trophiques qui se sont établis saisonnièrement dans le biofilm âgé de 28 jours de l'étang de Gazinet-Cestas (Aquitaine, France). Ces réseaux trophiques simplifiés ont été réalisés à partir des résultats des Community Weighted Means (cf section IV.2), dont les histogrammes d'été et d'automne ont été mis à disposition dans l'annexe 3. Ces résultats démontrent que la diversité fonctionnelle liée à l'activité trophique de la micro-méiofaune varie en fonction des saisons. En hiver, la micro-méiofaune était principalement représentée par une microfaune herbivore, bactérivore et microphage qui s'alimentait par filtration. Au printemps, la micro-méiofaune était herbivore, macrophage et prédatrice, majoritairement peuplée d'une microfaune assimilant ses proies par phagocytose et d'une méiofaune broyeuse. En été, la micro-méiofaune était prédominée par une microfaune qui filtrait et raclait bactéries, détritus et microalgues. La méiofaune était capable d'assimiler des proies par succion. La saison estivale était marquée par la présence d'un escargot de la macrofaune (*Physa* sp.) qui broutait de manière non sélective sur le biofilm (Hunter 1980), structurant ainsi les échelons inférieurs du réseau trophique (Guasch et al. 2016b). En automne, la topologie de la chaîne alimentaire se décomplexifiait. La micro-méiofaune était principalement représentée par la microfaune filtreuse bactérivore et racleuse détritivore. En effet, les détritivores sont généralement plus présents sur la fin de l'été et le début de l'automne, lorsque les feuilles tombent des arbres et les plantes meurent car ces microorganismes aquatiques participent à leur décomposition (Herbst 1982; Garden & Davies 1988).

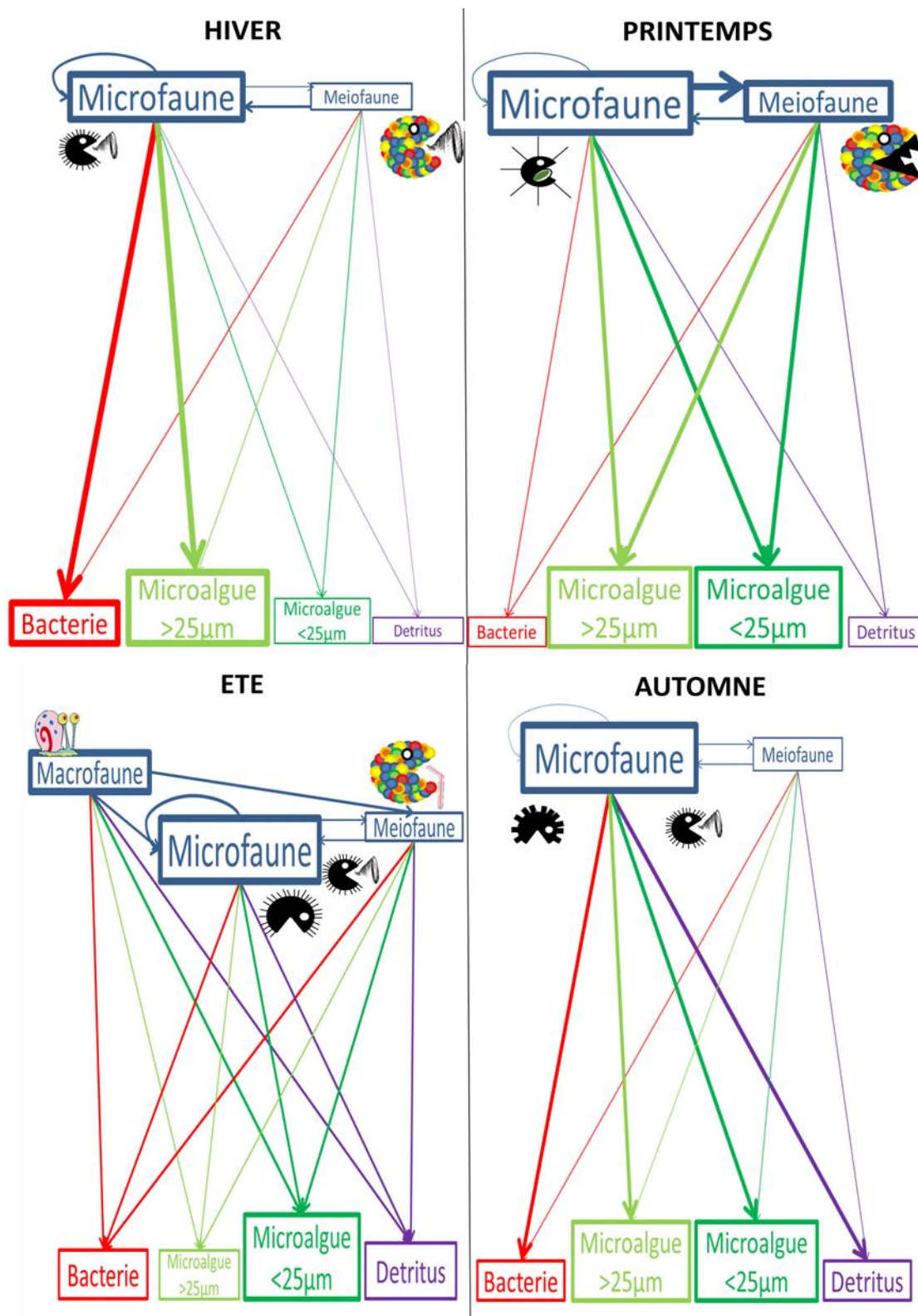


Figure 26: Réseau trophique simplifié et fonctions trophiques principales en fonction des saisons. La taille et la largeur des flèches et des cases correspondent aux proportions des traits morphofonctionnels de la micro-méiofaune extraite des CWM calculés à partir des abondances des espèces (Ind.cm-2).

## IV.4 Conclusions

L'analyse de la variabilité saisonnière des traits morphofonctionnels de la microméiofaune liés à l'activité trophique sur un biofilm mature a montré qu'il existe une nette différence entre les saisons en termes de structure et de diversité. Par l'approche fonctionnelle, nous avons simplifié la comparaison de quatre communautés éloignées. En effet, le biofilm s'est développé sur la même situation géographique (44°46'30.1"N, 0°41'44.3"W) pendant un même nombre de jours (=28) mais a été soumis à des contraintes abiotiques saisonnières différentes. L'étude des relations trophiques primaires permet de rendre compte de l'état fonctionnel du biofilm. Les traits morphofonctionnels de la micro-méiofaune liés à l'activité trophique sont saison-dépendants. En hiver la micro-méiofaune remplit des fonctions de bactérivores ; au printemps ce sont plutôt des herbivores et des prédateurs ; en été la macrofaune prédatrice est très structurante et en automne la micro-méiofaune joue principalement le rôle de détritivore.

La base de données présentée dans cet article est une amorce qui continuera d'être alimentée et pourrait servir à la compréhension du fonctionnement d'écosystèmes microbiens benthiques ou dans des études de biomonitoring (<https://stratus.irstea.fr/d/a36c1b3e32224fd9b182/>). En effet, depuis une dizaine d'années, les traits morphofonctionnels des compartiments algaux (Derot et al. 2020) ou des macroinvertébrés (Usseglio-Polatera et al. 2001) sont aussi utilisés dans le domaine de la bioindication pour déterminer la qualité des écosystèmes aquatiques (Van den Brink et al. 2018). En dépit de sa position intermédiaire entre le pico- et nano-plancton et les niveaux trophiques supérieurs (Weitere et al. 2018), la communauté de micro-méiofaune est encore peu étudiée notamment en écotoxicologie.

**Chapitre 5 : Evolution  
fonctionnelle du biofilm  
soumis à de multiples  
pressions naturelles et  
anthropiques**

## Chapitre V Evolution fonctionnelle du biofilm soumis à de multiples pressions naturelles et anthropiques

### V.1 De l'échelle individuelle/populationnelle à l'échelle de la communauté

Dans la recherche en écologie, la complémentarité entre les observations de terrain et les approches expérimentales à différentes échelles (individus/populations/communautés) a déjà été soulignée. Avec la prolifération de contaminants émergents (Nilsen et al. 2019), cette complémentarité d'approche s'applique aussi à l'écotoxicologie (Artigas et al. 2012a; Gessner & Tlili 2016). Un écosystème se définit comme un assemblage de composés biotiques et abiotiques en constante interaction (Odum & Barrett 1971). De nombreux facteurs structurent taxonomiquement et fonctionnellement un écosystème. L'étude de ces stress multiples passe par la combinaison de facteurs et d'échelles. En effet, plus il y a de données générées à ces différentes échelles, plus les prédictions sont précises et statistiquement efficaces (Gessner & Tlili 2016).

Au cours de ce projet de thèse, des travaux ont été réalisés à plusieurs échelles. Diverses réponses ont d'abord été observées sur des modèles d'organismes diversifiés et complémentaires. La variabilité interspécifique de la sensibilité aux contaminants a été mise en évidence aussi bien sur la microméiofaune que sur les microalgues. Les tests écotoxicologiques menés sur huit espèces de nématodes de milieux variés ont révélé que malgré leur tolérance à l'imidaclopride (insecticide) et au diuron (herbicide), deux espèces de nématodes étaient plus sensibles que les autres sur le critère de mortalité (cf section III.2.3). Les deux diatomées pennées *Planothidium lanceolatum* et *Gomphonema gracile* ont aussi montré des sensibilités différentes à ces deux pesticides, *P. lanceolatum* a démontré une phase de latence plus longue que sa congénère en réponse à l'imidaclopride (cf section III.3.2.2).

Les organismes participent aux conditions environnementales de leur habitat (Hillebrand & Kahlert 2001; Martin et al. 2016), par leur simple présence dans un même environnement ils peuvent s'influencer les uns et les autres (compétition ou coexistence interalgale et potentielle prédation ; cf section III.3.2.2). Les interactions biotiques, principalement trophiques, ont un impact non négligeable sur la structure et la diversité de l'écosystème (Hillebrand 2002; 2004; 2008). Les consommateurs primaires exercent un effet top-down sur la densité et la croissance des algues par l'action de broutage et l'enrichissement du milieu (fèces, mucus des nématodes, décomposition des cadavres) (cf section III.3.2.2 et III.3.3.2). Par leur fonction de ressource alimentaire, les microalgues effectuent un contrôle bottom-up sur les consommateurs primaires



(cf section III.3.2.2 et III.3.3.2). L'efficacité de l'apport nutritionnel pour le développement du brouteur et de sa population dépend aussi de l'appétence de ces algues (cf section III.3.3.2). L'impact chimique peut avoir des effets sur ces interactions biotiques de manière directe et indirecte : l'effet top-down peut être réduit lorsque l'insecticide affecte les brouteurs (cf section III.3.3.2), l'effet bottom-up peut être variable si la croissance de population des algues est réduite (moins de nourriture) ou si leur appétence varie obligeant les brouteurs à changer leurs préférences alimentaires (cf section III.3.3.2).

Par le biais d'expériences en microcosmes sur des organismes modèles dans des conditions simplifiées, l'observation des effets de facteurs biotiques et abiotiques, mesurés individuellement ou en combinaison, a été rendue possible. Dans un contexte de stress multiples, beaucoup d'études sont nécessaires pour démêler leurs impacts seuls et en combinaison (Ormerod et al. 2010). Ces types d'expériences permettent la répétabilité et un contrôle explicite des conditions (Liess et al. 2008) et sont importants à prendre en compte et à corrélérer dans un cadre théorique afin de prédire les effets aux différents niveaux d'organisation biologique. Puisqu'en effet, la simplification des relations permet d'observer les effets sous différents angles. Par exemple, au cours des expériences du chapitre 3, les réponses des microbrouteurs et des microalgues ont pu être distinguées. Ainsi, nous avons mis en évidence la variabilité interspécifique de la sensibilité aux contaminants (cf section III.2.3 et III.3.2.2) et la modification des relations trophiques sous pression pesticide (cf section III.3.3.2).

Pour extrapoler les informations obtenues en laboratoire à la situation réelle de terrain, des études à l'échelle de la communauté sont nécessaires et complémentaires pour pallier les nombreuses incertitudes. En effet, en extrapolant du niveau individuel au niveau communautaire, les interactions biologiques et les facteurs environnementaux « naturels » ne sont pas considérés. Le développement structurel et taxonomique du biofilm est fortement dépendant des facteurs environnementaux physiques et chimiques (Sabater et al. 2007), qui fluctuent avec les saisons. La composition en espèces de diatomées périphtiques varie considérablement entre l'été et l'hiver (Duong et al. 2008). Les communautés de méiofaune et de macrofaune benthiques oscillent aussi saisonnièrement (Rudnick et al. 1985; Meurer & Netto 2007). Les variations saisonnières d'un biofilm d'eau douce en milieu hypereutrophe ont été étudiées (cf section IV.2 et I.1). Ces variations d'assemblages saisonniers influençant les relations biotiques (Meurer & Netto 2007; Semprucci et al. 2019), l'évolution de la microméiofaune a été abordée par l'approche des traits morphofonctionnels. En termes de relation trophique, nous avons observé qu'à chaque saison correspondait une fonctionnalité. Les bactérivores étaient plus présents en hiver. Au printemps la communauté accueillait plutôt des herbivores et prédateurs. En été, nous avons noté l'importance des gros prédateurs temporaires (*Physa* sp.). Enfin en automne, la majeure partie de la



communauté était composée de détritivores (cf section IV.2). La variabilité saisonnière taxonomique et fonctionnelle de la microméiofaune (cf section IV.2) pourrait influencer sa sensibilité aux contaminants. En effet, la distribution des traits de la microméiofaune pourrait être modulée par les effets éventuellement indirects d'interaction entre la sélection par les contaminants et par les facteurs saisonniers.

## V.2 Des contraintes abiotiques saisonnières plus structurantes que l'impact chimique

### V.2.1 Introduction

La prédictibilité de la sensibilité d'un écosystème passe par la compréhension des interactions entre sa structure et son fonctionnement (Artigas et al. 2012a). Les traits bioécologiques sont de bons réflecteurs du fonctionnement d'un écosystème (Usseglio-Polatera et al. 2001). Pour cibler les effets des contaminants sur une communauté, les études impliquant les traits morphofonctionnels se multiplient en écotoxicologie. En effet, il est difficile de tester toutes les combinaisons d'espèces et de toxiques pour déterminer la vulnérabilité d'un écosystème. Les traits morphofonctionnels ont peu à peu émergé en tant que descripteur de communautés et sont de plus en plus utilisés pour déterminer les altérations fonctionnelles dues à des contaminations d'origine anthropique (Liess et al. 2008; Rubach et al. 2011; Artigas et al. 2012a; Gessner & Tlili 2016). Pour approfondir notre compréhension des réponses du biofilm aux contaminants, nous avons souhaité analyser les variations fonctionnelles de communautés périphtiques développées en milieu hypereutrophe aux différentes saisons : hiver, printemps, été et automne sous la pression d'un herbicide (diuron) et d'un insecticide (imidaclopride) seuls et en mélange. Les compositions en consommateurs primaires ayant des effets considérables sur les processus et mécanismes d'un écosystème (Duffy et al. 2001; Hillebrand & Kahlert 2001), nous avons examiné les traits morphofonctionnels liés à l'activité trophique.

Pour ce faire, des lames de biofilm mature (28 jours, correspondant aux temps finaux d'exposition *in situ* de la section II.2.3.1) ont été transférées dans quatre aquariums dans une salle thermorégulée, dont la température et la photopériode était ajustée selon les saisons (Tableau 4). Quatre modalités ont été testées : un aquarium témoin, un contaminé au diuron à  $5\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , un autre à l'imidaclopride à  $5\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  et une modalité présentant un mélange binaire de ces deux substances à  $5\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , chacune durant 14 jours dans de l'eau de l'étang filtrée à  $30\mu\text{m}$  (cf section II.2.3.3). Le choix des molécules et de leur concentration a été décidée en fonction de leur occurrence dans le milieu, le diuron et l'imidaclopride faisant partie du « Top 15 » des pesticides les plus fréquemment détectés dans les cours d'eaux français (Soes 2015). Les analyses des

paramètres physico-chimiques de l'eau et du biofilm ont été réalisées (cf section II.3 et II.4) ainsi que des comptages de microméiofaune (cf section II.4.2.4 et II.4.2.5), au temps initial, après 7 et 14 jours d'exposition, à raison de 3 réplicats par traitement. Une RLQ a été conduite sur l'ensemble des données des saisons et traitements pour évaluer l'impact structurant de la saisonnalité et de la contamination. Puis, des « Principal Response Curves » ont été réalisées d'abord pour chaque saison en fonction de la durée d'exposition puis sur les dates finales (14 jours) de chaque saison, afin de caractériser l'évolution temporelle des communautés soumises à un stress toxique, par rapport aux trajectoires témoin.

## V.2.2 Evolution saisonnière des communautés et impact des pesticides

Le plan principal de l'analyse RLQ (Figure 27) est fortement explicatif avec 71% de l'inertie totale expliquée par le premier axe et 19% par le deuxième axe. Le premier axe est assimilable à la distinction des saisons (Figure 27, .A) qui s'est avéré être le facteur majeur de la structuration morphofonctionnelle des communautés, plus que l'impact chimique (Diuron, Imidaclopride ou mélange binaire) et le temps d'exposition aux pesticides (7 et 14 jours). Les saisons sont caractérisées par des conditions environnementales différentes (Figure 27, .B). En hiver, on retrouve des concentrations en phosphore total, azote organique et chlorophylle *a* dans l'eau plus élevées. Les algues vertes sont dominantes dans la colonne d'eau. Pour la saison printanière, les concentrations en phosphate et en ammonium dans l'eau sont plus fortes. L'indice d'autotrophie *y* est plus élevé que pour les autres saisons. Les algues bleues sont dominantes dans l'eau et dans le biofilm du printemps, et les diatomées périphytiques sont plus présentes que les algues vertes qui sont complètement anti-corrélées à cette saison. Le milieu environnant des communautés estivales est principalement caractérisé par l'augmentation des températures et des concentrations en nitrates et en silice dans l'eau. Le groupe algal des diatomées domine les microalgues planctoniques. Les relevés d'automne occupent une place intermédiaire entre toutes les autres saisons. Les variations saisonnières des paramètres climatiques et physico-chimiques semblent principalement responsables des changements au sein des fonctions de la microméiofaune. Jiang et al. (2007) ont d'ailleurs démontré que la structure, en termes d'espèces, des communautés de protozoaires du lac Donghu était principalement dépendante de la variabilité des paramètres de qualité de l'eau (azote, phosphore, oxygène dissout). Nous avons aussi vu précédemment que les fonctions trophiques de la microméiofaune variaient d'une saison à l'autre (cf Chapitre IV).



Figure 27: Résultats des deux premiers axes de l'analyse RLQ : axe 1 (71%) et axe 2 (19%). (A) Scores des relevés des aquariums de toutes les saisons (H= Hiver, P=Printemps, E=Eté, A=Automne), à chaque temps d'exposition (0=Temps initial, 7= 7 jours d'exposition, 14=14 jours d'exposition). (B) Scores des conditions physico-chimiques et climatiques : (gr\_b) concentration en algues vertes dans le biofilm, (bl\_b) concentration en algues bleues dans le biofilm, (br-b) concentration en algues brunes dans le biofilm, (gr\_w) concentration en algues vertes dans l'eau, (bl\_w) concentration en algues bleues dans l'eau, (br-w) concentration en algues brunes dans l'eau, (Chla\_w) concentration en chlorophylle a dans l'eau, (autotrophy) indice d'autotrophie, (Cond) Conductivité de l'eau, (Temp) Température de l'eau, (pH) pH de l'eau, (O2) Oxygène dissout, (Ptot) Phosphore total, (PPO4) Orthophosphates, (NNorg) Azote organique, (NNO3) Nitrates, (NNO2) Nitrites, (NNH4) Ammonium, (SiO2) Silice, (Cl) Chlorure, (Na) Sodium, (SO4) Sulfates, (Mg) Magnésium, (Ca) Calcium, (K) Potassium.

Pour s'affranchir de l'impact des facteurs saisonniers sur la structure des communautés, nous avons conduit des « Principal Response Curve » (PRC) pour chaque saison, permettant d'évaluer une divergence de trajectoire temporelle des traitements, en comparaison des témoins. Ces PRC sont présentées dans les annexes 4 à 7. Elles confirment que l'impact chimique n'a d'effet significatif sur les communautés de micro-méiofaune du point de vue fonctionnel pour aucune des saisons étudiées. Les taxons de la communauté « perturbée » sont différents mais fonctionnellement redondants avec ceux de la communauté témoin. La redondance fonctionnelle est un concept dans lequel différentes espèces remplissent les mêmes fonctions dans un écosystème de manière à ce que les changements de diversité d'espèces d'une communauté ne se répercutent pas sur le fonctionnement des écosystèmes (Lawton & Brown 1994). Par exemple, pour maintenir les capacités d'accumulation des nutriments d'un biofilm périphytique malgré les fluctuations saisonnières de température, la communauté s'adapte en termes de composition et de richesse spécifique (Sun et al. 2019). A des concentrations environnementales ( $5\mu\text{g.L}^{-1}$ ), les changements de composition de la microméiofaune affectent peu les processus de l'écosystème. Pourtant, à ces mêmes concentrations, les expériences du Chapitre III, ont démontré que le diuron et l'imidaclopride impactaient les relations trophiques (comportement des microbrouleurs, disponibilité et valeur nutritionnelle des proies). On avait ainsi supposé que ces effets pouvaient se propager le long des chainons supérieurs de la chaîne trophique de l'écosystème. Mais à l'échelle de la communauté, la coexistence spatiale des organismes (la richesse spécifique) et leur relation avec le milieu et les autres organismes augmentent les capacités de résilience d'une communauté (Loreau 2004; Allison & Martiny 2008). En effet, les organismes plus sensibles peuvent être remplacés par d'autres organismes ayant les mêmes fonctions. La résilience de la communauté sous-entend une durabilité fonctionnelle (Allison & Martiny 2008; Sun et al. 2019).

Une autre PRC a été conduite sur toutes les saisons au 14<sup>ème</sup> jour d'exposition aux pesticides afin de déterminer si l'impact chimique variait saisonnièrement (Figure 28). La variation saisonnière de l'exposition chronique aux pesticides sur les traits de la microméiofaune est marginalement significative ( $p\text{-value}=0,074$ ). La courbe de référence représente l'aquarium témoin, sans pesticide. En hiver, il n'y a aucune différenciation d'effet entre le témoin et les traitements. En hiver, les conditions abiotiques extrêmes structurent potentiellement le biofilm avec des organismes plus tolérants aux fonctions plus primitives (cf section I.1). Au printemps, les trois courbes correspondant aux aquariums contaminés suivent la même trajectoire et atteignent un effet moindre (Effet = +0,1 ; Figure 28). Les effets les plus élevés ont été relevés à la saison estivale. Les traitements agissaient différemment sur les traits de la microméiofaune. Au quatorzième jour d'exposition à l'imidaclopride (Effet = +0,4, Figure 28), la microméiofaune était représentée par des organismes d'une taille de 100 à 249  $\mu\text{m}$  (Lx2, Figure 28), des macrophages

(Ral6, Figure 28) capables d'assimiler des proies d'une taille supérieure à 50 $\mu\text{m}$  (TpA3, Figure 28) par broyage (Mal2, Figure 28) ou phagocytose (Mal4, Figure 28). Au contraire, les expositions au diuron et au mélange binaire de diuron et d'imidaclopride présentent des effets négatifs, -0,3 et -0,2 respectivement. La microméiofaune est représentée par des organismes de petite taille (20-99 $\mu\text{m}$ , Lx1, Figure 28) se déplaçant à l'aide de cils (Dor2, Figure 28), des microphages (Ral7, Figure 28) qui se nourrissent de bactéries (Ral1, Nou6, Figure 28) et de microalgues (Nou11 et Nou 12, Figure 28) de petite taille (0-20 $\mu\text{m}$ , TpA1, Figure 28) en filtrant (Mal3, Figure 28) ou en raclant (Mal5, Figure 28). Les effets du diuron sur les microalgues à des concentrations de l'ordre du microgramme sont reconnues (Ricart et al. 2009; Roubeix et al. 2011). Après 14 jours d'exposition au diuron, seul et en combinaison avec l'imidaclopride, la disponibilité de ressource pour les herbivores a engendré une commutation de la microméiofaune en faveur d'organismes bactérivores. Des effets divergents ont aussi été observés pour la saison automnale. Le traitement à l'imidaclopride ne diffère pas du témoin. Cette fois, le mélange a un effet positif (Effet = +0,25, Figure 28), la microméiofaune présente les mêmes traits que ceux énoncés précédemment pour le traitement à l'imidaclopride en été. Le traitement au diuron en automne présente la même trajectoire donc les mêmes traits fonctionnels qu'en été avec un effet plus faible (Effet = -0,2, Figure 28). Ces résultats suggèrent que les modes d'action des pesticides et leur combinaison impactent différemment les communautés en fonction des saisons. De nombreux facteurs peuvent être à l'origine de ses variations de réponse aux contaminations. La RLQ sur l'environnement expérimental (Figure 27) a été construite à partir des données physico-chimiques des eaux des aquariums. Ces eaux filtrées à 30 $\mu\text{m}$  provenaient de l'étang de Gazinet-Cestas, le lieu de développement du biofilm (II.2.3.1). Bien que la situation géographique reste inchangée, les conditions abiotiques varient saisonnièrement (Figure 27). Les différents assemblages de traits observés ont probablement été conditionnés par des successions écologiques du biofilm sélectionnant des espèces aux critères divers en fonction des saisons.

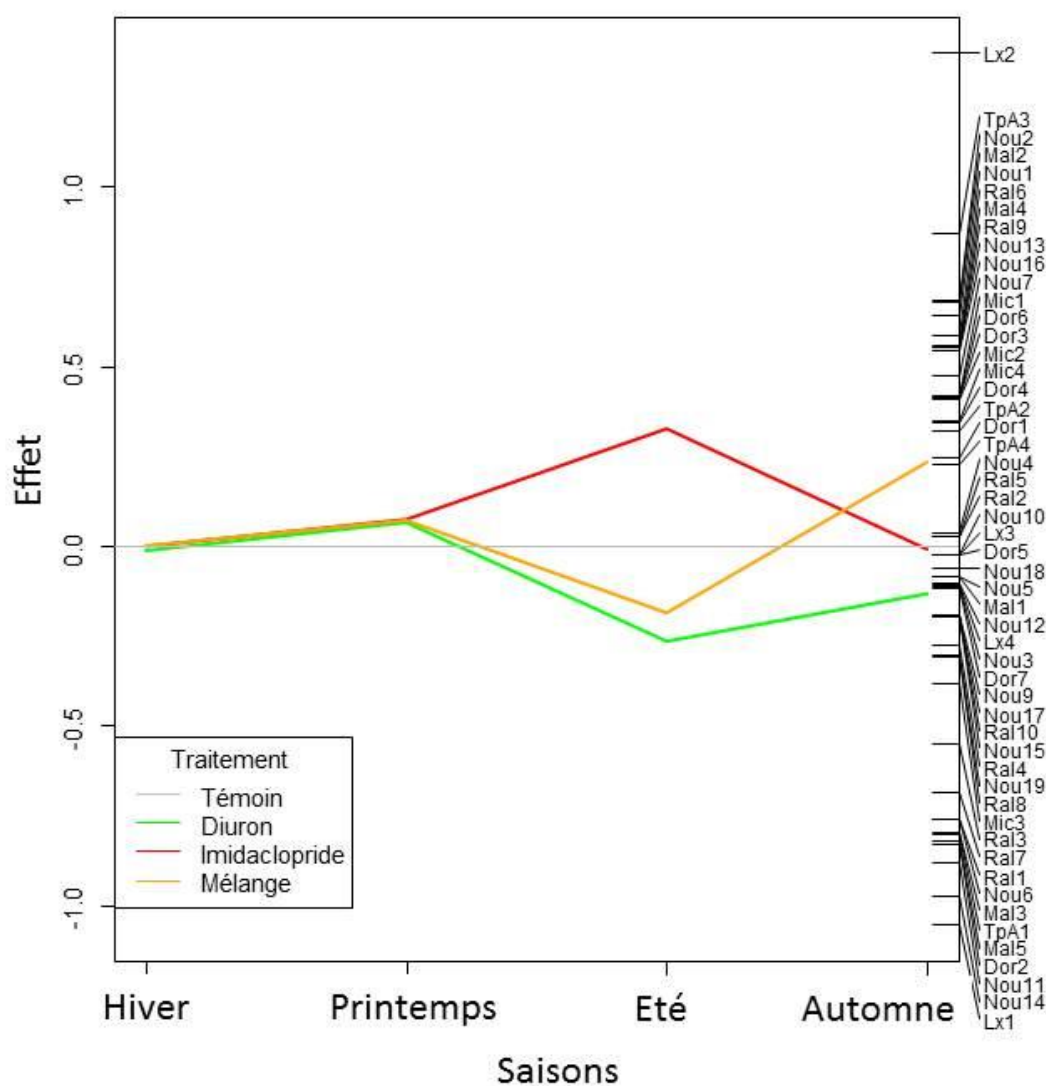


Figure 28: Courbes de réponse principale (PRC) sur les traits morphofonctionnels de la micro-méiofaune liés à l'activité trophique, indiquant les effets de l'imidaclopride (insecticide) et du diuron (herbicide), seuls et en mélange, en fonction des saisons (p-value = 0,074). Longueur maximale : 20-99  $\mu\text{m}$  (Lx1), 100-249  $\mu\text{m}$  (Lx2), 250-999  $\mu\text{m}$  (Lx3), 1000-2000  $\mu\text{m}$  (Lx4) ; Taille des proies assimilables : 0-20  $\mu\text{m}$  (TpA1), 21-50  $\mu\text{m}$  (TpA2), >50  $\mu\text{m}$  (TpA3), Non limité par la taille de la bouche (TpA4) ; Nourriture : Algues filamenteuses (Nou1), Algues unicellulaires (Nou2), Algues vertes (Nou3), Algues vertes filamenteuses (Nou4), Algues vertes unicellulaires (Nou5), Bactéries (Nou6), Ciliés (Nou7), Cyanobactéries (Nou8), Détritus (Nou9), Diatomées (Nou10), Microalgues (Nou11), Particules minérales (Nou12), Petits métazoaires (Nou13), Phytoflagellés (Nou14), Protistes (Nou15), Protistes hétérotrophes (Nou16), Rotifères (Nou17), Bactéries sulfureuses (Nou18), Zooflagellés (Nou19) ; Régime alimentaire : Bactérovore (Ral1), Cannibalisme (Ral2), Détritovore (Ral3), Herbivore (Ral4), Histophage (Ral5), Macrophage (Ral6), Microphage (Ral7), Omnivore (Ral8), Prédateur (Ral9) ; Mode d'alimentation : Absorbant/suceur (Mal1), Broyeur (Mal2), Filtreur (Mal3), Phagocytose (Mal4), Racleur (Mal5) ; Organe de déplacement : Aucun (Dor1), Cils (Dor2), Cirrhes (Dor3), Couronne ciliaire (Dor4), Pied (Dor5), Pseudopodes/cytoplasme (Dor6), Soies (Dor7).

### V.2.3 Conclusions

Les saisons présentent des habitats différents qui accueillent des organismes taxonomiquement et fonctionnellement divers. En effet, le biofilm mature utilisé pour ces tests écotoxicologiques s'est développé à la même situation géographique pour les quatre saisons. Et pourtant, nous avons identifié des assemblages de traits fonctionnels saisonnièrement variables, probablement structurés par les conditions environnementales qui influençaient la succession écologique du biofilm. A des concentrations environnementales de pesticides ( $5 \mu\text{g.L}^{-1}$ ), les contraintes saisonnières ont un impact plus important qu'une contamination au diuron et/ou à l'imidaclopride. Pour une saison donnée, la communauté ne varie pas notablement du point de vue fonctionnel. Elle s'adapte à l'impact des pesticides testés par redondance fonctionnelle. Par contre, l'action toxique des pesticides diverge en fonction des saisons. Des concentrations plus fortes en pesticides pourraient être testées, ou des expériences pourraient être conduites à plus long terme, de manière à déceler les concentrations minimales d'effet et les durées d'exposition à partir desquelles la fonctionnalité de la microméiofaune serait affectée.

### V.3 Effets saisonniers sur les successions écologiques du biofilm

La succession écologique d'un écosystème est un processus naturel qui consiste en l'évolution et au développement de ce dernier depuis un stade de colonisation initial à un stade mature dit climacique. La communauté initiale est composée d'organismes pionniers et évolue, théoriquement, vers des organismes plus complexes et une plus grande diversité (Amoros & Wade 1996). Le développement du biofilm peut se décomposer en trois étapes successives : l'adhésion, l'accumulation et le détachement.

- L'adhésion : dans un premier temps, ce sont les bactéries et les diatomées pennées qui s'installent sur un substrat vierge (Sabater & Romani 1996). Ces organismes pionniers sécrètent des composés polymériques extracellulaires rendant le milieu adhérent et facilitant la formation de microcolonies (Battin et al. 2003).
- L'accumulation : la diversité et la densité d'organismes augmente. Des organismes de la colonne d'eau ou des sédiments voisins viennent coloniser ce nouveau milieu riche en ressource (Jackson et al. 2001). Les bactéries, les exopolymères saccharidiques dissous et les microalgues sont des ressources riches en éléments nutritifs utiles aux protozoaires et petits métazoaires (Porter et al. 1985).
- Le détachement : puis le biofilm se décompose progressivement, augmentant le taux de particules détritiques (Battin et al. 2003). La sénescence des algues, la bioturbation créée par les organismes plus imposants et le broutage contribuent à engendrer un détachement



du biofilm. Le biofilm mature se régénère et rajeunit (Boulêtreau et al. 2006; Hillebrand 2008).

Néanmoins, la succession et la durée de ces diverses étapes de colonisation sont générales. Différents facteurs abiotiques non seulement environnementaux influencent le développement du biofilm : la température, le pH, le taux d'oxygène, l'hydrodynamisme, la présence d'ions spécifiques, les nutriments ; mais également des facteurs biotiques d'interactions entre les espèces co-habitanes (Goller & Romeo 2008). Les vitesses de colonisation et les diverses étapes de successions écologiques du biofilm doivent donc être variables d'une saison à une autre (Goller & Romeo 2008; Artigas et al. 2012b). En ajoutant les stades de développement du biofilm à l'analyse fonctionnelle on devrait davantage comprendre la structure de cet écosystème et ses variations au cours des saisons.

Les différentes étapes de succession écologique du biofilm et les divers facteurs qui les influencent ont été traitées abondamment. Toutefois, ces études ont été menées sur un critère de diversité spécifique. Les interactions trophiques représentant la première force agissant sur la structure et le fonctionnement d'un écosystème (Hillebrand & Kahlert 2001; Hillebrand 2002), les variations saisonnières de la diversité fonctionnelle liée à l'activité trophique lors de la succession écologique au sein des communautés de la microméiofaune pourraient être abordées dans de futures recherches.

## V.4 Des relations biotiques structurantes

### V.4.1 Relations diversité/fonction entre la micro-méiofaune et les microalgues

Dans le contexte actuel de surveillance, de restauration et de développement d'écosystèmes durables, il devient important de comprendre les fonctions d'un écosystème. La compréhension et l'appréhension des fonctions d'un écosystème passent obligatoirement par l'étude d'espèces clés ou de groupes fonctionnels plus que par l'inventaire et l'abondance des espèces présentes dans le milieu (Bengtsson 1998). De nombreuses communautés de microorganismes sont utilisées dans la surveillance pour déterminer la qualité des eaux. Les études de biomonitoring en rivière, pour les communautés microbiennes benthiques, portent principalement sur le groupe des diatomées en termes de diversité et d'amplitude écologique (IBD : Indice Biologique Diatomées, Coste et al. 2009). D'autres indices, particulièrement pour la surveillance des estrans côtiers, sont calculés principalement grâce aux assemblages de méiofaune (Borja et al. 2003; Semprucci et al. 2015) ; aux assemblages de nématodes des eaux douces dans les sédiments des rivières (NemaSPEAR, Höss et al. 2017) ; aux assemblages taxonomiques et fonctionnels des



macroinvertébrés d'eau douce pour les grands cours d'eau français avec l'I<sub>2</sub>M<sub>2</sub> (Mondy et al. 2012). Néanmoins, la plupart des indices biotiques d'évaluation de la qualité des eaux est souvent basée sur un seul compartiment biologique et ne prend pas en compte la part importante que représentent les interactions écologiques entre les différents compartiments trophiques (prédation, compétition...).

Au cours de ces travaux de thèse, nous avons vu que les relations biotiques entre microalgues et microméiofaune étaient des facteurs très structurants des écosystèmes en termes de diversité-fonction. L'étude de la variabilité saisonnière des traits morphofonctionnels de la microméiofaune, liés aux activités trophiques, a permis de mettre en évidence les variations fonctionnelles observables de la microméiofaune des biofilms d'eau douce. Il serait envisageable pour la suite de corrélérer les traits morphofonctionnels de la microméiofaune à ceux des microalgues en construisant des matrices de cooccurrence de traits comme sur le principe de l'étude des interactions plante-plante à partir de modèles d'équations structurelles (Soliveres et al. 2014) ou par le biais du modèle de prédiction de Diamond comme l'on fait Gotelli & McCabe (2002), en remplaçant les espèces par des traits morphofonctionnels. En effet, en étudiant les cooccurrences fonctionnelles des microalgues (producteurs primaires) et de la microméiofaune (consommateurs primaires), nous pourrions élaborer des patchworks de fonctions non pas sur un compartiment trophique particulier mais sur l'ensemble des traits qui participent à la relation trophique. Par exemple, dans un étang hypereutrophe, pendant la saison printanière, la communauté était composée d'organismes de grande taille, macrophages, herbivores et broyeurs et de grandes microalgues à frustule aux formes allongées (aciculaire, fusiforme, Cox 1996). Après une contamination au diuron, l'abondance des algues a diminué et persistaient principalement des petites algues flagellées circulaires auxquelles se sont associés des organismes microphages, herbivores et filtreurs. Dans ce cas, il y a une redondance fonctionnelle en termes d'herbivorie mais l'herbicide a impacté l'assemblage microalgue/microméiofaune. Les fonctions des écosystèmes sont très liées à leur biodiversité (Paine 1966), mais cette approche fonctionnelle permettrait d'étudier les effets des changements de conditions climatiques ou de contamination chimique sur un assemblage de fonctions, et non pas sur des espèces qui peuvent de toute façon présenter les mêmes fonctions (=redondance fonctionnelle; Lawton & Brown 1994).

#### **V.4.2 Interactions entre organismes : rôle potentiel de la communication moléculaire**

Nous avons vu dans les parties précédentes que les microorganismes du biofilm entretenaient des relations biotiques structurantes qui pouvaient être plus ou moins impactées par les conditions abiotiques du milieu. Des études récentes se sont penchées sur les communications

chimiques qui peuvent avoir lieu entre les microorganismes aquatiques. Les microalgues peuvent en effet produire des molécules de communication chimique pour contrôler l'adhésion au substrat ou la croissance de leurs congénères compétitives (Leflaive & Ten-Hage 2011; Corcoran et al. 2019). Des bactéries participent par allélopathie au métabolisme de certaines diatomées (Paul et al. 2013). L'étude des phénomènes allélopathiques de communication moléculaire interalgale et même entre algues et prédateurs, et leur comportement face à un stress chimique, serait intéressante à envisager pour comprendre la diversité des réponses observées dans le Chapitre III. En effet, nous avons vu précédemment que les nématodes du genre *Aphelenchoides* n'étaient pas léthalement impactés par le diuron, ni par l'imidaclopride (cf section III.2.3). Les résultats de la section III.3.2.2 sur les cinétiques de croissance de diatomées soumises à des pressions combinées de compétition, prédation et de stress chimique montrent pourtant une variation de comportement du prédateur lorsqu'il est exposé à ces pesticides. Les nématodes produisent des ascarosides spécifiques (phéromones) pour communiquer entre eux, principalement en période de reproduction (Choe et al. 2012). Certains composés odorants des biofilms de cyanobactéries ou de diatomées interviennent dans la communication entre microalgues ou avec leurs prédateurs, avec une action répulsive ou attractive envers les nématodes aquatiques, entre autres (Höckelmann et al. 2004; Leflaive & Ten-Hage 2009). Les pesticides peuvent interférer avec les signaux chimiques allélochimiques et chimiotactiques (Lydon et al. 1993). Ces interférences pourraient influencer les relations biotiques entre les nématodes et les microalgues.

## V.5 Abondance versus biomasse

Lors de ce projet de thèse, les études de variations des traits morphofonctionnels ont été réalisées sur la base des abondances relatives des organismes. Les densités d'espèces sont des moyens d'estimer l'occupation d'une espèce en termes de nombre d'individus au sein d'un écosystème. La biomasse aurait sans doute été également un très bon indicateur et apporterait des informations complémentaires. En effet, à ce niveau d'échelle d'étude, nous avons mêlé des organismes unicellulaires et pluricellulaires, de la microfaune à la petite macrofaune, présentant des temps de génération de quelques heures à quelques jours et des populations de taille très variable. Par ce biais, nous avons estimé que le poids d'un trait fonctionnel sur la communauté était lié au nombre d'individus le présentant. Pour la saison printanière, par exemple, la dominance en abondance de l'héliozoaire *Sphaerastrum fockei* s'est traduite par des scores élevés sur la modalité 'phagocytose' du trait fonctionnel 'mode d'alimentation' (Figure 25). La modalité 'absorbeur/suceur' de ce même trait fonctionnel au printemps était portée principalement par les

rotifères *Cephalodella forcicula* et *Cephalodella forcicata*. Les densités de ces rotifères étaient beaucoup plus faibles, que les densités de l'héliozoaire dominant, et ces scores amoindrissent l'impact de leur fonction alimentaire sur le biofilm (Figure 29). Pourtant, *Sphaerastrum* est un microorganisme unicellulaire d'environ 15-30 $\mu\text{m}$  présentant probablement une moindre biomasse sèche par cellule et probablement de moindre taux de broutage. Au contraire, les *Cephalodella* sont des organismes pluricellulaires, des rotifères avec des lorica durs, mesurant 150 à 400  $\mu\text{m}$ , donc une biomasse sèche bien plus élevée que celle de l'héliozoaire. Certains rotifères peuvent ingurgiter 13,5 diatomées par heure (McCormick 1991). Les relations trophiques étant des transferts de biomasse, l'estimation du poids des traits liés à l'activité trophique à partir des biomasses des espèces permettrait de considérer de manière plus intégrative et plus réaliste le poids de ces mêmes traits sur la structure et le fonctionnement de l'écosystème, comme exemplifié sur la Figure 29.

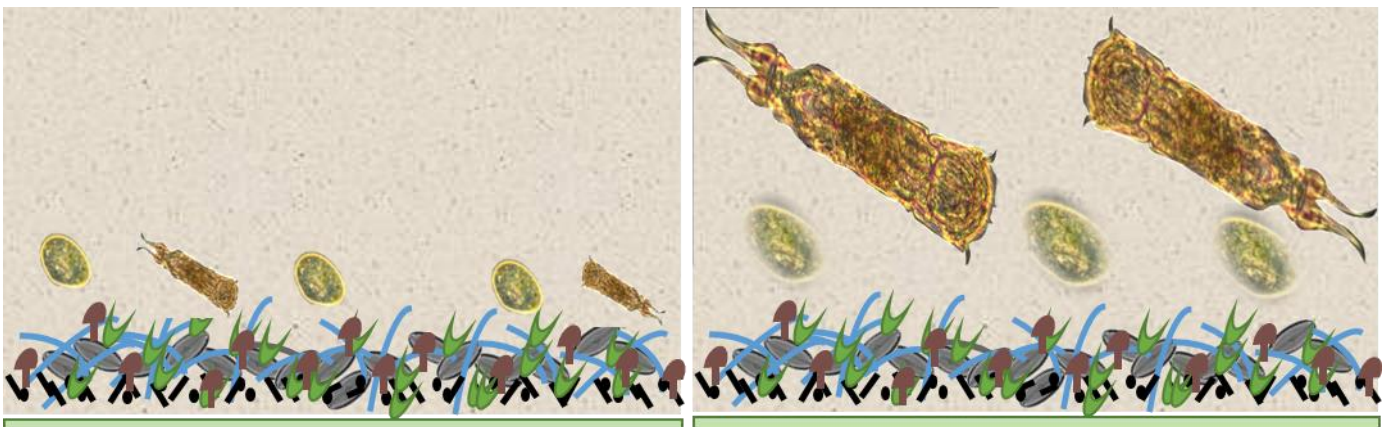


Figure 29: Schéma illustrant les différences d'estimation de l'importance d'organismes de taille variable entre l'abondance relative représentée à gauche et la biomasse à droite.

## V.6 Avenir de la base de données des traits morphofonctionnels de la microméiofaune

La base de données qui a été présentée au cours du chapitre 4 (<https://stratus.irstea.fr/d/a36c1b3e32224fd9b182/>) est une base évolutive autant en termes de traits fonctionnels recensés et de modalités de traits, que d'espèces qui y seront rajoutées. En effet, cette amorce ne présente, pour le moment, que les espèces dont les fréquences relatives pour chaque saison étaient supérieures à 0,1% dans le biofilm de l'étang hypereutrophe de Gazinet Cestas (49 espèces) étudié dans ce travail de thèse. La microméiofaune accueille des individus plutôt cosmopolites, certains peuvent aussi bien supporter les conditions de vie en eau douce qu'en eau de mer, comme les ciliés *Aspidisca cicada* ou *Codonolella cratera* (Foissner 1996).

Cette base de données pourrait répertorier à terme les traits de la microméiofaune de multiples biofilms (lac, rivières, étangs | périphytiques, épiphytiques). Les traits morphologiques de biomasse et de biovolume sont des traits morphologiques primordiaux qui devraient être ajoutés, à partir de la littérature ou de mesures géométriques sur les photographies des organismes (Halliday 2001). Très peu de données de biomasses individuelles d'organismes de la microméiofaune sont disponibles ; mis à part les gros travaux sur les ciliés de Foissner et al. (1991; 1992; 1993; 1994; 1995; 1996; 1999; 2000; 2007; 2008; 2008), ou les organismes plus régulièrement étudiés comme les nématodes, les manuels et publications de taxonomie décrivent très rarement ces organismes microscopiques sur ces critères. De nouvelles modalités de traits fonctionnels apparaîtront avec les espèces additionnelles.

Cette base de données restera dans un premier temps disponible en contactant Jacky Vedrenne, Soizic Morin ou moi-même. Une fois qu'elle aura atteint un volume plus conséquent, elle pourra être déposée sur un logiciel de partage comme GitHub pour en favoriser la diffusion vers un large public et l'utilisation ainsi que l'alimentation collaborative par la communauté scientifique.

Cette base de données est un outil qui pourra promouvoir la considération de la microméiofaune dans les approches écosystémiques de fonctionnement notamment la modélisation trophique, la recherche en écologie et écotoxicologie.



# Conclusion générale

## Conclusion générale

L'objectif de cette thèse était de déceler l'impact de la saisonnalité et d'une contamination pesticide environnementale sur les relations biotiques entre la micro-méiofaune et les microalgues d'un biofilm d'eau douce. Le but était de démontrer l'importance de relier les échelles (individus, population, communauté) et d'aborder la question de variabilité fonctionnelle plutôt que taxonomique pour élucider les impacts des facteurs biotiques (relations entre organismes de différents niveaux trophiques) et abiotiques (saisons, substances chimiques) sur le fonctionnement d'un écosystème. Ainsi, ces travaux de thèse ont regroupé des expériences en laboratoire (microcosme, mésocosme, conditions contrôlées) sur des individus, des populations et des communautés artificielles avec des études de terrain sur des communautés dans leur milieu naturel.

Les expérimentations réalisées en microcosmes sur les interactions entre de potentiels brouteurs et les microalgues soumis à une pression pesticide ont démontré que les interactions biotiques (trophiques) peuvent avoir un impact non négligeable sur la structure et la diversité de l'écosystème. Les organismes participent aux conditions environnementales de leur habitat et influencent les autres organismes. L'effet du brouteur sur les microalgues (Top-Down) est traduit par son action de broutage (effet négatif sur la densité algale) et l'enrichissement nutritif du milieu (effet positif sur la croissance de la population algale). Au contraire les algues conditionnent les brouteurs (Bottom-Up) avec leur densité (disponibilité en ressource alimentaire) et leur appétence (apport nutritionnel suffisant pour le développement du brouteur et sa population). L'impact chimique a montré des effets variables sur ces interactions biotiques selon la cible du pesticide et l'écologie des organismes : réduction de la pression de broutage si les brouteurs sont affectés ; réduction de disponibilité en nourriture ou réduction de l'appétence des algues et donc changement de nourriture ou compensation par un taux de broutage plus élevé si la qualité nutritive (e.g. les acides gras) des algues est altérée. Ces types de variabilité d'interactions causés par les pesticides pouvant engendrer une cascade d'effets sur les chaînes trophiques et restructurer des communautés entières, nous avons ensuite décidé de nous focaliser sur une communauté benthique naturelle.

Par la suite, nous avons donc mené des expérimentations sur le terrain pour déterminer la variabilité saisonnière de la microméiofaune par une approche fonctionnelle liée à l'activité trophique. Puis les biofilms matures saisonniers ont été transférées dans des mésocosmes et soumis à une exposition chronique d'un herbicide et d'un insecticide, seuls et conjointement. L'approche basée sur les traits a permis de prendre en compte la microméiofaune et les relations

fonctionnelles mises en jeu au sein du biofilm et de simplifier la comparaison entre des communautés taxonomiquement éloignées. Pour ce faire, nous avons ainsi créé la première base de données sur les traits morphofonctionnels de la microméiofaune (disponible en version pdf <https://stratus.irstea.fr/d/a36c1b3e32224fd9b182/>). La saisonnalité avait un impact plus fort sur la structure (taxonomique et fonctionnelle) des communautés qu'une contamination pesticide à des concentrations environnementales ( $5\mu\text{g.L}^{-1}$ ). En effet à chaque saison, les assemblages de la communauté étaient différents donc les cibles potentielles des pesticides divergeaient aussi. On a pu observer qu'à chaque saison la communauté compensait l'impact pesticide par redondance fonctionnelle.

Pour conclure, ces travaux de thèse ont permis d'améliorer les connaissances sur un compartiment bien longtemps négligé des études en eau douce : la microméiofaune. L'élaboration de la base de données est une initiative qui permettrait à l'avenir de corrélérer les bases de données des traits fonctionnels de tous les maillons de la chaîne trophique aquatique. Le fonctionnement d'un écosystème est régi par les interactions entre les organismes qui le composent et les conditions environnementales. Dans le contexte actuel de surveillance, de préservation et de restauration des systèmes aquatiques, où l'on cherche à comprendre le fonctionnement de l'écosystème, cette thèse met en lumière l'importance de combiner les facteurs abiotiques et biotiques, de prendre en compte les variabilités notamment saisonnières et de lier les travaux effectués aux multiples échelles d'étude.





# Bibliographie

## Bibliographie

- Abebe, E., I. Andr ssy & W. Traunspurger, 2006. Freshwater nematodes: ecology and taxonomy. CABI.
- Abebe, E. & A. Coomans, 1997. Aquatic nematodes from Ethiopia IX. One new and three known species of Dorylaimidae, *Mononchus truncatus* Bastian, 1865, and *Diploscapter coronatus* (Cobb, 1893) Cobb, 1913 (Nematoda). *Hydrobiologia* 353(1-3):121-138.
- Agresti, A., 1992. A survey of exact inference for contingency tables. *Statistical science* 7(1):131-153.
-  kerblom, N. & W. Goedkoop, 2003. Stable isotopes and fatty acids reveal that *Chironomus riparius* feeds selectively on added food in standardized toxicity tests. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22(7):1473-1480 doi:10.1002/etc.5620220708.
- Allison, S. D. & J. B. H. Martiny, 2008. Resistance, resilience, and redundancy in microbial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105(Supplement 1):11512-11519 doi:10.1073/pnas.0801925105.
- Amoros, C. & P. M. Wade, 1996. Ecological successions. In Petts, G. E. & C. Amoros (eds) *The Fluvial Hydrosystems*. Springer Netherlands, Dordrecht, 211-241.
- Arrhenius,  ., F. Gr nvall, M. Scholze, T. Backhaus & H. Blanck, 2004. Predictability of the mixture toxicity of 12 similarly acting congeneric inhibitors of photosystem II in marine periphyton and epipsammon communities. *Aquatic Toxicology* 68(4):351-367 doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.04.002>.
- Artigas, J., G. Arts, M. Babut, A. B. Caracciolo, S. Charles, A. Chaumot, B. Combourieu, I. Dahll f, D. Despr aux & B. Ferrari, 2012a. Towards a renewed research agenda in ecotoxicology. *Environmental Pollution* 160:201-206.
- Artigas, J., K. Fund, S. Kirchen, S. Morin, U. Obst, A. M. Romani, S. Sabater & T. Schwartz, 2012b. Patterns of biofilm formation in two streams from different bioclimatic regions: analysis of microbial community structure and metabolism. *Hydrobiologia* 695(1):83-96 doi:10.1007/s10750-012-1111-3.
- Artois, T., D. Fontaneto, W. D. Hummon, S. J. McInnes, M. A. Todaro, M. V. S rensen & A. Zullini, 2011. Ubiquity of microscopic animals? Evidence from the morphological approach in species identification. *Biogeography of microscopic organisms, is everything small everywhere*:244-283.
- Ashauer, R., A. Hintermeister, E. Potthoff & B. I. Escher, 2011. Acute toxicity of organic chemicals to *Gammarus pulex* correlates with sensitivity of *Daphnia magna* across most modes of action. *Aquatic Toxicology* 103(1):38-45 doi:<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.02.002>.
- Azevedo-Pereira, H. M. V. S., M. F. L. Lemos & A. M. V. M. Soares, 2011. Behaviour and Growth of *Chironomus riparius* Meigen (Diptera: Chironomidae) under Imidacloprid Pulse and Constant Exposure Scenarios. *Water, Air, & Soil Pollution* 219(1):215-224 doi:10.1007/s11270-010-0700-x.
- Baker, R. L. & S. L. Ball, 1995. Microhabitat selection by larval *Chironomus tentans* (Diptera: Chironomidae): effects of predators, food, cover and light. *Freshwater Biology* 34(1):101-106 doi:10.1111/j.1365-2427.1995.tb00427.x.
- Battin, T. J., K. Besemer, M. M. Bengtsson, A. M. Romani & A. I. Packmann, 2016. The ecology and biogeochemistry of stream biofilms. *Nature Reviews Microbiology* 14(4):251.
- Battin, T. J., L. A. Kaplan, J. D. Newbold, X. Cheng & C. Hansen, 2003. Effects of Current Velocity on the Nascent Architecture of Stream Microbial Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* 69(9):5443-5452 doi:10.1128/aem.69.9.5443-5452.2003.
- Beier, S. & W. Traunspurger, 2001. The meiofauna community of two small German streams as indicator of pollution. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery* 8(3-4):387-405.
- Bengtsson, J., 1998. Which species? What kind of diversity? Which ecosystem function? Some problems in studies of relations between biodiversity and ecosystem function. *Applied Soil Ecology* 10(3):191-199 doi:[https://doi.org/10.1016/S0929-1393\(98\)00120-6](https://doi.org/10.1016/S0929-1393(98)00120-6).
- Bernhardt, E. S., E. J. Rosi & M. O. Gessner, 2017. Synthetic chemicals as agents of global change. *Frontiers in Ecology and the Environment* 15(2):84-90 doi:10.1002/fee.1450.
- Bertrand, J. C., P. Caumette, P. Lebaron, R. Matheron & P. Normand, 2011. *Ecologie microbienne : microbiologie des milieux naturels et anthropis s*. Presses Universitaires de Pau et des Pays de l'Adour, Pau.
- B rzi n , B. & B. Pejler, 1989. Rotifer occurrence in relation to temperature. *Hydrobiologia* 175(3):223-231 doi:10.1007/bf00006092.

- Biggs, B. J., 1996. Patterns in benthic algae of streams. *Algal ecology: freshwater benthic ecosystems*:31-56.
- Biggs, B. J. F., 1990. Periphyton communities and their environments in New Zealand rivers. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 24(3):367-386 doi:10.1080/00288330.1990.9516431.
- Blanchard, G. F., 1991. Measurement of meiofauna grazing rates on microphytobenthos: is primary production a limiting factor? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 147(1):37-46 doi:[https://doi.org/10.1016/0022-0981\(91\)90035-U](https://doi.org/10.1016/0022-0981(91)90035-U).
- Bonmatin, J.-M., C. Giorio, V. Girolami, D. Goulson, D. Kreuzweiser, C. Krupke, M. Liess, E. Long, M. Marzaro & E. Mitchell, 2015. Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil. *Environmental Science and Pollution Research* 22(1):35-67.
- Borchardt, M. A. & T. L. Bott, 1995. Meiofaunal Grazing of Bacteria and Algae in a Piedmont Stream. *Journal of the North American Benthological Society* 14(2):278-298 doi:10.2307/1467780.
- Borja, A., I. Muxika & J. Franco, 2003. The application of a Marine Biotic Index to different impact sources affecting soft-bottom benthic communities along European coasts. *Marine Pollution Bulletin* 46(7):835-845.
- Bortolus, A., 2008. Error Cascades in the Biological Sciences: The Unwanted Consequences of Using Bad Taxonomy in Ecology, vol 37. BIOONE.
- Bott, 1996. Algae in Microscopic Food Webs.
- Böttger, R., M. Feibicke, J. Schaller & G. Dudel, 2013. Effects of low-dosed imidacloprid pulses on the functional role of the caged amphipod *Gammarus roeseli* in stream mesocosms. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 93:93-100 doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.04.006>.
- Bottin, M., J. Soininen, D. Alard & J. Rosebery, 2016. Diatom cooccurrence shows less segregation than predicted from niche modeling. *PLoS ONE* 11(4):e0154581 doi:10.1371/journal.pone.0154581.
- Botts, P. S. & B. C. Cowell, 1992. Feeding electivity of two epiphytic chironomids in a subtropical lake. *Oecologia* 89(3):331-337 doi:10.1007/bf00317410.
- Boulêtreau, S., F. Garabétian, S. Sauvage & J.-M. Sanchez-Pérez, 2006. Assessing the importance of a self-generated detachment process in river biofilm models. *Freshwater Biology* 51(5):901-912 doi:10.1111/j.1365-2427.2006.01541.x.
- Boyle, K. S. & M. H. Horn, 2006. Comparison of feeding guild structure and ecomorphology of intertidal fish assemblages from central California and central Chile. *Marine Ecology Progress Series* 319:65-84.
- Brenner, S., 1974. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77(1):71-94.
- Bryce, D. & A. Hobart, 1972. biology and identification of the larvae of the Chironomidae (Diptera). *Entomologist's Gazette*.
- Callow, M. E., 2000. Algal biofilms. *Biofilms: Recent advances in their study and control*:189-209.
- Canter, E. J., C. Cuellar-Gempeler, A. I. Pastore, T. E. Miller & O. U. Mason, 2018. Predator identity more than predator richness structures aquatic microbial assemblages in *Sarracenia purpurea* leaves. *Ecology* 99(3):652-660.
- Caramujo, M.-J., C. R. B. Mendes, P. Cartaxana, V. Brotas & M.-J. Boavida, 2008. Influence of drought on algal biofilms and meiofaunal assemblages of temperate reservoirs and rivers. *Hydrobiologia* 598(1):77-94 doi:10.1007/s10750-007-9141-y.
- Carvalho, R. N., L. Ceriani, A. Ippolito & T. Lettieri, 2015. Development of the first Watch List under the Environmental Quality Standards Directive. JRC Technical Report - Report EUR 27142 EN, Luxembourg: Publications Office of the European Union, 2015, 168.
- Chaumet, B., S. Morin, O. Hourtané, J. Artigas, B. Delest, M. Eon & N. Mazzella, 2019. Flow conditions influence diuron toxicokinetics and toxicodynamics in freshwater biofilms. *Science of the Total Environment* 652:1242-1251 doi:<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.265>.
- Choe, A., Stephan H. von Reuss, D. Kogan, Robin B. Gasser, Edward G. Platzter, Frank C. Schroeder & Paul W. Sternberg, 2012. Ascarioside Signaling Is Widely Conserved among Nematodes. *Current Biology* 22(9):772-780 doi:<https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.03.024>.
- Christoffels, E., A. Brunsch, J. Wunderlich-Pfeiffer & F. M. Mertens, 2016. Monitoring micropollutants in the Swist river basin. *Water Science and Technology* 74(10):2280-2296 doi:10.2166/wst.2016.392.
- Coquillé, N. & S. Morin, 2019. Fitness of teratological morphotypes and heritability of deformities in the diatom *Gomphonema gracile*. *Ecological Indicators* 106:105442 doi:<https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2019.105442>.
- Corcoran, A. A., M. Seger, R. Niu, N. Nirmalakhandan, P. J. Lammers, F. O. Holguin & W. J. Boeing, 2019. Evidence for induced allelopathy in an isolate of *Coelastrrella* following co-culture with *Chlorella sorokiniana*. *Algal Research* 41:101535

- doi:<https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.10.1535>.
- Coste, M., S. Boutry, J. Tison-Rosebery & F. Delmas, 2009. Improvements of the Biological Diatom Index (BDI): Description and efficiency of the new version (BDI-2006). *Ecological Indicators* 9(4):621-650 doi:<https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2008.06.003>.
- Costerton, J. W., Z. Lewandowski, D. DeBeer, D. Caldwell, D. Korber & G. James, 1994. Biofilms, the customized microniche. *Journal of Bacteriology* 176(8):2137-2142 doi:10.1128/jb.176.8.2137-2142.1994.
- Cox, E. J., 1990. Studies on the algae of a small softwater stream I. Occurrence and distribution with particular reference to the diatoms. *Archiv für Hydrobiologie/Supplement (Monographische Beiträge)* 83(4):525-552.
- Cox, E. J., 1996. Identification of freshwater diatoms from live material, vol 158. Chapman & Hall London.
- Cox, G. N., M. Kusch & R. S. Edgar, 1981. Cuticle of *Caenorhabditis elegans*: its isolation and partial characterization. *The Journal of Cell Biology* 90(1):7-17 doi:10.1083/jcb.90.1.7.
- Cummins, K. W. & M. J. Klug, 1979. Feeding ecology of stream invertebrates. *Annual Review of Ecology and Systematics* 10(1):147-172.
- Dauta, A., Conditions de développement du phytoplancton. Etude comparative du comportement de huit espèces en culture. I. Détermination des paramètres de croissance en fonction de la lumière et de la température. In: *Annales de Limnologie*, 1982. vol 18. Cambridge Univ Press, p 217-262.
- De Puytorac, P., J. Grain & J. P. Mignot, 1987. Précis de protistologie. Boubée, Paris.
- Demailly, F., I. Elfeky, L. Malbezin, M. Le Guédard, M. Eon, J.-J. Bessoule, A. Feurtet-Mazel, F. Delmas, N. Mazzella, P. Gonzalez & S. Morin, 2019. Impact of diuron and S-metolachlor on the freshwater diatom *Gomphonema gracile*. Complementarity between fatty acid profiles and different kinds of ecotoxicological impact-endpoints. *Science of the Total Environment* 688:960-969 doi:<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.347>.
- Demailly, F., M. Le Guédard, I. Elfeky, L. Malbezin, M. Eon, J.-J. Bessoule, A. Feurtet-Mazel, F. Delmas, N. Mazzella, P. Gonzalez & S. Morin, submitted. Interspecific variability in diatom responses to herbicide exposure from molecular to populational scales. *Ecological Indicators*.
- Derot, J., A. Jamoneau, N. Teichert, J. Rosebery, S. Morin & C. Laplace-Treyture, 2020. Response of phytoplankton traits to environmental variables in French lakes: New perspectives for bioindication. *Ecological Indicators* 108:105659 doi:<https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2019.105659>.
- Dorigo, U., X. Bourrain, A. Bérard & C. Leboulanger, 2004. Seasonal changes in the sensitivity of river microalgae to atrazine and isoproturon along a contamination gradient. *Science of the Total Environment* 318(1):101-114 doi:[https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(03\)00398-X](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(03)00398-X).
- Duffy, J. E., B. J. Cardinale, K. E. France, P. B. McIntyre, E. Thébault & M. Loreau, 2007. The functional role of biodiversity in ecosystems: incorporating trophic complexity. *Ecology Letters* 10(6):522-538 doi:10.1111/j.1461-0248.2007.01037.x.
- Duffy, J. E., K. S. Macdonald, J. M. Rhode & J. D. Parker, 2001. Grazer diversity, functional redundancy, and productivity in seagrass beds: an experimental test. *Ecology* 82(9):2417-2434 doi:10.1890/0012-9658(2001)082[2417:Gdfrap]2.0.Co;2.
- Duggins, D. O. & M. N. Dethier, 1985. Experimental studies of herbivory and algal competition in a low intertidal habitat. *Oecologia* 67(2):183-191.
- Dunstan, G. A., J. K. Volkman, S. M. Barrett, J.-M. Leroi & S. W. Jeffrey, 1993. Essential polyunsaturated fatty acids from 14 species of diatom (Bacillariophyceae). *Phytochemistry* 35(1):155-161 doi:[https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)90525-9](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)90525-9).
- Duong, T. T., S. Morin, O. Herlory, A. Feurtet-Mazel, M. Coste & A. Boudou, 2008. Seasonal effects of cadmium accumulation in periphytic diatom communities of freshwater biofilms. *Aquatic Toxicology* 90(1):19-28 doi:<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2008.07.012>.
- El-Shabrawy, G. M. & M. O. A. Germoush, 2014. Seasonal changes and abundance of rotifers in a shallow Manzalah lake (Egypt). *Ecology & Hydrology* 14(3):243-252 doi:10.1016/j.ecohyd.2014.06.001.
- Elwood, J. W. & D. J. Nelson, 1972. Periphyton production and grazing rates in a stream measured with a <sup>32</sup>P material balance method. *Oikos*:295-303.
- Epstein, S. S. & M. P. Shiaris, 1992. Rates of microbenthic and meiobenthic bacterivory in a temperate muddy tidal flat community. *Applied and Environmental Microbiology* 58(8):2426-2431.
- Erken, M., N. Farrenschon, S. Speckmann, H. Arndt & M. Weitere, 2012. Quantification of Individual Flagellate - Bacteria Interactions within Semi-natural Biofilms. *Protist* 163(4):632-642

- doi:<https://doi.org/10.1016/j.protis.2011.1.0.008>.
- Eßer, M., 2006. Long-term dynamics of microbial biofilm communities of the river Rhine. Universität zu Köln.
- Estifanos, T. K., W. Traunspurger & L. Peters, 2013. Selective feeding in nematodes: a stable isotope analysis of bacteria and algae as food sources for free-living nematodes. *Nematology* 15(1):1-13.
- Eyualem-Abebe, W. Traunspurger & I. Andrassy, 2006. Freshwater nematodes: ecology and taxonomy. CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Fauvelle, V., N. Montero, J. F. Mueller, A. Banks, N. Mazzella & S. L. Kaserzon, 2017. Glyphosate and AMPA passive sampling in freshwater using a microporous polyethylene diffusion sampler. *Chemosphere* 188:241-248.
- Fenchel, T., 1975. The Quantitative Importance of the Benthic Microfauna of an Arctic Tundra Pond. *Hydrobiologia* 46(4):445-464 doi:10.1007/BF00028286.
- Fleeger, J. W., K. R. Carman & R. M. Nisbet, 2003. Indirect effects of contaminants in aquatic ecosystems. *Science of the Total Environment* 317(1):207-233 doi:[https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(03\)00141-4](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(03)00141-4).
- Foissner, W., 1993. Colpodea (Ciliophora). 798.
- Foissner, W., 1996. A user-friendly guide to the ciliate (Protozoa, Ciliophora) commonly used by hydrobiologists as bioindicators in rivers, lakes, and waste waters, with notes on their ecology. *Freshwater Biology* 35:375-482.
- Foissner, W., 2008. Wilhelm FOISSNER: nomenclatural and taxonomic summary 1967–2007.
- Foissner, W., H. Berger, H. Blatterer & F. Kohmann, 1995. Taxonomische und ökologische revision der ciliaten des saprobiensystems : band IV. Gymnostomatea, Loxodes, Suctorina. Bayerisches Landesamt für Wasserwirtschaft, Munchen, DEU.
- Foissner, W., H. Berger & F. Kohmann, 1992. Taxonomische und ökologische Revision der Ciliaten des Saprobiensystems. Band II: Peritrichia, Heterotrichida, Odontostomatida, vol 5/92. Informationsberichte des Bayerischen Landesamtes für Wasserwirtschaft.
- Foissner, W., H. Berger & F. Kohmann, 1994. Taxonomische und ökologische revision der ciliaten des saprobiensystems : band III. Hymenostomata, Prostomatida, Nassulida. Bayerisches Landesamt für Wasserwirtschaft, Munchen, DEU.
- Foissner, W., H. Berger & J. Schaumburg, 1999. Identification and ecology of limnetic plankton ciliates. 793.
- Foissner, W., H. Blatterer, H. Berger & F. Kohmann, 1991. Taxonomische und ökologische Revision der Ciliaten des Saprobiensystems. Band I: Cyrtophorida, Oligotrichida, Hypotrichia, Colpodea, vol 1/91. Informationsberichte des Bayerischen Landesamtes für Wasserwirtschaft.
- Foissner, W., A. Chao & L. Katz, 2008. Diversity and geographic distribution of ciliates (Protista: Ciliophora). *Biodiversity and Conservation* 17(2):345-363 doi:10.1007/s10531-007-9254-7.
- Foissner, W. & G. A. Korganova, 2000. The *Centropyxis aerophila* complex (Protozoa: Testacea). *Acta Protozoologica* 39(4):257-274.
- Foissner, W. & K. Xu, 2007. Monograph of the Spathidiida (Ciliophora, Haptoria) Vol. I: Proüospathidiidae, Arcuospathidiidae, Apertospathulidae.
- Fonseca, G. & K. H. Fehlauer-Ale, 2012. Three in one: fixing marine nematodes for ecological, molecular, and morphological studies. *Limnology and Oceanography: Methods* 10(7):516-523.
- Fontaneto, D. & W. H. De Smet, 2015. Rotifera, chapter 4 Handbook of Zoology, Gastrotricha, Cycloneuralia and Gnathifera, Volume 3, Gastrotricha and Gnathifera Schmidt-Rhaesa, Andreas (ed). de Gruyter, 217-300.
- Francoeur, S. N., B. J. F. Biggs, R. A. Smith & R. L. Lowe, 1999. Nutrient Limitation of Algal Biomass Accrual in Streams: Seasonal Patterns and a Comparison of Methods. *Journal of the North American Benthological Society* 18(2):242-260 doi:10.2307/1468463.
- Fulton, R. S., III & H. W. Paerl, 1987. Toxic and inhibitory effects of the blue-green alga *Microcystis aeruginosa* on herbivorous zooplankton. *Journal of Plankton Research* 9(5):837-855 doi:10.1093/plankt/9.5.837.
- Gallucci, F., I. B. de Castro, F. C. Perina, D. M. de Souza Abessa & A. de Paula Teixeira, 2015. Ecological effects of Irgarol 1051 and Diuron on a coastal meiobenthic community: A laboratory microcosm experiment. *Ecological Indicators* 58:21-31 doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ecolind.2015.05.030>.
- Garden, A. & R. W. Davies, 1988. Decay rates of autumn and spring leaf litter in a stream and effects on growth of a detritivore. *Freshwater Biology* 19(3):297-303 doi:10.1111/j.1365-2427.1988.tb00352.x.
- Gaudes Saez, A., 2011. Freshwater meiofauna in Mediterranean lotic systems: community structure, adaptations and contribution to functional processes/Meiofauna d'aigua dolça en sistemes lòtics mediterranis: estructura de les seves comunitats,



- adaptacions i contribució en els processos funcionals.
- Gessner, M. O. & A. Tlili, 2016. Fostering integration of freshwater ecology with ecotoxicology. *Freshwater Biology* 61(12):1991-2001 doi:10.1111/fwb.12852.
- Giacomazzi, S. & N. Cochet, 2004. Environmental impact of diuron transformation: a review. *Chemosphere* 56(11):1021-1032 doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.04.061>.
- Goller, C. C. & T. Romeo, 2008. Environmental Influences on Biofilm Development. In Romeo, T. (ed) *Bacterial Biofilms*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 37-66.
- Gomez-Eyles, J. L., C. Svendsen, L. Lister, H. Martin, M. E. Hodson & D. J. Spurgeon, 2009. Measuring and modelling mixture toxicity of imidacloprid and thiacloprid on *Caenorhabditis elegans* and *Eisenia fetida*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72(1):71-9 doi:10.1016/j.ecoenv.2008.07.006.
- González-Barreiro, O., C. Rioboo, C. Herrero & A. Cid, 2006. Removal of triazine herbicides from freshwater systems using photosynthetic microorganisms. *Environmental Pollution* 144(1):266-271 doi:<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2005.12.014>.
- Gophen, M., 2005. Seasonal Rotifer Dynamics in the Long-term (1969–2002) Record from Lake Kinneret (Israel). *Hydrobiologia* 546(1):443-450 doi:10.1007/s10750-005-4287-y.
- Gotelli, N. J. & D. J. McCabe, 2002. Species co-occurrence: meta-analysis of J. M. Diamond's assembly rules model. *Ecology* 83(8):2091-2096 doi:10.1890/0012-9658(2002)083[2091:Scoama]2.0.Co;2.
- Gravel, D., C. Albouy & W. Thuiller, 2016. The meaning of functional trait composition of food webs for ecosystem functioning. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 371(1694) doi:10.1098/rstb.2015.0268.
- Grover, J. P., 1991. Dynamics of Competition among Microalgae in Variable Environments: Experimental Tests of Alternative Models. *Oikos* 62(2):231-243 doi:10.2307/3545269.
- Guasch, H., J. Artigas, B. Bonet, C. Bonninaeu, O. Canals, N. Corcoll, A. Foulquier, J. López-Doval, S. Kim Tiam, S. Morin, E. Navarro, S. Pesce, L. Proia, H. Salvadó & A. Serra, 2016a. The use of biofilms to assess the effects of chemicals on freshwater ecosystems. Caister Academic Press, Norfolk, U.K.
- Guasch, H., B. Bonet, C. Bonninaeu, N. Corcoll, J. López-Doval, I. Muñoz, M. Ricart, A. Serra & W. Clements, 2012. How to link field observations with causality? Field and experimental approaches linking chemical pollution with ecological alterations. In Guasch, H., A. Ginebreda & A. Geislinger (eds) *Emerging and Priority Pollutants in Rivers. The Handbook of Environmental Chemistry*, vol 19. Springer Berlin Heidelberg, 181-218.
- Guasch, H., M. Ricart, J. López-Doval, C. Bonninaeu, L. Proia, S. Morin, I. Muñoz, A. M. Romani & S. Sabater, 2016b. Influence of grazing on triclosan toxicity to stream periphyton. *Freshwater Biology* 61(12):2002-2012.
- Hadoux, E., M. Plaire, P. Esmieu, A. Duberland & C. Laplace-Treytore, 2015. PHYTOBS v2.3: Outil de comptage du phytoplancton en laboratoire et de calcul de l'IPLAC. Version 23 Application JAVA.
- Hägerbäumer, A., S. Höss, P. Heininger & W. Traunspurger, 2015. Experimental studies with nematodes in ecotoxicology: an overview. *Journal of Nematology* 47(1):11-27.
- Hägerbäumer, A., S. Höss, P. Heininger & W. Traunspurger, 2018. Is *Caenorhabditis elegans* representative of freshwater nematode species in toxicity testing? *Environmental Science and Pollution Research* 25(3):2879-2888.
- Halliday, N. C., 2001. A comparison of morphometric and geometric methods for the estimation of individual zooplankton volumes. *Sarsia* 86(2):101-105 doi:10.1080/00364827.2001.10420466.
- Hamels, I., H. Mussche, K. Sabbe, K. Muylaert & W. Vyverman, 2004. Evidence for constant and highly specific active food selection by benthic ciliates in mixed diatoms assemblages. *Limnology and Oceanography* 49(1):58-68 doi:10.4319/lo.2004.49.1.0058.
- Harkey, G. A., P. F. Landrum & S. J. Klaine, 1994. Preliminary studies on the effect of feeding during whole sediment bioassays using *Chironomus riparius* larvae. *Chemosphere* 28(3):597-606 doi:[https://doi.org/10.1016/0045-6535\(94\)90301-8](https://doi.org/10.1016/0045-6535(94)90301-8).
- Hart, D. D., 1985. Grazing insects mediate algal interactions in a stream benthic community. *Oikos*:40-46.
- Hayasaka, D., T. Korenaga, K. Suzuki, F. Saito, F. Sánchez-Bayo & K. Goka, 2012. Cumulative ecological impacts of two successive annual treatments of imidacloprid and fipronil on aquatic communities of paddy mesocosms. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 80:355-362 doi:<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.04.004>.
- Herbst, G. N., 1982. Effects of leaf type on the consumption rates of aquatic detritivores. *Hydrobiologia* 89(1):77-87 doi:10.1007/bf00017540.

- Herren, C. M., K. C. Webert, M. D. Drake, M. Jake Vander Zanden, Á. Einarsson, A. R. Ives & C. Gratton, 2017. Positive feedback between chironomids and algae creates net mutualism between benthic primary consumers and producers. *Ecology* 98(2):447-455 doi:10.1002/ecy.1654.
- Hershey, A. E., K. Fortino, B. J. Peterson & A. J. Ulseth, 2007. Chapter 27 - Stream Food Webs. In Hauer, F. R. & G. A. Lamberti (eds) *Methods in Stream Ecology* (Second Edition). Academic Press, San Diego, 637-659.
- Hillebrand, H., 2002. Top-down versus bottom-up control of autotrophic biomass—a meta-analysis on experiments with periphyton. *Journal of the North American Benthological Society* 21(3):349-369.
- Hillebrand, H., 2008. Grazing regulates the spatial variability of periphyton biomass. *Ecology* 89(1):165-173.
- Hillebrand, H. & B. J. Cardinale, 2004. Consumer effects decline with prey diversity. *Ecology Letters* 7(3):192-201.
- Hillebrand, H. & M. Kahlert, 2001. Effect of grazing and nutrient supply on periphyton biomass and nutrient stoichiometry in habitats of different productivity. *Limnology and Oceanography* 46(8):1881-1898 doi:doi:10.4319/lo.2001.46.8.1881.
- Höckelmann, C., T. Moens & F. Jüttner, 2004. Odor compounds from cyanobacterial biofilms acting as attractants and repellents for free-living nematodes. *Limnology and Oceanography* 49(5):1809-1819 doi:10.4319/lo.2004.49.5.1809.
- Höss, S., P. Heininger, E. Claus, C. Möhlenkamp, M. Brinke & W. Trautspurger, 2017. Validating the NemaSPEAR [%]-index for assessing sediment quality regarding chemical-induced effects on benthic communities in rivers. *Ecological Indicators* 73:52-60.
- Höss, S., W. Trautspurger, G. F. S. Everin, I. Jüttner, G. Pfister & K.-W. Schramm, 2004. Influence of 4-nonylphenol on the structure of nematode communities in freshwater microcosms. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23(5):1268-1275 doi:doi:10.1897/03-226.
- Hummon, W., W. Evans, M. Hummon, F. Doherty & R. Wainberg, Meiofaunal abundance in sandbars of acid mine polluted, reclaimed, and unpolluted streams in southeastern Ohio. In: Thorp, J. H. & J. W. Gibbons (eds) *Energy and Environmental Stress in Aquatic Systems*, Augusta, Georgia 1978. p 188-203.
- Hunter, R. D., 1980. Effects of grazing on the quantity and quality of freshwater Aufwuchs. *Hydrobiologia* 69(3):251-259 doi:10.1007/bf00046800.
- Ieromina, O., W. J. Peijnenburg, G. de Snoo, J. Müller, T. P. Knepper & M. G. Vijver, 2014. Impact of imidacloprid on *Daphnia magna* under different food quality regimes. *Environmental Toxicology and Chemistry* 33(3):621-631.
- Imamura, S., 1931. Nematodes in the paddy field, with notes on their population before and after irrigation. *Journal of the College of Agriculture / Imperial University of Tokyo* 11(2):193-240.
- Jackson, C. R., P. F. Churchill & E. E. Roden, 2001. Successional changes in bacterial assemblage structure during epilithic biofilm development. *Ecology* 82(2):555-566 doi:10.1890/0012-9658(2001)082[0555:Scibas]2.0.Co;2.
- Jassey, V. E., M. Lamentowicz, L. Bragazza, M. L. Hofsommer, R. T. Mills, A. Buttler, C. Signarbieux & B. J. Robroek, 2016. Loss of testate amoeba functional diversity with increasing frost intensity across a continental gradient reduces microbial activity in peatlands. *European Journal of Protistology* 55:190-202.
- Jiang, J.-G., S.-G. Wu & Y.-F. Shen, 2007. Effects of seasonal succession and water pollution on the protozoan community structure in an eutrophic lake. *Chemosphere* 66(3):523-532 doi:<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.05.042>.
- Jiang, Y., H. Xu, X. Hu, M. Zhu, K. A. Al-Rasheid & A. Warren, 2011. An approach to analyzing spatial patterns of planktonic ciliate communities for monitoring water quality in Jiaozhou Bay, northern China. *Marine Pollution Bulletin* 62(2):227-235.
- Jüttner, F., 2001. Liberation of 5,8,11,14,17-eicosapentaenoic acid and other polyunsaturated fatty acids from lipids as a grazer defence reaction in epilithic diatom biofilms. *Journal of Phycology* 37(5):744-755 doi:10.1046/j.1529-8817.2001.00130.x.
- Kaehler, S. & P. W. Froneman, 2002. Herbivore-mediated increase in the photosynthetic capacity of marine biofilms: indirect effects of changing microalgal assemblage composition. *Marine Ecology Progress Series* 234:15-22.
- Kanavillil, N. & S. Kurissery, 2013. Dynamics of grazing protozoa follow that of microalgae in natural biofilm communities. *Hydrobiologia* 718(1):93-107 doi:10.1007/s10750-013-1606-6.
- Kathol, M., H. Fischer & M. Weitere, 2011. Contribution of biofilm-dwelling consumers to pelagic–benthic coupling in a large river. *Freshwater Biology* 56(6):1160-1172.
- Kendrick, M. R. & A. D. Huryn, 2015. Discharge, legacy effects and nutrient availability as determinants of temporal patterns in biofilm



- metabolism and accrual in an arctic river. *Freshwater Biology* 60(11):2323-2336.
- Knauf, W. & E. Schulze, 1972. Long range effect of sublethal amounts of the herbicide linuron and monolinuron on some representative fauna and flora. *Schriftenr Ver Wasser Boden Lufthyg Berlin-Dahlem* 37:231-239.
- Kudelska, M. M., L. Holden-Dye, V. O'Connor & D. A. Doyle, 2017. Concentration-dependent effects of acute and chronic neonicotinoid exposure on the behaviour and development of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Pest Management Science* 73(7):1345-1351.
- Kydd, J., H. Rajakaruna, E. Briski & S. Bailey, 2018. Examination of a high resolution laser optical plankton counter and FlowCAM for measuring plankton concentration and size. *Journal of Sea Research* 133:2-10 doi:10.1016/j.seares.2017.01.003.
- Laliberté, E., P. Legendre, B. Shipley & M. E. Laliberté, 2014. Package 'FD'. Measuring functional diversity from multiple traits, and other tools for functional ecology.
- Lamberti, G. A., 1984. Aquatic insects as primary consumers. The ecology of aquatic insects:164-195.
- Lappin-Scott, H. M. & J. W. Costerton, 2003. *Microbial biofilms*, vol 5. Cambridge University Press.
- Larned, S. T., 2010. A prospectus for periphyton: recent and future ecological research. *Journal of the North American Benthological Society* 29(1):182-206 doi:10.1899/08-063.1.
- Larras, F., A. Bouchez, F. Rimet & B. Montuelle, 2012. Using bioassays and Species Sensitivity Distributions to assess herbicide toxicity towards benthic diatoms. *PLoS ONE* 7(8):e44458.
- Lavorel, S., K. Grigulis, S. McIntyre, N. S. Williams, D. Garden, J. Dorrrough, S. Berman, F. Quéfier, A. Thébault & A. Bonis, 2008. Assessing functional diversity in the field—methodology matters! *Functional Ecology* 22(1):134-147.
- Lawton, J. H. & V. K. Brown, 1994. Redundancy in Ecosystems. In Schulze, E.-D. & H. A. Mooney (eds) *Biodiversity and Ecosystem Function*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 255-270.
- Leflaive, J. & L. Ten-Hage, 2011. Impairment of benthic diatom adhesion and photosynthetic activity by 2E,4E-decadienal. *Research in Microbiology* 162(9):982-989 doi:<https://doi.org/10.1016/j.resmic.2011.06.003>.
- Leflaive, J. & L. Ten-Hage, 2009. Chemical interactions in diatoms: role of polyunsaturated aldehydes and precursors. *New Phytologist* 184(4):794-805.
- Leppänen, M. T. & J. V. K. Kukkonen, 1998. Relative Importance of Ingested Sediment and Pore Water as Bioaccumulation Routes for Pyrene to Oligochaete (*Lumbriculus variegatus*, Müller). *Environmental Science & Technology* 32(10):1503-1508 doi:10.1021/es970941k.
- Levine, J. M., 2015. A trail map for trait-based studies. *Nature* 529:163 doi:10.1038/nature16862.
- Lewis, J. A. & J. T. Fleming, 1995. Basic culture methods *Methods in Cell Biology*. vol 48. Elsevier, 3-29.
- Liess, M., R. B. Schäfer & C. A. Schriever, 2008. The footprint of pesticide stress in communities—Species traits reveal community effects of toxicants. *Science of the Total Environment* 406(3):484-490 doi:<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.05.054>.
- Lischke, B., G. Weithoff, S. A. Wickham, K. Attermeyer, H.-P. Grossart, K. Scharnweber, S. Hilt & U. Gaedke, 2015. Large biomass of small feeders: ciliates may dominate herbivory in eutrophic lakes. *Journal of Plankton Research* 38(1):2-15.
- Lock, M. A., R. R. Wallace, J. W. Costerton, R. M. Ventullo & S. E. Charlton, 1984. River Epilithon: Toward a Structural-Functional Model. *Oikos* 42(1):10-22 doi:10.2307/3544604.
- López-Doval, J. C., M. Ricart, H. Guasch, A. M. Romani, S. Sabater & I. Muñoz, 2009. Does Grazing Pressure Modify Diuron Toxicity in a Biofilm Community? *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 58(4):955-962 doi:10.1007/s00244-009-9441-5.
- Loreau, M., 2004. Does functional redundancy exist? *Oikos* 104(3):606-611 doi:10.1111/j.0030-1299.2004.12685.x.
- Lorenzen, C. & S. Jeffrey, 1980. Determination of chlorophyll in seawater. *Unesco tech pap mar sci* 35(1):1-20.
- Lubchenco, J., 1978. Plant species diversity in a marine intertidal community: importance of herbivore food preference and algal competitive abilities. *American Naturalist*:23-39.
- Luck, G. W., S. Lavorel, S. McIntyre & K. Lumb, 2012. Improving the application of vertebrate trait-based frameworks to the study of ecosystem services. *Journal of Animal Ecology* 81(5):1065-1076.
- Lydon, J., S. O. Duke & J. Altman, 1993. The role of pesticides on host allelopathy and their effects on allelopathic compounds. *CRC*, Boca Raton:37-56.
- Magnusson, M., K. Heimann, M. Ridd & A. P. Negri, 2012. Chronic herbicide exposures affect the sensitivity and community structure of tropical benthic microalgae. *Marine*

- Pollution Bulletin 65(4):363-372  
doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.09.029>.
- Magnusson, M., K. Heimann, M. Ridd & A. P. Negri, 2013. Pesticide contamination and phytotoxicity of sediment interstitial water to tropical benthic microalgae. *Water Research* 47(14):5211-21  
doi:10.1016/j.watres.2013.06.003.
- Majdi, N., B. Mialet, S. Boyer, M. Tackx, J. Leflaive, S. Boulétreau, L. Ten-Hage, F. Julien, R. Fernandez & E. Buffan-Dubau, 2011a. The relationship between epilithic biofilm stability and its associated meiofauna under two patterns of flood disturbance. *Freshwater Science* 31(1):38-50.
- Majdi, N., M. Tackx & E. Buffan-Dubau, 2012a. Trophic positioning and microphytobenthic carbon uptake of biofilm-dwelling meiofauna in a temperate river. *Freshwater Biology* 57(6):1180-1190.
- Majdi, N., M. Tackx, W. Traunspurger & E. Buffan-Dubau, 2012b. Feeding of biofilm-dwelling nematodes examined using HPLC-analysis of gut pigment contents. *Hydrobiologia* 680(1):219-232 doi:10.1007/s10750-011-0920-0.
- Majdi, N., I. Threis & W. Traunspurger, 2017. It's the little things that count: Meiofaunal density and production in the sediment of two headwater streams. *Limnology and Oceanography* 62(1):151-163.
- Majdi, N. & W. Traunspurger, 2015. Free-Living Nematodes in the Freshwater Food Web: A Review.
- Majdi, N., W. Traunspurger, S. Boyer, B. Mialet, M. Tackx, R. Fernandez, S. Gehner, L. Ten-Hage & E. Buffan-Dubau, 2011b. Response of biofilm-dwelling nematodes to habitat changes in the Garonne River, France: influence of hydrodynamics and microalgal availability. *Hydrobiologia* 673(1):229-244 doi:10.1007/s10750-011-0781-6.
- Martin, E. C., K. B. Gido, N. Bello, W. K. Dodds & A. Veach, 2016. Increasing fish taxonomic and functional richness affects ecosystem properties of small headwater prairie streams. *Freshwater Biology* 61(6):887-898.
- Martin, H. L., C. Svendsen, L. J. Lister, J. L. Gomez-Eyles & D. J. Spurgeon, 2009. Measurement and modeling of the toxicity of binary mixtures in the nematode *Caenorhabditis elegans*—a test of independent action. *Environmental Toxicology and Chemistry* 28(1):97-104 doi:10.1897/07-215.1.
- Masiá, A., J. Campo, A. Navarro-Ortega, D. Barceló & Y. Picó, 2015. Pesticide monitoring in the basin of Llobregat River (Catalonia, Spain) and comparison with historical data. *Science of the Total Environment* 503-504(Supplement C):58-68  
doi:<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.06.095>.
- Mathieu, M., J. Leflaive, L. Ten-Hage, R. de Wit & E. Buffan-Dubau, 2007. Free-living nematodes affect oxygen turnover of artificial diatom biofilms. *Aquatic Microbial Ecology* 49(3):281-291.
- Matsuda, K., S. D. Buckingham, D. Kleier, J. J. Rauh, M. Grauso & D. B. Sattelle, 2001. Neonicotinoids: insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors. *Trends in Pharmacological Sciences* 22(11):573-580  
doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0165-6147\(00\)01820-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0165-6147(00)01820-4).
- Matsuda, K., S. Kanaoka, M. Akamatsu & D. B. Sattelle, 2009. Diverse actions and target-site selectivity of neonicotinoids: structural insights. *Molecular Pharmacology*.
- McCormick, P. V., 1991. Lotic Protistan Herbivore Selectivity and Its Potential Impact on Benthic Algal Assemblages. *Journal of the North American Benthological Society* 10(3):238-250 doi:10.2307/1467597.
- Meurer, A. Z. & S. A. Netto, 2007. Seasonal dynamics of benthic communities in a shallow sublittoral site of Laguna Estuarine System (South, Brazil). *Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology* 11(2):53-62.
- Meyer, D. & P. L. Williams, 2014. Toxicity testing of neurotoxic pesticides in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B* 17(5):284-306.
- Moens, T., W. Traunspurger & M. Bergtold, 2006. Feeding ecology of free-living benthic nematodes. *Freshwater nematodes: ecology and taxonomy* CAB International publishing, Cambridge:105-131.
- Moens, T., A.-M. Vafeiadou, E. De Geyter, P. Vanormelingen, K. Sabbe & M. De Troch, 2014. Diatom feeding across trophic guilds in tidal flat nematodes, and the importance of diatom cell size. *Journal of Sea Research* 92:125-133  
doi:<https://doi.org/10.1016/j.seares.2013.08.007>.
- Moens, T. & M. Vincx, 1997. Observations on the feeding ecology of estuarine nematodes. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 77(01):211-227.
- Moghaddam, N. S., M. P. Zakaria, D. Omar, K. Sijam & R. Khakvar, Effects of imidacloprid on the biodiversity of soil microbes in selected soils of Malaysia. In: *Proceedings 2nd international conference on environmental science and development IPCBEE*, 2011. vol 4.
- Moisset, S., S. Kim Tiam, A. Feurtet-Mazel, S. Morin, F. Delmas, N. Mazzella & P. Gonzalez, 2015. Genetic and physiological responses of three freshwater diatoms to realistic diuron exposures. *Environmental Science*

- and Pollution Research International 22(6):4046-55 doi:10.1007/s11356-014-3523-2.
- Mondy, C. P., B. Villeneuve, V. Archaimbault & P. Usseglio-Polatera, 2012. A new macroinvertebrate-based multimetric index (I2M2) to evaluate ecological quality of French wadeable streams fulfilling the WFD demands: A taxonomical and trait approach. *Ecological Indicators* 18:452-467 doi:<https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2011.12.013>.
- Mora-Gómez, J., A. Freixa, N. Perujo & L. Barral-Fraga, 2015. Limits of the biofilm concept and types of aquatic biofilms Aquatic biofilms: ecology, water quality and wastewater treatment. Caister Academic Press UK, 3-28.
- Morin, S., B. Chaumet & N. Mazzella, 2018. A Time-Dose Response Model to Assess Diuron-Induced Photosynthesis Inhibition in Freshwater Biofilms. *Frontiers in Environmental Science* 6(131) doi:10.3389/fenvs.2018.00131.
- Morin, S., M. Coste & F. Delmas, 2007. Substrats artificiels : dans quelle limite permettent-ils de décrire les peuplements diatomiques des cours d'eau? *Ingénieries EAT* 52:3-12.
- Morin, S., N. Gómez, E. Tornés, M. Licursi & J. Rosebery, 2016. Benthic diatom monitoring and assessment of freshwater environments: standard methods and future challenges *Aquatic Biofilms: Ecology, Water Quality and Water Treatment*. Caister Academic Press UK, 111-124.
- Morin, S., L. Proia, M. Ricart, C. Bonnineau, A. Geiszinger, F. Ricciardi, H. Guasch, A. Romani & S. Sabater, 2010. Effects of a bactericide on the structure and survival of benthic diatom communities. *Vie et Milieu (Life and Environment)* 60(2):109-116.
- Motta, R. L. & V. S. Uieda, 2005. Food web structure in a tropical stream ecosystem. *Austral Ecology* 30(1):58-73 doi:10.1111/j.1442-9993.2005.01424.x.
- Münze, R., P. Orlinskiy, R. Gunold, A. Paschke, O. Kaske, M. A. Beketov, M. Hundt, C. Bauer, G. Schüürmann, M. Möder & M. Liess, 2015. Pesticide impact on aquatic invertebrates identified with Chemcatcher® passive samplers and the SPEARpesticides index. *Science of the Total Environment* 537(Supplement C):69-80 doi:<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.07.012>.
- Muscarella, R. & M. Uriarte, 2016. Do community-weighted mean functional traits reflect optimal strategies? *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 283(1827):20152434 doi:10.1098/rspb.2015.2434.
- Naser, M. N. & D. Roy, 2012. Feeding ecology of Chironomus larvae (Insecta: Diptera) collected from different habitat of Dhaka, Bangladesh. *Bangladesh Journal of Zoology* 40(1):129-133.
- Nebeker, A. & G. Schuytema, 1998. Chronic effects of the herbicide diuron on freshwater cladocerans, amphipods, midges, minnows, worms, and snails. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 35(3):441-446.
- Neury-Ormanni, J., 2014. les interactions micro-méiofaune/microalgues des biofilms d'eau douce lors de tests écotoxicologiques en milieu aquatiques sur supports immergés. M1 SPE-Ecologie, Univ. La Rochelle.
- Neury-Ormanni, J., C. Doose, N. Majdi, J. Vedrenne, S. Morin, S. Höss & W. Traunspurger, 2019. Tolerance of free-living nematode species to imidacloprid and diuron. *Invertebrate Biology* (accepted 13.09.2019).
- Neury-Ormanni, J., J. Vedrenne & S. Morin, 2016. Who eats who in biofilms? Exploring the drivers of microalgal and micro-meiofaunal abundance. *Botany Letters* 163(2):83-92 doi:10.1080/23818107.2016.1151827.
- Nilsen, E., K. L. Smalling, L. Ahrens, M. Gros, K. S. B. Miglioranza, Y. Picó & H. L. Schoenfuss, 2019. Critical review: Grand challenges in assessing the adverse effects of contaminants of emerging concern on aquatic food webs. *Environmental Toxicology and Chemistry* 38(1):46-60 doi:10.1002/etc.4290.
- Norf, H. & M. Weitere, 2010. Resource quantity and seasonal background alter warming effects on communities of biofilm ciliates. *FEMS Microbiology Ecology* 74(2):361-370 doi:10.1111/j.1574-6941.2010.00948.x.
- Odum, E. P. & G. W. Barrett, 1971. *Fundamentals of ecology*, vol 3. Saunders Philadelphia.
- Ormerod, S. J., M. Dobson, A. G. Hildrew & C. R. Townsend, 2010. Multiple stressors in freshwater ecosystems. *Freshwater Biology* 55(s1):1-4 doi:10.1111/j.1365-2427.2009.02395.x.
- Paine, R. T., 1966. Food web complexity and species diversity. *The American Naturalist* 100(910):65-75.
- Pakeman, R. J., E. Garnier, S. Lavorel, P. Ansquer, H. Castro, P. Cruz, J. Doležal, O. Eriksson, H. Freitas, C. Golodets, J. Kigel, M. Kleyer, J. Lepš, T. Meier, M. Papadimitriou, V. P. Papanastasis, H. Quested, F. Quétier, G. Rusch, M. Sternberg, J.-P. Theau, A. Thébault & D. Vile, 2008. Impact of abundance weighting on the response of seed traits to climate and land use. *Journal of Ecology* 96(2):355-366 doi:10.1111/j.1365-2745.2007.01336.x.

- Parry, D. J., 2004. Protozoan grazing of Freshwater Biofilms *Advances in Applied Microbiology*. vol 54. Elsevier, 167-196.
- 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  
doi:<https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2006.09.018>.
- Paul, C., M. A. Mausz & G. Pohnert, 2013. A co-culturing/metabolomics approach to investigate chemically mediated interactions of planktonic organisms reveals influence of bacteria on diatom metabolism. *Metabolomics* 9(2):349-359  
doi:10.1007/s11306-012-0453-1.
- Perhar, G. & G. B. Arhonditsis, 2012. Examination of the role of detritus food quality, phytoplankton intracellular storage capacity, and zooplankton stoichiometry on planktonic dynamics. *Ecological Informatics* 11:76-89  
doi:<https://doi.org/10.1016/j.ecoinf.2012.06.002>.
- Pesce, S., C. Fajon, C. Bardot, F. Bonnemoy, C. Portelli & J. Bohatier, 2006. Effects of the phenylurea herbicide diuron on natural riverine microbial communities in an experimental study. *Aquatic Toxicology* 78(4):303-314  
doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.03.006>.
- Pestana, J. L. T., A. C. Alexander, J. M. Culp, D. J. Baird, A. J. Cessna & A. M. V. M. Soares, 2009a. Structural and functional responses of benthic invertebrates to imidacloprid in outdoor stream mesocosms. *Environmental Pollution* 157(8):2328-2334  
doi:<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.03.027>.
- Pestana, J. L. T., S. Loureiro, D. J. Baird & A. M. V. M. Soares, 2009b. Fear and loathing in the benthos: Responses of aquatic insect larvae to the pesticide imidacloprid in the presence of chemical signals of predation risk. *Aquatic Toxicology* 93(2-3):138-149  
doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.04.008>.
- Petchey, O. L. & K. J. Gaston, 2006. Functional diversity: back to basics and looking forward. *Ecology Letters* 9(6):741-758  
doi:10.1111/j.1461-0248.2006.00924.x.
- Petchey, O. L., P. T. McPhearson, T. M. Casey & P. J. Morin, 1999. Environmental warming alters food-web structure and ecosystem function. *Nature* 402(6757):69.
- Pfister, G., B. Auer & H. Arndt, 2002. Pelagic ciliates (Protozoa, Ciliophora) of different brackish and freshwater lakes — a community analysis at the species level. *Limnologica - Ecology and Management of Inland Waters* 32(2):147-168  
doi:[http://doi.org/10.1016/S0075-9511\(02\)80005-6](http://doi.org/10.1016/S0075-9511(02)80005-6).
- Pisa, L. W., V. Amaral-Rogers, L. P. Belzunces, J.-M. Bonmatin, C. A. Downs, D. Goulson, D. P. Kreuzweiser, C. Krupke, M. Liess & M. McField, 2015. Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. *Environmental Science and Pollution Research* 22(1):68-102.
- Pohlert, T., 2014. The pairwise multiple comparison of mean ranks package (PMCMR). R package 27.
- Porter, K. G., 1977. The Plant-Animal Interface in Freshwater Ecosystems: Microscopic grazers feed differentially on planktonic algae and can influence their community structure and succession in ways that are analogous to the effects of herbivores on terrestrial plant communities. *American Scientist* 65(2):159-170  
doi:10.2307/27847715.
- Porter, K. G., E. B. Sherr, B. F. Sherr, M. Pace & R. W. Sanders, 1985. Protozoa in Planktonic Food Webs 1,2. *The Journal of Protozoology* 32(3):409-415  
doi:10.1111/j.1550-7408.1985.tb04036.x.
- Pourriot, R., 1957. Sur la nutrition des Rotifères à partir des Algues d'eau douce. *Hydrobiologia* 9(1):50-59.
- Pratt, J. R. & J. Cairns, 1985. Functional Groups in the Protozoa: Roles in Differing Ecosystems 1,2. *The Journal of Protozoology* 32(3):415-423  
doi:10.1111/j.1550-7408.1985.tb04037.x.
- Proia, L., F. Cassió, C. Pascoal, A. Tili & A. M. Romani, 2012. The Use of Attached Microbial Communities to Assess Ecological Risks of Pollutants in River Ecosystems: The Role of Heterotrophs. In Guasch, H., A. Ginebreda & A. Geiszinger (eds) *Handbook of Environmental Chemistry*. vol 19. Springer, Heidelberg, 55-83.
- Proia, L., S. Morin, M. Peipoch, A. M. Romani & S. Sabater, 2011. Resistance and recovery of river biofilms receiving short pulses of Triclosan and Diuron. *Science of the Total Environment* 409(17):3129-3137  
doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.05.013>.
- Ptatscheck, C., B. Kreuzinger-Janik, H. Putzki & W. Traunspurger, 2015. Insights into the importance of nematode prey for chironomid larvae. *Hydrobiologia* 757(1):143-153  
doi:10.1007/s10750-015-2246-9.
- Ptatscheck, C., H. Putzki & W. Traunspurger, 2017. Impact of deposit-feeding chironomid larvae (*Chironomus riparius*) on meiofauna and protozoans. *Freshwater Science* 36(4):796-804  
doi:10.1086/694461.



- Rakowski, C. & B. J. Cardinale, 2016. Herbivores control effects of algal species richness on community biomass and stability in a laboratory microcosm experiment. *Oikos*:n/a-n/a doi:10.1111/oik.03105.
- Ribes, M., R. Coma & J.-M. Gili, 1998. Seasonal variation of in situ feeding rates by the temperate ascidian *Halocynthia papillosa*. *Marine Ecology Progress Series* 175:201-213.
- Ricart, M., D. Barceló, A. Geiszinger, H. Guasch, M. L. d. Alda, A. M. Romani, G. Vidal, M. Villagrasa & S. Sabater, 2009. Effects of low concentrations of the phenylurea herbicide diuron on biofilm algae and bacteria. *Chemosphere* 76(10):1392-1401 doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.06.017>.
- Ricart, M., H. Guasch, M. Alberch, D. Barceló, C. Bonnineau, A. Geiszinger, J. Ferrer, F. Ricciardi, A. M. Romani & S. Morin, 2010. Triclosan persistence through wastewater treatment plants and its potential toxic effects on river biofilms. *Aquatic Toxicology* 100(4):346-353.
- Riemann, F. & E. Helmke, 2002. Symbiotic relations of sediment-agglutinating nematodes and bacteria in detrital habitats: the enzyme-sharing concept. *Marine Ecology* 23(2):93-113.
- Rioboo, C., O. González, C. Herrero & A. Cid, 2002. Physiological response of freshwater microalga (*Chlorella vulgaris*) to triazine and phenylurea herbicides. *Aquatic Toxicology* 59(3-4):225-235.
- Roche, H., Y. Vollaire, A. Persic, A. Buet, C. Oliveira-Ribeiro, E. Coulet, D. Banas & F. Ramade, 2009. Organochlorines in the Vaccarès Lagoon trophic web (Biosphere Reserve of Camargue, France). *Environmental Pollution* 157(8):2493-2506 doi:<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.03.016>.
- Roubex, V., N. Mazzella, L. Schouler, V. Fauvelle, S. Morin, M. Coste, F. Delmas & C. Margoum, 2011. 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 doi:10.1039/C0EM00783H.
- Rubach, M. N., R. Ashauer, D. B. Buchwalter, H. De Lange, M. Hamer, T. G. Preuss, K. Töpke & S. J. Maund, 2011. Framework for traits-based assessment in ecotoxicology. *Integrated Environmental Assessment and Management* 7(2):172-186 doi:10.1002/ieam.105.
- Rudnick, D. T., R. Elmgren & J. B. Frithsen, 1985. Meiofaunal prominence and benthic seasonality in a coastal marine ecosystem. *Oecologia* 67(2):157-168 doi:10.1007/bf00384279.
- Ruiz, T., A. Bec, M. Danger, A.-M. Koussoroplis, J.-P. Aguer, J.-P. Morel & N. Morel-Desrosiers, 2018. A microcalorimetric approach for investigating stoichiometric constraints on the standard metabolic rate of a small invertebrate. *Ecology Letters* 21(11):1714-1722 doi:10.1111/ele.13137.
- Sabater, S., D. Barceló, N. De Castro-Català, A. Ginebreda, M. Kuzmanovic, M. Petrovic, Y. Picó, L. Ponsatí, E. Tornés & I. Muñoz, 2016. Shared effects of organic microcontaminants and environmental stressors on biofilms and invertebrates in impaired rivers. *Environmental Pollution* 210:303-314 doi:<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.01.037>.
- Sabater, S., H. Guasch, M. Ricart, A. Romani, G. Vidal, C. Klünder & M. Schmitt-Jansen, 2007. Monitoring the effect of chemicals on biological communities. The biofilm as an interface. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 387(4):1425-1434.
- Sabater, S. & A. M. Romani, 1996. Metabolic changes associated with biofilm formation in an undisturbed Mediterranean stream. *Hydrobiologia* 335(2):107-113 doi:10.1007/bf00015272.
- Samorì, G., C. Samorì, F. Guerrini & R. Pistocchi, 2013. Growth and nitrogen removal capacity of *Desmodesmus communis* and of a natural microalgae consortium in a batch culture system in view of urban wastewater treatment: Part I. *Water Research* 47(2):791-801 doi:<https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.11.006>.
- Schmid-Araya, J. M. & P. E. Schmid, 2000. Trophic relationships: integrating meiofauna into a realistic benthic food web. *Freshwater Biology* 44(1):149-163 doi:10.1046/j.1365-2427.2000.00594.x.
- Schmitz, O. J., R. W. Buchkowski, K. T. Burghardt & C. M. Donihue, 2015. Chapter Ten - Functional Traits and Trait-Mediated Interactions: Connecting Community-Level Interactions with Ecosystem Functioning. In Pawar, S., G. Woodward & A. I. Dell (eds) *Advances in Ecological Research*. vol 52. Academic Press, 319-343.
- Schrama, M., S. H. Barmantlo, E. R. Hunting, R. S. P. van Logtestijn, M. G. Vijver & P. M. van Bodegom, 2017. Pressure-Induced Shifts in Trophic Linkages in a Simplified Aquatic Food Web. *Frontiers in Environmental Science* 5(75) doi:10.3389/fenvs.2017.00075.
- Schroeder, F., W. Traunspurger, K. Pettersson & L. Peters, 2012. Temporal changes in periphytic meiofauna in lakes of different

- trophic states. *Journal of Limnology* 71(1):e23-e23 doi:10.4081.
- Segner, H., M. Schmitt-Jansen & S. Sabater, 2014. Assessing the impact of multiple stressors on aquatic biota: the receptor's side matters. *Environmental Science & Technology* 48(14):7690-6 doi:10.1021/es405082t.
- Sekar, R., K. Nair, V. Rao & V. Venugopalan, 2002. Nutrient dynamics and successional changes in a lentic freshwater biofilm. *Freshwater Biology* 47(10):1893-1907.
- Semprucci, F., C. Facca, F. Ferrigno, M. Balsamo, A. Sfriso & R. Sandulli, 2019. Biotic and abiotic factors affecting seasonal and spatial distribution of meiofauna and macrophytobenthos in transitional coastal waters. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 219:328-340 doi:<https://doi.org/10.1016/j.ecss.2019.02.008>.
- Semprucci, F., C. Sbrocca, M. Rocchi & M. Balsamo, 2015. Temporal changes of the meiofaunal assemblage as a tool for the assessment of the ecological quality status. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 95(2):247-254 doi:10.1017/S0025315414001271.
- SERA, 2005. Imidacloprid - Human Health and Ecological Risk Assessment – Final Report. Report from Syracuse Environmental Research Associates to USDA, Forest Service, 283.
- Shibamura, A., T. Ikeda & Y. Nishikawa, 2009. A method for oral administration of hydrophilic substances to *Caenorhabditis elegans*: Effects of oral supplementation with antioxidants on the nematode lifespan. *Mechanisms of Ageing and Development* 130(9):652-655 doi:<https://doi.org/10.1016/j.mad.2009.06.008>.
- Siddiqui, I. A. & D. Taylor, 1969. Feeding mechanisms of *Aphelenchoides bicaudatus* on three fungi and an alga. *Nematologica* 15(4):503-509.
- Simon-Delso, N., V. Amaral-Rogers, L. P. Belzunces, J.-M. Bonmatin, M. Chagnon, C. Downs, L. Furlan, D. W. Gibbons, C. Giorio & V. Girolami, 2015. Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. *Environmental Science and Pollution Research* 22(1):5-34.
- Sladeczek, V. & A. Sladeczkova, 1963. Relationship between wet weight and dry weight of the periphyton. *Limnology and Oceanography* 8(2):309-311 doi:10.4319/lo.1963.8.2.0309.
- Soes, 2015. Les pesticides dans les cours d'eau français en 2013. Commissariat général au développement durable. Ministère de l'écologie, du développement durable et de l'énergie.
- Soliveres, S., F. T. Maestre, M. A. Bowker, R. Torices, J. L. Quero, M. García-Gómez, O. Cabrera, A. P. Cea, D. Coaguila, D. J. Eldridge, C. I. Espinosa, F. Hemmings, J. J. Monerris, M. Tighe, M. Delgado-Baquerizo, C. Escobar, P. García-Palacios, B. Gozalo, V. Ochoa, J. Blones, M. Derak, W. Ghiloufi, J. R. Gutiérrez, R. M. Hernández & Z. Nouni, 2014. Functional traits determine plant co-occurrence more than environment or evolutionary relatedness in global drylands. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 16(4):164-173 doi:<https://doi.org/10.1016/j.ppees.2014.05.001>.
- Song, M. Y., J. D. Stark & J. J. Brown, 1997. Comparative toxicity of four insecticides, including imidacloprid and tebufenozide, to four aquatic arthropods. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16(12):2494-2500.
- Stanca, E., M. Cellamare & A. Basset, 2013. Geometric shape as a trait to study phytoplankton distributions in aquatic ecosystems. *Hydrobiologia* 701(1):99-116 doi:10.1007/s10750-012-1262-2.
- Sterner, R. W., 1990. The Ratio of Nitrogen to Phosphorus Resupplied by Herbivores: Zooplankton and the Algal Competitive Arena. *The American Naturalist* 136(2):209-229.
- Stoughton, S. J., K. Liber, J. Culp & A. Cessna, 2008. Acute and Chronic Toxicity of Imidacloprid to the Aquatic Invertebrates *Chironomus tentans* and *Hyalella azteca* under Constant- and Pulse-Exposure Conditions. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 54(4):662-673 doi:10.1007/s00244-007-9073-6.
- Sun, R., Y. Xu, Y. Wu, J. Tang, S. Esquivel-Elizondo, P. G. Kerr, P. L. Staddon & J. Liu, 2019. Functional sustainability of nutrient accumulation by periphytic biofilm under temperature fluctuations. *Environmental Technology*:1-10 doi:10.1080/09593330.2019.1659422.
- Tachet, H., P. Richoux, M. Bournaud & P. Usseglio Polatera, 2010. Invertébrés d'eau douce : systématique, biologie, écologie. CNRS Editions, Paris.
- Tang, J., K. D. Hoagland & B. D. Siegfried, 1998. Uptake and bioconcentration of atrazine by selected freshwater algae. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal* 17(6):1085-1090.
- Tenore, K. R., Some Ecological Perspectives in the Study of the Nutrition of Deposit Feeders. In, New York, NY, 1989. *Ecology of Marine Deposit Feeders*. Springer New York, p 309-317.

- Tišler, T., A. Jemec, B. Mozetič & P. Trebše, 2009. Hazard identification of imidacloprid to aquatic environment. *Chemosphere* 76(7):907-914  
doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.05.002>.
- Tlili, A., U. Dorigo, B. Montuelle, C. Margoum, N. Carlier, V. Gouy, A. Bouchez & A. Bérard, 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  
doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2008.02.004>.
- Tlili, A., B. Montuelle, A. Bérard & A. Bouchez, 2011. Impact of chronic and acute pesticide exposures on periphyton communities. *Science of the Total Environment* 409(11):2102-2113.
- Tokeshi, M., 1995. Species interactions and community structure. In Armitage, P. D., P. S. Cranston & L. C. V. Pinder (eds) *The Chironomidae: Biology and ecology of non-biting midges*. Springer Netherlands, Dordrecht, 297-335.
- Tomizawa, M. & J. E. Casida, 2005. Neonicotinoid insecticide toxicology: Mechanisms of Selective Action. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 45(1):247-268  
doi:doi:10.1146/annurev.pharmtox.45.1204.03.095930.
- Tornøe, C., D. Bai, L. Holden-Dye, S. N. Abramson & D. B. Sattelle, 1995. Actions of neurotoxins (bungarotoxins, neosurugatoxin and lophotoxins) on insect and nematode nicotinic acetylcholine receptors. *Toxicon* 33(4):411-424  
doi:[http://dx.doi.org/10.1016/0041-0101\(94\)00163-3](http://dx.doi.org/10.1016/0041-0101(94)00163-3).
- Traunspurger, W., 1996. Distribution of benthic nematodes in the littoral of an oligotrophic lake (Königssee, National Park Berchtesgaden, FRG). *Archiv fuer Hydrobiologie* 135(3).
- Traunspurger, W., 1997. Bathymetric, seasonal and vertical distribution of feeding-type of nematodes in an oligotrophic lake. *Vie et Milieu* 47(1):1-7.
- Traunspurger, W., 2000. The biology and ecology of lotic nematodes. *Freshwater Biology* 44(1):29-45.
- Traunspurger, W., M. Haitzer, S. Höss, S. Beier, W. Ahlf & C. Steinberg, 1997. Ecotoxicological assessment of aquatic sediments with *Caenorhabditis elegans* (Nematoda) — a method for testing liquid medium and whole-sediment samples. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16(2):245-250  
doi:10.1002/etc.5620160221.
- Tretny, A. & R. E. Kendrick, 1991. Acetylcholine in plants: presence, metabolism and mechanism of action. *The Botanical Review* 57(1):33-73.
- Troton, D., R. Calvayrac, A. T. P. Thit & D. Laval-Martin, 1986. Modifications of thylakoid lipids in *englena gracilis* during diuron-adaptation. *Phytochemistry* 25(2):393-399  
doi:[https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)85487-4](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)85487-4).
- Usseglio-Polatera, P., M. Bournaud, P. Richoux & H. Tachet, 2001. Biological and ecological traits of benthic freshwater macroinvertebrates: relationships and definition of groups with similar traits. *Freshwater Biology* 43(2):175-205  
doi:10.1046/j.1365-2427.2000.00535.x.
- Van den Brink, P. J., A. B. A. Boxall, L. Maltby, B. W. Brooks, M. A. Rudd, T. Backhaus, D. Spurgeon, V. Verougstraete, C. Ajao, G. T. Ankley, S. E. Apitz, K. Arnold, T. Brodin, M. Cañedo-Argüelles, J. Chapman, J. Corrales, M.-A. Coutellec, T. F. Fernandes, J. Fick, A. T. Ford, G. Giménez Papiol, K. J. Groh, T. H. Hutchinson, H. Kruger, J. V. K. Kukkonen, S. Loutseti, S. Marshall, D. Muir, M. E. Ortiz-Santaliestra, K. B. Paul, A. Rico, I. Rodea-Palomares, J. Römbke, T. Rydberg, H. Segner, M. Smit, C. A. M. van Gestel, M. Vighi, I. Werner, E. I. Zimmer & J. van Wensem, 2018. Toward sustainable environmental quality: Priority research questions for Europe. *Environmental Toxicology and Chemistry* 37(9):2281-2295  
doi:doi:10.1002/etc.4205.
- Van den Brink, P. J. & C. J. T. Braak, 1999. Principal response curves: Analysis of time-dependent multivariate responses of biological community to stress. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal* 18(2):138-148.
- Van der Sluijs, J., V. Amaral-Rogers, L. Belzunces, M. B. van Lexmond, J.-M. Bonmatin, M. Chagnon, C. Downs, L. Furlan, D. Gibbons & C. Giorio, 2015. Conclusions of the Worldwide Integrated Assessment on the risks of neonicotinoids and fipronil to biodiversity and ecosystem functioning. *Environmental Science and Pollution Research* 22(1):148-154.
- Van Dijk, T. C., M. A. Van Staalduinen & J. P. Van der Sluijs, 2013. Macro-Invertebrate Decline in Surface Water Polluted with Imidacloprid. *PloS ONE* 8(5):e62374  
doi:10.1371/journal.pone.0062374.
- Van Lexmond, M. B., J.-M. Bonmatin, D. Goulson & D. A. Noome, 2015. Worldwide integrated assessment on systemic pesticides. *Environmental Science and Pollution Research* 22(1):1-4  
doi:10.1007/s11356-014-3220-1.
- Vedry, B., 1996. Les biomasses épuratrices. Agence de l'eau Seine-Normandie, Nanterre.


- Villanueva, V. D., J. Font, T. Schwartz & A. M. Romani, 2011. Biofilm formation at warming temperature: acceleration of microbial colonization and microbial interactive effects. *Biofouling* 27(1):59-71 doi:10.1080/08927014.2010.538841.
- Villéger, S., N. W. Mason & D. Mouillot, 2008. New multidimensional functional diversity indices for a multifaceted framework in functional ecology. *Ecology* 89(8):2290-2301.
- Villéger, S., J. R. Miranda, D. F. Hernández & D. Mouillot, 2010. Contrasting changes in taxonomic vs. functional diversity of tropical fish communities after habitat degradation. *Ecological Applications* 20(6):1512-1522.
- Violle, C., M.-L. Navas, D. Vile, E. Kazakou, C. Fortunel, I. Hummel & E. Garnier, 2007. Let the concept of trait be functional! *Oikos* 116(5):882-892 doi:10.1111/j.0030-1299.2007.15559.x.
- Vos, J. H., M. A. G. Ooijevaar, J. F. Postma & W. Admiraal, 2000. Interaction between food availability and food quality during growth of early instar chironomid larvae. *Journal of the North American Benthological Society* 19(1):158-168 doi:10.2307/1468288.
- Wang, C. J. & Z. Q. Liu, 2007. Foliar uptake of pesticides—Present status and future challenge. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 87(1):1-8 doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2006.04.004>.
- Watson, M. G., A. J. Scardino, L. Zaluzniak & J. Shimeta, 2015. Colonisation and succession of marine biofilm-dwelling ciliate assemblages on biocidal antifouling and fouling-release coatings in temperate Australia. *Biofouling* 31(9-10):709-720.
- Weber, S. & W. Traunspurger, 2013. Food choice of two bacteria-feeding nematode species dependent on food source, food density and interspecific competition. *Nematology* 15(3):291-301 doi:10.1163/15685411-00002679.
- Weisse, T., 2017. Functional diversity of aquatic ciliates. *European Journal of Protistology* 61:331-358 doi:<https://doi.org/10.1016/j.ejop.2017.04.001>.
- Weisse, T., R. Anderson, H. Arndt, A. Calbet, P. J. Hansen & D. J. S. Montagnes, 2016. Functional ecology of aquatic phagotrophic protists – Concepts, limitations, and perspectives. *European Journal of Protistology* 55:50-74 doi:<https://doi.org/10.1016/j.ejop.2016.03.003>.
- Weitere, M., M. Erken, N. Majdi, H. Arndt, H. Norf, M. Reinshagen, W. Traunspurger, A. Walterscheid & J. K. Wey, 2018. The food web perspective on aquatic biofilms. *Ecological Monographs* doi:10.1002/ecm.1315.
- Williams, P. L. & D. B. Dusenbery, 1990. Aquatic toxicity testing using the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal* 9(10):1285-1290.
- Wood, F. H., 1973. Nematode feeding relationships: Feeding relationships of soil-dwelling nematodes. *Soil Biology and Biochemistry* 5(5):593-601 doi:[https://doi.org/10.1016/0038-0717\(73\)90049-7](https://doi.org/10.1016/0038-0717(73)90049-7).
- Xu, Y., T. Stoeck, D. Forster, Z. Ma, L. Zhang & X. Fan, 2018. Environmental status assessment using biological traits analyses and functional diversity indices of benthic ciliate communities. *Marine Pollution Bulletin* 131:646-654.
- Zhao, L., G. Xu, Z. Wang & H. Xu, 2016. Body-size spectra of biofilm-dwelling protozoa and their seasonal shift in coastal ecosystems. *European Journal of Protistology* 56:32-40 doi:10.1016/j.ejop.2016.07.003.





# Annexes

## Annexe 1 : Préparation du milieu Dauta

	<b>Groupement de Bordeaux</b> UR Écosystèmes Aquatiques et changements globaux	<b>Laboratoire d'Hydrobiologie</b>	EABX_HYD_405 Version : 2 Date : 27/10/2017 Page : 5/11 Processus : R4
		<b>Mode Opérateur</b>	
		<b>Cultures de micro-algues d'eaux douces en milieu liquide</b>	

Éléments majeurs :	Masses à dissoudre dans des fioles de 100 ml d'eau déminéralisée
FeSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0,1 g
NaHCO <sub>3</sub>	5 g
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,5 g
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	2,5 g
CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O	2,5 g
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> , 9H <sub>2</sub> O	2,842 g
KNO <sub>3</sub>	20 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,5 g

Lorsque les solutions sont terminées, les transvaser de préférence dans des récipients en verre (fermés avec un bouchon). A l'exception de la solution de Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub> , 9H<sub>2</sub>O qui doit être stockée dans un récipient en plastique pour éviter une potentielle interaction entre le verre et la silice.

#### 4.2.1.2.2 Préparation des oligoéléments (trace metal solution)

Éléments trace :	Masses à dissoudre dans 1 litre d'eau déminéralisée
CuCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O	20 mg
ZnSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	20 mg
CoCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O	10 mg
MnCl <sub>2</sub> , 4H <sub>2</sub> O	400 mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> , 2H <sub>2</sub> O	35 mg
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1 mg

#### 4.2.1.2.3 Préparation du milieu de culture :

Dans une bouteille en verre d'un litre, en milieu stérile (ici sous flamme au bec benzène), ajouter les solutions suivantes, à l'aide d'une seringue et d'un filtre :

- 1 ml d'oligoéléments
- 1 ml de FeSO<sub>4</sub> , 7H<sub>2</sub>O
- 1 ml de NaHCO<sub>3</sub>
- 1 ml de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>
- 1 ml de MgSO<sub>4</sub> , 7H<sub>2</sub>O
- 1 ml de CaCl<sub>2</sub> , 2H<sub>2</sub>O
- 1 ml de KNO<sub>3</sub>
- 1 ml de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- 3,6 ml de Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub> , 9H<sub>2</sub>O

Une fois les solutions ajoutées, compléter jusqu'à un litre avec de l'eau distillée ou déminéralisée.

A l'aide de papier pH, ajuster le pH aux environ de 7,5 – 8 avec du HCl. Moins d'une dizaine de goutte suffisent (~100µL).

Pour finir, autoclaver la bouteille.

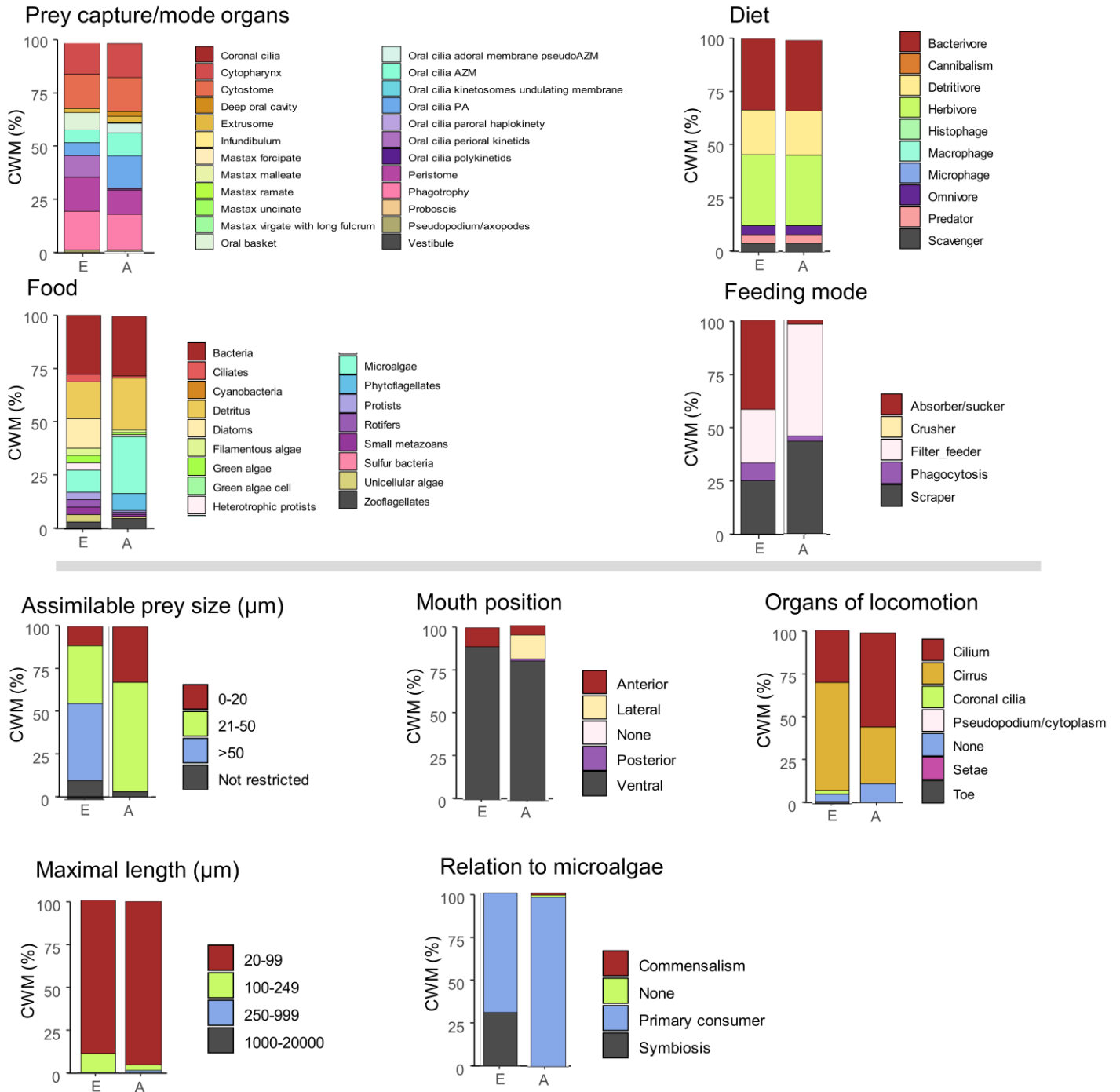
Le milieu de culture ainsi préparée et les solutions nutritives sont stockés au réfrigérateur.

## Annexe 2 : Composition des eaux de sources Volvic et Ondine

Composition	Volvic ®	Ondine ®
Bicarbonates	74 mg.L <sup>-1</sup>	163,5 mg.L <sup>-1</sup>
Calcium	12 mg.L <sup>-1</sup>	46,1 mg.L <sup>-1</sup>
Chlorures	15 mg.L <sup>-1</sup>	3,5 mg.L <sup>-1</sup>
Magnésium	8 mg.L <sup>-1</sup>	4,3 mg.L <sup>-1</sup>
Nitrates	7,3 mg.L <sup>-1</sup>	<1 mg.L <sup>-1</sup>
Potassium	6 mg.L <sup>-1</sup>	3,5 mg.L <sup>-1</sup>
Sodium	12 mg.L <sup>-1</sup>	6,3 mg.L <sup>-1</sup>
Silice	32 mg.L <sup>-1</sup>	/
Sulfate	9 mg.L <sup>-1</sup>	9 mg.L <sup>-1</sup>
Résidus à 180°C	130 mg.L <sup>-1</sup>	178 mg.L <sup>-1</sup>
pH	7,00	7,65

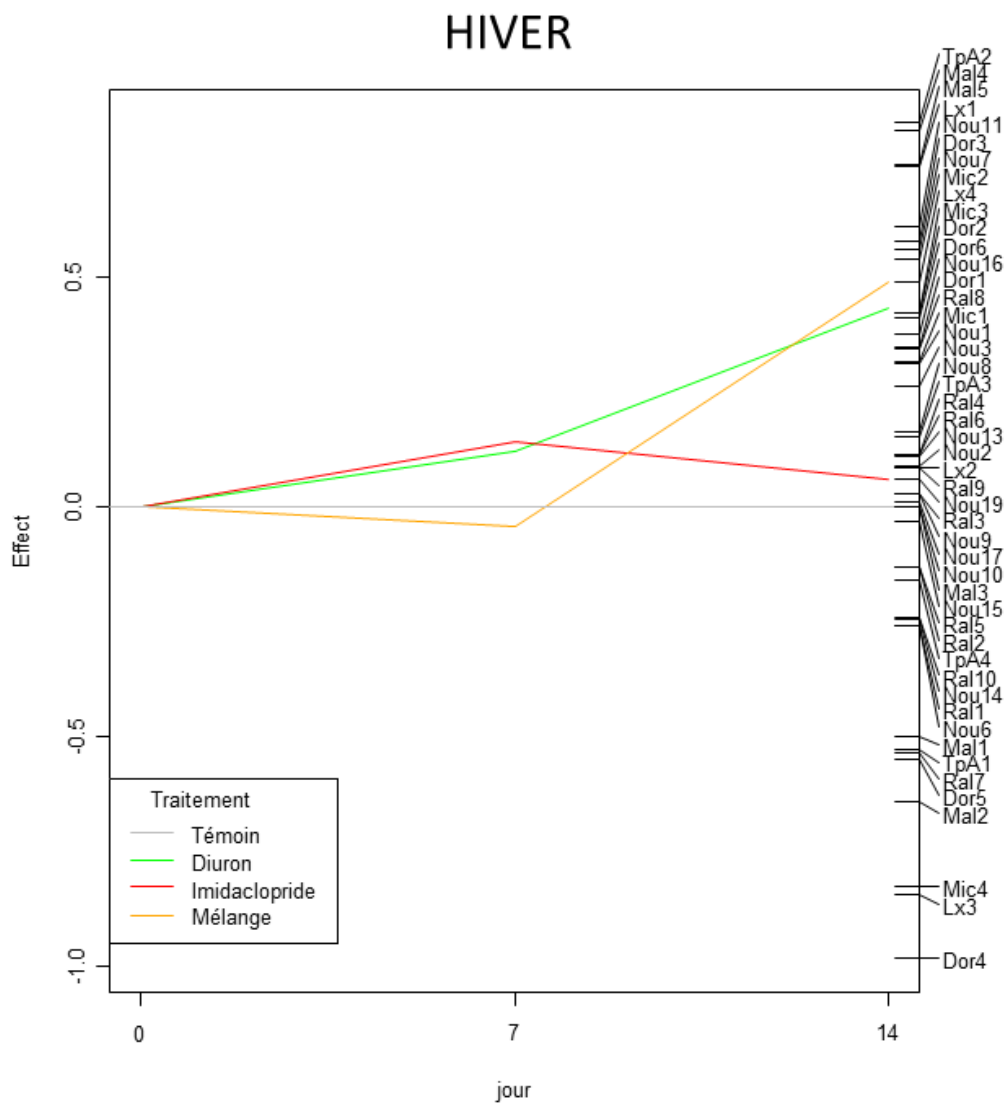
Source : étiquette des bouteilles

## Annexe 3 : Histogrammes des Community Weighted Means de 9 traits morphofonctionnels de l'été et de l'automne



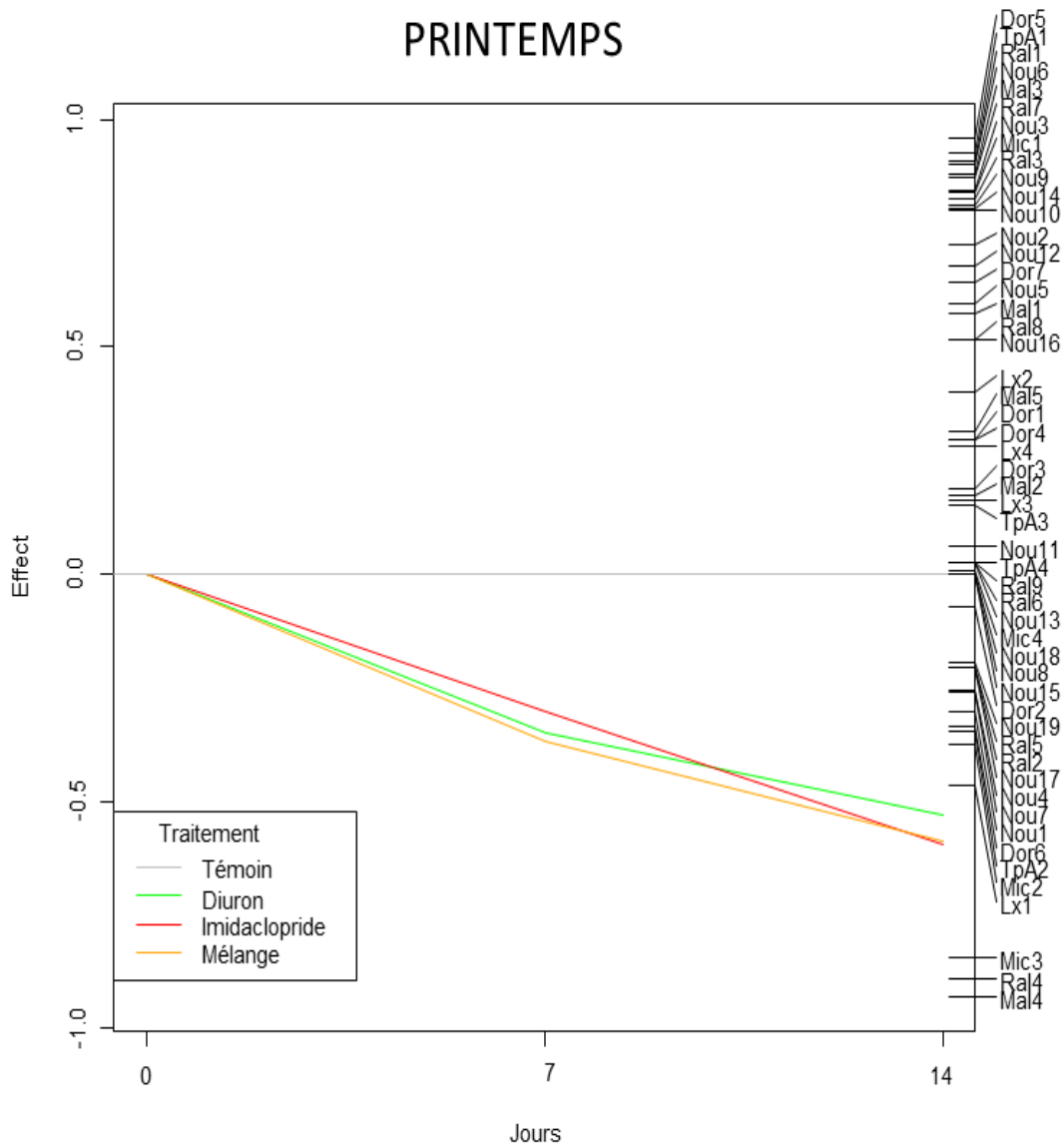
Community weighted means (CWM) en pourcentage (%) pour 9 des 11 traits morphofonctionnels de la micro-méiofaune directement impliqué dans l'activité trophique en fonction de la saison estival ou autonal après 28 jours de colonisation

## Annexe 4 : Principal Response Curve (PRC) de la saison d'hiver



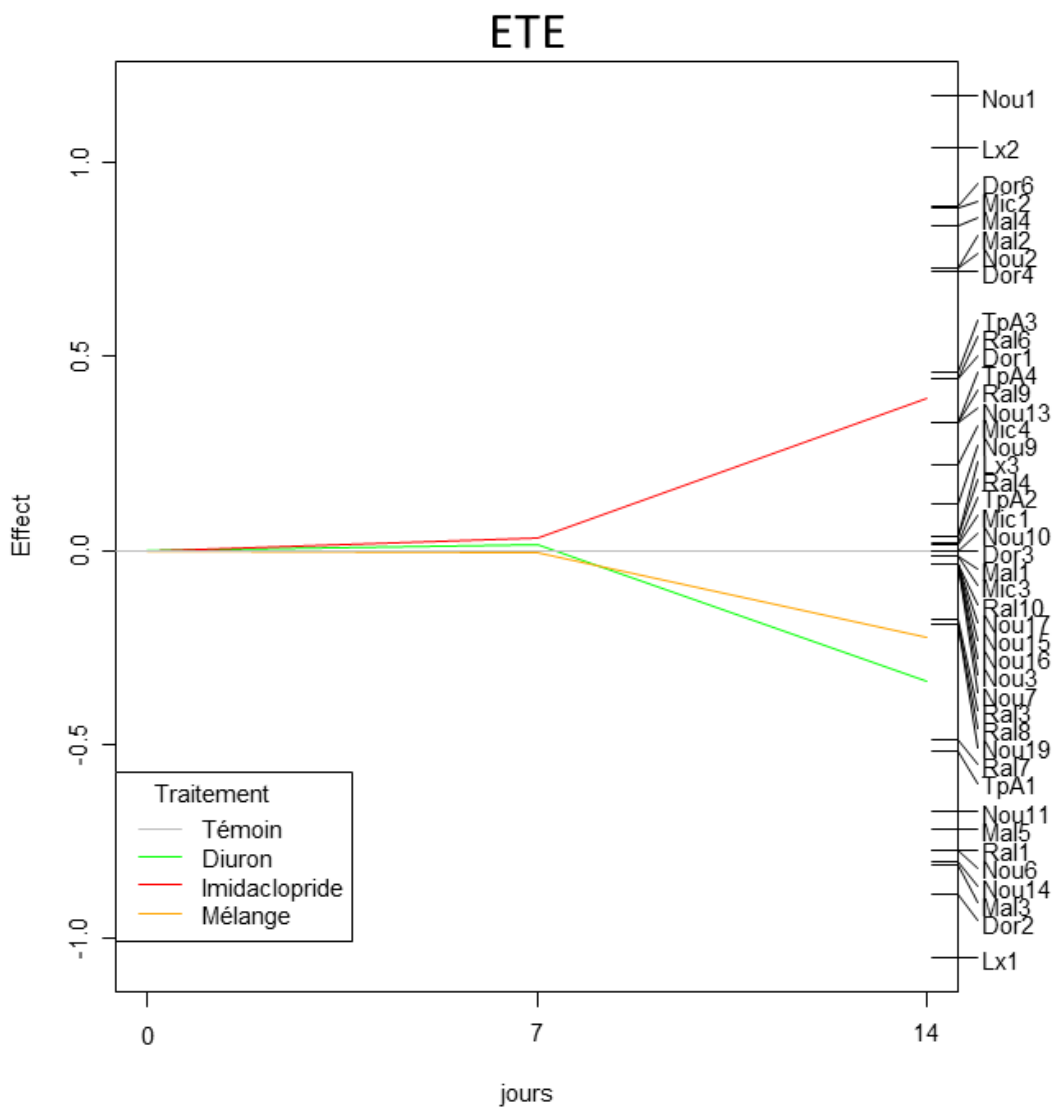
Courbes de réponse principale (PRC) sur les traits morphofonctionnels de la micro-méiofaune liés à l'activité trophique, indiquant les effets de l'imidaclopride (insecticide) et du diuron (herbicide), seuls et en mélange, en fonction des durée d'exposition pendant la saison hivernale (p-value = 0,658).

## Annexe 5 : Principal Response Curve (PRC) de la saison de printemps



Courbes de réponse principale (PRC) sur les traits morphofonctionnels de la micro-méiofaune liés à l'activité trophique, indiquant les effets de l'imidaclopride (insecticide) et du diuron (herbicide), seuls et en mélange, en fonction des durée d'exposition pendant la saison printannière (p-value = 0,240).

## Annexe 6 : Principal Response Curve (PRC) de la saison d'été

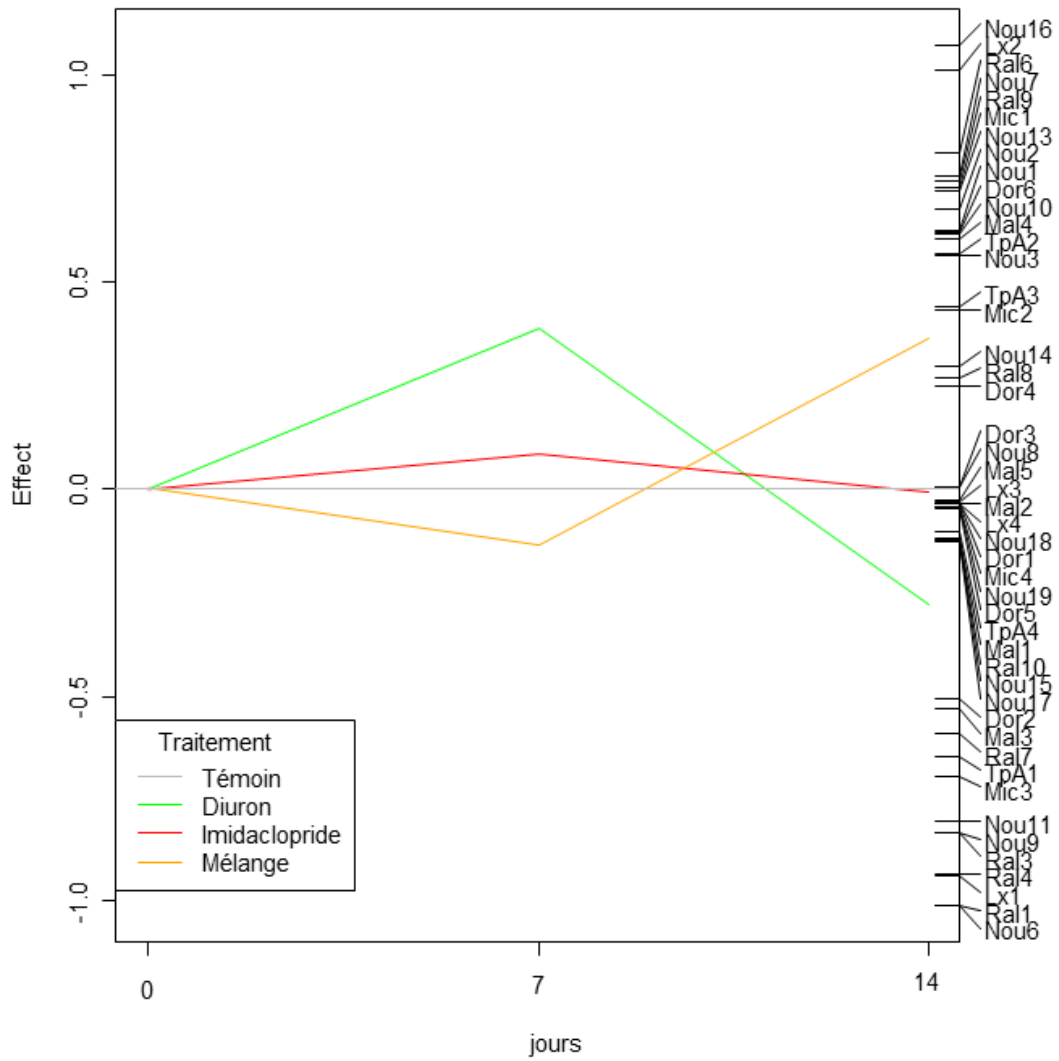


Courbes de réponse principale (PRC) sur les traits morphofonctionnels de la micro-méiofaune liés à l'activité trophique, indiquant les effets de l'imidaclopride (insecticide) et du diuron (herbicide), seuls et en mélange, en fonction des durée d'exposition pendant la saison estivale (p-value = 0,481).



## Annexe 7 : Principal Response Curve (PRC) de la saison d'automne

### AUTOMNE



Courbes de réponse principale (PRC) sur les traits morphofonctionnels de la micro-méiofaune liés à l'activité trophique, indiquant les effets de l'imidaclopride (insecticide) et du diuron (herbicide), seuls et en mélange, en fonction des durée d'exposition pendant la saison automnale (p-value = 0,114).

## Annexe 8 : Article publié en Mars 2016



**Botany Letters**

ISSN: 2381-8107 (Print) 2381-8115 (Online) Journal homepage: <http://www.tandfonline.com/loi/tabg21>

---

### **Who eats who in biofilms? Exploring the drivers of microalgal and micro-meiofaunal abundance**

**Julie Neury-Ormanni, Jacky Vedrenne & Soizic Morin**

To cite this article: Julie Neury-Ormanni, Jacky Vedrenne & Soizic Morin (2016): Who eats who in biofilms? Exploring the drivers of microalgal and micro-meiofaunal abundance, Botany Letters, DOI: [10.1080/23818107.2016.1151827](https://doi.org/10.1080/23818107.2016.1151827)

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/23818107.2016.1151827>

SPECIAL ISSUE: ADLAF SYMPOSIUM 2015

## Who eats who in biofilms? Exploring the drivers of microalgal and micro-meiofaunal abundance

Julie Neury-Ormanni, Jacky Vedrenne and Soizic Morin

Irstea, UR EABX, 50 avenue de Verdun, 33612 Cestas cedex, France

### ABSTRACT

A substantial amount of research has been dedicated to aquatic biofilms, but unlike the influence of macrograzers, that of microscopic herbivores (2  $\mu\text{m}$  to 2 mm) has been largely disregarded. The selective pressure that they may exert remains unexplored, despite its potential impact on microbial community structure and ultimately, function. We performed *in situ* experiments to assess the abundance of microflora and micro-meiofauna in mature biofilms, in four rivers located in southwest France, stressing their quantitative importance (averaging 50% of the total number of organisms counted). We highlighted that the balance between microflora and micro-meiofauna depends on local environmental conditions, and specific taxon selection is likely to provide information on river pollution. Indeed, microalgae were directly favoured by nutrients and indirectly by biocides targeting micrograzers. In contrast, micro-meiofauna was predominant in sites where herbicides were found, in particular photosynthesis inhibitors (e.g. in the River Ponteils, 97% micro-meiofauna). Although the prey–predator relationships in the laboratory experiment appeared to depend on the initial pools of microorganisms during the first days, they reached stable states within a week. Then, all cultures stabilized around a ratio of  $20 \pm 6 : 1$  prey/potential predator. Further research is required to better understand the abiotic (water quality, habitat) and biotic (traits of the organisms present) drivers governing the coexistence of microalgae and their predators across the microbial landscape, and its consequences on the structure and function of the aquatic ecosystem.

### ARTICLE HISTORY

Received 25 August 2015  
Accepted 28 January 2016

### KEYWORDS

Diatoms; freshwater;  
grazing; periphyton;  
protozoa; rotifers

### Introduction

In freshwater streams, key biological processes are ensured by biofilms (primary production, nutrient cycling, provision of food resources), which are at the basis of ecosystem functioning. Aquatic biofilms are complex microscale ecosystems composed of microscopic algae, bacteria, protozoans and other micrograzers in constant interaction together, and with their environment. The close spatial proximity between these very diverse life-strategy organisms engenders many biotic interactions: competition for resources, facilitation, protection (providing refuge), syntrophism (e.g. algal exudates released during photosynthesis are metabolised by bacteria, inorganic nutrients produced by heterotrophic mineralization are taken up by algae), and predation by micrograzers. Moreover, the biofilm organisms develop under environmental constraints that control their development. Hence, biofilms are interfaces that integrate a variety of responses to environmental changes and chemical stressors; their rapid interaction

with dissolved substances results in functional and structural responses, endorsing them as ‘early warning systems’ of disturbances to the ecosystem (Sabater et al. 2007). In these microecosystems, the responses to environmental stressors vary depending on the target organisms, and the overall impacts of pollutants resulting from both direct and indirect effects (Proia et al. 2012). Unlike diatoms (brown microalgae) or bacteria that have received great attention over recent decades, the micro-meiofauna has been overlooked. Its biodiversity in river biofilms remains almost totally unexplored, despite its potential influence on algal composition, as also exerted by macrofauna (more extensively studied; e.g. Bott and Borchardt 1999; Lange et al. 2011). Micro-meiofauna is composed of microscopic heterotrophs – generally defined in a size range of 2  $\mu\text{m}$  to 2 mm (e.g. Artois et al. 2011). In attached communities such as biofilms, prey species (microalgae) may have difficulty avoiding their predators, and must coexist with them, at the cost of high predation risk. Hence, understanding

**CONTACT** Soizic Morin  soizic.morin@irstea.fr

© 2016 Société botanique de France

prey–predator relationships in biofilms under natural, complex environmental conditions, is a topical question, just as it is for higher organisms (Hammill et al. 2015), and requires dedicated investigations. Few data are available on the quantitative importance of micro-meiofauna in fluvial biofilms. However, algal ingestion by micro-consumers, reviewed by Bott (1996), can reach hourly rates of 13.5 diatoms per predator, suggesting significant potential top–down control of microalgal abundance by micro-meiofauna. Precise quantification and characterization of the biofilm micro-meiofauna would consequently increase our understanding of the river microbial ecosystem and of the relationships between microalgae and micrograzers. Predators are expected to be more vulnerable to environmental changes than their prey, due to their longer life cycles and dependence on lower trophic levels (Petchey et al. 1999). Prey–predator coexistence may consequently be shaped by environmental (abiotic) fluctuations, and indicate greater quality (in terms of abiotic stability) of the sites colonized.

In this context, we performed complementary field and laboratory experiments. We analysed the microflora and micro-meiofauna abundances in mature biofilms collected in four rivers in southwest France. The numbers of micro-meiofauna and microflora individuals in natural biofilms were quantified in upstream and downstream sections of the rivers, with the objective to determine how environmental stressors (such as toxic contamination) shape, directly and indirectly, periphytic community (biofilm) structure. Large-scale studies demonstrate a decrease in the specific diversity of benthic microorganisms with environmental pollution (Tison et al. 2005; Donohue et al. 2009). Therefore, we expected that upstream species composition would be more diversified and reflect the local pool of species, from which would stem the downstream community affected by degraded water quality. Species selection was anticipated to be linked with possible pollution sources along the gradients. The sites selected exhibited different types of contamination, and we predicted that herbicide-impacted sites would be dominated by micro-meiofauna, whereas insecticide contamination would rather target fauna and favour microalgae. Field characterization was complemented with simplified laboratory experiments, under controlled uncontaminated conditions, to assess the joint growth dynamics of microalgae and micro-meiofauna depending on their respective initial densities. We expected to experimentally determine the co-evolution of prey and predator numbers over time, at three different prey–predator ratios (starving, intermediate and excess). Specific aims were to confirm the quantitative impact of grazing pressure in biofilms, and to demonstrate that prey–predator relationships at the microbial scale fit commonly used models for higher organisms.

## Materials and methods

### Sampling natural biofilm communities: field study

#### Sampling sites

We selected four rivers in southwest France (Figure 1). All presented a sandy substrate and slightly acidic water typical of the Landes hydroecoregion (Wasson, Chandesris, and Pella 2002), with pine riparian cover. In 2014 in each river, artificial substrates (unpolished glass slides, 300 cm<sup>2</sup> total area) were immersed for 1 month of colonization to collect mature biofilms (Peterson and Stevenson 1990), following the sampling method detailed in Morin et al. (2007). The substrates were placed in openwork plastic boxes, preventing grazing by larger predators (e.g. fish) and ensuring comparable water current conditions. Using a buoy, they were immersed 10 cm below the water surface, under similar light penetration conditions. Triplicate glass slides were placed upstream (reference sites) and downstream, in three tributaries of Arcachon Bay (River Leyre, River Bourg, River Ponteils) and a river from the Landes area (River Luzou), about 90 km south. Their watersheds are characterized by contrasting land uses: agricultural (Leyre, Bourg), urban (Bourg) and industrial (Ponteils, Luzou).

More specifically, the Leyre is the main tributary of Arcachon Bay and drains a large (2000 km<sup>2</sup>) watershed mainly occupied by pine forest, with a 13% agricultural area predominantly used for maize production. The Bourg watershed is characterized by market gardening (mostly carrots) and peri-urban weeding. The Ponteils and Luzou receive passive landfill inputs and complex industrial discharge, respectively.

#### Sample collection and analysis

After a 1-month immersion, all substrates except those of the Ponteils upstream site (due to substrate loss) were recovered. Water physicochemistry (pH, dissolved oxygen, conductivity and temperature) was measured *in situ* using appropriate WTW probes. One-litre water samples were collected, stored at 4°C and analysed in the laboratory for nutrients.

The mature biofilms were carefully scraped off each artificial substrate with a razor blade, suspended in a standard volume (200 mL) of Evian mineral water (Danone, 1.5-l PET bottles) and stored at 4°C in the dark until microscopic observation (up to 48 h). A 20-ml aliquot of each triplicate suspension was used to quantify dry weight following the European standard NF EN 872. Then, replicate suspensions from each sampling site were pooled for taxonomic analyses, to counter possible heterogeneity in species colonization of the slides. Microalgae (distinguishing between diatoms, cyanobacteria and green algae) and micro-meiofauna were quantified and identified simultaneously from

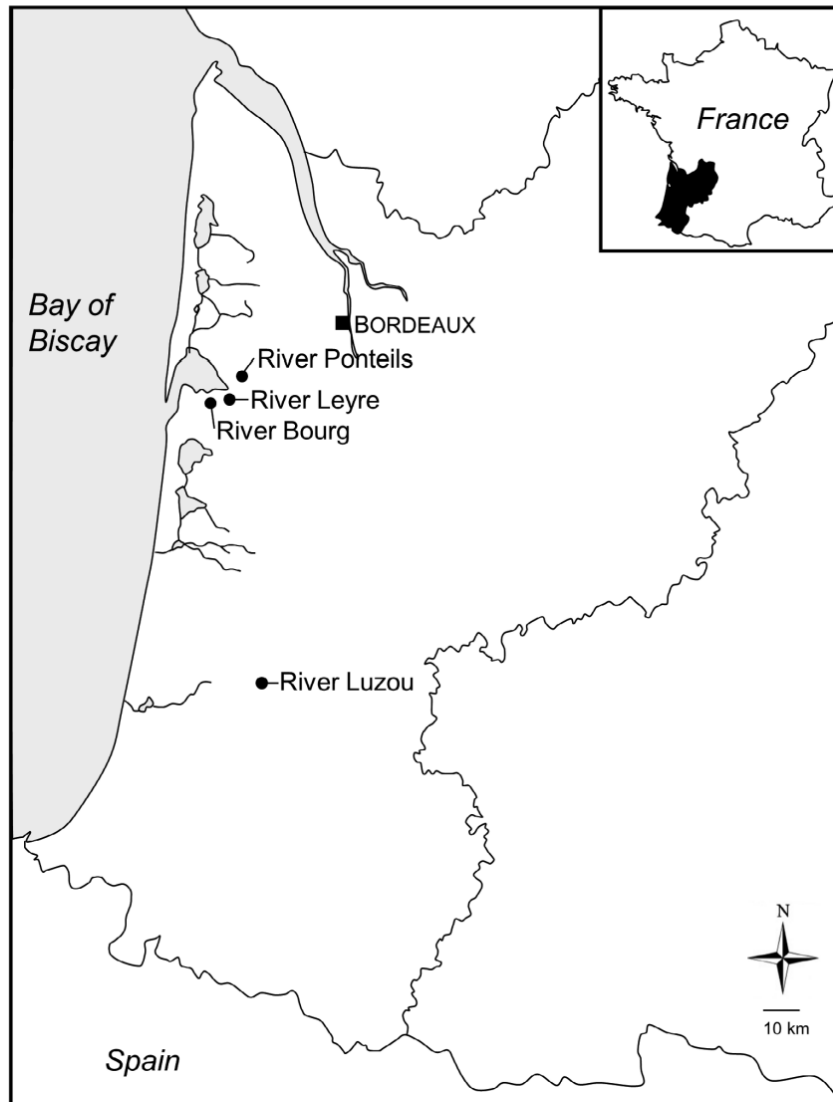


Figure 1. Location of the rivers studied.

fresh material, using a Bürker counting chamber under light microscopy with 40× magnification (Leica DMLS phase-contrast microscope, Germany). Briefly, the suspension was gently homogenized and a 15-ml sample was collected. The suspension was decanted for 16 h to concentrate the organisms, and 2 ml of the pellet was dropped onto the Bürker chamber. For each sample, all organisms in all fields of the chamber ( $1.8 \mu\text{m}^3$  in total) were counted to calculate organism densities. For each taxonomic group, the densities were then recorded as individuals per  $\text{cm}^2$  of glass substrate. The specifically identified micro-meiofauna taxa were protozoa (flagellates, heliozoans, sarcodinae – amoebae, thecamoebians – and ciliates) and metazoans (rotifers, nematodes, oligochaetes, gastrotrichs and dipteran larvae). They

were identified to the lowest taxonomic level possible following de Puytorac, Grain, and Mignot (1987), Foissner (1996), Vedry (1996), Canler et al. (1999), Lynn (2010) and Tachet et al. (2010).

#### ***Coexistence of predators and prey under simplified conditions: laboratory experiment***

##### *Collection of natural communities*

Triplicate glass slides were implemented with the same protocols at the three sites studied in Lainé, Morin, and Tison-Rosebery (2014) along the River Luzou, for 30 days in June 2014. A third site, 5 km further downstream, was added to those described above. At this site, the industrial contaminants are diluted (Lainé,



Morin, and Tison-Rosebery 2014) and the ratio between microalgae and micro-meiofauna was expected to differ slightly from the two sites upstream. The glass slides were individually scraped and diluted in Evian water to give triplicate 200-ml suspensions per treatment, called Up (inoculum from upstream), Dw1 (downstream) and Dw2 (far downstream).

### Experimental set-up

Nine independent experimental units (triplicate suspensions of Up, Dw1 and Dw2) were incubated in batch mode under the same ambient conditions (uncontaminated, without nutrient addition), in thermoregulated chambers (20°C) with a light : dark cycle of 14 : 10 h. The experimental units were not agitated, to allow the micro-organisms to settle. Over a 3-week experimental period, samples were collected every day under flame to prevent contamination. Algal composition was checked daily for the proportions of diatoms, green algae and cyanobacteria by means of a PhytoPAM fluorimeter (Heinz Walz, Germany) in all experimental units. The microbial community was described *in vivo* on days 0, 2, 7, 10, 15 and 18, following the counting method detailed above.

### Data analyses

In the field study, the different classes of organisms were grouped as follows: diatoms, green algae, cyanobacteria, flagellates, protozoa other than flagellates, and metazoans based on the microscopic counts. Their relative abundances were log transformed and analysed by principal components analysis (PCA) with PC-Ord software (version 6.08; MjM Software, Gleneden Beach, OR, USA), to identify patterns in community composition related with sampling sites.

The abundances of the taxonomic groups were used as a measure of their specific growth over the 1-month immersion period, and to estimate the potentially grazed numbers of diatoms, as most of the literature data refer to diatoms as prey. Our calculations used averaged values of previously reported grazing rates, based on the hourly consumption of 3–6 diatoms/ciliate (McCormick 1991) and 0–13 diatoms/rotifer (Borchardt and Bott 1995).

The abundances of diatoms and of potential predators during the laboratory experiment were plotted over time. Linear regressions were performed to assess the dependence between abundances of prey and predators.

## Results and Discussion

### Field abundances of predators and prey are determined by environmental conditions

#### Between-river differences in microbial biodiversity

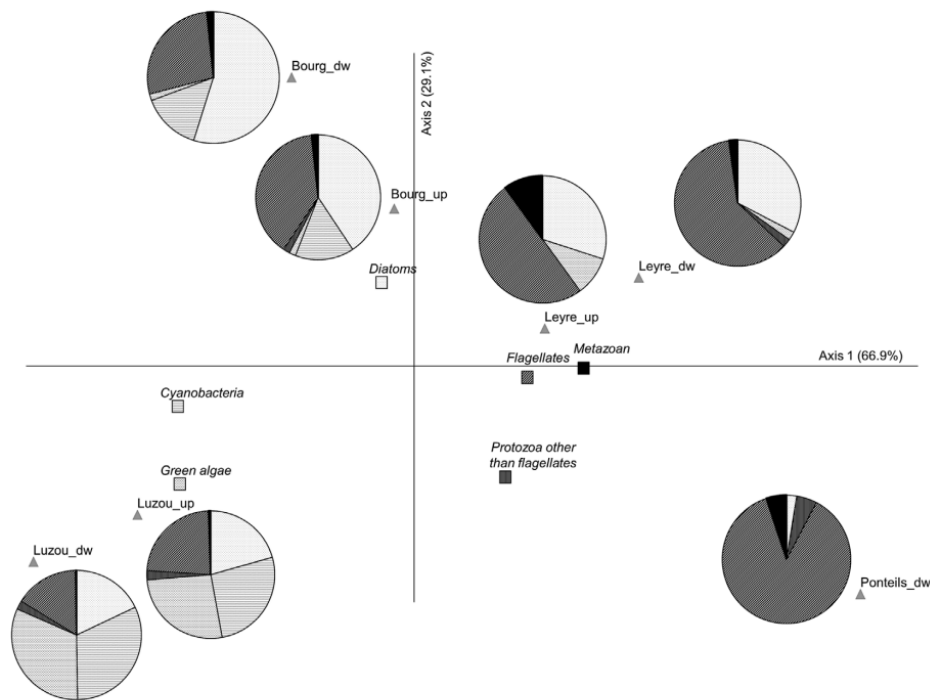
As shown in Figure 2, taxonomic compositions diverged between rivers. Axis 1, accounting for almost 67% of the total variance, discriminated rivers where micro-meiofauna was more abundant, on the right hand panel

(Rivers Pontails and Leyre), from the Rivers Bourg and Luzou dominated by autotrophs. Micro-meiofauna was, however, quantitatively important in all cases (> 20% of the individuals counted) and reached 97% of the organisms inventoried at Pontails downstream. In relation to the high abundances of larger organisms, i.e. protozoa and metazoans (Table 1, Figure 2), the River Pontails was much more productive than the others, with higher biofilm dry weight. In all cases, flagellates were the most numerous of the micro-meiofauna.

Differences in species composition depending on the rivers may reflect local pools of species determined by small-scale environmental drivers. Species coexistence is allowed by their differences in ecological or functional features (traits), to achieve the highest fitness outcomes under context-dependent conditions (e.g. Descamps-Julien and Gonzalez 2005; Loza, Perona, and Mateo 2014). Differences in microalgal fitness may reflect trade-offs between physiological tolerance of environmental conditions (and extremes) and competitive ability, e.g. nutrient acquisition by periphytic diatoms depending on the position of cells within the biofilm (Burkholder, Wetzel, and Klomparens 1990). The contrasting communities found in the rivers (Figure 2) can therefore be explained by differences in environmental conditions. Although all rivers had slightly acidic waters with low conductivity and orthophosphate concentrations (Table 1), high nitrate concentrations were recorded in the Bourg and downstream in the Leyre, as a probable consequence of agricultural land use of their watersheds. Nutrient availability, which is known to greatly influence community composition in biofilms, was associated here with higher abundances of diatoms. In the Luzou, periphytic communities were more diversified, as a probable result of warmer temperatures (sampling in spring versus in winter in Arcachon Bay tributaries) and/or highlighting seasonality in community successions.

### Potential drivers of the upstream to downstream changes in species distributions

Variations in global biomass (biofilm dry weight) along the rivers were observed. In all rivers but the Luzou, biofilm biomass increased from upstream to downstream, as did the total numbers of organisms (microalgae, protozoa, metazoans) per unit area colonized (Table 1). In Figure 2, upstream sites were grouped around the origin of the biplot, and the corresponding downstream sections spread over but still remained in the same quarter of the PCA. This spread showed increasing differences from reference conditions, highlighting specific changes in taxonomic composition, i.e. species selection from their upstream pool of species. Along the Leyre, the relative abundance of micro-meiofauna increased slightly, whereas it decreased in the Bourg and Luzou. The biofilms sampled in the River Pontails were dominated by heterotrophs (mainly protozoa). The changes in communities in the downstream sections of the rivers studied



**Figure 2.** Principal Components Analysis (PCA): distribution of sampling sites based on transformed ( $\log(x + 1)$ ) relative abundances of the major components of biofilms. Close to each sampling site location, the proportions of autotrophs (light background) and micro-meiofauna (dark background) are described (pie charts). The corresponding periphytic groups are labelled accordingly in the PCA.

probably reflected changes in water quality such as nutrient availability and contamination. In particular, coexistence between microorganisms may be modulated by diverse environmental conditions, including toxic compounds with distinct modes of action, targeting prey or predators. Indeed, different patterns in community composition changes from upstream to downstream (Figure 2) may result from the type of contamination present, impacting the balance between periphytic autotrophs and heterotrophs. Although not measured specifically in this work, data were available about the kind of pollutants present downstream in the rivers studied (Fauvelle 2012; Lainé, Morin, and Tison-Rosebery 2014).

The relative increase in microalgae in the Rivers Bourg and Luzou may result from direct and indirect impacts of toxic inputs. Increasing concentrations of insecticides (e.g. chlorpyrifos, which is frequently measured in the sediments of the Bourg; Fauvelle 2012) and complex industrial releases (mixtures of metals and aromatic compounds in the Luzou; Lainé, Morin, and Tison-Rosebery 2014) were recorded. Micro-meiofauna, directly targeted by such contaminations, decreased in abundance probably as a consequence of higher mortality and/or reduced fitness. The resulting lower grazing pressure indirectly favoured microalgal development. In contrast, a decrease in microalgal densities associated with higher abundances of micro-meiofauna was observed in the Pontetils and Leyre. In these rivers, pesticides were

monitored continuously for 20 months in 2010/11 by Fauvelle (2012), revealing chronic contamination by herbicides. Direct inhibitors of photosynthesis such as isoproturon and diuron in the Pontetils (average concentrations measured by Fauvelle 2012:  $380 \pm 50$  ng/l and  $37 \pm 7$  ng/l, respectively) almost eliminated the microalgal component of the biofilm and the community was dominated by heterotrophs (> 90% of individuals). The Leyre was mostly contaminated by chloroacetanilides (acetochlor, metolachlor and their metabolites oxanilic acid and ethane sulphonic acid). The chloroacetanilide gradient was quite weak ( $2.1 \pm 0.2$  µg/l in total chloroacetanilides including metabolites; Fauvelle 2012), and the highest concentrations recorded downstream ( $\sim 4$  µg/l) were far below the acute toxicity thresholds determined by Roubeix et al. (2012). The relative decrease in autotrophs (in proportion but not in cell numbers) probably resulted from both the low toxicity of herbicides towards microalgae at the concentrations occurring and the increase of the numbers of flagellates, whose growth was potentially less detrimentally affected by the pesticides.

#### Potential grazing activity

In many systems, the most important factors determining species distribution relate to differences in the ability to coexist with predators (Paine 1976; Chase et al. 2002). Among the micro-meiofauna inventoried, 40–60% of the taxa have already been classified as predators of microalgae (de

**Table 1.** Water and biofilm characteristics after a 1-month immersion of artificial substrates *in situ*. Biofilm dry weights are means  $\pm$  SE ( $n=3$ ).

River	Leyre		Bourg		Ponteils		Luzou		
Sampling date	January 2014		January 2014		January 2014		June 2014		
Site	upstream	down-stream	upstream	down-stream	upstream	down-stream	upstream	down-stream (Dw1)	Dw2
Geographic coordinates	44°35'17"N 0°56'02"W	44°37'33"N 0°59'46"W	44°36'55"N 1°04'25"W	44°38'09"N 1°04'25"W	44°42'43"N 0°55'11"W	44°41'16"N 1°01'01"W	43°50'31"N 0°54'38"W	43°50'28"N 0°53'28"W	43°49'34"N 0°51'21"W
<b>Water physico-chemistry</b>									
pH	6.4	7.0	6.7	5.9	5.9	6.6	7.2	6.7	6.7
Temperature (°C)	11.9	10.6	11.3	11.6	11.7	12	14.8	15.6	15.9
Conductivity ( $\mu$ S/cm)	145	167	219	219	132	158	110	142	145
Oxygen saturation (%)	99.1	102.5	93.1	95.3	100.7	94.9	90	88.4	84.2
Dissolved oxygen (mg/l)	10.7	11.4	10.2	9.7	10.8	9.1	8.9	8.9	8.4
Suspended solids (mg/l)	4.6	11	4.4	8.2	5.8	4.4	4.1	3.1	5.3
Nitrates (mgNO <sub>3</sub> /l)	0.5	11.1	11.0	9.8	2.6	2.7	3.2	2.9	4.1
Nitrites (mgNO <sub>2</sub> /l)	<0.03	<0.03	0.043	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03
Ammonium (mgNH <sub>4</sub> <sup>+</sup> /l)	0.04	0.03	0.16	0.16	0.02	0.33	0.08	0.85	0.72
Orthophosphates (mgP/l)	<0.002	<0.002	0.003	0.003	<0.002	<0.002	0.025	0.029	0.021
<b>Biofilm characteristics</b>									
Dry weight (mg/cm <sup>2</sup> )	0.03 $\pm$ 0.01	0.13 $\pm$ 0.02	0.05 $\pm$ 0.01	0.23 $\pm$ 0.01		1.9 $\pm$ 0.5	0.77 $\pm$ 0.04	0.27 $\pm$ 0.19	0.31 $\pm$ 0.08
Total number of organisms recorded (individuals/cm <sup>2</sup> )	593	2730	3502	3680		2315	9260	6404	7811
Estimated numbers of microalgae grazed (individuals/cm <sup>2</sup> )									
by protozoa	5850	33,900	30,150	21,000		42,100	2000	950	
by rotifers	0	1700	0	0		1700	450	100	

Puytorac, Grain, and Mignot 1987; Vedry 1996; Bertrand et al. 2011; Majdi et al. 2012) and/or were observed here with microalgal content. Indeed, at the abundances we found *in situ*, micro-meiofauna may exert a strong selection pressure in the ecosystems in which they exist, thereby altering the structure of the biological communities. Based on the abundances of diatoms and micro-meiofauna counted in the field samples, we calculated the potentially grazed numbers of diatoms over the 1-month immersion period (Table 1). These values clearly exceed the numbers actually recorded by several orders. This suggests high top-down control of periphytic predators on microalgal densities, even for taxa with elevated reproduction rates (up to two divisions/day; Baars 1983). However, the mature biofilms were still composed of high numbers of both microalgae and micro-meiofauna, denoting complex coexistence relationships that were therefore investigated over time under simplified conditions (see next section).

### Coexistence of prey and predator rapidly reaches a stable state under simplified conditions

The abundances of both predators and prey were followed over time under laboratory conditions. Our streamlined experiment was performed using suspensions of batch-cultured biofilms taken directly from river sites, involving a simplification of natural conditions due to the transitory destructuring of the biofilm. Despite the change in community structure (not a biofilm anymore but rather a suspension allowed to settle down), the percentage of crawling micro-meiofauna did not significantly decrease (with values of  $48.4 \pm 8.9\%$  on day 0 and of  $42.7 \pm 0.7\%$  on day 18). This experiment aimed to characterize the long-term coexistence between microalgae and micro-meiofauna under three different treatments (variable prey-predator proportions). Exhaustive information on the taxonomic composition of micro-meiofauna is detailed in Table 2.



**Table 2.** Temporal variation of the micro-meiofauna, including non-predatory taxa (*laboratory*).

	day 0	day 2	day 7	day 10	day 15	day 18
<b>Up</b>						
Flagellates	2174±575	4767±672	870±288	3308±848	1444±327	2143±669
Ciliates	124±16	171±41	47±47	264±78	730±386	342±31
Heliozoa	0±0	0±0	16±16	93±54	124±124	62±31
Sarcodines	93±27	248±68	311±41	1040±135	637±351	217±135
Rotifers	47±27	47±27	0±0	0±0	0±0	0±0
Nematodes	16±16	16±16	0±0	0±0	0±0	0±0
Oligochaetes	16±16	0±0	0±0	31±31	0±0	0±0
Gastrotrichs	0±0	0±0	16±16	0±0	0±0	0±0
Planaria	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
Chironomid larvae	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	31±31
<b>Dw1</b>						
Flagellates	994±205	2547±153	1087±437	3168±234	3323±646	2345±217
Ciliates	31±31	93±47	78±56	124±82	217±173	280±54
Heliozoa	0±0	0±0	62±31	62±31	109±56	31±31
Sarcodines	109±41	280±54	124±56	171±94	404±124	280±54
Rotifers	16±16	16±16	0±0	0±0	0±0	62±31
Nematodes	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
Oligochaetes	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
Gastrotrichs	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
Planaria	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
Chironomid larvae	16±16	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
<b>Dw2</b>						
Flagellates	2562±821	1755±205	1304±317	2391±567	3121±327	2888±281
Ciliates	186±47	202±68	47±0	171±56	155±82	93±54
Heliozoa	31±16	0±0	16±16	0±0	202±68	171±94
Sarcodines	280±108	248±68	124±31	373±71	280±54	404±82
Rotifers	0±0	16±16	0±0	0±0	0±0	0±0
Nematodes	16±16	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
Oligochaetes	47±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
Gastrotrichs	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
Planaria	16±16	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
Chironomid larvae	31±16	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0

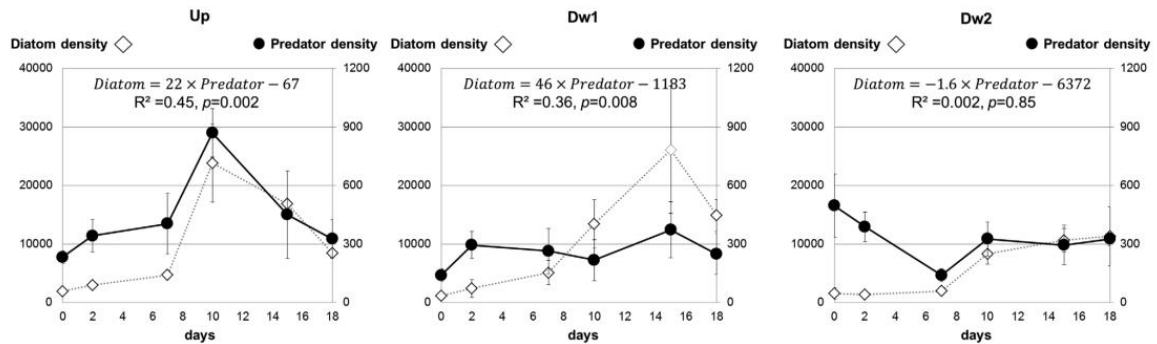
Densities are average (cell/cm<sup>2</sup>) ± SE values ( $n = 3$  replicates per date).

At the beginning of the experiment, the autotrophic component of the inocula was composed of about  $38 \pm 1\%$  green algae,  $36 \pm 2\%$  diatoms and  $26 \pm 2\%$  cyanobacteria (PhytoPAM measurements). The proportion of green algae increased over time in all treatments and represented  $78 \pm 4\%$  on day 18, as a consequence of more favourable conditions for their growth and/or preferential grazing of diatoms (whose abundance decreased to  $7 \pm 2\%$  at the end of the experiment). Mutual exclusion may have occurred between microalgae; hence green algae may have taken competitive advantage of slightly higher temperatures, or of the light conditions in the chambers. Besides, it has to be noted that nutrient loads were very low as we used mineral water to suspend the organisms, such conditions usually not being optimal for green algae (e.g. Sigeo 2005). Depending on the site of origin of the communities, different trends were observed in the experimental units (Figure 3). Throughout the experiment, predator densities clearly followed the trends of diatom abundances in Up ( $R^2 = 0.45$ ,  $p = 0.002$ ) and Dw1 ( $R^2 = 0.36$ ,  $p = 0.008$ ) treatments, whereas they diverged in Dw2 ( $R^2 = 0.002$ ,  $p = 0.85$ ) during the first week (day 0 to day 7). In Dw2 where the initial pools of micrograzers were higher, their abundances decreased three-fold during the first days, due to the change of environment (culture conditions) and/or to a lower balance between prey and predators in this treatment. In all treatments, however, the patterns of

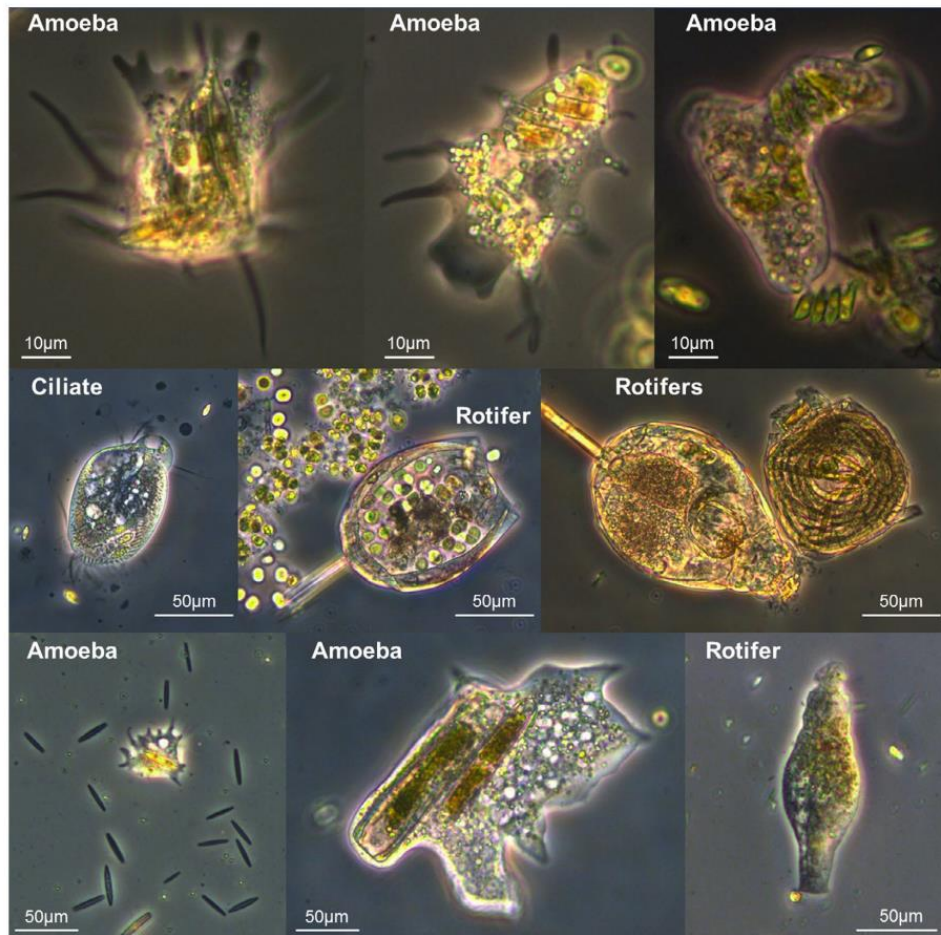
prey and predator densities developed similarly from the second week. Our data followed prey-density-dependent patterns (Type II or Type III, Holling 1959): over the second experimental period (from day 7) when the densities stabilized. We calculated a ratio of  $20 \pm 6 : 1$  prey/potential predator ( $n = 36$ ,  $R^2 = 0.26$ ,  $p = 0.001$ , pooling all treatments). This positive correlation confirms the findings of Kanavilil and Kurissery (2013) in Canadian freshwaters (creeks and lakes). Classical predator models assume that predators capture and consume prey singly; however, protozoa have the ability to consume high numbers of individuals simultaneously (over 100 diatoms at the same time, as mentioned by McCormick 1991). In our samples too, amoebae, ciliates and rotifers were occasionally found to contain numerous microalgal cells (Figure 4).

Moreover, non-predatory micro-meiofauna (in particular, flagellates) were not taken into account even though they were 8- to 10-fold more abundant than the predators. Although not directly involved in the microalgal density count, these organisms coexisted and probably competed for resources such as nutrients and space, and may have played an indirect role in structuring the community.

On the other hand, prey can reduce predator consumption rates by exhibiting active or passive defences. Interspecific variations in constitutive (permanently expressed) or induced defences may lead to differences



**Figure 3.** Temporal dynamics of diatoms (open diamonds) and potential micro-meiofauna predators (dark circles) in the three experimental treatments (laboratory). Densities are average (cell/cm<sup>2</sup>)  $\pm$  SE values ( $n = 3$  replicates per date). Linear correlations calculated between abundances of preys and potential predators are mentioned for each treatment ( $n = 18$ ).



**Figure 4.** Examples of ingestion of microalgae by micro-meiofauna.

in prey susceptibility to predation, partitioning the species along a gradient of predation risk (Stoks and McPeck 2003). Passive ability to make capture harder – such as microalgal size, shape, presence of spines –, would allow larger species to coexist with predators at a higher density than smaller ones. Nevertheless, Bott (1996) reported cases of micrograzers ingesting microalgae

larger than themselves, by body distension. Our observations (e.g. Figure 4) provided experimental evidence of such grazing activity for amoebae. Among the features that may actively help the prey to avoid predators, we can mention: escape behaviour (motility and velocity, e.g. Coquillé et al. 2015), and/or the excretion of allelopathic substances (Leflaive et al. 2008). In this



study, we observed that *in situ* abundance of microalgae and micro-meiofauna are driven by local conditions, and that prey–predator dynamics under controlled conditions are likely to follow classical models established for higher organisms, irrespective of the different forms of prey defence. These results are a first step in elucidating the link between interspecific differences in defence, functional responses and environmental conditions.

## Conclusions

Given the fact that the same environmental factors (light, temperature, dissolved substances including contaminants) structure the communities of microalgae and micro-meiofauna (de Puytorac, Grain, and Mignot 1987), their joint dynamics are likely to be affected by ambient changes. Even though the periphytic prey–predator relationships seem to rapidly reach a stable state under uncontaminated conditions (laboratory), this equilibrium may be impacted by various disturbances, such as punctual toxic pollution. Thereafter, the periphytic ecosystem would either reach another stable state with community functions maintained, or could dysfunction.

The ubiquity of micro-meiofauna and its high ingestion capacity for microalgae suggest a substantial qualitative and quantitative impact on periphyton. Further work is required to better understand whether prey–predator relationships and stability of the communities within biofilms are modified by changes in environmental conditions. How natural or anthropic environmental factors shape periphytic biodiversity (in species and traits), both directly and indirectly, is a topic that requires further investigation. To that aim, determining whether micro-meiofauna has prey preferences is a prerequisite. Does the choice of grazed microalgae depend on their morphological attributes and/or on the feeding mode of the predator (capture and ingestion modes, for example)? What is the impact of grazing selectivity on the overall vulnerability of biofilm communities?

## Acknowledgements

This study was carried out with the financial support of the French National Research Agency (ANR) in the framework of the ‘Investments for the Future’ programme, within the Cluster of Excellence COTE (ANR-10-LABX-45) and from the Adour-Garonne Water Agency (convention 310 33 0075, 2012–2014). The authors wish to thank Juliette Rosebery and Vincent Fauvelle (Irstea) for their help in field sampling, as well as Mélissa Eon and Karine Madarassou from the Chemistry Laboratory at Irstea Bordeaux for performing nutrient analyses and dry weight determinations. Benoît Schoefs (Université du Maine à Le Mans) and the two anonymous reviewers of our manuscript are thanked for their constructive comments that greatly helped to improve the text. Peter Winterton is warmly acknowledged for English corrections and suggestions on the manuscript.

## Notes on contributors

**Julie Neury-Ormanni**, master student. *Contribution:* participated in field work, conducted laboratory work, contributed to analyses.

**Jacky Vedrenne**, senior technician. *Contribution:* participated in field work, conducted laboratory work, contributed to analyses and co-wrote the manuscript.

**Soizic Morin**, research scientist. *Contribution:* planned the study, participated in field and laboratory work, contributed to analyses and wrote the manuscript.

## References

- Artois, T., D. Fontaneto, W. D. Hummon, S. J. McInnes, M. A. Todaro, M. V. Sørensen, and A. Zullini. 2011. “Ubiquity of microscopic animals? Evidence from the morphological approach in species identification.” In *Biogeography of Microscopic Organisms: Is Everything Small Everywhere?*, edited by D. Fontaneto, 244–83. Cambridge, U.K.: Cambridge University Press.
- Baars, J. W. 1983. “Autoecological investigations on freshwater diatoms. 1. Generation times of some species.” *Archiv für Hydrobiologie - Supplement* 67: 11–18.
- Bertrand, J. C., P. Caumette, P. Lebaron, R. Matheron, and P. Normand. 2011. *Écologie microbienne : Microbiologie des Milieux Naturels et Anthropisés*. Pau: Presses Universitaires de Pau et des Pays de l’Adour.
- Borchardt, M. A., and T. L. Bott. 1995. “Meiofaunal grazing of bacteria and algae in a piedmont stream.” *Journal of the North American Benthological Society* 14: 278–298.
- Bott, T.L. 1996. “Algae in microscopic food webs.” In *Algal Ecology: Freshwater Benthic Ecosystems*, edited by R.J. Stevenson, M.L. Bothwell, and R.L. Lowe, p. 574–608 Academic Press, San Diego.
- Bott, T. L., and M. A. Borchardt. 1999. “Grazing of protozoa, bacteria, and diatoms by meiofauna in lotic epibenthic communities.” *Journal of the North American Benthological Society* 18: 499–513.
- Burkholder, J. M., R. G. Wetzel, and K. L. Klomparens. 1990. “Direct comparison of phosphate uptake by adnate and loosely attached microalgae within an intact biofilm matrix.” *Applied and Environmental Microbiology* 56: 2882–2890.
- Canler, J. P., E. Cotteux, P. Duchène, and J. M. Perret. 1999. *Aide au Diagnostic des Stations d’Épuration par l’Observation Microscopique des Boues Activées*. Cahors: CEMAGREF editions.
- Chase, J. M., P. A. Abrams, J. P. Grover, S. Diehl, P. Chesson, R. D. Holt, S. A. Richards, R. M. Nisbet, and T. J. Case. 2002. “The interaction between predation and competition: a review and synthesis.” *Ecology Letters* 5: 302–315.
- Coquillé, N., G. Jan, A. Moreira, and S. Morin. 2015. “Use of diatom motility features as endpoints of metolachlor toxicity.” *Aquatic Toxicology* 158: 202–210.
- De Puytorac, P., J. Grain, and J. P. Mignot. 1987. *Précis de protistologie*. Paris: Société Nouvelle des Editions Boubée.
- Descamps-Julien, B., and A. Gonzalez. 2005. “Stable coexistence in a fluctuating environment: An experimental demonstration.” *Ecology* 86: 2815–2824.
- Donohue, I., A. L. Jackson, M. T. Pusch, and K. Irvine. 2009. “Nutrient enrichment homogenizes lake benthic assemblages at local and regional scales.” *Ecology Letters* 90: 3470–3477.

- Fauvelle, V. 2012. "Évaluation de la contamination en pesticides des tributaires du bassin d'Arcachon et développement d'un échantillonneur passif spécifique des herbicides anioniques." Doctorat en chimie environnementale. PhD thesis - Univ. Bordeaux I Ecole Doct. Sciences chimiques (Bordeaux).
- Foissner, W. 1996. "A user-friendly guide to the ciliate (protozoa, ciliophora) commonly used by hydrobiologists as bioindicators in rivers, lakes, and waste waters, with notes on their ecology." *Freshwater Biology* 35: 375–482.
- Hammill, E., T. B. Atwood, P. Corvalan, and D. S. Srivastava. 2015. "Behavioural responses to predation may explain shifts in community structure." *Freshwater Biology* 60: 125–35.
- Holling, C. S. 1959. "The components of predation as revealed by a study of small-mammal predation of the European Pine Sawfly." *The Canadian Entomologist* 91: 293–320.
- Kanavillil, N., and S. Kurissery. 2013. "Dynamics of grazing protozoa follow that of microalgae in natural biofilm communities." *Hydrobiologia* 718: 93–107.
- Lainé, M., S. Morin, and J. Tison-Rosebery. 2014. "A multicompartement approach – diatoms, macrophytes, benthic macroinvertebrates and fish – to assess the impact of toxic industrial releases on a small French river." *PLoS ONE* 9 (7): e102358.
- Lange, K., A. Liess, J. J. Piggott, C. R. Townsend, and C. D. Matthaei. 2011. "Light, nutrients and grazing interact to determine stream diatom community composition and functional group structure." *Freshwater Biology* 56: 264–278.
- Leflaive, J., S. Boulêtreau, E. Buffan-Dubau, and L. Ten-Hage. 2008. "Temporal patterns in epilithic biofilm – relation with a putative allelopathic activity." *Fundamental and Applied Limnology* 173: 121–134.
- Loza, V., E. Perona, and P. Mateo. 2014. "Specific responses to nitrogen and phosphorus enrichment in cyanobacteria: factors influencing changes in species dominance along eutrophic gradients." *Water Research* 48: 622–631.
- Lynn, D. H. 2010. *The Ciliated Protozoa: Characterization, Classification, and Guide to the Literature*. 3rd ed. Dordrecht, NLD: Springer.
- Majdi, N., M. Tackx, W. Traunspurger, and E. Buffan-Dubau. 2012. "Feeding of biofilm-dwelling nematodes examined using HPLC-analysis of gut pigment contents." *Hydrobiologia* 680: 219–232.
- Mccormick, P. V. 1991. "Lotic protistan herbivore selectivity and its potential impact on benthic algal assemblages." *Journal of the North American Benthological Society* 10: 238–250.
- Morin, S., M. Vivas-Nogues, T. T. Duong, A. Boudou, M. Coste, and F. Delmas. 2007. "Dynamics of benthic diatom colonization in a cadmium/zinc-polluted river (Rioumort, France)." *Fundamental and Applied Limnology / Archiv für Hydrobiologie* 168: 179–187.
- Paine, R. T. 1976. "Size-limited predation: an observational and experimental approach with the *Mytilus*-*Pisaster* interaction." *Ecology* 57: 858–873.
- Petchey, O. L., P. T. Mcphearson, T. M. Casey, and P. J. Morin. 1999. "Environmental warming alters food-web structure and ecosystem function." *Nature* 402 (6757): 69–72.
- Peterson, C. G., and R. J. Stevenson. 1990. "Post-spate development of epilithic algal communities in different current environments." *Canadian Journal of Botany* 68: 2092–2105.
- Proia, L., F. Cassiò, C. Pascoal, A. Tili, and A. M. Romani. 2012. "The use of attached microbial communities to assess ecological risks of pollutants in river ecosystems: the role of heterotrophs." In *Handbook of Environmental Chemistry*, edited by H. Guasch, A. Ginebreda and A. Geislinger, 55–83. Heidelberg: Springer.
- Roubeix, V., V. Fauvelle, J. Tison-Rosebery, N. Mazzella, M. Coste, and F. Delmas. 2012. "Assessing the impact of chloroacetanilide herbicides and their metabolites on periphyton in the Leyre river (SW France) via short term growth inhibition tests on autochthonous diatoms." *Journal of Environmental Monitoring* 14 (6): 1655–1663.
- Sabater, S., H. Guasch, M. Ricart, A. Romani, G. Vidal, C. Klünder, and M. Schmitt-Jansen. 2007. "Monitoring the effect of chemicals on biological communities. The biofilm as an interface." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 387 (4): 1425–1434.
- Sigeo, D. C. 2005. *Freshwater Microbiology: Biodiversity and Dynamic Interactions of Microorganisms in the Aquatic Environment*. Chichester, UK: John Wiley & Sons.
- Stoks, R., and M. A. Mcpeek. 2003. "Antipredator behavior and physiology determine lests species turnover along the pond-permanence gradient." *Ecology* 84: 3327–3338.
- Tachet, H., P. Richoux, M. Bournaud, and P. Usseglio Polatera. 2010. *Invertébrés d'eau douce : Systématique, biologie, écologie*. Paris: CNRS Editions.
- Tison, J., Y. S. Park, M. Coste, J. G. Wasson, L. Ector, F. Rimet, and F. Delmas. 2005. "Typology of diatom communities and the influence of hydro-ecoregions: a study on the French hydrosystem scale." *Water Research* 39: 3177–3188.
- Vedry, B. 1996. *Les biomasses épuratrices*. Nanterre: Agence de l'eau Seine-Normandie.
- Wasson, J.G., A. Chandesris, and H. Pella. 2002. *Définition des hydro-écorégions de France métropolitaine. Approche régionale de typologie des eaux courantes et éléments pour la définition des peuplements de référence d'invertébrés*, 190: Technical report, Cemagref Lyon BEA/LHQ.



