

**THESE**

**PRESENTEE A**

**L'UNIVERSITE BORDEAUX 1**

**ECOLE DOCTORALE**

**« Sciences du vivant, Géosciences et Sciences de l'Environnement »**

**par Soizic MORIN**

**POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR**

**SPECIALITE : ECOTOXICOLOGIE**

**(N° d'ordre : 3245)**

**BIOINDICATION DES EFFETS DES POLLUTIONS METALLIQUES  
SUR LES COMMUNAUTES DE DIATOMÉES BENTHIQUES**

**APPROCHES *IN SITU* ET EXPERIMENTALES**



**2006**



**THESE**  
**PRESENTEE A**  
**L'UNIVERSITE BORDEAUX 1**  
**ECOLE DOCTORALE**  
**« Sciences du vivant, Géosciences et Sciences de l'Environnement »**

**par Soizic MORIN**

**POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR**  
**SPECIALITE : ECOTOXICOLOGIE**  
**(N° d'ordre : 3245)**

**BIOINDICATION DES EFFETS DES POLLUTIONS METALLIQUES**  
**SUR LES COMMUNAUTES DE DIATOMÉES BENTHIQUES**  
**APPROCHES *IN SITU* ET EXPERIMENTALES**

**Soutenue le 29 novembre 2006**

**Après avis de :**

<b>Mr Jean Prygiel</b> Professeur associé, PBDS UMR CNRS 8110, Université des Sciences et Technologies de Lille	Rapporteur
<b>Mr Sergi Sabater</b> Professeur, Institut d'Ecologia Aquàtica, Universitat de Girona, Catalogne	Rapporteur

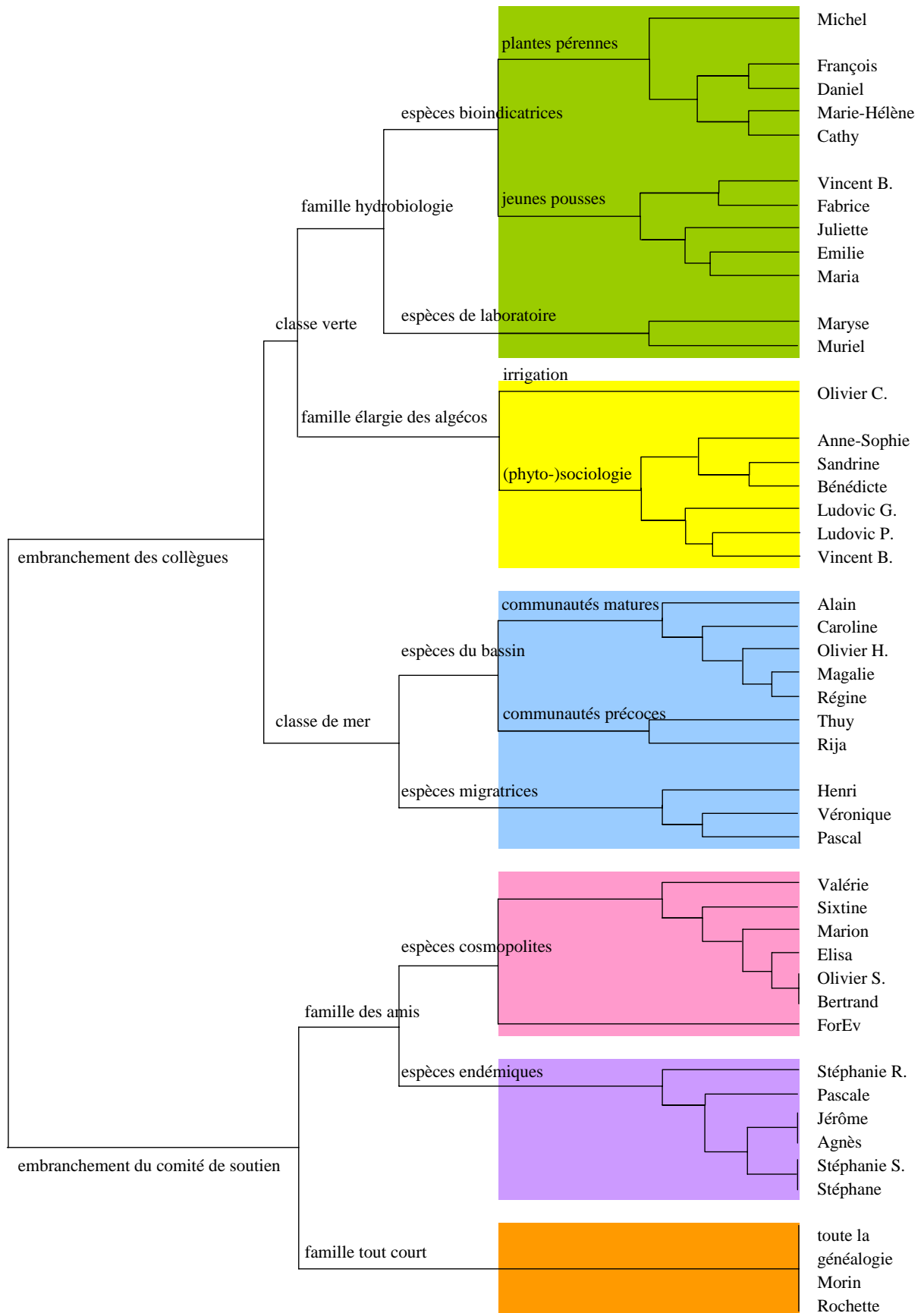
**Devant la commission d'examen formée de :**

<b>Mme Michèle Capdepuy</b> Professeur, Laboratoire d'Océanographie Biologique, UMR 5805 EPOC, Université de Bordeaux 1	Présidente, rapporteur de soutenance
<b>Mr Jean Prygiel</b> Professeur associé, PBDS UMR CNRS 8110, Université des Sciences et Technologies de Lille	Rapporteur
<b>Mr Sergi Sabater</b> Professeur, Institut d'Ecologia Aquàtica, Universitat de Girona, Catalogne	Rapporteur
<b>Mr Michel Coste</b> Directeur de Recherche, UR REQUE, Cemagref – Groupement de Bordeaux	Examineur
<b>Mr Alain Boudou</b> Professeur, Présidence de l'Université Bordeaux 1	Examineur



*Remerciements.*

Un bon schéma valant mieux qu'un long discours (le schtroumpf à lunettes)...





L'écologie moderne est issue de la dichotomie historique entre deux perceptions, organiciste et individualiste. Selon Clements (1916), les organismes s'organisent naturellement en associations (animales ou végétales) distinctes, ou communautés, décrites comme une entité organique. Gleason (1926), lui, défend l'idée que les espèces constituent des assemblages fortuits et uniques, et répondent individuellement aux variations de l'environnement.

Le fonctionnement d'un écosystème aquatique est extrêmement complexe ; de nombreux modèles écologiques ont été proposés, tels que le "Patch Dynamics Concept" (Townsend 1989), la "Species Pool Hypothesis" (Taylor *et al.* 1990), l'"Habitat Temple" (Townsend et Hildrew 1994), le "Telescoping Ecosystem Model" (Fisher *et al.* 1998), l'"Ecological Ambiance System" (Lafont 2001), etc. La définition du concept de communauté écologique a été discutée récemment (Lortie *et al.* 2004), introduisant la notion de "communauté intégrée". La structure des communautés y est décrite comme conditionnée par une combinaison de facteurs : (i) partitionnement aléatoire des espèces, (ii) tolérances des espèces aux déterminants abiotiques, (iii) interactions positives ou négatives entre organismes, et (iv) interactions indirectes au sein et entre niveaux trophiques.

Ainsi l'organisation des communautés, fortement dépendante des paramètres abiotiques du milieu, dépend également de relations entre organismes. Les effets directs ou indirects de cette co-existence peuvent favoriser (par des phénomènes de facilitation : Bruno *et al.* 2003, Michalet *et al.* 2006) ou limiter (par de la compétition, du parasitisme, du broutage, etc. : Tilman 1990) le développement des communautés.

Dans ce travail, les termes de communauté (au sens de Barbault 1992) et d'assemblage ont été utilisés indifféremment pour décrire un ensemble d'espèces en inter-relations et soumises à un ensemble de contraintes communes. Le terme de population qualifie un ensemble d'individus de la même espèce cohabitant dans le même habitat, tel que décrit dans la hiérarchie de Allen et Starr (1982).

Au regard des connaissances actuelles, les interactions biotiques, positives comme négatives, n'ont pas été prises en compte. L'étude des communautés diatomiques a été essentiellement basée sur l'impact du stress physiologique provoqué par le niveau de contamination métallique, en fonction de variations de facteurs environnementaux abiotiques.





## TABLE DES MATIERES.

<b>INTRODUCTION.</b>	<b>19</b>
<b>CHAPITRE 1</b>	
<b>DIATOMEES ET POLLUTIONS METALLIQUES : ETAT DES CONNAISSANCES</b>	<b>23</b>
<b>A – IMPORTANCE DES DIATOMEES COMME INDICATEURS DE L'ETAT DE SANTE DES ECOSYSTEMES AQUATIQUES.</b>	<b>24</b>
<b>1- Biologie des diatomées (Bacillariophycées).</b>	<b>24</b>
1.1 – Morphologie et structure cellulaire.	24
1.2 – Stratégies de reproduction.	25
1.3 – Habitats et modes de vie.	26
1.4 – Systématique.	27
<b>2- Utilisation des Diatomées comme bio-indicateurs de la qualité des eaux.</b>	<b>28</b>
2.1 – Intérêts de la bio-indication pour l'évaluation de la qualité des eaux.	28
2.2 – Définition d'un bio-indicateur.	30
2.3 – Potentialités des Diatomées pour la bioévaluation de la qualité des eaux.	31
2.4 – Des méthodes d'évaluation diatomique de la qualité de l'eau.	32
<b>3- Limites des performances indiciaires et des connaissances actuelles pour la bio-indication des pollutions métalliques.</b>	<b>34</b>
3.1 – Inconvénients des méthodes indiciaires, exemple de l'IBD (AFNOR 2000).	34
3.2 – Une connaissance insuffisante des effets des métaux sur les diatomées et sur la structure des assemblages.	35
<b>B – REPONSES DES DIATOMEES PERIPHYTIQUES A LA POLLUTION METALLIQUE.</b>	<b>38</b>
<b>1- Mécanismes d'accumulation des métaux.</b>	<b>38</b>
1.1 – Influence de la teneur en métaux sur la réponse physiologique des organismes.	38
1.2 – Modèles biologiques d'internalisation des métaux.	39
<b>2- Mécanismes de toxicité.</b>	<b>41</b>
2.1 – Dérèglements du métabolisme cellulaire.	41
2.2 – Perturbations de la production primaire des populations.	43
2.3 – Modifications de la structure et de l'architecture des communautés.	44

<b>3- Mécanismes de tolérance.</b>	<b>46</b>
3.1 – Réduction de la toxicité au niveau cellulaire.	46
3.2 – Développement à long terme de mécanismes de tolérance à l'échelle communautaire.	48
3.3 – Rôle de la matrice organique dans la protection des cellules.	49

## **CHAPITRE 2**

### **BASES METHODOLOGIQUES** **51**

#### **A – DES CONDITIONS DE CONTAMINATION METALLIQUE EN MILIEU NATUREL : LE "SITE ATELIER" EN AMONT DE LA RIVIERE LOT.** **52**

##### **1- Des pollutions métalliques diffuses affectant l'ensemble du continuum "Lot / Garonne / Estuaire de la Gironde".** **52**

- |  |    |
|--|----|
| 1.1 – Un transport important de polluants métalliques depuis le Lot amont jusqu'à l'estuaire de la Gironde.      | 52 |
| 1.2 – Biodisponibilité des métaux pour les organismes aquatiques le long du continuum "Lot / Garonne / Gironde". | 54 |

##### **2- Le "site atelier" en amont de la rivière Lot : une zone privilégiée pour l'étude des effets des contaminants métalliques.** **56**

- |  |    |
|--|----|
| 2.1 – Un projet de recherche inscrit dans le contexte de pollution polymétallique du "site atelier".                       | 56 |
| 2.2 – Le site expérimental "Lot amont" : caractérisation des stations d'étude le long du gradient de pollution métallique. | 58 |
| 2.3 – Des expérimentations de terrain le long de deux gradients de pollution.  | 61 |

##### **3- Etude en canaux artificiels des effets de la contamination au cadmium sur des communautés périphytiques collectées sur le terrain.** **63**

- |   |    |
|---|----|
| 3.1 – Evaluation des effets de la pollution par le cadmium sur les biofilms et la structure des communautés de diatomées périphytiques. | 63 |
| 3.2 – Inoculation d'une suspension de biofilm prélevée in situ.   | 64 |
| 3.3 – Procédure de contamination des systèmes expérimentaux.  | 65 |

#### **B – METHODES D'ECHANTILLONNAGE ET D'ANALYSE DES EAUX ET DU PERIPHYTON.** **66**

##### **1- Caractérisation de l'hydroclimat des stations.** **66**

- |   |    |
|---|----|
| 1.1 – Détermination des paramètres physico-chimiques usuels.              | 66 |
| 1.2 – Détermination des concentrations métalliques dans la colonne d'eau. | 67 |

##### **2- Caractérisation qualitative et quantitative des biofilms.** **68**

- |  |    |
|--|----|
| 2.1 – Méthodes d'échantillonnage du périphyton.  | 68 |
| 2.2 – Caractérisation de la biomasse en place.   | 69 |
| 2.3 – Analyses quantitative et qualitative de la structure des communautés de diatomées. | 71 |

<b>3- Traitement statistique des données.</b>	<b>74</b>
3.1 – Statistiques descriptives.	74
3.2 – Tests statistiques pour la discrimination des échantillons.	75

## **CHAPITRE 3**

### **VARIABILITE SAISONNIERE ET INTER-ANNUELLE DES COMMUNAUTES DIATOMIQUES DU RIOU-MORT ET DU RIOU-VIOU. IDENTIFICATION DE DESCRIPTEURS DES POLLUTIONS METALLIQUES**

**77**

#### **A – CARACTERISATION DES COMMUNAUTES DU BASSIN VERSANT DU RIOU-MORT.**

**79**

<b>1- Conditions de développement des communautés diatomiques.</b>	<b>80</b>
1.1 – Caractéristiques physico-chimiques des cours d'eau.	80
1.2 – Des biofilms à biomasse très variable.	84
<b>2- Des assemblages reflétant l'origine du périphyton.</b>	<b>85</b>
2.1 – Une structure des assemblages en relation avec le cours d'eau d'origine.	85
2.2 – Quelques espèces dominantes en conditions d'exposition métallique (Cd / Zn).	93

#### **3- Variabilité saisonnière et inter-annuelle : exemple de la station Joanis sur le Riou-Mort aval.**

**94**

Long term survey of heavy metal pollution, biofilm contamination and diatom community structure in the Riou-Mort watershed, South West France

#### **B – UNE ZONE ATELIER FAVORABLE A L'IDENTIFICATION DE DESCRIPTEURS SPECIFIQUES DES POLLUTIONS METALLIQUES.**

**117**

<b>1- Impacts des métaux sur la morphologie (taille, physionomie) des individus : mise en évidence en conditions hivernales (mars-avril 2004).</b>	<b>118</b>
Metal-induced shifts in the morphology of diatoms from the Riou-Mort and Riou-Viou streams (South West France)	
<b>2- Intérêt des anomalies morphologiques pour la bioindication en routine : étude pluri-annuelle de leur fréquence d'apparition.</b>	<b>133</b>

## CHAPITRE 4

### **CINETIQUE D'ETABLISSEMENT DES COMMUNAUTES DIATOMIQUES LE LONG DU GRADIENT DE POLLUTIONS DU RIOU-MORT** **139**

---

#### **A – DYNAMIQUE DE COLONISATION DES COMMUNAUTES DIATOMIQUES.** **141**

##### **1- Etablissement des communautés en conditions estivales.** **142**

*Dynamics of benthic diatom colonization in a cadmium/zinc-polluted river (Riou-Mort, France)*

##### **2- Etablissement des communautés en conditions hivernales.** **159**

2.1 – Hydroclimat des stations. **159**

2.2 – Caractéristiques du biofilm. **160**

2.3 – Caractérisation des assemblages diatomiques. **162**

#### **B – VARIABILITE SAISONNIERE DES EFFETS SUR LES BIOFILMS ET LES COMMUNAUTES DIATOMIQUES ASSOCIEES.** **166**

*Seasonal effects on the relationships between cadmium accumulation in freshwater biofilms and periphytic diatom communities*

## CHAPITRE 5

### **CINETIQUE DE COLONISATION ET DE BIO-ACCUMULATION DU CADMIUM EN CONDITIONS EXPERIMENTALES** **187**

---

#### **A – DEMARCHE EXPERIMENTALE.** **190**

##### **1- Collecte du périphyton sur le terrain** **190**

##### **2- Des conditions expérimentales recréées d'après celles observées sur le terrain.** **190**

2.1 – Détermination des facteurs abiotiques. **190**

2.2 – Suivi des caractéristiques physico-chimiques. **192**

#### **B – BIOACCUMULATION ET TOXICITE DU CADMIUM A DIFFERENTS NIVEAUX D'EXPOSITION.** **194**

*Cadmium toxicity and bioaccumulation in freshwater biofilms*

#### **C – INFLUENCE DE LA MATRICE ORGANIQUE SUR L'ACCUMULATION DU CADMIUM DANS LES ORGANISMES ET L'EXPRESSION DE SA TOXICITE EN DOSES SUBLETALES.** **220**

*Toxicity and bioaccumulation of cadmium in freshwater diatoms in relation to biofilm matrix : a microcosm study*

## **CHAPITRE 6**

### **DISCUSSION – PERSPECTIVES – CONCLUSIONS 245**

---

#### **A - DES APPROCHES COMPLEMENTAIRES AU SERVICE D'UNE MEILLEURE COMPREHENSION DES PHENOMENES OBSERVES IN SITU. 247**

**1- Caractéristiques des communautés matures / suivi des cinétiques de colonisation. 247**

**2- Apports des expérimentations en laboratoire. 249**

#### **B - INTERET D'UN SUIVI POSTERIEUR DES COMMUNAUTES DIATOMIQUES POUR ESTIMER L'IMPACT DES DEMARCHES DE REMEDIATION. 252**

**1- Utilisation d'enregistrements historiques. 252**

1.1 – Evolution des concentrations en ETM dissous de 1977 à nos jours. 253

1.2 – Analyse des relevés floristiques correspondants. 254

**2- Perspectives : un suivi des flores diatomiques pour valider les effets de la démarche de remédiation entreprise par Umicore ? 256**

2.1 – Un contexte favorable à la mise en place d'un suivi. 256

2.2 – Objectifs de réhabilitation : vers quelle structure de communauté ? 256

#### **C - IMPLICATIONS POUR LA GESTION 258**

**1- Qualification des effets de substances prioritaires définies par la DCE. 258**

**2- Conséquences pour le biomonitoring en routine et perspectives. 260**

2.1 – Utilisations actuelles et futures des descripteurs morphologiques. 260

2.2 – Proposition d'un indice de pollution métallique probable. 261

### **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 267**

## TABLE DES ILLUSTRATIONS.

Figure 1 : Schéma conceptuel détaillé des expérimentations.....	21
Figure 2. Structure du frustule de la diatomée <i>Luticola ventricosa</i> (observé au MEB) (d'après Güttinger 1999). .....	24
Figure 3: Modes de reproduction des diatomées - seules les valves sont représentées (d'après Round <i>et al.</i> 1990).....	25
Figure 4 : Formes solitaires et coloniales de diatomées (photographies de Jason Oyadomari, source : <a href="http://www.bio.mtu.edu/">http://www.bio.mtu.edu/</a> ).....	26
Figure 5 : Clé simplifiée de détermination des genres des diatomées d'eau douce (d'après Krammer et Lange-Bertalot 1986 - 1991), illustrations de Michel Coste (Coste 1999). .....	27
Figure 6 : Variabilité des concentrations en cadmium dissous et particulaire dans le Riou-Mort (Joanis) pour l'année 2000 (Blanc <i>et al.</i> 2006). Les barres noires correspondent à des échantillons prélevés mensuellement. La ligne brisée est tracée à partir des concentrations déterminées dans des échantillons cumulant 6 jours de prélèvements.....	29
Figure 7 : exemples de diatomées caractéristiques d'eaux : a/ de mauvaise qualité et b/ de bonne qualité (source : RNDE 2000). .....	34
Figure 8 : Localisation des principales études <i>in situ</i> des effets des pollutions métalliques sur les communautés de diatomées d'eau douce. ....	36
Figure 9 : Réponse des algues à une augmentation de la concentration métallique dans le milieu (a : métaux non essentiels, b : métaux essentiels) (d'après Simkiss et Taylor 1989).....	38
Figure 10 : Mécanismes de transport des métaux (d'après Campbell <i>et al.</i> 2002). .....	39
Figure 11. Déterminants intracellulaires de la toxicité métallique.....	41
Figure 12 : Frustules déformés de <i>Pinnularia parvulissima</i> , observés en milieux contaminés par les métaux (photographies : Michel Coste). .....	42
Figure 13 : Représentation schématique des effets de la contamination par les métaux sur l'architecture des communautés diatomiques se développant sur les substrats artificiels vierges en conditions expérimentales contrôlées (d'après Gold 2002).....	45
Figure 14 : Section longitudinale d'une cellule de <i>Skeletonema costatum</i> non contaminée à gauche (C : chloroplaste, F : frustule, M : mitochondrie, N : noyau, V : vacuole), et présentant une inclusion de cadmium (I) dans la vacuole à droite (in Nassiri <i>et al.</i> 1997).....	47
Figure 15 : Principe du concept PICT, profils de tolérance des communautés échantillonnées sur sites de référence et pollué (d'après Boivin <i>et al.</i> 2001). .....	48
Figure 16 : Coupe schématique d'un biofilm périphytique (épaisseur : 1-2000µm). .....	49
Figure 17 : Qualité des eaux du Bassin Adour-Garonne vis-à-vis de la contamination métallique (eau, bryophytes et sédiments confondus (Agence de l'Eau Adour-Garonne 2005). .....	52
Figure 18 : Schéma du bilan des flux de cadmium dissous et particulaire dans le système Lot / Garonne / Gironde pour l'année 2000 (d'après Audry <i>et al.</i> 2004b).....	53

Figure 19 : Concentrations en cadmium (en ng/g de poids frais) dans les reins et les muscles de poissons collectés le long de la rivière Lot en 1995, 1996 et 1997 (Andres <i>et al.</i> 2000).....	54
Figure 20 : Comparaison de la contamination au cadmium des huîtres creuses de la Gironde et de Marennes aux médianes nationales, pour les années 2002, 2003 et 2004 (IFREMER 2005b, a)....	55
Figure 21 : Activités métallurgiques dans le bassin industriel de Decazeville (vue aérienne du site Umicore de Viviez ; photographie : Umicore).....	57
Figure 22 : Localisation des sites d'étude (fond de carte IGN 2338O, 1:50000). .....	58
Figure 23 : Photographies des stations du Riou-Viou : Moulin (à gauche) et Usine (à droite), mai 2004.....	59
Figure 24 : Photographies des stations du Riou-Mort : Firmi, Decazeville et Joanis (de gauche à droite), juillet 2004.....	60
Figure 25 : Implantation de substrats destinés à la récupération du biofilm et à l'immersion des bivalves (station Joanis, Riou-Mort).....	61
Figure 26 : Systèmes expérimentaux mis en place au laboratoire.....	64
Figure 27 : Substrats artificiels utilisés sur le terrain et en laboratoire. ....	68
Figure 28 : Protocole de récolte du biofilm et devenir des échantillons. ....	69
Figure 29 : Localisation des sites étudiés dans le cadre du suivi annuel.....	80
Figure 30 : Conductivités électriques mesurées <i>in situ</i> aux dates de prélèvement des échantillons de périphyton.....	81
Figure 31 : Disponibilité des ressources nutritives : exemple des concentrations en azote ammoniacal et en orthophosphates mesurées aux dates d'échantillonnage du périphyton.....	82
Figure 32 : Concentrations en cadmium et en zinc dans les phases dissoute et particulaire déterminées sur les échantillons d'eau collectés par préleveurs automatiques (données : UMR EPOC, année 2004) pour les dates des campagnes "diatomées".....	83
Figure 33 : Valeurs des estimateurs de biomasse : poids sec du biofilm et concentrations en chlorophylle.....	84
Figure 34 : Classification ascendante hiérarchique réalisée sur la base des abondances relatives des espèces de diatomées échantillonnées sur le Riou-Mort et le Riou-Viou lors des campagnes 2004-2005.....	85
Figure 35 : Espèces majoritaires inventoriées sur le bassin versant du Riou-Mort (campagnes 2004-2005).....	88
Figure 36 : Valeurs moyennes de matière sèche sans cendre et de concentrations en chlorophylle <i>a</i> dans les biofilms des trois stations, pendant la durée du suivi. Barres d'erreur : écarts-types.....	161
Figure 37 : Analyse en Composantes Principales des inventaires diatomiques des trois stations échantillonnées, pendant la durée du suivi. Barres d'erreur : écarts-types.....	163
Figure 38: Abondances relatives des espèces de petite et de grande taille, respectivement inférieures à 100µm <sup>3</sup> , en noir, et supérieures à 500µm <sup>3</sup> , en blanc. Les barres d'erreur représentent l'écart-type.....	164
Figure 39 : Evolution des abondances relatives d'espèces déformées à Firmi, Decazeville et Joanis. Les barres d'erreur représentent l'écart-type.....	165
Figure 40 : Plan expérimental. ....	192
Figure 41 : Equipements mis en place pour les expérimentations en laboratoire - vue partielle de la chambre climatisée. ....	193

Figure 42 : Représentation schématique de la répartition des espèces par station, chaque carré de couleur regroupe les espèces rencontrées dans la station concernée (de gauche à droite : gradient amont / aval).....	247
Figure 43 : Architecture du biofilm - exemple de la structuration des communautés diatomiques matures, juillet 2004 (d'après Morin <i>et al.</i> 2006).....	248
Figure 44 : Réponses des communautés des 4 unités expérimentales pendant la durée de l'expérimentation. La taille des diagrammes représente la quantité de biomasse et les quartiers les abondances spécifiques des espèces majoritaires. Les astérisques figurent la présence significative de formes anormales.....	250
Figure 45 : Localisation des stations Decazeville, Joanis et Boisse-Penchat sur le Riou-Mort.....	252
Figure 46 : Evolution temporelle (1973-2005) des concentrations en cadmium et zinc dissous mesurées et du nombre d'espèces de diatomées recensées sur le Riou-Mort aval.....	253
Figure 47 : Structure des communautés diatomiques collectées sur le Riou-Mort, à l'amont et à l'aval de sa confluence avec le Riou-Viou : évolution temporelle et objectifs de remédiation. En hachures : espèces sensibles, en plein : espèces tolérantes, en blanc : espèces sans préférence connue. ....	257
Figure 48 : Calcul de l'indice de pollution métallique probable pour les sites Decazeville et Joanis sur le Riou-Mort, Moulin et Usine sur le Riou-Viou . ....	263
Tableau 1 : Récapitulatif des principales études en laboratoire d'évaluation des effets des pollutions métalliques sur les communautés de diatomées d'eau douce.....	37
Tableau 2 : Analyses des principaux paramètres physico-chimiques de la colonne d'eau.....	67
Tableau 3 : Espèces dominantes inventoriées lors des campagnes d'échantillonnages 2004-2005 sur le Riou-Mort et le Riou-Viou. ....	87
Tableau 4 : Principales caractéristiques physico-chimiques des eaux aux différentes dates de prélèvement (ld: limite de détection: 1µgCd/L et 10µgZn/L).....	159
Tableau 5 : Détermination des valeurs moyennes des poids secs (PS), de la matière sèche sans cendre (MSSC), des concentrations en chlorophylle a (Chl.a), en cadmium ([Cd]) et en zinc ([Zn]) et des densités cellulaires dans les biofilms collectés sur substrats artificiels (ld : limite de détection).....	161
Tableau 6 : Composition chimique du milieu de culture utilisé.....	191
Tableau 7 : Espèces majoritaires observées sur le Riou-Mort aval.....	254
Tableau 8 : Définition générale de la qualité écologique pour le phytobenthos .....	258
Tableau 9 : EQR calculés pour les sites Firmi, Decazeville, Joanis, Moulin et Usine, d'après les calculs d'IPS réalisés sur échantillons prélevés en été sur substrats naturels. ....	259
Tableau 10 : Comparaison des notes d'IPS version 1982 et 2004 pour le site Riou-Mort à Joanis lors des étés 2004 et 2005.....	260
Tableau 11 : Construction d'un indice de pollution métallique probable : Abondances relatives des espèces suivantes et prise en compte de l'attribut "anomalies morphologiques".....	262



## LEXIQUE FRANÇAIS / ANGLAIS DES ABBREVIATIONS.

<i>Français</i>		<i>Anglais</i>	
ACP	Analyse en composantes principales	Principal component analysis	PCA
ANOVA	Analyse de variance	Analysis of variance	ANOVA
<i>BLM</i>	Modèle du ligand biotique	Biotic ligand model	BLM
CAH	Classification ascendante hiérarchique	Hierarchical cluster analysis	HCA
CEE	Indice diatomée de Descy et Coste (1991)	Diatom index by Descy & Coste (1991)	CEC
DBO <sub>5</sub>	Demande biologique en oxygène sur 5 jours	Biological oxygen demand	BOD
DCO	Demande chimique en oxygène	Chemical oxygen demand	COD
EPS	Exopolysaccharides	Extracellular polymeric substances	EPS
ETM	Élément trace métallique	Trace metal	
<i>FIM</i>	Modèle de l'ion libre	Free ion model	FIM
IBD	Indice biologique diatomées de Lenoir et Coste (1996)	Biological diatom index (Lenoir & Coste 1996)	BDI
IPS	Indice de polluo-sensibilité de Coste ( <i>in</i> Cemagref 1982)	Specific pollution sensitivity index (Coste <i>in</i> Cemagref 1982)	SPI
MES	Matières en suspension	Suspended particulate matter	SPM
<i>PICT</i>	Tolérance des communautés induite par l'exposition aux polluants	Pollution-induced community tolerance	PICT
<i>ROS</i>	Radicaux libres de l'oxygène	Reactive Oxygen Species	ROS
SE	Système expérimental	Experimental unit	EU
SEQ-Eaux	Système d'évaluation de la qualité des eaux	French water quality assessment system	<i>SEQ-Eaux</i>
SLA	Indice saprobique de Sládeček (1986)	Sládeček Saprobic diatom index (1986)	SI
<i>TDI</i>	Indice diatomique trophique de Kelly et Whitton (1995)	Trophic diatom index (Kelly & Whitton 1995)	TDI
WAT	Indice de Watanabe (1982-1990)	Diatom community index (Watanabe 1982-1990)	DCI



## ***INTRODUCTION.***

L'intérêt des algues en écologie des systèmes lotiques est aisément défendable, en raison de leur rôle prépondérant dans les cours d'eau. Non seulement producteurs primaires autotrophes et convertisseurs de nutriments inorganiques en formes organiques utilisables par les autres maillons de la chaîne alimentaire, ces organismes jouent un rôle structurant de stabilisation du substrat et de création d'habitat pour les poissons ou les invertébrés.

La connaissance des effets des dégradations anthropiques sur les communautés diatomiques constitue donc un enjeu majeur de l'écologie des systèmes aquatiques d'eau douce ; cependant ce compartiment biologique a été relativement moins exploité que les poissons ou les invertébrés pour la biosurveillance de l'état de santé des cours d'eau (Whitton *et al.* 1991, Rosen 1995, Whitton et Kelly 1995, Whitton et Rott 1996, Prygiel *et al.* 1999b, Hill *et al.* 2000a). Néanmoins, la situation évolue rapidement, notamment en Europe où de nombreux pays ont développé des indices basés sur la distribution des diatomées et leurs préférences écologiques, relatives entre autres au niveau saprobique ou trophique (Sládeček 1986, Lange-Bertalot 1979, Watanabe 1982-1990, Schiefele et Schreiner 1991, Kelly et Whitton 1995), au pH (Renberg et Hellberg 1982, Håkansson 1993), à la salinité (Ziemann 1991) ou à un niveau de qualité globale, incluant divers paramètres tels que les matières organiques, les substances nutritives et la physicochimie (Coste *in* Cemagref 1982, Dell'Uomo 1996, Lenoir et Coste 1996).

Ces indices diatomiques évaluent la perturbation anthropique d'après les abondances relatives des espèces recensées, pondérées par leurs caractéristiques spécifiques de sensibilité à différents indicateurs d'eutrophisation. Pour d'autres impacts anthropiques cependant, notamment les pollutions à toxiques, les indicateurs actuels sont peu performants et les études s'y intéressant en particulier relativement rares. Or, la contamination croissante des écosystèmes aquatiques par des substances toxiques suscite un intérêt grandissant de la part des politiques et des gestionnaires, et les pays européens placent désormais cette problématique au centre de leurs préoccupations, au travers de la mise en place de la Directive Cadre européenne sur l'Eau (Parlement Européen 2000). Il s'agit dès lors de quantifier ces pollutions mais également de caractériser leurs impacts sur les organismes aquatiques.

C'est dans ce contexte que le Cemagref et le LEESA<sup>1</sup> ont, depuis une dizaine d'années, engagé des études expérimentales en microcosmes (Peres 1996), puis des travaux couplés de laboratoire et de terrain (Gold 2002) d'évaluation des effets des contaminants métalliques sur les communautés diatomiques. Parallèlement, le Département d'Ecologie et d'Ecotoxicologie Aquatiques de l'Université d'Amsterdam a fortement contribué à la production de connaissances complémentaires sur le sujet (Ivorra 2000). Quelques études ponctuelles (*in situ* et en laboratoire, voir Chapitre 1) ont également favorisé l'acquisition de données relatives à des sensibilités ou tolérances d'espèces particulières aux métaux. Par ailleurs, les auteurs mentionnent de plus en plus fréquemment l'apparition de modifications dans la morphologie des diatomées (taille, forme générale) en lien avec ces pollutions (Cattaneo *et al.* 1998, Dickman 1998, Ruggiu *et al.* 1998, Torres *et al.* 2000, Cattaneo *et al.* 2004).

Les objectifs de cette thèse sont donc doubles : à partir d'études de terrain approfondies et d'expérimentations en laboratoire, il s'agit d'éclairer les effets structurants de la contamination métallique sur les assemblages diatomiques ainsi que sur la morphologie des individus, au regard des connaissances antérieures.

C'est pourquoi nous présentons dans un premier temps les acquis scientifiques actuels, au travers d'une revue bibliographique exposant les intérêts des diatomées pour la bio-indication et les pistes d'investigations fournies par les résultats des études pré-existantes.

Dans un deuxième chapitre, nous présenterons la démarche méthodologique suivie, qui combine les apports de suivis de terrain et d'expérimentations en laboratoire. Nous y expliquons le choix des sites d'étude, ainsi que les méthodes analytiques mises en œuvre pour l'acquisition des données.

Les parties suivantes développent les résultats obtenus au travers de trois approches complémentaires (Figure 1) : suivi des communautés diatomiques matures sur deux années (Chapitre 3), cinétiques de colonisation de substrats artificiels (Chapitre 4) et expérimentations de laboratoire (Chapitre 5). Ainsi, le chapitre 3 s'intéresse à la caractérisation de communautés diatomiques à l'amont et à l'aval d'une source de contamination métallique, sur deux cours d'eau du bassin versant du Riou-Mort (affluents du Lot amont, Sud-Ouest de la France) subissant différents degrés d'anthropisation. Il s'attache ensuite plus particulièrement à

---

<sup>1</sup> LEESA : Laboratoire d'Ecophysiologie et d'Ecotoxicologie des Systèmes Aquatiques, UMR CNRS EPOC 5805.

l'examen de descripteurs phénotypiques susceptibles de traduire un niveau d'exposition aux métaux élevé : les indicateurs "longueur cellulaire" et "fréquence des anomalies morphologiques" ont été analysés à partir des échantillons acquis lors du suivi des communautés matures. Les études présentées dans le chapitre 4 traitent des impacts de l'eutrophisation et des effets combinés nutriments/métaux sur la mise en place des communautés diatomiques. Deux expérimentations complémentaires ont été menées le long du gradient de pollution organique et métallique de la rivière Riou-Mort, en été puis en hiver, de manière à évaluer également la part de variabilité saisonnière. Enfin, les hypothèses élaborées d'après les études *in situ* ont fait l'objet d'une validation expérimentale, présentée dans le chapitre 5 de cette thèse. Nos expérimentations de laboratoire ont été conçues de manière à évaluer les impacts d'une contamination métallique (le cadmium dissous), appliquée en concentrations croissantes, sur les communautés diatomiques. Elles ont également donné lieu à une étude de l'effet protecteur de la matrice organique (biofilm) sur des communautés diatomiques en place depuis 15 jours avant leur exposition au contaminant.

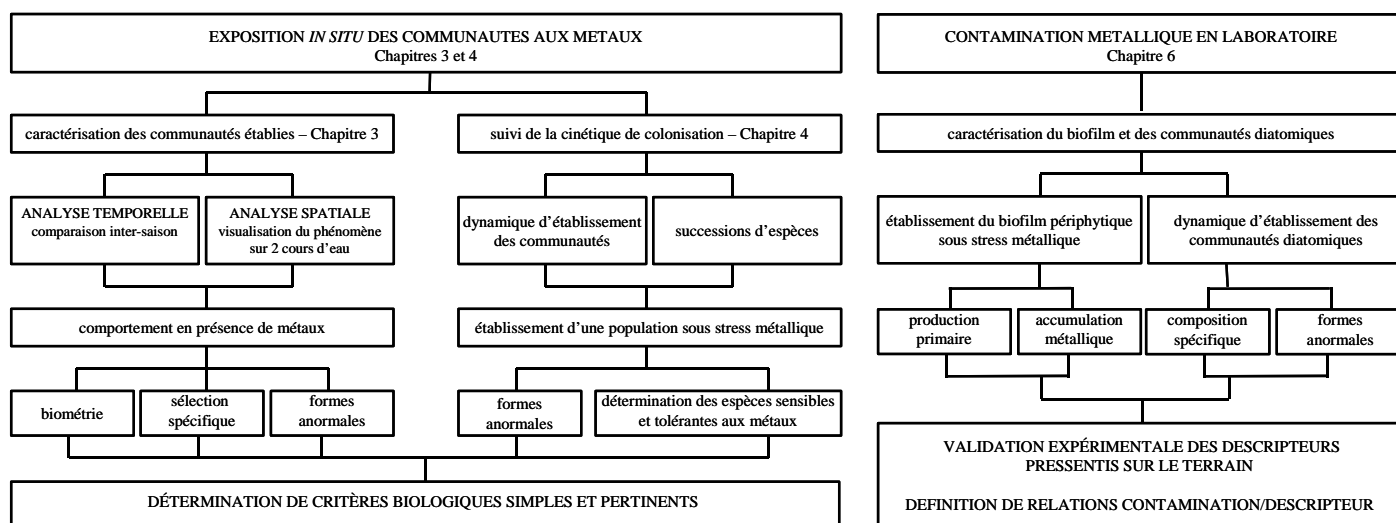


Figure 1 : Schéma conceptuel détaillé des expérimentations.

Le dernier chapitre dresse un bilan prospectif de nos études. Il résume les apports de nos différentes approches et leur complémentarité, puis propose des voies d'utilisation ultérieure des résultats obtenus au cours de cette thèse, pour la gestion du bassin versant étudié puis, à plus large échelle, pour la mise en œuvre de politiques de gestion plus efficaces de la contamination métallique des cours d'eau.



# **CHAPITRE 1**

Diatomées et pollutions métalliques :

Etat des connaissances

***A – IMPORTANCE DES DIATOMÉES COMME INDICATEURS DE L'ÉTAT DE SANTÉ DES ÉCOSYSTÈMES AQUATIQUES.***

**1- Biologie des diatomées (Bacillariophycées).**

Les diatomées sont membres de l'embranchement des algues brunes (Chromophytes). Ces micro-algues unicellulaires, dont la taille varie de quelques  $\mu\text{m}$  à plus de  $500\mu\text{m}$  pour les plus grandes, constituent la majeure partie du phytoplancton lacustre et marin. Les diatomées sont omniprésentes : depuis le début du Jurassique (Kooistra et Medlin 1996), elles colonisent divers types de substrats dans des conditions et des milieux très différents, des eaux pures aux plus polluées.

***1.1 – Morphologie et structure cellulaire.***

Les diatomées sont des cellules eucaryotes enchâssées dans une paroi de silice hydratée (le frustule) qui se compose de deux unités imbriquées : l'épivalve et l'hypovalve. Ces deux valves sont reliées par des ceintures connectives constituées de fines bandes siliceuses appelées copulae (Figure 2). La cohérence de cet ensemble est renforcée par une matrice organique extracellulaire constituée de polymères excrétés par la cellule au travers de perforations présentes sur toute la surface du frustule (Duke et Reimann 1977).

Selon les individus, les valves présentent des formes diversifiées et des ornementsations (stries, pores, ponctuations...) caractéristiques. Ces critères morphologiques sont utilisés pour leur identification jusqu'au niveau de l'espèce, lors de l'examen microscopique.

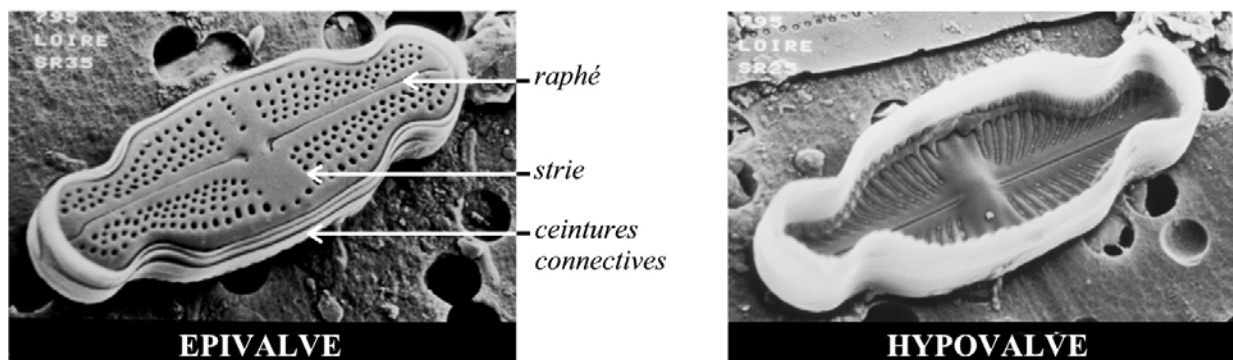


Figure 2. Structure du frustule de la diatomée *Luticola ventricosa* (observé au MEB) (d'après Güttinger 1999).



On trouve dans le protoplasme des diatomées les structures propres aux cellules eucaryotes : un noyau relativement homogène et un système membranaire avec plasmalemme, réticulum endoplasmique, appareil de Golgi, mitochondries, dictyosomes, vacuoles, chloroplastes d'une couleur brun-jaune, etc. Les pigments photosynthétiques sont des chlorophylles (*a* et *c*) et des caroténoïdes ( $\beta$ -carotène, fucoxanthine, diatoxanthine, diadinoxanthine) (Jørgensen 1977). Une partie de ces organismes est indépendante de l'énergie lumineuse, ce qui lui permet de coloniser jusqu'aux milieux les plus inhospitaliers (Hellebust et Lewin 1977).

### 1.2 – Stratégies de reproduction.

Le cycle de développement des diatomées est relativement court, de l'ordre de quelques heures à quelques jours (Baars 1983). La reproduction se fait essentiellement par voie végétative, et rarement par reproduction sexuée.

Lors de la reproduction asexuée, chaque cellule-fille reçoit par mitose la moitié de la paroi de la cellule-mère et fabrique elle-même la section manquante (hypovalve). Ce processus de régénération implique une réduction de la taille des cellules-filles aboutissant à des dimensions minimales, et la reproduction sexuée permet (en plus de la recombinaison génétique) de recouvrer des individus de taille normale (John 2000b). Les diatomées sont des organismes diploïdes, l'auxosporulation (production de cellules-oeuf) nécessite la formation de gamètes mâles flagellés et de gamètes femelles par méiose et produit une nouvelle cellule, appelée cellule initiale, dont la morphologie est un peu différente de celle des cellules végétatives.

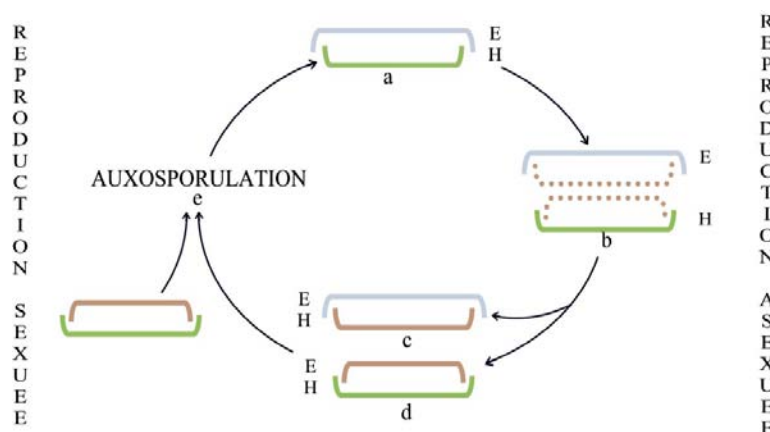


Figure 3: Modes de reproduction des diatomées - seules les valves sont représentées (d'après Round *et al.* 1990).

Dans des conditions défavorables (notamment lorsque l'azote devient un facteur limitant), on observe la formation des microspores de résistance : les hypnosporules (Edlund et Stoermer 1997, McQuoid 2002).

**1.3 – Habitats et modes de vie.**

Les diatomées ont une grande amplitude écologique, on les trouve dans tous les types de milieux : aérien, terrestre et aquatique, dans des conditions des plus favorables aux plus rigoureuses. Les habitats aquatiques colonisés peuvent être des lacs, des mares, des rivières, mais aussi des estuaires et le milieu marin. Les espèces dites phytoplanctoniques se développent dans la colonne d'eau (en particulier les Centriques et les Araphidées). Les espèces benthiques croissent sur différents types de substrats, ce qui constitue un critère de distinction (Patrick 1977) : les diatomées formant l'épilithon se fixent sur la pierre, celles de l'épiphyton sur les plantes, celles de l'épipélon sur le sédiment...

Les cellules sont solitaires ou fixées à l'aide de stipes mucilagineux (*Gomphonema*) ou bien vivent dans des tubes muqueux (*Cymbella*). Elles peuvent aussi former des colonies rubanées (*Fragilaria*), étoilées (*Asterionella*) ou filamenteuses (*Melosira*) (Figure 4).

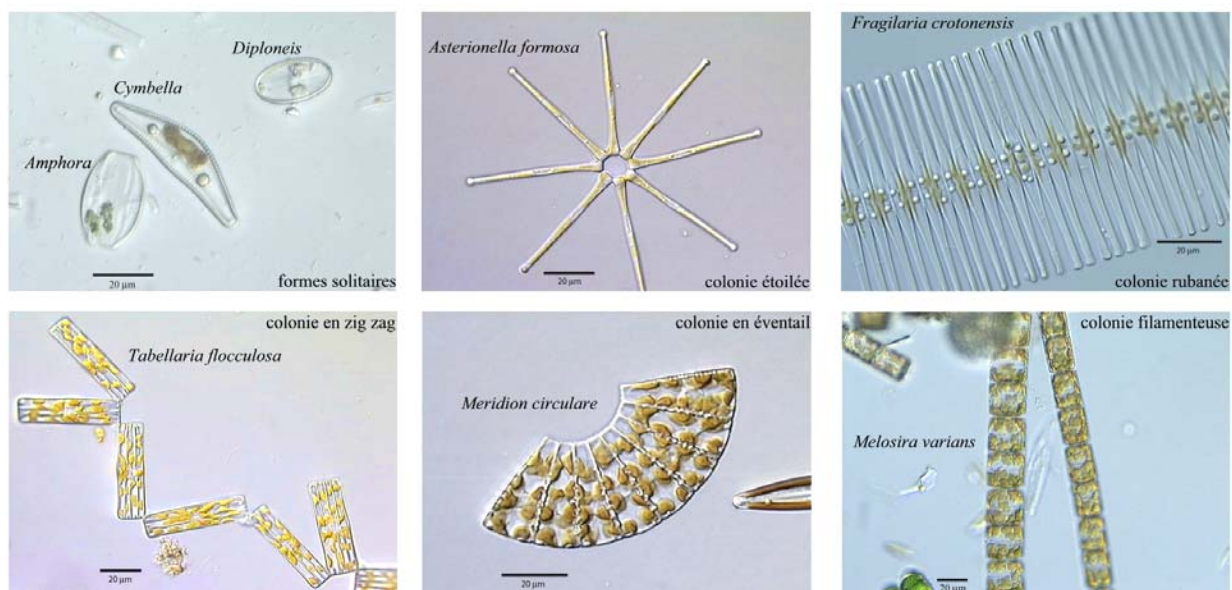


Figure 4 : Formes solitaires et coloniales de diatomées (photographies de Jason Oyadomari, source : <http://www.bio.mtu.edu/>).

Les diatomées étant rarement mobiles, la structure des communautés est principalement conditionnée par le "stock" d'espèces déjà en place. Elle dépend également de facteurs externes (disponibilité en nutriments, pression de prédation, parasitisme, pollution) et d'interactions entre espèces (compétition, excrétion de composés organiques autotoxiques, hétérotoxiques ou stimulants) (Townsend 1989).

### 1.4 – Systématique.

Il existe plus de 7000 espèces de diatomées dans les eaux douces ou saumâtres ; plus de 400 taxons sont décrits chaque année, ce qui astreint la classification à une évolution permanente.

Les classifications des diatomées sont abondantes, et révisées fréquemment. La Süßwasserflora (Krammer et Lange-Bertalot 1986 - 1991) repose sur la subdivision en deux groupes, qui sont identifiés d'après leur mode de reproduction sexuée et les caractéristiques du frustule (Round *et al.* 1990), observé en vues valvaire (de face) et connective (de profil) : forme, taille, symétrie, agencement et densité des ornements des valves, nature du raphé et des ceintures connectives. On distingue deux ordres (Figure 5) :

**Les diatomées centriques**, majoritairement pélagiques, sont définies par des critères de symétrie axiale des valves, et d'arrangement des ornements (nombre de pores, organisation radiale ou concentrique).

**Les diatomées pennées**, prédominantes dans le microphytobenthos, se distinguent des Centriques par une forme allongée des valves (linéaires, lancéolées ou ovales) et une symétrie des ornements du frustule généralement bilatérale. Certaines présentent une interruption des stries dans l'axe longitudinal de la valve (pseudo-raphé) ou une fente longitudinale (raphé). C'est la présence ou non de cette caractéristique qui distingue les Araphidées (diatomées sans raphé) des Raphidées. Les caractéristiques du raphé permettent ensuite de distinguer les sous-classes des Proraphidées (au raphé très court, restreint aux pôles des valves), des Monoraphidées (où le raphé n'est présent que sur une seule des valves) et des Biraphidées (possédant un raphé sur les deux valves). Au sein des Biraphidées, le raphé est soit placé longitudinalement au centre (par exemple chez *Navicula*), soit décalé latéralement (chez *Cymbella*), soit excentré (chez *Nitzschia*), soit confiné aux marges de la valve entière (chez *Surirella*).

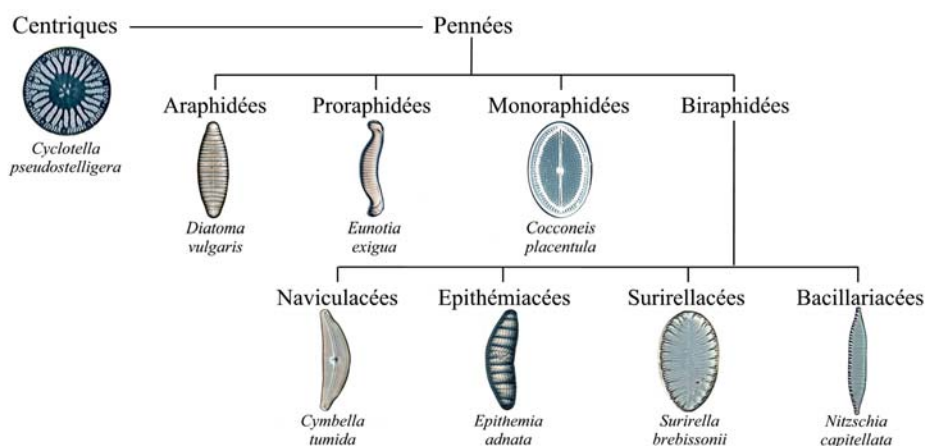


Figure 5 : Clé simplifiée de détermination des genres des diatomées d'eau douce (d'après Krammer et Lange-Bertalot 1986 - 1991), illustrations de Michel Coste (Coste 1999).

Les caractéristiques morphologiques du frustule, variables selon les espèces mais constantes au sein d'une même espèce, peuvent être observées au microscope photonique après élimination par traitement chimique des contenus cellulaires. Ces modalités de préparation des échantillons rendent possible l'observation minutieuse des parois siliceuses, mais ne permettent pas de ce fait la prise en compte des caractéristiques des formes vivantes des cellules (physiologiques, biochimiques, moléculaires et de reproduction) pour établir le statut taxonomique d'une espèce donnée (Bertrand 1995). Néanmoins, la description de la structure des cellules vivantes (notamment le nombre et la forme des chloroplastes) et son utilisation pour l'identification des espèces ont été récemment l'objet d'un intérêt croissant. En effet, les plastes sont de petite taille, nombreux, et en forme de disques aplatis localisés à la périphérie de la cellule chez les Centriques. Chez les Pennées, on distingue généralement un ou deux plastes de grande taille, et leur disposition variable dans la cellule permet une identification jusqu'au niveau du genre, voire de l'espèce. Cox (1996) a décrit en détail les chloroplastes de nombreux groupes de diatomées et a proposé une clé pratique pour l'identification des diatomées vivantes, combinant ainsi les traits morphologiques, les caractéristiques des contenus cellulaires et les formes coloniales observées.

## **2- Utilisation des Diatomées comme bio-indicateurs de la qualité des eaux.**

### ***2.1 – Intérêts de la bio-indication pour l'évaluation de la qualité des eaux.***

La qualité des cours d'eau et des milieux aquatiques est estimée en routine par la mesure de paramètres physico-chimiques ainsi que biologiques.

Il existe des méthodes standard de mesure de la pénétration lumineuse, de la turbidité, de la conductivité électrique, de la salinité, de l'oxygène dissous, de la demande biologique en oxygène, des teneurs en nutriments, en métaux lourds... Le suivi physico-chimique permet de recueillir des mesures simples et ponctuelles ; c'est une pratique de base de la surveillance de la qualité des eaux, qui s'est complétée et perfectionnée avec l'évolution des techniques. Cependant la mesure seule de ces paramètres ne fournit pas une vue d'ensemble de la santé de l'écosystème aquatique. En effet, l'appréciation de la chimie de l'eau, même à intervalles fréquents, est soumise à une variabilité temporelle non maîtrisée. On constate des fluctuations périodiques de la composition de l'eau, quotidiennes ou plus occasionnelles (en relation avec des causes externes par exemple : évolutions du débit des cours d'eau, impacts anthropiques...), qui peuvent se révéler significatives mais que l'analyse chimique peut

éventuellement manquer (Figure 6). Les organismes aquatiques sont en constante interaction physique, chimique et biologique avec leur écosystème. Ils sont ainsi capables d'intégrer les évolutions environnementales sur le court terme aussi bien que sur le long terme, mais également les effets antagonistes ou synergiques des différents types de contaminants, impossibles à mettre en évidence par des mesures physico-chimiques (Whitton 1991).

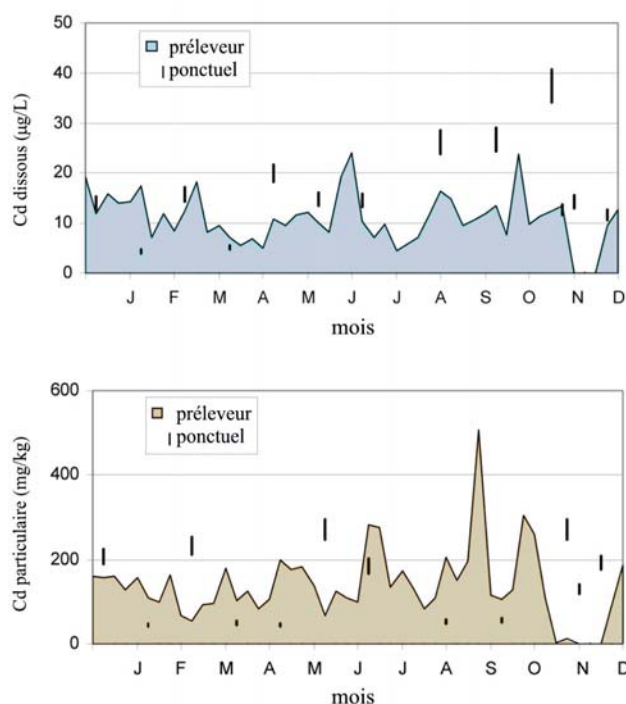


Figure 6 : Variabilité des concentrations en cadmium dissous et particulaire dans le Riou-Mort (Joanis) pour l'année 2000 (Blanc *et al.* 2006). Les barres noires correspondent à des échantillons prélevés mensuellement. La ligne brisée est tracée à partir des concentrations déterminées dans des échantillons cumulant 6 jours de prélèvements.

Les pratiques de bio-indication se sont développées pour évaluer la qualité de l'eau et des milieux aquatiques de façon plus intégrée dans le temps (Rott 1991). Les observations réalisées sur des individus particuliers sont généralement insuffisantes, très peu d'entre eux présentant des exigences environnementales suffisamment bien circonscrites pour en déduire des informations précises. En revanche, l'exploitation de la structure de communautés aquatiques intègre les caractéristiques spécifiques d'habitat des individus qui les constituent et se révèle ainsi plus appropriée à la bio-indication (Whitton 1975). Ces pratiques, basées sur les réactions d'organismes vivants exposés à des environnements plus ou moins pollués, sont des techniques simples, généralement peu onéreuses, et relativement souples d'observation et d'analyse.

## 2.2 – Définition d'un bio-indicateur.

*There is no better indicator of the status of a species or a system than the species or system itself* (Tingey 1989).

La notion de bio-indicateur désigne une espèce ou une population qui, du fait des particularités écologiques des espèces composant l'assemblage, est apte à rendre compte de façon intégrée dans le temps de l'ambiance écologique régnant dans un milieu aquatique et à révéler précocement des modifications biotiques ou abiotiques de l'environnement.

Pratiquement tous les organismes révèlent des informations sur leur environnement, mais certains sont plus utiles pour la surveillance de la qualité des eaux que d'autres (Charles et Smol 1994). Un bio-indicateur approprié doit idéalement présenter les caractéristiques suivantes :

**Abondance dans le milieu et cosmopolitisme** : les organismes sélectionnés doivent permettre une application géographique et temporelle large des techniques de bio-indication.

**Localisation en début de chaîne alimentaire**, c'est-à-dire au plus proche des transferts de nutriments et d'énergie : les producteurs primaires sont ainsi particulièrement sensibles aux variations environnementales, même légères (Cazaubon 1991, Rott 1991).

**Cycle de vie simple et court**, afin de révéler les changements ponctuels ainsi que les modifications sur le long-terme (par la persistance des tendances mises en évidence sur le court-terme) (Hellowell 1978).

**Facilités d'identification morphologique** jusqu'au niveau de l'espèce (John 1998).

**Protocoles d'échantillonnage sur le terrain simplifiés**, notamment dans l'optique d'une utilisation par les opérateurs pour la surveillance en routine du niveau de qualité des eaux.

Notons que les espèces autochtones reflètent mieux les changements de qualité des eaux qui composent leur environnement que les espèces exotiques *a priori* plus compétitives (John 2000b).

Le bio-indicateur indique non seulement des changements environnementaux, mais fournit également des informations au sujet de l'intensité d'exposition à certaines substances par des réponses "mesurables", physiologiques, biochimiques ou comportementales. Les informations peuvent ainsi être déduites de leur contenu en composés ou éléments particuliers, de leur structure cellulaire ou morphologique, de modifications métaboliques ou biochimiques, d'études comportementales ou de la structure des populations.

### **2.3 – Potentialités des Diatomées pour la bioévaluation de la qualité des eaux.**

Les communautés périphytiques (algues et bactéries) constituent un compartiment privilégié pour la surveillance à long terme des cours d'eau, notamment parce qu'elles ont des exigences spécifiques et des tolérances variables à des gammes de paramètres de qualité des eaux différentes (Stevenson et Pan 1999). Contrairement aux organismes terrestres, les communautés aquatiques sont très dépendantes du milieu en raison de leur immersion permanente dans les eaux. Toutes les fonctions vitales, telles que l'alimentation, la respiration, la reproduction, l'excrétion, etc. se produisent dans ce milieu. Les modifications de qualité des eaux peuvent donc affecter les dispositifs cellulaires ou l'activité biologique des communautés périphytiques. Les diatomées représentent une grande partie du volume du périphyton dans la plupart des écosystèmes aquatiques et présentent de nombreux avantages en faveur de leur utilisation pour la bio-indication (John 2000a, b) :

**Une large répartition géographique** : leur distribution dans tous les types d'environnement aquatique, ainsi que le fait qu'une grande partie des espèces est ubiquiste, permet la constitution d'une vaste base de données (Lecointe *et al.* 1993) et la comparaison d'études réalisées sur différents sites, au niveau local comme international. La rémanence de leur squelette siliceux favorise la conservation des informations *in situ* et dans les collections d'échantillons.

**Une intégration rapide des variations des conditions de milieu.**

En tant que constituants du phytoplancton à la base des réseaux trophiques (producteurs primaires) dans la chaîne alimentaire, ces organismes à cycle de développement très court (Eppley 1977, Baars 1983, Stevenson et Pan 1999) peuvent réagir directement aux polluants et plus rapidement que les macro-invertébrés benthiques au cycle de vie plus complexe. Leur grande sensibilité aux facteurs environnementaux et la très grande spécificité de certaines espèces dans leurs préférences et tolérances écologiques renseigne sur un grand nombre de paramètres physico-chimiques de l'eau (température, pH, salinité, eutrophisation...). Les diatomées possèdent également la capacité d'accumuler des métaux lourds et des substances organiques dangereuses provenant du milieu environnant : le mercure et des radionucléides (éléments radioactifs) par exemple (Sirenko et Shevchenko 1999). De plus, leur mobilité restreinte permet d'obtenir, à la différence des analyses physico-chimiques classiques, une mesure intégrée dans le temps des variations de la qualité du milieu dans lequel elles se développent.

***Des facilités d'échantillonnage et de conservation des prélèvements.***

Leur taille microscopique permet un échantillonnage sur les substrats relativement facile et très rapide (Rosen 1995), le protocole de préparation des lames permanentes est standardisé et l'outil diatomique est reconnu pour la bio-indication et la bio-surveillance des cours d'eau (AFNOR 2000). La possibilité de conservation des échantillons, et leur stockage dans des bibliothèques, permet d'assurer une certaine forme de traçabilité.

Ces critères font par conséquent des diatomées d'excellents bio-intégrateurs généraux de la qualité des eaux des milieux lotiques. Ce constat s'est d'ailleurs traduit par la mise en oeuvre de méthodes permettant de caractériser l'état de santé des sites à partir de croisements entre les connaissances acquises sur ce compartiment écologique.

***2.4 – Des méthodes d'évaluation diatomique de la qualité de l'eau.***

De nombreuses méthodes ont été développées en Europe (Prygiel et Coste 1999) et dans le reste du monde pour apprécier la qualité des eaux à partir de l'analyse des communautés de diatomées. Ces méthodes d'évaluation s'appuient généralement sur les préférences écologiques des différentes espèces, elles ont été favorisées par le développement de nombreux indices diatomiques et de méthodologies, parmi lesquels on peut distinguer :

***Des métriques d'intégrité biotique.***

Les communautés peuvent être décrites par des indices simples de richesse spécifique (nombre d'espèces présentes dans le milieu), la densité (nombre d'individus dénombrés par unité de surface) ou la biodiversité, mesurée par l'indice de Shannon  $H'$  :

$$H' = \sum_{i=1}^s \frac{n_i}{n} \log_2 \frac{n_i}{n} \quad (\text{Shannon et Weaver 1949})$$

Où  $n_i$  : nombre d'individus de l'espèce  $i$ ,  $n$  : nombre total d'individus dans l'échantillon et  $s$  : nombre d'espèces

La régularité (evenness) de Pielou (1975) est un indicateur permettant de comparer la diversité calculée à une diversité théorique optimale,  $H'_{\max}$  ( $= \log_2 s$ ) :

$$REG = \frac{H'}{H'_{\max}}$$



***Les méthodes d'évaluation du niveau saprobique.***

La classification de Lange-Bertalot (1979) est basée sur les caractéristiques de résistance, de sensibilité ou d'indifférence des espèces à l'enrichissement du milieu en matière organique biodégradable; l'indice SI (Saprobic Index) de Sládeček (1986) combine les valeurs de représentativité et de saprobité (affinité pour la matière organique) des espèces ; tandis que le DCI (Diatom Community Index) de Watanabe (1982-1990) établit une corrélation entre la DBO<sub>5</sub> (Demande Biologique en Oxygène sur 5 jours) et l'abondance relative des taxons (tolérants, indifférents et sensibles).

***Les méthodes d'estimation de l'eutrophisation du milieu.***

Le TDI (Trophic Diatom Index) évalue la sensibilité des taxons, en relation avec les concentrations en substances nutritives telles que le phosphate soluble réactif, le phosphore total, les nitrates et l'ammoniaque (indice de Kelly et Whitton, 1995).

***Les méthodes révélant l'acidification des eaux.***

Certaines méthodes permettent l'estimation directe du pH d'après les assemblages diatomiques (ter Braak et van Dam 1989), notamment le "Diatom Tolerance Grade System" de Schreiner (cité dans Coring 1996).

***Les méthodes d'évaluation de la qualité générale du milieu,*** intégrant les caractéristiques physico-chimiques des cours d'eau.

Ces méthodes prennent en compte la plupart des déterminants physiques, chimiques et biologiques, dont la matière organique biodégradable (DBO, DCO : Demandes Biologique et Chimique en Oxygène), ainsi que les teneurs en azote, phosphore... Certaines incluent également les chlorures, le pH et la conductivité (indice diatomique CEC (Descy et Coste 1991), IPS : Indice de Polluo-Sensibilité de Coste in Cemagref 1992).

En France, l'intégration de telles méthodes de bioévaluation diatomique dans les réseaux de surveillance de la qualité des cours d'eau a résulté d'une association entre les Agences de l'Eau et le Cemagref, qui a abouti à la mise au point d'un indice diatomique applicable en routine à l'ensemble du réseau hydrographique français (Prygiel et Coste 1998) : l'Indice Biologique Diatomée (ou IBD) (Lenoir et Coste 1996). Elaboré à partir de données nationales, cet indice qui utilise 209 taxons a fait l'objet en 2000 d'une norme homologuée AFNOR. Le développement de logiciels d'inventaires diatomiques et de calcul des indices, tels que le programme OMNIDIA (Lecoite *et al.* 1993), a considérablement favorisé l'application de ces méthodes en Europe et dans le Monde.

### 3- Limites des performances indicielles et des connaissances actuelles pour la bio-indication des pollutions métalliques.

La diagnose de l'état écologique des rivières, à réaliser dans le cadre de la mise en œuvre de la Directive Cadre sur l'Eau (2000/60/CE), impose le choix de descripteurs biotiques et abiotiques pertinents permettant la mesure d'un écart à la référence, et la compréhension des relations entre les descripteurs environnementaux et les assemblages biologiques en place. Or les méthodes utilisées actuellement semblent peu adaptées à la révélation des effets des pollutions métalliques : cette partie décrit les techniques actuellement utilisées en routine et leurs limites pour la bio-indication des pollutions métalliques.

#### 3.1 – Inconvénients des méthodes indicielles, exemple de l'IBD (AFNOR 2000).

Les diatomées sont d'excellents bio-indicateurs de l'enrichissement en nutriments, de l'acidification des eaux ou de l'eutrophisation du milieu. Les indices actuels ont été conçus d'après les *preferenda* écologiques des différentes espèces de diatomées et se révèlent très performants pour la surveillance de la charge organique et ionique des cours d'eau.

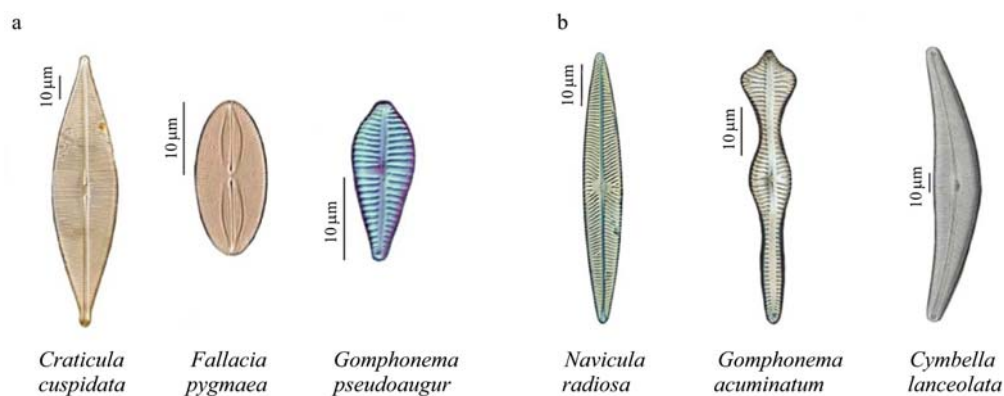


Figure 7 : exemples de diatomées caractéristiques d'eaux : a/ de mauvaise qualité et b/ de bonne qualité (source : RNDE 2000).

Cependant, à ce jour, aucune méthode basée sur les communautés périphytiques n'a été développée pour évaluer spécifiquement le niveau de pollution métallique des cours d'eau, et les outils d'évaluation de la qualité générale du milieu appliqués en routine n'intègrent pas non plus les caractéristiques de sensibilité, de tolérance ou d'indifférence vis-à-vis des pollutions métalliques des espèces utilisées pour le calcul des indices. Citons par exemple le cas

d'espèces considérées dans le calcul de l'IBD comme caractéristiques d'une bonne qualité d'eau mais rencontrées par ailleurs dans des contextes de forte contamination métallique : *Cocconeis placentula* var. *lineata* (Gold *et al.* 2003b) ou *Pinnularia gibba* (Admiraal *et al.* 1999b) semblent tolérer des conditions de stress cadmium / zinc, et *Eunotia exigua* (van Dam et Mertens 1990) ou *Pinnularia subcapitata* (van Dam et Mertens 1990, Hirst *et al.* 2002) résisteraient à des niveaux élevés de cuivre dissous. A l'inverse, bien que décrite par Shehata *et al.* (1999) comme sensible à de fortes concentrations métalliques, *Aulacoseira granulata*, est relativement tolérante aux pollutions organiques : sa présence dans un échantillon déprécie nettement les notes d'IBD.

L'application des méthodes indicielles "classiques" à des cours d'eau contaminés par ce type de toxiques ne donne ainsi que rarement des résultats suffisants à la mise en évidence du degré d'altération du milieu (Tison *et al.* 2003). La diagnose des pollutions à toxiques par l'utilisation des communautés diatomiques impose donc une révision des techniques d'évaluation des impacts des métaux sur les diatomées périphytiques, de manière à caractériser plus précisément l'état de pollution des cours d'eau.

### ***3.2 – Une connaissance insuffisante des effets des métaux sur les diatomées et sur la structure des assemblages.***

L'exposition des communautés de diatomées périphytiques aux métaux s'accompagne de conséquences observables du niveau cellulaire à celui de la communauté. Sirenko et Shevchenko (1999) distinguent quatre types de réponses des diatomées face aux pollutions à toxiques : des effets sur la croissance algale, l'apparition d'anomalies morphologiques chez certaines espèces, la disparition de certains taxons et l'amplification de la distribution d'autres taxons.

Les études de terrain réalisées à ce jour soulignent l'importance des variations observées de la composition spécifique des communautés périphytiques le long de gradients de pollutions polymétalliques : les communautés de diatomées périphytiques peuvent donc représenter des indicateurs biologiques très pertinents de la pollution métallique (Dickman 1998, Medley et Clements 1998, Stevenson et Bahls 1999). Cependant peu de travaux décrivent la structure des populations diatomiques en relation avec des pollutions toxiques. Une analyse plus fine de la structure des populations permettrait de mieux exploiter les renseignements apportés par les inventaires floristiques, et favoriserait probablement la mise en évidence des effets toxiques sur

les diatomées benthiques. De plus, les observations *in situ* réalisées sur le moyen et sur le long terme ont permis de décrire les communautés diatomiques ainsi que les réponses spécifiques de certains taxons. Cependant ces études se limitent à quelques sites (Figure 8), géographiquement disparates, et soumis à des niveaux de pollution métallique élevés (et relativement exceptionnels en conditions naturelles).

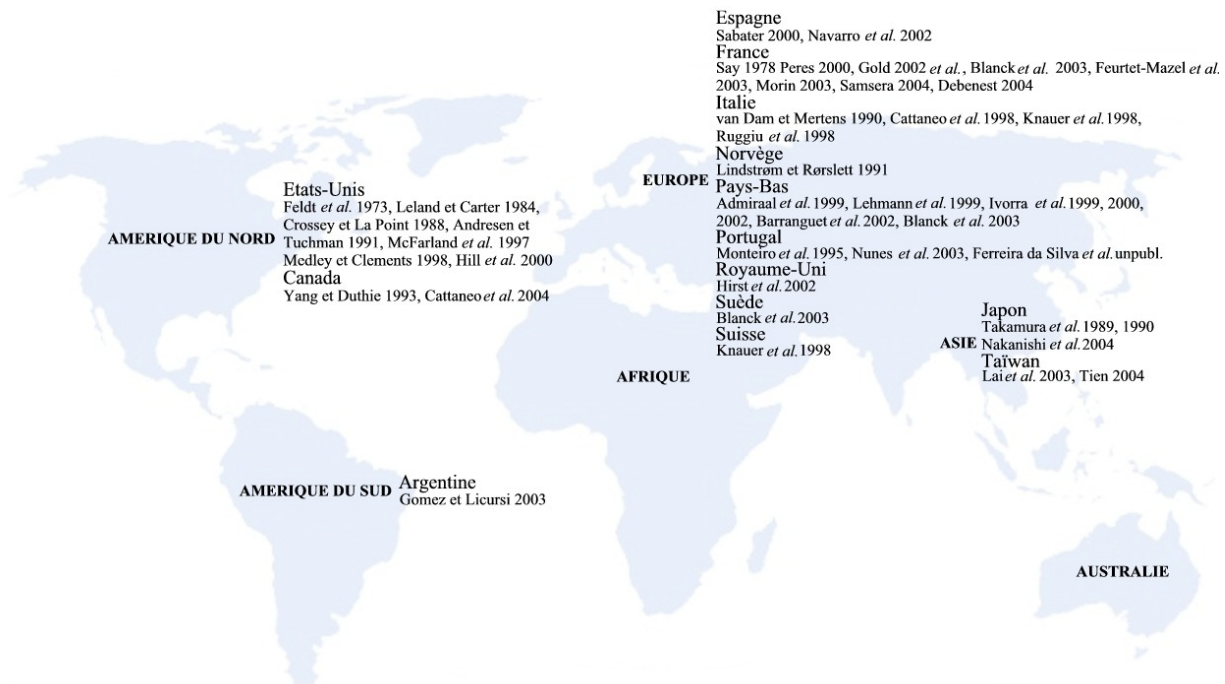


Figure 8 : Localisation des principales études *in situ* des effets des pollutions métalliques sur les communautés de diatomées d'eau douce.

L'étude des effets suspectés au niveau phénotypique est actuellement insuffisante et ces manifestations individuelles (susceptibles de fournir de nouveaux éléments d'information sur le niveau de pollution des cours d'eau étudiés) ne sont pas encore prises en compte pour la caractérisation de la qualité des eaux. Ainsi, si les aspects écotoxicologiques de la pollution métallique (et notamment cadmium / zinc) sur la structure des communautés ont été étudiés (Tableau 1), il n'existe actuellement pas de développements méthodologiques permettant une meilleure prise en compte des pollutions à toxiques (dont les métaux) par des techniques et des outils de bio-indication. De plus, la connaissance des profils de sensibilité, d'indifférence ou de tolérance aux métaux des espèces les plus communes reste limitée (Annexe A) et le statut de certaines espèces (citons notamment : *Achnantheidium minutissimum*, *Diatoma vulgare*, *Fragilaria capucina*, *Fragilaria ulna*, *Melosira varians*, ou *Nitzschia linearis*) est toujours discuté.

Tableau 1 : Récapitulatif des principales études en laboratoire d'évaluation des effets des pollutions métalliques sur les communautés de diatomées d'eau douce.

En microcosmes	En mésocosmes et canaux artificiels
Conway (1978)	Genter <i>et al.</i> (1987)
Conway et Williams (1979)	Colwell <i>et al.</i> (1989)
Fisher <i>et al.</i> (1981)	Genter et Amyot (1994)
Gensemer (1990)	Genter (1995)
Guanzon <i>et al.</i> (1994)	Shehata <i>et al.</i> (1999)
Guanzon <i>et al.</i> (1995)	Genter et Lehman (2000)
Gustavson et Wangberg (1995)	Soldo et Behra (2000)
Peres <i>et al.</i> (1995)	Gold <i>et al.</i> (2003a, 2003b)
Peres <i>et al.</i> (1996)	Lawrence <i>et al.</i> (2004)
Peres <i>et al.</i> (1997)	
Pistocchi <i>et al.</i> (1997)	
Pistocchi <i>et al.</i> (2000)	
Paulsson <i>et al.</i> (2000)	
Campbell <i>et al.</i> (2002)	
Interlandi (2002)	
Ivorra <i>et al.</i> (2002a)	
Rijstenbil et Gerringa (2002)	
Tien <i>et al.</i> (2005)	

Les diatomées représentent incontestablement d'excellents bio-indicateurs de la qualité des eaux, largement utilisées en routine pour la biosurveillance des milieux aquatiques. L'amélioration de ces méthodes nécessite le développement d'études visant à caractériser plus finement la biologie des diatomées ainsi que leur comportement en conditions notamment de stress toxique. En effet, les exigences actuelles en matière d'évaluation de la qualité des écosystèmes aquatiques (notamment dans le cadre de l'application de la Directive 2000/60/CE) imposent une meilleure définition des relations entre contamination toxique et structure des communautés diatomiques.

Ces travaux de thèse visent à améliorer la prise en compte des effets des pollutions métalliques sur le compartiment diatomées, afin d'améliorer la pertinence et la précision de cet indicateur biologique. La revue bibliographique des réponses identifiées du périphyton soumis à une contamination métallique permet la description des impacts actuellement décrits ou suspectés, ainsi que l'identification de pistes d'investigation susceptibles de se révéler intéressantes pour nos expérimentations.

## ***B – REPONSES DES DIATOMEES PERIPHYTIQUES A LA POLLUTION METALLIQUE.***

Les métaux sont naturellement présents dans les systèmes aquatiques à des concentrations généralement faibles. Cependant, les émissions anthropiques associées aux activités urbaines et industrielles contribuent à accroître la teneur en métaux dans les écosystèmes d'eau douce, très vulnérables car les composés métalliques de la phase particulaire peuvent s'accumuler dans le sédiment et être libérés dans l'eau interstitielle, accroissant ainsi la concentration en métaux solubles ou en suspension.

### **1- Mécanismes d'accumulation des métaux.**

#### ***1.1 – Influence de la teneur en métaux sur la réponse physiologique des organismes.***

Certains métaux sont essentiels au développement des êtres vivants, leur absorption en petite quantité est indispensable au métabolisme cellulaire (De Filippis et Pallaghy 1994) ; c'est le cas notamment du zinc, du cuivre ou du fer. D'autres, en revanche, ne sont pas nécessaires (cadmium, plomb, mercure, arsenic) et leur toxicité est reconnue, même à de très faibles concentrations (Figure 9). Ils semblent intervenir dans les voies métaboliques d'ions métalliques essentiels de structure chimique apparentée, perturbant ainsi le fonctionnement cellulaire de transport et de régulation de ces éléments. Les métaux essentiels influencent également le développement algal : une carence ou un excès en ces oligo-éléments indispensables au fonctionnement cellulaire sont susceptibles d'engendrer un stress physiologique chez les organismes. Inversement, les métaux non-essentiels peuvent, dans certaines conditions, favoriser la survie d'une espèce : Lee *et al.* (1995), et plus récemment Lane et Morel (2000) ont prouvé que, dans des conditions limitantes en zinc, la présence de cadmium augmente la croissance de la diatomée marine *Thalassiosira weissflogii*.

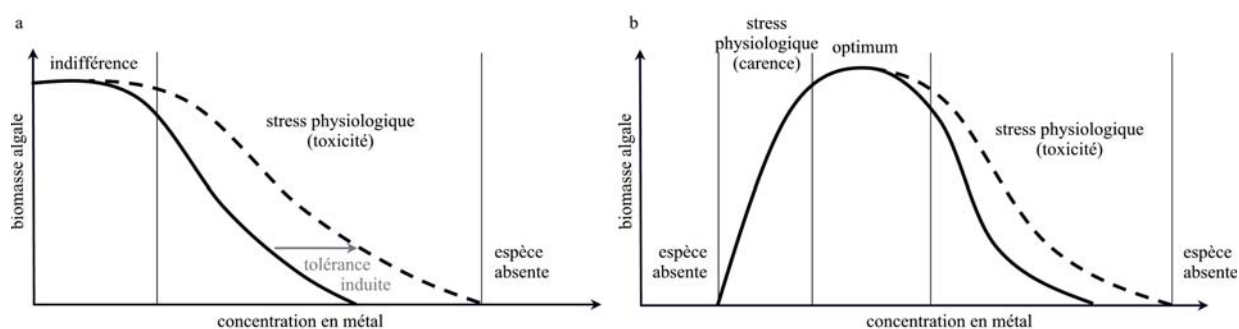


Figure 9 : Réponse des algues à une augmentation de la concentration métallique dans le milieu (a : métaux non essentiels, b : métaux essentiels) (d'après Simkiss et Taylor 1989).

Les potentialités de bio-accumulation des métaux toxiques par de nombreuses espèces aquatiques, et notamment par le périphyton, sont désormais reconnues (Hill *et al.* 2000b). Les travaux de caractérisation de leurs effets sur les diatomées (manifestations de toxicité et développement de stratégies de tolérance) couvrent les différents niveaux d'intégration biologique, de la base moléculaire (mécanismes cellulaires) à l'échelle des communautés (structure et fonction).

### 1.2 – Modèles biologiques d'internalisation des métaux.

Les espèces phytoplanctoniques, qui présentent une importante surface de contact avec leur milieu, sont susceptibles d'accumuler une quantité considérable de métaux (Admiraal *et al.* 1999a). La biodisponibilité de ces métaux, fortement dépendante de leur spéciation chimique dans la colonne d'eau (Lage *et al.* 1996, Gueguen *et al.* 2004), a été décrite au travers du Biotic Ligand Model (Di Toro *et al.* 2001, Heijerick *et al.* 2002), dérivé du Free Ion Model (Morel 1983). Les approches mathématiques visant à modéliser le transfert des espèces métalliques hydrophiles vers l'intérieur de la cellule montrent qu'il dépend vraisemblablement de deux mécanismes principaux (Campbell *et al.* 2002) (Figure 10) : une diffusion passive (sous contrôle thermodynamique) au travers de la membrane plasmique combinée à un transport actif occasionnel des métaux, liés à de la matière organique de faible poids moléculaire (Hudson 2005). Ce dernier processus implique une phase de fixation préalable des espèces métalliques à la surface de la cellule, généralement rapide (Wang et Dei 2001), suivie de la formation d'un complexe de surface noté M-X-cell selon l'équation suivante :



Où  $M^{Z+}$  : métal en solution et X-cell : ligand de la membrane phospholipidique.

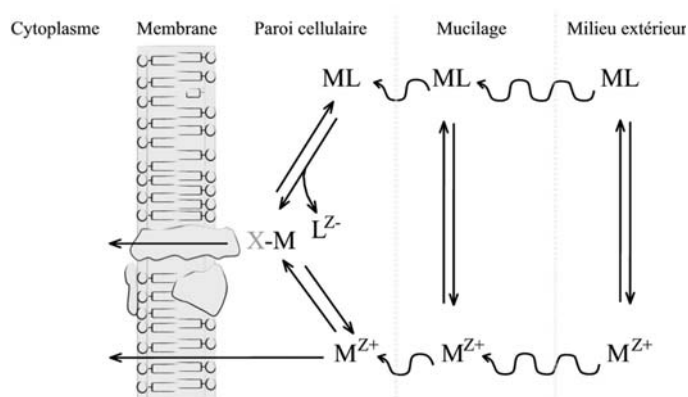


Figure 10 : Mécanismes de transport des métaux (d'après Campbell *et al.* 2002). Avec  $L^{Z-}$  : ligand extracellulaire, ML : métal particulaire, X : ligand membranaire.

Cette phase d'interaction de surface est généralement suivie d'une phase plus lente de passage transmembranaire dite d'internalisation de ces complexes (Perrein-Ettajani *et al.* 1999), qui fait intervenir des transporteurs de type pompes ou canaux ioniques. A l'intérieur de la cellule, les métaux n'apparaissent quasiment jamais à l'état d'ions libres ; ils sont adsorbés, transportés et mis en réserve dans le cytoplasme sous forme de complexes métalloprotéiques.

La contamination expérimentale de cultures de *Asterionella formosa* et *Aulacoseira varians* a permis de mettre en évidence une relation directe entre la concentration en métaux dans le milieu et la cinétique d'accumulation par ces diatomées (Tien *et al.* 2005), suivant le modèle d'adsorption de Freundlich :

$$x/m = K_f \cdot C^{1/n}$$

Où  $x/m$  : concentration en métal sorbé,  $K_f$  : constante de Freundlich,  $C$  : concentration en métal dans l'eau et  $1/n$  : constante d'intensité d'adsorption.

Cependant, au-delà de concentrations limites, on décrit une saturation des sites de liaison, réduisant la capacité d'absorption par les cellules (Rijstenbil et Gerringa 2002).

Le courant et l'intensité lumineuse d'une part conditionnent la sorption des métaux par le biofilm (Hill *et al.* 2000c), d'autre part la chimie du milieu (notamment le pH, les concentrations en cations  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ...) détermine le potentiel de fixation du ligand membranaire, et par conséquent la capacité de la cellule à internaliser le métal (Heijerick *et al.* 2002). Les travaux de Guanzon *et al.* (1995) ont également mis en évidence une compétition entre les différents métaux qui peuvent coexister dans le milieu pour les sites de fixation membranaires. Dans leurs expérimentations, la diatomée *Aulacoseira granulata* exposée à des mélanges binaires ou ternaires de cuivre, zinc et cadmium absorbe et accumule des quantités de métaux réduites par rapport à une exposition à chaque métal en "produit pur".

La présence de métaux dans le milieu peut affecter les protéines de transport au travers de la membrane : les études de Sunda et Huntsman (2000) décrivent un transport de cadmium au travers des canaux à manganèse chez *Thalassiosira oceanica*, ainsi qu'un système de co-transport cadmium / cobalt. Les systèmes enzymatiques contrôlant les fonctions biochimiques et physiologiques de l'algue sont également touchés ; des mécanismes de défense sont par ailleurs développés aux niveaux cellulaire et communautaire en réponse à leur action toxique.



## 2- Mécanismes de toxicité.

### 2.1 – Dérèglements du métabolisme cellulaire.

De nombreux travaux ont décrit les mécanismes de toxicité des métaux sur les diatomées, qui mettent en évidence des effets sur la multiplication, la photosynthèse, la respiration, l'assimilation de nutriments et la synthèse de molécules (Figure 11).

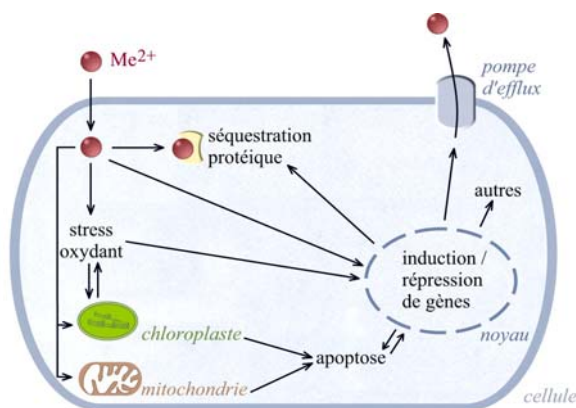


Figure 11. Déterminants intracellulaires de la toxicité métallique.

### *Des perturbations liées au transport des métaux vers l'intérieur de la cellule.*

L'exposition aux métaux peut entraîner des modifications biochimiques de la paroi cellulaire et de la membrane plasmique, susceptibles d'affecter ensuite la viabilité des cellules (Wong 1987, Guanzon *et al.* 1994). La plupart des métaux lourds peuvent se substituer aux ions métalliques en s'associant aux acides galacturoniques, diminuant ainsi leur affinité pour les éléments essentiels (Ernst *et al.* 1992) : chez *Thalassiosira pseudonana*, la liaison du métal aux composés membranaires provoquerait une compétition pour l'adsorption d'éléments nécessaires à la multiplication cellulaire tels que le fer ou le zinc (Morel *et al.* 1991). Des altérations de la perméabilité membranaire ont par ailleurs été décrites : De La Rocha *et al.* (2000) ont ainsi observé une réduction de l'adsorption de l'acide silicique par *Thalassiosira weissflogii* en présence de zinc et de fer. Conway (1978) a également constaté que la présence de cadmium perturbait le système des perméases impliquées dans le transfert du phosphate et de la silice à l'intérieur de la cellule, chez *Asterionella formosa*. Enfin, l'exposition aux métaux peut engendrer une dépolarisation de la membrane susceptible d'affecter les échanges transmembranaires (Conner et Schmid 2003, Pinto *et al.* 2003).

### *Des dommages intracellulaires provoqués par les métaux.*

Les métaux séquestrés dans le cytosol endommagent les cellules, ce qui implique souvent une hausse de la mortalité (Torres *et al.* 1998a). En effet, l'intoxication par un métal lourd induit

une production de radicaux libres de l'oxygène (ROS, Reactive Oxygen Species) (Cardozo *et al.* 2002). Le choc oxydant crée ainsi une perte d'homéostasie conduisant à des altérations de la structure cellulaire, notamment à des atteintes mitochondriales (décollement des membranes, désorganisation des crêtes) (Pinto *et al.* 2003), et à l'altération de l'expression des gènes (due aux effets génotoxiques des métaux) (Codina *et al.* 2000). Leur toxicité se manifeste également par une inhibition de la croissance résultant de perturbations de la division cellulaire causées par la diminution de la concentration intracellulaire en thiols induite par les métaux (Gerringa *et al.* 1995, Perrein-Ettajani *et al.* 1999). Dans ces conditions, la reproduction asexuée est le mode de multiplication privilégié, elle conduit à une sélection des individus les plus petits (Cattaneo *et al.* 1998, Joux-Arab *et al.* 2000). Des interférences avec le métabolisme de la silice (De La Rocha *et al.* 2000) semblent responsables de l'apparition de frustules déformés de diatomées (Figure 12), rapportée dans plusieurs cours d'eau contaminés par les métaux (Dickman 1998, Ruggiu *et al.* 1998, Torres *et al.* 2000). Les travaux récents de Grachev *et al.* (2005) émettent par ailleurs l'hypothèse que le zinc serait susceptible de jouer un rôle dans la régulation du transport de l'acide silicique (nécessaire à la formation du frustule) vers l'intérieur de la cellule. Les déformations observées se manifestent soit par des anomalies morphologiques globales du frustule, soit par des altérations des ornementsations des valves ; et, bien qu'aucun référentiel basé sur des manifestations tératologiques causées par une exposition aux pollutions métalliques n'ait encore été produit, la possibilité d'utiliser la morphologie de ces cellules anormales comme indicateurs de la pollution métallique a déjà été envisagée (Dickman 1998, Stevenson et Bahls 1999).

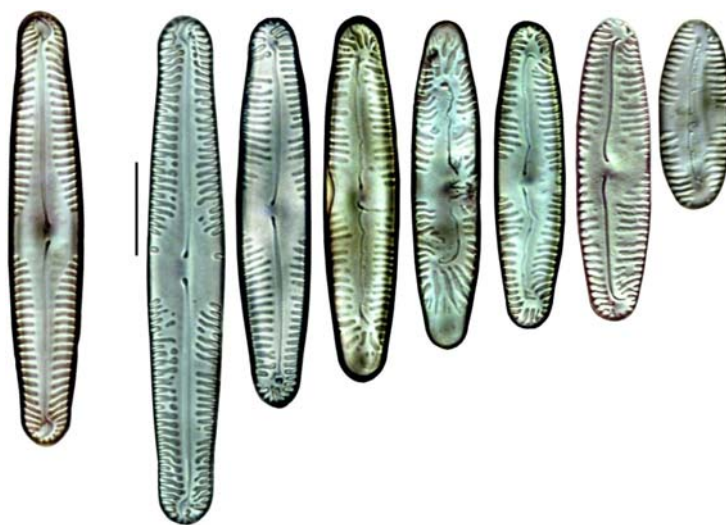


Figure 12 : Frustules déformés de *Pinnularia parvulissima*, observés en milieux contaminés par les métaux (photographies : Michel Coste).

Notons par ailleurs l'importance des paramètres physico-chimiques du milieu (température, pH, teneurs en nutriments, dureté, etc.) (Genter 1995, Rijstenbil *et al.* 1998, Interlandi 2002) et des facteurs biologiques (formes de croissance, stratégies de colonisation des espèces) (Gold 2002, Ivorra *et al.* 2002b) dans la biodisponibilité et l'expression de la toxicité des métaux sur les diatomées.

Aux impacts des pollutions métalliques au niveau cellulaire s'ajoutent les effets sur les populations et les communautés diatomiques qui tiennent compte des interactions interspécifiques (non prises en compte par les études sur cultures monospécifiques) et de l'agencement des cellules dans le biofilm (déterminant le degré d'exposition des espèces aux toxiques et, par conséquent, leurs réponses).

## ***2.2 – Perturbations de la production primaire des populations.***

Les populations de diatomées sont susceptibles d'accumuler des quantités importantes de métaux (Guanzon *et al.* 1995, Sunda et Huntsman 1998, Chang et Reinfelder 2000, Wang et Dei 2001), et d'autant plus que la biomasse algale est importante (Hill *et al.* 2000c). La production primaire des populations (croissance algale, activité photosynthétique) est affectée par l'exposition à ces toxiques.

***La croissance globale des populations peut être retardée, voire inhibée*** (dans le cas de niveaux de contamination élevés) (Berland *et al.* 1977, Conway 1978, Conway et Williams 1979, Wong 1987, Guanzon *et al.* 1994, Payne et Price 1999, Gold *et al.* 2003b). En effet, le métabolisme des populations est affecté (Husaini et Rai 1991) : des modifications de l'ultrastructure cellulaire (réticulum endoplasmique, mitochondrie) ont été décrites comme dépendantes de la concentration intracellulaire en cadmium (Wong 1987). Nalewajko (1995) observe chez *Chaetoceros* sp. une perturbation du renouvellement des phospholipides constitutifs de la membrane cellulaire sous l'effet du cadmium : l'augmentation des prélèvements concomitants de phosphates et de métal traduit une incorporation du cadmium dans les corps polyphosphates, imposant un turn-over plus important des phosphates pour assurer la détoxification. Au-dessus d'une concentration critique en zinc intracellulaire, les perturbations du métabolisme du phosphore dérèglent la division cellulaire et le rendement cellulaire (Guanzon *et al.* 1994).

***Des altérations de l'activité photosynthétique*** ont par ailleurs été reportées (Takamura *et al.* 1989, Takamura *et al.* 1990, Hill *et al.* 2000c, Soldo et Behra 2000), attribuables à des

dérèglements de l'activité enzymatique de la cellule (Husaini et Rai 1991, Paulsson *et al.* 2000) et à des perturbations du fonctionnement des photosystèmes. Chez *Chlorella pyrenoidosa*, l'accumulation intracellulaire de métaux est corrélée à une inhibition de la fixation du CO<sub>2</sub> et de la production de O<sub>2</sub> (Hart et Scaifes 1977) ; une inhibition du transport d'électrons dans les photosystèmes apparaît chez *Aulacoseira granulata* lors d'expositions à long terme à des concentrations élevées en cuivre, en zinc ou en cadmium (Guanzon *et al.* 1994). Les travaux de Bertrand *et al.* (2001) suggèrent également que la perturbation par le cadmium du cycle des xanthophylles (par une inhibition de l'époxydation de la diatoxanthine en diadinoxanthine) participerait à une inhibition de la photosynthèse chez *Phaeodactylum tricornutum*.

On observe ainsi au sein de la population une sélection des individus qui supportent ces modifications de leurs fonctions vitales, avantageant les organismes de petite taille (Joux-Arab *et al.* 2000). A ces modifications des taux de survie s'ajoutent une chute des taux de reproduction (Rott 1991, Peres 1996), des perturbations de la division cellulaire (Perrein-Ettajani *et al.* 1999) et des modifications des stratégies de migration (Peterson 1996), provoquant ainsi une diminution de la densité des diatomées, ce qui conduit à une forte réduction de la biomasse algale (Paulsson *et al.* 2000).

### ***2.3 – Modifications de la structure et de l'architecture des communautés.***

L'exposition aux métaux modifie à court terme la structure des assemblages et déprécie la densité totale de diatomées. On observe sur les communautés exposées aux métaux dès leur phase initiale de développement une diminution de la richesse spécifique et de la diversité des communautés, que cela soit en laboratoire (Gold *et al.* 2003b) ou en conditions non contrôlées (échantillonnage soit sur substrats naturels du lit des cours d'eau (Medley et Clements 1998, Niyogi *et al.* 2002), soit sur substrats artificiels introduits dans les rivières).

Suite à une exposition prolongée aux contaminants métalliques, on observe des perturbations quantitatives et qualitatives du développement des communautés diatomiques (Hill *et al.* 2000b, Sabater 2000) *in situ* comme en laboratoire, similaires aux tendances observées à court terme. La littérature rapporte l'existence de niveaux de tolérance aux métaux variables selon les espèces (Paulsson *et al.* 2000, Gold *et al.* 2002), impliquant une modification de la structure spatiale des communautés. Les études de terrain et de laboratoire confirment à long terme les modifications dans l'architecture en trois dimensions des communautés périphtiques pressenties lors des études de toxicité menées sur de plus courtes périodes (Figure 13) (Gold

2002). Les stratégies de colonisation des différentes espèces sont en effet conditionnées par le niveau de pollution métallique (Stevenson *et al.* 1991) : les communautés qui se développent sont dominées, même sur le long terme, par des espèces pionnières, adhérentes et étroitement rattachées au substrat, qui seraient plus tolérantes aux pollutions métalliques (Medley et Clements 1998). C'est ainsi que la diatomée cosmopolite *Achnantheidium minutissimum*, fréquemment dominante dans les cours d'eau soumis à des épisodes de contamination toxique, est occasionnellement utilisée comme indicateur de pollution métallique (Takamura *et al.* 1990, Stevenson et Bahls 1999). Les espèces qui colonisent plus tardivement les milieux (*Diatoma vulgare*, *Melosira varians* ou *Nitzschia dissipata*), à long pédoncule ou filamenteuses, voire libres, régressent en abondance relative. Or ce sont en conditions non polluées les espèces constitutives des couches externes du biofilm ; on aboutit par conséquent à une réduction de l'épaisseur du biofilm sur les substrats en conditions de stress métallique (Ivorra 2000).

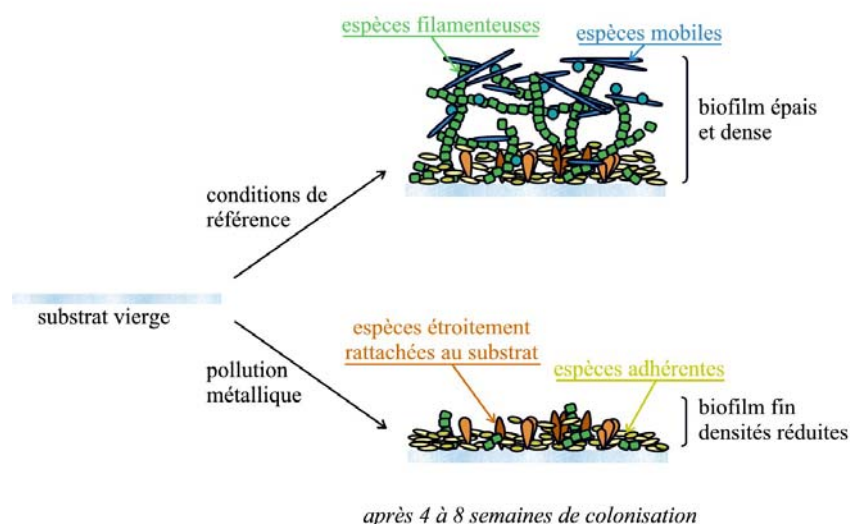


Figure 13 : Représentation schématique des effets de la contamination par les métaux sur l'architecture des communautés diatomiques se développant sur les substrats artificiels vierges en conditions expérimentales contrôlées (d'après Gold 2002).

Les communautés soumises à des contaminations métalliques présentent une capacité variable à tolérer ces conditions de stress. Tolérance et résistance sont développées au niveau individuel (avec des différences de sensibilité entre espèces : Conway et Williams 1979, Wong 1987), mais également à l'échelle de la communauté entière et au niveau du biofilm, qui se comporte comme un ensemble cohérent et protecteur.

### 3- Mécanismes de tolérance.

#### 3.1 – Réduction de la toxicité au niveau cellulaire.

Les algues présentent des mécanismes constitutifs (c'est-à-dire présents dans la plupart des phénotypes) et adaptatifs (existant seulement dans les phénotypes tolérants) leur permettant de faire face à des concentrations élevées en métaux (Meharg 1994). Ces mécanismes de défense et de détoxification ont pour fonction principale de limiter les perturbations de l'homéostasie de la cellule consécutives à une exposition aux métaux.

Quatre grandes catégories de mécanismes de régulation des flux sont déployés par les diatomées en conditions de stress métallique :

**Des mécanismes de limitation des entrées de métaux**, notamment par la diminution de la concentration en ions libres, donc biodisponibles pour l'organisme. Certains métaux peuvent être fixés aux hydroxydes de fer ou de manganèse recouvrant la membrane cellulaire (Perrein-Ettajani *et al.* 1999). De plus, les algues sont capables de produire des exsudats susceptibles de complexer les métaux hors de la cellule (Vasconcelos et Leal 2001). On observe aussi une réduction de la taille cellulaire, limitant la surface exposée et par conséquent les prélèvements métalliques par la cellule (Khoshmanesh *et al.* 1997). Des mécanismes de régulation de l'influx métallique ont également été décrits : les altérations de la membrane cellulaire lors de l'internalisation des ions conduisent à une diminution de la perméabilité membranaire (De Filippis et Pallaghy 1994, Gaur et Rai 2001). Des modifications au niveau de la paroi sont également susceptibles de limiter les entrées de métaux : Twiss et Nalewajko (1992) émettent l'hypothèse que l'épaississement de la paroi cellulaire observé chez *Scenedesmus* en conditions limitantes en phosphore pourrait contribuer à entraver l'entrée des métaux dans la cellule.

**Le développement de modes de stockage sous forme insoluble dans le cytosol**, permettant de maintenir une concentration intracellulaire en métaux optimale pour la croissance et le métabolisme des diatomées. L'exposition aux métaux active les précurseurs de la phytochélatine-synthase (Tsuji *et al.* 2003) et induit la synthèse de polypeptides intracellulaires riches en cystéine : les phytochélatines (Ahner et Morel 1995, Morelli et Pratesi 1997, Pistocchi *et al.* 2000, Pawlik-Skowronska 2001, Ahner *et al.* 2002). Ces polymères jouent un rôle essentiel dans le processus de détoxification cellulaire (Hirata *et al.* 2001) : ils piègent sous une forme moins toxique les métaux avec lesquels ils forment des complexes stables (Gonzalezdavila 1995, Scarano et Morelli 2002). Nassiri *et al.* (1997) décrivent également un phénomène de vacuolisation (Figure 14) permettant de réduire la concentration intracytoplasmique en métaux et par conséquent leur toxicité.

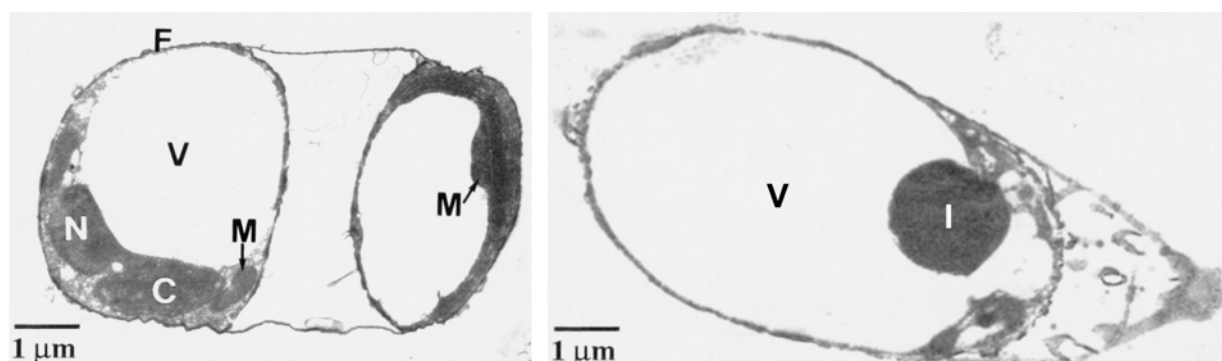


Figure 14 : Section longitudinale d'une cellule de *Skeletonema costatum* non contaminée à gauche (C : chloroplaste, F : frustule, M : mitochondrie, N : noyau, V : vacuole), et présentant une inclusion de cadmium (I) dans la vacuole à droite (in Nassiri *et al.* 1997).

Le degré de tolérance est variable suivant les espèces exposées (Rijstenbil *et al.* 1994a) et les métaux impliqués : selon leurs caractéristiques (de valence notamment), les capacités de séquestration du complexe métallo-protéique sont plus ou moins importantes (Guanzon *et al.* 1995, Scarano et Morelli 2002). A ces modes de stockage non exclusifs s'ajoutent vraisemblablement des formes de tolérances plus spécifiques de certains métaux : Pokrovsky *et al.* (2005) ont montré la liaison particulière entre thiols et zinc intracellulaire chez *Skeletonoma costatum*.

#### **Des mécanismes de neutralisation du stress oxydant.**

La défense des cellules contre le stress oxydant provoqué par les entrées de métaux est assurée par deux mécanismes principaux. La production accrue de proline (Wu *et al.* 1995, Wu *et al.* 1998) et de thiols de faible poids moléculaire (notamment le glutathion) (Rijstenbil *et al.* 1994b, Ahner *et al.* 2002, Rijstenbil et Gerringa 2002) joue un rôle antioxydant et détoxifiant essentiel. L'exposition des cellules aux métaux induit également l'activation d'enzymes de type superoxyde-dismutase (Rijstenbil *et al.* 1994b, Pinto *et al.* 2003) qui favorise une réaction de liaison des radicaux libres avec des ions hydrogène et aboutit à la production d'oxygène moléculaire neutre et moins toxique.

**Des mécanismes d'expulsion active des métaux hors de la cellule** se mettent par ailleurs en place et contribuent à favoriser la tolérance aux polluants (Teitzel et Parsek 2003). L'altération du métabolisme cellulaire qu'ils causent induit une production accrue de polysaccharides qui, après liaison avec les métaux, peuvent être exportés dans l'environnement extracellulaire (Pistocchi *et al.* 1997). Ainsi, Lee *et al.* (1996) ont décrit un efflux de complexes phytochélatine / cadmium chez *Thalassiosira weissflogii*, en présence de fortes concentrations en cadmium. L'expulsion active des ions métalliques par des pompes ATPasiques décrite chez les bactéries peuvent également jouer un rôle dans la détoxification et la survie du phytoplant (Rosen 1996).

### 3.2 – Développement à long terme de mécanismes de tolérance à l'échelle communautaire.

On observe également une tolérance induite de la communauté envers les contaminants auxquels elle est exposée. L'outil écotoxicologique PICT (Pollution-Induced Community Tolerance) de Blanck *et al.* (1988) et les tests photosynthétiques (Soldo et Behra 2000) permettent de décrire la sensibilité d'une communauté à un toxique (Figure 15). Le concept PICT permet de mesurer la toxicité d'un contaminant à l'échelle d'une communauté. Il est basé sur le principe d'une baisse de la survie des espèces les plus sensibles, ce qui conduit à une tolérance accrue de la communauté. La mise en œuvre de cet indicateur a permis de mettre en évidence, au sein des assemblages diatomiques, des modifications de composition consécutives à une exposition aux métaux (Paulsson *et al.* 2000). Dans ces conditions, les espèces les plus tolérantes se développent progressivement au détriment des plus sensibles (Gustavson et Wangberg 1995, Berard *et al.* 1998) et l'on peut observer une chute de la diversité spécifique (Ivorra *et al.* 2002a). L'exposition aux métaux peut provoquer dans certaines populations des mutations spontanées rares : ce phénomène peut suffire au remplacement des individus par des organismes au génotype plus résistant, assurant ainsi la survie des populations algales en milieu contaminé (Baos *et al.* 2003). Ces adaptations individuelles et collectives favorisent la réponse de tolérance globale des communautés constatée par de nombreux auteurs.

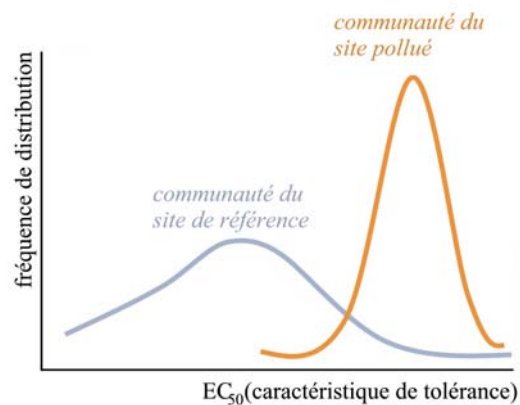


Figure 15 : Principe du concept PICT, profils de tolérance des communautés échantillonnées sur sites de référence et pollué (d'après Boivin *et al.* 2001).

L'étude de courbes photosynthèse / irradiance couplée avec des tests de toxicité permet également de mettre en évidence une relation de causalité entre toxicité du contaminant et photo-adaptation des communautés (Guasch et Sabater 1998, Soldo et Behra 2000).



### 3.3 – Rôle de la matrice organique dans la protection des cellules.

Les composés polymériques excrétés par les cellules (Extracellular Polymeric Substances, EPS) confèrent une fonction reconnue dans la cohésion globale du biofilm et dans la défense contre les agressions mécaniques (Figure 16). Ainsi, ces substances mucilagineuses préservent les cellules de la dessiccation (Hoagland *et al.* 1993). Ghosh et Gaur (1998) ont également mis en évidence une action protectrice de la matrice organique mature contre l'effet érosif du courant. Le biofilm, enchâssé dans ces sécrétions polysaccharidiques, développe son propre métabolisme interne. Les polymères du biofilm adsorbent, fixent et concentrent les molécules organiques et les ions à proximité des cellules, ainsi en mesure de subvenir en partie à leurs besoins trophiques (Decho 2000). Ivorra *et al.* (2000) ont également mis en évidence un recyclage des gaz et des nutriments au sein de la matrice organique, et la modification des échanges du biofilm avec le milieu environnant (également décrite par Barranguet *et al.* 2002, Barranguet *et al.* 2003).

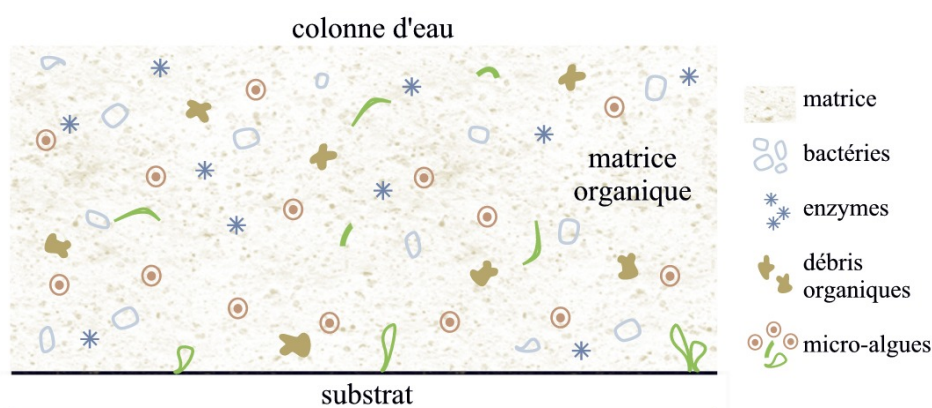


Figure 16 : Coupe schématique d'un biofilm périphytique (épaisseur : 1-2000 $\mu$ m).

La matrice organique joue un rôle considérable dans la résistance aux pollutions toxiques. Son effet protecteur est nettement corrélé à la disponibilité en nutriments (Guasch *et al.* 2004) ainsi qu'à l'importance de la biomasse algale (Guasch *et al.* 2003). Le stress métallique, estimé au travers des perturbations structurales subies, se révèle ainsi moins important au niveau des biofilms épais (Hill *et al.* 2000c) ; les communautés matures sont également moins affectées que celles exposées à un stade de développement précoce (Ivorra *et al.* 2000).

La fonction protectrice de la matrice est attribuable en partie à des conditions locales de pH et d'anoxie dans les couches internes des biofilms épais (Revsbech *et al.* 1988, Teissier et Torre 2002) ; les gradients de diffusion modifient les conditions d'oxydoréduction, et par conséquent

les potentiels d'accumulation dans les cellules. De plus, les exsudats polysaccharidiques possèdent des propriétés de chélation des métaux lourds permettant le piégeage des ions métalliques (notamment  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$  et  $\text{Pb}^{2+}$ ) par des ligands de complexation associés aux polymères (Pistocchi *et al.* 1997, Decho 2000). Muller *et al.* (2005) ont également mis en évidence des interactions entre communautés algales et bactériennes, certaines espèces produisant dans le milieu des ligands susceptibles de complexer les métaux et de réduire ainsi leur biodisponibilité. L'existence de sites de fixation des métaux à la surface du biofilm permet en outre d'en réduire les effets délétères vis-à-vis des diatomées présentes dans les strates inférieures de la matrice organique (Gold *et al.* 2003b).

La littérature relative aux effets des pollutions métalliques sur les biofilms périphtiques souligne la diversité des impacts attribuables aux contaminants, à toutes les échelles d'observation. Du niveau individuel (modifications de la morphologie : tailles, déformations du frustule) à celui de la population (production primaire, activité photosynthétique) ou de la communauté (densités cellulaires, composition spécifique), diverses stratégies sont mises en œuvre face au stress métallique. C'est à partir de ce constat que des travaux d'investigations ont été initiés, axés sur la recherche de nouveaux descripteurs permettant de mieux prendre en compte les effets des métaux sur les communautés diatomiques *in situ* et en laboratoire, afin d'apporter des compléments aux méthodes indicielles actuelles.

Nos expérimentations de terrain et de laboratoire ont été réalisées au niveau d'un site expérimental localisé en amont de la rivière Lot, caractérisé par une forte contamination des eaux par le cadmium et le zinc. Les stations étudiées ainsi que les méthodes de prélèvement, de traitement des échantillons et d'analyse des données sont décrites dans le Chapitre 2.

## **CHAPITRE 2**

Bases méthodologiques

**A – DES CONDITIONS DE CONTAMINATION METALLIQUE EN MILIEU NATUREL : LE "SITE ATELIER" EN AMONT DE LA RIVIERE LOT.**

**1- Des pollutions métalliques diffuses affectant l'ensemble du continuum "Lot / Garonne / Estuaire de la Gironde".**

Dans le Sud-Ouest de la France, l'estuaire de la Gironde et ses affluents ont été relativement épargnés par l'industrie ; cependant, on y rencontre une pollution métallique résiduelle dont le cadmium et le zinc sont les principaux responsables. Cette pollution, d'origine industrielle, ne provient pas des rives de l'estuaire mais du bassin de Decazeville (Aveyron), et plus précisément d'un ancien site d'extraction de zinc (usine "Vieille Montagne") situé de part et d'autre du Riou-Viou, petit tributaire du Riou-Mort qui alimente le Lot.

**1.1 – Un transport important de polluants métalliques depuis le Lot amont jusqu'à l'estuaire de la Gironde.**

Le réseau hydrographique Lot / Garonne / Gironde est caractérisé par un nombre important de stations de mauvaise qualité (d'après le classement du SEQ-Eaux superficielles<sup>1</sup>), déclassées par les fortes teneurs en métaux dues à l'ancienne activité métallurgique du bassin industriel de Decazeville (Figure 17).

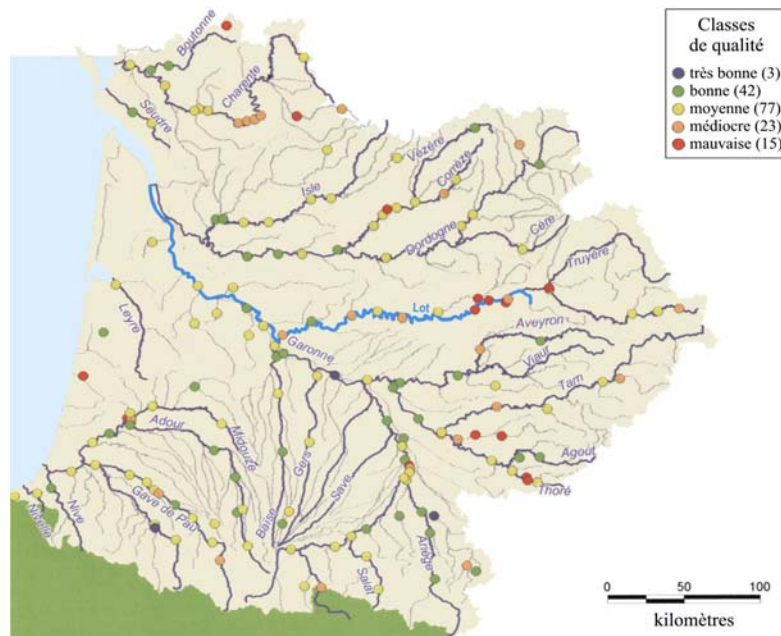


Figure 17 : Qualité des eaux du Bassin Adour-Garonne vis-à-vis de la contamination métallique (eau, bryophytes et sédiments confondus (Agence de l'Eau Adour-Garonne 2005).

<sup>1</sup> La circulaire du Ministère de l'Ecologie et du Développement Durable - Direction de l'Eau (2005) fixe les limites de qualité des eaux utilisées dans le cadre du Système d'Evaluation de la Qualité (SEQ) des eaux.

En effet, une grande partie du sous-sol du site de "Vieille Montagne" a été remblayée avec des déchets industriels produits par l'activité métallurgique à l'occasion des restructurations de la société. Ces déchets conjugués à ceux stockés en divers lieux (crassier Dunet, décharges de Montplaisir et des Cérons, Igue du Mas) enrichissent les eaux de lessivage de matières en suspension chargées en éléments traces métalliques (ETM). Elles contaminent le Riou-Mort et sont par la suite collectées par le Lot puis la Garonne, pour aboutir dans l'estuaire de la Gironde (Audry *et al.* 2004b) (Figure 18). Malgré une diminution importante des émissions en cadmium (Blanc *et al.* 1999, Audry *et al.* 2004a), Schäfer *et al.* (2002) ont déterminé que les apports du Riou-Mort représentaient encore 50% des flux de cadmium responsables de la pollution estuarienne. Les concentrations en cadmium dissous et particulaire à l'exutoire du bassin versant du Riou-Mort sont respectivement de 15-30µg/L et 350mg/kg, soit environ 1000 et 100 fois supérieures aux valeurs de la Garonne (Audry *et al.* 2004a). Les analyses réalisées par l'équipe TGM<sup>1</sup> y ont montré la très nette dominance du cadmium et du zinc par rapport aux autres métaux (cuivre, plomb, arsenic, mercure...).

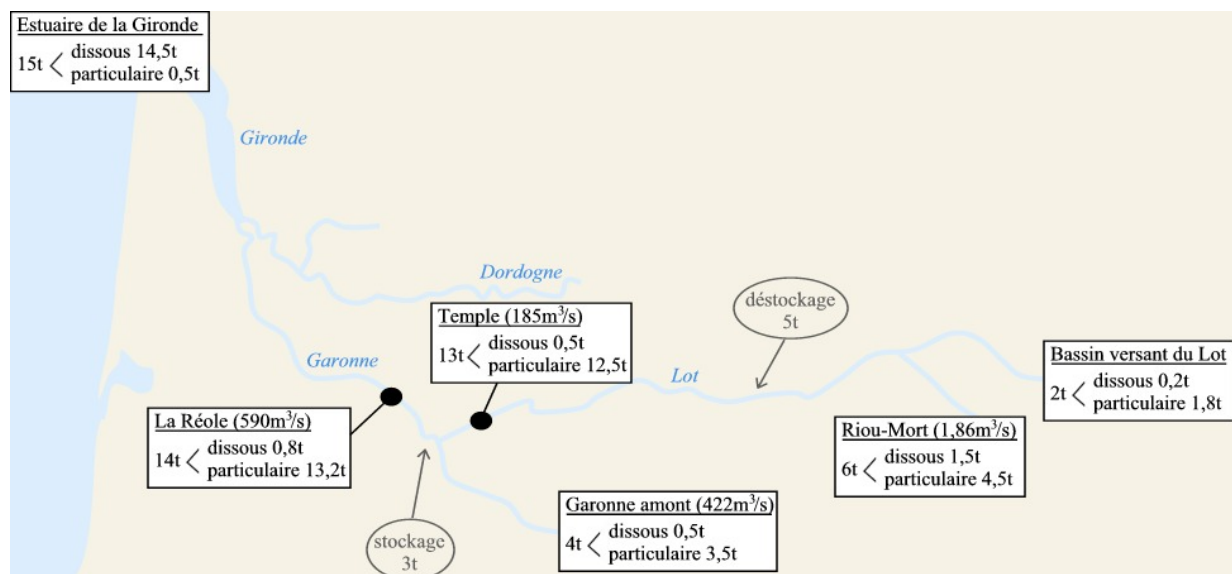


Figure 18 : Schéma du bilan des flux de cadmium dissous et particulaire dans le système Lot / Garonne / Gironde pour l'année 2000 (d'après Audry *et al.* 2004b).

Les métaux transportés le long du continuum sont susceptibles d'être mobilisés sous forme particulaire ou stockés dans le sédiment (notamment au niveau des retenues). Ils peuvent également être accumulés par les organismes vivant dans l'hydrosystème contaminé.

<sup>1</sup> TGM : équipe Traceurs Géochimiques et Minéralogiques, UMR EPOC 5805, Université de Bordeaux 1.

**1.2 – Biodisponibilité des métaux pour les organismes aquatiques le long du continuum "Lot / Garonne / Gironde".**

La pollution métallique de l'hydrosystème Lot / Garonne / Gironde affecte toute la chaîne écologique vivant dans le réseau hydrographique, du phytoplancton aux carnivores situés au sommet de la pyramide alimentaire, et menace l'économie estuarienne.

Les capacités d'accumulation des bryophytes vis-à-vis des métaux sont exploitées pour le suivi de la qualité des eaux superficielles par les Agences de l'Eau. Les concentrations en cadmium mesurées dans les bryophytes de la rivière Lot sont proportionnelles aux teneurs en métal dissous dans l'eau (Agence de l'Eau Adour-Garonne 1993, 1995, Rames 1995, Agence de l'Eau Adour-Garonne 1996) et traduisent le gradient de contamination le long du continuum.

Andres *et al.* (2000) ont également observé des phénomènes de bioaccumulation du cadmium dans les organes de plusieurs espèces de poissons (brème, chevesne, gardon) (Figure 19).

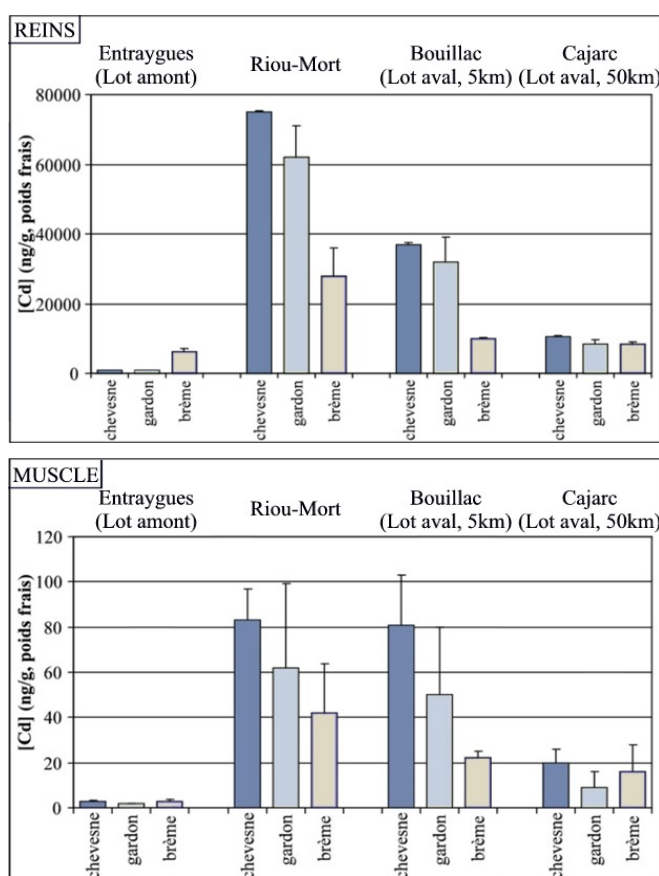


Figure 19 : Concentrations en cadmium (en ng/g de poids frais) dans les reins et les muscles de poissons collectés le long de la rivière Lot en 1995, 1996 et 1997 (Andres *et al.* 2000).

De plus, des études menées par le Réseau National d'Observation de la qualité de l'eau de l'Ifremer<sup>1</sup> (Figure 20) et par le LEESA (Baudrimont *et al.* 2003a, Baudrimont *et al.* 2003b, Baudrimont *et al.* 2005) sur les Lamellibranches ont mis en évidence une accumulation métallique dans le corps mou des bivalves de l'estuaire. On relève une contamination aiguë par le cadmium des huîtres sauvages de la Gironde (20 à 60 $\mu$ g/g de chair en 2004), nettement supérieure aux normes européennes de salubrité pour les mollusques (1 $\mu$ g/g de poids frais) (Règlement 466/2001/CE). L'estuaire de la Gironde est donc fermé depuis plusieurs années à la production, au ramassage et à la consommation d'huîtres, du fait d'un taux en cadmium supérieur au seuil réglementaire.

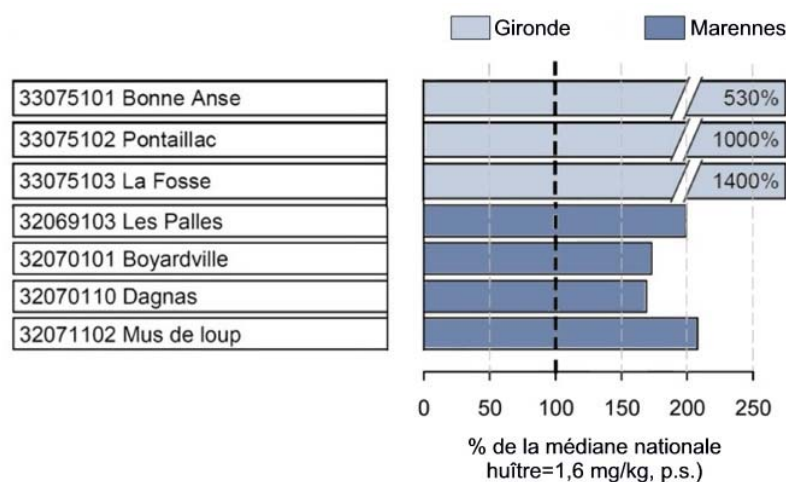


Figure 20 : Comparaison de la contamination au cadmium des huîtres creuses de la Gironde et de Marennes aux médianes nationales, pour les années 2002, 2003 et 2004 (IFREMER 2005b, a).

Les actions menées jusque récemment visaient à caractériser les apports polluants (et notamment métalliques) dans le réseau hydrographique et à décrire leurs effets sur les organismes (Andres *et al.* 1999, Baudrimont *et al.* 1999, Andres *et al.* 2000, Gold *et al.* 2002, 2003b). Les enjeux des recherches en cours sont une restauration des teneurs en métaux dans le continuum Lot / Garonne / Gironde / Marennes-Oléron à un niveau compatible avec la Directive Cadre sur l'Eau ("Défi Cadmium" de l'Agence de l'Eau Adour-Garonne). Ces études affichent également des objectifs de préservation des activités conchylicoles de Marennes-Oléron, de réhabilitation des sites du bassin de Decazeville et de développement touristique de la vallée du Lot (par des activités nautiques notamment).

<sup>1</sup> Ifremer : Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer.

## **2- Le "site atelier" en amont de la rivière Lot : une zone privilégiée pour l'étude des effets des contaminants métalliques.**

Le site expérimental "Lot amont", composante de la Zone Atelier Adour-Garonne<sup>1</sup>, comprend des stations localisées sur le Riou-Mort et le Riou-Viou, dans le bassin industriel de Decazeville à l'origine de la contamination polymétallique du Lot. Il a fait l'objet d'études géochimiques et écotoxicologiques (Say 1978, Lapaquellerie et Maillet 1993, Lapaquellerie *et al.* 1995, Andres *et al.* 1999, Baudrimont *et al.* 1999, Blanc *et al.* 1999, Andres *et al.* 2000, Gold *et al.* 2002, 2003b, Audry *et al.* 2004a) qui ont démontré sa pertinence en tant que modèle de gradient de pollution polymétallique.

Le GIS ECOBAG<sup>2</sup> a contribué à une majorité de ces études, et coordonne actuellement un nouveau programme pluridisciplinaire visant à caractériser les composantes géochimique et biologique (dont diatomées) de stations du "site atelier" choisies de façon à présenter un gradient de contamination polymétallique et / ou organique.

### ***2.1 – Un projet de recherche inscrit dans le contexte de pollution polymétallique du "site atelier".***

A partir de minerais tels que la blende (ZnS) ou la calamine ( $Zn_4[SiO_2](OH)_2 \cdot H_2O$ ) acheminés depuis diverses régions de France et outremer, l'usine de "Vieille Montagne" a extrait du zinc pendant plus d'un siècle, jusqu'en 1987. Or ces minerais contiennent non seulement du zinc, mais également du cadmium, du cuivre, du plomb, de l'argent et du soufre, que l'on retrouve dans les résidus d'extraction et de purification du zinc. Jusqu'à 1952, les résidus étaient stockés sans traitement préalable sur les terrils. Les procédés d'inertage des résidus ont été initiés par la suite : traitement par cubilot (combustion semi-réductrice) de 1952 à 1960, puis par voie humide (de 1973 à 1985). L'enregistrement sédimentaire historique réalisé par Audry (2003) sur des carottages dans la retenue de Cajarc (premier barrage en aval de la confluence du Lot avec le Riou-Viou) met en évidence un enrichissement du système hydrologique en éléments traces métalliques liés aux résidus de traitement, ainsi que l'impact des modifications des procédés de traitement des minerais de zinc sur le niveau de pollution polymétallique dans les eaux du Lot.

---

<sup>1</sup>La Zone Atelier Adour-Garonne a été labellisée par le CNRS/PEVS en 2002.

<sup>2</sup>GIS ECOBAG : Groupement d'Intérêt Scientifique "Environnement, Ecologie et Economie des Bassins de l'Adour et de la Garonne".





Figure 21 : Activités métallurgiques dans le bassin industriel de Decazeville (vue aérienne du site Umicore de Viviez ; photographie : Umicore).

C'est autour de la zone de rejets que se concentre l'étude pluridisciplinaire des mécanismes de contamination des hydrosystèmes continentaux coordonnée par le GIS ECOBAG dans le cadre du projet ECOTDYN<sup>1</sup> (programme national ACI-ECCO<sup>2</sup>). Ce projet a pour but d'analyser les processus géochimiques et écotoxicologiques liés à la contamination métallique, il repose sur une collaboration entre 11 équipes des laboratoires des universités de Bordeaux, Toulouse et Pau, du Cemagref et de l'INRA. La recherche s'articule autour de trois axes complémentaires : géochimie aquatique (spéciation chimique des métaux, flux et transferts de matières), biologie aquatique (bivalves, biofilms, poissons-zèbres, larves de xénope) et transferts sol-eau-plante dans les zones rivulaires (tabac, maïs, laitue, haricot vert). Les mécanismes de contamination du bassin versant du Riou-Mort et leurs conséquences sur la composante biologique sont étudiés *in situ*, au niveau du site expérimental "Lot amont". En parallèle sont développées des approches en laboratoire pour analyser certains mécanismes dans des conditions d'exposition parfaitement contrôlées, afin de renforcer les analyses interprétatives des résultats acquis sur le terrain. Dans ce contexte, les objectifs de cette thèse sont de caractériser l'hydroclimat des sites (physicochimie des eaux) et d'examiner les effets des contaminants métalliques sur les caractéristiques et la structure des communautés périphytiques.

<sup>1</sup>ECOTDYN : Ecotoxicologie et Ecodynamique des Contaminants.

<sup>2</sup>ACI-ECCO : Action Concertée Incitative "Ecosphère Continentale".

**2.2 – Le site expérimental "Lot amont" : caractérisation des stations d'étude le long du gradient de pollution métallique.**

Nos expériences de terrain ont été menées sur un "site-atelier" correspondant au bassin versant du Riou-Mort, le long de deux cours d'eau : le Riou-Mort et son affluent le Riou-Viou. Cinq stations ont été sélectionnées en fonction de leur accessibilité de manière à présenter un gradient de contamination organique et métallique (Figure 22).

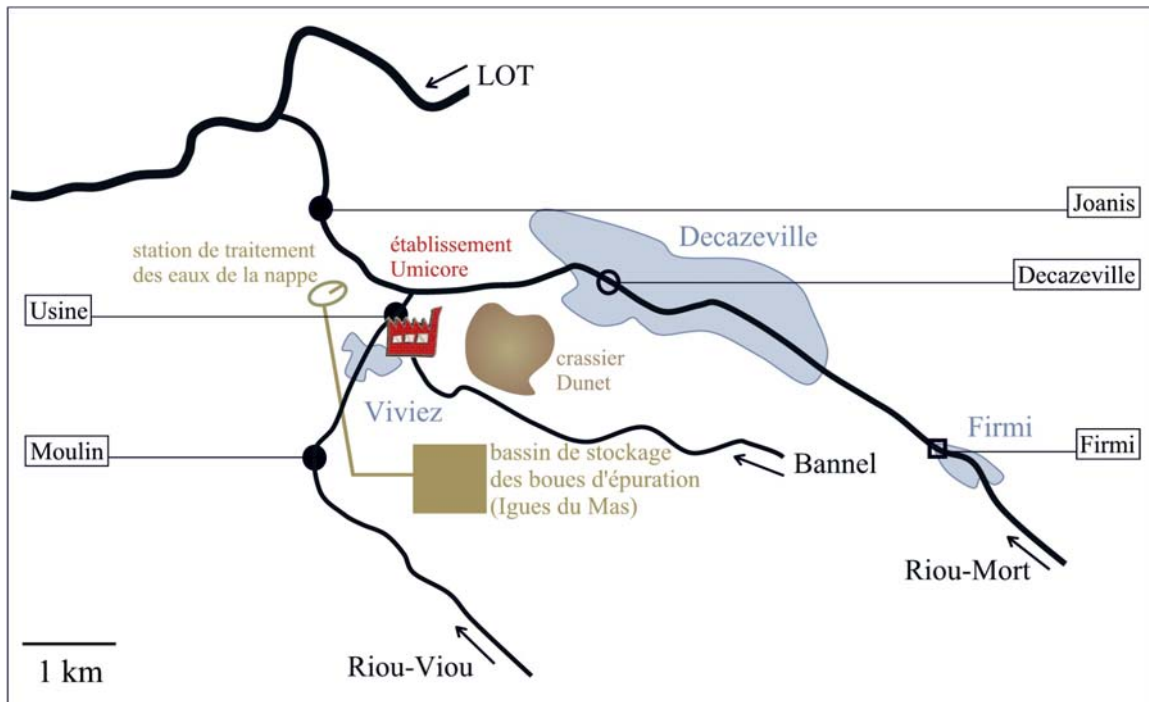


Figure 22 : Localisation des sites d'étude.

- : sites faisant l'objet d'une implantation de bivalves (*Corbicula fluminea*)
- : sites instrumentés par l'équipe TGM (préleveurs automatiques)

**Station Moulin (Riou-Viou)**

Le Riou-Viou prend sa source sur des terrains géologiques cristallins où dominent gneiss et micaschistes. Son régime hydrologique est torrentiel, avec des débits pouvant varier de 0,2 à 40m<sup>3</sup>/s. Large de 3m environ, profond de 20 à 120cm selon la période de l'année, le cours d'eau présente à cet endroit un substrat essentiellement constitué de galets. Localisée en amont de l'origine des rejets métalliques (Riou-Viou Usine), cette station peu anthropisée présente des concentrations en métaux relativement faibles dans la colonne d'eau (0,3µgCd/L et 20,7µgZn/L en moyenne pour l'année 2004).

**Station Usine (Riou-Viou)**

Cette station a été choisie sur le lieu d'implantation du site industriel de "Vieille Montagne", à laquelle la direction de Umicore (qui occupe actuellement les lieux) nous a autorisé l'accès. Le cours d'eau est canalisé sur cette zone, sa largeur y est de 5m environ, sa profondeur varie de 10 à 80cm sur l'année. Le fond du ruisseau est constitué de sable et de graviers. Le niveau de contamination métallique est élevé, et montre une variabilité extrême des concentrations en cadmium. Ainsi, en 2004, les concentrations moyennes mesurées dans la colonne d'eau étaient de 15,7µgCd/L pour le dissous (de 0,3 à 53,2µg/L) et de 367mgCd/kg pour le particulaire (de 15 à 1430mg/kg).



Figure 23 : Photographies des stations du Riou-Viou : Moulin (à gauche) et Usine (à droite), mai 2004.

**Station Firmi (Riou-Mort)**

Le bassin versant du Riou-Mort dispose d'une superficie de 150km<sup>2</sup> environ et est caractérisé par un régime torrentiel. Il naît sur des grès et pélites rouges du Permien et traverse ensuite le bassin houiller de Decazeville. La station de Firmi se situe sur ces terrains permien dans une zone faiblement anthropisée, 5km à l'amont de la zone urbaine de Decazeville, au niveau d'une dérivation du Riou-Mort dont le substrat est constitué de dalles de pierres. La largeur du cours d'eau y est de 4m et sa profondeur varie de 10cm à l'étiage à environ 50cm en hiver. Le niveau de pollution organique y est assez faible et les concentrations métalliques moyennes proches du fond géochimique (*i.e.* de la composition naturelle en éléments chimiques) de cette zone du Sud-Ouest du Massif Central (Andres 1997).



### ***Station Decazeville (Riou-Mort)***

Après avoir drainé les terrains permien, le Riou-Mort continue sa progression dans des terrains houillers (dépôts sédimentaires du Carbonifère). La station Decazeville est située sur cette formation, à l'aval immédiat de l'agglomération decazevilloise et en amont de la confluence du Riou-Mort avec le Riou-Viou. Elle présente une charge organique supérieure à la station Firmi (Morin 2003) et une concentration faible en métaux (20-160ngCd/L en 2002 d'après les mesures de l'équipe TGM). A cet endroit, la largeur du Riou-Mort ne dépasse pas 4m, et sa profondeur connaît des variations annuelles importantes, de 10cm jusqu'à plus d'1m en période de crue. Le fond du cours d'eau est constitué de galets et de blocs rocheux.

### ***Station Joanis (Riou-Mort)***

Ce site se trouve sur la rive gauche du cours d'eau, sur un substrat de sable et de galets. Au niveau de cette station située à quelques kilomètres en aval de la confluence du Riou-Mort avec le Riou-Viou et à l'amont de sa confluence avec le Lot, le site présente un niveau assez important de pollution organique. A cet endroit, les rejets métalliques drainés par le Riou-Viou sont en partie dilués par les eaux provenant du Riou-Mort, et les concentrations métalliques atteignaient en 2000 des valeurs moyennes de 17 µgCd/L et 1,3 mgZn/L (Audry *et al.* 2004b). Cette station fait l'objet d'un suivi des débits par la DIREN<sup>1</sup>, et est caractérisée par un régime torrentiel, avec un débit annuel moyen de 2 m<sup>3</sup>.s<sup>-1</sup> et des variations journalières de débit pouvant atteindre un facteur 10 (Audry 2003).



Figure 24 : Photographies des stations du Riou-Mort : Firmi, Decazeville et Joanis (de gauche à droite), juillet 2004.

---

<sup>1</sup> DIREN : Direction Régionale de l'Environnement

### 2.3 – Des expérimentations de terrain le long de deux gradients de pollution.

Les objectifs de l'étude ont conditionné le choix des sites de prélèvement. Ainsi, le travail s'articule autour de deux axes de recherche complémentaires : un suivi mensuel des stations du Riou-Mort et du Riou-Viou, ainsi qu'une détermination précise de la cinétique de colonisation par les communautés périphytiques le long d'un gradient de pollution organique et métallique.

#### *Caractérisation de la variabilité saisonnière et inter-annuelle des stations du Riou-Viou et du Riou-Mort.*

Pour le suivi saisonnier, les différents sites d'échantillonnage des eaux et du biofilm ont été définis de manière à encadrer la source de contamination sur le Riou-Viou et sur le Riou-Mort. Quatre sites ont ainsi été retenus : Decazeville et Joanis (sur le Riou-Mort), Moulin et Usine (sur le Riou-Viou). Ces stations ont été suivies à un pas de temps de 4 semaines de mars 2004 à décembre 2005 pour l'échantillonnage du biofilm. Elles ont également fait l'objet d'une implantation de bivalves (*Corbicula fluminea*), dont la collecte était synchronisée avec les prélèvements de biofilm (Figure 25).



Figure 25 : Implantation de substrats destinés à la récupération du biofilm et à l'immersion des bivalves (station Joanis, Riou-Mort).

Les études précédemment réalisées dans le bassin versant du Riou-Mort ont uniquement décrit les communautés aquatiques en aval de la contamination, sans référence aux populations amont (Say 1978, Rames 1995, Andres 1997, Andres *et al.* 1999, Baudrimont *et al.* 1999, Andres *et al.* 2000, Gold 2002, Gold *et al.* 2002, Baudrimont *et al.* 2003a, Feurtet-Mazel *et al.* 2003,

Gold *et al.* 2003b, Morin 2003). Cette expérimentation permet donc une caractérisation fine de stations sélectionnées à l'amont et à l'aval de la contamination sur les deux cours d'eau du site atelier pendant deux années. Pour chacun des sites, il est ainsi possible de décrire la variabilité saisonnière et inter-annuelle du biofilm, et plus précisément de la structure des communautés périphytiques, Elle autorise également la comparaison inter-station sur des périodes déterminées, de manière à identifier l'influence de l'origine des apports (*i.e.* le cours d'eau considéré) ainsi que les impacts de la contamination métallique sur le périphyton.

### ***Etude de la cinétique d'établissement des communautés diatomiques le long du Riou-Mort.***

Les stations du Riou-Mort (Firmi, Decazeville et Joanis) ont fait l'objet d'une étude des cinétiques de développement des communautés périphytiques. Ces trois stations, dont les caractéristiques hydrodynamiques sont proches, présentent un gradient de pollution organique et métallique à des distances relativement réduites. La station Firmi a été retenue comme station de "référence", indemne de contamination organique et métallique. A l'aval, la station Decazeville accuse les impacts de l'agglomération ; le cours d'eau présente des caractéristiques d'eutrophisation marquées. Entre la confluence du Riou-Mort avec le Riou-Viou et celle avec le Lot, la station Joanis draine les rejets du Riou-Viou et présente un niveau marqué de contamination métallique. L'étude des communautés diatomiques collectées sur substrats naturels le long de ce même gradient (Morin 2003) a montré une évolution notoire de la composition spécifique de l'amont vers l'aval de la source de pollution en été. Le choix des stations Firmi, Decazeville et Joanis nous autorise à caractériser et à comparer les cinétiques d'établissement *in situ* des communautés diatomiques en conditions de référence, en conditions de pollution organique et en conditions de stress métallique, le long d'un seul et même cours d'eau.

Dans le cadre de ce suivi, les prélèvements ont été réalisés après 3, 5, 8, 15 et 21 jours de colonisation. Ces expériences, réalisées en conditions estivales (juillet 2004) et hivernales (mars 2005), permettent également d'évaluer la variabilité saisonnière liée aux événements extrêmes d'étiage et de crue le long du gradient.

### **3- Etude en canaux artificiels des effets de la contamination au cadmium sur des communautés périphytiques collectées sur le terrain.**

L'étude des effets du cadmium sur les communautés diatomiques a également été étudiée en conditions contrôlées, afin de valider ou d'infirmer les hypothèses issues des expérimentations de terrain. Les études en laboratoire représentent en effet le moyen de contrôler la plupart des facteurs abiotiques (physicochimie des eaux) et d'isoler ainsi les réponses au facteur étudié. Des communautés de diatomées périphytiques collectées dans la rivière Riou-Mort ont été introduites en suspension dans la colonne d'eau de canaux expérimentaux de laboratoire. Les substrats artificiels vierges immergés dans ces mésocosmes ont permis de suivre le développement des communautés sous différents niveaux de contamination par le cadmium, dans des conditions contrôlées, fixées de manière à recréer des conditions proches de celles observées sur le terrain.

#### ***3.1 – Evaluation des effets de la pollution par le cadmium sur les biofilms et la structure des communautés de diatomées périphytiques.***

Notre approche cherche à réaliser un couplage entre l'approche expérimentale et la modélisation de phénomènes observés sur le terrain. Les conditions d'expérimentation en microcosmes permettent une simplification de la complexité et de la variabilité du milieu naturel, par la standardisation de la plupart des paramètres environnementaux à un niveau choisi (facteurs physico-chimiques et de contamination).

Cette démarche devrait donc nous permettre de compléter les observations réalisées *in situ* et de confirmer ou d'infirmer certaines hypothèses émises quant aux effets du cadmium sur les communautés diatomiques.

Elle devrait également nous renseigner de façon plus précise sur la cinétique d'accumulation du cadmium dissous dans le biofilm, ainsi que sur certains aspects de la toxicité du métal sur les diatomées.

### **3.2 – Inoculation d'une suspension de biofilm prélevée in situ.**

L'échantillonnage a été réalisé en hiver (mars 2006), de façon à recueillir des biofilms essentiellement constitués de diatomées (Whitton 1975). Le périphyton provenant de substrats artificiels immergés à la station Decazeville (Riou-Mort amont) pendant 1 mois a été échantillonné sur le terrain, mis en suspension et homogénéisé dans un volume de 2L. Trois aliquotes ont été prélevées pour déterminer à  $t = 0$  (au moment de l'inoculation des biofilms dans les systèmes expérimentaux) les concentrations en métaux dans le biofilm et la structure initiale des communautés diatomiques. Le reste du périphyton a été transporté au laboratoire dans des glacières pour assurer la survie des algues, puis introduit dans la colonne d'eau de quatre systèmes expérimentaux indépendants (Figure 26). Chaque unité expérimentale, constituant un circuit fermé, était composée d'une colonne de distribution de l'eau vers trois canaux artificiels montés en parallèles, contenant chacun six substrats artificiels vierges (lames de verres de 150 cm<sup>2</sup> par face). Un réservoir de 40L permettait d'alimenter la colonne et les canaux en continu grâce à une pompe externe. La surverse au niveau de la colonne y assure une hauteur d'eau constante et par conséquent garantit une alimentation stable et continue des canaux en eaux (par le maintien d'une différence invariable de potentiel dans la colonne d'eau).



Figure 26 : Systèmes expérimentaux mis en place au laboratoire (réalisation : Henri Bouillard, LEESA).

Ce dispositif expérimental a permis de fixer et de contrôler les conditions environnementales sous lesquelles se sont développés les biofilms : nature des substrats de colonisation, profondeur d'immersion de ces substrats, vitesse du courant, éclairage, température, ressource en nutriments (milieu de culture Woods Hole), niveaux de contamination en cadmium...



### 3.3 – Procédure de contamination des systèmes expérimentaux.

Le contrôle des concentrations métalliques revêt une importance primordiale, car leur évolution au sein des systèmes expérimentaux conditionne les modalités d'exposition des organismes, les capacités de bioaccumulation et, *in fine*, les effets toxiques.

A partir d'un apport initial de contaminant dans la colonne d'eau des microcosmes, correspondant à l'obtention d'une concentration nominale fixée, de nombreux processus abiotiques et biotiques concourent à la disparition plus ou moins rapide du produit : mécanismes de dégradation, fixation sur les parois des unités expérimentales, transferts vers le compartiment biologique... Selon leur importance, des procédures permettant une compensation de ces phénomènes de décroissance sont indispensables au maintien d'une pression de contamination relativement constante pendant toute la durée des expériences. La décroissance des concentrations en cadmium dans la colonne d'eau des unités expérimentales, suite à un ajout initial, est importante et très rapide (Gold *et al.* 2003a). En effet, les parois de PVC des systèmes expérimentaux absorbent une part non négligeable du métal dissous. Pour éviter de soumettre les organismes à des variations d'exposition aux métaux de trop grande amplitude, nous avons pré-contaminé les systèmes quelques jours avant l'inoculation du biofilm, suivi et compensé quotidiennement les décroissances de concentrations, afin d'atteindre un "équilibre" dans les systèmes. Par la suite, les concentrations ont été mesurées tous les jours pendant la première semaine d'expérimentation puis deux fois par semaine durant le reste de l'expérimentation, afin de conserver des conditions d'exposition constantes tout en limitant le nombre de dosages.

La contamination de l'eau des systèmes expérimentaux et le maintien des concentrations autour de la valeur nominale ont été réalisés par ajout d'une solution concentrée de chlorure de cadmium ( $\text{CdCl}_2$ , Merck, Darmstadt, Allemagne) dans la colonne d'eau.

## ***B – METHODES D'ECHANTILLONNAGE ET D'ANALYSE DES EAUX ET DU PERIPHYTON.***

Les différentes études ont donné lieu à des analyses visant à décrire l'ambiance physico-chimique du milieu dans lequel se sont développées les communautés périphytiques et à caractériser qualitativement et quantitativement le biofilm collecté.

### **1- Caractérisation de l'hydroclimat des stations.**

Les expériences menées sur le terrain et en laboratoire nécessitent une caractérisation fine de l'hydroclimat des stations. Pour ce faire, diverses analyses physico-chimiques ont été réalisées dans la colonne d'eau de manière d'une part à déterminer les valeurs des paramètres classiquement étudiés et la disponibilité en nutriments (Rodier 1978), et d'autre part à caractériser le niveau de contamination métallique.

#### ***1.1 – Détermination des paramètres physico-chimiques usuels.***

Chaque campagne de prélèvements a donné lieu à des mesures *in situ* et à des prélèvements d'échantillons de l'eau des stations. Le Tableau 2 décrit les analyses réalisées et les méthodes de dosages utilisées.

##### ***Mesures physico-chimiques réalisées in situ.***

Sur le terrain, le pH, la température, la conductivité électrique (estimation de la minéralisation globale de l'eau, *i.e.* de la teneur en sels dissous), la concentration en oxygène dissous et la saturation en oxygène ont été déterminés grâce à l'utilisation de sondes multi-paramètres (WTW, Weilheim, Allemagne) calibrées avant chaque campagne d'échantillonnage à partir de solutions-étalon.

##### ***Analyses chimiques réalisées en laboratoire.***

Deux litres d'eau ont également été collectés par site, stockés au frais et analysés au Laboratoire d'Analyse des Eaux du Cemagref de Bordeaux dans les 24 heures. Les dosages concernent l'oxydabilité de la matière organique (indice permanganate), les concentrations en nutriments (en distinguant les formes ionisées ou non de l'azote – azote nitreux, nitrique, ammoniacal et minéral soluble, azote Kjeldahl, azote organique – et du phosphore – orthophosphates, phosphore total) et en silice.

Tableau 2 : Analyses des principaux paramètres physico-chimiques de la colonne d'eau.

Dénomination des analyses	Méthodes de dosage (normes AFNOR)
Détermination de l'indice permanganate	NF EN ISO 8467
Nitrates	NF EN ISO 13395
Nitrites	NF EN ISO 13395
Azote ammoniacal	NF EN ISO 11732
Azote minéral soluble	NF EN ISO 13395 et NF EN ISO 11732
Azote Kjeldahl	NF EN 25663
Azote organique	NF EN 25663 et NF EN ISO 11732
Orthophosphates	NF T 90-023
Phosphore total	NF T 90-023
Silice	NF T 90-007

### 1.2 – Détermination des concentrations métalliques dans la colonne d'eau.

La quantification et la caractérisation des sources et des mécanismes de transport érosif au niveau du site-atelier impose une méthodologie adaptée pour le suivi des concentrations en matières en suspensions et en polluants métalliques (Blanc *et al.* 1999, Schäfer et Blanc 2002, Coynel *et al.* 2004). Les stations Moulin, Usine et Joanis ont été instrumentalisées par l'équipe TGM de l'Université de Bordeaux 1. Des préleveurs automatiques (fréquence journalière) ont été installés, avec une récupération des échantillons tous les 24 jours. Les concentrations métalliques (cadmium, zinc, cuivre et plomb) dans les fractions dissoute (<0,2µm) et particulaire des échantillons ont été analysées par spectrométrie de masse à plasma couplé (ICP-MS) au laboratoire TGM.

Pour les expériences de laboratoire, le suivi du niveau de contamination métallique a été réalisé au LEESA. Les concentrations en cadmium ont été mesurées tous les jours pendant la première semaine et deux fois par semaine pendant le reste de l'expérimentation. Le maintien d'un niveau relativement constant de contamination métallique autour de la concentration nominale (concentration souhaitée) a été permis par des ajouts de chlorure de cadmium réalisés après chaque dosage. L'appareil prélève 10µL des échantillons d'eau prélevés puis acidifiés (HNO<sub>3</sub>, 2%), qu'il mélange avec 4µL de solution "palladium - Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>" (50/50) avant atomisation pour les dosages par spectrophotométrie d'absorption atomique au four (Varian AA400 – Zeeman correction, Victoria, Australia), les blancs et les échantillons certifiés sont traités en même temps que les échantillons. La limite de détection est 0,1µgCd/L.

## 2- Caractérisation qualitative et quantitative des biofilms.

### 2.1 – Méthodes d'échantillonnage du périphyton.

Pour les différentes expériences, le périphyton a été échantillonné sur des substrats artificiels. Ce type de substrat permet de réaliser des prélèvements quantitatifs, dans des conditions relativement reproductibles d'un site à l'autre et d'une date à l'autre. Après colonisation des substrats vierges, il est possible de comparer les communautés qui s'y sont établies sur une durée déterminée, qui sont représentatives du passé récent du milieu.

Notre choix s'est porté sur des substrats en verre, couramment utilisés autant en milieu naturel (Ivorra *et al.* 1999, Gold *et al.* 2002, 2003b, Duong *et al.* 2006) que pour les études de laboratoire (Peres *et al.* 1995, Peres *et al.* 1997, Ivorra *et al.* 2000, Gold *et al.* 2003a). Ces supports inertes permettent un échantillonnage simple par raclage, rapide, et réduisant la variabilité liée au prélèvement. Pour les expériences de terrain, des lames de verre (300cm<sup>2</sup> par face) ont été insérées par six dans des cages en plastique ajourées immergées dans la colonne d'eau des stations (Figure 27). Ces cages équipées de flotteurs en polystyrène sont ainsi maintenues dans la zone photique et rattachées à la berge. Les expériences de laboratoire ont été réalisées dans des canaux artificiels munis de lames de verre de 150cm<sup>2</sup> (Figure 27).



Figure 27 : Substrats artificiels utilisés sur le terrain et en laboratoire.

A chaque temps d'échantillonnage du périphyton, les substrats sont prélevés, raclés à l'aide d'une lame de cutter et dilués dans un volume standard d'eau minérale. Chaque réplicat est soigneusement homogénéisé, puis séparé en diverses aliquotes destinées aux analyses suivantes : description de la biomasse en place (parties B.2.2.) et dosage des concentrations métalliques dans le biofilm (partie B.2.3.). Tout le flaconnage utilisé pour le prélèvement et la conservation des échantillons destinés au dosage des métaux est en Téflon<sup>®</sup>, de manière à limiter les réactions d'adsorption ou désorption de métaux au niveau des parois.

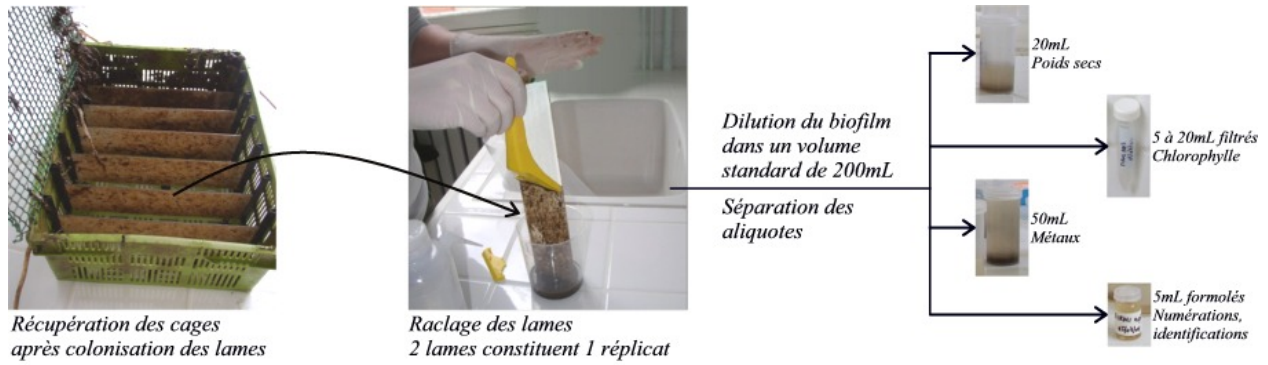


Figure 28 : Protocole de récolte du biofilm et devenir des échantillons.

Chaque prélèvement de terrain sur substrats artificiels a été accompagné d'un échantillonnage des communautés périphytiques directement sur substrat naturel, conformément aux préconisations de la NF EN 13946 (AFNOR 2003). Bien que n'autorisant pas l'analyse quantitative, la collecte sur substrats naturels satisfait aux exigences de suivi biologique normalisé pour la détermination de l'Indice Biologique Diatomées.

## 2.2 – Caractérisation de la biomasse en place.

A partir des échantillons de périphyton mis en suspension, des aliquotes ont été destinées à l'analyse qualitative et quantitative du biofilm :

### Description de la composition organique et minérale du biofilm :

20mL ont été assignés à la détermination du poids sec (PS) du biofilm et à la mesure de la fraction organique, suivant la norme NF EN 872. Chaque échantillon a été filtré sur filtre en fibres de verre. Après séchage du filtre à 105°C et pesée du résidu retenu sur le filtre, les échantillons ont été passés 1 heure au four à 500°C pour calculer la matière sèche sans cendre (MSSC).

$$PS(mg / cm^2) = \frac{m_{étuve} - m_{filtre}}{S}$$

$$\text{et } MSSC(mg / cm^2) = PS \times \left( 1 - \frac{m_{four} - m_{filtre}}{m_{étuve} - m_{filtre}} \right)$$

Avec :

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

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

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

$S$  : surface correspondante de support gratté (cm<sup>2</sup>).

**Détermination de la concentration en pigments photosynthétiques :**

De 5 à 20mL ont été utilisés pour le dosage spectrophotométrique de la concentration en pigments chlorophylliens selon un protocole modifié de la norme NF T90-117. Après filtration de la suspension de périphyton, les filtres GF/C ont été conservés au frais et à l'obscurité dans un volume de 10mL d'acétone (90%). Après 24h, les absorbances de l'extrait acétonique sont mesurées avant et après acidification, les concentrations en chlorophylle *a* ( $C_a$ ) et en indice phéopigments ( $P_a$ ) sont déterminées d'après les équations de Lorenzen et exprimées en  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  :

$$C_a (\mu\text{g} / \text{cm}^2) = 26,7 \times ((A_0 665 - A_0 750) - (A_a 665 - A_a 750)) \times \frac{v}{L \times S}$$

$$\text{et } P_a (\mu\text{g} / \text{cm}^2) = 26,7 \times (1,7 \times (A_a 665 - A_a 750) - (A_0 665 - A_0 750)) \times \frac{v}{L \times S}$$

Avec :

$A_0 665, A_0 750$  : absorbances de l'extrait à 665 nm et 750 nm avant acidification ;

$A_a 665, A_a 750$  : absorbances de l'extrait à 665 nm et 750 nm après acidification ;

$v$  : volume d'extrait acétonique (mL) ;

$L$  : trajet optique de la cuve utilisée (cm) ;

$S$  : surface correspondante de support gratté ( $\text{cm}^2$ ).

**Mesure des concentrations métalliques dans le biofilm :**

Les dosages de métaux (cadmium et zinc notamment) dans le biofilm ont été réalisés au LEESA par Thuy Duong. 20mL d'échantillon ont été conservés au frais, avant d'être filtrés (Millipore Corp., 0,45 $\mu\text{m}$ ) puis acidifiés ( $\text{HNO}_3$ , 2%). L'appareil (Varian AA400 à effet Zeeman, Australie) prélève 10 $\mu\text{L}$  de solution acidifiée qu'il mélange avec 4 $\mu\text{L}$  de solution « palladium –  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$  » (50/50) avant atomisation pour l'analyse de la concentration métallique par spectrophotométrie d'adsorption atomique au four. Les blancs et les échantillons certifiés sont traités en même temps que les échantillons. La limite de détection est de 0,10 $\mu\text{g}/\text{L}$  pour le cadmium et 10 $\mu\text{g}/\text{L}$  pour le zinc.

Dans le cadre de l'expérimentation en laboratoire, une deuxième protocole de dosage des concentrations en cadmium dans le biofilm a été testé : les suspensions d'échantillon ont été rincées à l'EDTA de manière à éliminer la fraction métallique faiblement liée et à doser de façon plus précise les quantités accumulées par les organismes.

### ***2.3 – Analyses quantitative et qualitative de la structure des communautés de diatomées.***

5mL supplémentaires ont été prélevés et conservés dans 1mL de solution formolée (10%). Le matériel vivant est ainsi fixé dans les conditions physiologiques des organismes au moment du prélèvement. Ces échantillons subissent ensuite les traitements appropriés à chaque type d'analyse, puis font l'objet d'un montage microscopique entre lame et lamelle. Chacun des protocoles d'analyse est détaillé par la suite.

L'observation en microscopie photonique des lames permet le comptage des cellules et leur identification jusqu'au niveau de l'espèce. A partir d'un point de départ sur la lame défini de manière à pouvoir inventorier un nombre suffisant de diatomées, la préparation est balayée régulièrement de long en large. Chaque cellule est prise en compte si : a) elle se présente en vue valvaire plutôt qu'en vue connective (en supposant que la probabilité pour une espèce de présenter l'une ou l'autre des valves est la même pour chaque espèce), b) les  $\frac{3}{4}$  du frustule au minimum sont visibles dans le champ du microscope, c) la diatomée est identifiable jusqu'au niveau de l'espèce.

#### ***Analyse quantitative des communautés de diatomées.***

La quantification des diatomées se fait par estimation de la densité totale de cellules présentes dans les échantillons. Leur énumération est réalisée au moyen d'une cellule de comptage de type cellule de Nageotte.

Un traitement aux ultrasons (7 minutes) est nécessaire à l'homogénéisation des échantillons de périphyton sans dommage sur les frustules (Samsera 2004). 100 $\mu$ L sont prélevés et déposés sur la cellule de Nageotte ; le dénombrement s'effectue sur un total de 10 champs (1 champ rectangulaire a une profondeur de 0,5mm et correspond à un volume d'échantillon de 1,25 $\mu$ L) répartis sur toute la largeur de la cellule. L'observation au grossissement x40 permet d'apprécier l'homogénéité de la répartition de l'échantillon (absence d'un gradient de densité), le grossissement x100 permet ensuite le comptage des cellules dans un champ.

La densité des diatomées sur les substrats (D, exprimée en nombre de cellules par cm<sup>2</sup>) requiert un comptage de 200 cellules minimum. Elle est calculée d'après la formule :

$$D = \frac{A \times V}{n \times 1,25} \times \frac{1}{S}$$

Où A : nombre total de cellules dénombrées ; n : nombre de champs ; V : volume initial de l'échantillon formolé de périphyton ( $\mu$ L) ; S : surface totale des lames de verre raclées par échantillon (cm<sup>2</sup>).

### *Analyse qualitative des communautés de diatomées.*

L'identification des diatomées présentes dans les échantillons de périphyton est actuellement réalisée d'après l'examen microscopique de leur squelette siliceux, rendu possible par un traitement permettant de débarrasser les échantillons d'une grande partie des matières organiques. Le protocole normalisé AFNOR (NF EN 13946) préconise un nettoyage par digestion de la matière organique : un traitement des échantillons formolés à l'eau oxygénée (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 30%) bouillante de 10 minutes permet de dégrader la matière organique. Un deuxième traitement, à l'acide chlorhydrique (HCl, 35%) bouillant pendant 5 minutes est généralement nécessaire pour obtenir un nettoyage satisfaisant des frustules. Les résidus d'eau oxygénée et d'acide sont éliminés par des cycles successifs de centrifugations (5 minutes à 2500g) et de rinçages à l'eau distillée. Une partie aliquote est déposée sur une lamelle propre et déshydratée par séchage. La lamelle est ensuite retournée sur une goutte de Naphrax<sup>®</sup><sup>1</sup> déposée au préalable sur une lame, le chauffage permet de chasser les bulles d'air et d'aboutir à la fabrication de lames permanentes.

L'identification des diatomées se fait par l'observation en microscopie photonique (au grossissement x1000) des lames préparées. L'effort de détermination porte sur 400 valves au minimum, sachant qu'au-delà de 400 individus, le nombre d'espèces inventoriées n'augmente plus de façon significative (Bate et Newall 2002). Les cellules comptées sont identifiées au niveau spécifique ou infraspécifique à l'aide de la littérature appropriée, notamment la Süßwasserflora de Krammer et Lange Bertalot (1986 - 1991), les références étant actualisées conformément à la nomenclature récente (OMNIDIA version 2005). A partir des inventaires floristiques et des abondances relatives spécifiques de chaque échantillon, différentes caractéristiques des peuplements diatomiques peuvent être obtenues. Il est ainsi possible de caractériser la structure des communautés, et la saisie informatique des résultats des comptages dans le programme OMNIDIA (Lecointe *et al.* 1993) facilite le calcul des différents indices utilisés habituellement en routine (IBD, IPS, diversité de Shannon...), et permet de définir les caractéristiques écologiques globales des populations.

---

<sup>1</sup> Le Naphrax<sup>®</sup> est une résine réfringente dont l'indice de réfraction est de 1,74, commercialisée par Brunel Microscopes Ltd., Angleterre.



***Identification de traits morphologiques.***

La revue bibliographique suggère que certains traits morphologiques pourraient varier avec le niveau de contamination métallique. L'utilisation de ces attributs pourrait alors constituer une piste intéressante à exploiter pour la révélation des pollutions métalliques.

Trois indicateurs en particulier ont été étudiés :

- la fréquence des anomalies morphologiques

Stevenson et Bahls (1999) ont suggéré l'utilisation du pourcentage de diatomées déformées comme outil de la diagnose de la qualité des eaux au regard des toxiques. Lors de la réalisation des inventaires floristiques, les diatomées présentant des anomalies morphologiques (concernant la forme générale des frustules comme l'ornementation des valves) ont donc été répertoriées. Leurs abondances relatives dans les échantillons (exprimées en %) ont été comparées avec le niveau de contamination métallique du milieu.

- le biovolume total des communautés

Le programme OMNIDIA permet d'extraire de la « base de données diatomées » le biovolume théorique de chacune des espèces inventoriées. A partir de cette donnée et des abondances relatives de chacune d'entre elles, il est possible de calculer un biovolume théorique moyen de la communauté (noté B), suivant la formule :

$$B = \sum_{i=1}^n RA_i \times B_{spi}$$

Où  $n$  : nombre de taxons dans l'échantillon ;  $RA_i$  : abondance relative de l'espèce  $i$  et  $B_{spi}$  : biovolume théorique de l'espèce  $i$ .

- la mesure de la longueur de certains taxons

La diminution de taille cellulaire constatée par certains auteurs (Cattaneo *et al.* 1998, Joux-Arab *et al.* 2000, Cattaneo *et al.* 2004) sur sites contaminés n'est à ce jour pas exploitée pour diagnostiquer la pollution métallique. Un travail biométrique a été mis en place sur des espèces sélectionnées au regard de leur abondance relative dans les échantillons. Un minimum de 40 individus par lame (*i.e.* par échantillon) a été mesuré pour chacun de ces taxons, dans le sens de la longueur. La moyenne et la dispersion des tailles individuelles ont ensuite fait l'objet d'une comparaison inter-échantillon.

### 3- Traitement statistique des données.

L'analyse descriptive des données a nécessité la mise en œuvre d'analyses multivariées de type Analyse en Composantes Principales. La comparaison statistique de nos variables quantitatives a été réalisée par les méthodes statistiques appropriées. La comparaison de 2 moyennes a été effectuée au travers du test de Student. Dans les situations où l'analyse nécessitait la prise en compte de plusieurs moyennes, les données ont été traitées par ANOVA (analyse de variance). Le principe général de ces trois types d'analyse est développé dans cette partie.

#### 3.1 – *Statistiques descriptives.*

L'Analyse en Composantes Principales (ACP) est l'une des techniques descriptives les plus utilisées en écologie. Elle permet de réduire et d'intégrer la distance entre les données et de convertir des variables interdépendantes en composantes indépendantes et significatives (Brosse *et al.* 2001). Dans le cadre de cette thèse, les ACP ont été effectuées à l'aide des logiciels PC-ORD (McCune et Mefford 1999) et STATISTICA (v5.1, StatSoft France, 1997) pour décrire les conditions physico-chimiques discriminantes entre sites, ainsi que pour comparer la structure spécifique des assemblages diatomiques. Les résultats obtenus sont présentés sous la forme de graphiques bidimensionnels. Les composantes 1 et 2 (variables synthétiques issues de la combinaison des variables réelles) décrivent un plan restituant la majeure partie de l'information. Dans cette représentation, il est possible de visualiser la projection des individus (échantillons) ainsi que celle des variables (*i.e.* paramètres physico-chimiques ou abondances relatives des espèces), les plus discriminantes étant celles dont la distance à l'origine est la plus importante. Les échantillons peuvent ainsi être regroupés d'après leurs similitudes et discriminés par un certain nombre de facteurs environnementaux ou caractérisés par des associations d'espèces particulières.

Certaines analyses ont également motivé l'utilisation de méthodes de Classifications Ascendantes Hiérarchiques (CAH) appliquées aux données de manière à regrouper les échantillons au mieux pour obtenir une vision globale des échantillons sous forme de dendrogramme. Le logiciel PC-ORD permet de réaliser des clusters, classant les individus en fonction de leur éloignement mesuré par la distance de Ward. Cette distance géométrique est généralement appliquée aux CAH, car elle favorise des groupements les plus compacts possibles dans l'espace des données, *i.e.* qui font le moins varier l'inertie intraclasse.

### 3.2 – Tests statistiques pour la discrimination des échantillons.

L'interprétation des résultats issus des expérimentations *in situ* et en laboratoire nécessite la mise en œuvre de tests statistiques.

Le test de Student est une méthode communément utilisée pour déterminer si la différence observée entre les moyennes de deux échantillons est attribuable aux fluctuations d'échantillonnages ou correspond à une différence vraie entre les deux échantillons. Il peut être appliqué sous réserve d'une distribution normale des valeurs.

L'analyse de variance (ou ANOVA) permet de comparer les moyennes d'échantillons en fonction d'un facteur étudié. L'ampleur de la dispersion totale se décompose en dispersions intra- et inter-groupes étudiés. Ces sources de variabilité sont comparées de manière à déterminer si la source de variabilité principale est attribuable au facteur étudié, *i.e.* au niveau de contamination métallique. Les ANOVAs ont été effectuées à l'aide du logiciel SAS (GLM Procedure, SAS Institute, 2005), après vérification de la distribution normale des données et en fixant le risque  $\alpha$  à 5%. Dans les cas de rejet de l'hypothèse nulle, les tests de Student-Newmann-Keuls ou de Tukey ont été utilisés pour mettre en évidence des différences significatives entre les groupes de données.

Dans le cadre du programme de recherche ECOTDYN, les objectifs de cette thèse sont de contribuer à une meilleure connaissance : (i) de la structure des communautés matures du bassin versant du Riou-Mort, en prenant en compte la variabilité saisonnière et (ii) de la dynamique d'établissement des biofilms et des communautés diatomiques soumises aux effets combinés des nutriments et des métaux. Ces études *in situ* ont également permis de recueillir des informations nombreuses et plus précises concernant les effets suspectés des métaux sur la morphologie des individus. Enfin, nous avons mis en place une expérimentation en conditions contrôlées nous permettant d'étudier les effets spécifiques de l'intensité d'exposition aux métaux et du stade de développement de la matrice organique sur les caractéristiques du biofilm et sur les diatomées.

Les résultats obtenus dans le cadre de ces travaux sont exposés au travers des trois chapitres suivants : le Chapitre 3 est consacré au suivi annuel (saisonnier) des stations du bassin versant du Riou-Mort, le Chapitre 4 concerne plus précisément à la cinétique de colonisation le long du Riou-Mort, et le Chapitre 5 décrit les expérimentations réalisées en laboratoire.



## **CHAPITRE 3**

Variabilité saisonnière et inter-annuelle  
des communautés du Riou-Mort et du Riou-Viou

Identification de descripteurs des pollutions métalliques

### *Préambule.*

Une étude préliminaire de la chimie et des algues benthiques du Riou-Mort, avait été réalisée par Say en 1978. Depuis, le bassin versant a fait l'objet d'un suivi conséquent de la physicochimie et des éléments traces métalliques, assuré par les géochimistes de l'UMR EPOC notamment (Philipps et Jouanneau 1986, Schäfer *et al.* 2002, Audry *et al.* 2004b), et par la DIREN pour ce qui concerne les paramètres classiques de suivi, à la station Joanis. En revanche, l'examen des communautés périphtiques du bassin versant n'a été repris que tardivement, à l'initiative d'une collaboration LEESA / Cemagref (Gold 2002, Gold *et al.* 2002, Feurtet-Mazel *et al.* 2003, Gold *et al.* 2003b). Ces travaux présentent un suivi hivernal des communautés de diatomées établies sur substrats artificiels, au niveau de la station Joanis. Par la suite, une caractérisation des communautés estivales du Riou-Mort échantillonnées sur substrats naturels (galets lotiques) a été proposée (Morin 2003), avant le commencement de cette thèse. La prise en compte du compartiment biologique des diatomées dans le programme ECOTDYN nous a ensuite permis de réaliser une caractérisation plus précise des communautés algales du bassin versant, sur une échelle de temps conséquente (deux années), et avec une fréquence d'analyse de l'ordre du mois.

Au travers de cette étude, nous avons mis en évidence l'importance de facteurs de petite échelle, notamment de l'origine des échantillons en termes de cours d'eau (géologie du substrat, disponibilité en nutriments...), sur la composition des assemblages diatomiques. L'étude plus spécifique de la station Joanis nous a donné l'opportunité de décrire la variabilité saisonnière et inter-annuelle des communautés, en s'affranchissant de l'effet "cours d'eau", et même de l'effet "site", mis en évidence préalablement. Enfin, le cadre de ces travaux a favorisé l'identification de descripteurs morphologiques spécifiques des pollutions métalliques :

- une réduction significative de la taille des individus en conditions de stress métallique ;
- l'apparition d'anomalies morphologiques à des fréquences significativement plus importantes dans les sites contaminés.

Ce chapitre a donc pour objectifs de caractériser les communautés diatomiques du bassin versant, en termes de variabilité géographique et temporelle, et de présenter les indicateurs morphologiques qu'il nous semble pertinent de développer pour la mise en évidence des effets des pollutions polymétalliques.

## **A – CARACTERISATION DES COMMUNAUTES DU BASSIN VERSANT DU RIOU-MORT.**

Dans le cadre du projet ECOTDYN, des opérations de suivi de grande envergure ont été réalisées sur quatre stations du bassin versant du Riou-Mort (Moulin et Usine sur le Riou-Viou, Decazeville et Joanis sur le Riou-Mort) pendant deux ans, avec une fréquence d'échantillonnage de 24 jours environ. Chacune des campagnes d'échantillonnage a donné lieu à une caractérisation de l'hydroclimat des stations (analyses physico-chimiques des eaux, *in situ* et en laboratoire), du biofilm (en termes de biomasse installée et de bioaccumulation métallique) et des communautés diatomiques.

La première partie de ce chapitre a pour objectifs de décrire les conditions environnementales de développement des biofilms, leurs caractéristiques ainsi que les assemblages diatomiques en place. La variabilité saisonnière et stationnelle des conditions de milieu se traduit par une disparité importante des résultats obtenus pour les différents descripteurs étudiés. En termes d'assemblages diatomiques, le facteur le plus structurant a été identifié comme étant le cours d'eau d'origine, les apports nutritifs ainsi que le substrat géologique d'origine discriminant nettement les communautés du Riou-Mort et du Riou-Viou.

Devant l'abondance de la donnée disponible et les sources de variation observées, nous avons ensuite choisi de caractériser plus finement ces descripteurs pour une station en particulier. Notre choix s'est porté sur la station Joanis, qui fait l'objet d'un suivi de la part de la DIREN et dont les communautés ont été auparavant étudiées (Say 1978, Gold 2002). Même si l'analyse reste délicate, le suivi de cette station nous a permis de discerner des tendances lourdes :

- l'installation du biofilm n'est pas exclusivement conditionnée par les débits ;
- les communautés diatomiques peuvent constituer un bon outil de bioindication de la contamination cadmium / zinc ;
- l'apparition d'anomalies morphologiques à des fréquences inhabituelles semble pouvoir constituer un indicateur de pollution métallique.

## 1- Conditions de développement des communautés diatomiques.

### 1.1 – Caractéristiques physico-chimiques des cours d'eau.

Un suivi mensuel des communautés diatomiques a été réalisé sur la période avril 2004 – décembre 2005 ; les prélèvements ont été effectués sur les quatre sites suivants : Decazeville et Joanis sur le Riou-Mort, Moulin et Usine sur le Riou-Viou (Figure 29). Des échantillons d'eau ont été collectés simultanément pour la détermination des paramètres physico-chimiques classiques et l'analyse des concentrations en nutriments conformément aux protocoles définis au Chapitre 2 (B- Méthodes d'échantillonnage et d'analyse des eaux et du périphyton).

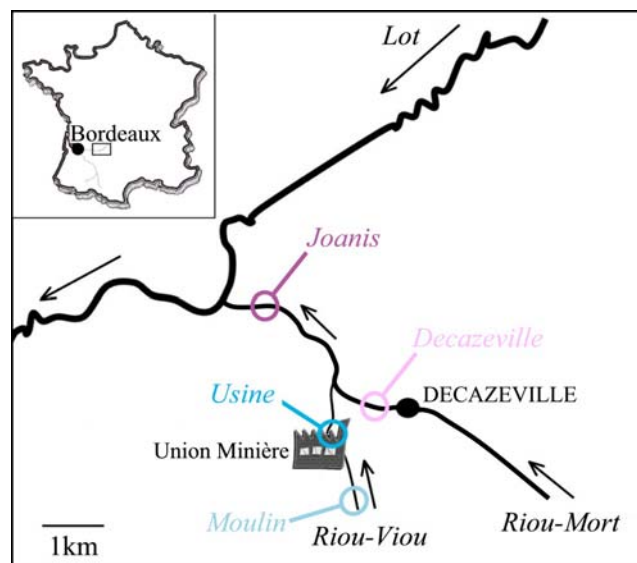


Figure 29 : Localisation des sites étudiés dans le cadre du suivi annuel.

Les eaux des quatre stations présentent sur l'année des pH proches de la neutralité ( $7,7 \pm 0,3$ ). Leurs températures suivent un cycle saisonnier, avec des valeurs minimales prises en mars ( $3,9 \pm 2,0^\circ\text{C}$ ) et maximales atteintes en août ( $21,6 \pm 1,4^\circ\text{C}$ ). Les températures mesurées sur le Riou-Viou sont quasiment toujours inférieures de  $2^\circ\text{C}$  à celles du Riou-Mort. Les concentrations en oxygène dissous dans les eaux, fluctuant autour de  $7,6 \pm 2,2\text{mgO}_2/\text{L}$  sur les deux années de l'étude, assurent une oxygénation satisfaisante et favorable au développement algal. Ajoutons que les apports en silice (concentrations comprises entre 4,5 et 14  $\text{mgSi}/\text{L}$ , avec une moyenne bisannuelle de  $7,8 \pm 2,3\text{mgSi}/\text{L}$ ) sont largement suffisants au développement des diatomées.



Les deux cours d'eau présentent cependant des différences manifestes de physicochimie en termes de conductivité électrique et de disponibilité en nutriments (Figure 30 et Figure 31). Les stations du Riou-Viou sont caractérisées par des eaux de conductivité faible ( $240 \pm 50 \mu\text{S/cm}$  à Moulin) à relativement importantes ( $980 \pm 370 \mu\text{S/cm}$  à Usine), alors que les valeurs mesurées sur le Riou-Mort sont fréquemment très élevées ( $1400 \pm 900 \mu\text{S/cm}$ ), avec des pics pouvant atteindre  $4500 \mu\text{S/cm}$  (à Decazeville en octobre 2005). Ces valeurs considérables sont attribuables à l'origine géologique du cours d'eau (le Riou-Mort prend sa source sur des terrains permien et draine des sols sédimentaires du Carbonifère), mais plus vraisemblablement à la localisation des sites à l'aval de l'agglomération de Decazeville. En effet, quelques centaines de mètres en amont de la station Decazeville se trouve une laverie, suspectée de jouer un rôle dans le relargage de solutions fortement minéralisées dans le cours d'eau.

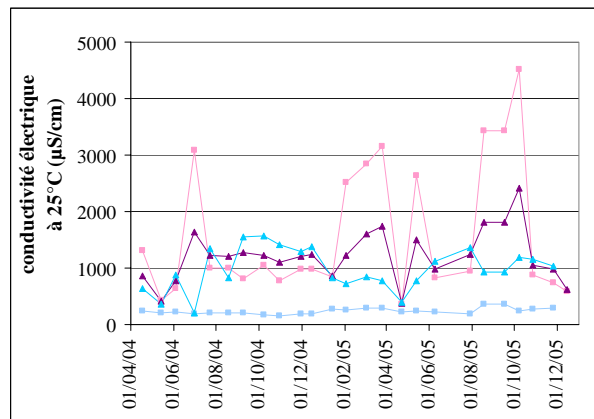


Figure 30 : Conductivités électriques mesurées *in situ* aux dates de prélèvement des échantillons de périphyton.

La disponibilité de la ressource nutritive constitue de plus un facteur discriminant majeur entre les deux cours d'eau. Les formes biodisponibles de l'azote et du phosphore sont en effet très peu présentes à Moulin ( $0,6 \pm 0,8 \text{mgN}_{\text{kjel}}/\text{L}$  ;  $0,07 \pm 0,07 \text{mgP}/\text{L}$ ), un peu plus importantes à Usine, à l'aval de l'agglomération de Viviez ( $1,2 \pm 0,58 \text{mgN}_{\text{kjel}}/\text{L}$  ;  $0,10 \pm 0,05 \text{mgP}/\text{L}$ ) ; toutefois ces concentrations sont bien inférieures à celles mesurées sur le Riou-Mort ( $3,4 \pm 2,2 \text{mgN}_{\text{kjel}}/\text{L}$ ,  $0,56 \pm 0,44 \text{mgP}/\text{L}$ ). Les eaux du Riou-Viou, comparées à celles du Riou-Mort, sont faiblement impactées par l'anthropisation. En revanche, les stations de Decazeville et Joanis, situées à l'aval de l'agglomération, reçoivent une pollution organique relativement importante. Entre Decazeville et Joanis, la dilution par les apports du Riou-Viou ne suffit pas à compenser ce niveau de contamination, auquel s'ajoutent les rejets d'une station d'épuration située quelques centaines de mètres à l'amont de la station Joanis.

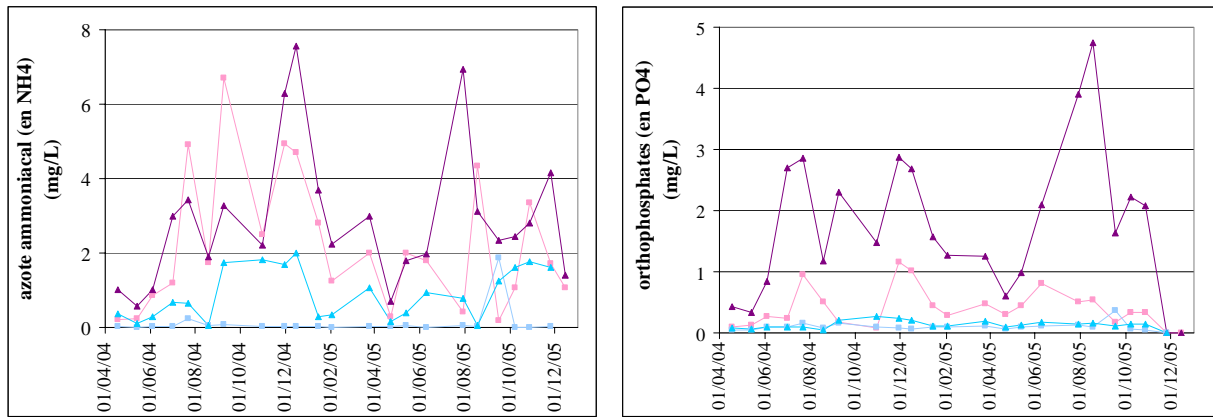


Figure 31 : Disponibilité des ressources nutritives : exemple des concentrations en azote ammoniacal et en orthophosphates mesurées aux dates d'échantillonnage du périphyton.

Les concentrations en cadmium et en zinc mesurées dans les phases dissoute et particulaire (Figure 32) mettent en évidence un gradient amont - aval de la source de contamination métallique. Elles sont :

- quasiment inexistantes à Decazeville ;
- relativement faibles à Moulin ( $0,3 \pm 0,2 \mu\text{gCd/L}$ ,  $20,7 \pm 8,5 \mu\text{gZn/L}$ ,  $31,5 \pm 13,5 \text{mgCd/kg}$  et  $1580 \pm 430 \text{mgZn/kg}$ ) ;
- très au-delà des seuils de "très mauvaise qualité" selon les qualifications du SEQ-Eaux superficielles<sup>1</sup> au niveau des stations aval, à Usine ( $35,4 \pm 20,7 \mu\text{gCd/L}$ ,  $1315 \pm 808 \mu\text{gZn/L}$ ,  $393 \pm 178 \text{mgCd/kg}$  et  $16300 \pm 7800 \text{mgZn/kg}$ ) ainsi qu'à Joanis ( $25,9 \pm 14,7 \mu\text{gCd/L}$ ,  $1515 \pm 990 \mu\text{gZn/L}$ ,  $639 \pm 307 \text{mgCd/kg}$  et  $14800 \pm 5700 \text{mgZn/kg}$ ).

Les valeurs élevées en cadmium et zinc observées ici concordent avec les gammes de concentrations mesurées sur des fenêtres d'observation plus longues (la station Joanis fait l'objet d'un suivi régulier des géochimistes de l'UMR EPOC depuis 2000). Pendant la période étudiée, l'augmentation des concentrations en métaux dissous est corrélée à la réduction des débits, l'année 2004 / 2005 ayant connu un automne et un hiver exceptionnellement secs (données hydrologiques de la DIREN). Les concentrations en métaux dans la phase particulaire, en revanche, sont relativement stables sur l'intervalle de temps étudié, les pics estivaux mis à part. Ces valeurs anormalement élevées sont vraisemblablement dues à la présence, dans les prélèvements analysés, de paillettes métalliques, ce qui gonfle artificiellement la concentration mesurée (Schäfer 2006, *comm. pers.*).

<sup>1</sup> La version 1 du SEQ-Eaux superficielles fixe la limite inférieure de "très mauvaise qualité" à  $3 \mu\text{gCd/L}$ ,  $330 \mu\text{gZn/L}$ ,  $7 \text{mgCd/kg}$  et  $680 \text{mgZn/kg}$ .

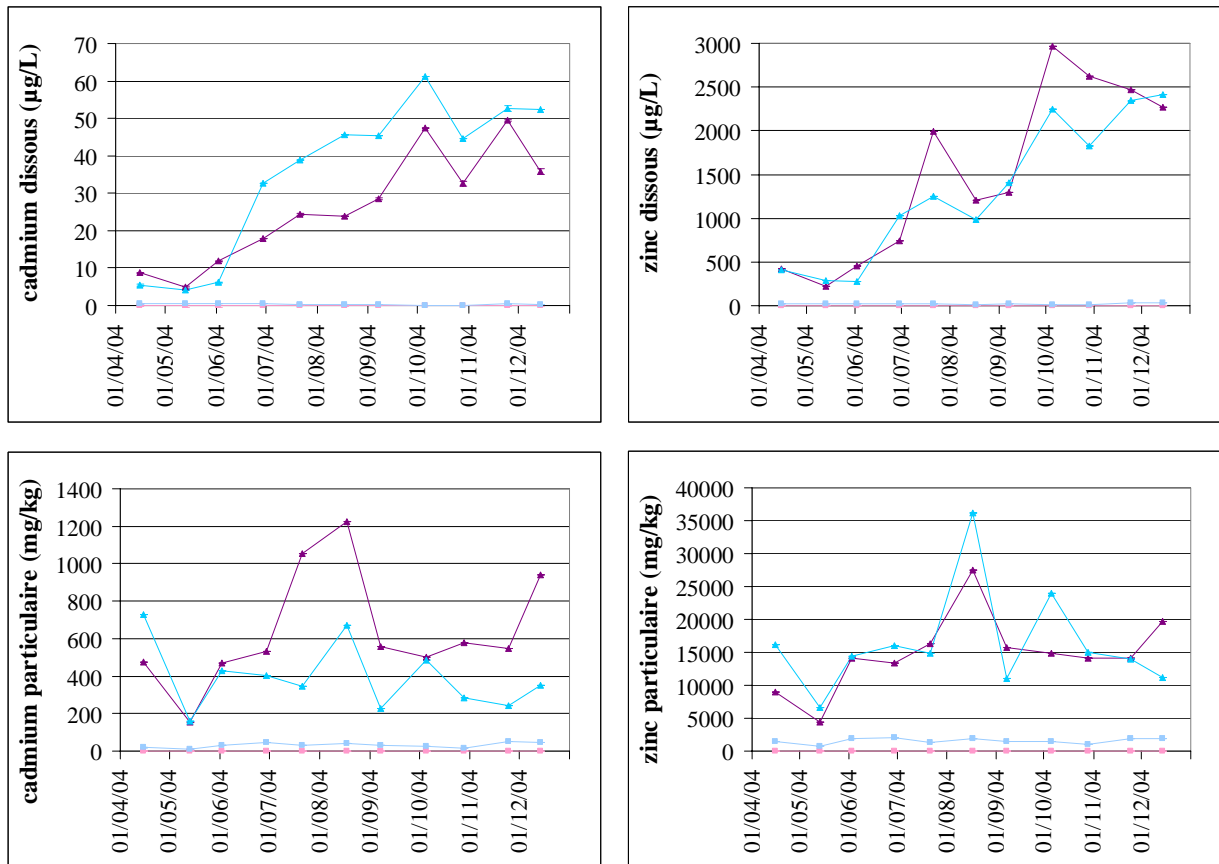


Figure 32 : Concentrations en cadmium et en zinc dans les phases dissoute et particulaire déterminées sur les échantillons d'eau collectés par préleveurs automatiques (données : UMR EPOC, année 2004) pour les dates des campagnes "diatomées".

L'analyse préliminaire des caractéristiques physico-chimiques des eaux révèle ainsi des différences marquées entre le Riou-Mort et le Riou-Viou au travers de paramètres majeurs tels que la conductivité et les concentrations en nutriments. Elle souligne d'autre part l'existence d'un gradient amont - aval de contamination polymétallique, avec des concentrations mesurées à Usine et Joanis très largement supérieures aux niveaux acceptables dans les cours d'eau européens.

### 1.2 – Des biofilms à biomasse très variable.

La production de biomasse algale a été estimée au travers du poids sec, de la matière sèche sans cendre (ou MSSC, *i.e.* la fraction organique de la matière sèche) et de la concentration en pigments chlorophylliens. Les poids secs prennent des valeurs en dents de scie plus ou moins rapprochées (Figure 33) avec des pics de plus de 4,5mg/cm<sup>2</sup>, excepté à Moulin où l'on mesure quelle que soit la date moins de 0,15mg/cm<sup>2</sup>. Pour cette station, la faiblesse des valeurs est vraisemblablement liée à des apports réduits en matières en suspension ainsi qu'à la pauvreté minérale et organique des eaux de la station. En revanche, ni les cycles saisonniers, ni les variations de régime hydrologique, ni même les rares observations de broutage par des oligochètes (sur quelques échantillons de printemps, à Joanis et à Usine) ne suffisent à expliquer les fluctuations importantes de poids sec observées aux autres stations. On remarque des variations semblables dans les valeurs de matière sèche sans cendre, la fraction organique représentant respectivement, pour le Riou-Viou et le Riou-Mort, de  $16 \pm 4\%$  et  $22 \pm 2\%$  en hiver à près de  $50 \pm 12\%$  et  $40 \pm 5\%$  en été, ce qui atténue en partie l'amplitude des fluctuations. Les valeurs de chlorophylle *a* (Figure 33) sont généralement comprises entre 0 et 2mg/cm<sup>2</sup>, avec des pics correspondant à des proliférations d'algues filamenteuses en été.

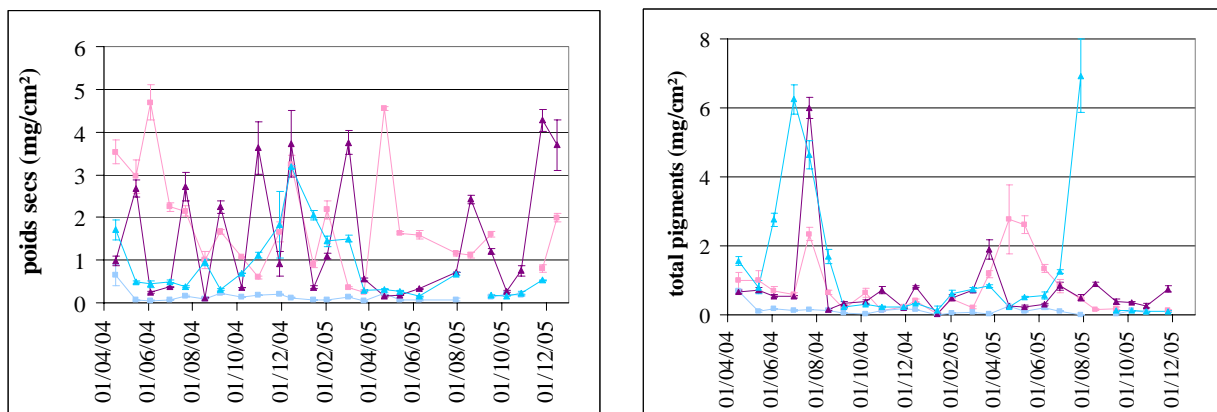


Figure 33 : Valeurs des estimateurs de biomasse : poids sec du biofilm et concentrations en chlorophylle *a*.

L'hétérogénéité spatiale et temporelle non seulement de la distribution des concentrations métalliques dans l'eau et les matières en suspension, mais également d'autres paramètres, notamment la structure des biofilms périphytiques, influencent l'accumulation métallique dans la matrice organique. Sur la période considérée, on a mesuré des concentrations moyennes allant de  $14,9\mu\text{gCd/g}$  de poids sec et  $1974\mu\text{gZn/g}$  de poids sec à Decazeville jusqu'à  $630\mu\text{gCd/g}$  de poids sec à Joanis ou  $16000\mu\text{gZn/g}$  de poids sec à Usine.

## 2- Des assemblages reflétant l'origine du périphyton.

L'atlas des diatomées du bassin versant du Riou-Mort (Morin et Coste 2006a) fournit une description et une iconographie détaillées de toutes les espèces rencontrées lors des campagnes d'échantillonnage de 2004 et 2005. Dans cette partie, nous ne présenterons que les espèces majoritaires des cours d'eau.

### 2.1 – Une structure des assemblages en relation avec le cours d'eau d'origine.

La classification ascendante hiérarchique basée sur les abondances relatives des différentes espèces (Figure 34) met en évidence une séparation assez nette entre les communautés du Riou-Mort et du Riou-Viou. Celles-ci sont caractérisées par un pool commun de taxons, typiques du bassin versant ; des abondances relatives plus élevées d'espèces particulières différencient les deux cours d'eau (Tableau 3). Notons ici que c'est avant tout le cours d'eau d'origine qui permet la séparation en deux clusters ; le niveau de contamination métallique influe dans un second temps sur la composition spécifique des assemblages.

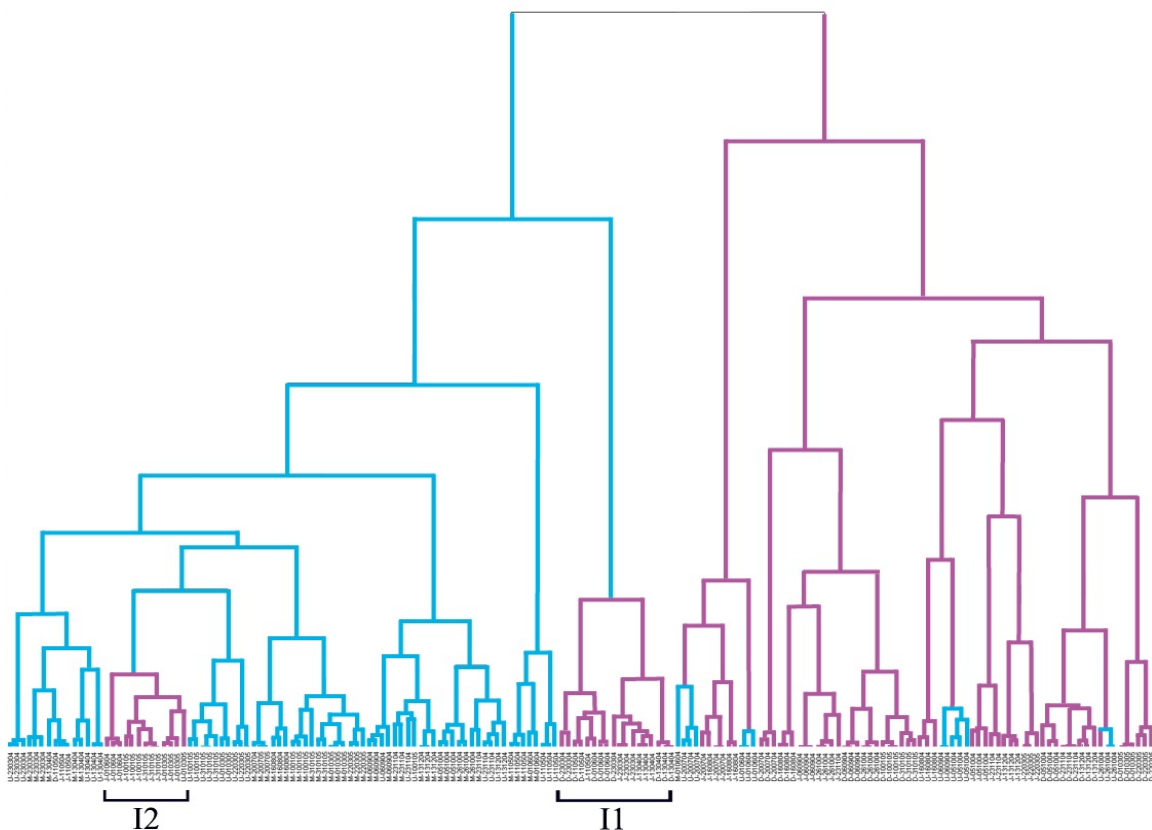


Figure 34 : Classification ascendante hiérarchique réalisée sur la base des abondances relatives des espèces de diatomées échantillonnées sur le Riou-Mort (en mauve) et le Riou-Viou (en bleu) lors des campagnes 2004-2005.

La plupart des taxons inventoriés lors de cette étude sont relativement courants dans les eaux françaises. La structure des assemblages, principalement liée aux caractéristiques physico-chimiques du milieu dans lequel on les retrouve, semble ici fortement conditionnée par les paramètres conductivité électrique et disponibilité en nutriments. Ceux-ci ont effectivement été identifiés comme variables fortement structurantes dans la distinction entre Riou-Mort et Riou-Viou. Les assemblages du Riou-Mort sont ainsi dominés notamment par les espèces *Gomphonema parvulum* var. *parvulum* f. *parvulum*, *Navicula (dicta) seminulum*, *Navicula veneta*, *Nitzschia palea* et *Ulnaria ulna*, identifiées par Tison *et al.* (2005b) comme espèces caractéristiques d'assemblages rencontrés en milieu impacté dans les hydroécotones à conductivité élevée et à forte contamination organique. Les communautés du Riou-Viou sont, elles, dominées par des espèces typiques de milieux plus ou moins impactés à faible conductivité électrique : *Achnanthydium subatomus*, *Encyonema minutum*, *Fragilaria gracilis* et *Navicula cryptocephala* (Tison *et al.* 2005b).

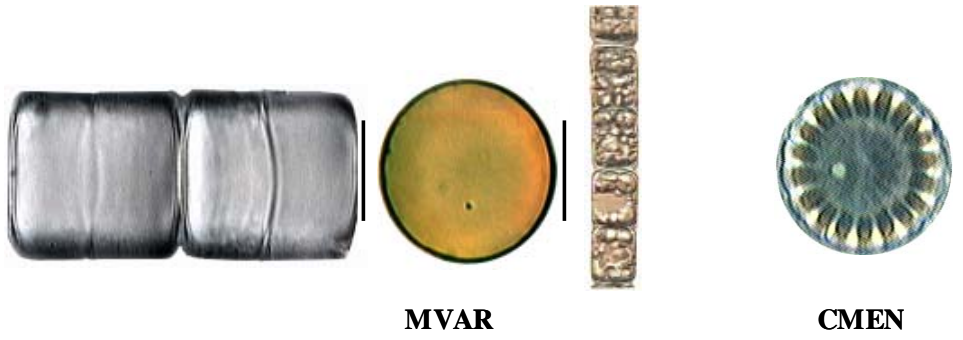
On observe sur la Figure 34 deux inclusions notables (notées I1 et I2) d'inventaires provenant du Riou-Mort dans la branche du cluster regroupant les échantillons du Riou-Viou. Ainsi, le sous-cluster figuré par le I1 est très différent de la partie contenant les échantillons du Riou-Viou, et plus encore des flores habituellement retrouvées dans le Riou-Mort. Ceci traduit une modification importante de la structure des communautés à Decazeville et à Joanis au printemps 2004, marquée par une prolifération d' *Achnanthydium minutissimum* et *Encyonema minutum*, par une représentation réduite de *Cyclotella meneghiniana*, *Navicula (dicta) seminulum* et *Navicula veneta*, ainsi que par une légère diminution des abondances relatives de *Nitzschia palea* et *Ulnaria ulna*. L'inclusion notée I2 des inventaires de Joanis pendant l'hiver 2004 / 2005 est à relier aux conditions hydrologiques hivernales. A cette période en effet, les débits du Riou-Mort amont ont été fortement réduits, la station Joanis était alors principalement alimentée par les eaux du Riou-Viou, ce qui explique les similitudes de composition des assemblages de la station Joanis avec ceux du Riou-Viou : on y retrouve des espèces comme *A. minutissimum*, *E. minutum*, *Fragilaria capucina* var. *capucina* ou *F. gracilis* dans des abondances bien plus élevées qu'aux autres dates de prélèvement. Notons également la disparition conjointe de *Pinnularia parvulissima*, taxon d'ordinaire très caractéristique de la station Joanis.

Tableau 3 : Espèces dominantes inventoriées lors des campagnes d'échantillonnages 2004-2005 sur le Riou-Mort et le Riou-Viou.

	Référence planche
<b>Espèces communes au Riou-Mort et au Riou-Viou</b>	
<i>Achnanthydium saprophila</i> (ADSA)	2
<i>Amphora pediculus</i> (APED)	4
<i>Cocconeis placentula</i> var. <i>placentula</i> (CPLA)	2
<i>Fragilaria ulna</i> var. <i>acus</i> (FUAC)	1
<i>Melosira varians</i> (MVAR)	3
<i>Navicula viridula</i> var. <i>rostellata</i> (NVRO)	5
<i>Nitzschia dissipata</i> (NDIS)	5
<i>Nitzschia linearis</i> var. <i>linearis</i> (NLIN)	2
<i>Planothidium frequentissimum</i> (PLFR)	4
<i>Rhoicosphenia abbreviata</i> (RABB)	
<b>Espèces rencontrées préférentiellement à l'aval du Riou-Mort et du Riou-Viou</b>	
<i>Eolimna minima</i> (EOMI)	2
<i>Pinnularia globiceps</i> (PGLO)	4
<i>Surirella brebissonii</i> (SBRE)	5
<b>Espèces caractéristiques du Riou-Mort</b>	
<i>Gomphonema olivaceum</i> var. <i>olivaceum</i> (GOLI)	4
<i>Gomphonema parvulum</i> var. <i>parvulum</i> f. <i>parvulum</i> (GPAR)	4
<i>Navicula lanceolata</i> (NLAN)	3
<i>Ulnaria ulna</i> (UULN)	1
<b>Espèces rencontrées préférentiellement en amont du Riou-Mort</b>	
<i>Cyclotella meneghiniana</i> (CMEN)	1
<i>Navicula gregaria</i> (NGRE)	3
<i>Nitzschia palea</i> (NPAL)	5
<i>Navicula (dicta) seminulum</i> (NVDS)	2
<i>Navicula veneta</i> (NVEN)	3
<i>Nitzschia acicularis</i> (NACI)	5
<b>Espèces rencontrées préférentiellement à l'aval du Riou-Mort</b>	
<i>Pinnularia parvulissima</i> (PPVS)	4
<i>Surirella angusta</i> (SANG)	5
<b>Espèces caractéristiques du Riou-Viou</b>	
<i>Achnanthydium minutissimum</i> (ADMI)	2
<i>Encyonema minutum</i> (ENMI)	4
<i>Fragilaria capucina</i> var. <i>capucina</i> (FCAP)	1
<i>Nitzschia fonticola</i> (NFON)	5
<i>Planothidium lanceolatum</i> (PLAN)	2
<b>Espèces rencontrées préférentiellement en amont du Riou-Viou</b>	
<i>Achnanthydium subatomus</i> (ADSU)	2
<i>Navicula cryptocephala</i> (NCRY)	3
<b>Espèce rencontrée préférentiellement à l'aval du Riou-Viou</b>	
<i>Fragilaria gracilis</i> (FGRA)	1

**CENTRIQUES**

**Pl. 1**



**PENNÉES**

**- Araphidées**

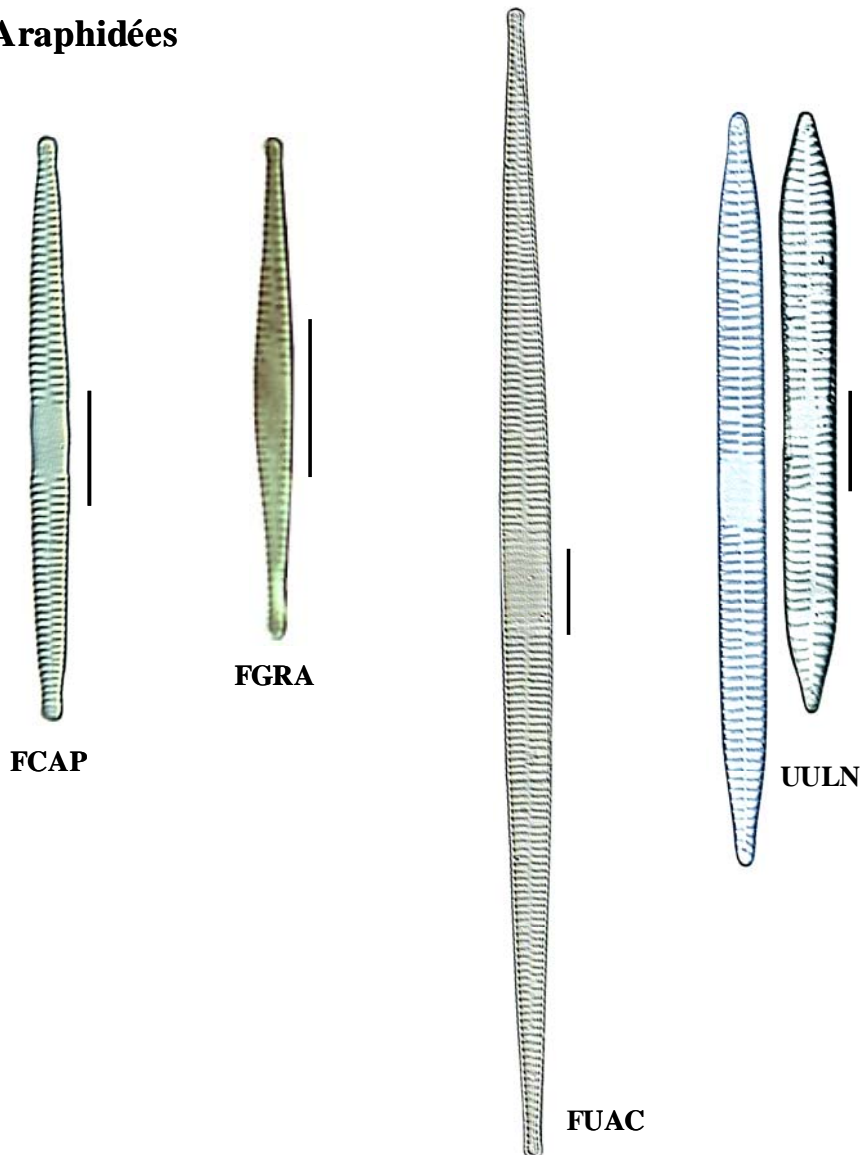
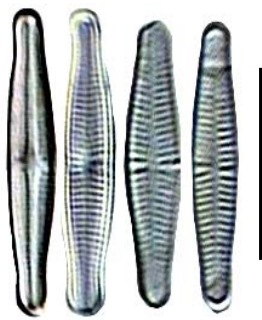


Figure 35 : Espèces majoritaires inventoriées sur le bassin versant du Riou-Mort (campagnes 2004-2005). Microphotographies issues de Coste (1999).



- Monoraphidées

Pl. 2



ADMI



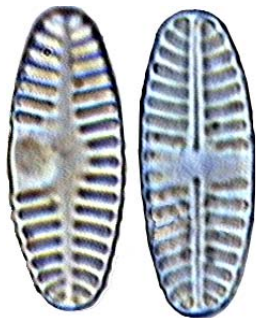
ADSA



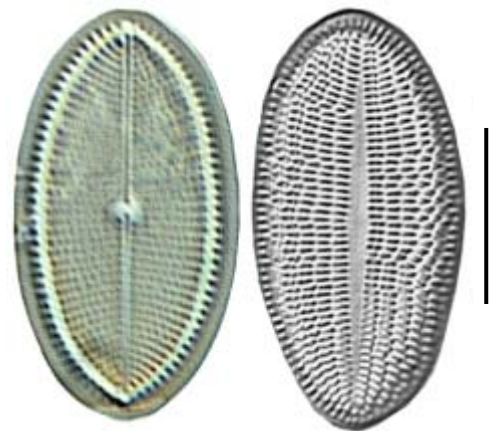
ADSU



PLFR

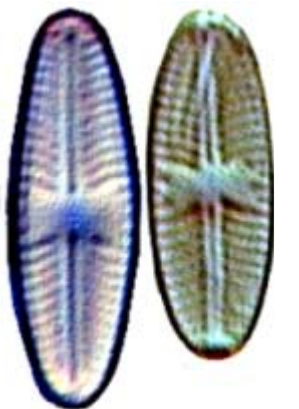


PTLA

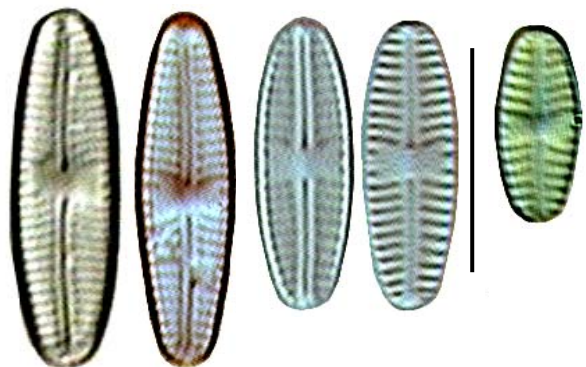


CPLA

- Biraphidées



EOMI



NVDS

Figure 35 (suite).

- Biraphidées (suite)

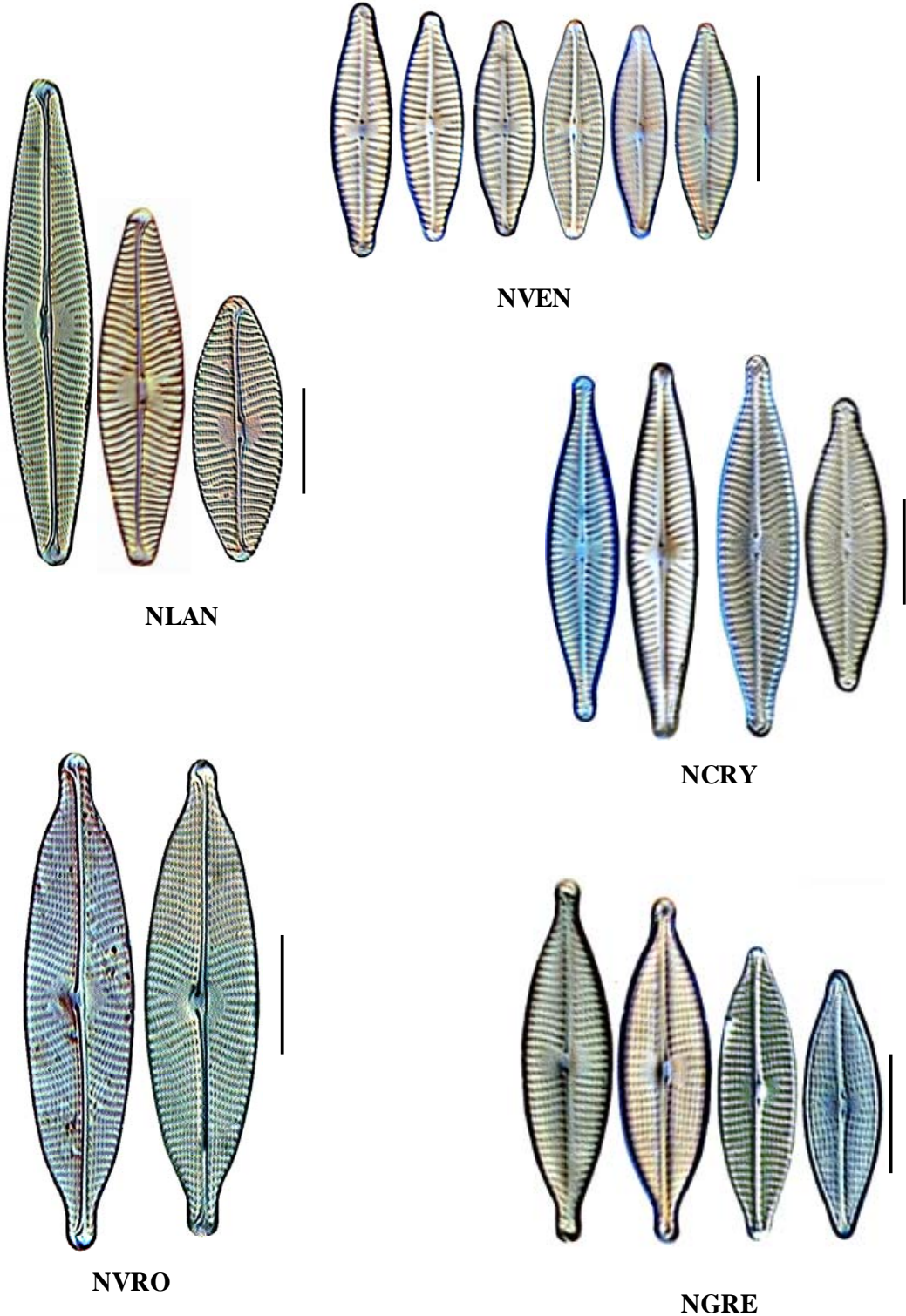


Figure 35 (suite).

- Biraphidées (suite)

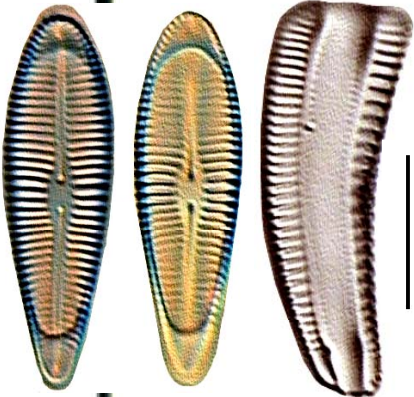
Pl. 4



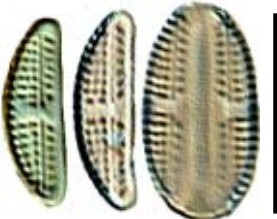
PGLO



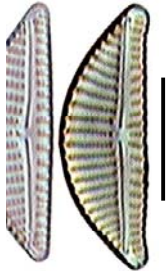
PPVS



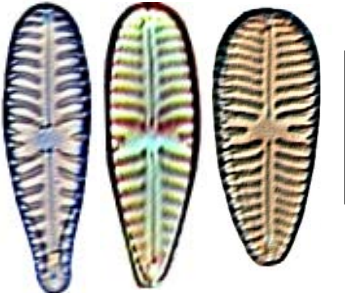
RABB



APED



MI



GOLI

GPAR

Figure 35 (suite).



- Biraphidées (suite)

Pl. 5

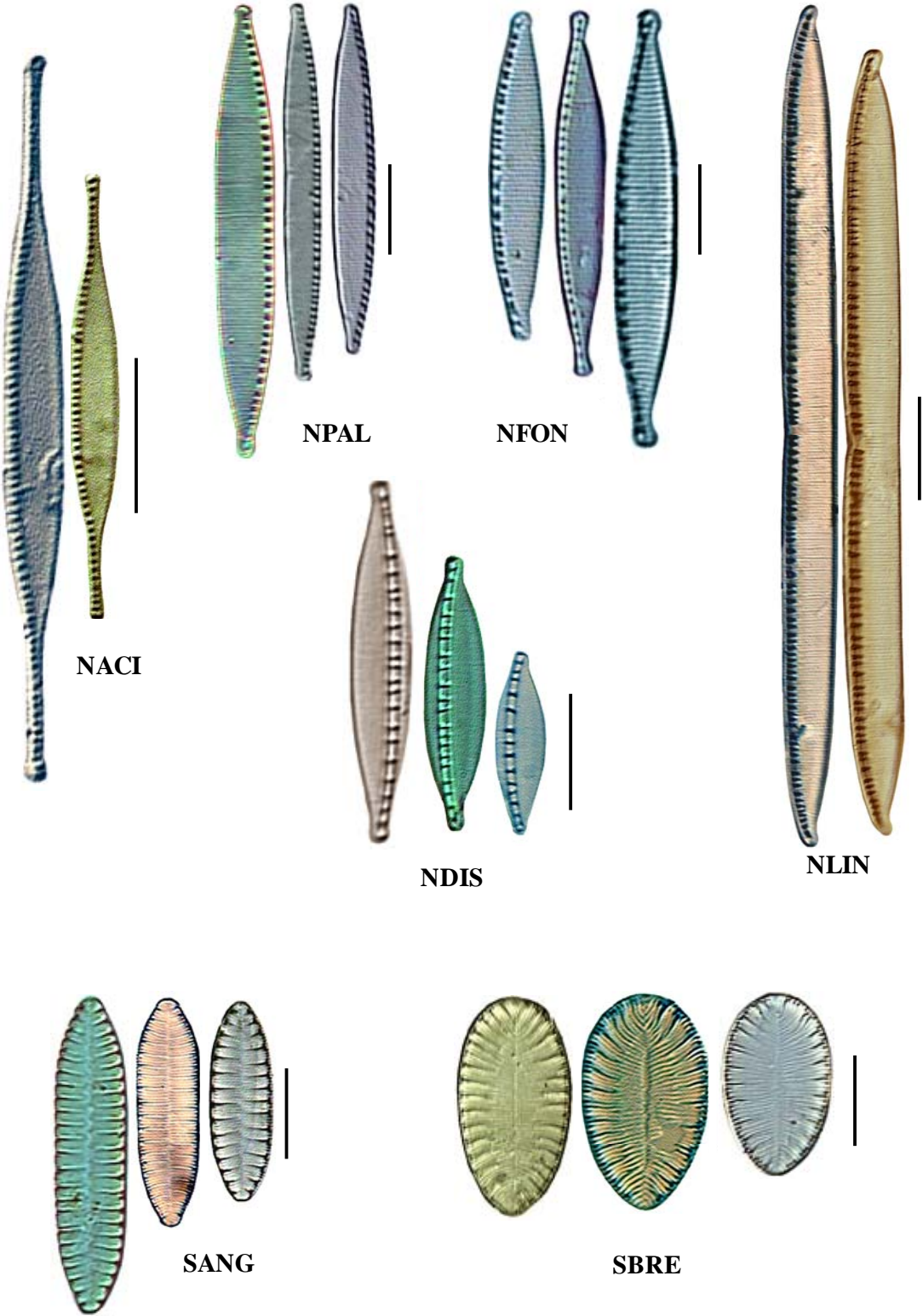


Figure 35 (suite).

## 2.2 – Quelques espèces dominantes en conditions d'exposition métallique (Cd / Zn).

Le cluster présenté en Figure 34 révèle des différences majeures dans la structure des communautés diatomiques, en relation directe avec la physicochimie (conductivité, concentrations en nutriments) de terrain. Cependant, une analyse plus approfondie de la composition des assemblages souligne la présence, à l'aval de la source de contamination métallique, d'espèces particulières en proportions majoritaires. Ainsi, l'espèce *Eolimna minima*, commune aux deux cours d'eau, est présente en abondances relatives plus élevées aux stations Usine et Joanis qu'à Moulin ou Decazeville. Cette espèce, fréquemment reportée dans des milieux impactés par les métaux (Peres *et al.* 1997, Gold *et al.* 2002, Feurtet-Mazel *et al.* 2003, Szabó *et al.* 2005), est considérée aux Etats-Unis comme un indicateur fort de contamination métallique (Bahls 2005, *comm. pers.*). Les espèces du genre *Surirella*, et particulièrement *S. angusta*, sont également reportées comme tolérantes à la présence de métaux dans le milieu (Takamura *et al.* 1989, Gold *et al.* 2002, Feurtet-Mazel *et al.* 2003, Ferreira Da Silva *et al.* unpubl.).

Les espèces *Pinnularia globiceps* var. *globiceps* et *Pinnularia parvulissima*, dont la distribution géographique est relativement restreinte, constituent l'originalité principale des assemblages du bassin versant, et semblent également typiques d'une contamination métallique. L'espèce *P. parvulissima*, souvent identifiée comme *P. gibba*, a été dénombrée en abondances remarquables dans les cours d'eau exposés à de fortes concentrations en métaux lourds, dont le cadmium et le zinc (Admiraal *et al.* 1999b, Gomez et Licursi 2003).

La quantité considérable d'information recueillie au travers des nombreuses campagnes d'échantillonnage réalisées nous permet de caractériser globalement les conditions de milieu rencontrées dans le bassin versant et les communautés diatomiques qui s'y développent.

Nous avons choisi de nous intéresser plus particulièrement à la station Joanis, station pour laquelle nous disposons des données classiques mesurées lors de nos campagnes, mais également de données hydrologiques précises (la station fait l'objet d'un suivi de la DIREN) et de données historiques concernant le niveau de contamination métallique.

### 3- Variabilité saisonnière et inter-annuelle : exemple de la station Joanis sur le Riou-Mort aval.

---

#### Long-term survey of heavy-metal pollution, biofilm contamination and diatom community structure in the Riou-Mort watershed, South West France <sup>1</sup>

Morin, S.<sup>a,b\*</sup>, Duong, T.T.<sup>a,b</sup>, Dabrin, A.<sup>c</sup>, Coynel A.<sup>c</sup>, Herlory, O.<sup>b</sup>, Baudrimont, M.<sup>b</sup>, Delmas, F.<sup>a</sup>, Durrieu, G.<sup>b</sup>, Schäfer, J.<sup>c</sup>, Winterton P.<sup>d</sup>, Blanc G.<sup>c</sup>, Boudou, A.<sup>b</sup>, Coste, M.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Unité de Recherche Réseaux, Epuration et Qualité des Eaux, Cemagref, 50 avenue de Verdun, F-33612 Cestas.

<sup>b</sup> Equipe Géochimie et Ecotoxicologie des Métaux dans les systèmes Aquatiques GEMA, UMR 5805 EPOC, Université Bordeaux 1, Place du Docteur Bertrand Peyneau, F-33120 Arcachon.

<sup>c</sup> Equipe Géochimie et Ecotoxicologie des Métaux dans les systèmes Aquatiques GEMA, UMR 5805 EPOC, Université Bordeaux 1, Avenue de Facultés, F-33405 Talence.

<sup>d</sup> Université Paul Sabatier – Toulouse III, 118 route de Narbonne, F-31062 Toulouse Cedex 4.

#### Abstract:

In a metal-polluted stream in the Riou-Mort watershed in SW France, periphytic biofilm was analyzed for diatom cell densities and taxonomic composition, dry weight and metal bio-accumulation (cadmium and zinc). Periphytic diatom communities were affected by the metal but displayed induced tolerance, seen through structural impact (dominance of small, adnate species) as well as morphological abnormalities particularly in the genera *Ulnaria* and *Fragilaria*. Species assemblages were characterized by taxa known to occur in metal-polluted environments, and shifts in the community structure expressed seasonal patterns: high numbers of *Eolimna minima*, *Nitzschia palea* and *Pinnularia parvulissima* were recorded in Summer and Autumn, whereas the species *Surirella brebissonii*, *Achnantheidium minutissimum*, *Navicula lanceolata* and *Surirella angusta* were dominant in Winter and Spring. Commonly used indices such as the Shannon diversity index and Specific Pollution sensitivity Index reflected the level of pollution and suggest seasonal periodicity, the lowest diversities being observed in Summer.

#### Capsule:

Periphytic biofilm diatom communities are suitable indicators for the bioassay of elevated levels of metals in contaminated river water.

---

<sup>1</sup> Article soumis à *Environmental Pollution* en septembre 2006.

**Keywords:**

Geochemical survey; Cd; Zn; Metal bioaccumulation; Biofilms; Periphytic diatoms; Valve abnormalities

**1. Introduction**

The Gironde estuary exhibits a polymetallic pollution which has notable consequences on the biota in the coastal zone; the estuary has been classified as “zone D” by the National Observation Network (RNO), i.e. it is forbidden to harvest oysters for consumption, production or purification. The most important source of cadmium is located in the former zinc ore treatment area of Decazeville, in the Riou-Mort watershed, a small tributary of the Lot River (Boutier et al. 1989, Latouche 1992). Although metal emissions in the source zones have clearly decreased during the last two decades (Audry et al. 2004c), Zn and Cd concentrations in water and suspended particulate matter (SPM) still are important (Coynel 2005). Moreover, decreasing acceptable threshold concentrations for seafood (e.g. Cd:  $<5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , dry weight; European Community, 2002) and the historically high levels of metal in the Lot River sediments (Audry et al. 2004), strengthen the potential socio-economic impact of the Cd pollution, (e.g. for oyster production at Marennes-Oléron, ~30 km north of the mouth of the Gironde estuary).

Biomonitoring is a powerful tool for assessing aquatic ecosystem health further to physical and chemical analyses. It involves organisms that are likely to reveal the environmental changes brought about by natural and anthropogenic phenomena. In freshwater environments, periphytic algal assemblages are the main primary producers. As they are composed of a large number of species with various ecological tolerances, and due to their position in the foodweb and their short life cycle, they are powerful ecological indicators. However, few field studies have been carried out to characterize the alterations occurring in periphytic communities owing to long-term metal contamination. Most of the surveys performed one to four samplings per year (Foster 1982, Lindstrøm et Rørslett 1991, McFarland et al. 1997, Hill et al. 2000a, Sabater 2000), but studies on periphyton based on monthly sampling frequencies are rare (Takamura et al. 1990, Nakanishi et al. 2004). In the present experiment, a long-term geochemical and diatom survey was conducted from April 2004 to March 2005 at a highly metal-polluted site on the Riou-Mort River. Our approach aimed to relate benthic community structure to metal exposure. Cadmium and zinc concentrations were measured in water, suspended particulate matter (SPM) and in the biofilm to characterize the geochemical behaviour of Cd and Zn and

their impact on bioaccumulation kinetics. Benthic communities are described through diatom assemblages, applying the Specific Pollution sensitivity Index (SPI, Coste *in* Cemagref 1982) and the Biological Diatom Index (Lenoir and Coste, 1996; nationally standardized in 2000, NF T90-354) commonly used for routine biomonitoring in France. The taxonomic composition of the assemblages, commonly used indices (SPI, Shannon index) and the frequency of morphological aberrations occurring in some diatom species were determined and discussed as a response to metal contamination.

## 2. Material and methods

### 2.1. Study site

The Riou-Mort River (watershed area: 155 km<sup>2</sup>) drains the Decazeville area known for polymetallic pollution due to former open-cast coal mining and Zn ore treatment. The mean annual discharge of the Riou-Mort River at the studied site, Joanis, was ~1.9 m<sup>3</sup>·s<sup>-1</sup> during 2000-2003 and ~0.98 m<sup>3</sup>·s<sup>-1</sup> during the study period (March 2004 to March 2005, data from the DIREN: French regional environment department).

The experimental site on the Riou-Mort River, which is located close to the outlet of the watershed and downstream from the former ore treatment site (Figure 1), receives cadmium- and zinc- enriched water from this pollutant source (Boutier et al. 1989, Latouche 1992).

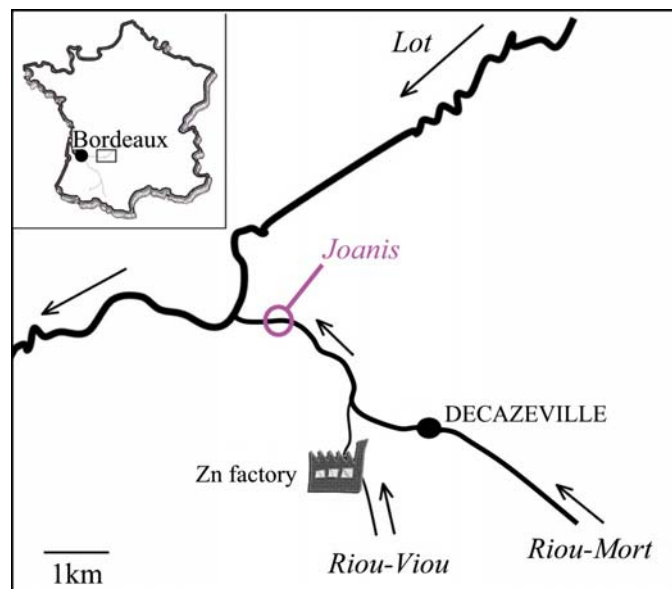


Fig. 1: Study site.



## 2.2. Sampling and sample analyses

### 2.2.1. Stream water physicochemical parameters

Temperature, pH, conductivity and dissolved oxygen were measured in the river every 24 days (WTW, Weilheim, Germany), during the 13-month experimental period (March 2004 to March 2005).

Two-litre stream water samples were simultaneously collected and brought back to the laboratory for nutrient measurements. Phosphate, silica, ammonium, nitrite and nitrate concentrations were determined according to French and international standards (NF T90-023, NF T90-007, NF EN ISO 11732 and NF EN ISO 13395, respectively).

Water and SPM for trace metal analysis were sampled every 24 days using clean techniques. All materials in contact with the water samples were made of polypropylene (PP), carefully decontaminated as previously detailed in Audry et al. (2004). The dissolved phase was sampled using an acid pre-cleaned PP bottle (1 L), previously rinsed with the river water of the site. Water samples were filtered immediately through 0.2 µm Nucleopore<sup>®</sup> polycarbonate filters in a glove box (laboratory van). Filtrates were collected in an acid-washed PP bottle after thoroughly rinsing it with an aliquot of the filtrate, acidified (0.1% ultrapure HNO<sub>3</sub>, Merck, Darmstadt, Germany) and stored in the dark at 4°C until analysis (Blanc et al. 1999).

Particulate matter for trace element analyses was retrieved by pumping up to 200 L of river water (1 m from the bank at 0.3 m depth) using an all PP-pump with PP-tubing followed by centrifugation (Westfalia, Oelde, Germany; 12,000 g). This technique is considered a practicable and reliable method for SPM sampling in all hydrological situations (Lapaquellerie et al. 1996, Schäfer et Blanc 2002).

Daily cumulative 1-liter samples of river water consisting of 8 subsamples taken at regular time intervals (every three hours) were obtained using an automated sampling system (SIGMA 900P, American Sigma, Hach, Loveland, Colorado). The samples were recovered every 24 days and filtered through preweighed 0.7 µm glassfiber filters (Whatman GF/F) to obtain daily SPM concentrations (Schäfer et al. 2002, Coynel et al. 2004). During low and/or stable hydrological conditions, water aliquots and SPM of up to six daily samples were then cumulated and were considered representative of up to a six day-period whereas samples representing particular hydrological events (e.g. floods, high SPM concentrations) were analyzed separately. Cumulative or isolated samples were filtered in the laboratory using 0.2 µm Sartorius<sup>®</sup> polycarbonate filters. Filtrates were collected in 60 cc polypropylene

bottles, previously decontaminated and thoroughly rinsed with the filtrate, acidified ( $\text{HNO}_3$  ultrapure grade; 1:1000) and stored at  $4^\circ\text{C}$  until analysis (Schäfer et al. 2002).

Representative sub-samples (30 mg of dry, powdered and homogenized material) were digested in closed Teflon reactors (Savillex<sup>®</sup>) using 750  $\mu\text{L}$   $\text{HCl}$  (12 M, suprapur), 250  $\mu\text{L}$   $\text{HNO}_3$  (14 M, suprapur) and 2 mL  $\text{HF}$  (22 M, suprapur). The reactors were then heated to  $110^\circ\text{C}$  for 2 h. After complete cooling, the solutions were evaporated to dryness and then brought to 10 mL using 150  $\mu\text{L}$   $\text{HNO}_3$  (suprapur) and ultrapure (Milli-Q<sup>®</sup>) water (Blanc et al. 1999, Audry et al. 2005).

Dissolved and particulate metals were measured using ICP-MS (X7, THERMO) with external calibration. Indium was used as internal standard and after each batch of five samples, a calibration blank and one calibration standard were measured to check potential sensitivity variations or memory effects. The analytical methods employed were continuously quality checked by analysis of certified reference sediments (PACS-1, BCR 320, SL-1) and river waters (SLRS-3, SLRS-4). Accuracy was within 5% of the certified values and the analytical error (relative standard deviation) was generally better than 5% for concentrations ten times higher than detection limits.

### 2.2.2. Biofilm characteristics

Biofilms were grown on glass slides (total surface area reaching  $300\text{ cm}^2$ ) used as artificial substrates (Figure 2). After a 24-day immersion, the slides were removed from the water and scraped into a standardized volume of 200 mL mineral water. Three replicate samples per sampling date were collected and separated into aliquots.

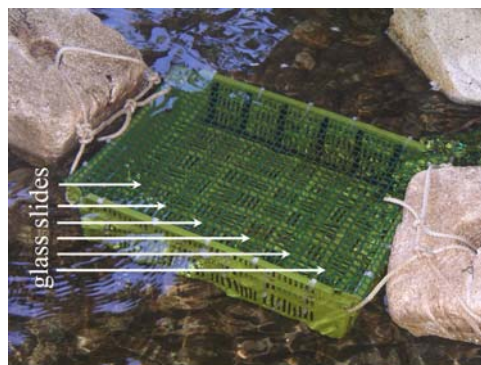


Fig. 2: Artificial substrates used for algal attachment.

Another aliquot of 20 mL was used for particulate matter analysis: biofilm dry weights (DW) were determined following the European standard NF EN 872. After filtration through pre-weighed glass fibre filters (Sartorius, Göttingen, Germany), samples were dried at 105°C for 1 hour. The amount of material retained (i.e. biofilm DW, as expressed in  $\text{mg}\cdot\text{cm}^{-2}$  glass substrate) was determined by re-weighing.

Aliquots of 20 mL were used for metal measurements (cadmium and zinc). Periphyton samples were filtered with an aspiration pump, through a pre-weighed metal-free filter paper (0.45  $\mu\text{m}$  membrane, Millipore) to obtain the dry weight (DW) of each sample after drying at 60°C for 48 hours in incubation tubes. Then, the filters were digested using nitric acid (3 mL of  $\text{HNO}_3$  65%) in a pressurized container at 100° C for 3 hours (hot block CAL 3300, Environmental Express, USA). Digestates were then diluted with ultra-pure water (Milli Q, Bedford, MA, USA), and Cd and Zn concentrations measured by flame atomic absorption spectrometry (Varian AA20), with a detection limit of 15  $\mu\text{gCd}\cdot\text{L}^{-1}$  and 10  $\mu\text{gZn}\cdot\text{L}^{-1}$ . The validity of the method was checked periodically by parallel analysis of certified biological reference materials (Tort 2 – lobster hepatopancreas and Dolt 2: dogfish liver from NRCC – CNRC, Ottawa, Canada). Reference samples were measured in triplicate. Values for Cd and Zn were consistently within the certified ranges for each metal and each standard reference (data not shown).

Finally, 5 mL were preserved in a formalin solution for quantitative counting and diatom identifications to the species level. Enumeration was done in each sample using a Nageotte counting chamber: the total number of cells counted in 10 fields (1.25 $\mu\text{L}$  each, 0.5mm depth) using light microscopy at 400x magnification (photomicroscope Leica DMRB, Wetzlar, Germany) was then recorded as cells per unit area of sampled substrate (number of diatom cells $\cdot\text{cm}^{-2}$ ). Samples assigned to taxonomic analysis of diatom assemblages were prepared according to ANSP (Academy of Natural Sciences of Philadelphia) protocols (Charles et al. 2002), *i.e.* digestion in boiling hydrogen peroxide (30%  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) and hydrochloric acid (35%) followed by three cycles of centrifugation of the sample and pellet rinsing with distilled water. After the last treatment, the pellet was once again resuspended in distilled water, and this solution was pipetted onto coverslips which were mounted onto slides after air drying, using the high refractive index (1.74) medium Naphrax© (Brunel Microscopes Ltd, UK). Diatom counts were conducted at a magnification of 1.000x; individual fields were scanned until at least 400 valves had been identified using specialized literature (Krammer and Lange-Bertalot

1986 - 1991) from which theoretical biovolumes of each species were also extracted. Diatom species diversity was calculated using the Shannon index  $H' = -\sum p_i \cdot \log_2 p_i$  (where  $p_i$ : relative abundances of species  $i$ , Shannon and Weaver 1949). Individual deformities (cells with abnormal general shape and / or diatoms with deformed valve wall ornamentation) were observed and their frequency determined.

### ***2.2.3. Statistical analyses***

Major differences in physicochemical parameters between sampling dates were investigated using Principal Components Analysis (PCA) performed with PC-ORD software (McCune and Mefford, 1999). Accumulation rates of metals in the biofilm as well as correlations between DW and diatom densities were determined by linear regression on the raw data set and tested for statistical significance. Regression least-squares assumptions (homoscedasticity and normality of the error term) were checked using the residual term (Levene test and  $\chi^2$  and Kolmogorov-Smirnov goodness-of-fit tests). Commonly used indices (SPI, Shannon index) were calculated using OMNIDIA software (Lecointe et al. 1993). Statistical significance of metal contents in biofilm and particulate matter was examined using analysis of variance. For all statistical results, a probability of  $p < 0.05$  was considered significant. Values are mean  $\pm$  standard error (SE).

## **3. Results**

### ***3.1. Field colonization conditions***

#### ***3.1.1. Physical and chemical characteristics***

The sampling site is next to a permanent station of the regional environment department (DIREN), measuring water levels for discharge observation. The hydrological evaluation of the experimental period is based on the data available at <http://hydro.rnde.tm.fr/>. The mean water discharge for this period is  $1.5 \pm 2.0 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ , and the study period is quite representative of the situation observed for several years. Typical, short flood events occurred in winter, when discharge reached  $54 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$  in mid-March.

The physical and chemical parameters measured in the sampled waters are shown in Table 1. During this study, water had a uniform pH (around  $7.7 \pm 0.3$ ) and silica levels were found at concentrations sufficient for diatom development. Temperature showed strong seasonal variations, ranging from about 5 °C in March to almost 25 °C in July. Accordingly, dissolved oxygen level was minimum during the summer. Nutrient values differed greatly among sampling dates. Located downstream of the urban area of Decazeville, the Joanis site is strongly impacted by quite high levels of organic and domestic contamination (Lemaire et al. 2006): orthophosphates as well as high levels of ionic forms of nitrogen (nitrates, nitrites and ammonia; Table 1). Average conductivity values were quite high ( $1130 \pm 320 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) during almost the whole observation period and drastically decreased to  $414 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  in May.

Table 1: Physicochemical parameters measured in stream waters at each sampling date (n.m: not measured).

	pH	temperature (°C)	conductivity ( $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ )	dissolved oxygen ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	$\text{NO}_3$ ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	$\text{NO}_2$ ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	$\text{NH}_4$ ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	$\text{PO}_4$ ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	Si ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	discharge ( $\text{m}^3\cdot\text{s}^{-1}$ )	dissolved Cd ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	particulate Cd ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )	dissolved Zn ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	particulate Zn ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )
04/15/04	8.2	12.4	867	9.3	15.6	0.4	1.0	0.4	8.0	1.4	15.2	198	1490	5750
05/13/04	7.8	14.2	414	8.9	9.5	0.2	0.6	0.3	9.0	4.2	7.6	220	353	10 000
06/02/04	7.9	17.7	780	8.8	8.6	0.5	1.0	0.8	10.0	0.9	17.1	447	551	15 000
07/21/04	7.5	24.8	1220	n.m.	36.0	1.3	3.4	2.9	12.5	0.1	23.6	273	1300	6230
08/17/04	7.5	20.9	1210	n.m.	7.3	0.5	1.9	1.2	13.0	4.7	27.3	1340	1980	15 400
09/07/04	7.3	21.9	1280	5.7	71.3	1.6	3.3	2.3	12.0	4.9	44.5	455	2590	12 300
10/06/04	7.5	19.3	1220	4.8	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	0.1	57.8	917	2800	18 300
10/27/04	7.0	13.2	1110	8.3	6.8	1.6	2.2	1.5	11.0	0.1	43.8	568	2460	14 300
11/24/04	7.8	9.3	1200	7.2	41.4	1.2	6.3	2.9	8.5	0.2	47.6	613	2990	15 800
12/15/04	7.6	7.0	1240	9.0	38.6	1.2	7.6	2.7	12.0	0.2	46.9	412	2505	14 600
01/11/05	7.8	6.7	862	9.6	22.1	0.5	3.7	1.6	9.5	0.2	30.1	662	1320	16 200
02/02/05	7.8	6.1	1230	8.9	18.5	0.4	2.2	1.3	8.0	0.5	19.7	463	903	9200
03/03/05	8.0	4.5	1600	9.6	25.5	0.75	2.9	0.9	10.5	0.5	16.7	343	477	13 600

### *3.1.2. Dissolved and particulate metal concentrations*

The average dissolved Cd and Zn concentrations in the samples obtained every 24 days and filtered immediately after sampling ranged from 5.2 to 49.2  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (average 26.2  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) and from 259 to 2965  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (average 1458  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), respectively (Table 1). The dissolved Cd and Zn concentrations measured in samples retrieved by the automatic sampling system and filtered after several days of storage in the sampling containers ranged from 0.223 to 54.3  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (average 22.2  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) and from 28.0 to 3490  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (average 1280  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ; data not shown), respectively. Average particulate metal concentrations in SPM sampled manually and automatically ranged from 170 to 1160  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  (average 560  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) for Cd and from 4750 to 26540  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  (average 13 120  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) for Zn. No clear differences in particulate metal concentrations obtained from the two sample types were observed.

### *3.1.3. Seasonal variability*

We applied the PCA method to a data matrix of 13 months observed on 14 variables. These presentations based on stream physicochemical parameters (Figure 3) revealed great differences between four groups of sampling dates and underlined the seasonal gradient. The results of this analysis showed that the first two principal components mainly account for more than 60 % of the total variability. For this reason, due to the number of variables, the projection in a plane spanned by the first two principal components explains the structure of the data with a good clarification power. It is worth noting that the same tendencies were observed in plane 1-3.

Axis 1 separated Winter and Spring samples on the right-half plane (positive values) and Summer and Autumn water on the left-half plane (negative values). Separation along Axis 2 expressed the differences between water collected in Spring and Summer on the one hand, and those sampled in Autumn and Winter on the other hand. PCA discriminated sampling dates according to the most important seasonal characteristics. Summer samples were correlated with high temperatures and strong particulate metal contamination levels while Winter samples were characterized by low temperatures and the highest dissolved oxygen concentrations as well as elevated turbidity. Autumn samples exhibited the highest levels of dissolved metals and nutrients, with nitrate concentrations reaching 71  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  in September 2004 (Table 1).

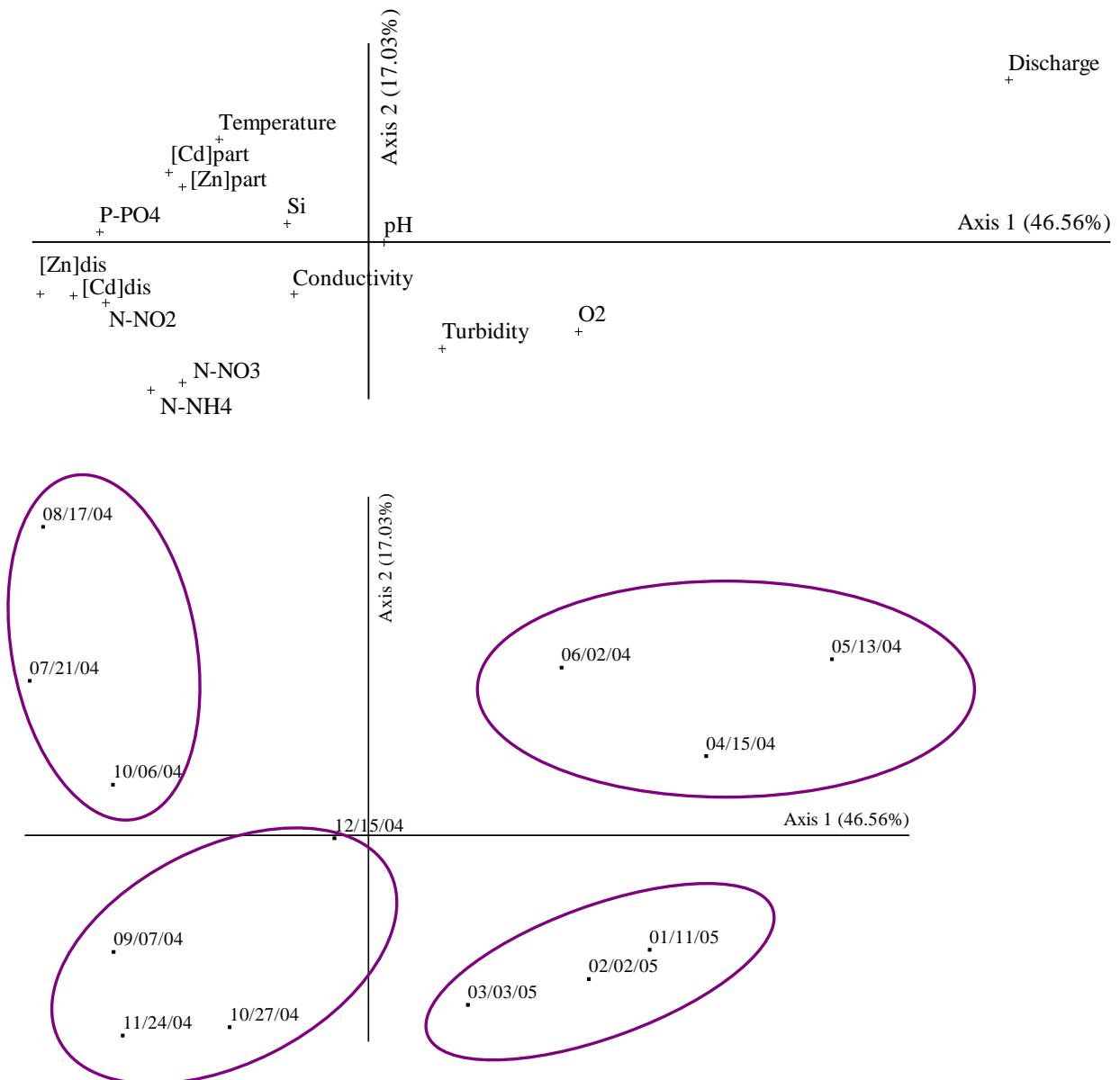


Fig. 3: Principal Components Analysis (PCA) of physicochemical stream characteristics.

### 3.2. Biofilm characteristics and structure of diatom assemblages

#### 3.2.1. Trace metal concentrations in the biofilm.

The concentration of the metals Cd and Zn that had accumulated in biofilm are presented in Table 2. They varied considerably throughout the experiment. Zn was very high in July ( $23\,750 \pm 2470 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) whereas Cd was elevated during summer from June to August, October and December. The highest values of Cd content in biofilm were observed in August with an average of around  $1809 \pm 200 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ . There were strong relationships between metal

concentrations in biofilm and those in SPM (Figure 4). In fact, biofilm Cd and Zn concentrations showed significant linear regressions (Cd:  $R^2=0.71$ ,  $F_{cal}=26.8$ ,  $p<0.05$  and Zn:  $R^2=0.46$ ,  $F_{cal}=9.4$ ,  $p<0.05$ ) with the respective concentrations in SPM.

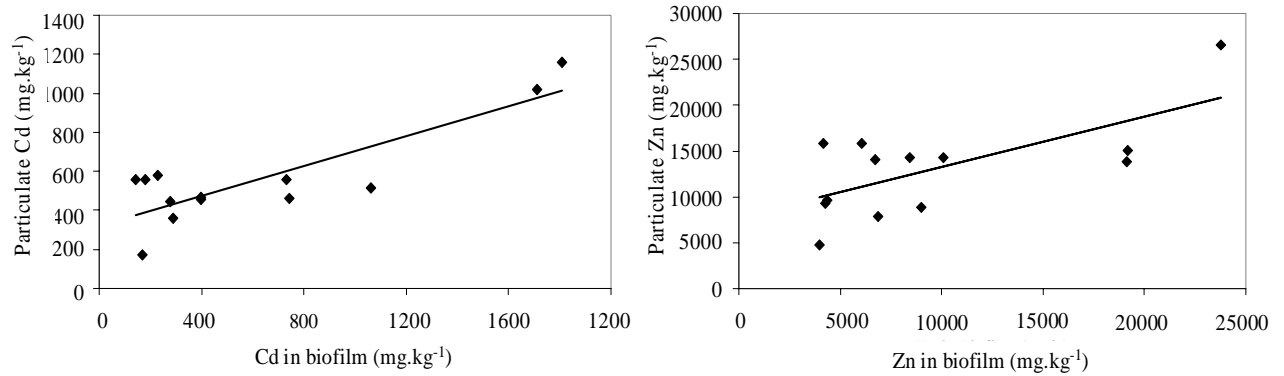


Fig. 4: Relationships between metal concentrations in the water particular phase and in the biofilm.

Table 2: Biofilm and diatom assemblages characteristics (mean value  $\pm$  SE).

	dry weight ( $\text{mg}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	density ( $\text{cell}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	cadmium ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{DW}$ )	zinc ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{DW}$ )	species richness	Shannon index	SPI value	deformed valves (%)
04/15/04	$0.97 \pm 0.11$	$13\ 800 \pm 520$	$278 \pm 34$	$9007 \pm 274$	$66 \pm 1$	$4.63 \pm 0.06$	$12.4 \pm 0.2$	$14.6 \pm 7.4$
05/13/04	$2.68 \pm 0.20$	$11\ 860 \pm 590$	$170 \pm 2$	$3958 \pm 41$	$67 \pm 3$	$4.57 \pm 0.32$	$13.2 \pm 0.2$	$12.5 \pm 8.1$
06/02/04	$0.25 \pm 0.03$	$11\ 920 \pm 500$	$743 \pm 31$	$19\ 149 \pm 1014$	$62 \pm 2$	$4.63 \pm 0.11$	$10.5 \pm 0.2$	$32.4 \pm 8.0$
07/21/04	$2.72 \pm 0.33$	$19\ 870 \pm 390$	$1711 \pm 65$	$4171 \pm 181$	$46 \pm 5$	$3.51 \pm 0.47$	$9.2 \pm 2.4$	$11.8 \pm 6.8$
08/17/04	$0.12 \pm 0.01$	$3650 \pm 1550$	$1809 \pm 201$	$23\ 750 \pm 2469$	$48 \pm 4$	$3.81 \pm 0.34$	$9.0 \pm 2.2$	$10.6 \pm 4.6$
09/07/04	$2.24 \pm 0.15$	$15\ 600 \pm 500$	$143 \pm 8$	$6070 \pm 225$	$66 \pm 2$	$4.79 \pm 0.10$	$10.9 \pm 0.8$	$6.1 \pm 2.6$
10/06/04	$0.36 \pm 0.00$	$14\ 380 \pm 750$	$1062 \pm 542$	$19\ 166 \pm 70$	$58 \pm 6$	$4.15 \pm 0.41$	$7.8 \pm 2.0$	$3.7 \pm 0.8$
10/27/04	$3.63 \pm 0.62$	$26\ 250 \pm 2520$	$228 \pm 4$	$6714 \pm 290$	$67 \pm 1$	$4.66 \pm 0.04$	$10.2 \pm 1.4$	$5.8 \pm 3.1$
11/24/04	$0.91 \pm 0.30$	$5760 \pm 100$	$180 \pm 39$	$10\ 062 \pm 379$	$61 \pm 1$	$4.27 \pm 0.20$	$8.4 \pm 2.2$	$5.1 \pm 2.3$
12/15/04	$3.73 \pm 0.78$	$27\ 450 \pm 1430$	$729 \pm 20$	$8446 \pm 108$	$60 \pm 8$	$4.57 \pm 0.36$	$9.1 \pm 2.4$	$7.7 \pm 3.3$
01/11/05	$0.37 \pm 0.03$	$2240 \pm 410$	$399 \pm 89$	$6885 \pm 1235$	$77 \pm 2$	$5.17 \pm 0.04$	$12.0 \pm 1.9$	$4.2 \pm 2.2$
02/02/05	$1.09 \pm 0.08$	$6174 \pm 340$	$287 \pm 5$	$4239 \pm 67$	$68 \pm 5$	$4.96 \pm 0.14$	$12.5 \pm 1.7$	$1.8 \pm 1.1$
03/03/05	$3.75 \pm 0.28$	$4171 \pm 80$	$399 \pm 2$	$4348 \pm 4$	$73 \pm 3$	$5.17 \pm 0.03$	$11.5 \pm 0.2$	$9.7 \pm 1.6$



3.2.2. Species composition and standing crop

The results of the quantitative measurements of periphytic biomass, as expressed by dry weight and cell density, are shown in Table 2 and reveal a positive correlation between mean dry weights and mean densities ( $p < 0.05$ ). Average cell densities during this one-year experiment were  $\sim 12\,200 \pm 2000 \text{ cell}\cdot\text{cm}^{-2}$ . The significant peaks that were observed for cell densities (see 3.2.3. Seasonal variations) were concomitant with peaks in biofilm dry weights.

Diatom assemblages were characterized by an association of Naviculaceae, Nizschiaceae and Araphideae, the most abundant species being *Eolimna minima* (Grunow) Lange-Bertalot (16.4% of the total annual standing crop), *Nitzschia palea* (Kützing) W. Smith (7.0%) and *Pinnularia parvulissima* Krammer (6.8%). During the study, 255 species were identified; the most abundant and frequent are presented with their individual biovolumes in Table 3.

Table 3: Average relative abundances (R.A., %) of most diatom species at each sampling date.

	<i>Achnantheidium minutissimum</i>	<i>Cyclotella manenghiniana</i>	<i>Eolimna minima</i>	<i>Navicula gregaria</i>	<i>Navicula lanceolata</i>	<i>Nitzschia palea</i>	<i>Pinnularia parvulissima</i>	<i>Surirella angusta</i>	<i>Surirella brebissonii</i> var. <i>brebissonii</i>
Biovolume ( $\mu\text{m}^3$ )	76	1240	88	485	1230	391	2650	1820	2650
R.A. (%)									
04/15/04	4.1	0.2	3.5	12.7	18.0	2.3	0.0	1.0	12.4
05/13/04	6.8	0.0	3.7	20.3	15.3	1.9	0.0	0.3	3.8
06/02/04	8.7	0.2	14.7	7.9	10.8	6.9	0.1	1.6	3.5
07/21/04	0.5	18.7	36.3	2.0	1.0	9.0	4.0	0.5	0.3
08/17/04	2.0	21.3	16.4	2.4	2.4	5.3	8.0	0.3	0.8
09/07/04	1.0	4.0	20.8	1.0	0.7	11.9	34.7	0.1	0.7
10/06/04	1.7	10.9	20.4	2.2	1.2	6.3	9.3	1.0	0.6
10/27/04	1.6	6.2	15.4	0.8	1.0	13.1	18.6	1.7	0.7
11/24/04	1.2	3.0	10.0	0.6	1.4	7.1	16.0	20.9	0.3
12/15/04	6.4	3.7	14.1	2.3	1.0	4.8	2.7	3.2	0.3
01/11/05	8.4	4.1	12.4	4.0	0.9	5.6	0.5	1.6	0.7
02/02/05	5.0	3.8	7.5	7.7	1.6	3.8	0.2	6.7	1.6

Various valve abnormalities affecting general cell shape and/or valve ornamentation were observed in a total of 28 species representing 17 genera, with frequencies reaching 3.2% in June 2004. Malformations (Figure 5) were more often observed in genera such as *Ulnaria*

(53% of the teratologies enumerated), *Fragilaria* (23%) and some Raphids (22%) than in others (e.g. abnormal valves of *Cocconeis pediculus* Ehrenberg, *C. placentula* Ehrenberg and *Planothidium frequentissimum* (Lange-Bertalot) Lange-Bertalot represented together less than 2%).

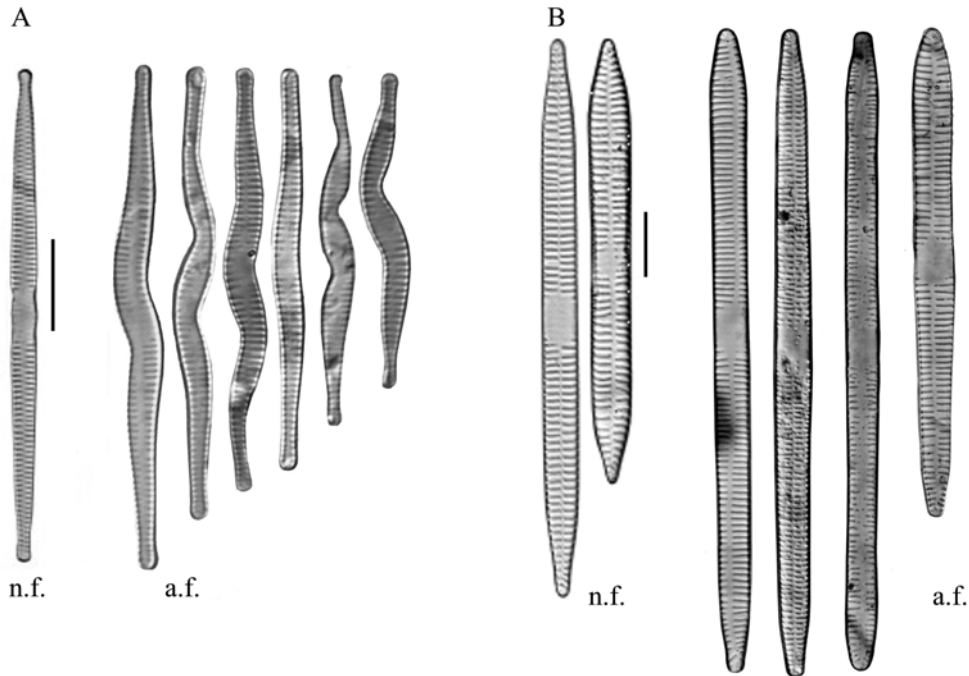


Fig 5: Morphological variants of *Fragilaria capucina* var. *gracilis* (A) and *Ulnaria ulna* (B) originated from Joanis (n.f.: normal forms, a.f.: abnormal forms, scale bar: 10µm)

### 3.2.3. Seasonal variations

Seasonal variations of the periphytic biomass and diatom cell densities are reported in Table 2. Dry weights and cell densities displayed a similar seasonal pattern with significant peaks in July, September, October and December 2004.

Calculations of indices also exhibited seasonal variations. For example, SPI values were generally from 8 to 10, except for spring values which reached up to 13. Species diversity was generally lowest in summer, when only 40-50 taxa were enumerated. The highest Shannon index values were observed in winter and peaked to 5.17 in January and March 2005.

We also observed seasonal cycles of the principal species: *E. minima*, *N. palea*, *P. parvulissima* and *Cyclotella meneghiniana* Kützing were dominant in Summer and Autumn. The species *Surirella brebissonii* Krammer & Lange-Bertalot var. *brebissonii*, *Achnantheidium minutissimum* (Kützing) Czarnecki, *Navicula lanceolata* (Agardh) Ehrenberg and *Surirella angusta* Kützing reached peak abundances in Winter and Spring.

## **4. Discussion**

### ***4.1. Geochemical scenario***

The average dissolved metal concentrations in the cumulated samples were ~30% lower than average values in the manually retrieved and immediately filtered samples. This may partly be due to sorption onto the container walls and/or onto SPM in the samples during the storage period (up to 24 days) in the automatic sampling system. However, these samples integrate 8 sub-samples per day over 5-6 days including possible diurnal variations due to urban and/or industrial activities in the watershed. Therefore, these samples may be more representative of real conditions integrated by the biofilms, than the samples taken by hand during the daytime every 24 days. However, given the generally very high dissolved Cd and Zn concentration levels compared to uncontaminated sites (data not shown), the observed differences between the different sample types are probably not relevant for the interpretation of the biofilm response to metal exposure (see below).

The observed relatively high dissolved and particulate Cd and Zn concentration levels are typical for the Riou-Mort River, i.e. similar to the concentration ranges observed during our permanent observation (since 2000) at the same site. Indeed, these levels are 2-3 orders of magnitude higher than those measured in the Riou-Mort River tributaries (e.g. the Riou-Viou, Enne and Banel Rivers) upstream from the former mining and ore treatment area (Coyne 2005). An important part of the metal load in the Riou-Mort River has been attributed to sulphide oxidation of Zn ore treatment residues (Audry et al. 2005). However, hydrological variations may induce complex responses in dissolved metal concentrations due to dilution effects, leaching of diverse industrial residues and changing interactions between groundwater and surface water (Coyne 2005). During the period studied, dissolved metal concentrations tended to increase with decreasing discharge. In contrast, SPM were mainly derived from erosion processes and transported during short floods. Therefore, particulate metal concentrations depend on the particle type, source and to a lesser extent on sorption processes, i.e. exchanges between the dissolved and the particulate phases (Coyne 2005). During the period studied, particulate metal fluxes were relatively low due to the atypically dry autumn and winter season 2004/2005 (DIREN; data not shown).

#### ***4.2. Metal bioaccumulation in biofilms***

The present study shows that high levels of Cd and Zn accumulated in biofilm at Joanis station of the Riou-Mort River. High levels of metals of this area have been documented in several studies (Andres et al. 1999, Audry et al. 2005). This result suggested that metals can be detected reliably by measuring metals content in biofilm. High levels of trace elements have been reported to be accumulated by natural biofilm in acute metal pollution conditions (Ivorra et al. 1999) and it has been suggested that biofilm could serve as a biological monitor for anthropogenic waste (Newman et al. 1985, Hill et al. 2000b). The metals contained in biofilm were used to provide an indication of both the biological availability of metals and their ambient concentrations over relatively long periods (Foster 1982, Behra et al. 2002). Our results revealed a significant correlation between metal concentration in biofilm and SPM in contrast to several reports concluding that metal concentrations in water samples reflected metal concentration in biofilm (Ivorra et al. 1999, Behra et al. 2002). The reason may be that the metals accumulated in biofilm are contained into two fractions i.e. the biotic (algae, bacteria) and abiotic (silt, particulate matter) components of the biofilm. High positive correlations were found between intracellular metal content in biofilm and the exchangeable sediment fraction for Cd, Cu and Zn metals (Holding et al. 2003). Metal levels in periphyton generally parallel those found in surface sediments at the same sites (Ramelow et al. 1992). Accumulation of metals has been suggested to depend on natural variation of their concentration (Meylan et al. 2003). Further studies should be performed to better understand metal accumulation processes within the periphyton both in short-term and long-term metal exposure.

#### ***4.3. Diatom community responses to heavy metal contamination***

##### ***4.3.1. Characterization of the community structure***

We established that biofilm dry weights and diatom densities are correlated. This means that, instead of counting the number of cells per unit area, which is too elaborate and time consuming for routine biomonitoring programs, further shifts in standing crop at Joanis may be assessed through DW measurements. Interpretation of DW and density data in the present study is however quite difficult, because they are highly dependent on nutrient and toxicant concentrations as well as on natural disturbances. For example, high discharge may scour the

substrate and possibly lead to erroneous estimates of the number of organisms present (Ghosh and Gaur 1998). It cannot be excluded that the size of the standing crop is influenced by grazing from invertebrates and fish, which can complicate interpretation.

SPI values indicated a moderate to poor quality status of the waters sampled. Water quality assessed by the SPI index probably reflects the nutrient contamination level rather than metal concentrations, although it is also known to be sensitive to micropollutants in some cases. The low values of the SPI index may not be considered as a specific indication of the metal pollution level, there is a need to combine these data with further information. According to species richness or Shannon index values, the best time for sampling diatoms is Summer, as Winter samples as well as those collected in Spring and Autumn may contain too many species with less defined dominance (John 2000). Micropollutant alterations are probably best estimated in Summer i.e. under extreme conditions, typically exhibiting lowest discharges and highest metal concentrations.

Low average biovolume ( $1200 \mu\text{m}^3$  per cell), inferred from individual biovolumes and relative abundances, expressed the dominance of species like *E. minima* or *A. minutissimum*. Although several authors have reported such small, adnate species to present the highest abundances in metal-polluted environments (Medley and Clements 1998, Cattaneo et al. 2004), very few studies have attempted to link community biovolume to metal contamination. Size reduction of the global community (compared to the non-exposed communities found upstream, Morin et al. 2006) appeared to be an excellent specific indicator of metal contamination, more compatible with routine biomonitoring than measurements of individuals, which necessitates an additional counting effort.

#### 4.3.2. Sensitivities of algal species

The majority of the commonly occurring species in the Riou-Mort River are quite cosmopolitan in distribution and their ecological preferences in this experiment were consistent with those described in the literature. Indeed, most of them had already been recorded in metal-contaminated sites. High relative abundances of *E. minima* (in July 2004 this species represented around 50% of the total community) were in accordance with several indications of its tolerance to heavy metals found in the literature (Peres et al. 1997, Gold 2002, Feurtet-Mazel et al. 2003, Szabó et al. 2005). This study also confirmed the resistance of *N. lanceolata* (Szabó et al. 2005), *N. palea* (Peres et al. 1997, Medley and Clements 1998, Lai et al. 2003, Whitton 2003) as well as *S. angusta* (Takamura et al. 1989, Gold 2002, Feurtet-Mazel et al. 2003). The species *P. parvulissima* was found to be tolerant to heavy metals. Many studies

have already revealed the presence of the genera *Pinnularia* (Admiraal et al. 1999, Gold 2002, Hirst et al. 2002; Gomez and Licursi, 2003) exposed to metal contamination. Although the status of *A. minutissimum* is still a matter of debate, Sabater (2000) and Blanck et al. (2003) reporting that it is quite sensitive to metal exposure, many authors have found this species tolerant to heavy metals (Ivorra et al. 2000, Gold et al. 2002, Feurtet-Mazel et al. 2003, Nunes et al. 2003, Cattaneo et al. 2004, Guasch et al. 2004, Nakanishi et al. 2004, Szabó et al. 2005). The presence of *C. meneghiniana* in Summer and Autumn was found quite surprising, since species from the genera *Cyclotella* have been described as metal-sensitive by several authors (Ruggiu et al. 1998 Shehata et al. 1999; van Dam and Mertens 1990); it was probably linked to nutrient availability at this period which favoured this species' development. Although most of these taxa are found in uncontaminated sites as well, their joint presence and co-dominance may be considered as an indicator of metal pollutions.

#### *4.3.3. Interest of valve abnormalities for biomonitoring studies*

Many teratological valves were evidenced during this study. The most difficult types of abnormalities to assess were those involving changes in the sculpting of the valve surface, particularly in small diatom species. This may be attributed to the limited resolution of the photomicroscopes used here, but it may also signify that small species are less susceptible to morphological deformations.

Work on the valve abnormalities has established that both the incidence of abnormal light or the concentration of salts in the growth medium can produce teratological results, which appear identical to the observer. However, several observations have reported extreme changes in valve morphology associated with heavy metal pollution in freshwater environments (e.g. Yang and Duthie 1993, McFarland et al. 1997, Peres 2000, Nunes et al. 2003, Szabó et al. 2005, Morin et al. 2006), in seawater (Thomas et al. 1980, Dickman 1998) and in sediment cores (Ruggiu et al. 1998, Cattaneo et al. 2004). In our case, deformities were undoubtedly related to the acute toxicity of Cd and Zn, the amounts of abnormal diatoms being significantly higher than the "background levels" of deformities found in the upstream Riou-Mort (less than 0.5%). Dickman (1998) and Stevenson and Balhs (1999) have suggested that morphological aberrations are good indicators of heavy metal contaminations. Here, we quantified many abnormal diatoms, but there are two major limitations for their use in routine biomonitoring. Firstly, the observation and enumeration of abnormal valves assumes a good knowledge of diatom taxonomy and hence requires experienced operators. Secondly, deformed cells are found in very low abundances suggesting that a better estimate would be obtained by

increasing the counting effort and by performing abnormality enumerations separately from the taxonomic identifications. This study demonstrates that the rarely reported effects of heavy metals on the morphology of diatoms need to be studied more thoroughly and that diatom morphology may provide an efficient indicator.

## 5. Conclusions

Substantial evidence has been gathered to justify the use of biofilms, and particularly diatoms, as indicators of heavy metal contaminations. This study has shown the general relationship between metal contamination in water and biofilms and confirmed the tolerance to heavy metals of several periphytic species. The distribution patterns of diatoms are influenced by metal contamination at the Joanis site. The present results represent a basis for further studies on biofilms and diatoms as indicators of metal pollution in contaminated watersheds.

## Acknowledgements

The authors would like to thank Henri Bouillard, Cécile Bossy, Véronique Duflo, Naïg Girardot, Gilbert Lavaux and Jean-Pierre Lissalde from the GEMA team for their technical assistance in the field and Muriel Bonnet and Maryse Boudigues from the Cemagref laboratory who carried out the water sample analyses.

## References

- Admiraal W., Blanck H., Buckert- De Jong M., Guasch H., Ivorra N., Lehmann V., Nystrom B.A.H., Paulsson M., Sabater S., 1999. Short-term toxicity of zinc to microbenthic algae and bacteria in a metal polluted stream. *Water Res* 33, 1989-1996.
- Andres S., Baudrimont M., Lapaquellerie Y., Ribeyre F., Maillet N., Latouche C., Boudou A., 1999. Field transplantation of the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* along a polymetallic contamination gradient (river Lot, France): I. Geochemical characteristics of the sampling sites and cadmium and zinc bioaccumulation kinetics. *Environ Toxicol Chem* 18, 2462-2471.
- Audry S., Blanc G., Schäfer J., 2005. The impact of sulphide oxidation on dissolved metal (Cd, Zn, Cu, Cr, Co, Ni, U) inputs into the Lot-Garonne fluvial system (France). *Appl Geochem* 20, 919-931.

- Audry S., Schäfer J., Blanc G., Jouanneau J.-M., 2004. Fifty-year sedimentary record of heavy metal pollution (Cd, Zn, Cu, Pb) in the Lot River reservoirs (France). *Environ Pollut* 132, 413-426.
- Behra R., Landwehrjohann R., Vogel K., Wagner B., Sigg L., 2002. Copper and zinc content of periphyton from two rivers as a function of dissolved metal concentration. *Aquatic Sciences - Research Across Boundaries* 64, 300-306.
- Blanc G., Lapaquellerie Y., Maillet N., Anschutz P., 1999. A cadmium budget for the Lot-Garonne fluvial system (France). *Hydrobiologia* 410, 331-341.
- Blanck H., Admiraal W., Cleven R.F.M.J., Guasch H., van den Hoop M., Ivorra N., Nystrom B., Paulsson M., Petterson R.P., Sabater S., Tubbing G.M.J., 2003. Variability in zinc tolerance, measured as incorporation of radio-labeled carbon dioxide and thymidine, in periphyton communities sampled from 15 European river stretches. *Arch Environ Contam Toxicol* 44, 17-29.
- Boutier B., Chiffolleau J.-F., Jouanneau J.C., Latouche C., Philipps I., 1989. La contamination de la Gironde par le cadmium. Origine, extension, importance. n°14. *Sci Tech. IFREMER*.
- Cattaneo A., Couillard Y., Wunsam S., Courcelles M., 2004. Diatom taxonomic and morphological changes as indicators of metal pollution and recovery in Lac Dufault (Québec, Canada). *J Paleolimnol* 32, 163-175.
- Cemagref, 1982. Etude des méthodes biologiques d'appréciation quantitative de la qualité des eaux. Rapport Q.E. Lyon A.F. - Bassin Rhône-Méditerranée-Corse.
- Charles D.F., Knowles C., Davies R.S., 2002. Protocols for the analysis of algal samples collected as part of the U.S. Geological Survey National Water-Quality Assessment Program. Patrick Center for Environmental Research, The Academy of Natural Sciences, Philadelphia.
- Coyne A., 2005. Erosion mécanique des sols et transferts géochimiques dans le bassin Adour-Garonne., PhD thesis - Univ. Bordeaux I Ecole Doct. Sciences du vivant, Géosciences et Sciences de l'Environnement.
- Coyne A., Schafer J., Hurtrez J.E., Dumas J., Etcheber H., Blanc G., 2004. Sampling frequency and accuracy of SPM flux estimates in two contrasted drainage basins. *Sci Total Environ* 330, 233-247.
- Cunningham L., Stark J.S., Snape I., McMinn A., Riddle M.J., 2003. Effects of metal and petroleum hydrocarbon contamination on benthic diatom communities near Casey Station, Antarctica: An experimental approach. *J Phycol* 39, 490-503.
- Dickman M.D., 1998. Benthic marine diatom deformities associated with contaminated sediments in Hong Kong. *Environ Int* 24, 749-759.



- Feurtet-Mazel A., Gold C., Coste M., Boudou A., 2003. Study of periphytic diatom communities exposed to metallic contamination through complementary field and laboratory experiments. *J Phys IV* 107, 467-470.
- Foster P.L., 1982. Species associations and metal contents of algae from rivers polluted by heavy metals. *Freshwat Biol* 12, 17-39.
- Ghosh M., Gaur J.P., 1998. Current velocity and the establishment of stream algal periphyton communities. *Aquat Bot* 60, 1-10.
- Gomez, N., Licursi, M., 2003. Abnormal forms in *Pinnularia gibba* (Bacillariophyceae) in a polluted lowland stream from Argentina. *Nova Hedwigia* 77, 389-398.
- Gold C., 2002. Etude des effets de la pollution métallique (Cd/Zn) sur la structure des communautés de diatomées périphytiques des cours d'eau. Approches expérimentales *in situ* et en laboratoire. PhD thesis - Univ. Bordeaux I Ecole Doct. Sciences du vivant, Géosciences et Sciences de l'Environnement.
- Gold C., Feurtet-Mazel A., Coste M., Boudou A., 2002. Field transfer of periphytic diatom communities to assess short-term structural effects of metals (Cd,Zn) in rivers. *Water Res* 36, 3654-3664.
- Guasch H., Navarro E., Serra A., Sabater S., 2004. Phosphate limitation influences the sensitivity to copper in periphytic algae. *Freshwat Biol* 49, 463-473.
- Hill B.H., Willingham W.T., Parrish L.P., McFarland B.H., 2000a. Periphyton community responses to elevated metal concentrations in a Rocky Mountain stream. *Hydrobiologia* 428, 161-169.
- Hill W.R., Bednarek A.T., Larsen I.L., 2000b. Cadmium sorption and toxicity in autotrophic biofilms. *Can J Fish Aquat Sci* 57, 530-537.
- Hirst H., Jüttner I., Ormerod S.J., 2002. Comparing the responses of diatoms and macroinvertebrates to metals in upland streams of Wales and Cornwall. *Freshwat Biol* 47, 1752-1765.
- Holding K.L., Gill R.A., Carter J., 2003. The relationship between epilithic periphyton (biofilm) bound metals and metals bound to sediments in freshwater systems. *Environmental Geochemistry and Health* 25, 87-93.
- Ivorra N., Bremer S., Guasch H., Kraak M.H.S., Admiraal W., 2000. Differences in the sensitivity of benthic microalgae to Zn and Cd regarding biofilm development and exposure history. *Environ Toxicol Chem* 19, 1332-1339.

- Ivorra N., Hettelaar J., Tubbing G.M.J., Kraak M.H.S., Sabater S., Admiraal W., 1999. Translocation of microbenthic algal assemblages used for *in situ* analysis of metal pollution in rivers. *Arch Environ Contam Toxicol* 37, 19-28.
- John J., 2000. Diatom prediction and classification system for urban streams. LWRDC, Canberra.
- Krammer K., Lange-Bertalot H., 1986 - 1991. Bacillariophyceae 1. Teil: Naviculaceae. 876 p.; 2. Teil: Bacillariaceae, Epithemiaceae, Surirellaceae, 596 p.; 3. Teil: Centrales, Fragilariaceae, Eunotiaceae, 576 p.; 4. Teil: Achnantheaceae. Kritische Ergänzungen zu *Navicula* (Lineolatae) und *Gomphonema*. 437 p. Süßwasserflora von Mitteleuropa . Band 2/1-4. G. Fischer Verlag., Stuttgart.
- Lai S.D., Chen P.C., Hsu H.K., 2003. Benthic algae as monitors of heavy metals in various polluted rivers by energy dispersive X-ray spectrometer. *J Environ Sci Health, Part A* 38, 855-866.
- Lapaquellerie Y., Maillet N., Jouanneau J.M., Coakley J.P., Latouche C., 1996. Flux de matieres en suspension et de cadmium dans le Lot. *Hydroecol Appl* 8, 173 -191.
- Latouche C., 1992. La pollution par le cadmium des huîtres sauvages de l'Estuaire de la Gironde. Origine. Mécanismes responsables de la fixation du cadmium. *Ichthyophysiol Acta* 15, 139 -152.
- Lecointe C., Coste M., Prygiel J., 1993. Omnidia - Software for taxonomy, calculation of diatom indexes and inventories management. *Hydrobiologia* 269, 509-513.
- Lemaire E., Blanc G., Schäfer J., Coynel A., Etcheber H., 2006. Dissolved Trace Metal-Organic Complexes in the Lot-Garonne River System Determined Using the C18 Sep-Pak System. *Aquatic Geochemistry* 12, 21-38.
- Lenoir, A., Coste, M., 1996. Development of a practical diatom index of overall water quality applicable to the French national water Board network. In: Whitton, B.A., Rott, E., editors. Use of algae for monitoring rivers. *Studia Student, G.m.b.H, Innsbruck*, pp. 29-43.
- Lindstrøm E.-A., Rørslett B., 1991. The effects of heavy metal pollution on periphyton in a Norwegian soft-water river. *Verh Internat Verein Limnol* 24, 2215-2219.
- McCune, B., Mefford, M.J., 1999. Multivariate analysis of ecological data, version 4.01. MJM Software, Gleneden Beach, Oregon USA.
- McFarland B.H., Hill B.H., Willingham W.T., 1997. Abnormal *Fragilaria* spp. (Bacillariophyceae) in streams impacted by mine drainage. *J Freshwat Ecol* 12, 141-149.
- Medley C.N., Clements W.H., 1998. Responses of diatom communities to heavy metals in streams: The influence of longitudinal variation. *Ecol Appl* 8, 631-644.

- Meylan S., Behra R., Sigg L., 2003. Accumulation of copper and zinc in periphyton in response to dynamic variations of metal speciation in freshwater. *Environ Sci Technol* 37, 5204-5212.
- Morin S., Vivas-Nogues M., Duong T.T., Boudou A, Coste M, Delmas F., 2006. Dynamics of benthic diatom colonization in a cadmium/zinc-polluted river (Riou-Mort, France). *Arch Hydrobiol* (in press).
- Nakanishi Y., Sumita M., Yumita K., Yamada T., Honjo T., 2004. Heavy-metal pollution and its state in algae in Kakehashi River and Godani River at the foot of Ogoya mine, Ishikawa prefecture. *Anal Sci* 20, 73-78.
- Navarro E., Guasch H., Sabater S., 2002. Use of microbenthic algal communities in ecotoxicological tests for the assessment of water quality: the Ter river case study. *J Appl Phycol* 14, 41-48.
- Newman M.C., Alberts J.J., Greenhut V.A., 1985. Geochemical factors complicating the use of aufwuchs to monitor bioaccumulation of arsenic, cadmium, chromium, copper and zinc. *Water Res* 19, 1157-1165.
- Nunes M.L., Da Silva E.F., De Almeida S.F.P., 2003. Assessment of water quality in the Caima and Mau River basins (Portugal) using geochemical and biological indices. *Water Air Soil Pollut* 149, 227-250.
- Peres F., 2000. Mise en évidence des effets toxiques des métaux lourds sur les diatomées par l'étude des formes tératogènes. Rapport d'étude, Agence de l'Eau Artois Picardie.
- Peres F., Coste M., Ribeyre F., Ricard M., Boudou A., 1997. Effects of methylmercury and inorganic mercury on periphytic diatom communities in freshwater indoor microcosms. *J Appl Phycol* 9, 215-227.
- Ramelow G.J., Biven S.L., Zhang Y., Beck J.N., Young J.C., Callahan J.D., Marcon M.F., 1992. The identification of point sources of heavy metals in an industrially impacted waterway by periphyton and surface sediment monitoring. *Water, Air, & Soil Pollution* 65, 175-190.
- Ruggiu D., Luglie A., Cattaneo A., Panzani P., 1998. Paleoecological evidence for diatom response to metal pollution in Lake Orta (N. Italy). *J Paleolimnol* 20, 333-345.
- Sabater S., 2000. Diatom communities as indicators of environmental stress in the Guadiamar River, S-W. Spain, following a major mine tailings spill. *J Appl Phycol* 12, 113-124.
- Schäfer J., Blanc G., 2002. Relationship between ore deposits in river catchments and geochemistry of suspended particulate matter from six rivers in southwest France. *Sci Total Environ* 298, 103-118.

- Schäfer J., Blanc G., Lapaquellerie Y., Maillet N., Maneux E., Etcheber H., 2002. Ten-year observation of the Gironde tributary fluvial system: fluxes of suspended matter, particulate organic carbon and cadmium. *Mar Chem* 79, 229-242.
- Shannon C.E., Weaver W., 1949. The mathematical theory of communication. Univ.Illinois Press.Urbana U.S.A., Univ.Illinois Press.Urbana III.
- Shehata S.A., Lasheen M.R., Kobbia I.A., Ali G.H., 1999. Toxic effect of certain metals mixture on some physiological and morphological characteristics of freshwater algae. *Water Air Soil Pollut* 110, 119-135.
- Stevenson R.J., Bahls L., 1999. Periphyton protocols. In: Barbour M.T., Gerritsen J., Snyder B.D., Stribling J.B., editors. Rapid bioassessment protocols for use in streams and wadeable rivers : Periphyton, benthic macroinvertebrates and fish. 2nd ed. Washington D.C., pp.1-22.
- Szabó K., Kiss K.T., Taba G., Ács É., 2005. Epiphytic diatoms of the Tisza River, Kisköre Reservoir and some oxbows of the Tisza River after the cyanide and heavy metal pollution in 2000. *Acta Bot Croat* 64, 1-46.
- Takamura N., Kasai F., Watanabe M.M., 1989. Effects of Cu, Cd and Zn on photosynthesis of freshwater benthic algae. *J Appl Phycol* 1, 39-52.
- Takamura N., Hatakeyama S., Sugaya Y., 1990. Seasonal changes in species composition and production of periphyton in an urban river running through an abandoned copper mining region. *Jpn J Limnol* 51, 225-235.
- Thomas W.H., Hollibaugh J.T., Seibert D.L.R., 1980. Effects of heavy metals on the morphology of some marine phytoplankton. *Phycologia* 19, 202-209.
- van Dam H., Mertens A., 1990. A comparison of recent epilithic diatom assemblages from the industrially acidified and copper polluted lake Orta (Northern Italy) with old literature data. *Diat Res* 5, 1-13.
- Whitton B.A., 2003. Use of plants for monitoring heavy metals in freshwaters. In: Ambast R.S., Ambast N.K., editors. *Modern Trends in Applied Aquatic Ecology*. Kluwer Academic / Plenum Publishers, New-York, pp. 43-63.
- Yang J.R., Duthie H.C., 1993. Morphology and ultrastructure of teratological forms of the diatoms *Stephanodiscus niagarae* and *S. parvus* (Bacillariophyceae) from Hamilton Harbor (Lake-Ontario, Canada). *Hydrobiologia* 269, 57-66.

## ***B – UNE ZONE ATELIER FAVORABLE A L'IDENTIFICATION DE DESCRIPTEURS SPECIFIQUES DES POLLUTIONS METALLIQUES.***

L'étude de la structure des communautés matures du Riou-Mort et du Riou-Viou souligne l'importance des facteurs de petite échelle dans la structuration spécifique des assemblages. La composition spécifique des communautés est ainsi directement dépendante de la charge organique et ionique du milieu, ce qui est susceptible de biaiser considérablement les analyses réalisées à l'échelle, pourtant réduite, de ce bassin versant. La prise en compte des caractéristiques de sensibilité ou de tolérance aux métaux des espèces pour une utilisation en bioindication nécessite donc des études plus poussées et / ou de plus grande ampleur géographique.

Les pistes méthodologiques entrevues dans la revue bibliographique (Chapitre 1) nous ont conduit à nous centrer davantage sur les individus, au travers d'un travail sur les descripteurs phénotypiques identifiés comme résultant d'une exposition probable aux métaux.

Ainsi, nous avons été amenés à réaliser, dans un premier temps et sur un nombre limité d'inventaires (échantillons collectés en mars et avril 2004), une étude exploratoire des conséquences d'une exposition aux métaux sur la morphologie des cellules. Nous nous sommes intéressés à la quantification de ces effets par la détermination des longueurs moyennes d'individus sélectionnés d'après leurs abondances (suffisantes dans tous les échantillons pour autoriser l'analyse statistique), ainsi que par la mesure de la fréquence d'apparition d'anomalies morphologiques. Sur le jeu de données considéré, nous avons pu mettre en évidence une réduction significative de la taille pour les espèces *Gomphonema parvulum* et *Nitzschia palea* en conditions de stress métallique. Nous avons également pu identifier un effet tératogène des métaux affectant les individus de 25 espèces, principalement des Araphidées. Cette étude préliminaire des descripteurs morphologiques nous a permis de valider leur pertinence sur le terrain, cependant le travail fastidieux de mesure microscopique des longueurs restreint l'utilisation potentielle de cet indicateur pour la bioindication en routine. Le calcul de la fréquence des anomalies morphologiques, en revanche, découle directement des résultats des inventaires diatomiques.

Nous avons donc dans un second temps étudié sur une plus longue durée leur fréquence d'apparition dans les échantillons des quatre stations du bassin versant suivies régulièrement. Ce travail, réalisé sur des échantillons prélevés de mars 2004 à mai 2005, nous a permis de mettre en évidence une relation entre contamination métallique des eaux, accumulation dans le

biofilm et occurrence des formes anormales. Bien qu'exploratoire et réductionniste, cette approche nous a permis de déceler des tendances à l'augmentation de la fréquence des anomalies en milieux contaminés. Cependant, l'effet des autres paramètres environnementaux (chimie, hydrologie notamment) n'est ici que modérément pris en compte, bien qu'il puisse également jouer un rôle dans l'apparition de ces formes anormales. Le lien entre exposition aux métaux et fréquence des anomalies morphologiques, nécessite une validation expérimentale. Il en sera question dans le Chapitre 5, sur l'exemple d'une contamination des eaux par le cadmium.

### **1- Impacts des métaux sur la morphologie (taille, physionomie) des individus : mise en évidence en conditions hivernales (mars-avril 2004).**

---

#### **Metal-induced shifts in the morphology of diatoms from the Riou-Mort and Riou-Viou streams (South West France)<sup>1</sup>**

MORIN Soizic<sup>\*\*\*</sup>, COSTE Michel<sup>\*</sup>

<sup>\*</sup> Cemagref Bordeaux, U.R. Réseaux Eputation et Qualité des Eaux, 50 av. de Verdun, F-33610 Cestas, France

<sup>\*\*</sup> Université de Bordeaux 1 / LEESA, 1 place Dr Peyneau, F-33120 Arcachon, France

#### **Summary.**

Many field and experimental studies have been conducted to reveal shifts in periphytic diatom assemblages under metal pollution. On account of their low cost, routine biomonitoring is based on approaches like community structure examination or biodiversity, which are not accurate enough in assessing metal contaminations. Several morphological traits have been tested like diatom cell lengths and abnormal forms frequencies. Diatoms were collected in winter 2004 on artificial substrates immersed along a gradient of polymetallic (cadmium/zinc) pollution in the Riou-Mort drainage basin (South West France). Significant reduction of the body size within the single taxa *Gomphonema parvulum* (Kützing) Kützing and *Nitzschia palea* (Kützing) W.Smith was observed in the polluted sites suggesting that metal-stressed environments select for smaller organisms. Abnormal forms were enumerated in highest percentages in the contaminated sites in April. This supported the hypothesis that heavy metals may interfere with silica uptake and metabolism.

---

<sup>1</sup> Publié dans les actes du congrès *Use of algae for monitoring rivers VI* en septembre 2006.

## **Introduction.**

Diatom communities are widely studied for bioindication purposes, with great emphasis on species richness and species assemblages structure (Prygiel *et al.* 1999a). However, global indices as used in routine biomonitoring are not accurate enough to diagnose toxic pollutions. As the diatom communities of a river ecosystem integrate the variability of the habitat, species may present certain combinations of adaptations related to survival; biological attributes may reflect environmental conditions (Townsend 1989).

Evidence of heavy-metal toxicity on freshwater diatom communities from previous studies suggests that morphological traits may be informative for investigating the relationship between metal pollution and organisms response. Dickman (1998) described diatoms with shape deformities in metal-contaminated sediments; abnormal frustules of diatoms were observed in a zinc-mine drainage basin in South West France (river Riou-Mort) (Gold *et al.* 2003b, Morin *et al.* submitted). In another respect, cell surface area has been displayed to be a major parameter in the uptake of metals (Khoshmanesh *et al.* 1997, Campbell *et al.* 2002), which suggests that smaller species or even smaller individuals may be less disfavoured under metal stress.

In this study conducted in winter 2004, the morphological variations of freshwater diatoms have been assessed in cadmium/zinc-polluted rivers (rivers Riou-Mort and Riou-Viou, South West France), to estimate the relevance of the use of biological traits for bioindication.

## **Site description.**

Upstream of the river Lot, the industrial basin of Decazeville (South West France) is the source of a metal contamination that is propagated up to the Gironde estuary (Schäfer *et al.* 2002, Audry *et al.* 2004b). This pollution is mainly due to a former zinc-mining activity in the "Vieille Montagne" factory (Say 1978) located on the Riou-Viou stream, a small tributary of the Riou-Mort stream (Figure 1). Four stations were selected: one reference and one metal-polluted site along each of those two streams. On the Riou-Viou stream: the "Moulin" site is located a few kilometres upstream from the factory and the "Usine" site in the factory estate. Lying on the Riou-Mort river, the "Decazeville" site is located in an urban, quite eutrophicated zone, whereas the "Joanis" site is located just after the confluence of the Riou-Mort with the Riou-Viou stream carrying high levels of metals.

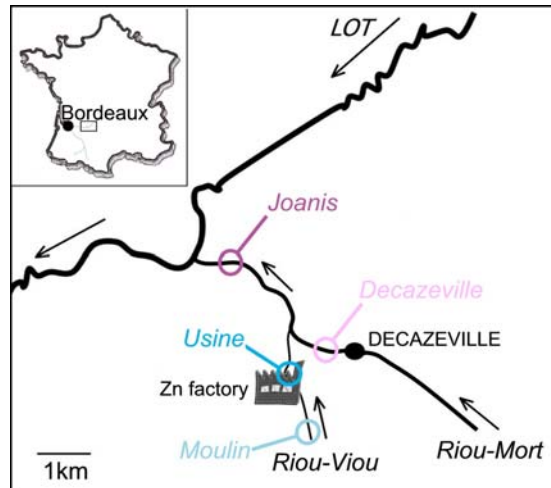


Figure 1: Location of the study sites.

## **Materiel and methods.**

### *Water samples analyses.*

Temperature, pH, conductivity and dissolved oxygen were measured at each site and sampling date in the stream (WTW, Weilheim, Germany), during the experimental period (March-April 2004).

Stream water samples were simultaneously collected and brought back to the laboratory for nutrient measurements. Phosphate, silica, ammonium, nitrite and nitrate concentrations were determined according to French and international standards (NF T90-023, NF T90-007, NF EN ISO 11732 and NF EN ISO 13395, respectively).

Metal concentrations at Joanis, Moulin and Usine were analysed by the TGM laboratory, University Bordeaux1.

### *Periphyton samplings.*

Biofilm was collected on large glass slides (300 cm<sup>2</sup> area for both sides) used as artificial substrates, inserted in plastic racks moored to the bank of the river and immersed near the water surface (10 to 15 cm depth). At each sampling time (after a four-week colonization time) and each site, six slides were removed from the rivers and scraped carefully with a cutter blade to constitute three replicate periphyton samples (one replicate = two slides).



Periphytic communities developed during the colonization time on the slides were scraped carefully and all the material was poured into a flask and diluted to a standard volume of 200 mL. Formalin-preserved aliquotes were prepared according to ANSP protocols (Charles *et al.* 2002) for the analysis of diatom samples. After digestion in boiling hydrogen peroxide (30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and hydrochloric acid (35%), permanent slides were prepared by mounting the cleaned diatom frustules on a glass microscope slide in Naphrax© (Northern Biological Supplies Ltd, UK), a high refractive index (1.74) medium. Altogether 400 diatom valves were identified on each slide at 1000x magnification, following the Krammer and Lange-Bertalot (1986 - 1991) classification and according to European standard for diatom counts (NF EN 14407). Relative abundances of each species were estimated; individual deformities (cells with abnormal general shape and/or diatoms with irregular valve wall ornamentation) were observed and enumerated; species were selected and their individual lengths measured.

### ***Biological traits.***

After species identification and enumeration, several biological traits have been tested like abnormal forms abundances and individual size reductions to demonstrate modifications under metal pollution.

In the diatom surveys, deformities affecting shape morphology, valve ornamentation or both were quantified. As abnormal cells frequencies were quite low, they were expressed into permille.

Species were selected for individual measurements with regards to their abundances in all the samples, to allow statistical analyses and between-site comparisons. The length of those selected species was measured under light microscopy, a total of 1080 observations were realized per species and taken into account for statistical analyses.

### ***Data analyses.***

Site comparison based on water samples analyses was performed using PC-ORD software (McCune et Mefford 1999) for Principal Component Analysis (PCA). The ordination was conducted on the following parameters: pH, electric conductivity, temperature, dissolved oxygen, oxygen saturation, nutrients (nitrates, nitrites, ammonia, orthophosphates, total phosphorus), silica, cadmium and zinc concentrations in dissolved and particulate phases.

After validating normality, data related to the frequency of deformities were analyzed; means and standard errors were determined for each sample. Comparison tests among pair of means (*t*-tests) were carried out to find out the effects of heavy-metals on this attribute.

Individual sizes were analysed using two-way analysis of variance (ANOVA) performed with SAS software (SAS Institute, 2005). The general linear model (GLM) procedure was used for site discrimination on this biological trait, after checking for data normality and variance equality. If the site effect was significant, the Student-Newman-Keuls (SNK) tests were applied for comparison of mean values and grouping.

All hypothesis testing was conducted at the 95% level of confidence (*i.e.*  $p < 0.05$ ).

### **Results.**

#### *Water column characteristics.*

At both sites, pH was around 8 and water temperatures were about 6°C in March and 10 to 12°C in April. There was considerable variation in the conductivity in the streams, ranging from 192 (at Moulin in March) to 1303  $\mu\text{S cm}^{-1}$  (at Decazeville in April). Comparable silica levels were found between sites, and at concentration sufficient for diatom development. Levels of dissolved inorganic and organic nutrients and total nutrients did not significantly differ between sampling sites and dates, with the exception of nitrate and orthophosphates. Nitrate concentrations over the upstream sites (Decazeville and Moulin) averaged  $8.6 \pm 0.6 \mu\text{g L}^{-1}$ ; mean downstream nitrate concentrations show significant elevation between March and April: from 11.5 to  $15.6 \mu\text{g L}^{-1}$  at Joanis, and from 16.2 to  $20.3 \mu\text{g L}^{-1}$  at Usine. Orthophosphates levels averaged  $0.04 \pm 0.01 \mu\text{g L}^{-1}$ , except from Joanis waters showing orthophosphate concentration of  $0.43 \mu\text{g L}^{-1}$  in April. Decazeville water samples displayed metal concentrations similar to the geochemical background of South West France. At Moulin, metal concentrations in the water column were around  $0.35 \mu\text{g Cd L}^{-1}$  and  $15.6 \mu\text{g Zn L}^{-1}$ . In Joanis and Usine samples, dissolved cadmium and zinc concentrations averaged  $6.04 \pm 1.09$  and  $391.6 \pm 62.9 \mu\text{g L}^{-1}$ , respectively.

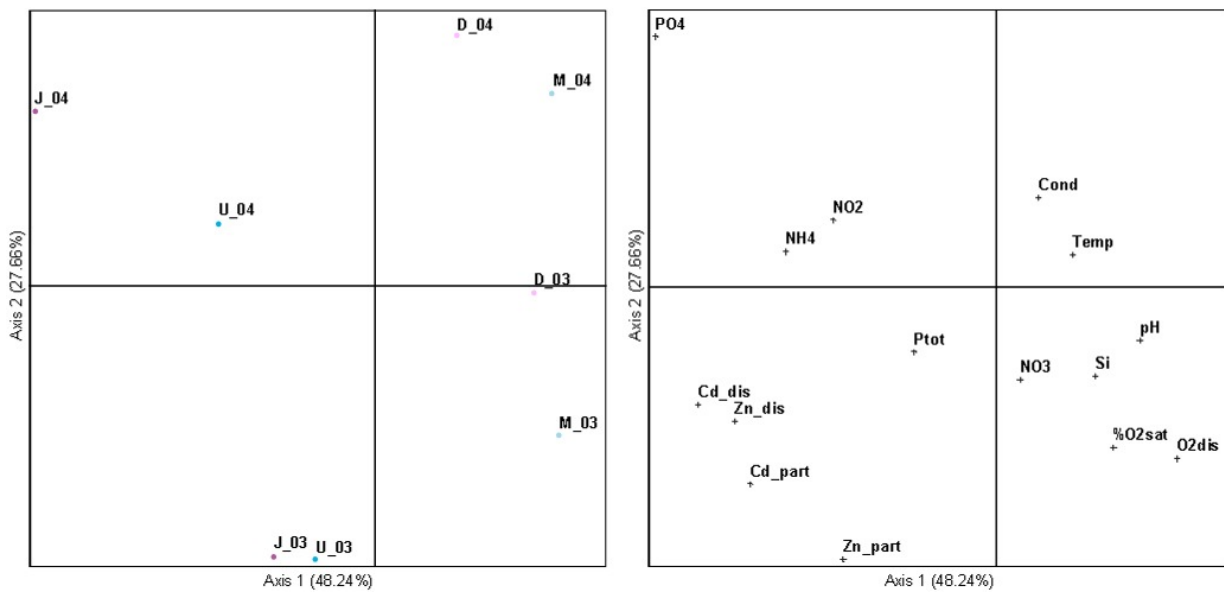


Figure 2: PCA projections of samplings (D: Decazeville; M: Moulin, J: Joanis, U: Usine; 03: March, 04: April), each characterized by the major physico-chemical parameters, in the plane defined by the two greatest variances (concentrations are expressed in mg/L, conductivity in  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , oxygen saturation in % and temperature in  $^{\circ}\text{C}$ ).

Result of PCA based on physico-chemical characteristics (Figure 2) showed great differences between sites and between sampling times. Almost half of the total variability (48.2%) was expressed by Axis 1, and Axis 2 accounted for around 28%. Axis 1 separated water samples collected up- and downstream of the metal pollution source. Decazeville and Moulin stations were found on the right-half plane (positive values) and Joanis and Usine sites on the left-half plane (negative values). Metal concentrations, especially dissolved cadmium and zinc, contributed negatively to the first principal component. Axis 2 expressed time variability: March samples tended to be correlated with negative values, whereas April samples were rather found on the upper-half plane (positive values). The main positive contribution to the second principal component was made by stream physical parameters (conductivity, temperature).

*Abnormal forms of benthic diatoms.*

A total of 20 diatom species representing 9 genera exhibited morphological deformities (Table 1 and Figure 3). Teratological valves were abundant among Araphids belonging to the genera *Fragilaria*, *Ulnaria* and *Meridion*, and were found in less number on several other genera (*Eolimna*, *Gomphonema*, *Mayamaea*, *Navicula*, *Nitzschia* and *Planothidium*).

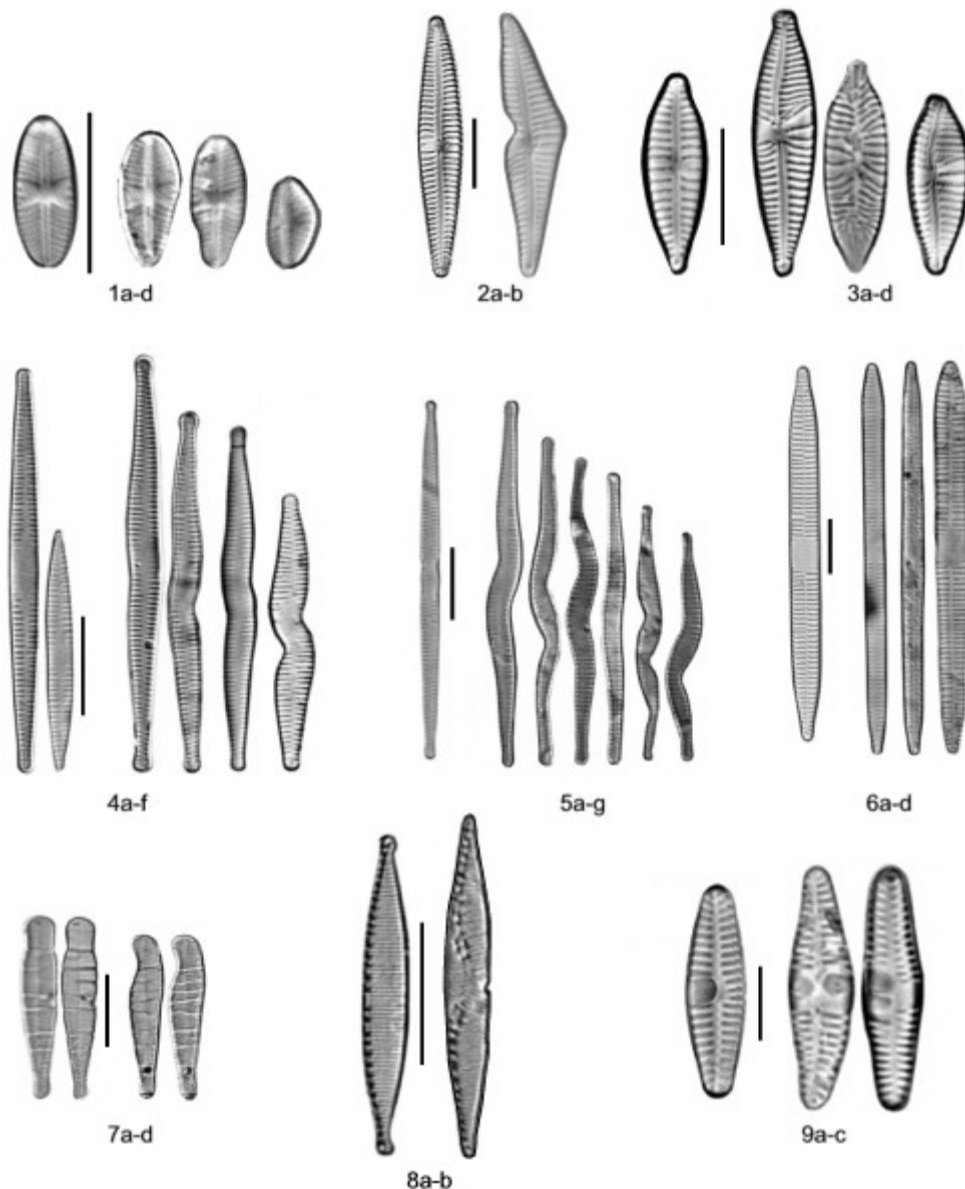


Figure 3: Some deformities observed in diatom valves from the Riou-Mort and Riou-Viou streams. 1a-d: *Eolimna minima* (a: normal form, b-d: abnormal forms); 2a-b: *Gomphonema gracile* (a: normal form, b: abnormal form); 3a-d: *Gomphonema parvulum* (a: normal form, b-d: abnormal forms); 4a-f: *Fragilaria capucina* (a-b: normal forms, c-f: abnormal forms); 5a-g: *Fragilaria gracilis* (a: normal form, b-g: abnormal forms); 6a-d: *Fragilaria ulna* (a: normal form, b-d: abnormal forms); 7a-d: *Meridion circulare* (a-b: normal forms, c-d: abnormal forms); 8a-b: *Nitzschia fonticola* (a: normal form, b: abnormal form); 9a-c: *Planothidium frequentissimum* (a: normal form, b-c: abnormal forms). Scale bar : 10µm.

Table 1: List of the 20 diatom taxa that exhibited morphological abnormalities.

Diatom species
<i>Eolimna minima</i> (Grunow) Lange-Bertalot
<i>Fragilaria capucina</i> Desmazières v. <i>capitellata</i> (Grunow) Lange-Bertalot
<i>Fragilaria capucina</i> Desmazières
<i>Fragilaria capucina</i> var. <i>vaucheriae</i> (Kützing) Lange-Bertalot
<i>Fragilaria gracilis</i> Ostrup
<i>Fragilaria ulna</i> var. <i>acus</i> (Kützing) Lange-Bertalot
<i>Gomphonema gracile</i> Ehrenberg
<i>Gomphonema olivaceum</i> (Hornemann) Brébisson
<i>Gomphonema parvulum</i> Kützing
<i>Mayamaea atomus</i> var. <i>permitis</i> (Hustedt) Lange-Bertalot
<i>Meridion circulare</i> (Greville) Agardh
<i>Navicula cryptotenelloides</i> Lange-Bertalot
<i>Navicula lanceolata</i> (Agardh) Ehrenberg
<i>Nitzschia archibaldii</i> Lange-Bertalot
<i>Nitzschia dissipata</i> (Kützing) Grunow
<i>Nitzschia fonticola</i> Grunow in Cleve et Möller
<i>Nitzschia linearis</i> (Agardh) W.M.Smith var. <i>linearis</i>
<i>Nitzschia palea</i> (Kützing) W.Smith
<i>Planothidium lanceolatum</i> (Brébisson ex Kützing) Lange-Bertalot
<i>Ulnaria ulna</i> (Nitzsch.) Compère

In Figure 4 the occurrences of deformed frustules in the samples are presented. The statistical tests conducted on the dataset underlined a "site effect". Indeed, abnormal forms were found in very low (residual) proportions in the "reference" sites (from 0.6‰ at Moulin to 4‰ at Decazeville), whereas great variability was found in frequencies determined at Joanis (from 3.6‰ in March to 7.3‰ in April) and Usine (from 2.7‰ in March to 20.3‰ in April). Samples from Decazeville and Moulin stations were not statistically different, but were discriminated from Joanis and Usine ( $t=6.82$ ,  $p<0.001$ ). Samples from Joanis and Usine exhibited significant differences between sampling dates (abnormalities frequency averaged 3.3‰ in March and reached 13.5‰ in April). Relative abundances of abnormal forms also discriminated slightly Joanis samples from Usine ones ( $p<0.01$ , *i.e.* to the 10% level of confidence).

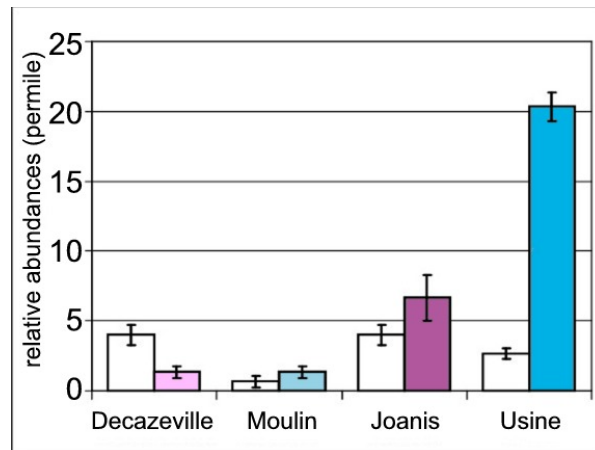


Figure 4: Average relative abundances (and standard errors) of deformities observed at each site in March (open bars) and April (solid bars).

**Size measurements.**

Two species were quite abundant in all the samples, *Gomphonema parvulum* (Kützing) Kützing and *Nitzschia palea* (Kützing) W.Smith. Shapiro-Wilk tests for normality confirmed that the data was Gaussian distributed ( $p=0.0046$  for *Gomphonema parvulum* and  $p<0.0001$  for *Nitzschia palea*). Applying variance analysis and the SNK test, measurements of individuals were found to reveal statistically significant differences between sites (Table 2 and Figure 5); but no statistical "date effect" was observed.

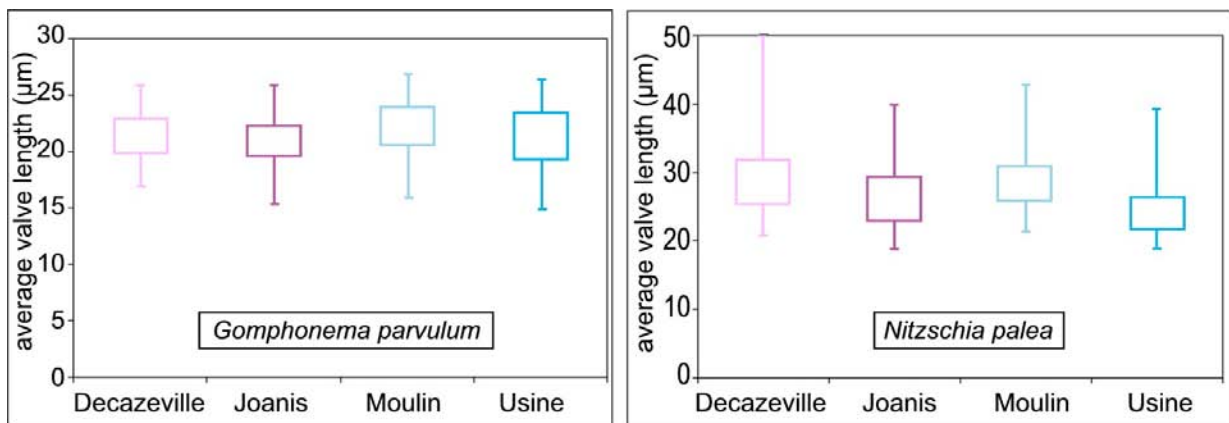


Figure 5: Valve lengths of the diatoms *Gomphonema parvulum* and *Nitzschia palea*. Boxplot: interquartile range (n=270) with the extreme values (minimum and maximum) denoted by the two horizontal lines outside the box.

*Gomphonema parvulum* individuals were grouped into three site classes after processing the SNK test: cells were statistically longer at Moulin (mean size=22.1µm) than at Decazeville (mean size=21.5µm). Individuals sampled from the metal-contaminated sites (Joanis and Usine) were found to be significantly shorter than the ones from upstream: mean lengths were

respectively of 20.7 and 21.0µm. SNK grouping also exhibited three groups in *Nitzschia palea* measurements. For that species, the mean length of individuals significantly decreased from around 29µm before metal contamination to 26.5µm at Joanis and to a minimum of 25.0µm at Usine.

Table 2: Outcome of the SNK tests for size measurements. Means with the same letter are not significantly different. (N: number of observations; species: GPAR: *Gomphonema parvulum*, NPAL: *Nitzschia palea*; sites: D: Decazeville, J: Joanis, M: Moulin, U: Usine)

SNK Grouping		Mean	N	site
GPAR	A	22.1222	270	M
	B	21.5259	270	D
	C	21.0296	270	U
	C	20.7630	270	J
NPAL	A	29.2074	270	D
	A	28.7037	270	M
	B	26.4519	270	J
	C	24.9963	270	U

## Discussion.

The presence of metals in the waters result from the former metallurgical activity and is responsible of a high contamination of the river Lot passed on by the Riou-Mort basin. In this study, study sites presented a gradient of polymetallic pollution on both streams and cadmium and zinc effects on diatom morphology were assessed using between-site comparison. In the polluted sites, metals tend to accumulate in the biofilm, and diatom traits are likely to be a valid indicator of metal exposure. Accumulation kinetics studied through previous *in situ* experiments (Morin *et al.* submitted) showed that accumulation rates of cadmium in the biofilm are quite fast, suggesting that a four-week exposure time may be sufficient to lead to toxicity. Metal impacts on diatom sizes were demonstrated through cell lengths measurements. Negative correlations between cadmium and zinc concentrations in the water and cell sizes were obtained. If cell surface exposed to metals determine uptake and, therefore, toxicity (as suggested by Khoshmanesh *et al.* 1997), our results tend to confirm that a selection occurs, where small individuals are more able to develop under metal stress than bigger ones. Significant reduction of body size was observed within the taxa *Gomphonema parvulum* and

*Nitzschia palea* correlated with metal contamination. According to Potapova and Snoeijs (1997), stressed ecosystems should induce rapid cell reduction. Under metal stress, cell division would be the dominant mode of multiplication, leading to a decrease in average cell size in the diatom populations with each successive round of mitosis (Cattaneo *et al.* 1998, Joux-Arab *et al.* 2000). This metal-induced decrease in diatom sizes was also described in paleolimnological studies (Cattaneo *et al.* 1998, Cattaneo *et al.* 2004), as well as in laboratory experiments showing a reduction in valve length in response to aluminium additions in cultures (Gensemer 1990).

There was a positive correlation between frequency of abnormal forms and metal exposure. However, in contrast to cell measurements, the appearance of deformities seemed to be highly dependant of the sampling date. This variability was shown to be mainly related to the physical parameters conductivity and temperature. Estes and Dute (1994) observed changes in valve morphology of several diatoms in continuous cultures, occurring in roughly 2 to 12-year cycles and probably related to the fact that the cells had exceed the lower limits for sexual reproduction and were on their way to extinction. The morphological shifts we observed in Riou-Mort and Riou-Viou streams occurred over the scale of weeks in correspondence to metal contamination and were thus differentiated from changes related to the natural life cycle of the diatoms. Morphological changes seem to be related to some stress in diatom metabolism, which intensity is highly dependant of the water column characteristics (Eppley 1977). Metal exposure may provoke biochemical changes in the cell wall and the plasma membrane (Conway 1978, Guanzon *et al.* 1994) and a competition for the absorption of essential metals may occur (Morel *et al.* 1991, De La Rocha *et al.* 2000), affecting cell viability. Metals sequestrated in the cytosol may damage cells and imply growth inhibition (Gerringa *et al.* 1995, Perrein-Ettajani *et al.* 1999) or even cell mortality (Torres *et al.* 1998a). Detrimental influence on silicon metabolism (Fisher *et al.* 1981, De La Rocha *et al.* 2000, Grachev *et al.* 2005) is also likely to explain morphological shifts and, particularly, appearance teratological valves. The observed appearance of deformities is probably not only the result of direct effects of metals. Indeed, at Usine, where the biofilm is not as dense as at Joanis, significantly higher frequencies of deformities were observed. The development stage of the biofilm (its thickness especially) may play a role as well (Hill *et al.* 2000c, Ivorra *et al.* 2002b, Guasch *et al.* 2003). A protective function of the organic matrix against metal toxicity would explain the differences we observed in April between the two contaminated sites.



### **Conclusion.**

Influence of heavy-metal contamination on morphological traits has been demonstrated in this study. The relationship between shifts in those attributes and metal concentrations was found significant, underlying their relevance at revealing toxic pollutions.

However, the biological attributes studied in the present experiment (incidence of abnormalities and cell measurements) are probably not usable this way. Indeed, determination of deformations relative abundances require counting a very large number of valves to increase the statistical significance and reduce standard errors, in order to provide a practical tool. Size measurements also need to spare a long time on each slide to find the selected species and determine their length. Even if the method needs a lot of labour, it can be performed on archive materials; this way it may be used for reconstruction of impacts occurred long time ago.

Further investigations are needed to standardize and, as possible, to automatize the use of those biological traits in order to take them into account for routine biomonitoring.

### **Acknowledgements.**

The authors would like to thank M. Bonnet and M. Boudigues from Cemagref, Bordeaux for water samples analyses and the TGM laboratory, University Bordeaux 1 for providing metal concentrations values. We also acknowledge H. Bouillard and V. Duflo for their technical assistance on the field.

### **References.**

- Audry, S., Schäfer, J., Blanc, G., Bossy, C. & Lavaux, G. 2004. Anthropogenic components of heavy metal (Cd, Zn, Cu, Pb) budgets in the Lot-Garonne fluvial system (France). *Appl. Geochem.* 19:769-86.
- Campbell, P. G. C., Errecalde, O., Fortin, C., Hiriart-Baer, W. R. & Vigneault, B. 2002. Metal bioavailability to phytoplankton - applicability of the biotic ligand model. *Comp. Biochem. Physiol. C: Toxicol. Pharmacol.* 133:189-206.

- Cattaneo, A., Asioli, A., Comoli, P. & Manca, M. 1998. Organisms' response in a chronically polluted lake supports hypothesized link between stress and size. *Limnol. Oceanogr.* 43:1938-43.
- Cattaneo, A., Couillard, Y., Wunsam, S. & Courcelles, M. 2004. Diatom taxonomic and morphological changes as indicators of metal pollution and recovery in Lac Dufault (Québec, Canada). *J. Paleolimnol.* 32:163-75.
- Charles, D. F., Knowles, C. & Davies, R. S. [Eds.] 2002. *Protocols for the analysis of algal samples collected as part of the U.S. Geological Survey National Water-Quality Assessment Program*. Patrick Center for Environmental Research, The Academy of Natural Sciences, Philadelphia, PA, 124p. pp.
- Conway, H. L. 1978. Sorption of arsenic and cadmium and their effects on growth, micronutrient utilization, and photosynthetic pigment composition of *Asterionella formosa*. *Journal of Fisheries Research Board of Canada* 35:286-94.
- De La Rocha, C. L., Hutchins, D. A., Brzezinski, M. A. & Zhang, Y. H. 2000. Effects of iron and zinc deficiency on elemental composition and silica production by diatoms. *Mar. Ecol.-Prog. Ser.* 195:71-9.
- Dickman, M. D. 1998. Benthic marine diatom deformities associated with contaminated sediments in Hong Kong. *Environ. Int.* 24:749-59.
- Eppley, R. W. 1977. Chapter 2: The growth and culture of diatoms. *In The Biology of Diatoms. Bot. Monogr.* 13. Blackwell Sci. Publ., Oxford., pp. 24-64.
- Estes, A. & Dute, R. R. 1994. Valve abnormalities in diatom clones maintained in long-term culture. *Diat. Res.* 9:249-58.
- Fisher, N. S., Jones, G. J. & Nelson, D. M. 1981. Effects of copper and zinc on growth, morphology, and metabolism of *Asterionella japonica* (Cleve). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 51:37-56.
- Gensemer, R. W. 1990. Role of aluminium and growth rate on changes in cell size and silica content of silica-limited populations of *Asterionella ralfsii* var. *americana* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.* 26:250-8.
- Gerringa, L. J. A., Rijstenbil, J. W., Poortvliet, T. C. W., Vandrie, J. & Schot, M. C. 1995. Speciation of copper and responses of the marine diatom *Ditylum brightwellii* upon increasing copper concentrations. *Aquat. Toxicol.* 31:77-90.
- Gold, C., Feurtet-Mazel, A., Coste, M. & Boudou, A. 2003. Impacts of Cd and Zn on the development of periphytic diatom communities in artificial streams located along a river pollution gradient. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 44:189-97.

- Grachev, M., Sherbakova, T., Masyukova, Y. & Likhoshway, Y. 2005. A potential zinc-binding motif in silicic acid transport proteins of diatoms. *Diat. Res.* 20:409-11.
- Guanzon, N. G., Nakahara, H. & Yoshida, Y. 1994. Inhibitory effects of heavy-metals on growth and photosynthesis of 3 freshwater microalgae. *Fish. Sci.* 60:379-84.
- Guasch, H., Admiraal, W. & Sabater, S. 2003. Contrasting effects of organic and inorganic toxicants on freshwater periphyton. *Aquat. Toxicol.* 64:165-75.
- Hill, W. R., Bednarek, A. T. & Larsen, I. L. 2000. Cadmium sorption and toxicity in autotrophic biofilms. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 57:530-7.
- Ivorra, N., Hettelaar, J., Kraak, M. H. S., Sabater, S. & Admiraal, W. 2002. Responses of biofilms to combined nutrient and metal exposure. *Environ. Toxicol. Chem.* 21:626-32.
- Joux-Arab, L., Berthet, B. & Robert, J. M. 2000. Do toxicity and accumulation of copper change during size reduction in the marine pennate diatom *Haslea ostrearia*? *Mar. Biol.* 136:323-30.
- Khoshmanesh, A., Lawson, F. & Prince, I. G. 1997. Cell surface area as a major parameter in the uptake of cadmium by unicellular green microalgae. *Chem. Eng. J.* 65:13-9.
- Krammer, K. & Lange-Bertalot, H. [Eds.] 1986 - 1991. *Bacillariophyceae 1. Teil: Naviculaceae.* 876 p.; *2. Teil: Bacillariaceae, Epithemiaceae, Surirellaceae,* 596 p.; *3. Teil: Centrales, Fragilariaceae, Eunotiaceae,* 576 p.; *4. Teil: Achnanthaceae. Kritische Ergänzungen zu Navicula (Lineolatae) und Gomphonema.* 437 p. G. Fischer Verlag., Stuttgart.
- McCune, B. & Mefford, M. J. 1999. *Multivariate analysis of ecological data, version 4.01.* MJM Software, Gleneden Beach, Oregon USA, 237 pp.
- Morel, F. M. M., Hudson, R. J. M. & Price, N. M. 1991. Limitation of productivity by trace-metals in the sea. *Limnol. Oceanogr.* 36:1742-55.
- Morin, S., Vivas-Nogues, M., Duong, T. T., Boudou, A., Coste, M. & Delmas, F. submitted. Dynamics of benthic diatom colonization in a cadmium/zinc-polluted river (Riou-Mort, France). *Arch. Hydrobiol.*
- Perrein-Ettajani, H., Amiard, J. C., Haure, J. & Renaud, C. 1999. Effects of metals (Ag, Cd, Cu) on the biochemical composition and compartmentalization of these metals in two microalgae *Skeletonema costatum* and *Tetraselmis suecica*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 56:1757-65.
- Potapova, M. & Snoeijs, P. 1997. The natural life cycle in wild populations of *Diatoma moniliformis* (Bacillariophyceae) and its disruption in an aberrant environment. *J. Phycol.* 33:924-37.

- Prygiel, J., Coste, M. & Bukowska, J. 1999. Review of the major diatom-based techniques for the quality assessment of rivers - State of the art in Europe. *In* Prygiel, J., Whitton, B. A. & Bukowska, J. [Eds.] *Use of algae for monitoring rivers III*. Agence de l'Eau Artois Picardie, Douai, pp. 224-38.
- Say, P. J. 1978. Le Riou-Mort, affluent du Lot pollué par les métaux. I. Etude préliminaire de la chimie et des algues benthiques. *Annls Limnol. (Int. J. Limnol.)* 14:113-31.
- Schäfer, J., Blanc, G., Lapaquellerie, Y., Maillet, N., Maneux, E. & Etcheber, H. 2002. Ten-year observation of the Gironde tributary fluvial system: fluxes of suspended matter, particulate organic carbon and cadmium. *Mar. Chem.* 79:229-42.
- Torres, E., Cid, A., Herrero, C. & Abalde, J. 1998. Removal of cadmium ions by the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin accumulation and long-term kinetics of uptake. *Bioresour. Technol.* 63:213-20.
- Townsend, C. R. 1989. The patch dynamics concept of stream community ecology. *J. N. Am. Benthol. Soc.* 8:36-50.

## 2- Intérêt des anomalies morphologiques pour la bioindication en routine : étude pluri-annuelle de leur fréquence d'apparition.

---

### Anomalies morphologiques en conditions de stress métallique<sup>1</sup>

S. Morin\* · \*\*, T. Duong\*\*, M. Coste\*

\* Cemagref de Bordeaux, 50 av. de Verdun, 33612 Cestas cedex, France

\*\* Université de Bordeaux 1 / LEESA, 1 place Dr Peyneau, 33120 Arcachon, France

La littérature évoque la possibilité d'utiliser les anomalies morphologiques des diatomées comme indicateur du niveau de contamination métallique (Dickman 1998, Stevenson et Bahls 1999). Dans le cadre du suivi des communautés périphytiques du bassin industriel de Decazeville, nous avons caractérisé et quantifié les formes anormales de diatomées, en relation avec l'exposition aux métaux.

Quatre stations ont été échantillonnées de mars 2004 à mai 2005 sur le site expérimental "Lot amont" (rivières Riou-Mort et Riou-Viou) (Figure 1). Les stations "Usine" et "Joanis" sont localisées au niveau et à l'aval d'un ancien site d'extraction de zinc et présentent une très mauvaise qualité de l'eau, selon les caractéristiques définies par le SEQ-Eaux Superficielles pour les micro-polluants cadmium et zinc (Agence de l'Eau Adour-Garonne 2005). En amont de la source de contamination, les stations "Decazeville" et "Moulin" présentent un niveau faible de pollution métallique. Pour chaque site, trois réplicats ont été prélevés sur des substrats artificiels immergés pendant une vingtaine de jours ; un jeu de 184 échantillons a été analysé pour cette étude. Environ 400 valves de diatomées ont été dénombrées par échantillon. La fréquence des formes anormales a été comparée avec le niveau de contamination métallique dans les eaux et dans la matrice organique.

---

<sup>1</sup> Accepté pour publication dans *Diatomania*.

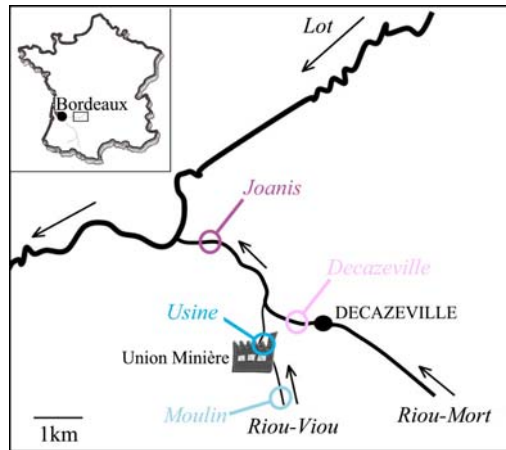


Figure 1 : Localisation des stations étudiées.

Le bassin industriel de Decazeville est caractérisé par des eaux de très mauvaise qualité au niveau et à l'aval de l'usine, déclassées par de fortes teneurs en cadmium et en zinc (Figure 2) dues aux anciennes activités métallurgiques du site. La limite de très mauvaise qualité (telle que définie par le SEQ-Eaux Superficielles) est atteinte pour des concentrations dans l'eau brute de  $3\mu\text{gCd/l}$  ou  $330\mu\text{gZn/l}$ , et dans les matières en suspension de  $7\text{mgCd/kg}$  et  $680\text{mgZn/kg}$ .

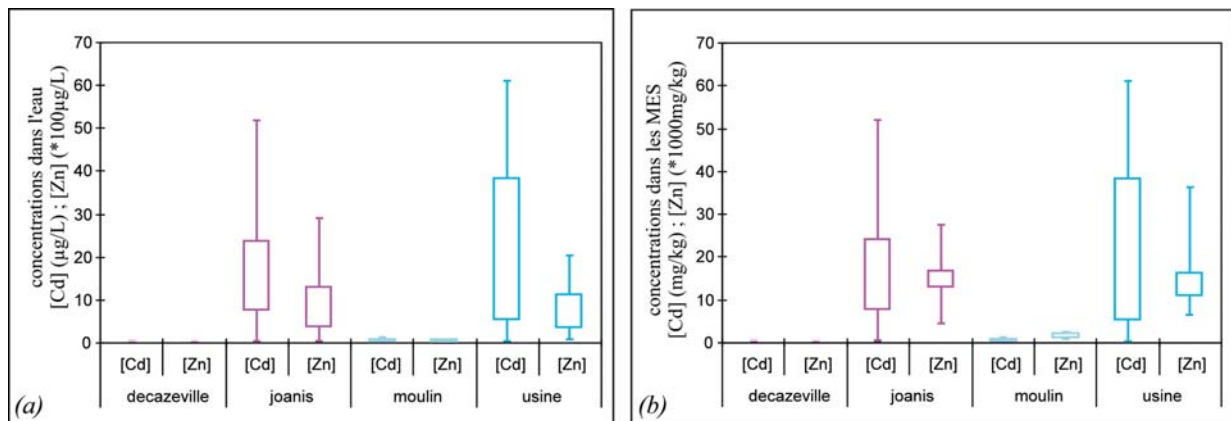


Figure 2 : Niveaux de contamination métallique des 4 stations étudiées : concentrations en cadmium et en zinc dans les phases dissoute (a) et particulaire (b). Dosages réalisés par le DGO, Université de Bordeaux 1.

Dans les échantillons provenant de ces stations fortement contaminées ("Joanis" et "Usine"), on rencontre à des fréquences moyennes de l'ordre de 10 à 20% des diatomées dont la morphologie est affectée (Figure 3), soit dans sa globalité soit plus spécifiquement au niveau des ornements du frustule. Très peu de ces anomalies morphologiques (0 à 6%) sont comptabilisées au niveau des stations amont ("Decazeville" et "Moulin"). Bien que les

quantités dénombrées en conditions de forte contamination métallique soient relativement faibles, elles sont néanmoins considérées comme significatives.

Les abondances relatives des formes anormales sont mieux corrélées aux concentrations en cadmium qu'en zinc, et traduisent plutôt l'exposition des communautés périphytiques aux métaux dosés dans le biofilm que dans l'eau. Ainsi, on obtient des coefficients de corrélation ( $r^2$ ) entre fréquence des formes anormales et cadmium dans les phases dissoute et particulaire de 0,09 ( $p < 0,002$ ) et 0,15 ( $p < 0,001$ ) respectivement. Avec le cadmium mesuré dans le biofilm on atteint des corrélations de 0,2236 ( $p < 0,001$ ). Notons l'influence du rôle protecteur de la matrice organique vis-à-vis des métaux : la fréquence des formes anormales dans les échantillons de "Joanis" (où le biofilm est épais et dense) est significativement moins élevée qu'à "Usine" (où la biomasse développée sur les substrats est plus réduite).

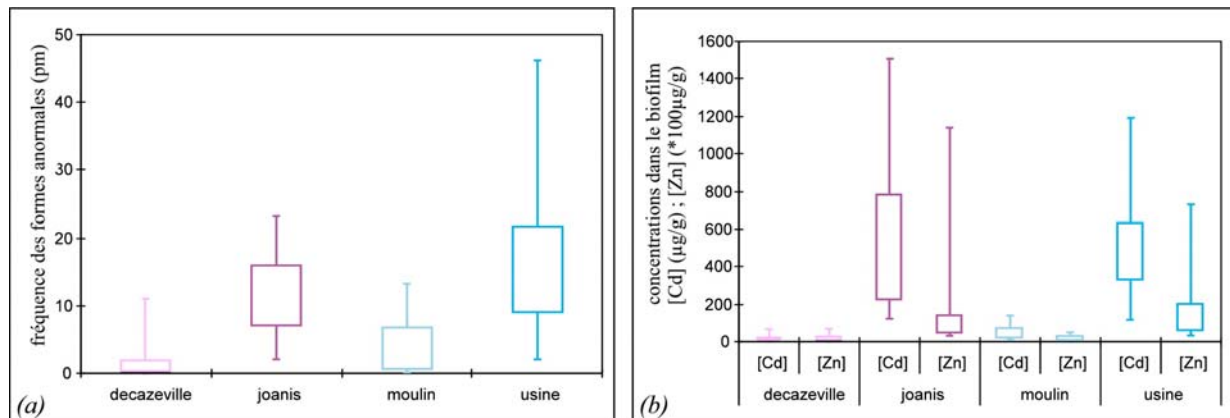


Figure 3 : Abondances relatives (exprimées en pour mille) des formes anormales de diatomées dans les échantillons (a) et concentrations métalliques mesurées dans le biofilm (b).

Lors de cette étude, un total de 48 espèces représentant 18 genres comptaient quelques individus présentant des anomalies morphologiques. La plupart des taxons concernés par ces déformations appartiennent aux genres *Fragilaria* (environ 52% des espèces déformées rencontrées) et *Ulnaria* (23%) : l'anomalie la plus fréquemment observée pour ces individus est une distorsion du frustule (Figure 4). On dénombre également des formes anormales parmi les Monoraphidées (5%), les Biraphidées (20%), et plus rarement chez la diatomée centrique *Cyclotella meneghiniana* (moins de 0,2%). Les anomalies d'ornementation peuvent concerner la régularité et l'alignement des stries (cf. l'exemple de *Diatoma vulgare*, Figure 4) comme des caractéristiques plus spécifiques de certaines espèces. Ainsi, certains individus de l'espèce *Planothidium frequentissimum* observés dans les échantillons contaminés présentaient un doublement du renflement en fer à cheval (Figure 4).

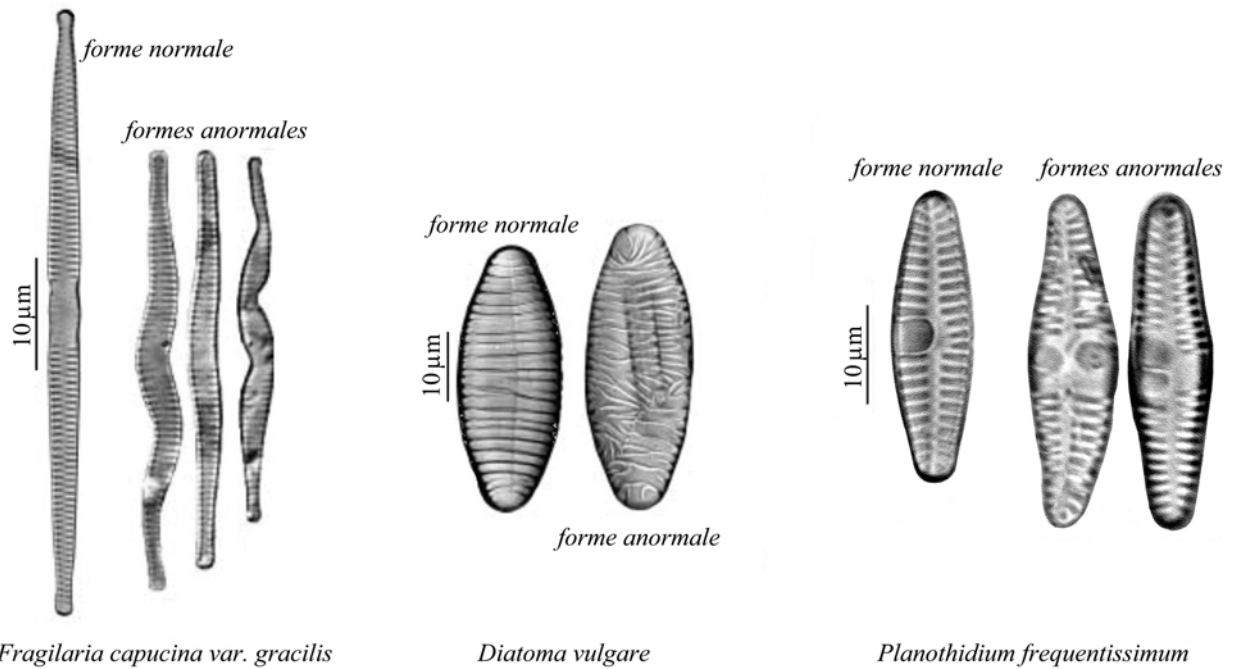


Figure 4 : Frustules déformés de diatomées, observés dans les stations "Joanis" et "Usine" (photographies : Michel Coste).

La toxicité des métaux lourds peut se manifester lors de l'internalisation des métaux et lors de leur séjour à l'intérieur de la cellule. Lorsqu'ils traversent la membrane cellulaire, ils sont susceptibles d'entrer en compétition pour l'adsorption et l'assimilation de la silice (Conway 1978, De La Rocha *et al.* 2000). Les métaux accumulés dans le cytosol peuvent par ailleurs générer un stress oxydant (Pinto *et al.* 2003) et induire des perturbations génétiques (Codina *et al.* 2000). Les travaux de Grachev *et al.* (2005) émettent de plus l'hypothèse que le zinc jouerait un rôle dans la désilicification du frustule, en se liant aux protéines de transport de l'acide silicique.

Ainsi, ces altérations métaboliques et génétiques induisent vraisemblablement l'apparition d'individus au frustule faiblement silicifié, ce qui expliquerait les atteintes morphologiques observées en conditions de stress métallique.



**Références bibliographiques :**

- Agence de l'Eau Adour-Garonne (2005). Bilan sur la qualité des eaux du Bassin Adour-Garonne en 2004. Les études de l'Agence de l'Eau Adour-Garonne. Toulouse, France: 54p.
- Codina, J. C., F. M. Cazorla, A. Perez-Garcia and A. de Vicente (2000). "Heavy metal toxicity and genotoxicity in water and sewage determined by microbiological methods." *Environmental Toxicology and Chemistry* **19**(6): 1552-1558.
- Conway, H. L. (1978). "Sorption of arsenic and cadmium and their effects on growth, micronutrient utilization, and photosynthetic pigment composition of *Asterionella formosa*." *Journal of Fisheries Research Board Canada* **35**(3): 286-294.
- De La Rocha, C. L., D. A. Hutchins, M. A. Brzezinski and Y. H. Zhang (2000). "Effects of iron and zinc deficiency on elemental composition and silica production by diatoms." *Marine Ecology-Progress Series* **195**: 71-79.
- Dickman, M. D. (1998). "Benthic marine diatom deformities associated with contaminated sediments in Hong Kong." *Environment International* **24**(7): 749-759.
- Grachev, M., T. Sherbakova, Y. Masyukova and Y. Likhoshway (2005). "A potential zinc-binding motif in silicic acid transport proteins of diatoms." *Diatom Research* **20**(2): 409-411.
- Pinto, E., T. C. S. Sigaud-Kutner, M. A. S. Leitao, O. K. Okamoto, D. Morse and P. Colepicolo (2003). "Heavy metal-induced oxidative stress in algae." *Journal of Phycology* **39**(6): 1008-1018.
- Stevenson, R. J. and L. Bahls (1999). Periphyton protocols. Rapid bioassessment protocols for use in streams and wadeable rivers : Periphyton, benthic macroinvertebrates and fish. 2nd ed. M. T. Barbour, J. Gerritsen, B. D. Snyder and J. B. Stribling. Washington D.C.



## **CHAPITRE 4**

Cinétique d'établissement des communautés diatomiques  
le long du gradient de pollutions du Riou-Mort

### *Préambule.*

Le développement du biofilm sur une surface immergée commence généralement par l'installation d'une matrice organique et bactérienne, suivie de la colonisation par des espèces diatomiques petites et adhérentes. La dynamique de colonisation par les diatomées est déterminée par le pool d'espèces disponibles dans le milieu, le type de substrat (Rosen 1995), la vitesse du courant (Ghosh et Gaur 1998), la température et l'éclairement (Eppley 1977, Hill 1996). Les successions d'espèces, des stades pionniers à la maturité des communautés, sont conditionnées par les taux de croissance spécifiques, variant avec les conditions de milieu (température, disponibilité en nutriments). Au fur et à mesure de la mise en place du biofilm, la biomasse algale, la densité cellulaire et le métabolisme du biofilm augmentent ; il s'opère une complexification de la structure et de l'architecture du biofilm, susceptible de réduire la dépendance des communautés vis-à-vis des facteurs physiques et chimiques externes, et par conséquent de leurs effets. Ainsi, les cellules enchâssées dans cette matrice semblent être moins affectées par une diminution de la ressource nutritive (Stevenson *et al.* 1991, Ivorra 2000) et par les stress induits par les métaux par exemple (Pistocchi *et al.* 1997, Decho 2000, Ivorra 2000).

Le Chapitre 3 présentait les résultats principaux obtenus dans le cadre du suivi des communautés matures du bassin versant du Riou-Mort. Les effets peu contrastés des métaux sur la structure des communautés diatomiques nous sont apparus comme principalement tributaires de la variabilité inter-cours d'eau. Après s'être attachés à caractériser les communautés établies, nous avons donc naturellement envisagé d'étudier plus précisément les mécanismes de colonisation des substrats par une fréquence de prélèvements plus soutenue (*i.e.* après 3, 5, 8, 15 et 21 jours à partir de la date d'implantation de substrats vierges) le long d'un gradient de contamination organique et métallique. Nous avons ainsi suivi le développement du biofilm et des communautés diatomiques sur les deux stations du Riou-Mort échantillonnées dans le cadre du suivi annuel (Decazeville et Joanis), auxquelles nous avons ajouté une référence "amont", Firmi, exempte des apports anthropiques de l'agglomération de Decazeville. Nos expérimentations ont été menées en conditions estivales et hivernales, afin d'évaluer la variabilité saisonnière de ces cinétiques d'installation.

## A – DYNAMIQUE DE COLONISATION DES COMMUNAUTES DIATOMIQUES.

La caractérisation des cinétiques d'établissement a été réalisée en conditions d'étiage (juillet 2004) et en conditions de hautes eaux (mars 2005). Le choix de l'étude de stations localisées uniquement le long du Riou-Mort nous a affranchis en grande partie de l'effet "cours d'eau" mis en évidence dans le Chapitre 3, le "pool" d'espèces potentiellement disponibles étant commun aux trois sites étudiés. Ainsi, nous avons pu mettre en évidence des effets liés à la charge organique d'une part (à Decazeville) et des effets combinés des nutriments et des métaux d'autre part (à Joanis).

Le long de ce gradient, la disponibilité nutritive élevée à Decazeville y favorise le développement du biofilm (augmentation de la biomasse, de la photosynthèse) et l'installation des communautés diatomiques (hausse des densités cellulaires), accompagnées d'une évolution des assemblages vers la mise en place d'espèces saprophytes comme *Gomphonema parvulum*. Les effets de la contamination métallique s'avèrent très marqués sur la mise en place du biofilm comme sur les communautés diatomiques. La croissance en épaisseur du biofilm, en effet, se trouve freinée à Joanis. Les communautés diatomiques sont également modifiées, tant du point de vue quantitatif (stagnation des densités cellulaires, diminution du biovolume cellulaire moyen à Joanis) que qualitatif. La taille moyenne des espèces inventoriées y est inférieure à celles mesurées en amont, et la petite espèce *Eolimna minima* domine les assemblages. Les abondances accrues de formes anormales observées à l'aval de la source de contamination métallique concordent avec les travaux de Andresen et Tuchman (1991), McFarland et al. (1997) et Dickman (1998), et confirment l'intérêt et la pertinence de ce descripteur pour la bioindication des pollutions métalliques (déjà évoqués dans le Chapitre 3).

## 1- Etablissement des communautés en conditions estivales.

---

### Dynamics of benthic diatom colonization in a cadmium/zinc-polluted river (Riou-Mort, France)<sup>1</sup>

Soizic MORIN <sup>1\*</sup>, Maria VIVAS-NOGUES <sup>1</sup>, Thi Thuy DUONG <sup>2</sup>, Alain BOUDOU <sup>2</sup>, Michel COSTE <sup>1</sup> and François DELMAS <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Cemagref Bordeaux, U. R. Réseaux Epuration et Qualité des Eaux, 50 av. de Verdun, 33610 Cestas, France

<sup>2</sup> Université de Bordeaux 1 / LEESA, 1 place Dr Peyneau, 33120 Arcachon, France

\* Corresponding author: soizic.morin@bordeaux.cemagref.fr

#### Abstract

Periphytic diatom communities were sampled from glass substrates immersed along a gradient of organic and metallic pollution. We investigated the influence of nutrients and a combination of nutrients and metals on biofilms and diatom communities settling on the glass over three weeks. Biofilm was characterized through organic biomass, chlorophyll *a* concentrations and metal content; structure of diatom assemblages was assessed by studying densities, mean biovolumes and taxonomic composition. Exposure to organic pollutants resulted in an increase of biomass (dry weight, chlorophyll *a* concentrations and diatom densities) and diatom community structure was similar to that at an unpolluted site relative to nutrient concentrations. *Cyclotella meneghiniana* was dominant and the species *Nitzschia palea*, *Navicula gregaria* and *Melosira varians* were well-represented. Downstream of the metal-contamination source, biofilm biomass, as well as chlorophyll *a* concentrations, decreased as cadmium and zinc content got higher (up to 60µgCd/g dry weight and 1400µgZn/g dry weight). Concurrently, the size distribution of diatoms, changing from larger to smaller individuals, reflected changes in the taxonomic composition of the assemblages where *Eolimna minima* was found in high proportions. Statistically significant amounts of abnormal frustules were also enumerated in the metal-polluted environment ( $p < 0.05$ ).

#### Keywords

Biomonitoring; Periphyton; Diatom assemblages; Streams; Cadmium; Zinc; Heavy metals effects; Morphological abnormalities

---

<sup>1</sup> Accepté pour publication dans *Archiv für Hydrobiologie* en juin 2006.

## Introduction

Diatom community structure can be affected by high levels of micropollutants, and in particular, metals which are often found in rivers. With the implementation of the European Water Framework Directive (WFD, 2000/60/CE), there is a need for data to allow the characterization of the effects of pollutants on aquatic environments based on selected biological key compartments, notably diatom communities.

Several studies have indicated a change in the structure of biofilms when exposed to metal pollution: PERES *et al.* (1997) and GOLD (2002) reported lower cell densities in contaminated sites, diatom assemblages were also found to be very different in reference compared to polluted sites (IVORRA 2000). Cell deformities affecting general cell shape and/or valve ornamentations were observed under metal stress, and are suspected to be an indicator of such pollution (DICKMAN 1998, GOMEZ and LICURSI 2003, TORRES *et al.* 2000).

Our study aimed at identifying *in situ* descriptors of metal-pollution effects, with the aim to improve diatom bioindication tools. In a zinc-mining impacted site generating cadmium and zinc pollution, the development of benthic communities was monitored from bare surfaces to mature biofilms. After a three-week development, diatom communities were characterized and we describe here the effects attributed to the pollution studied.

## Material and methods

### *Field sampling sites*

Biofilms were left to colonize glass substrates in the Riou-Mort stream, a small tributary of the river Lot located in the industrial basin of Decazeville (South West France, 44°N / 2°E). Three sites presenting different types and levels of pollutions were selected (Figure 1):

- the reference site (Firmi), located about three kilometers upstream from the anthropized area of Decazeville, with very low metal concentrations, and non-limiting nutrient content;
- the organically polluted site (Decazeville), located in the urban zone, highly nutrient-polluted and showing no metal concentration;
- the metal polluted site (Joanis), located just after the confluence of the Riou-Mort with the Riou-Viou, a stream carrying seepage from a former zinc factory, presenting high levels of dissolved cadmium and zinc (SAY 1978). In the year 2000, AUDRY *et al.* (2004b) measured concentrations of 16mg/L dissolved cadmium and 1300mg/L dissolved zinc (average values).

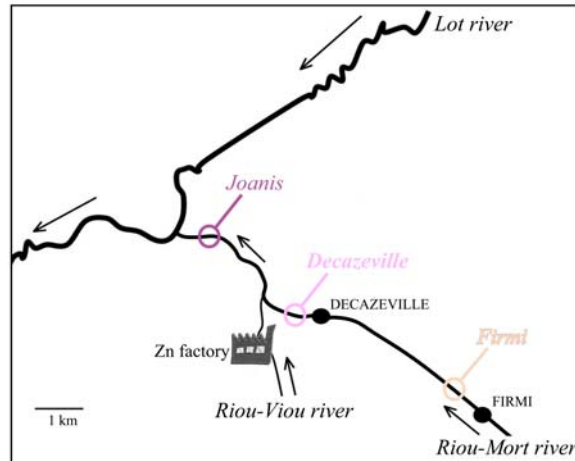


Figure 1: Location of the study sites.

### *Physical and chemical characterization of sites and metal concentrations in the water*

Temperature, pH, conductivity and dissolved oxygen were measured at each site and sampling date in the stream (WTW, Weilheim, Germany), during the 20-day experimental period (July 2004).

Stream water samples were simultaneously collected and brought back to the laboratory for nutrient measurements. Phosphate, silica, ammonium, nitrite and nitrate concentrations were determined according to French and international standards (NF T90-023, NF T90-007, NF EN ISO 11732 and NF EN ISO 13395, respectively).

Metal concentrations at Joanis were analysed by the TGM laboratory, University Bordeaux1.

### *Periphyton sampling method*

At each of the three sites, two plastic racks, perforated and equipped with glass slides (so-called, diatometers), were left in the water column for 4 to 20 days. They were immersed 5 centimeters below the water surface under similar light penetration conditions, perpendicular to the current (Figure 2). The diatometers (300 cm<sup>2</sup> area for both sides) were used as artificial substrates for algal attachment. Periphyton samples were taken from early stages of development to mature biofilms (BARRANGUET *et al.* 2005, PETERSON and STEVENSON 1990) after 4, 7, 14 and 20 days. Each time, one glass substrate was removed from each of the diatometers at the three sites, and scraped with a cutter blade to form two replicate periphyton samples per site and per sampling date.



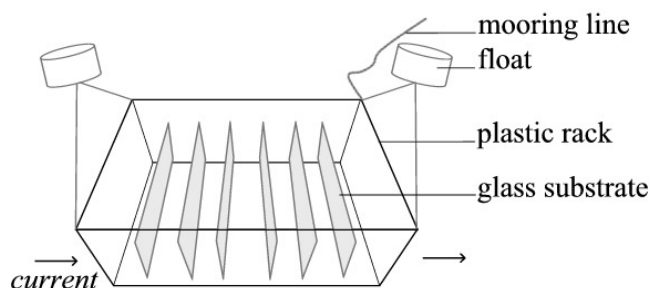


Figure 2: Schematic representation of one rack of artificial substrates, as moored at the three experimental sites.

All the periphyton samples were diluted to a standard volume of 100mL and divided into four aliquots assigned to various analyses. 5mL were preserved with 1mL of formalin solution (37% formol) for analysis of diatom assemblages. 20mL were filtered through a GF/C filter; the filters were kept refrigerated (4°C) in the dark for less than 24 hours, for chlorophyll *a* measurements in accordance to French standard NF T90-117. A further 20mL were used for particulate matter analysis: biofilm dry weights were determined following the European standard NF EN 872; after drying and weighing, samples were ashed at 500°C for 1 hour in a muffle furnace and results were reported as ash-free dry matter (AFDM). 50mL were put in Teflon© jars for metal concentration measurements: after filtration and mineralization, cadmium and zinc concentrations were measured by flame atomic absorption spectrophotometry (Varian AA20, Victoria, Australia). Detection limits were 15µg/L for cadmium and 10µg/L for zinc.

### ***Quantitative and qualitative analysis of diatom assemblages***

Diatom density was estimated in each untreated sample using a Nageotte counting chamber by enumeration of the total number of cells exhibiting chloroplasts in 10 fields (1.25µL each, 0.5mm depth) using light microscopy at 400x magnification (photomicroscope Leica DMRB, Wetzlar, Germany). Data were recorded as cells per unit area of sampled substrate (number of diatom cells/cm<sup>2</sup>).

Samples assigned to taxonomic analysis of diatom assemblages were prepared according to the procedure described in ANSP protocols (CHARLES *et al.* 2002). After digestion of 3mL of the formalin-fixed sample in boiling hydrogen peroxide (30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and hydrochloric acid (35%), permanent slides were prepared by mounting the cleaned diatom frustules on a glass microscope slide in Naphrax© (Northern Biological Supplies Ltd, UK), a high refractive index (1.74)

medium. A minimum of 400 diatom valves were identified on each slide at 1,000x magnification, following the Süßwasserflora (KRAMMER and LANGE-BERTALOT 1986 – 1991) classification. Relative abundances of each species and species richness were estimated, and diatom diversity was calculated using the Shannon index. Community biovolume was estimated after the theoretical biovolume (given in the literature) of each species found in the samples. The total biovolume of the community (B) was calculated as follows:  $B = \sum_{i=1}^n (RA_{sp\_i} \times B_{sp\_i})$ , where n: species richness of the sample,  $RA_{sp\_i}$ : relative abundance of species i,  $B_{sp\_i}$ : theoretical volume of species i. Individual deformities (cells with abnormal general shape and / or diatoms with deformed valve wall ornamentation) were observed and their frequency determined.

### *Statistical analyses*

Data were checked for normality and variance equality using STATISTICA software (v. 5.1, StatSoft, 1998) before launching the tests. Analysis of variance (ANOVA) methods were performed to study the effect of site (Firmi, Decazeville and Joanis) on biofilm characteristics (dry weights, AFDM, pigments and cadmium content) and diatom densities. If the null hypothesis was disproven, we used Tukey HSD post-hoc test to detect significant differences between groups. We considered all statistical results significant that had their probability (noted  $p$ ) less than 0.05.

A principal component analysis (PCA) was performed with PC-ORD software (MCCUNE and MEFFORD 1999) on data related to relative abundances of diatom species, in order to visualise taxonomic differences between diatoms communities collected in the different sites. Only the species having cumulative relative abundances representing more than 1% (of the whole dataset) were considered.

To test the assumption that diatom abnormalities reflect a high level of metal contamination, we calculated the correlation coefficients between the frequency of deformed valves and cadmium concentrations in the biofilm. We then calculated a one-tailed  $p$ -value indicating the probability of obtaining a mean correlation value larger than the observed value given the null hypothesis of randomly occurring abnormalities.

## Results

### *Field colonization conditions*

The physical and chemical parameters measured in the sampled waters are shown in Table 1.

Table 1. Values corresponding to physical and chemical characteristics of stream water determined during the experimental period (dl: detection limit: 0.3mg/L for NO<sub>3</sub>, 1µg/L for cadmium and 10µg/L for zinc).

	Firmi				Decazeville				Joanis			
	4 days	7 days	14 days	20 days	4 days	7 days	14 days	20 days	4 days	7 days	14 days	20 days
pH	7.4	7.4	7.4	7.3	7.9	7.7	7.7	7.6	8.0	7.7	7.7	7.7
conductivity (µS/cm)	1377	1223	1410	1427	3340	1104	1052	961	2350	1426	1290	1257
temperature	17.6	16.4	19.4	24.0	19.6	17.4	17.0	23.1	19.7	17.6	16.7	24.8
O <sub>2</sub> (mg/L)	7.0	8.0	9.3		4.6	4.5	4.0		7.2	7.3	6.4	
NH <sub>4</sub> (mg/L)	0.545	0.718	1.33	2.34	0.888	7.42	8.06	4.9	0.773	1.95	2.5	3.43
NO <sub>3</sub> (mg/L)	2.96	3.61	2.46	2.89	3.08	1.53	<dl	1.12	23.71	52.41	38.36	36
NO <sub>2</sub> (mg/L)	0.184	0.184	0.236	0.24	0.711	0.1	0.302	0.12	0.932	0.968	0.913	1.32
PO <sub>4</sub> (mg/L)	0.01	0.10	0.10	0.04	0.17	0.99	1.16	0.95	0.58	0.87	0.82	2.86
Si (mg/L)	10.5	13.5	12	14.5	14	11	10	11	12	11.5	12	12.5
Cd (µg/L)	<dl	<dl	<dl	<dl	<dl	<dl	<dl	<dl	26	26	27	24
Zn (µg/L)	<dl	<dl	<dl	<dl	<dl	<dl	<dl	<dl	2104	2170	2305	1617

At all sites, pH was around 7.5 and water temperatures were about 20°C during this study. Comparable silica levels were found in the three sites, and at concentrations sufficient for diatom development. Maximum nutrient values were observed in Decazeville and Joanis. Decazeville is impacted by quite strong organic and domestic contaminations: orthophosphate pollution as well as high levels of reduced forms of nitrogen like ammonia which nitrify downstream (the highest nitrate and nitrite concentrations were found at Joanis). Conductivity values were quite high (about 1500µS/cm) and a peak was observed on the 5<sup>th</sup> of July in Decazeville and Joanis.

Biofilm settlement at Joanis took place under much higher cadmium (more than 20 fold) and zinc (more than 200 fold) water concentrations than in Firmi and Decazeville.

Current velocity values (<http://hydro.rnde.tm.fr/>) were quite constant during the experimental period ( $0.13 \pm 0.01\text{m}^3/\text{s}$ ), except for day 19 when the flow increased two-fold ( $0.24\text{m}^3/\text{s}$ ).

**Biofilm description (see Table 2 and Figure 3)**

At each site, the dry weight and organic content increased as the biofilm settled, except for the Decazeville site, where dry weight decreased at the last sampling date. In general, dry weight and organic content of Decazeville biofilms from day 4 to day 14 were significantly higher ( $p < 0.05$ ) than those measured at Firmi and Joanis.

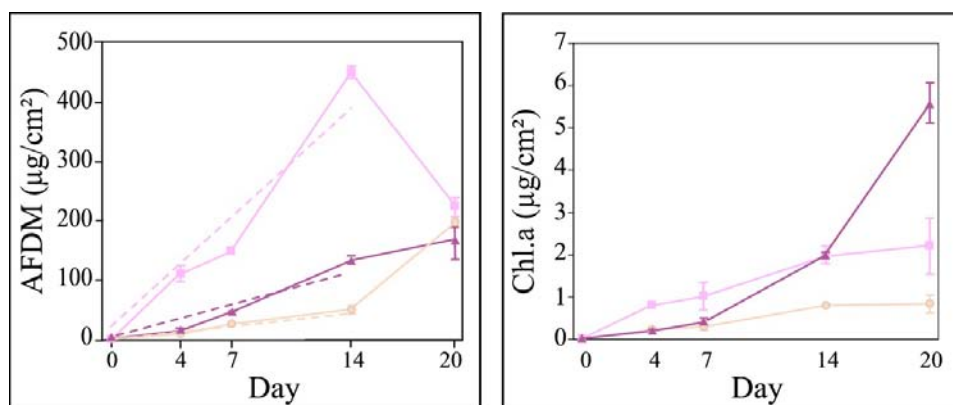


Figure 3: Mean ash-free dry mass values (plain lines) and colonization rates (dotted lines) and chlorophyll a concentrations in the biofilms of the different sites during the experiment (● : Firmi; ■ : Decazeville; ▲ : Joanis). Error bars: standard deviations.

Total chlorophyll *a*, as an estimate of algal biomass, showed the same trends, except for at Joanis after 20 days, where a large increase of pigment concentration was observed.

Diatom densities on artificial substrates allowed the quantitative characterization of communities. At Firmi, a mean density of 3200 cells/cm<sup>2</sup> (standard error = 125 cells/cm<sup>2</sup>) was found after three weeks colonization. 10300 cells/cm<sup>2</sup> were found at Decazeville, whereas 11500 cells/cm<sup>2</sup> were recorded at Joanis. Standard errors respectively represented 250 and 980 cells/cm<sup>2</sup>. A site effect was observed ( $p < 0.05$ ) and Tukey tests separated Firmi from the sites downstream.

Table 2. Mean dry weight values (DW), ash free dry matter values (AFDM), chlorophyll a concentrations (Chl.a) and cadmium ([Cd]) and zinc ([Zn]) concentrations in biofilm grown on artificial glass substrates (nm: not measured).

	Firmi				Decazeville				Joaanis			
	4 days	7 days	14 days	20 days	4 days	7 days	14 days	20 days	4 days	7 days	14 days	20 days
DW (mg/cm <sup>2</sup> )	0.029	0.081	0.176	0.350	0.311	0.358	0.984	0.584	0.026	0.094	0.319	0.407
AFDM (mg/cm <sup>2</sup> )	0.011	0.026	0.049	0.197	0.112	0.149	0.450	0.224	0.015	0.047	0.135	0.168
Chl.a (µg/cm <sup>2</sup> )	0.22	0.31	0.81	0.84	0.79	1.02	1.96	2.21	0.19	0.39	2.00	5.58
[Cd] (µg/g DW)	<dl	<dl	<dl	2	67	59	47	39	1081	1868	1427	1327
[Zn] (µg/g DW)	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	2766	nm	nm	nm	4171

**Metal accumulation (see Table 2)**

Accumulation of cadmium in Joanis biofilms increased in the first week of glass slide colonization and then stabilized around 1400µg/gDW. Cadmium concentrations in biofilms were significantly lower ( $p<0.05$ ) in Firmi and Decazeville sites.

Zinc levels were analyzed in Decazeville and Joanis biofilms sampled at day 20 and bioaccumulation was much higher at Joanis: around 4200µg/gDW, whereas 2800µg/gDW was measured at Decazeville.

**Characterization of diatom assemblages**

Although species richness and diversity were similar between sites (42 taxa were identified per sample and Shannon index values averaged 3), taxonomic composition and relative abundances of diatom communities differed. Firmi and Decazeville assemblages were dominated by *Cyclotella meneghiniana* KÜTZING, and the species *Nitzschia palea* (KÜTZING) W.SMITH, *Navicula gregaria* DONKIN and *Melosira varians* AGARDH were well represented. In the Joanis site, the dominant taxa, *Eolimna minima* (GRUNOW) LANGE-BERTALOT, was found in large amounts (around 50% of the total community).

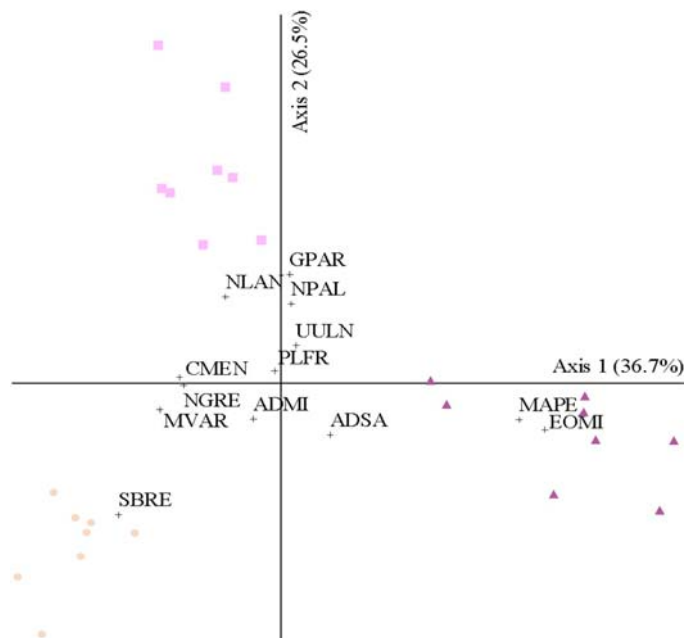


Figure 4: Principal Component Analysis (PCA), with regions of data points identified by sample site (● : Firmi; ■ : Decazeville; ▲ : Joanis). Vectors plotted indicate the correlation scores for significant correlations between species relative abundances and the two principal components axes. (ADMI: *Achnantheidium minutissimum*, ADSA: *Achnantheidium saprophila*, CMEN: *Cyclotella meneghiniana*, EOMI: *Eolimna minima*, GPAR: *Gomphonema parvulum*, MAPE: *Mayamaea atomus* var. *permitis*, MVAR: *Melosira varians*, NGRE: *Navicula gregaria*, NLAN: *Navicula lanceolata*, NPAL: *Nitzschia palea*; PLFR: *Planothidium frequentissimum*, SBRE: *Surirella brebissonii*, UULN: *Ulnaria ulna*)

Result of PCA based on relative abundances of diatom species (Figure 4) revealed great differences between the three sites, and showed strong homogeneity within each site. Axes 1 and 2 accounted for around 37% and 27% respectively of the total variability. Axis 1 separated diatom communities developed up- and downstream of the metal pollution source. Firmi and Decazeville stations were found on the left-half plane (negative values) and the Joanis site on the right-half plane (positive values). Separation along Axis 2 expressed the gradient of organic pollution.

Biovolume calculated for each site represented about  $1400\mu\text{m}^3$  (average for a diatom cell) at Firmi and  $1200\mu\text{m}^3$  at Decazeville, and decreased to  $700\mu\text{m}^3$  at Joanis. Differences in species sizes were also noticed: species measuring less than  $100\mu\text{m}^3$  represented half of the taxa identified at Joanis, whereas they were found in low percentages (about 10%) at Firmi and Decazeville. More than 50% of big species ( $> 500\mu\text{m}^3$  biovolume) were enumerated at Firmi and Decazeville, and only counted for 20% of the relative abundance at Joanis (Figure 5).

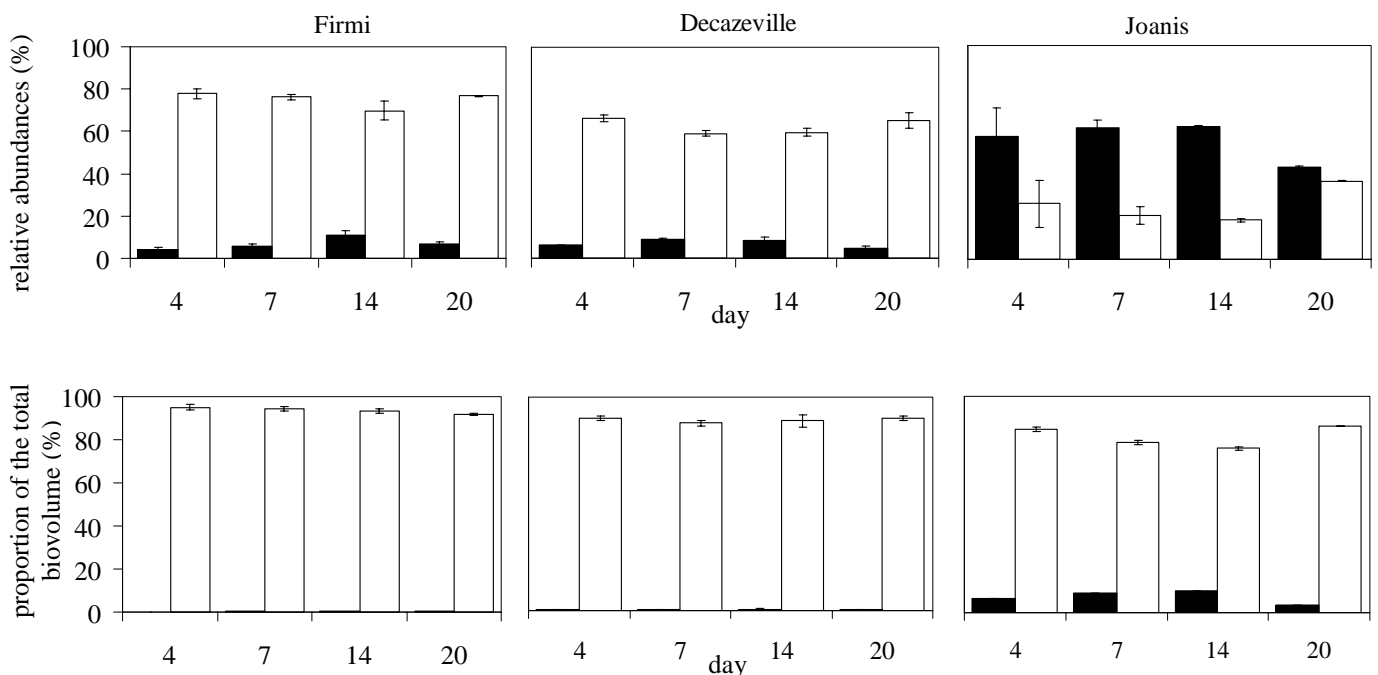


Figure 5: Relative abundances of small species (less than  $100\mu\text{m}^3$ , in black) and large species (more than  $500\mu\text{m}^3$ , in white) and their contribution to the total biovolume of the community. Error bars: standard deviations.

The frequency of abnormal frustules (Figure 6), which were almost only found at Joanis, increased significantly as biofilm settled. Most of them were araphids: *Fragilaria spp.* (average abundance in the cadmium-polluted site after a 20-day exposure: 3.01‰), *Ulnaria ulna*

(NITZSCH.) LANGE-BERTALOT (36.17‰). Deformities were also observed among raphids like *Achnanthydium saprophila* (KOBAYASI & MAYAMA) ROUND & BUKHTIYAROVA (1.00‰), *Eolimna minima* (2.01‰), *Gomphonema parvulum* (KÜTZING) KÜTZING (4.52‰) and *Nitzschia palea* (1.00‰). A few abnormal frustules of centric diatoms (*Cyclotella meneghiniana* (0.50‰)) and monoraphids (*Cocconeis pediculus* EHRENBERG (0.50‰), *Planothidium frequentissimum* (LANGE-BERTALOT) ROUND & BUKHTIYAROVA (1.00‰), *P. lanceolatum* (BREBISSON ex KÜTZING) LANGE-BERTALOT (1.00‰)) were found as well.

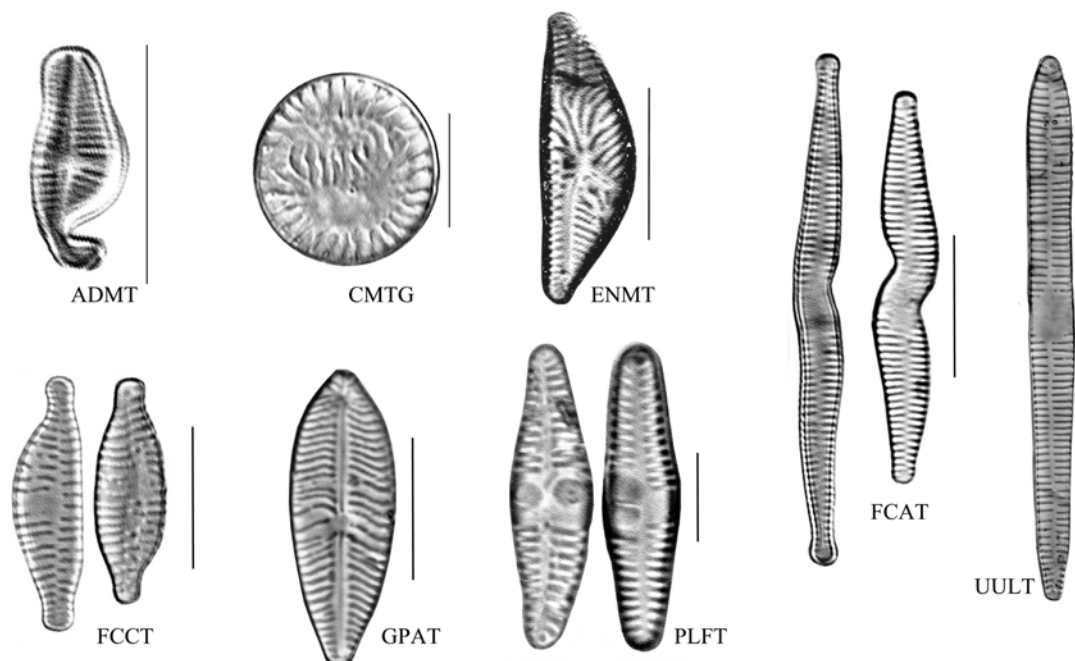


Figure 6: Deformed individuals of *Achnanthydium minutissimum* (ADMT), *Cyclotella meneghiniana* (CMTG), *Encyonema minutum* (ENMT), *Fragilaria capucina* (FCAT), *F. capucina* var. *capitellata* (FCCT), *Gomphonema parvulum* (GPAT), *Planothidium frequentissimum* (PLFT) and *Ulnaria ulna* (UULT) collected from Joanis site.

Scale bar = 10  $\mu$ m

## Discussion

The results obtained for days 4, 7 and 14 demonstrated that *in situ* combined high levels of organic contaminants and heavy metals were detrimental to biofilm settlement, but also that the organic matrix under metal exposure develops adaptive strategies. Biofilm growth was followed at the three sites from substrate immersion to a 20-day colonization. Quantitative differences were observed between the three stations. At each site, primary production (chlorophyll *a*) and biofilm dry weight increased with immersion duration; moreover biofilm settlement and development depended on nutrient availability and on the presence or not of dissolved cadmium

and zinc: at Firmi, biofilm was not as dense as at Decazeville, where increases in nutrient availability favored biofilm development (LAWRENCE *et al.* 2004). Despite a high nutrient potential, metal pollution in Joanis waters did not allow biofilm to grow as thick and dense as in Decazeville, as described by IVORRA *et al.* (2002b) in a polluted Dutch river. In Joanis, polluted by combined nutrient and metals, biofilm thickness was reduced compared to the Decazeville site. Colonization rates (as measured by accumulating total AFDM per day) also supported the notion that the nutrient-enriched site Decazeville (mean colonization rate: 0.02gAFDM/day) was a significantly more productive station than upstream site Firmi (0.002gAFDM/day) or even downstream Joanis (0.006gAFDM/day). In contrast, diatom densities were quite similar between Decazeville and Joanis sites, but most of the diatoms found at Joanis were small and attached taxa, enveloped in a thinner organic layer protecting individuals from strong exposure (LEHMANN *et al.* 1999).

On the 20<sup>th</sup> July (one day before the fourth sampling), the river Riou-Mort was in spate at the Decazeville and Joanis sites; the flow increased from about 0.13 to 0.24m<sup>3</sup>/s. This moderate hydrological event probably led to different rates of erosion of the biofilms on the glass substrates. GHOSH and GAUR (1998) showed that species relatively weakly attached to the substrate, which are often associated with particulate matter, are likely to disappear when exposed to higher velocity currents. At Decazeville, the very thick and dense organic matrix may have undergone extensive loss of organic matter, of suspended particles, of weakly attached algae (for instance, filamentous algae which were well represented), whereas at Joanis the thin and strongly attached biofilms were less affected by the increase of flow.

Qualitative modifications were also revealed. Chlorophyll *a* and diatom densities revealed a strong effect of organic pollution; the high nutrient levels seemed to set the degree of diatomic biomass development, that was quite similar at Decazeville and Joanis. However, although the actual quantity of biomass was similar, metal pollution dramatically changed the algae it was composed of. Community biovolume calculations and ratios of small to big taxa were found to reveal differences between metal-free and contaminated sites. Average biovolume for a single cell at Firmi and Decazeville was larger than 1000µm<sup>3</sup> and was drastically reduced at Joanis (700µm<sup>3</sup>). The contribution to the total community biovolume of small species (<100µm<sup>3</sup>) and big ones (>500µm<sup>3</sup>) was also relevant for distinguishing between up- and downstream of the metal pollution source, but needed more calculations than relative abundances of species from each size category. These results are in accordance with reductions in cell sizes reported for metal-stressed environments (CATTANEO *et al.* 1998) and also with studies demonstrating that the



uptake of metal ions from solution into the cell cytoplasm is directly linked to the specific surface area of the algae (KHOSHMANESH *et al.* 1997). As intracellular cadmium is suspected of perturbing algal metabolism (BERTRAND *et al.* 2001, PAULSSON *et al.* 2000, PERREIN-ETTAJANI *et al.* 1999, PINTO *et al.* 2003), some kind of selection may happen. When exposed to metal contaminations, taxa presenting lower cell surface areas would be less disfavored than big species which are able to remove higher amounts of poisonous matter (JOUX-ARAB *et al.* 2000). To our knowledge, very few studies have attempted to correlate cell size to metal contamination. The dominance of small, adnate species under cadmium and zinc pollution was however described by MEDLEY and CLEMENTS (1998) and CATTANEO *et al.* (2004). Several authors have also observed shorter valves during contamination events. GENSEMER (1990) examined the reduction in cell size of *Asterionella ralfsii* var. *americana* KÖRN in response to additions of aluminium to cultures, and CATTANEO *et al.* (2004) reported striking size changes in the dominant diatom taxa during a period of cadmium, zinc and iron contamination in Lac Dufault (Canada). Size reduction of individuals as well as of the global community appeared to be an excellent specific indicator of metal contamination. However, it involves an additional counting effort and thus increased cost which is hardly compatible with routine biomonitoring.

Taxonomic differences between diatom assemblages were investigated using principal component analysis. PCA discriminated communities according to their pollution characteristics. Separation along Axis 1 (in accordance with the gradient of cadmium and zinc) allowed us to characterize metal sensitivity of some species. High relative abundances of *Cyclotella meneghiniana* (at the end of the experiment, this species represented around 50% of the total community at both Firmi and Decazeville sites) and *Melosira varians* (which represented more than 10% of those assemblages) were correlated to negative values on Axis 1, *i.e.* with high sensitivity to cadmium and zinc. Species from the genera *Cyclotella* were already described as metal-sensitive. RUGGIU *et al.* (1998) described it for *C. bodanica*, VAN DAM *et al.* (1990) for *C. comensis* GRUNOW in VAN HEURCK, SHEHATA *et al.* (1999) for *C. comta* (EHR.) KÜTZING or GOLD (2002) for *C. stelligera* CLEVE and GRUN (in VAN HEURCK). Although its status is still discussed by BARRANGUET *et al.* (2002) and BLANCK *et al.* (2003) who found it quite tolerant, many authors found *Melosira varians* sensitive to heavy metals (FEURTET-MAZEL *et al.* 2003, GOLD *et al.* 2003a, b, IVORRA 2000, MEDLEY and CLEMENTS 1998, PERES *et al.* 1997). This study also revealed a sensitivity of *Navicula gregaria* exposed to metal contamination. Representative of Joanis communities (corresponding to positive Axis 1 values), *Eolimna minima* was found to be very tolerant (according to several indications found in the literature:

PERES *et al.* 1997, GOLD 2002, FEURTET-MAZEL *et al.* 2003), as well as *Mayamaea atomus* var. *permitis*. Higher Axis 2 values characterized communities from the Firmi site, which were strongly opposed to the Decazeville communities grown under high levels of organic matter. *Surirella brebissonii* KRAMMER & LANGE-BERTALOT settled quickly and stabilized in abundances close to 10% at Firmi, when Decazeville assemblages were associated with higher proportions of saprophile species such as *Gomphonema parvulum*, *Navicula lanceolata* (AGARDH) EHRENBERG and *Nitzschia palea*.

In agreement with DICKMAN (1998), who suspected deformed individuals to be a valid indicator of metal pollution, significant frequencies of diatom deformities were associated with metal-contaminated waters in our study ( $p < 0.05$ ). A significant correlation ( $p < 0.05$ ,  $r^2 = 0.92$ ) was shown between cadmium concentrations in biofilm and the frequency of abnormal cell morphology of diatoms. Anomalous *Fragilaria* species have already been observed by several authors in metal-polluted conditions (ANDRESEN and TUCHMAN 1991, DICKMAN 1998, MCFARLAND *et al.* 1997). Samples collected previously on the Riou-Mort river (during experiments conducted in 2003 and 2004) also exhibited deformed frustules of the following species: *Eolimna minima*, *Gomphonema parvulum*, *Nitzschia palea*, which were also found in this study. Although the frequency of abnormalities was statistically meaningful in the metal-contaminated site, there is a need to improve this tool, in order to be used for river quality assessment. We suggest more time be devoted to enumerating deformed valves on slides, by increasing the counting effort.

### Summary

1. Biofilm development, as well as diatom community settlement, are affected by combined organic and heavy metal pollution.
2. Under the conditions of this study, the diatoms *Eolimna minima* and *Mayamaea atomus* var. *permitis* showed high resistance to cadmium/zinc contamination.
3. The results suggest that calculating the total biovolume of the diatom community could serve as an additional criterion to assess metal pollution.
4. The frequency of abnormal forms, as a tool for monitoring heavy metal-pollution, also seems to be a relevant indicator.

## **Acknowledgements**

We thank Henri BOUILLARD and Véronique DUFLO from the LEESA for their technical assistance in the field, Muriel BONNET and Maryse BOUDIGUES who carried out the water sample analyses, and Jacques BONNET who played some role in the production of the pictures.

## **Reference list**

- ANDRESEN, N. A. and M. L. TUCHMAN (1991): Anomalous diatom populations in Lakes Michigan and Huron in 1983. - *J. Gt. Lakes Res.* **17**(1): 144-149.
- AUDRY, S., J. SCHÄFER, G. BLANC, C. BOSSY and G. LAVAUX (2004): Anthropogenic components of heavy metal (Cd, Zn, Cu, Pb) budgets in the Lot-Garonne fluvial system (France). - *Appl. Geochem.* **19**(5): 769-786.
- BARRANGUET, C., M. PLANS, E. VAN DER GRINTEN, J. J. SINKE and W. ADMIRAAL (2002): Development of photosynthetic biofilms affected by dissolved and sorbed copper in a eutrophic river. - *Environ. Toxicol. Chem.* **21**(9): 1955-1965.
- BARRANGUET, C., B. VEUGER, S. A. M. VAN BEUSEKOM, P. MARVAN, J. J. SINKE and W. ADMIRAAL (2005): Divergent composition of algal-bacterial biofilms developing under various external factors. - *Eur. J. Phycol.* **40**(1): 1-8.
- BERTRAND, M., B. SCHOEFS, P. SIFFEL, K. ROHACEK and I. MOLNAR (2001): Cadmium inhibits epoxidation of diatoxanthin to diadinoxanthin in the xanthophyll cycle of the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. - *Febs Letters* **508**(1): 153-156.
- BLANCK, H., W. ADMIRAAL, R. F. M. J. CLEVEN, H. GUASCH, M. VAN DEN HOOP, N. IVORRA, B. NYSTROM, M. PAULSSON, R. P. PETTERSON, S. SABATER and G. M. J. TUBBING (2003): Variability in zinc tolerance, measured as incorporation of radio-labeled carbon dioxide and thymidine, in periphyton communities sampled from 15 European river stretches. - *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **44**(1): 17-29.
- CATTANEO, A., A. ASIOLI, P. COMOLI and M. MANCA (1998): Organisms' response in a chronically polluted lake supports hypothesized link between stress and size. - *Limnol. Oceanogr.* **43**(8): 1938-1943.
- CATTANEO, A., Y. COUILLARD, S. WUNSAM and M. COURCELLES (2004): Diatom taxonomic and morphological changes as indicators of metal pollution and recovery in Lac Dufault (Québec, Canada). - *J. Paleolimnol.* **32**: 163-175.

- CHARLES, D. F., C. KNOWLES and R. S. DAVIES (2002): Protocols for the analysis of algal samples collected as part of the U.S. Geological Survey National Water-Quality Assessment Program. - Patrick Center for Environmental Research, The Academy of Natural Sciences, Philadelphia, PA, 124 p.
- DICKMAN, M. D. (1998): Benthic marine diatom deformities associated with contaminated sediments in Hong Kong. - *Environ. Int.* **24**(7): 749-759.
- FEURTET-MAZEL, A., C. GOLD, M. COSTE and A. BOUDOU (2003): Study of periphytic diatom communities exposed to metallic contamination through complementary field and laboratory experiments. - *J. Phys. IV* **107**: 467-470.
- GENSEMER, R. W. (1990): Role of aluminium and growth rate on changes in cell size and silica content of silica-limited populations of *Asterionella ralfsii* var. *americana* (Bacillariophyceae). - *J. Phycol.* **26**: 250-258.
- GHOSH, M. and J. P. GAUR (1998): Current velocity and the establishment of stream algal periphyton communities. - *Aquat. Bot.* **60**(1): 1-10.
- GOLD, C. (2002): Etude des effets de la pollution métallique (Cd/Zn) sur la structure des communautés de diatomées péiphytiques des cours d'eau. Approches expérimentales *in situ* et en laboratoire. - Thesis, Univ. Bordeaux I Ecole Doct. Sciences du vivant, Géosciences et Sciences de l'Environnement. 175 p.
- GOLD, C., A. FEURTET-MAZEL, M. COSTE and A. BOUDOU (2003a): Effects of cadmium stress on periphytic diatom communities in indoor artificial streams. - *Freshwat. Biol.* **48**: 316-328.
- GOLD, C., A. FEURTET-MAZEL, M. COSTE and A. BOUDOU (2003b): Impacts of Cd and Zn on the development of periphytic diatom communities in artificial streams located along a river pollution gradient. - *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **44**: 189-197.
- GOMEZ, N. and M. LICURSI (2003): Abnormal forms in *Pinnularia gibba* (Bacillariophyceae) in a polluted lowland stream from Argentina. - *Nova Hedw.* **77**(3-4): 389-398.
- IVORRA, N. (2000): Metal induced succession in benthic diatom consortia. - Thesis, University of Amsterdam, Faculty of Science, Department of Aquatic Ecology and Ecotoxicology. 157 p.
- IVORRA, N., J. HETTELAAR, M. H. S. KRAAK, S. SABATER and W. ADMIRAAL (2002): Responses of biofilms to combined nutrient and metal exposure. - *Environ. Toxicol. Chem.* **21**(3): 626-632.
- JOUX-ARAB, L., B. BERTHET and J. M. ROBERT (2000): Do toxicity and accumulation of copper change during size reduction in the marine pennate diatom *Haslea ostrearia*? - *Mar. Biol.* **136**(2): 323-330.
- KHOSHMANESH, A., F. LAWSON and I. G. PRINCE (1997): Cell surface area as a major parameter in the uptake of cadmium by unicellular green microalgae. - *Chem. Eng. J.* **65**(1): 13-19.

- KRAMMER, K. and H. LANGE-BERTALOT (1986 - 1991): Bacillariophyceae 1. Teil: Naviculaceae. 876 p.; 2. Teil: Bacillariaceae, Epithemiaceae, Surirellaceae, 596 p.; 3. Teil: Centrales, Fragilariaceae, Eunotiaceae, 576 p.; 4. Teil: Achnanthaceae. Kritische Ergänzungen zu *Navicula* (Lineolatae) und *Gomphonema*. 437 p. - G. Fischer Verlag., Stuttgart.
- LAWRENCE, J. R., M. R. CHENIER, R. ROY, D. BEAUMIER, N. FORTIN, G. D. W. SWERHONE, T. R. NEU and C. W. GREER (2004): Microscale and molecular assessment of impacts of nickel, nutrients, and oxygen level on structure and function of river biofilm communities. - Appl. Environ. Microbiol. **70**(7): 4326-4339.
- LEHMANN, V., G. M. J. TUBBING and W. ADMIRAAL (1999): Induced metal tolerance in microbenthic communities from three lowland rivers with different metal loads. - Arch. Environ. Contam. Toxicol. **36**(4): 384-391.
- MCCUNE, B. and M. J. MEFFORD (1999): Multivariate analysis of ecological data, version 4.01. - MJM Software, Gleneden Beach, Oregon USA, 237 p.
- McFARLAND, B. H., B. H. HILL and W. T. WILLINGHAM (1997): Abnormal *Fragilaria* spp. (Bacillariophyceae) in streams impacted by mine drainage. - J. Freshwat. Ecol. **12**(1): 141-149.
- MEDLEY, C. N. and W. H. CLEMENTS (1998): Responses of diatom communities to heavy metals in streams: The influence of longitudinal variation. - Ecol. Appl. **8**(3): 631-644.
- PAULSSON, M., B. NYSTROM and H. BLANCK (2000): Long-term toxicity of zinc to bacteria and algae in periphyton communities from the river Göta Älv, based on a microcosm study. - Aquat. Toxicol. **47**(3-4): 243-257.
- PERES, F., M. COSTE, F. RIBEYRE, M. RICARD and A. BOUDOU (1997): Effects of methylmercury and inorganic mercury on periphytic diatom communities in freshwater indoor microcosms. - J. Appl. Phycol. **9**(3): 215-227.
- PERREIN-ETTAJANI, H., J. C. AMIARD, J. HAURE and C. RENAUD (1999): Effects of metals (Ag, Cd, Cu) on the biochemical composition and compartmentalization of these metals in two microalgae *Skeletonema costatum* and *Tetraselmis suecica*. - Can. J. Fish. Aquat. Sci. **56**(10): 1757-1765.
- PETERSON, C. G. and R. J. STEVENSON (1990): Post spate development of epilithic algal communities in different current environments. - Can. J. Bot. **68**: 2092-2105.
- PINTO, E., T. C. S. SIGAUD-KUTNER, M. A. S. LEITAO, O. K. OKAMOTO, D. MORSE and P. COLEPICOLO (2003): Heavy metal-induced oxidative stress in algae. - J. Phycol. **39**(6): 1008-1018.
- RUGGIU, D., A. LUGLIE, A. CATTANEO and P. PANZANI (1998): Paleocological evidence for diatom response to metal pollution in Lake Orta (N. Italy). - J. Paleolimnol. **20**(4): 333-345.

SAY, P. J. (1978): Le Riou-Mort, affluent du Lot pollué par les métaux. I. Etude préliminaire de la chimie et des algues benthiques. - *Annls Limnol. (Int. J. Limnol.)* **14**(1-2): 113-131.

SHEHATA, S. A., M. R. LASHEEN, I. A. KOBBA and G. H. ALI (1999): Toxic effect of certain metals mixture on some physiological and morphological characteristics of freshwater algae. - *Water Air Soil Pollut.* **110**(1-2): 119-135.

TORRES, E., A. CID, C. HERRERO and J. ABALDE (2000): Effect of cadmium on growth, ATP content, carbon fixation and ultrastructure in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin. - *Water Air Soil Pollut.* **117**(1-4): 1-14.

VAN DAM, H. and A. MERTENS (1990): A comparison of recent epilithic diatom assemblages from the industrially acidified and copper polluted lake Orta (Northern Italy) with old literature data. - *Diat. Res.* **5**(1): 1-13.

## 2- Etablissement des communautés en conditions hivernales.

Pour simplifier la compréhension et la comparaison entre les résultats obtenus dans les suivis estival et hivernal, cette partie décrira les résultats obtenus pendant l'expérimentation menée du 3 au 23 mars 2005, sur les mêmes stations que pour la manipulation de juillet 2004 et avec les mêmes pas de temps entre les prélèvements.

### 2.1 – Hydroclimat des stations.

Le Tableau 4 recense les valeurs des paramètres physico-chimiques mesurés dans les eaux échantillonnées à chaque campagne de prélèvement.

Tableau 4 : Principales caractéristiques physico-chimiques des eaux aux différentes dates de prélèvement (ld: limite de détection: 1µgCd/L et 10µgZn/L).

	Firmi				Decazeville				Joanis			
	4 jours	7 jours	14 jours	20 jours	4 jours	7 jours	14 jours	20 jours	4 jours	7 jours	14 jours	20 jours
pH	7,8	7,6	7,9	8,0	7,5	7,8	7,8	8,0	7,5	7,8	7,9	8,2
conductivité (µS/cm)	678	538	639	578	688	2967	3212	3156	735	1602	1723	1744
température	3,4	4,5	10,3	13	2,7	5,5	10,3	13,8	2,8	6,1	5	13,9
O <sub>2</sub> (mg/L)	11,1	9,4	9,1	11,13	9	8,1	9,7	8,66	10,3	9,3	9,9	
NH <sub>4</sub> (mg/L)	0,88	0,39	0,61	0,62	0,92	1,02	0,71	2,01	0,92	3,44	3,54	2,98
NO <sub>3</sub> (mg/L)	4,99	3,86	2,77	2,65	5,56	4,35	4,15	4,64	33,84	11,55	26,57	37,33
NO <sub>2</sub> (mg/L)	0,07	0,04	0,08	0,12	0,18	0,22	0,29	0,59	0,73	0,46	1,10	1,11
PO <sub>4</sub> (mg/L)	0,24	0,08	0,21	0,12	0,30	0,28	0,24	0,48	0,21	1,45	1,43	1,26
Si (mg/L)	7	7,5	5,5	6,5	6,5	9	8,5	10	6,5	9	9,5	8
Cd (µg/L)	<ld	<ld	<ld	<ld	<ld	<ld	<ld	<ld	19,4	23	23,4	19,6
Cd (mg/kg)	<ld	<ld	<ld	<ld	<ld	<ld	<ld	<ld	579	408	602	349
Zn (µg/L)	<ld	<ld	<ld	<ld	<ld	<ld	<ld	<ld	1220	2060	1730	1210
Zn (mg/kg)	<ld	<ld	<ld	<ld	<ld	<ld	<ld	<ld	9810	6050	6740	5460

Quel que soit le site, le pH avoisine 7,8 pendant toute la durée de l'étude. Les températures des eaux augmentent au fil des échantillonnages, de  $3 \pm 0,4^{\circ}\text{C}$  le 7/03/05 à  $13,5 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  le 23/03/05. Les concentrations en silice (de 6,6mg/L en moyenne à Firmi et 8,4mg/L à Decazeville et Joanis) sont non limitantes pour le développement des communautés diatomiques.

On note une augmentation dans les concentrations en nutriments de l'amont à l'aval du Riou-Mort. En effet, les pollutions organiques et domestiques de l'agglomération de Decazeville

impactent fortement les deux stations aval. A Joanis, les concentrations en orthophosphates sont jusqu'à 5 fois supérieures à celles de Decazeville, les nitrates sont multipliés par un facteur 10. Cette augmentation considérable résulte vraisemblablement, d'une part, de rejets provenant de la station d'épuration présente quelques centaines de mètres en amont du site Joanis et, d'autre part, de phénomènes de nitrification des composés azotés entre Decazeville et Joanis.

Ces effets anthropiques marqués sont également observables sur les mesures de conductivité électrique : de l'ordre de  $600\mu\text{S}/\text{cm}$  à Firmi, elles atteignent jusqu'à plus de  $3000\mu\text{S}/\text{cm}$  à Decazeville, les phénomènes de dilution par les apports du Riou-Viou en amont de Joanis ne réduisent cependant ces grandeurs que de moitié, avec des valeurs toujours élevées, de l'ordre de  $1700\mu\text{S}/\text{cm}$ .

Le niveau de contamination métallique est significativement supérieur à Joanis, avec des concentrations en cadmium et en zinc dissous s'élevant respectivement à  $21,4 \pm 2,1\mu\text{gCd}/\text{L}$  et  $1555 \pm 415\mu\text{gZn}/\text{L}$ . En conditions hivernales où le débit du Riou-Mort est plus élevé ( $0,34 \pm 0,05\text{m}^3/\text{s}$  sur la durée de l'expérimentation), les concentrations métalliques sont inférieures à celles mesurées en juillet 2004, *i.e.*  $26\mu\text{gCd}/\text{L}$  et  $2000\mu\text{gZn}/\text{L}$  en moyenne à Joanis. Ce phénomène de dilution des concentrations en métaux dissous pendant des épisodes de débit important a déjà été décrit d'après l'étude de suivis saisonniers des flux d'ETM dans le Riou-Mort (Audry et al., 2004a Morin et al, accepted). Les métaux dans la phase particulaire représentent  $485 \pm 125\text{mgCd}/\text{kg}$  et  $7015 \pm 1935\text{mgZn}/\text{kg}$ .

## ***2.2 – Caractéristiques du biofilm (Tableau 5 et Figure 36).***

Les concentrations en métaux mesurées dans les biofilms reflètent les conditions d'exposition des sites. L'accumulation de cadmium dans les biofilms de Joanis augmente au fur et à mesure du suivi, de  $158 \pm 10\mu\text{gCd}/\text{g}$  de poids sec au cours de la première semaine à  $750 \pm 260\mu\text{gCd}/\text{g}$  de poids sec à la fin de l'expérimentation. On observe la même tendance à la bioaccumulation du zinc, depuis  $1480 \pm 200\mu\text{gZn}/\text{g}$  de poids sec dès 4 jours d'immersion jusqu'à  $17000 \pm 6000\mu\text{gZn}/\text{g}$  de poids sec après 20 jours d'exposition. Les concentrations en cadmium et en zinc sont significativement inférieures ( $p < 0,05$ ) à Decazeville et Firmi, avec des accumulations moyennes de  $5\mu\text{gCd}/\text{g}$  de poids sec et  $1400\mu\text{gZn}/\text{g}$  de poids sec respectivement.



Tableau 5 : Détermination des valeurs moyennes des poids secs (PS), de la matière sèche sans cendre (MSSC), des concentrations en chlorophylle a (Chl.a), en cadmium ([Cd]) et en zinc ([Zn]) et des densités cellulaires dans les biofilms collectés sur substrats artificiels (ld : limite de détection).

	Firmi				Decazeville				Joanis			
	4 jours	7 jours	14 jours	20 jours	4 jours	7 jours	14 jours	20 jours	4 jours	7 jours	14 jours	20 jours
PS (mg/cm <sup>2</sup> )	0,04	0,07	0,24	0,38	0,01	0,02	0,07	0,32	0,00	0,04	0,76	0,56
MSSC (mg/cm <sup>2</sup> )	0,02	0,03	0,07	0,13	0,00	0,01	0,05	0,19	0,00	0,02	0,36	0,28
Chl.a (µg/cm <sup>2</sup> )	0,16	0,30	0,88	0,97	0,02	0,04	0,44	1,17	0,02	0,09	1,34	1,33
[Cd] (µg/g PS)	<ld	<ld	9,08	6,5	<ld	14,6	6,5	5,8	168	148	461	749
[Zn] (µg/g PS)	1189	1291	1420	1092	1671	2502	972	1419	1478	3235	8137	16992
Densités (cel/cm <sup>2</sup> )	1930	5120	10490	15274	716	778	12337	22724	602	217	39274	35279

Le poids sec et la matière sèche sans cendre augmentent au fur et à mesure de l'installation du biofilm pour chaque site, de façon assez régulière à Firmi sur toute la durée du suivi, et à Decazeville et Joanis au début de la mise en place du biofilm. Ensuite, on observe une inflexion vers une croissance accélérée dès une semaine (à Joanis) et deux semaines d'immersion des substrats dans l'eau (à Decazeville). Les mesures de PS et de MSSC sont globalement toujours supérieures à Joanis. Cependant, ces indicateurs baissent sensiblement entre les deux dernières dates d'échantillonnage. On observe les mêmes tendances pour l'indicateur chlorophylle a ; excepté à Decazeville où les concentrations en pigments, très faibles pour les trois premières dates d'échantillonnage, augmentent fortement après 14 jours de colonisation.

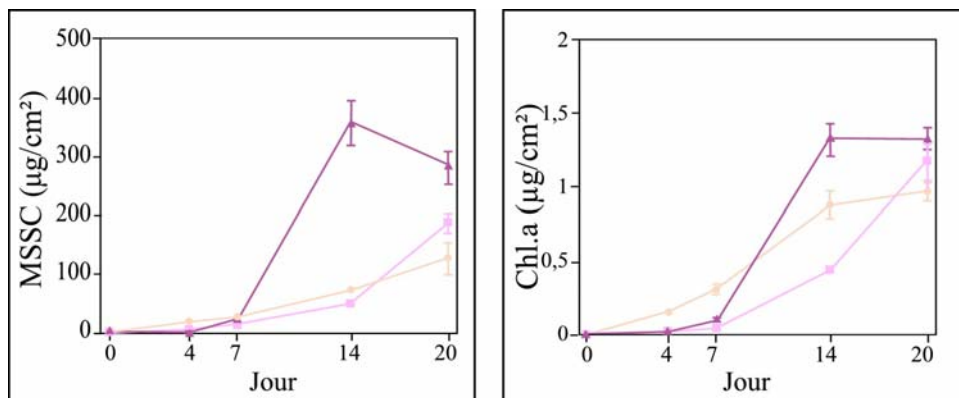


Figure 36 : Valeurs moyennes de matière sèche sans cendre et de concentrations en chlorophylle a dans les biofilms des trois stations, pendant la durée du suivi (● : Firmi; ■ : Decazeville; ▲ : Joanis). Barres d'erreur : écarts-types.

Les analyses réalisées sur le biofilm au cours de cette expérimentation ne suffisent pas à mettre en évidence d'effets délétères des métaux. Les différences observées en termes de mise en place de la biomasse périphytique (évaluée au travers des indicateurs matière sèche sans cendre et chlorophylle *a*) traduisent en effet un développement plus important à Joanis à partir d'une semaine d'immersion. Ce résultat, très différent des observations réalisées en été (Morin *et al.* 2006b), peut être imputable aux concentrations très élevées en nutriments observées au niveau de cette station. Les organismes périphytiques, plus stimulés dans leur croissance par la forte disponibilité nutritive que freinés par la contamination métallique (Lozano et Pratt 1994, Lawrence *et al.* 2004), trouvent à Joanis des conditions favorables à un développement accru.

Il faut par ailleurs tenir compte de l'impact, probablement moindre, d'une variabilité saisonnière dans la physiologie des organismes constitutifs du biofilm. En hiver, les biofilms sont composés de diatomées (Whitton 1975), contrairement à l'été où les algues filamenteuses représentent une part importante de la biomasse algale. Les niveaux de tolérance aux métaux, variables pour différents groupes algaux, pourraient partiellement expliquer les effets moins marqués (Whitton 2003) en hiver. D'autre part, on peut suspecter une mauvaise estimation de l'exposition réelle des organismes aux contaminants. En effet, ce sont les concentrations en métal total dans le biofilm que nous mesurons ici, elles représentent le métal piégé dans la matrice organique (dont les particules métalliques) et le métal non-échangeable, fixé par les cellules, dont nous ne mesurons pas la part, et par conséquent l'impact. D'autre part, les différences de composition en termes d'organismes évoquées précédemment peuvent modifier la biodisponibilité des métaux : les diatomées, en particulier les individus de petite taille, sécrètent des exopolysaccharides en quantités importantes (Rijstenbil et Gerringa 2002). Ces polymères ont une fonction reconnue dans le piégeage des métaux et la réduction de leur toxicité (Hoagland *et al.* 1993, Pistocchi *et al.* 2000).

### ***2.3 – Caractérisation des assemblages diatomiques.***

Les densités de diatomées énumérées après trois semaines de colonisation sont en moyenne de  $15000 \pm 350$  cellules/cm<sup>2</sup> de substrat (lame de verre) à Firmi, de  $22700 \pm 2400$  cellules/cm<sup>2</sup> à Decazeville et de  $35300 \pm 4000$  cellules/cm<sup>2</sup> à Joanis.

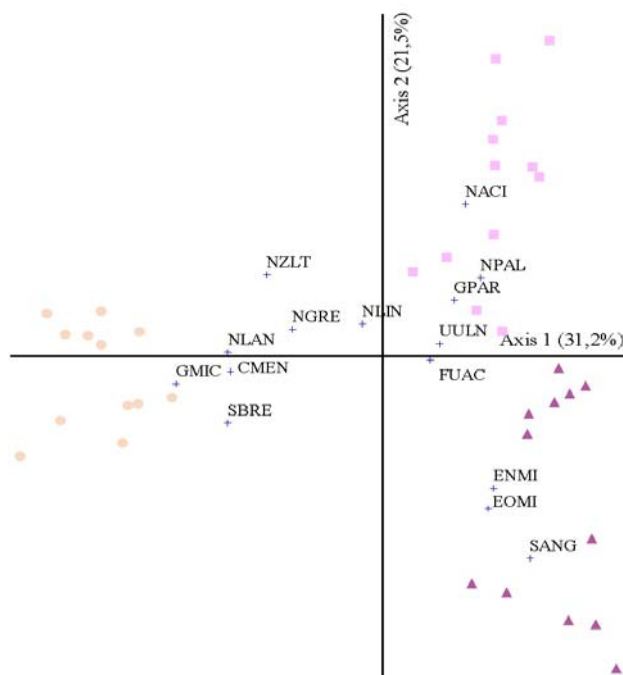


Figure 37 : Analyse en Composantes Principales des inventaires diatomiques des trois stations échantillonnées, pendant la durée du suivi (● : Firmi; ■ : Decazeville; ▲ : Joanis). Barres d'erreur : écarts-types.

L'Analyse en Composantes Principales, réalisée à partir des 15 espèces les plus représentées dans les échantillons (*i. e.* dont les abondances relatives sont supérieures à 5%), présente un bon pouvoir descriptif. En effet, 52,7% de la variance est expliquée dans le plan 1-2, avec une contribution de plus de 30% pour l'axe 1 et de plus de 20% pour l'axe 2. La représentation graphique dans le plan 1-3 (l'axe 3 pèse pour 16,6%) sépare également les trois groupes identifiables sur la Figure 37.

L'axe 1 exprime le gradient de contamination organique : il discrimine les communautés de Firmi de celles de Decazeville et Joanis. Les espèces *Cyclotella meneghiniana*, *Gomphonema micropus* var. *micropus*, *Navicula gregaria*, *N. lanceolata*, *Nitzschia linearis* var. *tenuis* et *Surirella brebissonii* sont fortement corrélées avec les valeurs négatives de cet axe, et caractérisent les assemblages inventoriés à Firmi. L'axe 2 traduit le gradient de pollution polymétallique. Dans le demi-plan des valeurs positives se retrouvent les communautés de Decazeville, caractérisées par une association de *Ulnaria ulna* (23%), *Nitzschia palea* (21%), *Navicula gregaria* (11%) et *Gomphonema parvulum* (7%). Le demi-plan des valeurs négatives contient les assemblages observés à Joanis, marqués par une dominance de *Ulnaria ulna* (22%) et *Surirella angusta* (12%), et l'apparition d'espèces comme *Eolimna minima* ou *Encyonema minutum*.

Le niveau de contamination métallique ne semble pas réduire ici le développement quantitatif des diatomées (estimé au travers de la densité de cellules énumérées/cm<sup>2</sup> de substrat). Comme nous l'avons observé pour les caractéristiques du biofilm dans sa globalité, les concentrations élevées en nitrates et orthophosphates mesurées à Joanis favorisent vraisemblablement le développement massif des diatomées. En effet, on y dénombre (voir plus bas) des abondances élevées d'espèces saprophytes, dont la multiplication est apparemment plus facilitée par une disponibilité nutritive importante que défavorisée par la présence de métaux dans l'eau (Ivorra *et al.* 2002b, Blanck *et al.* 2003).

Cependant, l'ACP illustre des différences qualitatives très marquées. En conditions hivernales, la disponibilité en nutriments semble le principal facteur structurant des communautés. Ainsi, on retrouve abondamment à l'aval de l'agglomération de Decazeville des espèces saprophytes comme *Nitzschia palea*, *Gomphonema parvulum*, et dans une moindre mesure, *Nitzschia acicularis*. Ces espèces trouvent dans les eaux du Riou-Mort aval, où le niveau de contamination organique est élevé, des conditions favorables à leur développement. Le facteur pollution métallique, bien que secondaire dans la structuration spécifique de ces assemblages, a néanmoins un poids important dans la discrimination des sites visualisée sur l'ACP. Il permet de mettre en évidence des caractéristiques de sensibilité aux métaux des espèces dominantes à Decazeville qui disparaissent en partie à Joanis (citons notamment *Nitzschia palea*, *Navicula gregaria* et *Gomphonema parvulum* – les textes qui décrivent leur sensibilité aux métaux sont référencés dans l'Annexe A) et de confirmer la tolérance des espèces recensées à l'aval de la contamination. En effet, les espèces dominantes, *i.e.* *Surirella angusta*, *Encyonema minutum* ou *Eolimna minima*, sont décrites dans la littérature comme tolérantes à des niveaux de contamination élevés en métaux (cf. Annexe A). La présence en abondances élevées de cette dernière espèce, *E. minima*, sert de plus d'indicateur de pollution par les métaux lourds aux Etats-Unis (Bahls 2005, *comm. pers.*).

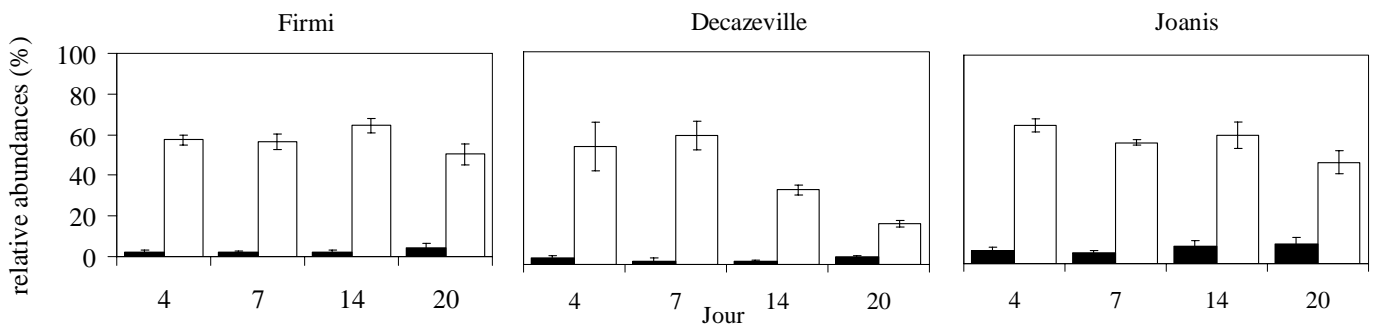


Figure 38: Abondances relatives des espèces de petite et de grande taille, respectivement inférieures à 100μm<sup>3</sup>, en noir, et supérieures à 500μm<sup>3</sup>, en blanc. Les barres d'erreur représentent l'écart-type.

La fréquence des espèces de petite taille (de biovolume inférieur à  $100\mu\text{m}^3$ ) est statistiquement plus élevée ( $p < 0,05$ ) à Joanis (Figure 38). Ce résultat, déjà obtenu sur la base des inventaires d'été (Morin *et al.* 2006b), confirme les observations de Cattaneo *et al.* (2004) de réduction des tailles cellulaires dans des environnements soumis à une contamination métallique.

Cependant, la contribution des petites espèces au biovolume total ne représente en moyenne que 0,2% à Joanis, contre presque 20% en conditions estivales. En réalité, dans cette étude, les espèces de taille moyenne sont présentes dans des proportions élevées, et contribuent de manière non négligeable (plus de 12%) au biovolume total. Parmi ces espèces, on dénombre notamment *Encyonema minutum*, l'une des espèces majoritaires, dont la tolérance aux métaux a déjà été décrite, et particulièrement sur un site du Riou-Mort aval (Feurtet-Mazel *et al.* 2003, Gold *et al.* 2003a). On rencontre également en abondances relatives plus modestes *Navicula gregaria*, espèce de taille moyenne, commune dans les eaux fraîches.

La fréquence d'apparition des anomalies morphologiques (Figure 39) confirme au travers de cette expérimentation sa pertinence comme indicateur de pollution métallique. A Joanis, on dénombre sur la durée du suivi des abondances de  $23,1 \pm 3,9\%$ , contre  $3,3 \pm 1,3\%$  à Firmi et  $2,7 \pm 0,8\%$  à Decazeville. Il semble probable qu'une part très faible des individus présente "naturellement" des anomalies morphologiques, responsable d'un "bruit de fond" estimé à moins de 5‰ (observation également réalisée par Morin et Coste 2006b). Au-delà de ces valeurs, on peut considérer que la fréquence des déformations est anormalement élevée, et révélatrice de niveaux de contamination métallique importants. C'est le cas à Joanis, où les malformations affectent principalement l'espèce *Ulnaria ulna* (73% des anomalies dénombrées), puis dans une moindre mesure *Gomphonema parvulum* (7%). Des individus déformés en conditions de stress métallique ont déjà été rencontrés au sein de ces deux espèces (Peres 2000, Morin et Coste 2006b, Morin *et al.* 2006b).

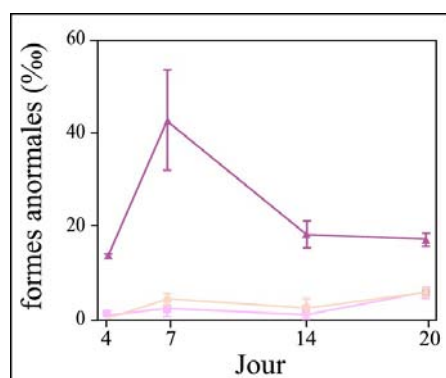


Figure 39 : Evolution des abondances relatives d'espèces déformées à Firmi (●), Decazeville (■) et Joanis (▲). Les barres d'erreur représentent l'écart-type.

Cette étude de la cinétique de colonisation par les communautés diatomiques en conditions hivernales confirme les apports de l'analyse de la structure des communautés diatomiques pour la bioindication des pollutions métalliques.

La croissance de la biomasse des biofilms, comme la densité de diatomées par unité de surface de substrat échantillonné, traduisent ici plus la disponibilité de la ressource nutritive que des effets éventuels des métaux.

En revanche, la présence de *Surirella angusta*, *Encyonema minutum* et *Eolimna minima* en aval de la contamination métallique renforce l'impact des observations de résistance déjà réalisées ; ces espèces se révèlent ici tolérantes à des niveaux de contamination métalliques supérieurs aux limites fixées par le SEQ-Eaux superficielles. A l'instar des résultats obtenus au fil des parties précédentes, le descripteur fréquence des anomalies morphologiques confirme également sa pertinence comme indicateur de pollution métallique.

### ***B – VARIABILITE SAISONNIERE DES EFFETS SUR LES BIOFILMS ET LES COMMUNAUTES DIATOMIQUES ASSOCIEES.***

---

#### **Seasonal effects on the relationships between cadmium accumulation in freshwater biofilms and periphytic diatom communities <sup>1</sup>**

Duong, T.T. <sup>1</sup>, Morin, S. <sup>2</sup>, Herlory, O. <sup>1</sup>, Feurtet-Mazel, A. <sup>1</sup>, Coste, M. <sup>2</sup> et Boudou, A. <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Université de Bordeaux 1 / LEESA, 1 place Dr Peyneau, 33120 Arcachon, France

<sup>2</sup> Cemagref Bordeaux, U. R. Réseaux Epuration et Qualité des Eaux, 50 av. de Verdun, 33610 Cestas, France

#### **Abstract:**

The relationships between diatom species to cadmium accumulated in biofilms of the Riou Mort River (South West France) were studied through two seasons: Summer and Winter in 2004 – 2005. Biofilms were sampled from artificial substrates immersed along pollution gradient during twenty days. Dynamics of diatom communities and cadmium accumulation were followed by collecting samples after 4, 7, 14 and 20 days of biofilm colonization. Cadmium sorption in biofilms was significantly higher in the polluted station (Joanis) than in the reference one (Firmi)

---

<sup>1</sup> Article en préparation.

for both seasons. Benthic diatom composition and correlation of diatom species with cadmium varied. Positive correlations between *Eolimna minima*, *Nitzschia palea*, *Encyonema minutum*, *Surirella angusta*, *Gomphonema parvulum* and cadmium accumulated in biofilms were observed, indicating that these species are tolerant to high levels of cadmium. On the other hand, negative correlations between *Cyclotella meneghiniana*, *Navicula gregaria* and *Navicula lanceolata* and cadmium suggested those species to be sensitive diatom species. Metal indicator groups will be meaningful for biomonitoring in natural aquatic systems.

**Key words:**

Biofilms; Diatom communities; Cadmium; Seasonal effect.

**Introduction**

Pollution of aquatic systems by heavy metals is an important environmental problem because of their potential accumulation and transfer along the food chains, leading to more or less severe toxic effects on the different biological levels, from the cellular and molecular basis to the communities and biocenosis. Metal sources for freshwater systems result from natural processes (weathering of soils and rocks, volcanic eruptions, etc) and from a variety of human activities (mining, smelting) (Audry et al., 2004; Ruangsomboona and Wongrat, 2006). Trace metals such as cadmium (Cd) are considered to be non-essential elements for living organisms; Cd is one of the most toxic metals, with a high solubility in water and a great bioaccumulation capacity in many aquatic species, notably algae and bivalves (Torres et al., 1998; Lee et al., 2001; Baudrimont et al., 1997a).

In freshwater ecosystems, biofilms are complex matrix attached to submerged substrata, made of periphytic algae, bacteria, fungi and their secretory products such as extracellular polymeric substances (EPS), organic and inorganic non living materials (Newman and McIntosh, 1989; Sekar et al., 2002; Burkholder, 1996). The capacity of freshwater periphytic algae to accumulate metals has been reported and discussed in several papers (Whitton and Say, 1975; Newman et al., 1989; Clements, 1991; Ramelow et al., 1992). Metal contents in algae were used to reflect their bioavailability from the aquatic biotopes, especially when their concentrations in water were too low to be detectable by routine analyses (Foster, 1982; Clements, 1991; Behra et al., 2002).

Three main processes are involved in metal accumulation by periphytic algae: (i) binding to EPS; (ii) cell surface adsorption; (iii) intracellular uptake (Holding and Carter, 2003).

The use of freshwater algae in general and periphytic diatoms in particular as indicators for water quality led to definition of several diatom indices which are currently applied in many countries (Cemagref, 1982; Watanabe et al., 1986; Kelly, 1998; Prygiel and Coste, 1999). The use of the structure of diatom communities to assess impacts of metal pollution on freshwater system has been discussed by several authors (Medley and Clements, 1998; Ivorra et al., 1999; Gold et al., 2002). Numerous studies, based on biofilm samples collected along pollution gradients or within indoor or outdoor artificial streams, have investigated metal impacts on periphyton communities, the majority of the studies being devoted to diatom communities (e.g. Rushforth et al., 1981; Gustavson and Wängberg, 1995; Soldo and Behra, 2000; Gold et al., 2003a; ; Gold et al., 2003b; Guasch et al., 2003). The polymetallic pollution of the Lot River in the South-West of France (Figure 1), essentially based on Cd and zinc (Zn) discharges from a zinc ore treatment factory via a small tributary (Riou-Mort), represents a remarkable field site for ecotoxicological studies. Gold et al. (2002; 2003a and 2003b) have investigated metal impacts on periphytic diatom communities after colonization of artificial substrates introduced along the pollution gradient (Stations 1, 2 and 3: Figure 1). The confrontation between field and experimental data obtained from indoor artificial streams enriched with diatom communities collected at the reference station (St. 1) and contaminated with metals added solely or mixed (Cd, Zn, Cd+Zn), has revealed the key role played by cadmium towards toxic effects on the diatom communities: significant decrease of cell density and diversity; presence of abnormal diatom frustules (Gold et al., 2002; Gold et al., 2003a).

In this paper, we present a new field study on this site in order to investigate the relationships between Cd accumulation levels in biofilms and the structural characteristics of periphytic diatom communities after 4, 7, 14 and 20 days of colonization on artificial substrates. All the previous studies have solely taken into account the contamination pressure via the determination of metal concentrations in the dissolved fraction of the water column during the different colonization phases. Cd concentrations in biofilms result both from the metal bioavailability and the structural and functional properties of the biofilms. In order to investigate seasonal effects, we have set up a comparative study between July 2004 and March 2005, using identical artificial substrates introduced in the reference upstream zone of the Riou-Mort River (Firmi station) and in the polluted zone (Joanis station) located downstream from the metallic factory discharges via the Riou-Viou tributary and the small town of Decazeville (6,787 inhabitants), which generates an urban pollution of organic and mineral nature into the Riou-Mort (Figure 1).



**Materials and methods.**

*Study area and sampling stations:*

The study area is located in the industrial basin of Decazeville (SW France), in the middle section of the Lot River (Figure 1). Since the end of the 19<sup>th</sup> century, the Riou-Mort River, a small tributary of the Lot River, is contaminated by metal discharges originated in the “Vieille Montagne” factory, specialized in zinc ore treatment. Two sampling stations were selected (Figure 1): the reference station (Firmi), located on the upstream zone of the Riou-Mort River, with very low metal background levels in the water and non-limiting nutrient content; the polluted station (Joanis), located in the downstream zone of the Riou-Mort River, at about 3 km after its confluence with the Riou-Viou River, characterized by high concentrations of Cd and Zn in the water column (Audry et al., 2004; Blanc et al., 1999).

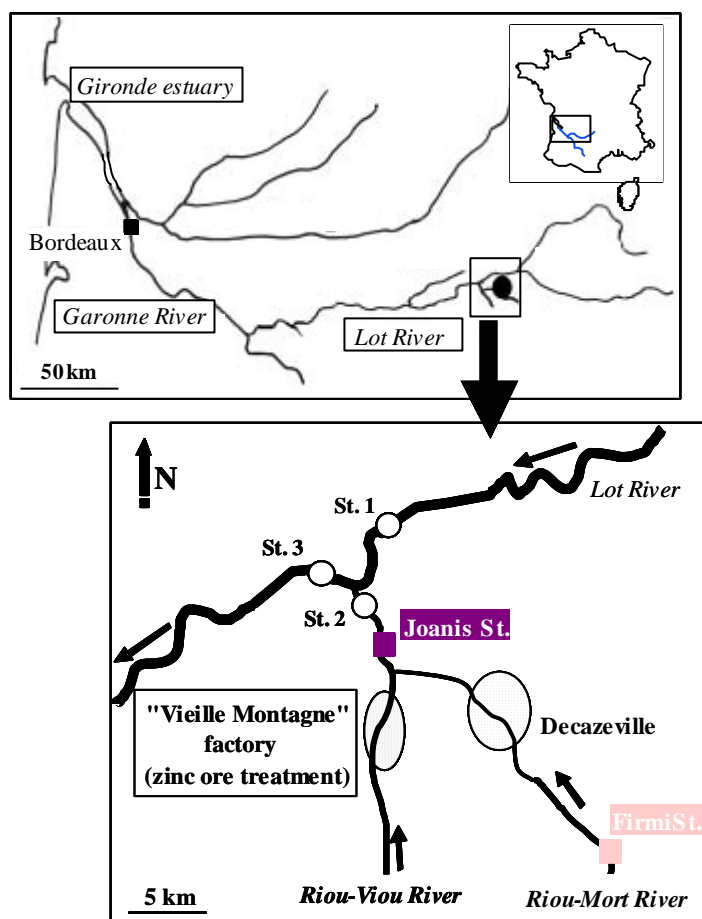


Figure 1: Former sampling stations (St) and new ones (Firmi, Joanis) along the metallic pollution gradient on the Lot River and its tributaries (SW France).

***Biofilm collection:***

Glass slides (10x15 cm - 300 cm<sup>2</sup> for both sides) were used as artificial substrates for biofilm attachment. At each sampling station, three plastic racks containing four vertical glass slides were immersed in the water column, parallel to the current at about 10-15 cm below the water surface (see Gold et al., 2002 for details). Biofilm samples were collected after 4, 7, 14 and 20 days of colonization, in July 2004 (07/01 to 07/21) and March 2005 (03/03 to 03/23). At each sampling day, one glass slide was removed randomly from each rack (3 replicates), then scratched using a cutter blade and washed with mineral water. All biofilm samples were diluted in a standard volume of 100 mL and divided after homogenization into three fractions assigned to various analyses: 5 mL were preserved with 1 mL of a formalin solution (Formaldehyde 37%, Prolabo, France) for diatom identification; 20 mL were used for ash-free dry mass (AFDM) determination; 50 mL for biofilm dry weight measurement and Cd concentration determination. The 25 mL remaining sample was stored for additional analyses (if necessary).

***Physico-chemical characteristics of the water and Cd concentrations in the dissolved fraction of the water column:***

Temperature, conductivity, pH and dissolved oxygen concentration were measured *in situ* at each sampling date using a multi-probe analyser (multi-sensor WTW, Weilheim, Germany). Water samples were also collected for nutrient analyses and phosphate, nitrate, nitrite, ammonium and silica concentrations were determined according to French and international standards (NT T 90-023, NF T 90-007, NF EN ISO 11723 and NF EN ISO 13395, respectively).

Dissolved Cd concentration was measured using ICP-MS (X7, THERMO, Elemental, UK) with external calibration. Indium was used as internal standard and after each batch of five samples, a calibration blank and one calibration standard were measured to control potential sensitivity variations or memory effects. The analytical method employed was continuously quality checked by analysis of certified reference river waters (SLRS-3, SLRS-4). Accuracy was within 5% of the certified values and the analytical error (relative standard deviation) was generally better than 5% for concentrations ten times higher than detection limits (see Audry, 2003 for details). Detection limit were 0.1 µg Cd.L<sup>-1</sup>.

***Biofilm ash-free dry mass (AFDM):***

AFDM was determined following the European standard NF EN 872: after filtration using pre-weighed glass fibre filters (47mm, 1  $\mu\text{m}$  pore size, Sartorius, Göttingen, Germany) and drying at 105 °C during one hour (dry weight measurement, DW), biofilm samples were ashed at 500 °C for one hour in a muffle furnace (ash weight) (Solax Technology Ltd, China). AFDM were expressed in  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^2$  (Morin et al., 2006). In this paper, results were expressed in AFDM percentages (AFDM/total DW x 100).

***Cd accumulation levels:***

Biofilm samples (50 mL) were filtered through metal-free filters (47 mm, 0.45  $\mu\text{m}$  pore size, Millipore). Filters were dried at 60 °C for 48 h and weighed, to determined the total dry weights (DW), expressed in  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^2$ . The filters were digested for Cd analysis by nitric acid attack (3 mL of  $\text{HNO}_3$ , Merck, Darmstadt, Germany) in a pressurized medium at 100 °C for 3 h (hot block CAL 3300, Environmental Express, USA). Digestates were then diluted up to 23 mL with ultra-pure water (Milli Q, Bedford, MA, USA). Cd concentrations were determined by flame atomic absorption spectrometry (Varian AA20, Australia), with a detection limit of  $15\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . The validity of the method was checked periodically with certified biological reference materials (Tort 2, lobster hepatopancreas; Dolt 2, dogfish liver from NRCC-CNRC, Ottawa, Canada). Values were consistently within the certified ranges (data not shown). Cd concentrations in biofilms were expressed in  $\text{ng}\cdot\text{cm}^{-2}$ .

***Samples preparation for diatom studies:***

In the laboratory, after homogenization, each sample collected for diatom studies was heated at 100 °C with hydrogen peroxide (30 %) and hydrochloric acid (35 %) to remove organic matter and dissolve calcium carbonates. The cleaned frustules were then mounted on a microscope glass slide in a high refractive index medium (Naphrax ©, Northern Biological Supplies Ltd, UK; RI = 1.74). Up to 400 diatom frustules were counted and identified on each slide at 1000x magnification, following the Süßwasserfloras classification (Krammer and Lange-Bertalot, 1986 - 1991). Relative abundances (%) of each diatom species and species richness were estimated; diversity index was calculated using the Shannon formula (Shannon and Weaver, 1949). Abnormal forms of diatom species with deformed general shape and/or valve wall ornamentation were counted.

***Data treatment:***

Statistical analysis was carried out using one-way variance model (ANOVA) to reveal the effects of colonization duration (days) and sampling station (Joanis and Firmi) on biofilm AFDM percentage and Cd concentration. Normality and homogeneity of variance were verified by using Cochran's test. If a significant effect was observed, *post-hoc* tests (Least Significant Difference test, LSD; Newman-Keuls test) were performed to isolate the significantly different groups with a significance level of  $p < 0.05$ . All statistical investigations were performed using Statistica software (version 6.1., StatSoft France). Values are mean  $\pm$  standard error (SE). A Principal Components Analysis (PCA) using SPAD Software (version 5.6., Decisia, Paris, France) was performed on the relative abundances of diatom species, in order to reveal taxonomic differences between communities collected from the two stations during the two seasons (July 2004 and March 2005). Pearson correlation matrix between Cd accumulation levels in biofilms and relative abundances of the 20 most abundant diatom species were calculated after PCA. Indices (IPS and diversity) were calculated using OMNIDIA software (Lecointe et al., 1993).

**Results*****Environmental characteristics of the two sampling stations:***

Values for physico-chemical parameters measured at Firmi and Joanis stations during the two 20 days sampling periods in July 2004 and March 2005 are summarized in Table 1. Extreme water temperatures ranged from 2.8 °C (Joanis, March, day 4) to 24.8 °C (Joanis, July, day 20). The average values for Firmi in July and March were 19.4 and 7.8 °C, respectively; for Joanis, they were 19.7 and 8.2 °C, respectively, without significant differences between the two stations. No significant differences were observed between the two stations for the oxygen concentrations during the two sampling periods: 10.0 mg.L<sup>-1</sup> in March and 7.5 mg.L<sup>-1</sup> in July. The average values for pH were 7.6 for Firmi and 7.8 for Joanis, without significant differences between the two seasons. For the conductivity, no significant difference was observed between the two stations in July (Firmi: 1580  $\pm$  259  $\mu$ s.cm<sup>-1</sup> and Joanis: 1359  $\pm$  46  $\mu$ s.cm<sup>-1</sup>); in March, values from Joanis were significantly higher (1451  $\pm$  240 and 608  $\pm$  31  $\mu$ s.cm<sup>-1</sup>, respectively). Marked differences were observed between ammonium, nitrate, nitrite and phosphate concentrations, in favour of Joanis. Silica determinations in water samples showed weak differences between stations but significant differences between the two seasons (7.4  $\pm$  0.7 mg.L<sup>-1</sup> in March and 12.4  $\pm$  0.7 mg.L<sup>-1</sup> in July).

Cd concentrations measured in the dissolved fraction ( $< 0.45 \mu\text{m}$ ) of the water column were systematically below the detection limit ( $0.1 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) at the reference station (Firmi). High Cd concentrations were measured at the polluted site (Joanis), with mean values of 25.6 and  $17.4 \mu\text{g.L}^{-1}$  in July 2004 and March 2005, respectively.

Table 1: Physico-chemical characteristics of stream water determined during the two experimental periods (d.l.: detection limit:  $0.1 \mu\text{g.L}^{-1}$  for cadmium).

Parameters	Firmi				Joanis			
	4 days	7 days	14 days	20 days	4 days	7 days	14 days	20 days
July 2004								
pH	7.4	7.4	7.4	7.3	8.0	7.7	7.7	7.7
T (°C)	17.6	16.4	19.4	24	19.7	17.6	16.7	24.8
Cond ( $\mu\text{S.cm}^{-1}$ )	1377	1223	1410	1427	2350	1426	1290	1257
O <sub>2</sub> ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	7.0	8.0	9.3	nm	7.2	7.3	6.4	nm
NH <sub>4</sub> ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	0.54	0.71	1.33	2.34	0.77	1.95	2.5	3.43
NO <sub>3</sub> ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	3	3.6	2.5	2.9	23.7	54.4	38.4	36
NO <sub>2</sub> ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	0.18	0.18	0.23	0.24	0.9	1	0.9	1.3
PO <sub>4</sub> ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	0.11	0.1	0.1	0.04	0.58	0.87	0.82	2.86
Si ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	10.5	13.5	12	15	12	11.5	12	12.5
Cd ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	< d.l.	< d.l.	< d.l.	< d.l.	26	26	27	24
March 2005								
pH	7.6	7.6	7.9	8	7.5	7.8	7.9	8.2
T (°C)	3,4	4,5	10,3	13	2,8	6,1	5	13,9
Cond ( $\mu\text{S.cm}^{-1}$ )	678	538	639	578	735	1602	1723	1744
O <sub>2</sub> ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	11,1	9,4	9,1		10,3	9,3	9,9	10,1
NH <sub>4</sub> ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	0.88	0.39	0.61	0.62	0.92	3.44	3.54	2.98
NO <sub>3</sub> ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	5	3.9	2.8	2.7	33.8	11.6	26.6	37.3
NO <sub>2</sub> ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	0.07	0.04	0.08	0.1	0.7	0.5	1.1	1.1
PO <sub>4</sub> ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	0.24	0.08	0.2	0.1	0.2	1.5	1.4	1.3
Si ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	7	7.5	5.5	6.5	6.5	9	9.5	8
Cd ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	< d.l.	< d.l.	< d.l.	< d.l.	17.1	19.8	21.6	11.2

**Biofilm total DW and AFDM:**

Evolutions of biofilm dry weights during the 20 days colonization periods from the two stations in July 2004 and March 2005 are shown in Figure 2. After 14 and 20 days of colonization, significant differences were observed between the two stations in favour of Joanis: at the end of the experiment, the mean values were  $824 \pm 80$  against  $405 \pm 128 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  in July and  $446 \pm 29$  against  $287 \pm 28 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  in March. No significant differences were observed after 4 and 7 days. The increase in DW was progressive, with tendencies close to linearity, except at Joanis in March where a decrease was observed between 14 and 21 days colonization.

AFDM percentages showed a weak variability during the different colonization periods. Significant differences were observed between Joanis and Firmi stations:  $60.4 \pm 8.7$  and  $36.2 \pm 3.9 \%$  in March, respectively;  $47.8 \pm 4.2$  and  $32.6 \pm 2.3 \%$  in July, respectively.

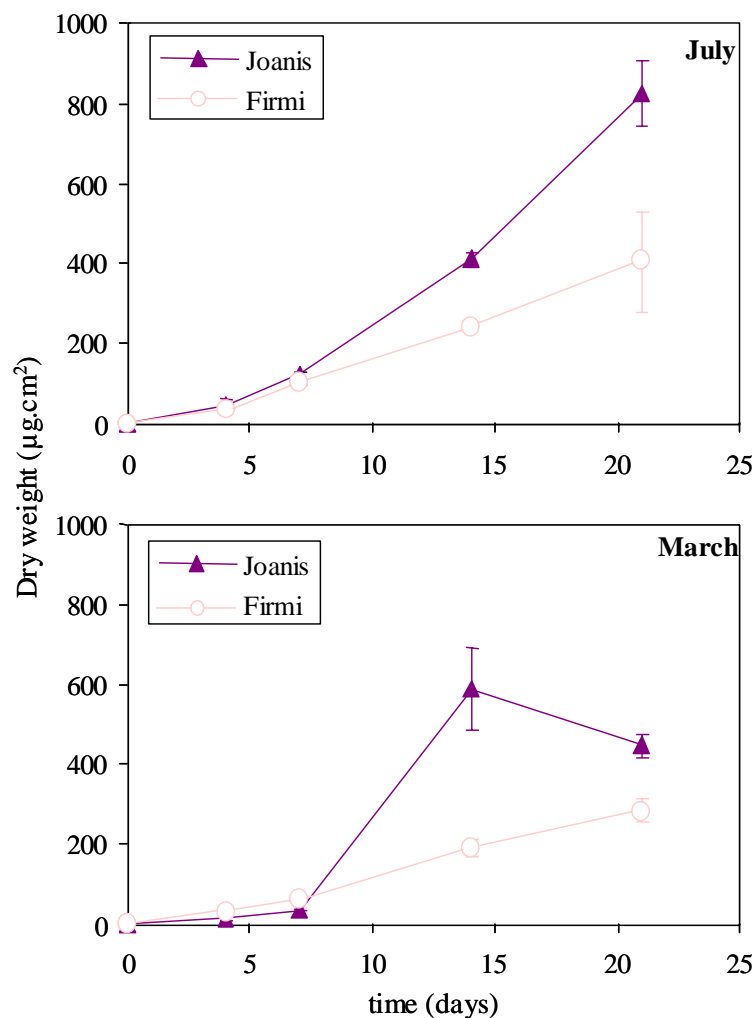


Figure 2: Dry weights (DW) of biofilms collected from Firmi and Joanis stations in July 2004 and March 2005 after 4, 7, 14 and 20 days of colonization. Mean  $\pm$  standard deviation (n = 3).

**Cd accumulation in biofilms:**

Kinetics of Cd accumulation in biofilm samples is shown in Figure 3. At the reference station (Firmi), Cd levels were very low, close to background levels: after 20 days of colonization, mean values were  $0.75 \pm 0.52 \text{ ng.cm}^{-2}$  in July and  $1.8 \pm 0.4 \text{ ng.cm}^{-2}$  in March. These accumulation levels, expressed on the basis of biofilm dry weight, were 1.8 and 6.3  $\text{ng.mg}^{-1}$ , respectively. At the opposite, very high values were observed at Joanis at the end of the experiment:  $1100 \pm 237 \text{ ng.cm}^{-2}$  ( $1334 \text{ ng.mg}^{-1}$ ) in July and  $254 \pm 88 \text{ ng.cm}^{-2}$  ( $627 \text{ ng.mg}^{-1}$ ) in March. The trends were different between the two seasons at the polluted station: in July, Cd accumulation levels increased progressively during the experiment; in March, the mean values measured after 14 and 20 days were not significantly different.

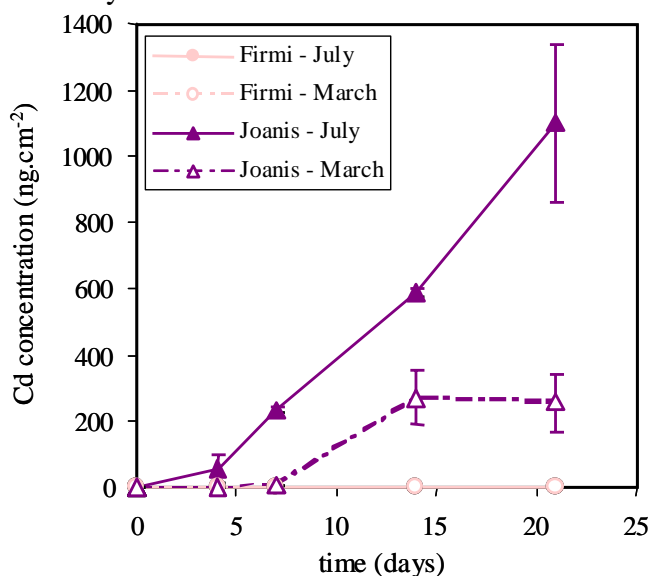


Figure 3: Cd accumulated in biofilms at Firmi and Joanis stations in summer 2004 and winter 2005 after 4, 7, 14 and 20 days of colonization. Mean  $\pm$  standard deviation (n = 3).

**Diatom community characteristics:**

Over 200 diatom taxa were identified from the different biofilm samples collected. Species richness (S: total number of species per sample) and diversity index (H') were quite similar between the two stations and significantly higher in March (Table 2).

Table 2: Species richness and diversity index

	March		July	
	Firmi	Joanis	Firmi	Joanis
Species richness (S)	$54 \pm 4$	$55 \pm 3$	$41 \pm 0.5$	$46 \pm 4$
Diversity index (H')	$4.2 \pm 0.1$	$4.1 \pm 0.2$	$3 \pm 0.02$	$3.2 \pm 0.1$

Taxonomic composition and relative abundances of diatom species were markedly different between the two stations and the two seasons (Figure 4). In July, the relative abundances of the seven most abundant species were quite similar during the 20 days colonization: *Cyclotella meneghiniana* (CMEN) was the dominant species, with more than 50 % of the total diatom community at Firmi station. In addition, *Navicula gregaria* (NGRE) and *Melosira varians* (MVAR) represented 8.4 and 9.2% respectively. At Joanis, *Eolimna minima* (EOMI) was dominant, with mean relative abundances close to 50 %. For *Cyclotella meneghiniana*, *Nitzschia palea* (NPAL), *Ulnaria ulna* (UULN) and *Gomphonema parvulum* (GPAR), the mean values were 12.1%, 5.4%, 4.6% and 2.7%, respectively.

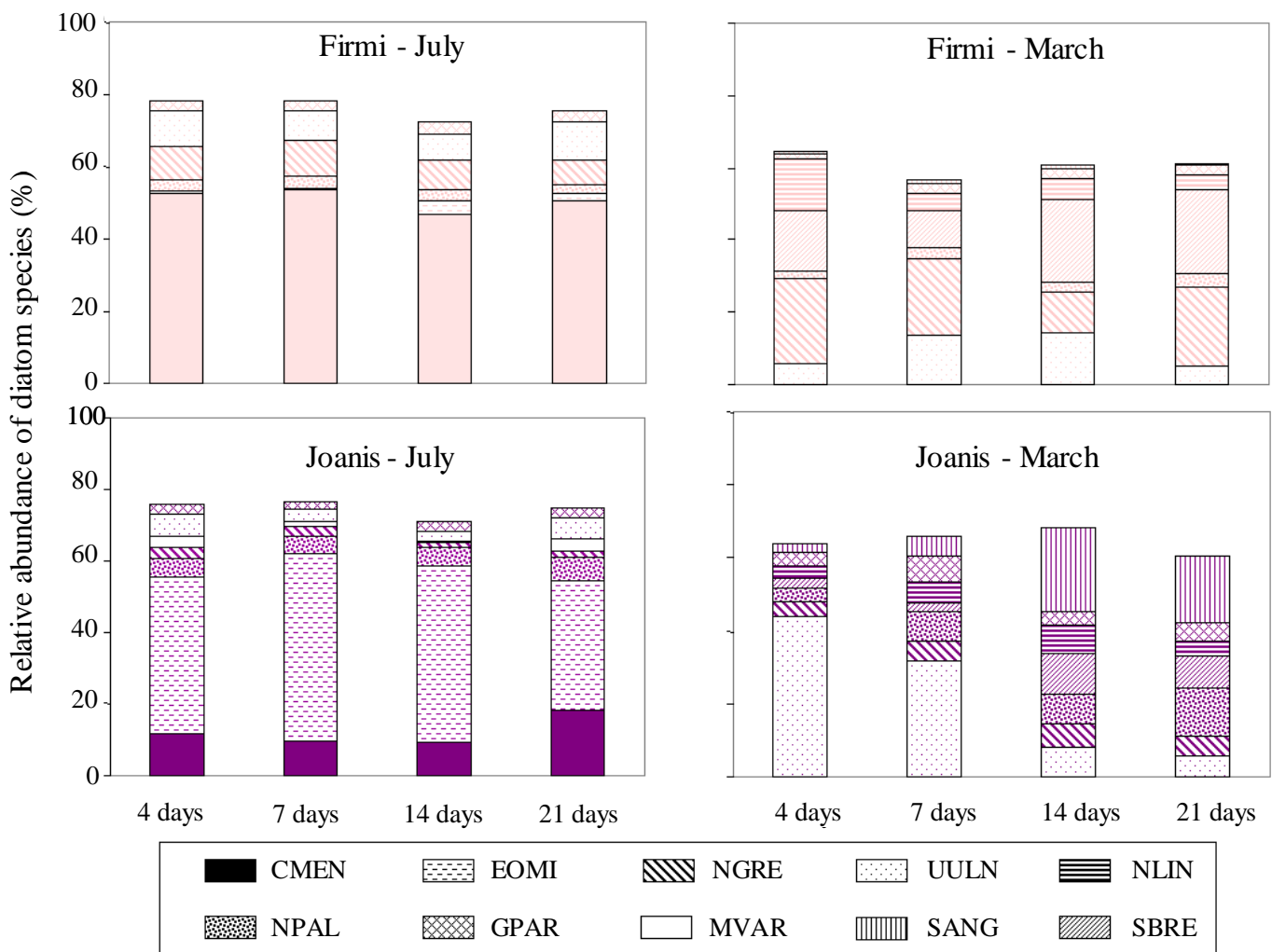


Figure 4: Relative abundances of diatom species (mean values, n = 3) with relative abundances  $\geq 10\%$  in summer and  $> 5\%$  in winter after 4, 7, 14 and 20 days of colonization at Firmi and Joanis stations. (CMEN: *Cyclotella meneghiniana*; EOMI: *Eolimna minima*; NGRE: *Navicula gregaria*; UULN: *Ulnaria ulna*; NLIN: *Nitzschia linearis*; NPAL: *Nitzschia palea*; GPAR: *Gomphonema parvulum*; MVAR: *Melosira varians*; SANG: *Surirella angusta*; SBRE: *Surirella brebissonii*)



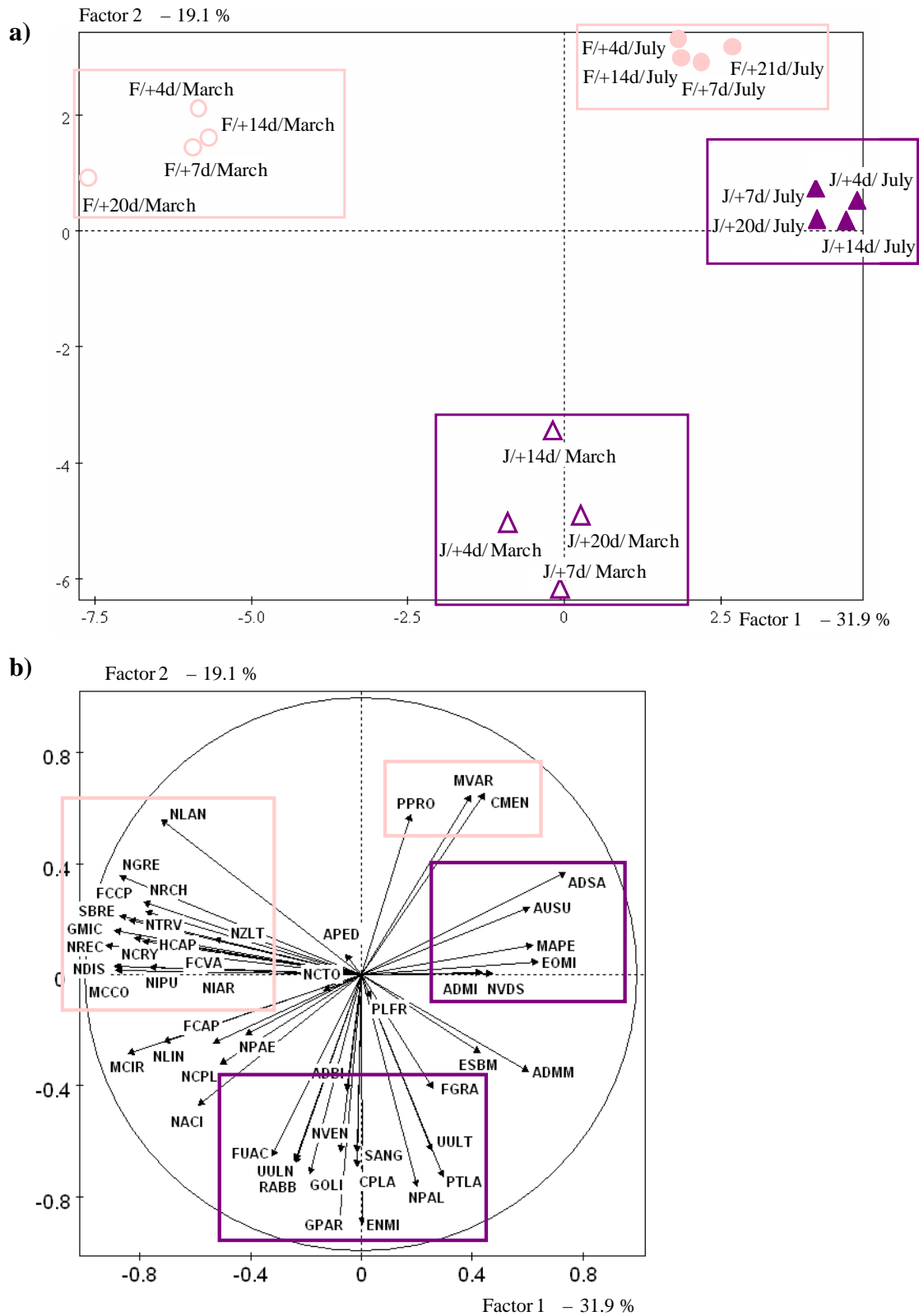


Figure 5: Principal Components Analysis (PCA) based on relative abundances of 50 diatom species collected from two stations along metallic pollution in summer 2004 and winter 2005 after 4, 7, 14 and 20 days colonization. (a): Projection of the communities on the first two principal components axes. Sampling time is pointed out in brackets (4 days, 7 days, 14 days, 20 days in summer and winter, three replicates). (b): Projection of the diatom species on the circle. The species which accumulate the most are plotted in the graph.

In March, relative abundances of the main diatom species at Firmi station were comparable after 4, 7, 14 and 20 days of colonization. The dominant planktonic species CMEN in July was replaced by two species: *Surirella brebissonii* (SBRE, 18% on average) and *Ulnaria ulna* (UULN, 10%), with a marked increase of *Navicula gregaria* (NGRE, 19%). At Joanis station, a marked decrease of UULN relative abundances was recorded (44% after 4 days and 6% after 21 days) with, in parallel, an increase in the relative abundances of *Surirella angusta* (SANG) from 2 to 19%, respectively. The two species NPAL and GPAR were still represented in March: 8 and 5% respectively. A global approach via a Principal Components Analysis (PCA) was based on the relative abundances of all the diatom species from the two stations and the four sampling points for the two seasons (Figure 5 a and b). On the first plane defined by the two axis 1 and 2, which represents more than 50 % of the total variance, the four conditions are clearly individualized: the two stations Firmi (F) and Joanis (J) in July are localized in the right superior quarter; Joanis station in March in the middle of the inferior part; Firmi in March in the left superior quarter. The correlation circle (Figure 5b) indicates the links between diatom species and the four studied conditions. Besides the seven species which were dominant, Joanis' diatom communities in July were characterized by small species such as *Navicula seminulum* (NVDS), *Mayamaea atomus* var. *permitis* (MAPE), *Achnantheidium saprophila* (ADSA) and *Achnantheidium minutissimum* (ADMI). In March, numerous species were associated to this polluted site: the dominant ones (SANG, NPAL, UULN) and *Encyonema minutum* (ENMI), *Cocconeis placentula* (CPLA), *Gomphonema olivaceum* (GOLI) or *Navicula veneta* (NVEN). For the reference site (Firmi), only three species were associated with the summer period: CMEN (dominant species), MVAR and *Parlibellus protracta* (PPRO). At the opposite, more than fifteen species were representative of the March period, with the two dominant taxa (SBRE and NGRE).

The relationships between relative abundances of diatom species and Cd accumulation levels in biofilms were investigated via Pearson correlations, one for each season: twenty diatom species were selected, with relative abundances higher than 10 % in July and 5 % in March (Table 3). These tables showed that *Eolimna minima* (EOMI), *Nitzschia palea* (NPAL), *Surirella angusta* (SANG), *Encyonema minutum* (ENMI), GPAR were positively correlated to Cd content in biofilm. In other hand, *Cyclotella meneghiniana* (CMEN), *Navicula lanceolata* (NLAN), *Navicula gregaria* (NGRE) *Surirella brebissonii* (SBRE) species was negatively related to Cd accumulated by biofilm.

Teratological frustules of diatom species which consisted in twisted valves or irregularity in striaes arrangement were rather frequently observed at Joanis station in both seasons (Figure 6).

The percentage of deformations in the total assemblage at Joanis was higher in July than March and ranged around 27.3‰ and 23‰ (average abundance) respectively. Of which, Araphid diatom species such as *Ulnaria ulna* (UULN) occupied large proportion with 14.5‰ in July and 16.7 ‰ in March. In addition, other abnormal frustules belong to Raphids were also abundant in biofilm samples at Joanis station both two seasons. Of which, *Gomphonema parvulum* (GPAR) presented a percentage of 2.3 ‰ in July and 1.6 ‰ in March; *Eolimna minima* (EOMI) had 2.6 ‰ and 0.5 ‰, and *Nitzschia palea* (NPAL) 1 and 0.3 ‰. Besides the abnormal forms of these species, Araphid, Monoraphid and Centric abnormal diatoms appeared during two experimental periods with lowest proportions, such as *Diatoma vulgare* (DVUL) *Achnantheidium minutissimum* (ADMI), *Achnantheidium saprophila* (ADSA), *Cyclotella meneghiniana* (CMEN).

## **Discussion**

The present study demonstrated that cadmium accumulation and dynamics of benthic diatom communities along a metallic pollution gradient in natural periphyton varied considerably between sites and seasons. Cd accumulation (per surface unit) by natural biofilms from Riou Mort River continuously increased with duration of exposure. Cd accumulated by periphyton has been attributed variously to absorption, diffusion, active uptake, photosynthesis, thickness of periphyton, taxonomic composition (Newman and McIntosh, 1989; Gray et al., 2001). Increasing Cd accumulation of Riou Mort biofilms in this experiment depended on periphyton biomass (Figure 2). As shown by several authors (Hill et al., 2000; Gray et al., 2001), variations in biomass have influenced metal sorption in biofilm. In general, periphyton biomass increased with duration of exposure; however, they could decrease due to flood events or grazing. This can explain the decrease in periphyton biomass on the last day of experiment at Joanis in winter.

Throughout the experiment in summer, relative abundances of dominant diatom species at Joanis and Firmi stations were quite stable (Figure 4). Planktonic species such as *Cyclotella meneghiniana* (CMEN), *Melosira varians* (MVAR) and the raphid species *Navicula gregaria* (NGRE) were found in large proportions in Firmi station. These species have been reported as metal-sensitive species (Genter et al., 1987; Medley and Clements, 1998; Morin et al., 2006). This is confirmed by negative correlation of these diatom species with Cd in periphyton for both seasons (Table 2 and 3). On the other hand, high Cd accumulated in the biofilm at Joanis station in summer determined the dominance of metal-tolerant taxa but did not underline the effects of

other variables (physical and chemical environmental factors) which were implicated by Barranguet et al. (2002). Joanis diatom communities tended towards small species, adapted to high levels of Cd accumulated in periphyton (Figure 4 and 5b), with high amounts of *Eolimna minima* (EOMI) (around 50% of the total community) and other small forms of diatom species *Mayamaea atomus* (MAPE), *Achnantheidium saprophila* (ADSA), *Aulacoseira subarctica* (AUSU). Considerable increases of small diatom species under high Cd concentration in laboratorial experiment were also observed by Peres (1996). In the summer period, positive correlations between an increase of relative abundances of small forms like EOMI, ADSA, ENMI accompanied by NPAL, GPAR and the increase of Cd accumulated by biofilms were recorded (Table 2 and 3). Due to the occurrence of these species in high proportions and their strong relation with Cd, we conclude that they are indicators for high Cd level. According to Khoshmanesh et al. (1997), smaller cells have relatively more numerous sites for metals binding than those of larger cells. So, the abundance of small diatom species at this site could induce increased accumulation of metals from surrounding water by biofilm in summer (Figure 3). By using X-ray analysis to observe metals contained in algae collected from heavy metal-polluted sites, Lai et al. (2003) and Nakanishi et al. (2004) showed that heavy metal elements could be found in diatom species such as *Nitzschia palea* and *Achnantheidium minutissimum*. Diatoms are supposed to take heavy metals through complex formation with polysaccharides and amino-acids constitutive of diatom valves (Nakanishi et al., 2004). Although dynamics of the predominant EOMI and other dominant species were stable in summer, diatom species' capacity of polysaccharides production during the experimental period, which have been reported to act as a trap for nutrients or metals (Sekar et al., 2002), could explain the continuous sorption of Cd by our periphyton.

The composition of benthic diatom communities in winter differed from those in summer (Figure 3 and 5b). The difference in diatom communities could depend on changes in the environments (Table 1), in which the role of metals accumulated in biofilms was focused. Firmi's communities were characterised by high abundances of *Navicula gregaria* (NGRE), *Surirella brebissonii* (SBRE) and *Ulnaria ulna* (UULN) (representing around 50 % of the total diatom community). Dynamics of these species throughout the experiment were quite stable, whereas the shifts in diatom community structure at Joanis were noticeable with a decrease in *Ulnaria ulna* (UULN) species and an increase in *Surirella angusta* (SANG) and *Nitzschia palea* (NPAL) species (Figure 4). The gradual increase of SANG and NPAL species was accompanied by a considerable increase of cadmium in biofilm, from its initial to mature stage; these relative correlations with Cd could therefore reflect these species to be indicators of high levels of metal.

Indeed, relative abundances of SANG occupying around 50% of total diatom community were found in Kakehashi River (Nakanishi et al., 2004), with high concentrations of cadmium recorded in the biofilms. Complex relationships of UULN and several metals with seasons were recorded when examining the effects of heavy metals on attached diatom in the Uintah basin of Utah (Rushforth et al., 1981). Positive correlations of UULN with cadmium, copper and mercury in spring were, in the contrary, negatively related to copper in winter. In the present study, this phenomenon was found, when comparing relationships between UULN and cadmium in summer and winter (Table 2 and 3). We could underline that such relations between diatoms and heavy metals may be affected by seasonal variations, expressing the fact that environmental factors do not operate separately but in interaction, negatively or positively (Rushforth et al., 1981). Unlike diatom composition in summer, under lower cadmium in biofilm in winter Joanis' communities showed appearance of several larger diatom species such as *Nitzschia linearis* (NLIN), *Fragilaria ulna var acus* (FUAC), *Gomphonema olivaceum* (GOLI) (Figure 4); however, small forms were still well presented.

Morphological aberrations of diatom species under changes in environmental conditions have been reported by several authors (Yang and Duthie, 1993; Ruggiu et al., 1998; Gold et al., 2003; Cattaneo et al., 2004; Cremer and Wagner, 2004; Morin et al., 2006). Gold et al. (2003) and Cattaneo et al. (2004) suggested that increasing metal concentrations (in water or sediment) could trigger formation deformed valves within some diatom genera. In this study, the appearance of abnormal forms was frequently observed at the polluted station (Joanis). Deformed valves within *Fragilaria* genus (synonym *Ulnaria* or *Synedra*) were higher than within smaller forms (EOMI, SANG) though they were dominant during the experimental period, which could assume their resistance to high metal concentrations.

In conclusion, our study show that cadmium accumulation and benthic diatom communities under metal stress varied between sites and seasons. Distribution patterns of benthic diatoms were not only controlled by environmental conditions (nutrients, temperature...) but also depended on metals accumulated in biofilms. Positive or negative correlations of dominant diatom taxa with cadmium accumulated in biofilm indicated groups of species which are tolerant or sensitive to metals, which will be meaningful for biomonitoring in natural aquatic systems. Such interpretations could be confirmed and further indoor studies concerning metal bioaccumulation in biofilms and its relation to diatom species must be performed to valid these results.

## Acknowledgements

This study is part of the PhD thesis of T. T. Duong. This work was financially supported by CNRS (Centre National de la Recherche Scientifique). The authors would like to thank Henri Bouillard, Cécile Bossy, Véronique Duflo from the GEMA team for their technical assistance and Muriel Bonnet and Maryse Boudigues from the Cemagref laboratory for carrying out nutrients analyses. We thank H. Koziol from the department of foreign languages (University of Bordeaux 2) for improvements of the narrative style of the manuscript.

## References

- Audry, S. 2003. Bilan géochimique du transport des éléments traces métalliques dans le système fluvial anthropisé Lot-Garonne-Gironde. University Bordeaux I Ecole Doctoral Sciences du vivant, Géosciences et Sciences de l'Environnement:375 pp.
- Audry, S., Schaefer, J., Blanc, G., Bossy, C., Lavaux, G. 2004. Anthropogenic components of heavy metal (Cd, Zn, Cu, Pb) budgets in the Lot-Garonne fluvial system (France). *Applied Geochemistry* 19: 769 - 786.
- Barranguet, C., Charantoni, E., Plans, M., Admiraal, W. 2000. Short-term response of monospecific and natural algal biofilms to copper exposure. *Eur. J. Phycol* 35:397-406.
- Barranguet, C., Plans, M., van der Grinten, E., Sinke, J. J., Admiraal, W. 2002. Development of photosynthetic biofilms affected by dissolved and sorbed copper in a eutrophic river. *Environ Toxicol Chem* 2: 1955 - 1965.
- Baudrimont, M., Metivaud, J., Maury-Brachet, R., Ribeyre, F., Boudou, A. 1997a. Bioaccumulation and metallothionein response in the Asiatic clam (*Corbicula fluminea*) after experimental exposure to cadmium and inorganic mercury. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16: 2096 - 2105.
- Behra, R., Rolf Landwehrjohann, Katrin Vogel, Wagner B, Sigg L. 2002. Copper and zinc content of periphyton from two rivers as a function of dissolved metal concentration. *Aquat. Sci* 64: 300 - 306.
- Besch, W. K., Ricard, M., Cantin, R. 1972. Benthic diatom as indicators of mining pollution in the northwest Miramichi river system, New Brunswick, Canada. *International Review of Hydrobiology* 57: 39 - 74.

- Burkholder, J. M. 1996. Interactions of benthic algae with their substrata. In: Stevenson, R. J., Bothwell, M. L., Lowe, R. L., (Eds.), Algal ecology of freshwater benthic ecosystem, Aquatic Ecology Series. Academic Press, Boston, pp: 253 -298.
- Cemagref, 1982. Etude des méthodes biologiques d'appréciation quantitative de la qualité des eaux.: Rapport Q.E.Lyon-A.F.Bassin Rhône-Méditerranée-Corse : 218 pp.
- Clements, W. H. 1991. Community responses of stream organisms to heavy metals: A review of observations and experimental approaches. In: Newman, M., McIntosh, A., (Eds.), Metal Ecotoxicology Concepts and Applications. Lewis Publishers, pp: 363 - 391.
- Costa, A., Leite, S. G. F. 1991. Comparative study of cadmium and zinc biosorption by free *Chlorella homosphaera* and *Scenedesmus quadricauda* cells. In: Proceeding IX the International Symposium on Biohydrometallurgy. Dararte, C. J., Lawrence, R.W (Eds) Forbitech, Portugal.
- Foster, P. L. 1982. Species associations and metal contents of algae from river polluted by heavy metals. *Freshwater Biology* 12: 17 - 39.
- Fraile A, Penche S, Gonzále F, Blázquez ML, Muñoz JA, Ballester A. 2005. Biosorption of copper, zinc, cadmium and nickel by *Chlorella vulgaris*. *Chemistry and Ecology* 21:61 - 75.
- Genter, R. B., Cherry, D. S., Smith, E. P., Cairns, J. J., 1987. Algal-periphyton population and community changes from zinc stress in stream mesocosms. *Hydrobiologia*153: 261 - 275.
- Gold, C., Feurtet-Mazel, A., Coste, M., Boudou, A. 2002. Field transfer of periphytic diatom communities to assess short-term structural effects of metals (Cd, Zn) in rivers. *Water Research* 36: 3654 - 3664.
- Gold, C., Feurtet-Mazel, A., Coste, M., Boudou, A. 2003a. Impacts of metals (Cd, Zn) on the development of periphytic diatom communities within outdoor artificial streams along a pollution gradient. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 44:189 - 197.
- Gold, C., Feurtet-Mazel, A., Coste, M., Boudou, A. 2003b. Effects of cadmium stress on periphytic diatom communities in indoor artificial streams. *Freshwater Biology* 48:316 - 328.
- Gray, B. R., Hill, W. R., Stewart, A. J. 2001. Effects of development time, biomass and ferromanganese oxides on nickel sorption by stream periphyton. *Environmental Pollution* 112: 61 - 71.
- Guasch, H., Admiraal, W., Sabater, S. 2003. Contrasting effects of organic and inorganic toxicants on freshwater periphyton. *Aquatic Toxicology* 64:165 -175.
- Gustavson, K., Wangberg, S. A. 1995. Tolerance induction and succession in microalgae communities exposed to copper and atrazine. *Aquatic Toxicology* 32: 283 - 302.

- Holding, K.L., Gill, R. A., Cater, J. 2003. The relationships between epilithic periphyton (biofilm) bound metals and metals bound to sediments in freshwater systems. *Environmental Geochemistry and Health* 25: 87 - 93.
- Ivorra, N., Hettelaar, J., Tubbing, G. M. J., Kraak, M. H. S., Sabater, S., Admiraal, W. 1999. Translocation of microbenthic algal assemblages used for in situ analysis of metal pollution in rivers. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* . 37:19 - 28.
- Kelly, M. G. 1998. Use of the trophic diatom index to monitor eutrophication in rivers. *Water Research* 32: 236 - 242.
- Khoshmanesh, A., Lawson, F., Prince, I.G. 1997. Cell surface area as a major parameter in the uptake of cadmium by unicellular green microalgae. *Chemical Engineering Journal* 65:13 - 19.
- Lai, S. D., Chen, P. C., Hsu, H. K. 2003. Benthic algae as monitor of heavy metals in various polluted rivers by energy dispersive X-ray spectrometer. *Journal of Environmental Science and Health* 38: 855 - 866.
- Lee, J. G., Ahner, B. A., Morel, F. M. M. 1996. Export of cadmium and phytochelatin by the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*. *Environmental Science and Technology* 30:1814 - 1821.
- Medley, N. C., Clements, W. H. 1998. Responses of diatom communities to heavy metals in Rocky Mountain streams: the influence of longitudinal variation. *Ecological Applications* 8: 631 - 644.
- Morin, S., Vivas-Nogues, M., Duong, T. T., Boudou, A., Coste, M., Delmas, F. 2006. Dynamics of benthic diatom colonization in a cadmium/zinc-polluted river (Riou-Mort, France). *Arch. Hydrobiol.* (in press).
- Nakanishi, Y., Sumita, M., Yumita, K., Yamada, T., Honjo, T., 2004. Heavy-metal pollution and its state in algae in Kakehashi River and Godani River at the foot of Ogoya mine, Ishikawa. *Anal. Sci.* 20. 73-78.
- Newman, M C., McIntosh, A. W. 1989. Appropriateness of Aufwuchs as a monitor of bioaccumulation. *Environmental Pollution* 60: 83 - 100.
- Peres F. 1996. Etude des effets de quatre contaminants: - herbicide (Isoproturon), dérivés du mercure (mercure inorganique, méthylmercure), cadmium - sur les communautés au sein de microcosmes d'eau douce. Thèse de Doctorat d'Ecotoxicologie aquatique: Univ. Paul Sabatier, Toulouse. 176 pp.
- Prygiel, J., Coste, M. 1999. Progress in the use of diatoms for monitoring rivers in France. In: Use of algae for monitoring rivers III. Prygiel, J., Whitton, B.A., Bukowska, J (Eds), Agence de l'Eau Artois Picardie: 165 -179.



- Ramelow, G. J., Biven, S. L., Zhang, Y., Beck, J.N., Young, J.C., Callahan, J.D., Marcon, M.F. 1992. The identification of point sources of heavy metals in an industrially impacted waterway by periphyton and surface sediment monitoring. *Water Air and Soil Pollution* 65: 175 - 190.
- Ruangsomboona, S., Wongrat, L. 2006. Bioaccumulation of cadmium in an experimental aquatic food chain involving phytoplankton (*Chlorella vulgaris*), zooplankton (*Moina macrocopa*), and the predatory catfish *Clarias macrocephalus* x *C. gariepinus*. *Aquatic Toxicology*: 15 – 20.
- Ruggiu, D., Luglie, A., Cattaneo, A. & Panzani, P. 1998. Paleoecological evidence for diatom response to metal pollution in Lake Orta (N. Italy). *J. Paleolimnol.* 20:333-45.
- Rushforth, S. H., Brotherson, J. D., Fungladda, N., Evenson, W. E. 1981. The effects of dissolved metals on attached diatom in the Uintah basin of Utah. *Hydrobiologia* 83: 313 - 323.
- Sekar R, Nair, K. V. K, Rao, V. N. R, Venugopalan, V. P. 2002. Nutrient dynamics and successional changes in a lentic freshwater biofilm. *Freshwater Biology* 47: 1893 - 1907.
- Shannon, C.E., Weaver, W. 1949. The mathematical theory of communication. University of Illinois Press, Urbana III.
- Soldo, D., Behra, R. 2000. Long-term effects of copper on the structure of freshwater periphyton communities and their tolerance to copper, zinc, nickel and silver. *Aquatic Toxicology* 47:181–189.
- Stevenson, R. J. 1996. Patterns of benthic algae in aquatic ecosystems. In: Stevenson, R. J., Bothwell, M. L., Lowe, R. L., (Eds.), *Algal ecology of freshwater benthic ecosystem*, Aquatic Ecology Series. Academic Press, Boston. 3 - 30.
- Torres, E., Cid, A., Herrero, C., Abalde, J. 1998. Remove of cadmium ions by the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin accumulation and long-term kinetics of uptake. *Bioresource Technology* 63: 213 - 220.
- Wang W-X, Dei R. C. H. 2001. Metal uptake in a coastal diatom influenced by major nutrients (N, P, and Si). *Water Research* 35(1):315-321
- Watanabe, T., Asai, K., Houki, A. 1986. Numerical estimation to organic pollution of flowing water by using epilithic Diatom assemblage Index (DAIpo). *The Science of the Total Environment* 55: 209 - 218.
- Whitton, B., A, Say. P. J. 1975. Heavy metals. In: B. A Whitton (Eds.), *River Ecology*. Blackwell Sci. Publ, pp: 286 - 311.
- Yang, J. R, Duthie, H. C. Morphology and ultrastructure of teratological forms of the diatoms *Stephanodiscus niagarae* and *S. parvus* (Bacillariophyceae) from Hamilton Harbour (Lake Ontario, Canada). *Hydrobiologia* 269 - 270: 57 - 66.



## **CHAPITRE 5**

Cinétique de colonisation et de bio-accumulation  
du cadmium en conditions expérimentales

*Préambule.*

Notre démarche d'évaluation des effets de la pollution métallique sur les communautés de diatomées périphytiques *in situ* a été complétée par une approche expérimentale visant à réduire la complexité du milieu naturel. Dans ce chapitre, nous exposons les résultats d'expérimentations de laboratoire visant à caractériser d'une part les effets du cadmium (en concentrations croissantes) sur les biofilms et les communautés diatomiques, d'autre part le rôle protecteur de la matrice organique sur les communautés vis-à-vis de concentrations sublétales.

Dans un premier temps, nous motivons la démarche scientifique suivie : le choix des conditions d'exposition au métal découle des observations réalisées sur le terrain, en nous efforçant de restituer le mieux possible l'environnement physico-chimique d'après les analyses réalisées au cours des deux ans de suivi sur le terrain. Le suivi de ces paramètres est également présenté. Les biofilms inoculés dans les systèmes expérimentaux proviennent du milieu naturel : ils ont été échantillonnés au site Decazeville (sur le Riou-Mort) et caractérisés en termes de composition spécifique avant introduction dans les microcosmes. Les analyses réalisées sur les biofilms s'installant sur les substrats vierges des canaux expérimentaux permettent de décrire les évolutions de biomasse périphytique (poids secs, matière sèche sans cendre, densités de diatomées), d'accumulation métallique dans la matrice et de composition spécifique des assemblages de diatomées.

Ensuite, nous exposons les résultats obtenus au travers de six semaines d'expérimentation. La première étude s'attache à l'analyse des impacts du cadmium en concentrations croissantes (0, 10, 100µg/L). Elle met en évidence une accumulation croissante de métal (total et non-échangeable) dans le biofilm exposé dès sa phase initiale de développement, en relation avec le niveau de contamination imposé et la durée d'exposition au toxique. L'exposition aux concentrations maximales réduit de moitié la croissance du biofilm en termes de poids sec, de matière sèche sans cendre et de densité de diatomées. La composition spécifique des communautés de diatomées traduit également la pression de contamination métallique. Les

espèces recensées dans les canaux témoins et faiblement pollués sont relativement similaires, en revanche on observe la mise en place d'une dominance de *Nitzschia palea* dans les canaux soumis à une contamination de 100µg/L. Ce constat semble confirmer les observations de terrain de Say (1978), qui identifiait une réduction marquée dans la diversité des diatomées (deux espèces recensées) dans des conditions d'exposition à des niveaux de contamination élevés (440µgCd/L).

La seconde étude vise à caractériser la bioaccumulation du cadmium par le biofilm et sa toxicité sur les communautés diatomiques, en relation avec les caractéristiques de maturité de la matrice organique. La contamination des canaux après deux semaines d'installation du biofilm en conditions de référence freine sa croissance, estimée au travers des poids secs, des matières sèches sans cendres et des densités de diatomées, moins cependant que pour l'exposition précoce. Les biofilms plus matures accumulent des quantités de cadmium légèrement inférieures à celles mesurées dans la matrice organique dès le début de son installation. La structure des communautés soumises à une contamination "tardive" diffère largement de la dominance par *N. palea* des assemblages contaminés initialement et s'éloigne pour partie de la composition spécifique des biofilms témoins. Cependant, on note le maintien d'espèces comme *Nitzschia dissipata*, décrite comme sensible aux métaux par Gold *et al.* (2003a, 2003b) et Feurtet-Mazel *et al.* (2003) dans les communautés périphytiques contaminées après leur installation, suggérant ici une protection de ces individus par la présence de la matrice organique.

Quelle que soit la date d'exposition des biofilms aux métaux, la contamination des eaux par 100µg/L de cadmium semble provoquer l'apparition de déformations du frustule en abondances relatives anormalement élevées (de l'ordre de 20 à 30%).

## **A – DEMARCHE EXPERIMENTALE.**

Nos expérimentations de laboratoire ont été mises en place de manière à reproduire le plus fidèlement possible les conditions moyennes observées sur le terrain, tout en tenant compte des contraintes intrinsèques aux manipulations en microcosmes.

### **1- Collecte du périphyton sur le terrain**

Quatre cages, contenant chacune six lames de verre (300 cm<sup>2</sup> par face), ont été immergées à la station Decazeville (Riou-Mort amont) en mars 2006. Après un mois de colonisation (de manière à obtenir une biomasse suffisamment importante), les lames de verre ont été raclées ; le biofilm ainsi récupéré a été mis en suspension dans un volume de 2L d'eau minérale et soigneusement homogénéisé. Le périphyton a été transporté au laboratoire dans des glacières, pour assurer la survie des algues. Trois aliquotes de 5mL ont été prélevées pour effectuer un examen qualitatif des communautés diatomiques initiales ; les échantillons étaient dominés, par ordre d'abondances relatives décroissantes, par deux espèces communément rencontrées dans des eaux fraîches : *Navicula lanceolata* (36 ± 4%), *N. gregaria* (11 ± 1%), puis par *Planothidium lanceolatum* (9 ± 3%).

Chaque unité expérimentale (cf. description au Chapitre 2) est constituée d'un réservoir de milieu circulant qui alimente trois canaux dans lesquels sont insérées des lames de verre vierges. Ces substrats artificiels servent de support à la colonisation des diatomées provenant de la suspension de périphyton, introduite équitablement dans le réservoir de chaque unité expérimentale.

### **2- Des conditions expérimentales recréées d'après celles observées sur le terrain.**

#### ***2.1 – Détermination des facteurs abiotiques.***

Les conditions expérimentales obéissent aux contraintes suivantes :

**Les températures (autour de 18°C)** ont été maintenues par l'installation des unités expérimentales en chambre climatisée. Elles correspondent aux températures moyennes pluriannuelles d'avril dans la région.

**La photopériode (cycle d'éclaircissement 10h / obscurité 14h)**, régulée grâce à des horloges programmables, reproduit des conditions de régime lumineux caractéristiques de la saison.

**Un courant de 0,4cm/s** a été imposé d'après les débits moyens mesurés en hiver 2005.

**Le milieu de culture Woods Hole modifié** (sans EDTA et supplémenté en silice), dilué quatre fois (Tableau 6), reproduit l'abondance nutritive qui caractérise le Riou-Mort aval. Les concentrations en nutriments sont cependant limitées, de manière à éviter les proliférations microbiennes.

Tableau 6 : Composition chimique du milieu de culture utilisé.

Nutriments	Concentration (mg/L)
CaCl <sub>2</sub> , 2 H <sub>2</sub> O	9
MgSO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O	9,25
NaHCO <sub>3</sub>	3,15
NaNO <sub>3</sub>	21,25
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,17
FeCl <sub>3</sub> , 6 H <sub>2</sub> O	1,05
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,25
MnCl <sub>2</sub> , 4 H <sub>2</sub> O	45.10 <sup>-3</sup>
ZnSO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O	5,5.10 <sup>-3</sup>
CuSO <sub>4</sub> , 5 H <sub>2</sub> O	2,5.10 <sup>-3</sup>
CoCl <sub>2</sub> , 6 H <sub>2</sub> O	2,5.10 <sup>-3</sup>
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> , 2 H <sub>2</sub> O	1,5.10 <sup>-3</sup>
Thiamine HCl	25.10 <sup>-3</sup>
Biotine	125.10 <sup>-6</sup>
Vitamine B12	125.10 <sup>-6</sup>
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> , 9 H <sub>2</sub> O	71

**Les niveaux de contamination par le cadmium** sont choisis proches des conditions d'exposition moyennes observées en hiver (10µg/L) et de niveaux de contamination exceptionnels (100µg/L). Les systèmes sont exposés au cadmium dès la phase de développement initial des communautés et sur biofilm mature (Figure 40) :

- un système "témoin" non contaminé (**S.E. 1**)
- un système faiblement contaminé (10µgCd/L) (**S.E. 2**)
- un système fortement contaminé (100µgCd/L) (**S.E. 3**)
- un système contaminé par 100µgCd/L après deux semaines de colonisation dans des conditions non contaminées (**S.E. 4**).

Les échantillons de périphyton ont été prélevés après 1, 2, 4 et 6 semaines de colonisation, dans chacun des trois canaux de chaque système expérimental.

L'étude des réponses des communautés des S.E. 1, 2 et 3 permet de caractériser les effets différentiels du niveau de contamination métallique sur la mise en place du biofilm et sur les communautés diatomiques. L'étude comparative des S.E. 1, 3 et 4, elle, permet de quantifier les effets d'une forte contamination (100µg/L) sur des communautés précoces et matures (établies depuis plus de deux semaines).

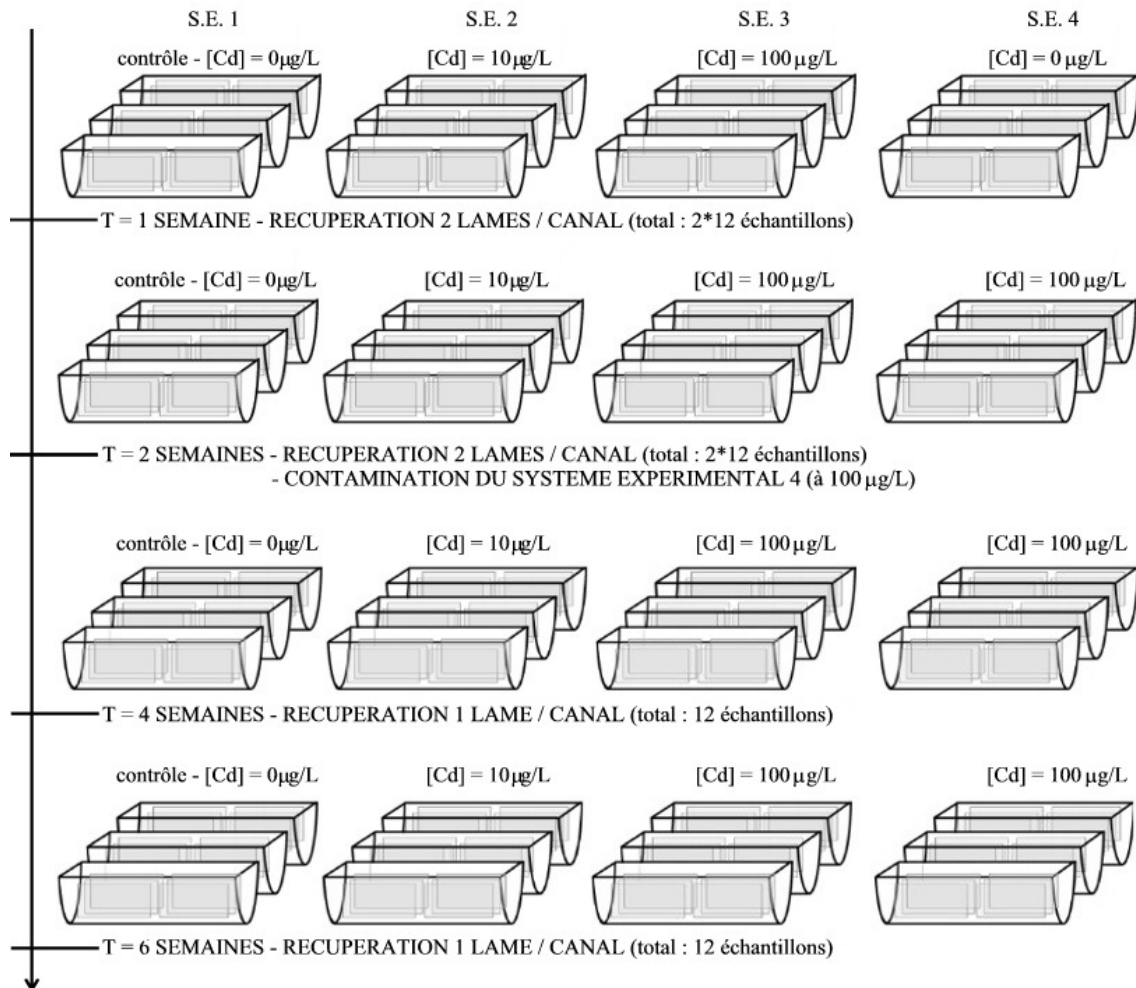


Figure 40 : Plan expérimental.

## 2.2 – Suivi des caractéristiques physico-chimiques.

Les paramètres température, pH, concentration en oxygène dissous, saturation en oxygène et conductivité électrique sont mesurés quotidiennement dans la colonne d'eau à la fin du cycle d'éclaircissement, à l'aide d'une sonde multiparamètres (WTW, Weilheim, Allemagne).

Le pH moyen mesuré dans les unités est légèrement basique, il varie très peu pendant la durée des expériences :  $7,6 \pm 0,3$ . Les températures mesurées ( $18,2 \pm 0,8^\circ\text{C}$ ) montrent la formation



d'un léger gradient thermique : on enregistre en moyenne 1°C de plus dans les unités 1 et 4. En effet, l'installation des microcosmes dans la chambre climatisée imposait de les disposer sur deux niveaux (Figure 41), l'"étage" supérieur (où étaient placés les S.E. 2 et 3) étant le plus proche du système de climatisation.

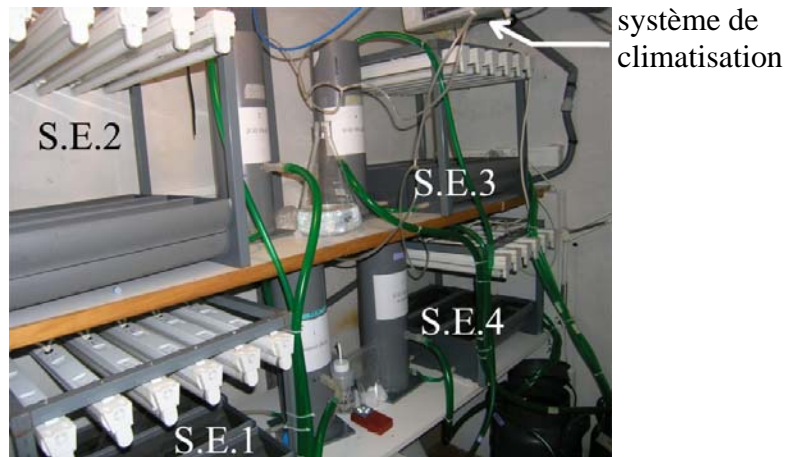


Figure 41 : Equipements mis en place pour les expérimentations en laboratoire - vue partielle de la chambre climatisée.

Les concentrations ( $8,7 \pm 0,4 \text{mgO}_2/\text{L}$ ) et la saturation ( $93 \pm 4\%$ ) en oxygène traduisent des conditions d'oxygénation homogènes entre les unités expérimentales et très favorables au développement des organismes. Les conductivités électriques ( $186,6 \pm 39,6 \mu\text{S}/\text{cm}$ ), en revanche, sont plus variables entre unités expérimentales et entre dates. En effet, on observe une augmentation régulière de la conductivité des systèmes dans le temps, de  $140 \mu\text{S}/\text{cm}$  à  $200\text{--}220 \mu\text{S}/\text{cm}$  (S.E.1, 3 et 4) contre  $320 \mu\text{S}/\text{cm}$  dans le S.E.2.

Chaque semaine, des échantillons d'eau (1L) sont prélevés pour analyse des concentrations en nutriments (orthophosphates, nitrates, silice) conformément aux normes NF T 90-023, NF EN ISO 13395, NF T 90-007.

Les résultats des dosages indiquent une diminution des concentrations en nutriments dans les microcosmes dès le début des expériences. Les nitrates et orthophosphates ont chuté régulièrement, respectivement de  $33,0 \pm 0,6 \text{mgNO}_3/\text{L}$  et  $2,9 \pm 0,0 \text{mgPO}_4/\text{L}$  au début de l'expérimentation, à  $24,9 \pm 4,4 \text{mgNO}_3/\text{L}$  et  $1,9 \pm 0,2 \text{mgPO}_4/\text{L}$  au bout de trois semaines. Des ajouts de milieu de culture ont été réalisés à cette date, afin de compenser cette décroissance liée à la consommation par les algues et à restaurer des conditions nutritives plus favorables. La disparition de la silice a également été très rapide ; cependant les apports de milieu n'ont pas suffi à rétablir les concentrations initiales dans les systèmes.

***B – BIOACCUMULATION ET TOXICITE DU CADMIUM A DIFFERENTS NIVEAUX D'EXPOSITION.***

---

**Cadmium toxicity and bioaccumulation in freshwater biofilms<sup>1</sup>**

Soizic Morin<sup>1</sup>, Thi Thuy Duong<sup>2</sup>, Olivier Herlory<sup>2</sup>, Agnès Feurtet-Mazel<sup>2</sup>, Michel Coste<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Cemagref, UR REQE, 50 av. de Verdun, F-33612 Cestas cedex, France

<sup>2</sup>LEESA, UMR EPOC, Place du Docteur Bertrand Peyneau, F-33120 Arcachon, France

*Correspondence to:* S. Morin: *e-mail:* soizic.morin@bordeaux.cemagref.fr, *telephone number:* +33(0)557890990, *fax number:* +33(0)557890801.

**Abstract:** A microcosm study was undertaken to examine the effects of dissolved cadmium at various concentrations (0, 10, 100µg·L<sup>-1</sup>) on biofilm accumulation and diatom assemblages. A natural biofilm sampled from the Riou-Mort River (South West France) was inoculated into 3 experimental systems, where biofilm settled on glass slides. Samples collected after 1, 2, 4 and 6 weeks of colonization were analyzed for metal accumulation (total metal content and intracellular metal content in the biofilm), biomass (as measured through dry weight and ash-free dry matter) and quantitative as well as qualitative analysis of diatom assemblages. There was a positive correlation between cadmium accumulation and dissolved cadmium concentrations and duration of exposure. Biofilm settlement was affected by high cadmium concentrations: we observed for all stages of settlement a drastic and significant (p<0.05) reduction in biofilm biomass and in diatom densities in the highest cadmium contamination, compared to control and low cadmium concentration units.

---

<sup>1</sup> Article soumis à *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* en novembre 2006.

## **Introduction**

Because of their specific ecological preferences (Lange-Bertalot 1979; Steinberg and Schiefele 1988; van Dam et al. 1994), benthic diatoms are commonly used to assess water quality and a great number of methods based on the use of diatoms have been proposed and are applied for the evaluation of eutrophication and organic pollution in rivers (a review of the major indices used in Europe is given in Prygiel et al. 1999). These methods are determined with consideration to nutrients and eutrophic conditions, however interactions between nutrients and toxicants often occur and are not evidenced through current indices. With the implementation of the European Water Framework Directive (2000/60/EC), there is a need to take into account priority substances such as heavy metals; studies are necessary for the improvement of diatom monitoring of these pollutions.

Aquatic primary producers from polluted sites are generally considered to be passive absorbers of the toxicants present in waters, in which happen all their vital functions such as nutrition, respiration, reproduction, excretion, etc. Although a number of studies have assessed the accumulation of cadmium and the biological effects in higher organisms of South West France rivers (Andres et al. 2000, Baudrimont et al. 2003, Baudrimont et al. 2005), cadmium toxicity is often observable from the beginning of the food chain. Previous *in situ* (Ivorra et al. 1999; Ivorra et al. 2000; Gomez and Licursi 2003; Morin et al. 2006) and experimental studies (Interlandi 2002; Ivorra et al. 2002; Gold et al. 2003a, b) have underlined the impact of combined nutrients and metals on diatom community structures but interactions between contaminants are likely to bias the sensitivity of species to single factors (Lozano and Pratt 1994; Guasch et al. 1998). To avoid this bias, we propose to set up an *in vitro* experiment to describe biofilm development under metallic contamination. Microcosms studies stray from field conditions but allow the control of physico-chemical parameters; in order to limit the differences with environmental conditions we worked on natural assemblages of diatom species.

Therefore, these studies linked shifts in diatom consortia to water metal concentrations and did not reflect the real exposure in the organic matrix. Indeed, periphytic biofilms accumulate metals following three main mechanisms (Holding et al. 2003): (i) absorption in extracellular polymeric substances (EPS), (ii) cell surface adsorption, and (iii) intracellular uptake. Here we propose to discriminate between metal adsorbed to abiotic or biotic materials and intracellular (non-exchangeable) metal by assaying the metal concentrations in the periphyton after no treatment or EDTA washing of periphyton samples (Behra et al. 2002).

Moreover, many authors have reported metal-induced deformities of the frustule in polluted streams (McFarland et al. 1997; Shehata et al. 1999; Gomez and Licursi 2003; Nunes et al. 2003), and yet correlations between exposure and occurrence of abnormal valves still lack experimental validation. The use of the frequency of abnormal frustules, if pointing to a metal stress, would be worthy for routine biomonitoring of metal contaminations.

The present microcosm study is aimed at characterizing biofilm development (using measurements of dry weight, ash-free dry mass and diatom density) under various metal levels, and at determining the accumulation kinetics of dissolved cadmium in a natural freshwater biofilm, as well as metal toxicity to diatom assemblages and individuals.

## **Materials and methods**

### *Field sampling*

The Riou-Mort stream, a small tributary of the river Lot located in the industrial basin of Decazeville (South West France, 44°N / 2°E), exhibits polymetallic pollution from its confluence with the Riou-Viou, a stream carrying seepage from a former zinc factory, presenting high levels of dissolved cadmium (Say 1978). In the year 2000, Audry et al. (2004) measured concentrations of 16mg·L<sup>-1</sup> dissolved cadmium (average value).

Diatom communities were sampled from the field, at a site on the Riou-Mort located upstream of the contamination source, in March 2006. Microbenthic biofilms were grown on 20 glass slides (300cm<sup>2</sup> per slide) immersed in the stream in plastic racks for 5 weeks before collection, scraping, suspension in stream water and transport to the laboratory (Morin et al. 2006).

### *Experimental design*

In the laboratory, biofilm suspensions were separated into 4 aliquots, each aliquot was inoculated in the water column of 3 independent experimental units. Each system runs in a closed circuit and is composed of replicate artificial streams (60cm long, 6cm radius) equipped with 6 glass substrates, connected in parallel to a 40L tank (Figure 1). Using an external pump, water was circulated from the tank to a header tank providing a steady supply of water to the streams.

The experimental units (EU) were placed in an air-conditioned room, at a light intensity of approximately 70μmol·s<sup>-1</sup>·m<sup>-2</sup> (10:14 light:dark regime) and under continuous water movement at a velocity of approximately 0.4cm·s<sup>-1</sup>. The reservoirs were filled with 40L of

modified Woods Hole culture medium (without EDTA and supplemented with silica) diluted four-fold (Gold et al. 2003a). The levels of nitrates and orthophosphates in the systems were typical nutrient concentrations found in the Riou-Mort river in 2004 and 2005. Before the start of the experiment, the microcosms were equilibrated overnight with the culture media, to which the experimental concentrations of cadmium had been added.

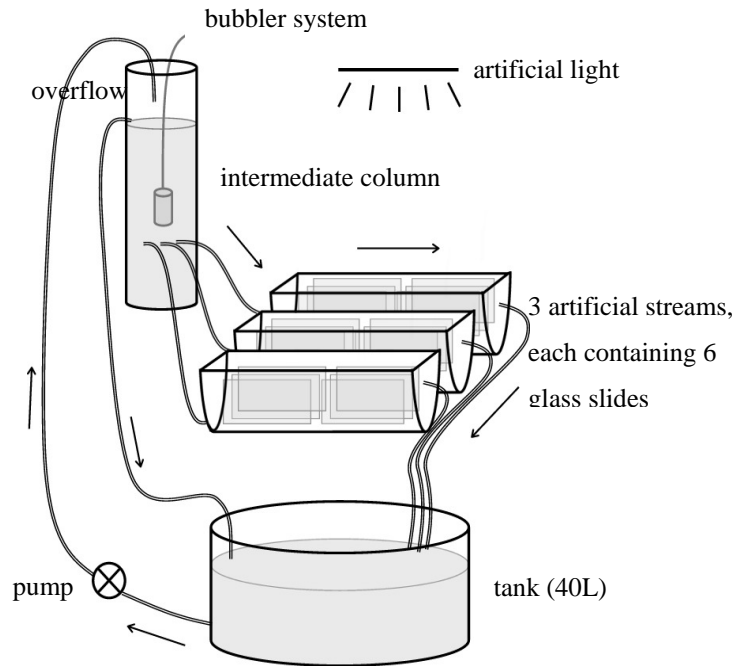


Fig. 1: Schematic representation of 1 experimental unit. Arrows indicate flow direction.

During the course of the experiment (6 weeks), water physical and chemical variables (temperature, pH, electric conductivity, dissolved oxygen concentration and saturation) (WTW, Weilheim, Germany) were determined daily at the end of the light cycle. Nutrient (orthophosphate, nitrate) concentrations were analyzed weekly at the laboratory from 1L water samples, according to French and international standards (NF T90-023 and NF EN ISO 13395, respectively). Depending on the results of the analyses, culture medium was added as required to compensate for the decrease of nutrient concentrations due to algal uptake.

### ***Water column contamination protocol***

Each individual experimental unit represented a different treatment: control (EU1), low contamination (EU2,  $10\mu\text{Cd}\cdot\text{L}^{-1}$ , in accordance with concentrations found in the polluted river Riou-Mort), high contamination (EU3,  $100\mu\text{gCd}\cdot\text{L}^{-1}$ ), which approximately corresponds to

extreme values recorded in a tributary of the river Riou-Mort, the Riou-Viou, by the TGM team, University Bordeaux 1 (e.g. more than  $60\mu\text{gCd}\cdot\text{L}^{-1}$  in October 2004).

The EU were contaminated with a cadmium chloride solution ( $\text{CdCl}_2$ , Merck, Darmstadt, Germany) to reach nominal test concentrations of 10 and  $100\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Cadmium concentrations were measured (and, when necessary, corrected) daily during the first week and twice per week during the rest of the experiment. Water samples were filtered and mineralized, to determine cadmium concentrations by atomic absorption spectrophotometry (Varian AA400 – Zeeman correction, Victoria, Australia). The detection limit was  $0.1\mu\text{gCd}\cdot\text{L}^{-1}$ . The accuracy of the analytical methods was checked periodically using two certified biological reference materials (Tort-2: lobster hepatopancreas and Dolt-2: dogfish liver from NRCC-CNRC, Ottawa, Canada). Values were consistently within the certified ranges (data not shown).

### ***Biofilm sampling and analyses***

After a 1- and 2-week colonization, 2 glass slides were removed at random from each artificial stream; 1 slide was sufficient for biofilm collection at weeks 4 and 6. The streams were then reset with new glass slides, to preserve identical flow conditions.

Both faces of the glass substrates were carefully scraped with a cutter blade and the biofilm was suspended in a standard volume of 100mL to form a single sample per stream (*i.e.* 3 replicate periphyton samples per experimental unit) per sampling date and per treatment.

Each suspended biofilm sample was separated into aliquots assigned to various analyses. 20mL were used for particulate matter analysis: biofilm dry weights (DW) were determined following the European standard NF EN 872; after drying and weighing, samples were ashed at  $500^\circ\text{C}$  for one hour in a muffle furnace (Solax Technology Ltd, China) and the results reported as ash-free dry mass (AFDM). 40 mL were put into Teflon © jars to assay metal concentrations, following 2 protocols: (i) 20mL were used for determination of total metal in the biofilm, (ii) 20mL were washed for 10 minutes with 4nM EDTA at pH=8 to determine the intracellular metal content of the periphyton. After filtration and mineralization of each sample (after washing with EDTA or not), cadmium concentrations were measured by atomic absorption spectrophotometry (Varian AA400 – Zeeman correction, Victoria, Australia) and by autosampler, with a  $0.1\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  detection limit. Finally, 5mL were preserved in a formaldehyde solution for countings and diatom identifications to the species level (see below “Quantitative and qualitative analysis of diatom assemblages”).

### ***Quantitative and qualitative analysis of diatom assemblages***

Enumeration was done in each formalin-preserved sample (100 $\mu$ L) using a Nageotte counting chamber: the total number of cells counted in 10 fields (1.25 $\mu$ L each, 0.5mm depth) using light microscopy at 400x magnification (photomicroscope Leica DMRB, Wetzlar, Germany) was then recorded as cells per unit area of sampled substrate (number of diatom cells $\cdot$ cm<sup>-2</sup>).

The sample fractions devoted to taxonomic analysis of diatom assemblages were prepared according to ANSP protocols (Charles et al. 2002), *i.e.* digestion in boiling hydrogen peroxide (30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and hydrochloric acid (35%) followed by 3 cycles of centrifugation of the sample and pellet rinsing with distilled water. After the last treatment, the pellet was once again resuspended in distilled water, and pipetted onto coverslips which were mounted onto slides after air drying, using the high refractive index medium Naphrax © (Brunel Microscopes Ltd, UK; RI=1.74). Diatom identifications were conducted at a magnification of 1,000x; individual microscope fields were scanned until a minimum of 400 valves had been identified using specialized literature (Krammer and Lange-Bertalot 1986 - 1991). Individual deformities (twisted cells and / or diatoms with deformed valve wall ornamentation) were observed and their frequency determined. Note that the valves of initial cells, which typically have a morphology that is different from vegetative valves (larger and usually presenting distorted costae)(Round et al. 1990), were not taken into account in diatom counts.

### ***Data analyses***

Data were evaluated statistically in two ways. First, DW, AFDM, densities and abnormal forms frequencies were analyzed using repeated measures ANOVA after having been tested for normality and homogeneity of variance. Statistical significance of differences was examined using *post hoc* Tukey tests. These statistical analyses were computed with the software package Statistica (v5.1, StatSoft Inc., 1984-1998). Second, PC-ORD software (McCune and Mefford 1999) was used for conducting Hierarchical Cluster Analysis. A dendrogram based on relative abundances of the species occurring most (the 80 species that had the highest cumulative relative abundances) was drawn by using Ward's method.

Values are mean  $\pm$  standard deviation.

## Results

### *Physical and chemical characteristics of microcosm water (see Table 1)*

The pH of the water did not differ significantly ( $p=0.77$ ) among experimental units. A slight increase was observed, ranging from 7 at the beginning of the experiment to 8 at the last dates. Temperature and oxygenation were relatively constant throughout the experimental period and similar between treatments. Temperatures averaged  $17.9^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 0.8^{\circ}\text{C}$ ). Dissolved oxygen concentrations were stable with a mean value of  $8.7\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $\pm 0.8\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) and oxygen saturation was quite high, with a 92% value ( $\pm 4\%$ ). The mean conductivity increased regularly in all streams, from  $140$  to  $200\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  in EU 1, to  $220\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  in EU3, and to  $320\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  in EU 2.

Table 1: Physicochemical parameters and nutrient concentrations measured during the 6-week experimental period in the water column of the 3 experimental systems (d.l.: detection limit:  $0.1\mu\text{gCd}\cdot\text{L}^{-1}$ ).

		EU1	EU2	EU3
pH	week 0	7.1	7.0	7.0
	week 1	7.4	7.5	7.4
	week 2	7.3	7.5	7.2
	week 4	7.7	8	7.8
	week 6	7.9	7.9	7.7
temperature ( $^{\circ}\text{C}$ )	week 0	18.0	18.3	17.8
	week 1	18.8	17.6	18.0
	week 2	18.9	17.9	18.2
	week 4	18.8	16.5	17.4
	week 6	18.7	17.6	18.1
dissolved O <sub>2</sub> ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	week 0	8.5	8.9	8.3
	week 1	8.7	8.4	8.3
	week 2	8.5	8.2	8.2
	week 4	9.2	8.9	9.2
	week 6	8.8	8.3	8.2
oxygen saturation (%)	week 0	89.0	89.1	87.1
	week 1	93.5	87.6	86.5
	week 2	91.7	87.9	85.4
	week 4	97.3	86.9	97.5
	week 6	94.2	86.3	84.9



conductivity ( $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ )	week 0	143	152	135
	week 1	153	180	139
	week 2	163	201	155
	week 4	183	254	181
	week 6	202	320	220
cadmium ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	week 0	<d.l.	5.34	70.38
	week 1	<d.l.	8.26	106.59
	week 2	<d.l.	7.87	92.52
	week 4	<d.l.	12.90	101.65
	week 6	<d.l.	9.72	110.50
nitrates ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	week 0	33.5	33.3	32.6
	week 1	27.3	24.4	27.6
	week 2	25.7	22.5	28.0
	week 4	22.2	23.6	31.6
	week 6	18.9	29.6	37.2
orthophosphates ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	week 0	2.9	2.9	2.9
	week 1	2.5	2.1	2.4
	week 2	2.3	1.9	2.2
	week 4	1.7	1.9	1.9
	week 6	0.9	1.9	2.2

Nitrate and phosphate concentrations were around  $33\text{mgNO}_3\cdot\text{L}^{-1}$  and  $2.9\text{mgPO}_4\cdot\text{L}^{-1}$  in all systems, at the beginning of the experiment (week 0). Concentrations decreased gradually in all the EU, until additions of culture medium at the end of week 3 restored nutrient levels to a comparable value in all systems, followed by stabilization. In EU1 however, a continuous decrease in nitrate and phosphate concentrations occurred.

Cadmium concentrations in the EU matched the nominal concentrations well. Actual concentrations were below  $0.1\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  in EU1, of  $9.07\pm 2.55\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  in EU2 and  $95.93\pm 14.57\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  in EU3 during the experiment.

### *Biofilm biomass and metal content*

The mean DW and AFDM of the biofilms increased throughout the 6-week exposure (Figure 2). In EU 3 however, DW and AFDM measurements tended to stabilize between week 4 and 6. The ANOVAs performed on the dataset confirmed this date effect (mean DW and AFDM ranged from 13.6 and 11.4 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  respectively at week 1 to 69.5 and 48.5 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  at week 6;  $p<0.01$  in both cases) and also underlined a treatment effect ( $p<0.01$ ). EU 1 and 2 exhibited similar DW values during the whole course of the experiment, whereas EU 3 values were half those of EU1 and 2 for almost all dates. Indeed, *post hoc* Tukey test did not discriminate EU 1 and 2, but expressed strong differences with EU 3 ( $p<0.01$ ). A slight but statistically significant increase in AFDM ( $p=0.023$ ) was observed between EU1 (mean AFDM=32.8 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) and EU2 (mean AFDM=38.9 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ). AFDM in EU3 was significantly reduced for all stages of settlement ( $p<0.01$ ) with an average value of 20.6 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ .

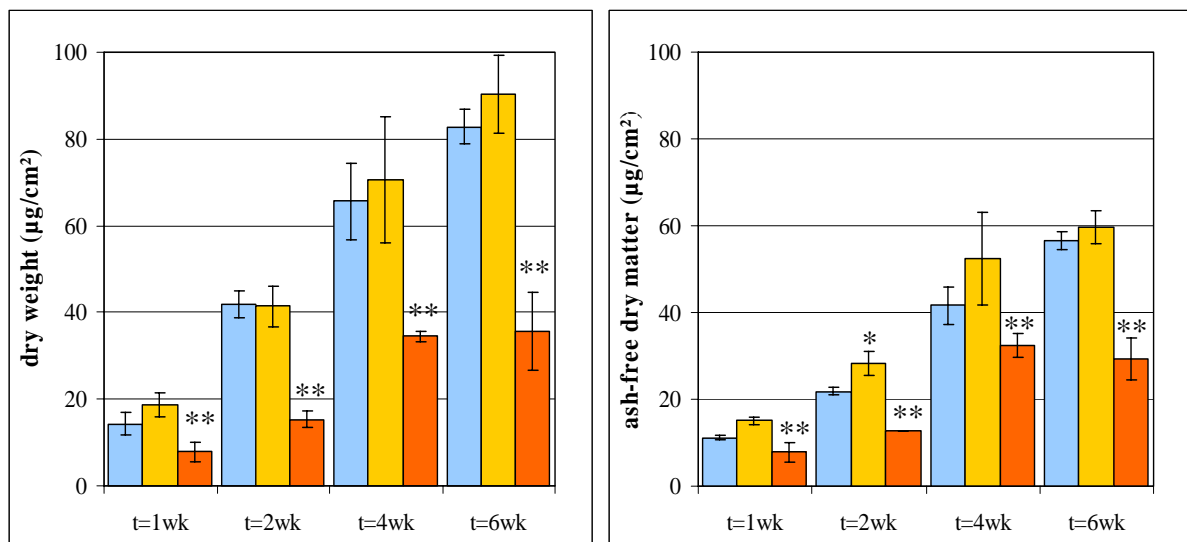


Fig. 2: Composition of the periphytic layer in the experimental units (blue bars: EU1, yellow bars: EU2, orange bars: EU3; statistically significant differences from EU1: \*:  $p<0.05$ ; \*\*:  $p<0.01$ ). Error bars: standard deviation of 3 replicates.

Metal content in biofilms as measured with both protocols (without and after an EDTA wash) reflected their exposure history. Biofilms from the cadmium-enriched systems (EU2 and EU3) sequestered increasing concentrations per DW unit as the biofilm settled. We observed a logarithmic accumulation of non-exchangeable and total cadmium in periphyton (Figure 3 and Figure 4). Cadmium contents increased from week 1 to week 4, and then stabilized around 3 and 5 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  DW in EU1 for non-exchangeable and total cadmium respectively, 115 and

330 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  DW in EU2, 1350 and 3700 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  DW in EU3. Within EU variability of cadmium concentrations in periphyton without and after EDTA wash was observed during the whole course of the experiment: the ratio non-exchangeable/total metal was of about 0.4 for EU3, and increased in EU2 from 0.2 at week 1 to 0.4 at the end of the experiment.

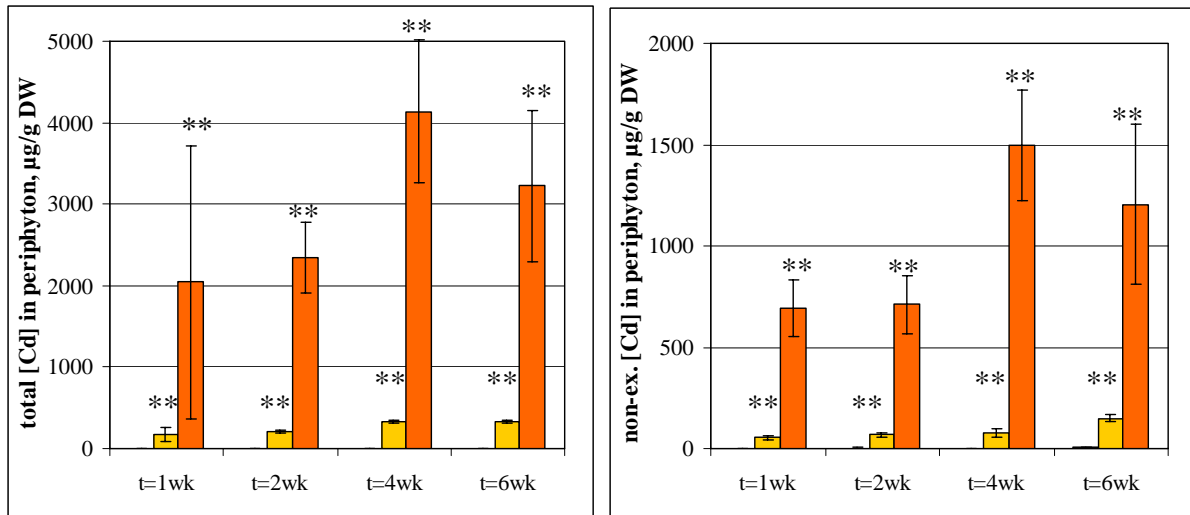


Fig. 3: Biofilm accumulation of total and non-exchangeable cadmium in the experimental units (blue bars: EU1, yellow bars: EU2, orange bars: EU3; statistically significant differences from EU1: \*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ). Error bars: standard deviation of 3 replicates.

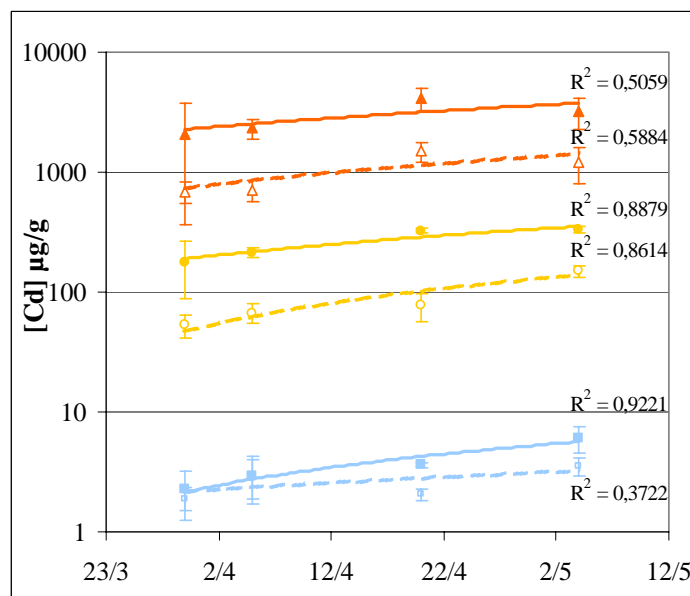


Fig. 4: Non-exchangeable (open symbols) and total cadmium (solid symbols) accumulation in biofilms during the course of the experiment. Symbols:  $\square$ =EU1,  $\circ$ =EU2,  $\Delta$ =EU3. Error bars: standard deviation of 3 replicates. Note the logarithmic scale on Y axis.

*Diatom assemblages*

EU1 and EU2 samples had initial diatom densities of  $2000 \pm 150$  cells·cm<sup>-2</sup> after 1 week of colonization (Figure 5). These cell densities increased strongly during the experiment, to  $55000 \pm 2700$  cells·cm<sup>-2</sup> at week 6 (average EU1 and EU2 values). Statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) in diatom densities between EU1 and EU2 were only observed after a 4-week incubation, but not at the other sampling dates. EU3 displayed dramatically low cell densities ( $p < 0.01$  for almost all dates) for all stages of settlement, compared to control and low cadmium contamination units. Data ranged from  $350 \pm 40$  cells·cm<sup>-2</sup> on week 1 to  $10400 \pm 2600$  cells·cm<sup>-2</sup> on week 6.

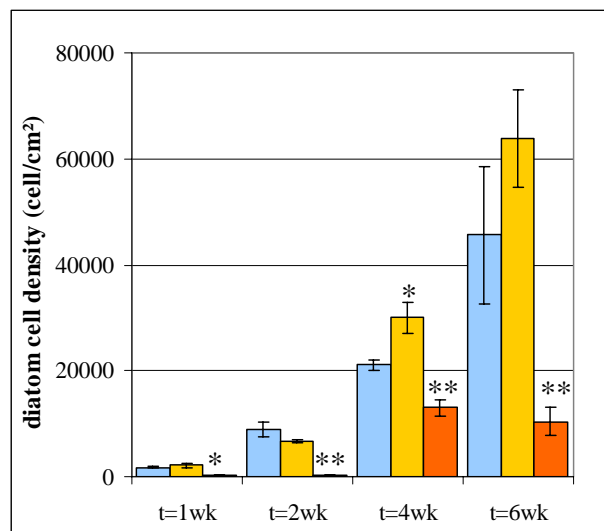


Fig. 5: Diatom cell densities enumerated in the glass substrates of each experimental unit (blue bars: EU1, yellow bars: EU2, orange bars: EU3; statistically significant differences from EU1: \*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ). Error bars: standard deviation of 3 replicates.

About 160 different taxa were identified. In Figure 6, the dendrogram based on relative species abundances showed two major clusters with one comprising diatom communities grown under  $100 \mu\text{gCd}\cdot\text{L}^{-1}$  contamination after 2, 4 and 6 weeks' exposure, which were strongly dominated by *Nitzschia palea* (Kützinger) W.Smith (from more than 50% relative abundances to about 80% at week 6, with a species richness of less than 20 taxa). The other cluster was divided into two subclusters: one subcluster included communities from the inoculum (week 0) and week 1 for every EU, the other subcluster was composed of assemblages from EU1 and EU2 developed after 2, 4 and 6 weeks. Communities from the inoculum (week 0) and from the first sampling date (week 1) were characterized by an association of *Navicula lanceolata* (Agardh) Ehrenberg, *Navicula gregaria* Donkin, *Surirella brebissonii* Krammer & Lange-Bertalot var.

*brebissonii*, *Nitzschia dissipata* (Kützing) Grunow and *Achnantheidium minutissimum* (Kützing) Czarnecki, while the other subcluster, corresponding to EU 1 and EU2 communities developed after a 2-week period, contained *Nitzschia palea*, *Eolimna minima* (Grunow) Lange-Bertalot, *Planothidium frequentissimum* (Lange-Bertalot) Lange-Bertalot, *Navicula gregaria* and *Nitzschia pusilla* (Kützing) Grunow. Naviculaceae presented 40 to 70% relative abundances in the control unit, and tended to decrease under high cadmium exposure, contrary to Nitzschiaceae, which tended to increase, representing more than 80% relative abundances at the end of the course experiment.

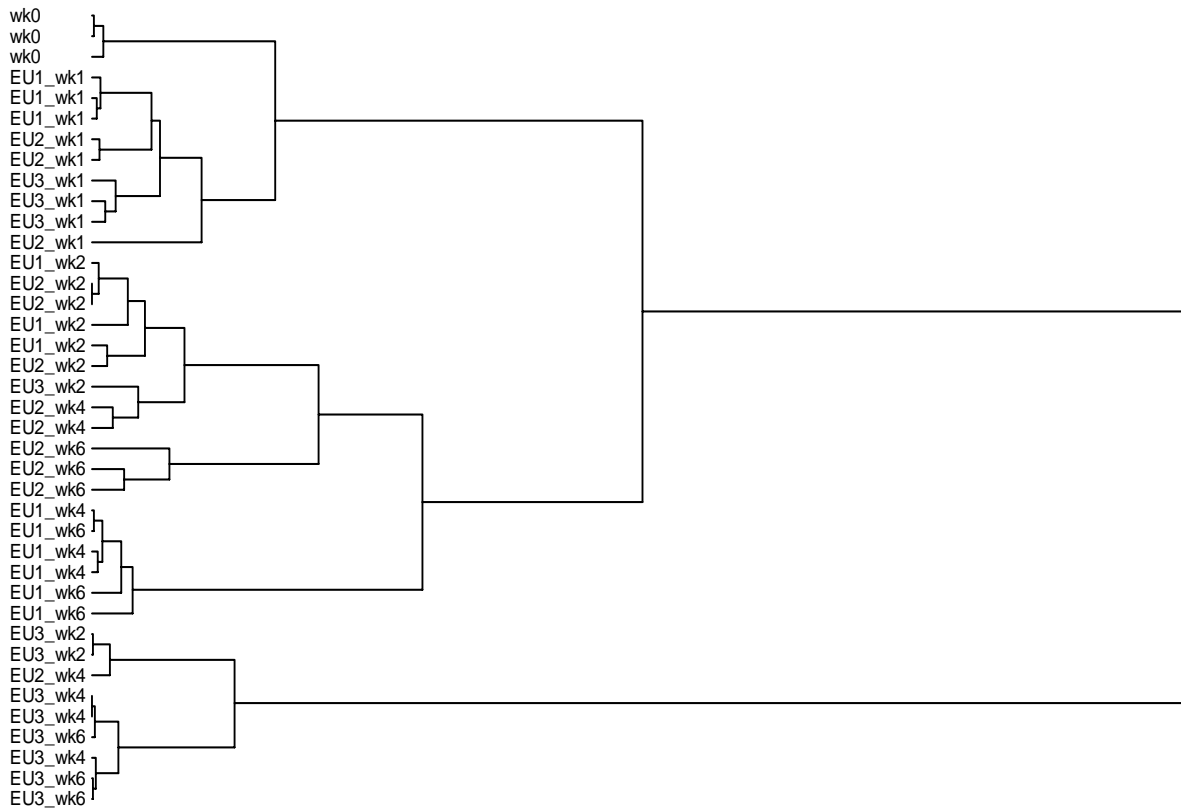


Fig. 6: Dendrogram of assemblages relationships among diatom communities developed under 3 cadmium concentrations and sampled at 5 sampling dates (EU: experimental unit, wk: week of sampling).

A total of 21 diatom species representing 10 genera exhibited morphological deformities (Figure 7) and were quantified. Teratological valves were abundant among Raphids (66% of the abnormalities enumerated) belonging to the genera *Nitzschia* (and, occasionally, to the genera *Caloneis*, *Eolimna*, *Gomphonema*, *Navicula*, *Sellaphora*, *Surirella*) and Araphids (33%) like *Fragilaria* sp. and a few occurrences of *Meridion*. Abnormalities were less abundant in Monoraphids from the genera *Planothidium*. In Figure 8 we observe that no teratological forms were present in the inoculum, in the experimental units however some abnormalities tended to appear, with increasing abundances in EU2 and EU3, reaching  $16\pm 4.5\%$  in EU2 and  $35\pm 5\%$  in EU3 after a 6-week exposure. The frequency of valve abnormalities in the control units was quite stable between weeks 1 and 4 ( $2.7\pm 0.7\%$ ) and increased to more than 10‰ on week 6, which was however statistically lower ( $p < 0.05$ ) than frequencies calculated in EU2 and 3.

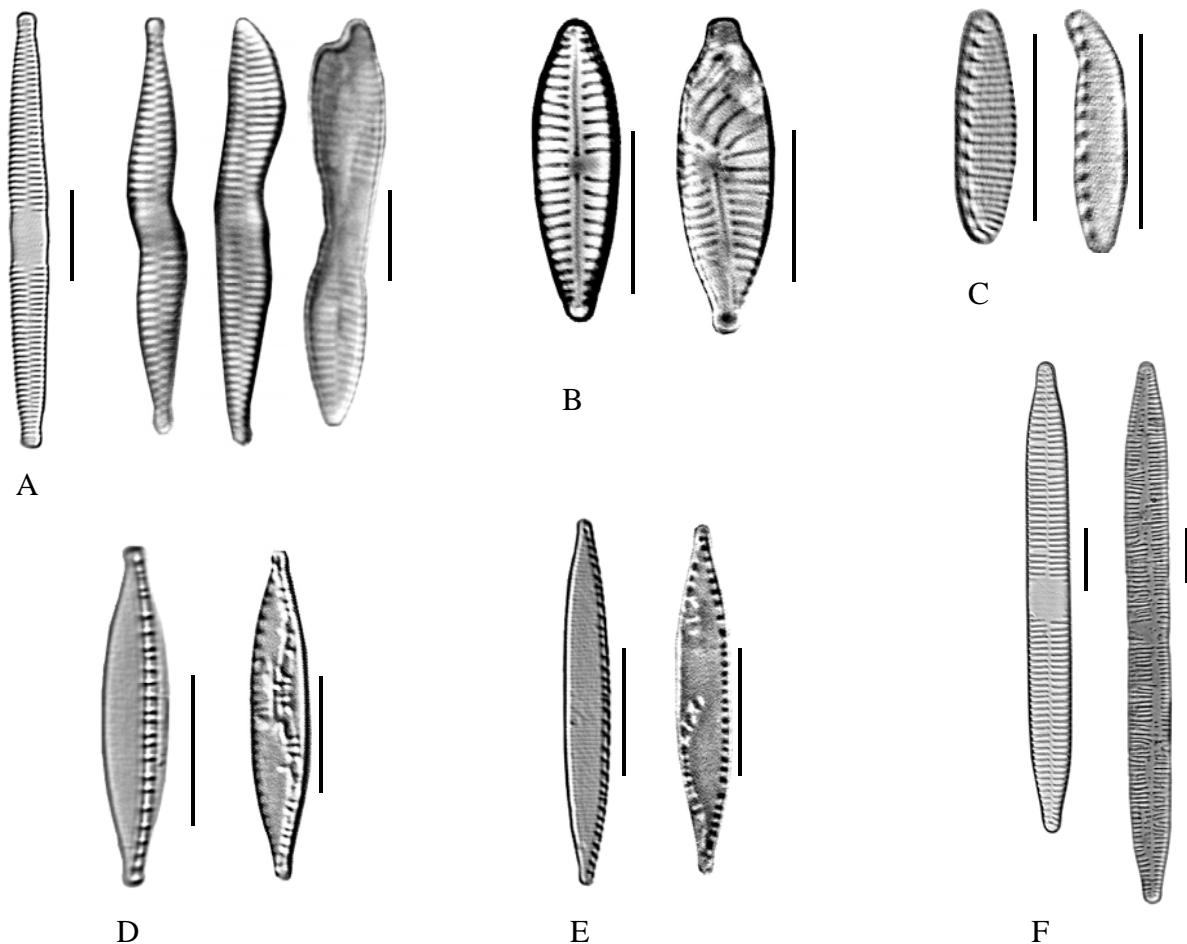


Fig. 7: Normal and deformed individuals of *Fragilaria capucina* (A), *Gomphonema parvulum* (B), *Nitzschia inconspicua* (C), *N. dissipata* (D), *N. palea* (E) and *Ulnaria ulna* (F). Scale bar = 10  $\mu$ m

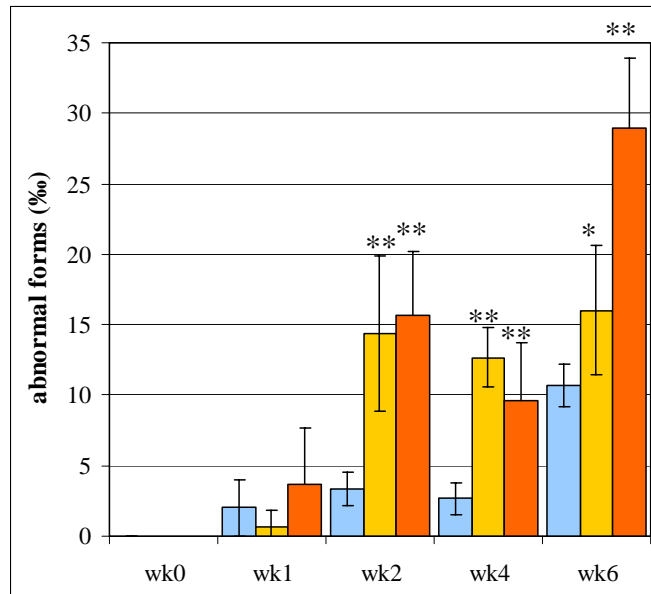


Fig. 8: Average relative abundances of deformed frustules in each experimental unit (blue bars: EU1, yellow bars: EU2, orange bars: EU3; statistically significant differences from EU1: \*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ). Error bars: standard deviation of 3 replicates.

## Discussion

### *Experimental setup*

In this study there were three different experimental units (EU) that consisted of six different slides each. To ensure that the starting conditions (inoculum, physical and chemical conditions) were the same in the different EU, water characteristics and diatom community composition were determined at week 0. Every EU received a different treatment (0, 10,  $100\mu\cdot\text{L}^{-1}$ ) but there were not a real replication of treatments in the design, and the slides from each channel were consequently considered as “analytical” replicates.

On the other side, the analyses performed would not have been possible in 3x3 systems, because of the time involved, especially in the determination of cadmium concentrations as well as community composition of the biofilms. Because the treatments were not “truly” replicated, the results need to be taken with caution.

### *Sorption kinetics of dissolved cadmium in the biofilms.*

Cadmium concentrations in the biofilms differed among EU and temporally within EU. Generally, an increase in metal concentrations in periphyton reflected the duration of exposure and the dissolved concentrations of this metal in the culture media of each experimental unit. Hence, the EU3 biofilms had much higher concentrations at any sampling time than those of

EU2 and EU1 (Figure 3). It has been demonstrated that biofilms have a good bioaccumulation capacity (Guanzon et al. 1995; Sunda and Huntsman 1998; Chang and Reinfelder 2000; Hill et al. 2000) and would be a tool for the monitoring of river pollution equivalent to metal measurements in the sediment and suspended solids (Fuchs et al. 1996). Indeed, heavy metal ions can be entrapped in the organic matrix and occasionally biosorbed by live cells (bacteria, fungi and algae). As observed in this experiment, high amounts of metals assayed in the biofilms were not actually taken up into the cells; 60% of the metal was rather absorbed on the cell surface (Torres et al. 1998) and eliminated by the EDTA wash.

Metal bioaccumulation reflects both passive and active modes (Campbell et al. 2002); most of the studies dealing with the subject describe an initial rapid phase of biosorption (Wang and Dei 2001; Hudson 2005), followed by slower active metal uptake (Perrein-Ettajani et al. 1999). The logarithmic regressions (Figure 4) expressed an increasing accumulation of cadmium per DW unit during the first four weeks of the experiment, then stabilization at the end of the experiment, which indicated some kind of equilibrium state, for total as well as non-exchangeable cadmium. Increasing cadmium sorption (until week 4) with increasing biofilm biomass implied a significant contribution of subsurface cells to metal sorption, these cells providing additional sorption sites (Hill et al. 2000). However, the effectiveness of additional biofilm biomass at removing metal was limited at the last dates of the experiment where an equilibrium state was reached. This may be due to saturation of the metal binding sites in the cells (Di Toro et al. 2001; Rijstenbil and Gerringa 2002), reducing cell absorption capacity. It may also be explained by the three-dimensional architecture of the biofilm, strongly modified under metal exposure. Indeed, in copper-treated biofilms, Teitzel and Parsek (2003) observed an external layer of dead cells, and an increased number of live cells towards the substratum. Presumably, most of the actively growing cells were in a “protected” region of the biofilm, where metal penetration was retarded. The protective effect of the organic matrix against pollution by toxins has been underlined by studies comparing the effects of heavy metals on thin vs. thick biofilms (Hill et al. 2000), or on biofilms exposed at various stages of development (Ivorra et al. 2000). This protective role of the matrix has been attributed to local pH and hypoxia conditions in the internal layers of the biofilm (Teissier and Torre 2002), which modify redox conditions and, possibly, cell bioaccumulation potentials. Moreover, it is generally accepted that exopolysaccharides secreted by algal and bacterial communities (Pistocchi et al. 1997; Decho 2000; Muller et al. 2005) also play a role in binding metals, thus reducing their bioavailability and toxicity to live cells.



***Influence of the metal contamination level on biofilms.***

In this study, biofilm accumulation was affected by high level of dissolved cadmium: DW and AFDM were significantly lower in biofilms exposed to a  $100\mu\text{gCd}\cdot\text{L}^{-1}$  contamination (EU3) than those measured in biofilms grown in EU1 and EU2. Growth inhibition at high metal contamination levels has been widely reported (Conway 1978; Conway and Williams 1979; Wong 1987; Guanzon et al. 1994; Payne and Price 1999; Gold et al. 2003a). Not only is global metabolism affected by metals (Husaini and Rai 1991), but so is cell ultrastructure (endoplasmic reticulum, mitochondria) which seems to be modified by elevated intracellular cadmium concentrations (Wong 1987). Moreover, Guanzon et al. (1994) described perturbations in phosphorus metabolism and cell division over critical concentrations of metal. Takamura et al. (1989) found growth inhibition of freshwater benthic algae at far lower cadmium concentrations than applied in EU3, and our findings provide added support for the idea that DW and AFDM are better indicators of metal damage to biofilm communities than microbenthic algal photosynthesis (Lehmann et al. 1999, this study, data not shown), on which substances like cadmium or zinc have an unspecific mode of action (Lehmann et al. 1999).

Although dissolved cadmium in EU2 exceeded metal concentrations normally regarded as toxic for chemical waste, biomass as assessed through AFDM was comparable between EU1 (reference) and EU2 ( $10\mu\text{gCd}\cdot\text{L}^{-1}$ ), and DW was even slightly higher in EU2 than in EU1. Nalewajko (1995) showed that moderate additions of cadmium (up to  $5\mu\text{gCd}\cdot\text{L}^{-1}$ ) may result in some growth stimulation. Nutrient bioavailability would also be likely to interact with the toxicant and slightly favour biofilm development (Lozano and Pratt 1994), nutrient concentrations being higher in EU2 at week 4 and 6 compared to the reference (see Table 1). Ivorra et al. (2002) noted that increased dissolved phosphorus concentrations might mitigate metal toxicity to biofilms or exert a protective role, by making coordination complexes of trace metals with phosphorus; moreover Barranguet et al. (2002) described a nutrient-stimulated biomass accumulation in photosynthetic biofilms affected by metals. This complicates the assessment of toxic effects on living organisms (and especially diatoms) embedded in the biofilm.

***Influence of the metal contamination level on diatom assemblages.***

It was expected that differences in cadmium concentrations between the systems would control the quantitative as well as qualitative characteristics of the diatom assemblages.

Diatom growth played a role in the development of the biofilm by dynamically contributing to the pool of live organisms (export and import of cells) as well as producing polysaccharide exudates which are partly responsible of the coherence of the organic matrix. Whatever the stage of colonization, Stevenson and Peterson (1991) estimated substantial daily immigration and emigration rates for diatoms in slow flowing streams. In the present study, specific growth rates were observed, diatom densities increasing regularly in EU1 and EU2. In the streams exposed to high cadmium concentrations, growth rates were diminished due to chemical stress affecting cell survival, cell division (Perrein-Ettajani et al. 1999), reproduction rates (Rott 1991; Peres et al. 1997) or even modifying migration strategies (Peterson 1996). These structural and functional perturbations led to the dramatic reduction we observed in diatom biomass, as described by Paulsson et al. (2000).

The diatom assemblages present during the first week were similar to the pool of species in the inoculum. Then the assemblages differentiated according to elevated metal exposure. However most of the dominant taxa identified in this experiment (including the control unit) had already been reported in metal-contaminated environments (see Table 2), even though the status of many of them is still discussed. Saprophylic species like *Nitzschia palea* or *Gomphonema parvulum* (Kützing) Kützing may have been favoured by the availability of nutrients, mitigating the effects of the cadmium at low concentrations. The shifts observed in diatom species in EU3 (high-level cadmium) were indeed consistent with data found in the literature. The increased abundance of *Nitzschia palea* in EU3 coincided with the reported tolerance of this species to metal pollution (Table 2). The predominance of this species concomitant with the detrimental effect of high contamination to most of the species initially present (decreasing species richness) is in agreement with observations of Ivorra et al. (2002).

Table 2: Metal-sensitivity and tolerance of diatom species identified in the experiment, as described through previous mesocosm (M) and field (F) studies.

Numbers refer to the following papers : [1] Admiraal et al. (1999a; 1999b), [2] Admiraal et al. (1999a; 1999b), [3] Blanck et al. (2003), [4] Cattaneo et al. (2004), [5] Feurtet-Mazel et al. (2003), [6] Gold et al. (2002), [7] Gold et al. (2003a), [8] Gold et al. (2003b), [9] Ivorra et al. (1999), [10] Ivorra et al. (2002a), [11] Ivorra et al. (2002b), [12] Lai et al. (2003), [13] Lehmann et al. (1999), [14] Medley and Clements (1998), [15] Morin et al. (2006), [16] Nunes et al. (2003), [17] Peres et al. (1997), [18] Sabater (2000), [19] Shehata et al. (1999), [20] Szabó et al. (2005), [21] Takamura et al. (1989).

Species	Described as metal-sensitive by:	Described as metal-tolerant by:
<i>Achnantheidium minutissimum</i> (Kützing) Czarnecki	3 (M), 18 (F)	4 (F), 5 (F-M), 7(M), 8(M), 11 (M), 16 (F), 20 (F)
<i>Amphora pediculus</i> (Kützing) Grunow	18 (F)	20 (F)
<i>Eolimna minima</i> (Grunow) Lange-Bertalot		5 (F-M), 6 (F), 17 (M) , 20 (F)
<i>Fragilaria capucina</i> Desmazières	6 (F)	11 (M), 13 (F), 19 (M), 20 (F)
<i>Gomphonema parvulum</i> (Kützing) Kützing	11 (M)	5 (F-M), 6 (F), 10 (M), 18 (F)
<i>Mayamaea atomus</i> var. <i>permitis</i> (Hustedt) Lange-Bertalot		15 (F)
<i>Navicula lanceolata</i> (Agardh) Ehrenberg		20 (F)
<i>Navicula(dicta) seminulum</i> (Grunow) Lange Bertalot		9 (F)
<i>Nitzschia dissipata</i> (Kützing) Grunow	5 (M), 7 (M), 8 (M)	20 (F)
<i>Nitzschia palea</i> (Kützing) W.Smith		1 (M), 2 (M), 8 (M), 12 (F), 14 (F), 18 (F)
<i>Planothidium lanceolatum</i> (Brebisson ex Kützing) Lange-Bertalot		20 (F)
<i>Surirella angusta</i> Kützing		5 (F-M), 6 (F), 21 (M)

### *Observations of diatom deformities*

The communities inoculated into the 3 experimental units showed no morphological abnormalities. In EU1 at the beginning of the experiment, aberrant cells occurred at low rates (less than 3%), similar to the rates of “naturally occurring” deformities. From week 2 in EU2 and EU3 however, there was a larger percentage of valve abnormalities, and cadmium exposure was identified as the leading stressor responsible of their increased occurrence. Abnormal cells had already been noted in sediment cores at various stages of the geologic record from metal-polluted environments (Ruggiu et al. 1998; Cattaneo et al. 2004), as well as in freshwater (Yang and Duthie 1993; McFarland et al. 1997; Nunes et al. 2003; Szabó et al. 2005; Morin et al. 2006) and in seawater (Thomas et al. 1980; Dickman 1998). In this experiment, concentrations of dissolved cadmium were above the “bad status” thresholds ( $3\mu\text{gCd}\cdot\text{L}^{-1}$ ) proposed by the French freshwater quality evaluation system (SEQ-eau). As the percentage of abnormal cells increased with increasing cadmium concentrations in the streams, and with duration of exposure, it seems that metal is the causative agent for deformed diatoms in this experimental study. Moreover, the experimental units used very soft water, with a neutral pH, which would have enhanced metal bioavailability. The frequency of deformities in diatom communities exposed to cadmium contaminations confirmed the observations described previously, in systems that were mostly contaminated by metals such as Cd, Cu or Zn. However, the percentages of deformities recorded here were very high compared with other studies. Maybe the high values found in this experiment indicated a more attentive consideration to slight alterations overlooked in other studies.

The reasons underlying the appearance of high numbers of deformed diatoms in EU1 after 6 weeks were suspected not to involve heavy metals. Anomalous diatom cells have been commonly described under culture conditions (Estes and Dute 1994), in relation to the fact that the cells had probably exceeded the lower limits for sexual reproduction and were on their way to extinction, however deformities happen in roughly 2- to 12-year cycles. Here we would be inclined to single out some physical damage during cell development, related to crowding on the substrate. Cells with mechanically-induced deformities may also be replicated in clonal populations as the cells divide, keeping the frequency of aberrations stable or increasing.

## **Aknowledgements**

We thank Henri Bouillard from the LEESA for his technical assistance in creating the experimental units, and Muriel Bonnet and Maryse Boudigues who carried out the nutrient analyses.

## **References**

- Admiraal W, Blanck H, Buckert-De Jong M, Guasch H, Ivorra N, Lehmann V, Nystrom BAH, Paulsson M, Sabater S (1999a) Short-term toxicity of zinc to microbenthic algae and bacteria in a metal polluted stream. *Water Res* 33:1989-96
- Admiraal, W, Ivorra, N, Jonker, M, Bremer, S, Barranguet, C, Guasch, H (1999b) Distribution of diatom species in a metal polluted Belgian-Dutch river : an experimental analysis. In Prygiel J, Whitton BA, Bukowska J (ed) *Use of algae for monitoring rivers III*, Douai, p 240-4
- Audry S, Schäfer J, Blanc G, Bossy C, Lavaux G (2004) Anthropogenic components of heavy metal (Cd, Zn, Cu, Pb) budgets in the Lot-Garonne fluvial system (France). *Appl Geochem* 19:769-86
- Barranguet C, Plans M, van der Grinten E, Sinke JJ, Admiraal W (2002) Development of photosynthetic biofilms affected by dissolved and sorbed copper in a eutrophic river. *Environ Toxicol Chem* 21:1955-65
- Behra R, Landwehrjohann R, Vogel K, Wagner B, Sigg L (2002) Copper and zinc content of periphyton from two rivers as a function of dissolved metal concentration. *Aquatic Sciences - Research Across Boundaries* 64:300-6
- Blanck H, Admiraal W, Cleven RFMJ, Guasch H, van den Hoop M, Ivorra N, Nystrom B, Paulsson M, Petterson RP, Sabater S, Tubbing GMJ (2003) Variability in zinc tolerance, measured as incorporation of radio-labeled carbon dioxide and thymidine, in periphyton communities sampled from 15 European river stretches. *Arch Environ Contam Toxicol* 44:17-29
- Campbell PGC, Errecalde O, Fortin C, Hiriart-Baer WR, Vigneault B (2002) Metal bioavailability to phytoplankton - applicability of the biotic ligand model. *Comp Biochem Physiol C: Toxicol Pharmacol* 133:189-206
- Cattaneo A, Couillard Y, Wunsam S, Courcelles M (2004) Diatom taxonomic and morphological changes as indicators of metal pollution and recovery in Lac Dufault (Québec, Canada). *J Paleolimnol* 32:163-75

- Chang SI, Reinfelder JR (2000) Bioaccumulation, subcellular distribution and trophic transfer of copper in a coastal marine diatom. *Environ Sci Technol* 34:4931-5
- Charles DF, Knowles C, Davies RS (2002) Protocols for the analysis of algal samples collected as part of the US Geological Survey National Water-Quality Assessment Program. Patrick Center for Environmental Research, The Academy of Natural Sciences, Philadelphia, PA
- Conway HL (1978) Sorption of arsenic and cadmium and their effects on growth, micronutrient utilization, and photosynthetic pigment composition of *Asterionella formosa*. *J Fish Res Board Can* 35:286-94
- Conway HL, Williams SC (1979) Sorption of cadmium and its effects on growth and the utilization of inorganic carbon and phosphorus of two freshwater diatoms. *J Fish Res Board Can* 36:579-86
- Decho AW (2000) Microbial biofilms in intertidal systems: an overview. *Contin Shelf Res* 20:1257-73
- Di Toro DM, Allen HE, Bergman HL, Meyer JS, Paquin PR, Santore RC (2001) Biotic ligand model of the acute toxicity of metals. 1. Technical basis. *Environ Toxicol Chem* 20:2383-96
- Dickman MD (1998) Benthic marine diatom deformities associated with contaminated sediments in Hong Kong. *Environ Int* 24:749-59
- Estes A, Dute RR (1994) Valve abnormalities in diatom clones maintained in long-term culture. *Diat Res* 9:249-58
- Fuchs S, Haritopoulou T, Wilhelmi M (1996) Biofilms in freshwater ecosystems and their use as a pollutant monitor. *Water Sci Technol* 34:137-40
- Gold C, Feurtet-Mazel A, Coste M, Boudou A (2003a) Effects of cadmium stress on periphytic diatom communities in indoor artificial streams. *Freshwat Biol* 48:316-28
- Gold C, Feurtet-Mazel A, Coste M, Boudou A (2003b) Impacts of Cd and Zn on the development of periphytic diatom communities in artificial streams located along a river pollution gradient. *Arch Environ Contam Toxicol* 44:189-97
- Gomez N, Licursi M (2003) Abnormal forms in *Pinnularia gibba* (Bacillariophyceae) in a polluted lowland stream from Argentina. *Nova Hedw* 77:389-98
- Guanzon NG, Nakahara H, Nishimura K (1995) Accumulation of copper, zinc, cadmium, and their combinations by 3 freshwater microalgae. *Fish Sci* 61:149-56
- Guanzon NG, Nakahara H, Yoshida Y (1994) Inhibitory effects of heavy-metals on growth and photosynthesis of 3 freshwater microalgae. *Fish Sci* 60:379-84

- Guasch H, Ivorra N, Lehmann V, Paulsson M, Real M, Sabater S (1998) Community composition and sensitivity of periphyton to atrazine in flowing waters: the role of environmental factors. *J Appl Phycol* 10:203-13
- Hill WR, Bednarek AT, Larsen IL (2000) Cadmium sorption and toxicity in autotrophic biofilms. *Can J Fish Aquat Sci* 57:530-7
- Holding KL, Gill RA, Carter J (2003) The relationship between epilithic periphyton (biofilm) bound metals and metals bound to sediments in freshwater systems. *Environ Geochem Health* 25:87-93
- Hudson RJM (2005) Trace metal uptake, natural organic matter, and the free-ion model. *J Phycol* 41:1-4
- Husaini Y, Rai LC (1991) Studies on nitrogen and phosphorus-metabolism and the photosynthetic electron-transport system of *Nostoc linckia* under cadmium stress. *J Plant Physiol* 138:429-35
- Interlandi S J (2002) Nutrient-toxicant interactions in natural and constructed phytoplankton communities: results of experiments in semi-continuous and batch culture. *Aquat Toxicol* 61:35-51
- Ivorra N, Bremer S, Guasch H, Kraak MHS, Admiraal W (2000) Differences in the sensitivity of benthic microalgae to Zn and Cd regarding biofilm development and exposure history. *Environ Toxicol Chem* 19:1332-9
- Ivorra N, Hettelaar J, Kraak MHS, Sabater S, Admiraal W (2002) Responses of biofilms to combined nutrient and metal exposure. *Environ Toxicol Chem* 21:626-32
- Ivorra N, Hettelaar J, Tubbing GMJ, Kraak MHS, Sabater S, Admiraal W (1999) Translocation of microbenthic algal assemblages used for in situ analysis of metal pollution in rivers. *Arch Environ Contam Toxicol* 37:19-28
- Krammer K, Lange-Bertalot H (1986 – 1991) Bacillariophyceae 1. Teil: Naviculaceae; 2. Teil: Bacillariaceae, Epithemiaceae, Surirellaceae; 3. Teil: Centrales, Fragilariaceae, Eunotiaceae; 4. Teil: Achnanthaceae. Kritische Ergänzungen zu *Navicula* (Lineolatae) und *Gomphonema*. G Fischer Verlag, Stuttgart
- Lange-Bertalot H (1979) Pollution tolerance of diatoms as a criterion for water quality estimation. *Nova Hedw* 64:285-304
- Lehmann V, Tubbing GMJ, Admiraal W (1999) Induced metal tolerance in microbenthic communities from three lowland rivers with different metal loads. *Arch Environ Contam Toxicol* 36:384-91

- Lozano RB, Pratt JR (1994) Interaction of toxicants and communities - the role of nutrients. *Environ Toxicol Chem* 13:361-8
- McCune B, Mefford MJ (1999) Multivariate analysis of ecological data, version 4.01. MJM Software, Gleneden Beach, Oregon USA
- McFarland BH, Hill BH, Willingham WT (1997) Abnormal *Fragilaria* spp. (Bacillariophyceae) in streams impacted by mine drainage. *J Freshwat Ecol* 12:141-9
- Morin S, Vivas-Nogues M, Duong TT, Boudou A, Coste M, Delmas F (2006) Dynamics of benthic diatom colonization in a cadmium/zinc-polluted river (Riou-Mort, France). *Arch Hydrobiol* (accepted)
- Muller FLL, Larsen A, Stedmon CA, Sondergaard M (2005) Interactions between algal-bacterial populations and trace metals in fjord surface waters during a nutrient-stimulated summer bloom. *Limnol Oceanogr* 50:1855-71
- Nalewajko C (1995) Effects of cadmium and metal-contaminated sediments on photosynthesis, heterotrophy, and phosphate uptake in MacKenzie river delta phytoplankton. *Chemosphere* 30:1401-14
- Nunes ML, Da Silva EF, De Almeida SFP (2003) Assessment of water quality in the Caima and Mau River basins (Portugal) using geochemical and biological indices. *Water Air Soil Pollut* 149:227-50
- Paulsson M, Nystrom B, Blanck H (2000) Long-term toxicity of zinc to bacteria and algae in periphyton communities from the river Göta Älv, based on a microcosm study. *Aquat Toxicol* 47:243-57
- Payne CD, Price NM (1999) Effects of cadmium toxicity on growth and elemental composition of marine phytoplankton. *J Phycol* 35:293-302
- Peres F, Coste M, Ribeyre F, Ricard M, Boudou A (1997) Effects of methylmercury and inorganic mercury on periphytic diatom communities in freshwater indoor microcosms. *J Appl Phycol* 9:215-27
- Perrein-Ettajani H, Amiard JC, Haure J, Renaud C (1999) Effects of metals (Ag, Cd, Cu) on the biochemical composition and compartmentalization of these metals in two microalgae *Skeletonema costatum* and *Tetraselmis suecica*. *Can J Fish Aquat Sci* 56:1757-65
- Peterson CG (1996) Mechanisms of lotic microalgal colonization following space-clearing disturbances acting at different spatial scales. *Oikos* 77:417-35
- Pistocchi R, Guerrini F, Balboni V, Boni L (1997) Copper toxicity and carbohydrate production in the microalgae *Cylindrotheca fusiformis* and *Gymnodinium* sp. *Eur J Phycol* 32:125-32



- Prygiel J, Coste M, Bukowska J (1999) Review of the major diatom-based techniques for the quality assessment of rivers - State of the art in Europe. In Prygiel J, Whitton BA, Bukowska J (ed) Use of algae for monitoring rivers III. Agence de l'Eau Artois Picardie, Douai, p 224-38
- Rijstenbil JW, Gerringa LJA (2002) Interactions of algal ligands, metal complexation and availability, and cell responses of the diatom *Ditylum brightwellii* with a gradual increase in copper. *Aquat Toxicol* 56:115-31
- Rott, E (1991) Methodological aspects and perspectives in the use of periphyton for monitoring and protecting rivers. In Whitton BA, Rott E, Friedrich G (ed) Use of algae for monitoring rivers. Institut für Botanik, Universität Innsbruck, Düsseldorf Germany, p 9-16
- Round FE, Crawford RM, Mann DG (1990) The Diatoms. Biology, and morphology of the genera. Cambridge Univ Press (ed)
- Ruggiu D, Luglie A, Cattaneo A, Panzani P (1998) Paleoecological evidence for diatom response to metal pollution in Lake Orta (N. Italy). *J Paleolimnol* 20:333-45
- Say PJ (1978) Le Riou-Mort, affluent du Lot pollué par les métaux. I. Etude préliminaire de la chimie et des algues benthiques. *Annls Limnol (Int J Limnol)* 14:113-31
- Shehata SA, Lasheen MR, Kobbia IA, Ali GH (1999) Toxic effect of certain metals mixture on some physiological and morphological characteristics of freshwater algae. *Water Air Soil Pollut* 110:119-35
- Steinberg C, Schiefele S (1988) Biological indication of trophy and pollution of running waters. *Z Wasser – Abwasser – Forsch* 21:227-34
- Stevenson RJ, Peterson CG (1991) Emigration and immigration can be important determinants of benthic diatom assemblages in streams. *Freshwat Biol* 26:279-94
- Sunda WG, Huntsman SA (1998) Control of Cd concentrations in a coastal diatom by interactions among free ionic Cd, Zn, and Mn in seawater. *Environ Sci Technol* 32:2961-8
- Szabó K, Kiss KT, Taba G, Ács É (2005) Epiphytic diatoms of the Tisza River, Kisköre Reservoir and some oxbows of the Tisza River after the cyanide and heavy metal pollution in 2000. *Acta Bot Croat* 64:1-46
- Takamura N, Kasai F, Watanabe MM (1989) Effects of Cu, Cd and Zn on photosynthesis of freshwater benthic algae. *J Appl Phycol* 1:39-52
- Teissier S, Torre M (2002) Simultaneous assessment of nitrification and denitrification on freshwater epilithic biofilms by acetylene block method. *Water Res* 36:3803-11
- Teitzel GM, Parsek MR (2003) Heavy metal resistance of biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* 69:2313-20

- Thomas WH, Hollibaugh JT, Seibert DLR (1980) Effects of heavy metals on the morphology of some marine phytoplankton. *Phycologia* 19:202-9
- Torres M, Goldberg J, Jensen TE (1998) Heavy metal uptake by polyphosphate bodies in living and killed cells of *Plectonema boryanum* (Cyanophyceae). *Microbios* 96:141-7
- van Dam H, Mertens A, Sinkeldam J (1994) A coded checklist and ecological indicator values of freshwater diatoms from the Netherlands. *Neth J Aquat Ecol* 28:117-33
- Wang WX, Dei RCH (2001) Metal uptake in a coastal diatom influenced by major nutrients (N, P, and Si). *Water Res* 35:315-21
- Wong PTS (1987) Toxicity of cadmium to freshwater microorganisms, phytoplankton, and invertebrates. In Nriagu JO, Sprague JB (ed) *Cadmium in the aquatic environment*. Wiley, New York
- Yang JR, Duthie HC (1993) Morphology and ultrastructure of teratological forms of the diatoms *Stephanodiscus niagarae* and *S. parvus* (Bacillariophyceae) from Hamilton Harbor (Lake-Ontario, Canada). *Hydrobiologia* 269:57-66

**C – INFLUENCE DE LA MATRICE ORGANIQUE SUR L'ACCUMULATION DU CADMIUM DANS LES ORGANISMES ET L'EXPRESSION DE SA TOXICITE EN DOSES SUBLETALES.**

---

**Toxicity and bioaccumulation of cadmium in freshwater diatoms in relation to biofilm matrix : a microcosm study <sup>1</sup>**

Thi Thuy DUONG <sup>1,2,3</sup>, Olivier HERLORY <sup>3</sup>, Agnès FEURTET-MAZEL <sup>3</sup>, Alain BOUDOU <sup>3</sup>

and

Soizic MORIN <sup>2</sup>, Michel COSTE <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Environmental Technology, Vietnam Academy of Science and Technology, 18 Hoang Quoc Viet, Cau Giay Hanoi, Vietnam.

<sup>2</sup> Cemagref U.R Réseaux Epuration et Qualité des Eaux, 50 av de Verdun, – 33610 Cestas France.

<sup>3</sup> UMR 5805 « Environnements et Paléoenvironnements Océaniques », Université Bordeaux 1- CNRS, Place du Docteur Peyneau 33120 Arcachon, France.

**Abstract**

A study was undertaken to examine cadmium accumulation on freshwater biofilm and effects of cadmium on biofilm development as well as on diatom community structure within biofilm. A natural biofilm sampled from the Riou-Mort River (South West France) was allowed to develop on clean substrates on three artificial stream systems in laboratory. Young and mature biofilms were exposed to a Cd concentration of 100 µg. L<sup>-1</sup>. Metal accumulation (total metal content and intracellular metal content in the biofilm), dry weight and ash-free dry mass of biofilms, diatom density and diatom composition were analyzed. Both total and intracellular Cd accumulated by the biofilm throughout the experiment increased with duration of metal exposure. Lower Cd content was found in mature biofilm. The Cd exposure that had inhibited dry weigh and biomass of biofilm as well as diatom density was more evident in young biofilm than in mature biofilm. Diatom communities in young biofilm exposed to Cd increased their tolerance to Cd by significant development of tolerant *Nitzschia palea* species. In contrast, Cd had less effect on biofilm and diatom communities within in biofilm. Taxonomic composition of diatom communities in mature biofilm after Cd exposure did not significant differed from those before Cd contamination. These results indicate role of protective layer may limit Cd accumulation into biofilm and protect biofilm itself and diatom communities from the effects of metals.

---

<sup>1</sup> Article en préparation

## Introduction

Diatoms have been used commonly as indicators of a variety of environmental conditions (Dixit et al., 1992) because of their high diversity, sensitivity to changes in water quality and their fundamental role in food web (Stevenson and Pan, 1999). By investigating diatoms in polluted rivers, it has been found that diatoms can be used as the bioindicators of several type of pollution such as eutrophication (Kelly, 1998; Kelly, 2003), organic pollution (Sládecek, 1984; Watanabe et al., 1986; Descy and Coste, 1996; Rott et al., 1998), metallic pollution (Gold et al., 2003; Lai et al., 2003; Cunningham et al., 2005; Morin et al., 2006). The relationship between diatom composition and the level of chemical contamination of water quality have been subject to extensive monitoring studies for several years (Say and Whitton, 1980; Foster, 1982; Medley and Clements, 1998; Sabater, 2000). It has long been recognized that metal contamination can be toxic to diatoms. *In situ* studies conducted at sites exhibiting high level of metal and microcosm experiments have demonstrated that metals caused decrease in productivity, diversity and changes in species composition of diatom communities (Takamura et al., 1989; Hill et al., 1997; Sabater, 2000). Trace metals have also been shown to decrease photosynthetic rate, and the uptake of various nutrients ions. Changes in morphology and increase in cell size are the gross manifestations of elevated concentration of metals (Fisher et al, 1981; McFarland et al., 1997; Dickman, 1998; Cattaneo et al., 2004; Morin et al., 2006). Diatom communities are subjected to multiple anthropogenic inputs into aquatic environment through wastewater disposal as well as natural disturbance such as flood, temperature changes. The large number factors such as temperature, light (Patrick, 1971; Hill et al., 1995), current velocity (Ghosh and Gaur, 1998; Stevenson, 1996; Abe et al., 2000), nutrient availability (Rosemond et al., 2000), dissolved chemical, organic or inorganic substance (Genter, 1996; Hoagland et al., 1996) are known to contribute on structural characteristics of diatom communities during its development. In aquatic systems, the interaction between these factors often occur leading to difficulties in interpretation the effects of a separate factor on structure and function of diatom communities.

On the other hand, on hard substrates in aquatic system, a succession of organisms often occurs, beginning with the development of an organic matrix and bacteria followed by a transition from small adnate diatoms and then by other algae, this organisms are associated in a mucopolysaccharide matrix, forming biofilm (Stevenson et al., 1996). Periphytic biofilm may achieve a high structural complexity with a complex function (Sekar et al., 2002) and can form a protective layer thereby reducing the exposure solid surface to the external environment and

decreasing toxicity of contaminants (Ivorra et al., 2000; Gold et al., 2003). Periphytic biofilms have a remarkable ability accumulate heavy metal and other contaminants from their environment (Newman et al., 1985; Clement, 1991; Ramelow et al., 1992, Berha et al., 2002; Holding et al., 2003). Accumulation of contaminants can be toxic to biofilms themselves, leading to decreased primary production and altered community composition (Sabater, 2000) and they can be toxic to other consumers in food web. Laboratorial experiment was performed aiming to examine cadmium accumulation in freshwater biofilm and effects of cadmium exposure to biofilm as well as structure of diatom communities. The role of protective layer in the response of diatom communities to cadmium and metal accumulation is discussed.

## **Materials and methods**

### *Field sampling*

The Riou-Mort stream, a small tributary of the Lot River in the industrial basin of Decazeville (South West France, 44°N / 2°E) is carrying seepage from its confluence with the Riou-Viou stream which origin from a former zinc factory, presenting high level of metals (Audry et al., 2004, Morin et al., 2006). Periphytic biofilm were obtained from the Riou-Mort stream, at a Decazeville site located about 1 kilometer upstream from the junction with the Riou-Viou stream (Figure 1).

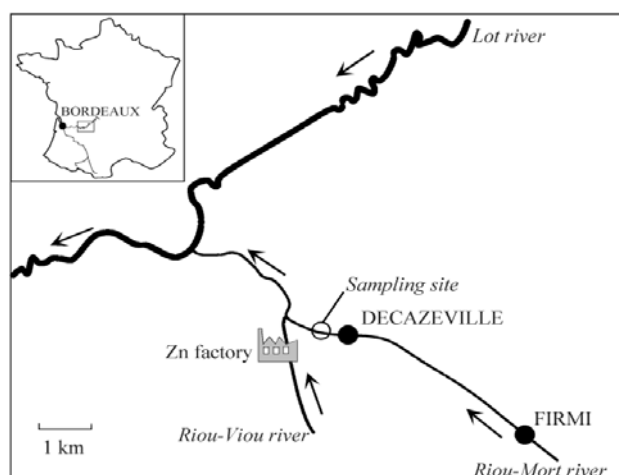


Figure 1: Location of the Riou-Mort stream, South West France, and stream sampling site.

The site was characterized by low metal concentrations and high nutrients (Morin et al., 2006). Plastic racks equipped with floaters, containing 6 separate and vertical glass substrates (6 x 15 cm, 300 cm<sup>2</sup> surface for both side), as artificial substrates for algal attachment, were immersed in the stream, parallel to the current, at a depth of 15 - 20 cm below the surface, and tied to the bank with a rope. The sampling was carried out in spring and glass substrates were left in the stream to allow periphyton's growth for five weeks prior to sampling. On the day of sampling, the racks were removed from the stream and biofilms colonized on glass substrates were scraped with a blade then rinsed and diluted to a volume of 2L with distilled water. This periphyton suspension was transferred into polyethylene bottle and transported to laboratory in a cool box (4°C).

### *Laboratory experiment*

#### *Aquaria system*

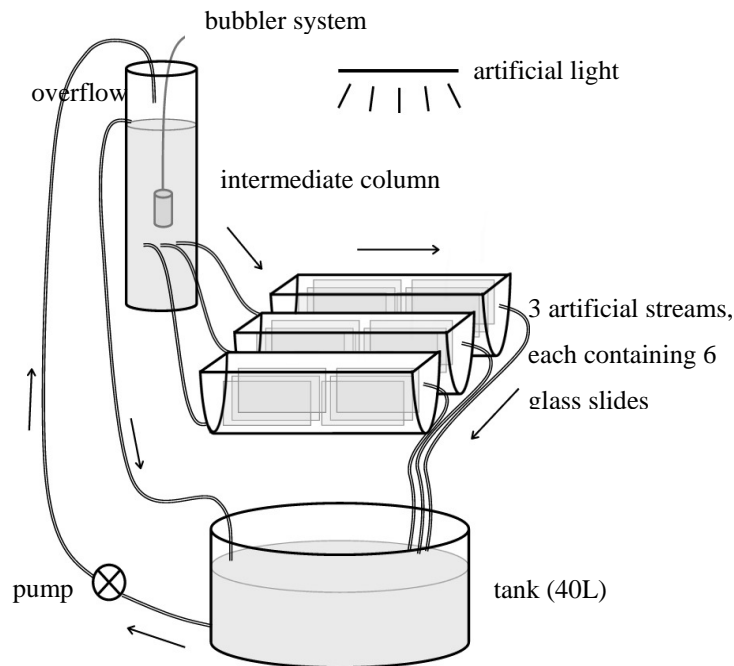


Figure 2: Schematic representation of 1 experimental system consisting in three artificial streams, each containing 6 glass bare substrates. Arrows indicate flow direction.

The set up was designed to allow the exposure of natural periphytic communities to cadmium under stable conditions. The effects of cadmium on biofilm and structure of diatom communities and metal accumulation in periphytic biofilm were investigated using of three artificial stream systems. Each system consisting of three small artificial stream systems (6L volume each) correspond to three replicates connected in parallel to a tank (Figure 2). An external pump allowed consecutive circulation of water through each system at velocity of 0.4 cm/s. Artificial stream systems were formed by using PVC tube (60 cm length and 6cm radius), each containing six clean glass substrates (150cm<sup>2</sup>) for periphyton colonization. The glass substrates were placed vertical, side by side in to three small artificial stream systems, parallel to the current about 0.5 cm below water surface, at a light intensity of approximately 70μmol.s<sup>-1</sup>.m<sup>2</sup> (10h light : 14h dark regime) in a thermo-regulate room at a temperature of about 15°C. The natural biofilm sample collected in the field was divided into three equal fractions; each fraction was introduced and incubated in each artificial stream system. Biofilms were incubated by supply 40L modified of Woods Hole culture medium (WC). This medium was kept without ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (Gold et al., 2003b). Before the start of the experiment, the systems were equilibrated overnight, then the experimental concentrations of cadmium had been added. During the experimental course, pH, temperature, conductivity and dissolved oxygen concentration on the water column of each experimental system were determined daily at the end of the light cycle. Nutrient concentrations (phosphates, nitrate, and silica) sampled at each system were measured weekly at laboratory according to French and international standards (NF T90-023 and NF EN ISO 13395, respectively). Depending on the results of the analyses, additions of culture medium were realized to compensate for the decrease of nutrient concentrations relative to algal uptake.

### *Cadmium exposure*

To examine the effects of Cd exposure on young and mature periphytic biofilms, contamination of water column of experimental systems were followed: (i) EU<sub>1</sub> was left free of cadmium concentration (reference); (ii) EU<sub>2</sub> was contaminated with Cd concentration of 100 μg.L<sup>-1</sup> during six weeks and the Cd contamination was performed simultaneously with introduction of natural biofilm into artificial stream system; (iii) EU<sub>3</sub> was left uncontaminated during the first two weeks of experiment to allow development of reference periphyton on substrates and then contaminated with Cd concentration of 100 μg.L<sup>-1</sup> during four weeks.

Cadmium chloride ( $\text{CdCl}_2$ ) 10 mg.  $\text{L}^{-1}$  (Merck, Darmstadt, Germany) as stock solution was used to add in the system experiment, in order to obtain a final nominal concentration of 100  $\mu\text{g}.\text{L}^{-1}$ . Cadmium concentration was measured daily during the first and the second week of contamination and twice per week during the rest of experiment period. During the course of the experiment cadmium was added into each system to maintain a relatively stable of cadmium concentration close to the nominal level.

### *Periphyton sampling*

After a colonization period, glass substrates colonized by periphyton from EU1, EU2 and EU3 were randomly removed at the weeks 1, 2, 4 and 6 (after 1, 2, 4 and 6 weeks of colonisation and contamination for EU2; after 1, 2, 4 and 6 weeks of colonisation, corresponding to two and four weeks of contamination for EU3). After each time of sample, the artificial stream systems were reset by new glass substrate to maintain identical flow conditions. Periphytons were scraped by using a blade washed and then diluted in 100 mL with distilled water. The obtained periphyton samples then divided into five fractions for various analyses. The first fraction (5 mL) was preserved with formalin solution (Formaldehyde 37%, Prolabo, France) for diatom identification. The second fraction (20 mL) was filtered through a GF/C filter using an aspiration pump for chlorophyll a measurement (French standard NF T 90 – 117). The third fraction (20 mL) was used for AFDM (ash free dry mass) analyses following European standard NF EN 872. After drying and weighing, sample was ashed at 500  $^{\circ}\text{C}$  for one hour in a muffle furnace (Solax Technology Ltd, China). The result was expressed as mg AFDM.  $\text{cm}^2$ . To measure intracellular metal (non-exchangeable) content in periphyton, the fourth fraction (20 mL) of sample was washed with EDTA (ethylenediaminetetra-acetic acid) 4mM at pH = 8 for 10 minute to remove cadmium absorbed onto the surface of algal cells and most of inorganic complexes embedded in the periphyton. The remaining of periphyton sample (20 mL) was used to determine total amount of metal accumulated in periphyton (Behra et al., 2002; Meylan et al., 2004). Each sample (no washing or washing with EDTA) was filtered with an aspiration pump through a tared metal free paper (0.45  $\mu\text{m}$  membrane, Millipore) to obtain the dry weight after 60  $^{\circ}\text{C}$  for 48 hours in incubation tube.



*Cd determination*

Cd concentrations in water samples were made three replicates, filtered (0.20 µm Millex<sup>®</sup> Millipore) and were mineralized with nitric acid (HNO<sub>3</sub> 2%) before measurements. Dried periphyton samples were first digested with nitric acid (3 mL HNO<sub>3</sub>, Merck, Darmstadt, Germany) in a pressurized medium at 100° C for 3 hours (hot block CAL 3300). The digestates were diluted with 20 mL ultra pure water (Milli Q, Bedford, MA, USA). Cd concentrations in periphyton and filtered water samples were measured by atomic absorption spectrophotometry (Varian AA 400) equipped with a model GTA graphic tube atomizer and auto-samples. 10 µL of sub-periphyton and sub-filtered water samples were taken and mixed before atomization with 4 µL of palladium - Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> mixture. The detection limit was 0.1 µL Cd.L<sup>-1</sup> (LD: mean + 3 SD of 10 reagent blanks). The validity of the method was checked periodically with certified biological reference materials (Tort 2 – lobster hepatopancreas and Dolt 2: dogfish liver from NRCC – CNRC, Ottawa, Canada); values were consistently within the certified ranges (data not shown).

*Analysis of diatom communities*

Diatom densities in formalin-preserved sample (100µL) were estimated using Nageotte counting chamber (Marienfeld, Germany), by counting the total number of diatoms in 30 fields (1.25 µL each, 0.5m depth), using light microscope (Olympus BX 50) at 200x magnification. Data are reported as cells per unit area of artificial substrate (cells /cm<sup>2</sup>). For identification to the species level, the diatom valves were cleaned with hydrogen peroxide (30 %) and hydrochloric acid (35 %) to remove organic material and dissolve calcium carbonates. Cleaned frustules were mounted in a microscope glass slide in a high refractive index medium (Brunel Microscope Ltd, UK; RI = 1.74). A minimum 400 diatom valves were identified and counted in each slide by using a Leitz DMRD light microscope at 1000 X magnification. The flora of Krammer & Lange – Bertalot (1986-1991) were used as reference for identification. Relative abundance of the species (percentage of the total abundance) and the species richness were estimated and diversity was calculated using the Shannon-Weaver index ( $H'$ ) (Shannon and Weaver, 1949).

### *Data treatment*

Differences in dry weight (DW), AFDM, diatom density and Cd accumulation in biofilm between experimental system, colonization time and Cd contamination duration were analyzed using one-way ANOVA after testing normality and homogeneity of variance. *Post hoc* Tukey tests were applied to get statistical significance of differences. One-way ANOVA were performed using STATISTICA software (version 5.1, StatSoft Inc., 1984-1998). Hierarchical cluster analysis based on relative abundances of the most occurring species (relative abundance > 1%) using PC-ORD software (McCune et Mefford 1999) was apply to find groups of samples or experimental system are more similar to each other.

## **Results**

### *Physicochemical characteristics of the water column*

Physical and chemical parameters measured in the artificial systems are shown in Table 1. During the experiment period, the pH varied little among three artificial systems. An increase in pH was measured in each system ranging from 7 at the beginning and 7.9 at the end of the experiment. Water temperature ranged from 17.4 to 19.1°C and dissolved oxygen ranged from 8.2 to 9.2 mg. L<sup>-1</sup>. Both water temperature and dissolved oxygen in three systems were similar and rather constant during the course of experiment ( $18.6 \pm 0.2^\circ\text{C}$  and  $8.7 \pm 0.1 \text{ mg. L}^{-1}$  for EU1;  $18 \pm 0.3^\circ\text{C}$  and  $8.4 \pm 0.2 \text{ mg. L}^{-1}$  for EU2 and  $18.7 \pm 0.1^\circ\text{C}$  and  $8.7 \pm 0.1 \text{ mg. L}^{-1}$  for EU3). The mean conductivity gradually increased in all systems from 143 to 202  $\mu\text{S/cm}$  in EU1, from 135 to 181  $\mu\text{S/cm}$  in EU2 and 145 to 200  $\mu\text{S/cm}$  in EU3. In all systems at the beginning of the experiment ( $W_0$ ), phosphate and nitrate concentrations were around 2.9 mg.L<sup>-1</sup>; 33 mg.L<sup>-1</sup> respectively. Concentrations of phosphate and nitrate gradually decreased in all systems. Continuous addition of culture medium resulted in restoration of the initial concentrations of phosphate and nitrate in EU2 and EU3 at the end of week 3 and week 5, however, at EU1 a continuous decrease was observed. Silica concentrations decreased in three systems also but sharp decline was found in EU1 and EU3 (before Cd exposure). From frequent measurement of Cd concentrations, actual Cd concentrations varied at the first week of contamination and then were appropriate with the nominal concentration. The actual concentrations of cadmium in EU1 were below 0.1  $\mu\text{g/L}$  and the average cadmium concentrations in the EU2 and EU3 were  $96.1 \pm 7 \mu\text{g/L}$  and  $91 \pm 6 \mu\text{g.L}^{-1}$  respectively.

Table 1: Physicochemical parameters and nutrient concentrations measured during the 6-week experimental period in the water column of the 3 experimental systems (d.l.: detection limit: 0.1µgCd/L). EU1 (Reference); EU2 (Cd contaminated during 6 weeks; [Cd] = 100µg.L<sup>-1</sup>) and EU3 (non Cd contaminated during the first two week and Cd contaminated during 4 weeks; [Cd] = 100µg.L<sup>-1</sup>).

Parameters	Reference (EU1)					Contaminated (EU2)					Contaminated (EU3)				
	W <sub>0</sub>	W <sub>1</sub>	W <sub>2</sub>	W <sub>4</sub>	W <sub>6</sub>	W <sub>0</sub>	W <sub>1</sub>	W <sub>2</sub>	W <sub>4</sub>	W <sub>6</sub>	W <sub>0</sub>	W <sub>1</sub>	W <sub>2</sub>	W <sub>4</sub>	W <sub>6</sub>
pH	7.1	7.4	7.3	7.7	7.9	7	7.4	7.2	7.8	7.4	7	7.4	7.3	7.7	7.6
Temp (°C)	18	18	19	19	19	18	18	18	17	18	18	19	19	19	19
O <sub>2</sub> (mg.L <sup>-1</sup> )	8.5	8.7	8.5	9.2	8.8	8.3	8.3	8.2	9.2	8.2	8.5	8.7	8.5	9.3	8.6
Conductivity (µS/cm)	143	153	163	183	202	135	139	155	181	181	145	149	159	179	200
P-PO <sub>4</sub> (mg.L <sup>-1</sup> )	2.9	2.5	2.3	1.7	0.9	2.9	2.4	2.2	1.9	2.2	2.9	2.4	2.2	1.9	2.2
N-NO <sub>3</sub> (mg.L <sup>-1</sup> )	33	27	25	22	19	32	27	28	31	37	32	26	26	29	33
SiO <sub>2</sub> (mg.L <sup>-1</sup> )	3	1	0.5	1	0.5	2.5	2	2	1	2.5	2.5	1.5	0.5	1	2.5
Dissolved Cd (mg.L <sup>-1</sup> )	<dl	<dl	<dl	<dl	<dl	70	106	92	101	110	<dl	<dl	78	99	97

### ***Cd accumulation***

Cd absorbed to abiotic or biotic material and intracellular (non-exchangeable) were obtained by measuring Cd content in non-washed biofilm or washed biofilm with EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), a strong metal complexing ligand. Both total and non-exchangeable Cd accumulated by biofilms (per unit dry weight, DW) are presented in figure 3a and b. In all case, there was a trend that Cd accumulation in biofilms increased with time exposure. The non-exchangeable Cd was lower than the measurement of total Cd content in biofilm. Measurement of Cd in biofilm of the reference system (EU1) was low and around  $3.7 \pm 0.8 \mu\text{g/g DW}$  for total Cd and  $0.57 \pm 0.1 \mu\text{g/g DW}$  for non-exchangeable Cd. In EU2 system, average values of total Cd and non-exchangeable Cd were around  $2935 \pm 472 \mu\text{g/g DW}$  and  $1026 \pm 394 \mu\text{g/g DW}$  respectively and the highest values of Cd accumulation were observed at week 4 (after 4 weeks of Cd exposure). EU3 system had a similar Cd content in biofilm to those determined in reference system (EU1) at the week 1 and week 2 (before Cd exposure). However, Cd addition led to a significantly higher Cd at the week 4 and week 6 than those in the biofilm of EU1 system ( $p < 0.05$ ). Cd accumulation by different stage development of biofilm varied significantly (Figure 3 a and b). After 2 and 4 weeks of Cd exposure, total Cd content in young biofilm of EU2 system was significant higher compared with Cd accumulated

in mature biofilm of EU3 ( $p < 0.05$ ). For non-exchangeable Cd content in biofilm, a similar trend was recorded, although, a slight but non-significant elevation of Cd content in biofilm of EU2 system to EU3 system after 2 weeks of Cd exposure.

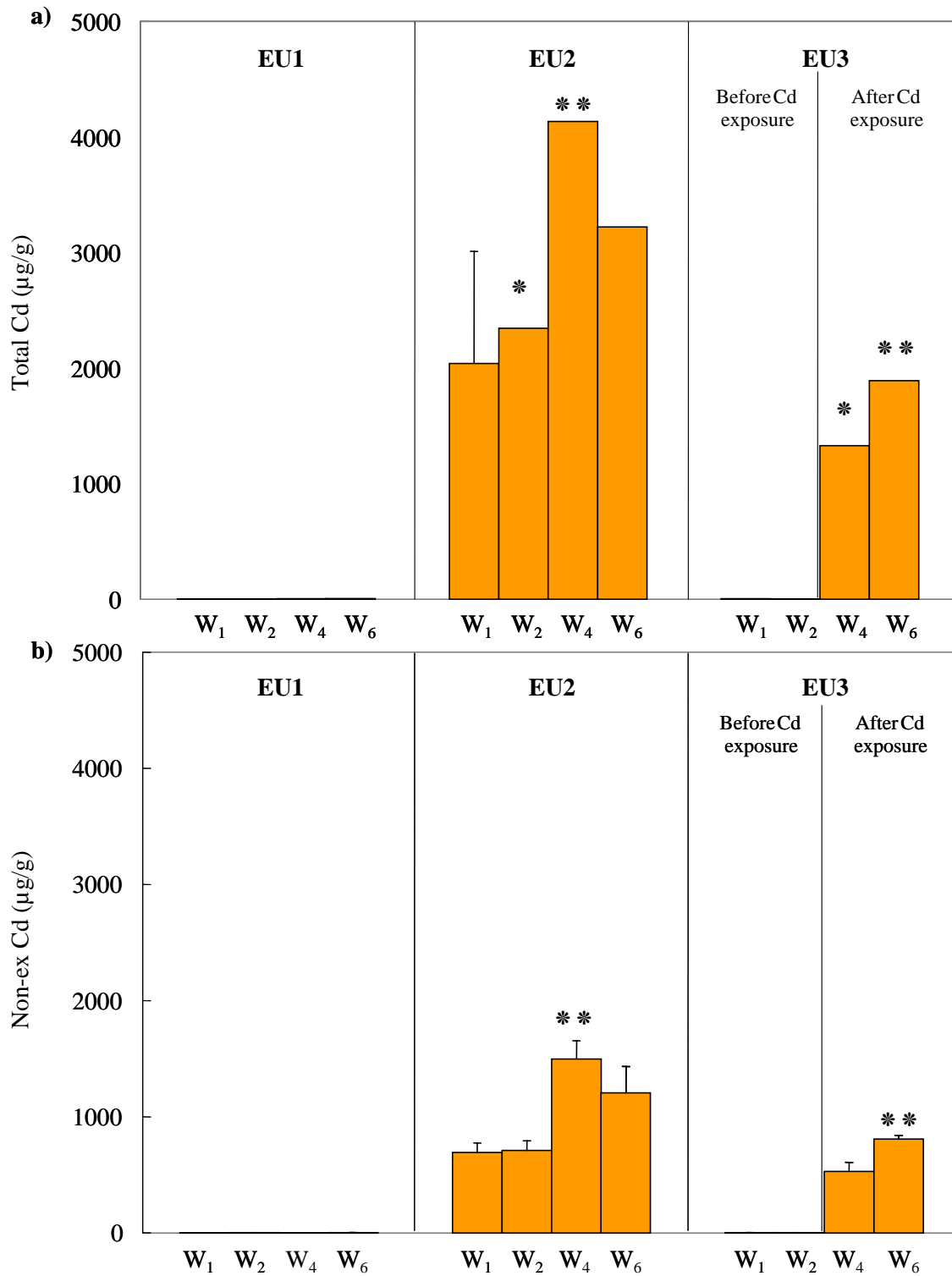


Figure 3: Total Cd content of biofilm (a) and intracellular Cd content of biofilm (b) in the experimental systems (EU1; EU2 and EU3) during 6 weeks of colonisation (mean value and  $n = 3$ ). \*:  $p < 0.05$  (significant differences after 2 weeks of Cd exposure) and \*\*:  $p < 0.05$  (significant differences after 4 weeks of Cd exposure).

**Dry weight and biomass of biofilm**

Dry weight (DW) and AFDM showed the same pattern during the experiment course (Figure 4 a and b). Average DW ranged from  $0.014 \pm 0.002 \text{ mg/cm}^2$  to  $0.08 \pm 0.003 \text{ mg/cm}^2$  in EU1 system. Lower values were found in EU2 system with mean values ranged from  $0.008 \pm 0.002 \text{ mg/cm}^2$  to  $0.0355 \pm 0.007 \text{ mg/cm}^2$ . Average DW ranged from  $0.02 \pm 0.001 \text{ mg/cm}^2$  to  $0.06 \pm 0.007 \text{ mg/cm}^2$  in EU3 system. Mean values of AFDM in EU1, EU2 and EU3 systems ranged from  $0.001 \pm 0.004 \text{ mg/cm}^2$  to  $0.056 \pm 0.0017 \text{ mg/cm}^2$ ;  $0.008 \pm 0.002 \text{ mg/cm}^2$  to  $0.032 \pm 0.002 \text{ mg/cm}^2$  and  $0.013 \pm 0.005 \text{ mg/cm}^2$  to  $0.04 \pm 0.005 \text{ mg/cm}^2$  respectively. DW and AFDM in EU1 increased following a linear model.

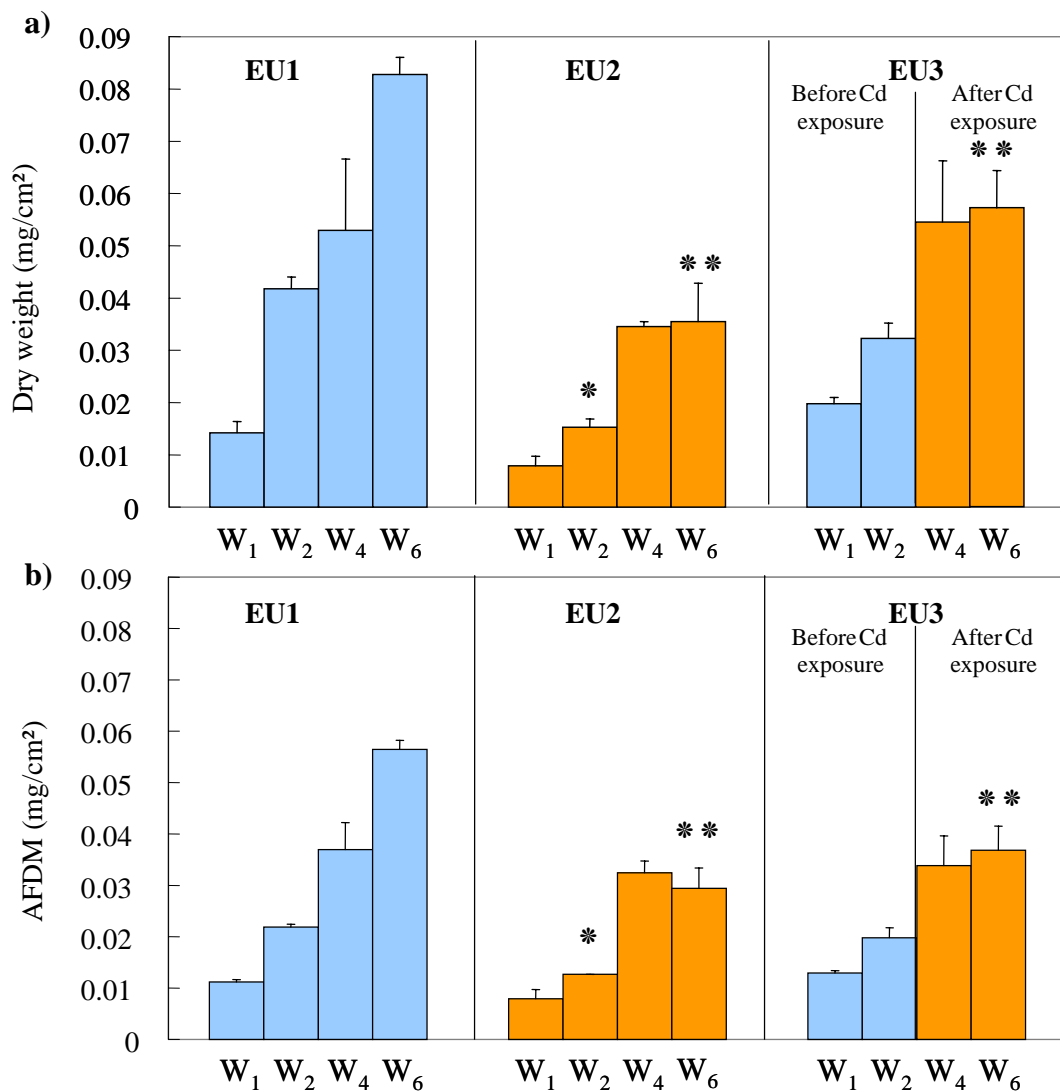


Figure 4: Dry weight (a) and ash free dry mass (AFDM) (b) of biofilm in the experimental systems (EU1; EU2 and EU3) during 6 weeks of colonisation (mean value and n = 3). \*: significant difference ( $p < 0.05$ ) with EU1 at week 2 and \*\*: significant difference ( $p < 0.05$ ) with EU1 at week 6.

On the other hand, EU2 and EU3 systems showed a similar increase in DW and AFDM from week 1 to week 2 but it was stable at week 4 and week 6. After 2 week of colonization, DW and AFDM were significantly higher in EU1 and EU3 (before Cd exposure) than in EU2 system. However, after 2 weeks of Cd exposure, DW and AFDM in EU3 system did not significantly differ from EU1 system (week 4). At the end of experiment, the mean values of DW and AFDM in EU1 were significant higher than those measured in EU2 and EU3 systems at week 6 ( $p < 0.05$ ). There was no difference between AFDM of EU2 and EU3 systems after 4 and 6 weeks of colonization.

*Quantitative and qualitative of diatom assemblages*

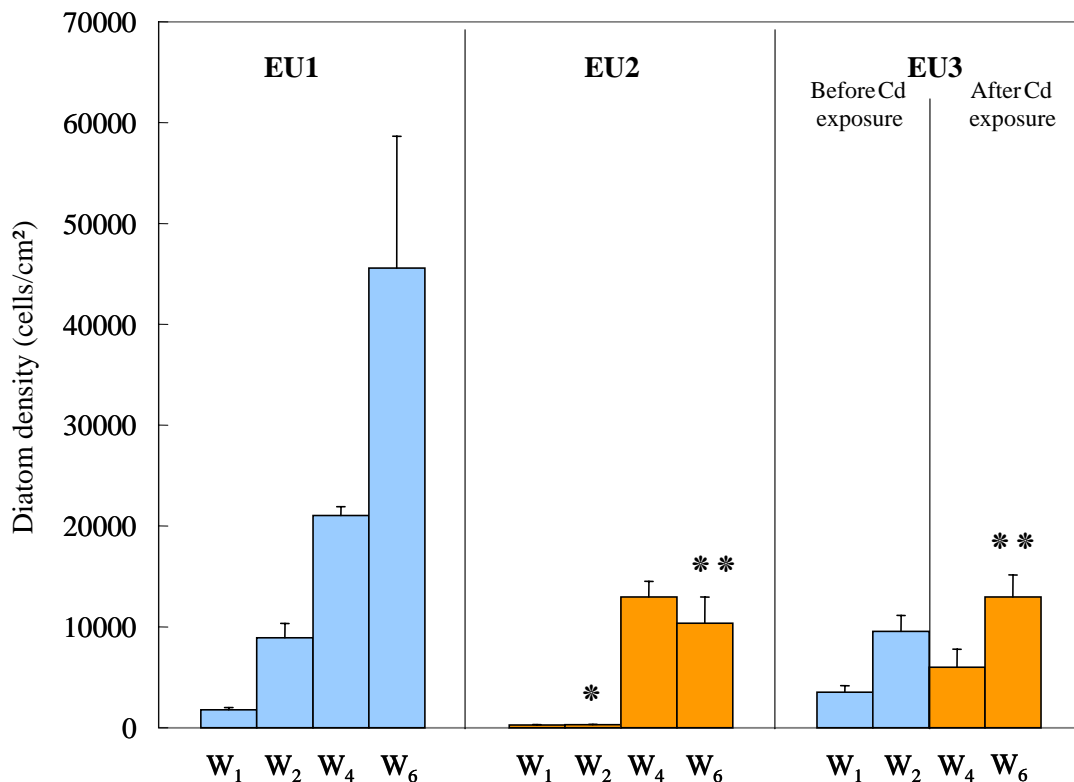


Figure 5: Diatom density (mean value and  $n = 3$ ) developed on glass substrates in three artificial systems ((EU1; EU2 and EU3) during period of Cd contamination). \*: significant difference ( $p < 0.05$ ) with EU1 at week 2 and \*\*: significant difference ( $p < 0.05$ ) with EU1 at week 6.

Diatom density colonised on substrates was one of the variables used to describe the response of diatom communities to Cd contamination (Figure 5). Glass substrates in EU1 and EU3 systems (before Cd exposure) were covered by a thin layer on the first week and then became denser with appearance of patchy colonies on the second week. Diatom density did not differ significantly between EU1 and EU3 system and ranged from  $1776 \pm 216$  cells.cm<sup>-2</sup> (W<sub>1</sub>) to

8914 ± 1432 (W<sub>2</sub>) and from 3522 ± 652 cells.cm<sup>-2</sup> (W<sub>1</sub>) to 9568 ± 1575 cells.cm<sup>-2</sup> (W<sub>2</sub>) respectively. Afterward, diatom density in EU1 system increased significantly and reached maximum values at the end the experiment (45,589 ± 13,073 cells.cm<sup>-2</sup>). In contrast, Cd contamination in EU3 system led to a slight decrease in diatom density at the week 4 (6005 ± 1768 cells.cm<sup>-2</sup>) and then densities increased on the last week of the experiment (12,968 ± 2189 cells.cm<sup>-2</sup>) but this value was always significantly lower than in EU1 system. In contaminated system (EU2), very thin layer covering on glass substrates was observed, with very low densities during the first two weeks of the experiment (around 300 ± 27 cells.cm<sup>-2</sup>). The highest mean value was recorded after 4 weeks of colonization however, it was significantly lower from those in reference system (p < 0.05). At the end of the experiment, diatom density in the EU2 system slightly decreased around 10,368 ± 2599 cells.cm<sup>-2</sup>.

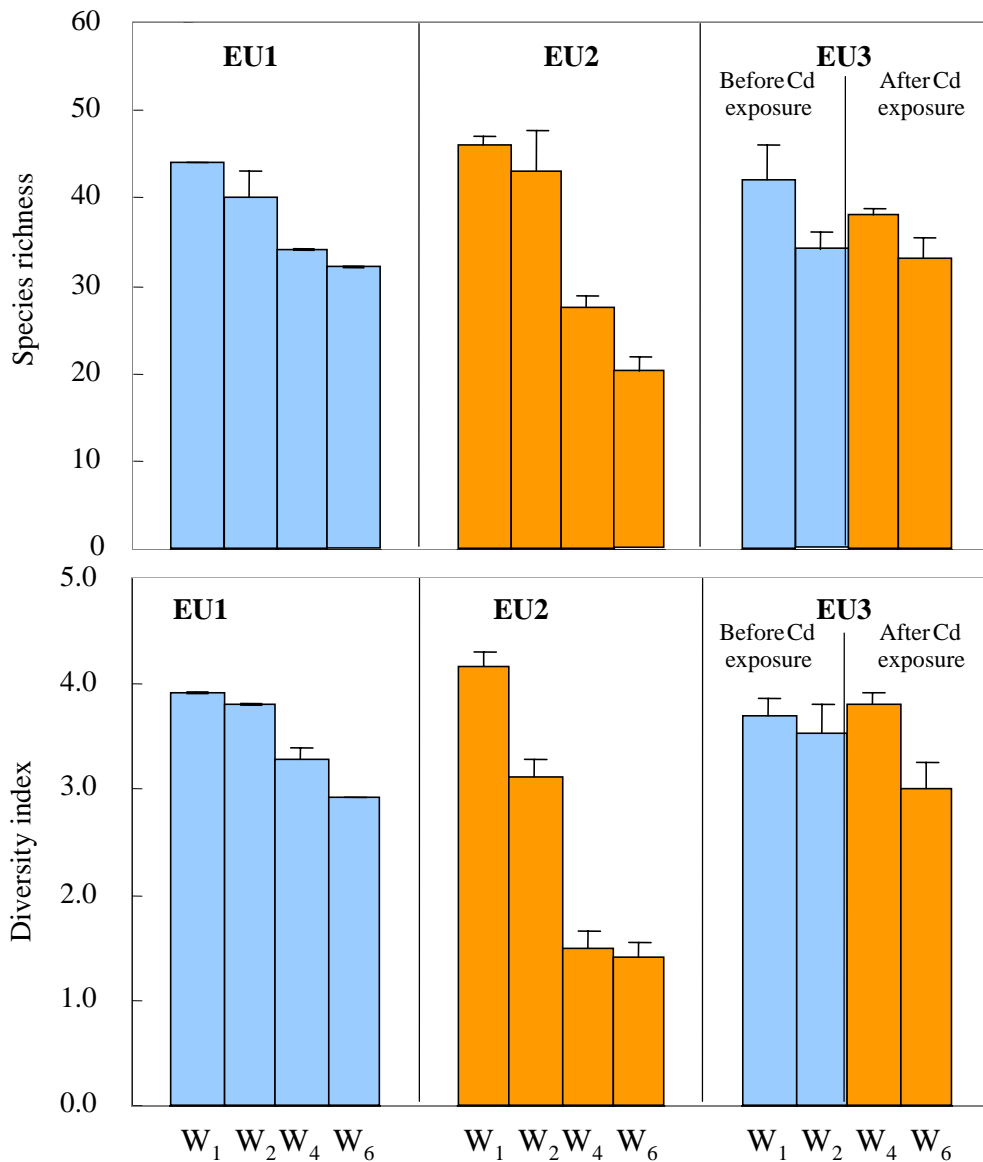


Figure 6: Mean diatom species richness and diversity index (mean value and n = 3) in EU1; EU2 and EU3 experimental systems during 6 weeks of colonization.

Global qualitative characterization of diatom was given by their species richness (S) and diversity index ( $H'$ ) (Figure 6). According to one-way ANOVA, no significant difference were observed in species richness (S) and diversity index ( $H'$ ) between three systems after 1 week of colonization, with species richness around 44 taxa and diversity of 3.9. There was a trend of decrease in both species richness and diversity index in EU1 and EU2 system till experiment ended; however, significant higher values were recorded in reference system (EU1) than those in contaminated system (EU2). On the other hand, Cd addition in EU3 system caused a slight but non-significant, increase of species richness and diversity index. These values did not differ significantly with those obtained in EU1 and before Cd contamination at week 1. Nevertheless, longer Cd exposure caused slight diminution in species richness and diversity index in week 6 (after 4 weeks of contamination).

A total of 176 diatom taxa were identified. Of these seven dominant diatom species with mean relative abundance > 9% were described as characteristic for diatom composition throughout the experiment (Figure 7). After 1 week of colonization, diatom composition in the three systems was similar with the presence of *Navicula gregaria*, *Navicula lanceolata*, *Nitzschia palea* and *Nitzschia dissipata*. Higher proportion of these species was observed in EU1 and EU3 than in EU2 system. At week 2, the dominant species and the species compositions were still similar in EU1 and EU3 (before Cd contamination) (Figure 7 and Figure 8), whereas in contaminated system (EU2) diatom species compositions were changed with a significant increase in proportion of *Nitzschia palea* species from 10 % ( $W_1$ ) to 52% ( $W_2$ ) and a decrease of *Navicula lanceolata* from 15% ( $W_1$ ) to 8% ( $W_2$ ) and *Nitzschia dissipata* from 6% ( $W_1$ ) to 2% ( $W_2$ ). After 4 and 6 weeks of colonisation, the species composition in EU1 system differed from that noted at week 1 and 2 with the proliferation of *Navicula seminulum* and the decrease of *Navicula gregaria* and *Navicula lanceolata*. For EU2 system, the long Cd exposure caused a significant increase of *Nitzschia palea* relative abundances during the last 4 weeks of experiment (from 52% at week 2 to 81% at week 4 and week 6). In EU3 system after two weeks of Cd contamination (at week 4), diatom assemblage did not differ significantly to those in week 1 and 2 (before Cd exposure), nor were they different from EU1 system (Figure 7 and 8). However, at the end of the experiment, high percentage of *Nitzschia acidoclinata* was observed although, main diatom species were still well represented with lower proportions.



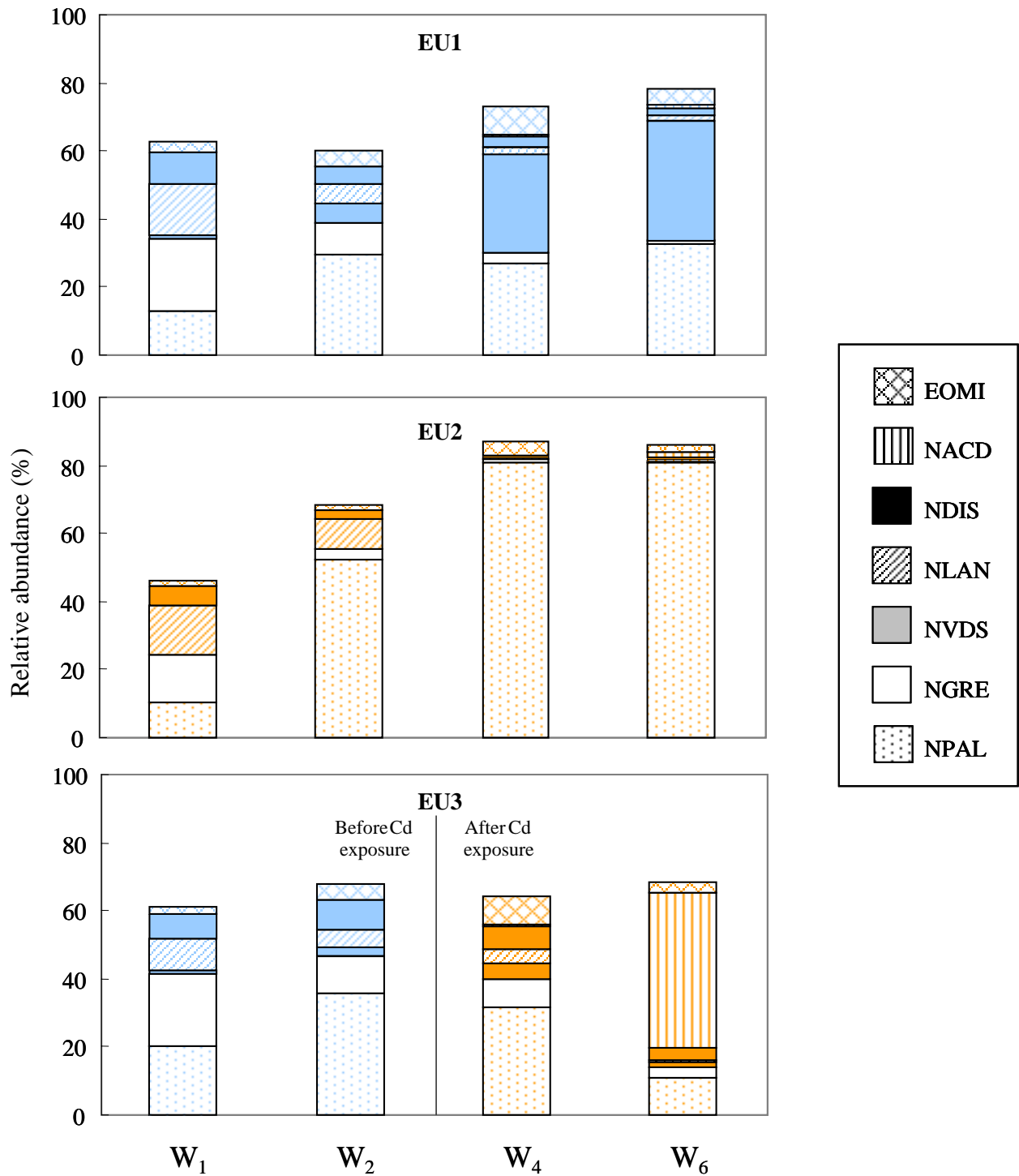


Figure 7: Relative abundance (mean value, n = 3) of the 6 major diatom species (> 9%) within diatom communities collected in the three experimental systems (EU1, EU2 and EU3) during 6 weeks of colonization.

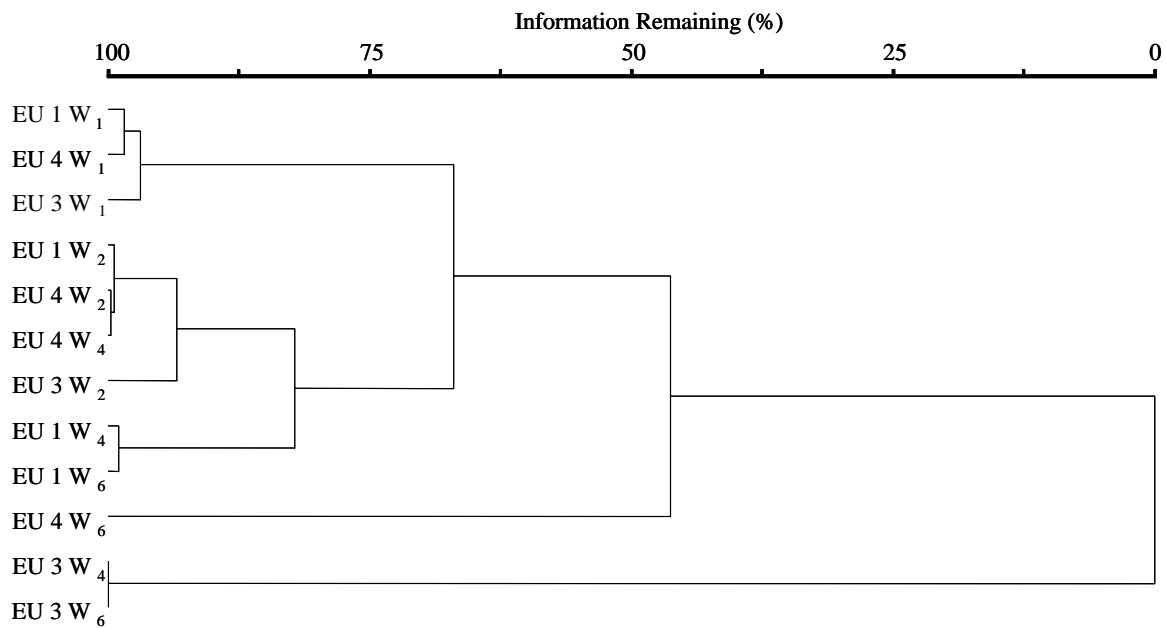


Figure 8: Dendrogram produced by Ward's method showing the similarity in taxonomic composition of diatom communities in EU1; EU2 and EU3 experimental system during 6 weeks of colonization.

In addition to changes in species composition to Cd exposure, the response of diatom communities to metal contamination is characterised by the appearance of diatom deformities. Mean values of abnormal form percentages of total diatom communities in three experimental systems are shown in table 2. Abnormal forms occurred increasingly with Cd exposure duration in EU2 system and reached from 3‰ (W<sub>1</sub>) to 33‰ (W<sub>6</sub>). In EU3 system, before Cd contamination, abnormal forms frequencies were low, around 2,8 ‰, and then (after Cd contamination) increased significantly and reached maximum values on the last week of the experiment (29 ‰). In reference system (EU1) the frequency of diatom deformities had low percentages with around 2.5 ‰ ± 0.3 from week1 to week 4, however, a slight increase in abnormal forms abundances at week 6 was observed. Among the 26 diatom species which were identified as abnormal forms, teratological forms of *Nitzschia palea* species were the most frequent in biofilm samples. On the other hand, deformities of some diatom species were observed such as *Fragilaria capucina*, *Eolimna minima*, *Fragilaria vaucheriae* and *Fragilaria gracilis*.

Table 2: Mean ( $\pm$  standard errors) abnormal form percentages ( $\%$ ) of total diatom communities in three experimental systems: EU1 (Reference); EU2 (Cd contaminated during 6 weeks;  $[\text{Cd}] = 100 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) and EU3 (non Cd contaminated during the first two week and Cd contaminated during 4 weeks;  $[\text{Cd}] = 100 \mu\text{g.L}^{-1}$ )

<b>Experiment unit</b>	<b>W<sub>1</sub></b>	<b>W<sub>2</sub></b>	<b>W<sub>4</sub></b>	<b>W<sub>6</sub></b>
Reference (EU1)	2 $\pm$ 1.1	3 $\pm$ 0.6	2.6 $\pm$ 0.6	10 $\pm$ 0.8
Contaminated (EU2)	3 $\pm$ 2.3	15 $\pm$ 2.6	9 $\pm$ 2.3	33 $\pm$ 2.8
Contaminated (EU3)	3 $\pm$ 2.4	2.3 $\pm$ 1.4	13 $\pm$ 0.6	29 $\pm$ 2.1

## Discussion

### *Role of the biofilm matrix in Cd accumulation*

Our results show that cadmium accumulation by biofilm differed between experimental systems and temporally within systems (Figure 3 a and b). In general, increases in Cd concentration in biofilm were related to time of metal exposure in the medium. In addition, both total and non-exchangeable Cd content in biofilms displayed similar pattern with duration of Cd contamination. The cadmium content in biofilm was higher in EU2 and in EU3 systems (after Cd exposure) than in reference system (EU1), demonstrating that biofilm was able to accumulate considerable amounts of cadmium (Ramelow et al., 1992; Holding et al., 2003). As shown by several authors, biofilms have large number of metal binding site located in either organic matrix (produced by algae, bacteria and fungi) at the surface of cells or in the organic particles trapped by the biofilm (Pistocchi et al., 1997; Barranguet et al., 2000; Decho, 2000; Hill et al., 2000). These substances can play an important role in the sorption of metals from water column. Metal accumulation by microalgae has been generally described as consisting of two phases: rapid sorption onto the surface cell wall (biosorptive process) and a slow active phase (Garnham et al., 1992; Torres et al., 1998; Hill et al., 2000). Therefore, the linear increase in Cd accumulation per dry weight unit (both total and non-exchangeable) occurred till week 4 (for EU2 system, after 4 week of Cd exposure) and week 6 (for EU3 system, after 4 week of Cd exposure). The increasing Cd content in biofilm simultaneous with increasing biofilm biomass underline a significant contribution of surface cells to metal sorption (Hill et al., 2000). As can be observed from Figure 3 a and b an equilibrium in Cd accumulation was reached at week 6 in EU2 system. This could be related to the saturation of the aforementioned binding sites of the biofilm leading to reduced metal absorption capacity (Garnham et al.,

1992). Similar pattern have been obtained for Cd sorption by natural biofilm (Duong et al., unpublished) or by monoculture diatom *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin (Torres et al., 1998) and other algal such as *Chorella vulgaris* (Ruangsomboon and Wongrat, 2006).

Regarding the EDTA released quantitative cadmium in figure 3 b, showing the amounts of non- exchangeable Cd in the biofilm were 35% (in EU2 system) and 41% (in EU3 system) of the total Cd content in biofilm. This result suggests that a considerable amount Cd adsorbed on the surface of cell wall of algal and bacterial within biofilm. Comparison Cd content in biofilm after 2 and 4 weeks of Cd contamination between two systems EU2 and EU3 indicate that difference in biofilm's thickness could explain the observed difference in Cd accumulation (Figure 3 a and b). Indeed, young biofilms in EU2 system had larger area exposed to Cd led to higher level of Cd content (both total and non-exchangeable) compared to lower level in mature biofilm in EU3 system. This seems to confirm that the thickness of biofilm or biofilm matrix could influence significantly metal sorption into biofilm itself. This accords with previous observation of Rose and Cushing (1970) and Ivorra et al (2000), who suggested that biofilm matrix restricted Cd and Zn penetration into deeper layer of the biofilm. Furthermore, high biofilm biomass was demonstrated by Hill et al (2000) that caused slow diffusion of Cd into deep cells in the biofilm matrix in slow current condition. This limitation has been attributed to the local pH (Ivorra et al., 2000) and the binding to algal and bacterial polysaccharide exudates (Pistocchi et al., 1997).

### ***Effects of Cd exposure on biofilm and diatom communities***

It was expected that exposure of biofilm to Cd resulted in developmental inhibition of dry weight and biomass of biofilm (Figure 4 a and b). In EU2, low dry weight and biomass were already noticed on the first two weeks of Cd exposure. Although DW and AFDM continuously increased and reached stability at the last date of the experiment but it was lower than those in reference system (EU1). Unlike response of young biofilms in EU2 system, mature biofilm's development in EU3 system was not inhibited after two weeks of Cd contamination and seemed to be resistant to Cd toxicity . It could be related probably to the protective role of the biofilm formed before Cd exposure. This hypothesis could explain the similarity observed between dry weight and biomass of biofilm in reference (EU1) and in EU3 system at week 4 (after 2 weeks of Cd exposure). However, the continuation of Cd exposure caused slow development of mature biofilm biomass. In agreement with our results, the same observations have been reported by other authors on the inhibitory effects of metals on algal growth capacity

(Prasad and Prasad, 1981; Lasheen et al., 1989; Payne and Price, 1999; Nayar et al., 2003). Furthermore, a role in the reduction of metal effects has been suggested to be related to the structure of biofilm (Admiraal et al., 1999; Barranguet et al., 2000; Guasch et al., 2003).

It has been elsewhere described that metal affects not only specific growth rate but also structure of diatom assemblage (Foster, 1982; Ivorra et al., 2000; Sabater, 2000; Gold et al., 2003). In our study, Cd caused general slow development of diatom cells in both EU2 and EU3 systems (Figure 5). Low diatom densities were reported after 2 weeks of Cd exposure in EU2. During the last four weeks following, an increase in diatom densities occurred; however, densities remained lower than the reference (EU1) after 6 weeks of colonization and communities were characterized by a proliferation of *Nitzschia palea* (Figure 7). Specific growth rate perturbation could be also observed within mature diatom communities after Cd exposure (EU3). As obtained by Gold et al. (2003), metal contamination had strong effect on the development of diatom communities. Further more, metal caused relatively reduced in rate of cell division of diatom species have demonstrate by Rivkin (1979). Inhibition of diatom growth with a few species developed in contaminated system (EU2) led to marked decrease in species richness and diversity index (Figure 6), which have been found in metal pollution rivers (Genter and Lehman, 2000; Sabater, 2000). Nevertheless, minor changes of diatom communities in EU3 system in species richness and diversity index were noticeable after Cd exposure (Figure 6), when the abundance of species before Cd exposure had still being exited (Figure 7). We can conclude that mature diatom communities is indeed protective and effects of metal to biofilm are limited by the thickness of the biofilm matrix.

Throughout the experiment, Cd exposure seems to play a role in determining Cd- tolerant communities (Figure 7). The diatom communities altered to more resistant species and excluded some sensitive species. Regarding the dynamic of diatom communities under Cd exposure in EU2 system, the significant development of *Nitzschia palea* in the whole exposed assemblage seems to provide favor and tolerance of this species to Cd contamination. This coincides with the observation of Gold et al. 2003 in low Cd contamination and those obtained at metal pollution sites in the field by Sabater (2000) as well as during high Zn level contamination experiment (Loez et al., 1995, Medley and Clements (1998). On the other hand, effects of metal stress on the composition of mature diatom assemblage in EU3 system were less visible than those in EU2 system related to role of protective layer (Ivorra et al, 2000; Gold et al., 2003). Indeed, main diatom species composition was not significantly changed even the community being exposed to Cd concentration and some species such as *Nitzschia dissipata* being indicated as sensitive to Cd still remained within the developed communities after Cd

contamination. However, longer Cd exposure could lead to some modification in composition of diatom assemblages by reducing the main species percentage and increasing the proportion of *Nitzschia acidoclinata*. The development of this species in EU3 after Cd exposure could be suggested to express Cd tolerance.

The influence of metal on diatom structure became much more evident when diatom deformities appeared within communities. In our study, we observed the increase in abnormal valves frequencies with duration time of Cd exposure in both systems EU2 and EU3 (after Cd contamination). The effects of metal stress caused morphological changes of diatom valves in our experiment, in agreement with some observations described by several authors such as McFarland et al. (1997), Dickman (1998), Gold et al. (2003) and Cattaneo et al. (2004), demonstrating that deformities of diatom valves could be good indicator in assessment of aquatic ecosystem's health. It has been suggested that abnormalities may result from impaired normal membrane function reducing silicic uptake and amino acid synthesis caused by metal (Fisher and Jones, 1981). The occurrence of some deformities valves in reference system (EU1) at the last week of the experiment was not directly concerned metal exposure could be caused by nutrient limitation (Thomas et al., 1980) in cultural medium condition. Frustules malformation, commonly found in culture (Estes and Dute 1994) and the decrease length of the frustules at each cell division may lead nevertheless to alteration of the morphological characteristic of the frustules. The abnormal forms tend to appear after a certain period in culture (Bates, 1998).

### **Acknowledgments**

The authors wish to thank Herry Bouillard and Bruno Etcheverria from GEMA for their technical assistance of the experiment system and Muriel Bonnet and Maryse Boudigues who carried out the nutrient analyses. We thank Hilary Koziol from the department of foreign language (University of Bordeaux 2) for improvements narrative style of the manuscript.

### **References**

Abe, S., Nagumo, T., Tanaka, J. 2000. Effects of current on the development of loosely and tightly attached layers in periphyton communities. *Phycological Research* 48: 261 - 265.

- Admiraal, W., Blanck, H., Buckert-de Jong, M., Guasch, H., Ivorra, N., Lehmann, V., Nystrom, B. A. H., Paulsson, M., Sabater, S. 1999. Short-term toxicity of zinc to microbenthic algae and bacteria in a metal polluted stream. *Water Research* 33: 1989 - 1996.
- Audry, S., Schäfer, J., Blanc, G., Bossy, C., Lavaux, G. 2004. Anthropogenic components of heavy metal (Cd, Zn, Cu, Pb) budgets in the Lot-Garonne fluvial system (France). *Applied Geochemistry* 19: 769 - 86.
- Bates, S. S. 1998. Ecophysiology and Metabolism of ASP Toxin Production. In: Anderson, D. M., Cembella, A. D. and Hallegraeff, G. M. (Eds). *Physiological ecology of harmful algal blooms* Springer-Verlag, Heidelberg: 405 - 426.
- Cattaneo, A., Couillard, Y., Wunsam, S., Courcelles, M. 2004. Diatom taxonomic and morphological changes as indicators of metal pollution and recovery in Lac Dufault (Québec, Canada). *Journal of Paleolimnology* 32: 163- 175.
- Decho, AW. 2000. Microbial biofilms in intertidal systems: an overview. *Continental Shelf Research*: 1257 - 1273.
- Dickman, M. D. 1998. Benthic marine diatoms deformities associated with contaminated sediments in Hong Kong. *Environment International*. 24: 749-759.
- Dixit, S. S., Smol, J. P, Kinston, J. C, Charles, D. F. 1992. Diatoms: powerful indicators of environmental change. *Environmental Science and Technology*. 26: 23 - 33.
- Estes, A., Dute, R. R. 1994. Valve abnormalities in diatom clones maintained in long-term culture. *Diatom Research* 9: 249 - 258.
- Fisher, N. S., Jones, G. J. 1981. Effects of copper and zinc on growth, morphology, and metabolism of *Asterionella japonica* (Cleve). *Journal of experimental Marine Biology and Ecology* 51: 37 - 56.
- Foster, P. L. 1982. Species associations and metal contents of algae from river polluted by heavy metals. *Freshwater Biology* 12: 17 - 39.
- Garnham, G. W., Codd, G. A., Gadd, G. M. 1992. Kinetics of uptake and intracellular location of cobalt, manganese and zinc in the estuarine green alga *Chlorella salina*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 37: 270 - 276.
- Gold, C., Feurtet-Mazel, A., Coste, M., Boudou, A. 2003 a. Impacts of Cd and Zn on the development of periphytic diatom communities in artificial streams located along a river pollution gradient. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 44: 189-197.
- Gold, C., Mazel, A. F., Coste, M., Boudou, A. 2003 b. Effects of cadmium stress on periphytic diatom communities in indoor artificial streams. *Freshwater Biology* 48: 316 - 328.

- Guasch, H., Admiraal, W., Sabater, S. 2003. Contrasting effects of organic and inorganic toxicants on freshwater periphyton. *Aquatic Toxicology* 64: 165 - 175.
- Hill, B. H., Lazorchak, J. M., McCormick, F. H., Willingham, W. T. 1997. The effects of elevated metals on benthic community metabolism in a rocky mountain stream. *Environmental Pollution* 96: 183 - 190.
- Hill, W. R., Bednarek, A. T., Larsen, L. 2000. Cadmium sorption and toxicity in autotrophic biofilms. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 57: 530 - 537.
- Hill, W. R., Ryon, M. G., Schilling, E. M. 1995. Light limitation in a stream ecosystem: responses by primary producers and consumers. *Ecology* 76: 1297 - 1309.
- Hoagland, K. D., Carder, J. P., Spawn, R. L. 1996. Effects of organic toxic substances. In: *Algal ecology of freshwater benthic ecosystem*, Aquatic Ecology Series, Stevenson, R.J., Bothwell, M.L., Lowe, R.L., (Eds.) Academic Press, Boston: 469 - 496.
- Holding, K. L., Gill, R. A., Cater, J. 2003. The relationship between epilithic periphyton (biofilm) bound metals and metals bound to sediments in freshwater systems. *Environmental Geochemistry and Health* 25: 87 - 93.
- Ivorra, N., Bremer, S., Guasch, H., Kraak, M. H. S., Admiraal, W. 2000. Differences in the sensitivity of benthic microalgae to Zn and Cd regarding biofilm development and exposure history. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19: 1332-1339.
- Kelly, M. G. 1998. Use of the trophic diatom index to monitor eutrophication in rivers. *Water Research* 32: 236 - 242.
- Kelly, M. G. 2003. Short term dynamics of diatoms in an upland stream and implications for monitoring eutrophication. *Environmental Pollution* 125: 117 - 122.
- Lai, S. D., Chen, P. C, Hsu, H. K. 2003. Benthic algae as monitor of heavy metals in various polluted rivers by energy dispersive X-ray spectrometer. *Journal of Environmental Science and Health* 38: 855 - 866.
- Lasheen, M., Shehata, S., Hali, G. 1989. Effects of cadmium, copper and chromium (VI) on the growth of Nile water algae. *Water Air and Soil Pollution* 50: 19 - 30.
- Loez, C. R., Topalián, M. L., Salibián, A. 1995. Effects of zinc on the structure and growth dynamics of a natural freshwater phytoplankton assemblage reared in the laboratory. *Environmental Pollution* 88: 275 - 281.
- McFarland, B. H., Hill, B. H., Willingham, W. T. 1997. Abnormal *Fragilaria* spp. (Bacillariophyceae) in streams impacted by mine drainage. *Journal of Freshwater Ecology* 12: 141 - 149.



- Medley, N. C., Clements, W. H. 1998. Responses of diatom communities to heavy metals in Rocky Mountain streams: the influence of longitudinal variation. *Ecological Applications* 8: 631 – 644.
- Morin, S., Vivas-Nogues, M., Duong, T. T., Boudou, A., Coste, M., Delmas, F. 2006. Dynamics of benthic diatom colonization in a cadmium/zinc-polluted river (Riou-Mort, France). *Archiv für Hydrobiologie*. (in press)
- Nayar, S., Goh, B. P. L., Chou, L. M., Reddy, S. 2003. *In situ* microcosms to study the impact of heavy metals resuspended by dredging on periphyton in a tropical estuary. *Aquatic Toxicology* 64: 293 - 306.
- Newman, M. C., Alberts, J. J., Greenhut, V. A. 1985. Geochemical factors complicating the use of aufwuchs to monitor bioaccumulation of arsenic, cadmium, chromium, copper and zinc. *Water Research* 19: 1157-1165.
- Patrick, R. 1971. The effects of increasing light and temperature on the structure of diatom communities. *Limnology Oceanography*. 16: 405 - 421.
- Payne, C. D., Price, N. M. 1999. Effects of cadmium toxicity on growth and elemental composition of marine phytoplankton. *Journal of Phycology* 35: 239 - 302.
- Pistocchi, R., Guerrini, F., Balboni, V., Boni, L. 1997. Copper toxicity and carbohydrate production in the microalgae *Cylindrotheca fusiformis* and *Gymnodinium sp.* *European Journal of Phycology*: 125 - 132.
- Prasad, P. V., Prasad, P. S. 1981. Effects of cadmium, lead and nickel on three freshwater green algae. *Water Air and Soil Pollution* 17: 263 - 268.
- Ramelow, G. J., Biven, S. L., Zhang, Y., Beck, J. N., Young, J. C., Callahan, J. D., Marcon, M. F. 1992. The identification of point sources of heavy metals in an industrially impacted waterway by periphyton and surface sediment monitoring. *Water, Air and Soil Pollution* 65: 175 - 190.
- Behra, R., Landwehrjohann, R., Vogel K., Wagner B., Sigg L. 2002. Copper and zinc content of periphyton from two rivers as a function of dissolved metal concentration. *Aquatic Sciences - Research Across Boundaries* 64: 300 - 306.
- Rivkin, R. B. 1979. Effects of lead on growth of the marine diatom *Skeletonema costatum*. *Marine Biology* 50: 239 - 247.
- Rose, F. L., Cushing, C. E. 1970. Periphyton: Autoradiography of Zn-65 adsorption. *Science* 168: 576 - 577.
- Rosemond, A. D., Mulholland, P. J., Brawley, S. H. 2000. Seasonally shifting limitation of stream periphyton: response of algal populations and assemblage biomass and productivity to

- variation in light, nutrients, and herbivores. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 57: 66 - 75.
- Rott, E., Duthie, H. C., Pipp, E. 1998. Monitoring organic pollution and eutrophication in the Grand River, Ontario, by means of diatoms. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 55: 1443 - 1453.
- Ruangsomboon S, Wongrat L. 2006. Bioaccumulation of cadmium in an experimental aquatic food chain involving phytoplankton (*Chlorella vulgaris*), zooplankton (*Moina macrocopa*), and the predatory catfish *Claria macrocephalus* x *C. gariepinus*. *Aquatic Toxicology* 78: 15 - 20.
- Sabater, S. 2000. Diatom communities as indicators of environmental stress in the Guadiamar River, S-W Spain, following a major mine tailing spill. *Journal of Applied Phycology* 12: 113–124.
- Say, P. J., Whitton, B. A. 1980. Changes in flora down a stream showing a zinc gradient. *Hydrobiologia* 76: 255 - 262.
- Shannon, C. E., Weaver W. 1949. *The mathematical theory of communication*. Univ. Illinois Press Urbana III.
- Stevenson, R. J. 1996. The stimulation and drag of current. In *Algal ecology of freshwater benthic ecosystem*, Aquatic Ecology Series, Stevenson, R. J., Bothwell, M. L., Lowe, R. L., (Eds.) Academic Press, Boston: 321 - 340.
- Stevenson, R. J., Bothwell, M. L., Lowe, R. L. 1996. *Algal Ecology - Freshwater Benthic Ecosystems*. Steveson RJ, Bothwell ML, Lowe RL (Eds). Academic Press New York. 750 pp.
- Stevenson, R. J., Pan, Y. 1999. Assessing ecological conditions in rivers and streams with diatoms. In: Stoermer, E. F and Smol, J. P (Eds). *The Diatoms: Applications to the Environmental and Earth Sciences*. Cambridge University Press, Cambridge, UK: 11 – 40 pp.
- Takamura, N., Kasai, F., Watanabe, M. M. 1989. Effects of Cu, Cd and Zn on Photosynthesis of Freshwater Benthic Algae. *Journal of Applied Phycology* 1: 39 - 52.
- Thomas, W. H., Hollibaugh, J. T., Seibert, D. L. R. 1980. Effects of heavy metals on the morphology of some marine phytoplankton. *Phycologia* 19: 202 - 209.
- Torres E, Cid A, Herrero C, Abalde J. 1998. Remove of cadmium ions by the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin accumulation and along-term kinetics of uptake. *Bioresource Technology* 63: 213 - 220.
- Watanabe, T., Asai, K., Houki, A. 1986. Numerical estimation to organic pollution of flowing water by using epilithic Diatom assemblage. *Diatom assemblage Index (DAIpo)*. *The Science of the Total Environment* 55: 209 - 218.

## **CHAPITRE 6**

Discussion – Perspectives – Conclusions

*Préambule.*

Ce dernier chapitre dresse un bilan des apports conjoints des approches de terrain et des expérimentations de laboratoire. Il vise ensuite à proposer, sur la base des résultats de nos expérimentations présentés dans les chapitres précédents, des développements méthodologiques pour le suivi de la remédiation des sites contaminés du bassin versant du Riou-Mort et pour la gestion des pollutions métalliques de façon plus générale.

Dans un premier temps, nous rapportons donc les résultats principaux de nos études de terrain et de laboratoire, les apports des différentes approches et leurs limites respectives. Ces démarches complémentaires permettent d'aborder un même problème (à savoir les effets des pollutions métalliques sur les communautés périphytiques) sous un angle global et intégré (terrain) et sur un plan plus réducteur mais maîtrisé au travers des études de laboratoire.

Ensuite, nous décrivons les utilisations ultérieures possibles de nos travaux. D'une part, notre étude fournit une base de connaissance des flores diatomiques du bassin versant du Riou-Mort et permet d'envisager la mise en place d'estimateurs biologiques des effets des procédures de remédiation engagées sur différents sites impactés du bassin versant. Nous proposons également des éléments de réflexion sur les objectifs à atteindre à l'échelle des communautés diatomiques.

D'autre part, les implications de nos résultats pour la gestion des milieux aquatiques sont développées :

- nous avons qualifié dans cette thèse les effets de substances prioritaires (métaux lourds) sur le compartiment "diatomées", pris en compte dans la mise en œuvre de la Directive Cadre européenne sur l'Eau : modifications de la structure des assemblages, au profit d'espèces tolérantes identifiées, et apparition d'anomalies morphologiques en abondances significatives ;

- nous soumettons également un indice de pollution métallique probable, dont le calcul est possible simplement d'après les inventaires diatomiques réalisés, par exemple, pour le calcul classique de l'IPS (Indice de Polluo-Sensibilité de Coste *in* Cemagref 1982).

**A - DES APPROCHES COMPLEMENTAIRES AU SERVICE D'UNE MEILLEURE COMPREHENSION DES PHENOMENES OBSERVES IN SITU.**

**1- Caractéristiques des communautés matures / suivi des cinétiques de colonisation.**

Cette thèse a donné lieu à deux années de campagnes de terrain à pas de temps mensuel. La triplication des échantillons ainsi que le suivi bisannuel ont permis, par le biais de traitements statistiques, de s'affranchir d'une variabilité trop importante et de dégager des tendances en termes de successions saisonnières d'espèces. De plus, il a été possible de déterminer les poids relatifs de la présence de nutriments et de métaux dans la structuration des communautés. On constate qu'à une échelle locale, les facteurs caractéristiques de l'habitat sont prépondérants (Chapitre 3). L'analyse spécifique des inventaires permet cependant de souligner la présence de taxons désormais considérés comme indicateurs d'un niveau de contamination métallique anormalement élevé dans le bassin versant du Riou-Mort. Ainsi, la présence d'espèces telles que *Eolimna minima*, *Fragilaria gracilis*, *Pinnularia globiceps* var. *globiceps*, *P. parvulissima*, *Surirella angusta* ou *S. brebissonii* semble concorder avec l'existence d'un stress métallique (Figure 42).

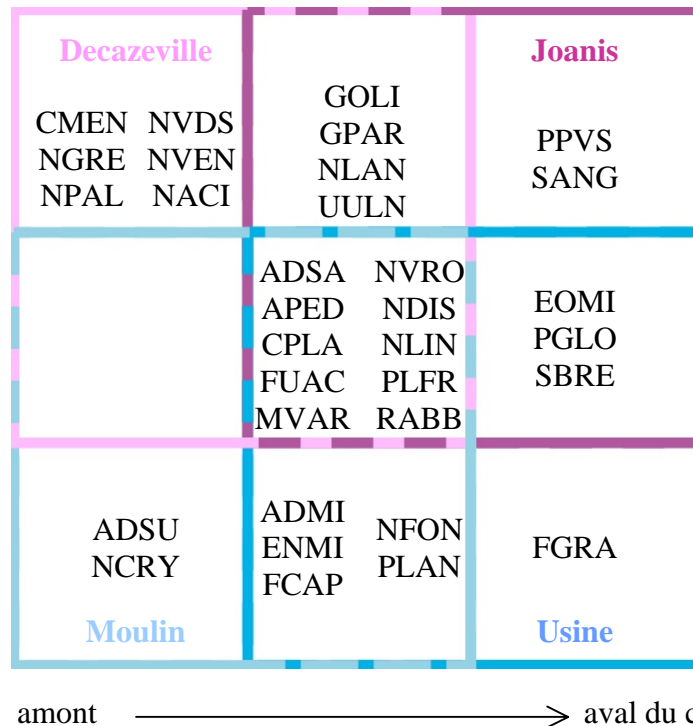


Figure 42 : Représentation schématique de la répartition des espèces par station, chaque carré de couleur regroupe les espèces rencontrées dans la station concernée (de gauche à droite : gradient amont / aval). La liste des abréviations des noms d'espèce est détaillée dans le Tableau 3, page 87.

La mise en œuvre d'un suivi de la cinétique de développement des communautés diatomiques le long du gradient de contamination organique et métallique du Riou-Mort nous a permis de mieux comprendre l'installation des espèces soumises à différentes manifestations d'impacts anthropiques (effets isolés des nutriments et combinés avec les métaux) (Chapitre 4). A l'instar des hypothèses de Gold (2002), nous observons un développement différencié de l'architecture des biofilms périphytiques (Figure 43). Les espèces pionnières, adhérentes, colonisent précocément les substrats dans les sites non exposés. Le développement en épaisseur du biofilm est ensuite favorisé par l'installation rapide d'espèces érigées puis d'espèces filamenteuses, constitutives des couches externes du biofilm. Ces conditions permettent également le dépôt des formes libres, retenues en superficie de la matrice organique. En revanche, le développement en trois dimensions des biofilms périphytiques exposés aux métaux est fortement réduit (Lehmann *et al.* 1999), et les petites diatomées à forte adhérence au substrat dominant alors.

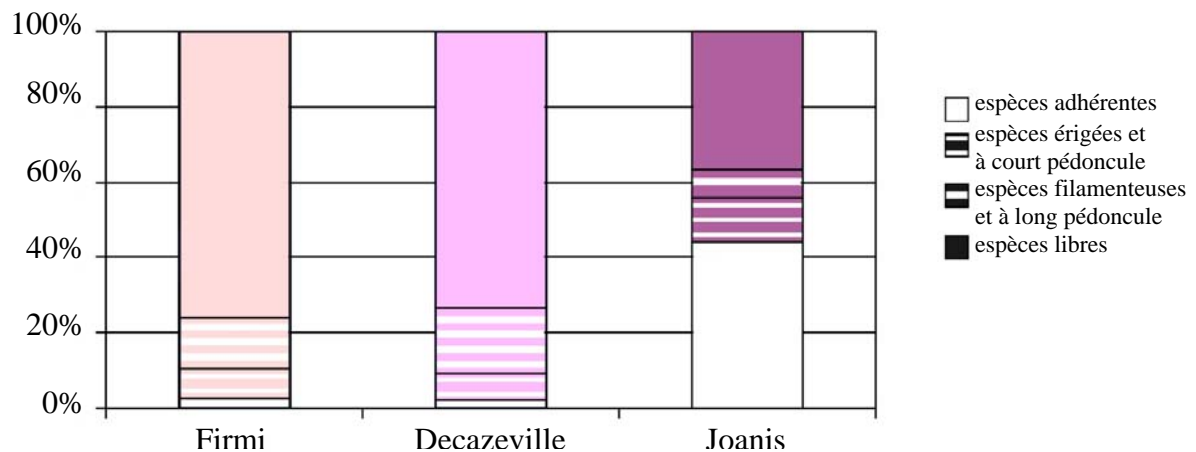


Figure 43 : Architecture du biofilm - exemple de la structuration des communautés diatomiques matures, juillet 2004 (d'après Morin *et al.* 2006b).

Ces études le long d'un gradient amont / aval du même cours d'eau nous permettent de nous affranchir en partie des biais constatés par Gold (2002) liés au choix d'une station de référence sur une rivière adjacente. Elle permet également de mettre en avant les effets combinés entre nutriments et métaux (Ivorra *et al.* 2002b) par la comparaison de sites plus ou moins eutrophisés. Nos travaux restent cependant limités géographiquement, leur généralisation aux hydrosystèmes français reste donc potentiellement sujette à des adaptations hydroécologiques. En effet, les facteurs de grande échelle structurent les assemblages de diatomées benthiques (Stevenson 1997, Tison 2006) et des études ultérieures (e.g. Laviale *en cours*) devraient permettre l'acquisition de connaissances dans d'autres hydrosystèmes français, et par conséquent fournir des éléments complémentaires pour la gestion des pollutions métalliques dans nos cours d'eau.

## 2- Apports des expérimentations en laboratoire.

D'un point de vue méthodologique, les études en microcosmes constituent de bons outils de reproduction du milieu naturel, facilitant la comparaison entre des objets d'étude similaires placés dans des conditions de milieu identiques, et soumis à la variation d'un ou plusieurs paramètres environnementaux. En effet, la complexité des caractéristiques environnementales naturelles ne permet pas de sélectionner sur le terrain, par exemple, des stations aux descripteurs abiotiques (hydrodynamique, physicochimie, habitat) identiques le long d'un gradient de pollution. Les sites choisis pour les manipulations de terrain dans cette thèse, quoique géographiquement proches et physiquement similaires (avec une variabilité moindre qu'entre les stations étudiées par Gold *et al.* en 2002), présentent des caractéristiques originales liées à la géologie des sols traversés par les cours d'eau ou à des degrés d'anthropisation variés du bassin versant du Riou-Mort biaisent l'analyse de l'effet seul de la contamination métallique.

C'est dans le but de confirmer des relations causales que nos expérimentations de laboratoire ont été mises en place, dans un souci de représentativité maximale des conditions de terrain, en utilisant des biofilms provenant du terrain et en travaillant sur des assemblages multispécifiques. De ce fait, nous n'avons pas été jusqu'au niveau de réductionnisme des travaux de Gold (2002) ou Ivorra *et al.* (2002a), lesquels s'attachaient à caractériser les réponses d'une seule espèce (respectivement *Achnanthydium minutissimum* et *Gomphonema parvulum*) soumise à des contaminations observées sur le terrain. Dans notre étude des communautés, nous prenons indirectement en compte les interactions biotiques, sans toutefois être à même de les caractériser ni de les quantifier.

De plus, nos études en microcosmes caractérisent finement les effets du cadmium dissous sur les diatomées collectées *in situ* (Figure 44). Appliqué à 100µg/L, il provoque une réduction très marquée de la biomasse péiphytique et des modifications de la structure des assemblages au profit d'espèces tolérantes comme, dans le cas présent, *Nitzschia palea*. Cependant nos manipulations n'ont pas permis de révéler d'effet notable d'une contamination de 10µg/L sur le développement de biofilm ou les communautés diatomiques, exception faite de l'apparition d'anomalies morphologiques à des abondances de l'ordre de 15%.

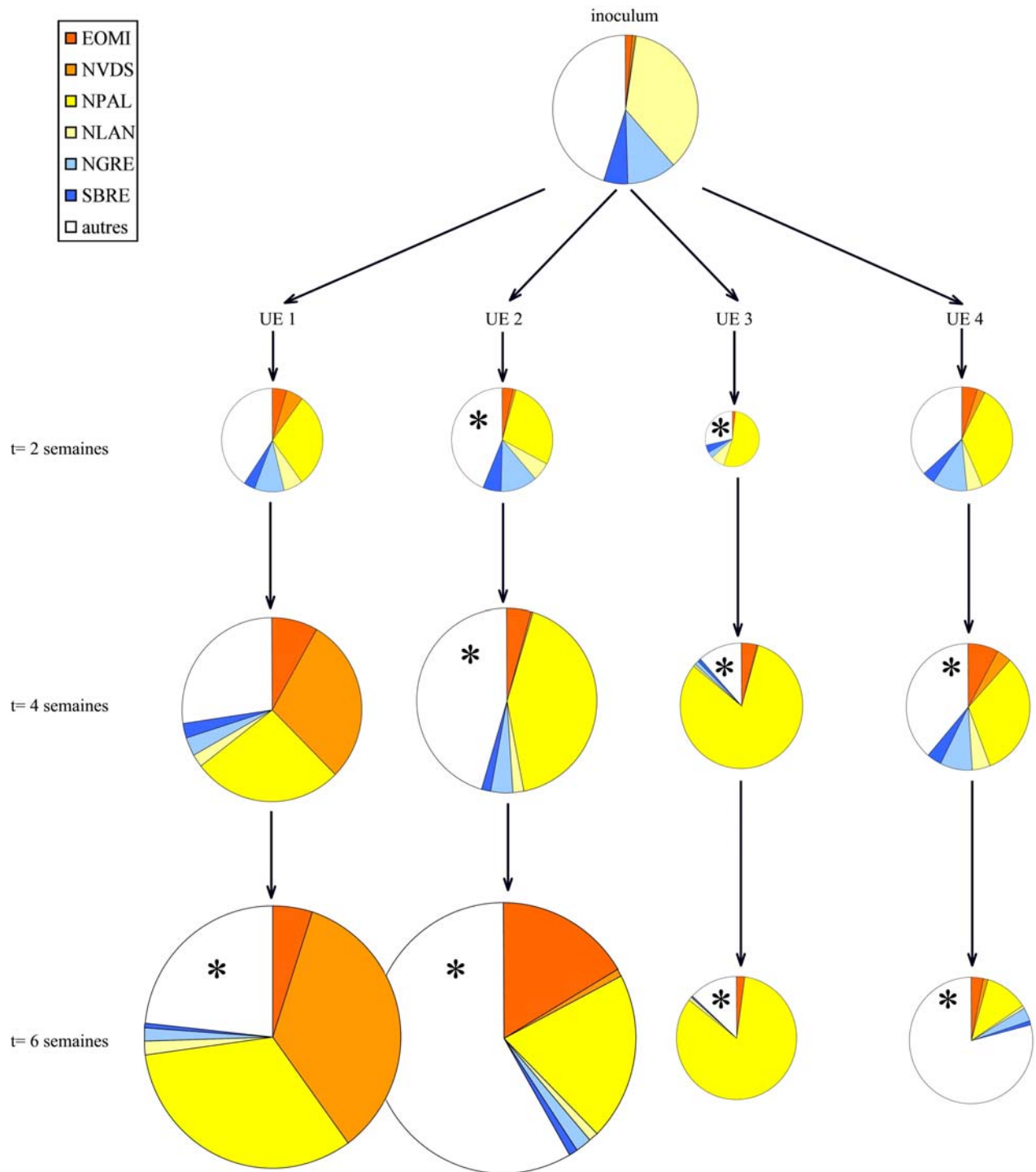


Figure 44 : Réponses des communautés des 4 unités expérimentales pendant la durée de l'expérimentation. La taille des diagrammes représente la quantité de biomasse et les quartiers les abondances spécifiques des espèces majoritaires. Les astérisques figurent la présence significative de formes anormales. EOMI : *Eolimna minima*, NVDS : *Navicula(dicta) seminulum*, NPAL : *Nitzschia palea*, NLAN : *Navicula lanceolata*, NGRE : *Navicula gregaria*, SBRE : *Surirella brebissonii*.



En plus du choix de concentrations en nutriments très favorables au développement des diatomées (et notamment d'espèces saprophytes, abondantes dans l'inoculum provenant du site Decazeville, sur le Riou-Mort), nous n'avons pas reproduit les conditions de terrain d'exposition métallique, puisque les eaux du bassin versant sont également soumises à une forte pollution par le zinc.

Néanmoins la confrontation des résultats obtenus par Gold (2002) sur le terrain et en conditions contrôlées (limitées également à l'étude des effets du cadmium), de même que les acquis de cette thèse (Chapitres 3, 4 et 5) valident l'hypothèse d'une structuration des communautés diatomiques par le cadmium principalement. Les effets de métaux essentiels comme le zinc en concentrations élevées peuvent en effet être modulés par une adaptation, de la part des cellules, des taux de prélèvement métallique (Ivorra 2000). Ainsi, Lehmann *et al.* (1999) n'ont pas pu démontrer, en utilisant le concept PICT, de sélection nette par le zinc sur les communautés diatomiques. Toutefois, il semble nécessaire d'envisager par la suite des expériences prenant en compte d'une part la contamination par le zinc, d'autre part la contamination mixte par le zinc et le cadmium, de manière à affiner les interprétations des données de terrain. L'étude des effets des deux contaminants, notamment, permettrait de mieux appréhender les effets de synergie ou d'antagonisme, décrits par exemple dans les travaux de Lee *et al.* (1995) qui démontrent un effet positif du cadmium sur la croissance de la diatomée marine *Thalassiosira weissflogii* dans un milieu carencé en zinc.

En outre, nous avons également fait abstraction de la pollution par les éléments traces métalliques en suspension, qui est mesurée sur le terrain. Même s'il semble que les métaux de la phase particulaire sont moins biodisponibles, et par conséquent moins toxiques, pour les organismes que les composés dissous (Prygiel 2006, *comm. pers.*), nous négligeons ici une source importante de contamination des biofilms. En effet, le piégeage de particules métalliques dans la matrice organique lors de son développement en épaisseur expose les communautés périphtiques plus directement. Dès lors le passage dans la cellule peut avoir lieu selon les deux mécanismes décrits par Campbell *et al.* (2002) : le transport actif par fixation des espèces métalliques à la surface des cellules puis dissociation du métal et de son ligand organique (Hudson 2005) et la voie passive par diffusion transmembranaire de métaux passés à l'état d'ions libres sous l'effet de conditions locales de pH dans le biofilm (Revsbech *et al.* 1988, Teissier et Torre 2002).

## ***B - INTERET D'UN SUIVI POSTERIEUR DES COMMUNAUTES DIATOMIQUES POUR ESTIMER L'IMPACT DES DEMARCHES DE REMEDIATION.***

Nous disposons de peu d'études antérieures sur la composition spécifique des communautés algales du bassin versant du Riou-Mort. Cependant, sur la base des études de Say (1978), de Gold *et al.* (2002), ainsi que des relevés réalisés en 2003 puis au cours de cette thèse (2004-2005), il semble envisageable d'effectuer une comparaison "historique" des inventaires réalisés sur le Riou-Mort aval (Figure 45), au regard du niveau de contamination métallique des eaux.

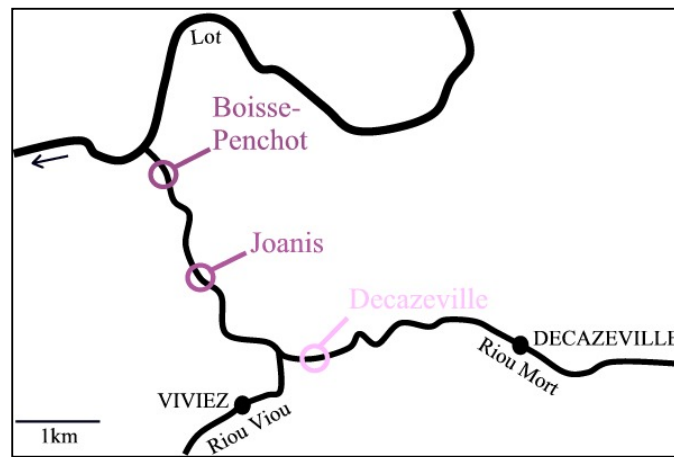


Figure 45 : Localisation des stations Decazeville, Joanis et Boisse-Penchat sur le Riou-Mort.

### **1- Utilisation d'enregistrements historiques.**

Cette analyse sommaire se base sur des échantillons prélevés sur substrats naturels en conditions estivales, excepté pour les données issues de Gold *et al.* (2002) : les communautés proviennent de substrats artificiels (lames de verres) échantillonnés à l'automne 1999. Ces inventaires, susceptibles de compléter nos connaissances, sont simplement ajoutés à titre informatif.

Pour chaque période d'échantillonnage, les concentrations en cadmium et en zinc dissous sont également rapportées (Figure 46). Lorsque les informations étaient disponibles pour d'autres années, les concentrations en métaux dissous mesurées ont été rajoutées, de manière à visualiser plus aisément leur évolution temporelle. Ces données complémentaires sont issues des études de Rames (1995), Blanc *et al.* (1999), Audry (2003), Blanc *et al.* (2003), Audry *et al.* (2004b), Blanc (2005) et Marie *et al.* (Marie *et al.* accepted).

## 1.1 – Evolution des concentrations en ETM dissous de 1977 à nos jours.

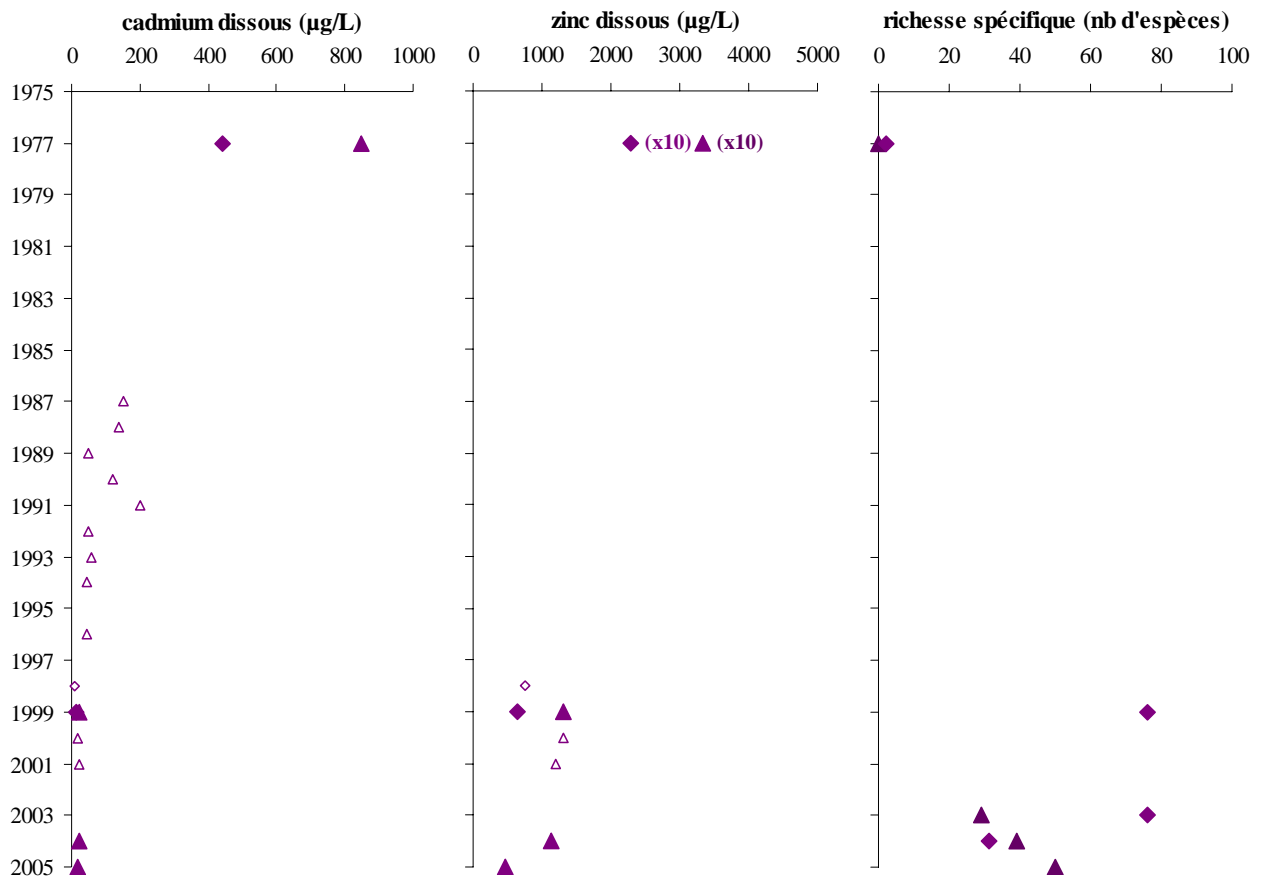


Figure 46 : Evolution temporelle (1977-2005) des concentrations en cadmium et zinc dissous mesurées et du nombre d'espèces de diatomées recensées sur le Riou-Mort aval (▲ : Joanis, ◆ : Boisse-Penchat ; les symboles pleins correspondent aux dates où les inventaires de diatomées ont été réalisés, les symboles vides sont issus de données géochimiques complémentaires).

Les concentrations en métaux dissous enregistrés depuis 1977 traduisent les modifications de l'activité du site de « Vieille Montagne ». Audry (2005) a montré que, entre 1977 et 1986, le choix du traitement des résidus par voie humide n'a permis de réduire que très faiblement les apports de cadmium et de zinc dans l'eau. A partir de 1987 (arrêt de la production de zinc), les profils de Cd et Zn montrent des concentrations en diminution régulière jusqu'à 1997, puis restent relativement constantes depuis cette date (autour de  $22\mu\text{gCd/L}$  et  $1200\mu\text{gZn/L}$  à Joanis). La phase de diminution peut être attribuée à l'arrêt de l'activité de production, mais également aux mesures de traitement des eaux de nappe et de confinement d'une partie des terrils par recouvrement d'argiles mises en œuvre entre 1987 et 2001. La phase de stabilisation des concentrations est liée à des apports métalliques continus provenant du Riou-Viou, elle traduit une pollution chronique persistante due au lessivage et à l'altération mécanique des terrils (Audry *et al.* 2004a, Audry *et al.* 2004b).

### 1.2 – Analyse des relevés floristiques correspondants.

En 1977, les communautés diatomiques du Riou-Mort aval étaient inexistantes à Joanis et composées exclusivement de deux espèces à Boisse-Penchot, contre le double à Decazeville (Say 1978). Douze ans après l'arrêt de l'activité minière du site en 1987, on dénombre plus de 70 espèces à Boisse-Penchot. Dans les années 2000, on note une stabilisation de la richesse spécifique autour d'un nombre moyen de 45 espèces (Figure 46).

Tableau 7 : Espèces majoritaires observées sur le Riou-Mort aval (B.-P. : Boisse-Penchot, J. : Joanis).

\* Espèces déjà observées en conditions de stress métallique (Annexe A)

\*\* Espèces dont la présence en abondances relatives importantes confirme une contamination métallique (Bahls 2005, *comm. pers.*)

	1977		1999	2003	2004		2005
	J.	B.-P.	B.-P.	B.-P.	J.	B.-P.	J.
<i>Achnantheidium minutissimum</i> *		++					+
<i>Achnantheidium saprophila</i>				+			+
<i>Cocconeis placentula</i>			+				
<i>Cyclotella meneghiniana</i>					+	+	+
<i>Diatoma vulgare</i> *			+				
<i>Eolimna minima</i> **				+	++	++	++
<i>Fragilaria crotonensis</i> *			++				
<i>Gomphonema parvulum</i> var. <i>parvulum</i> f. <i>parvulum</i> *		++			+	+	+
<i>Mayamaea atomus</i> var. <i>permitis</i>				+		+	
<i>Melosira varians</i>			+				
<i>Navicula(dicta) seminulum</i> **							+
<i>Nitzschia dissipata</i>			+				
<i>Nitzschia palea</i> *					+	+	+
<i>Pinnularia globiceps</i> var. <i>globiceps</i> *				+			
<i>Pinnularia microstauron</i>			+				
<i>Pinnularia parvulissima</i> *				+		+	+
<i>Planothidium frequentissimum</i>				+	+		+
<i>Planothidium lanceolatum</i> *					+		
<i>Surirella angusta</i> *				+			+
<i>Ulnaria ulna</i> *					+	+	+

L'analyse qualitative des inventaires floristiques du Riou-Mort aval révèle également des modifications structurelles importantes. La diversification des communautés diatomiques s'est accompagnée d'une diminution en abondances relatives des espèces *Gomphonema parvulum* et *Achnantheidium minutissimum* au profit, notamment, d'*Eolimna minima* qui domine dans les échantillons les plus récents, représentant plus de 40% des individus identifiés à partir de 2003. Cette espèce, reconnue pour son extrême tolérance aux pollutions métalliques, est cependant associée à des espèces non reportées en milieu contaminé ou même reconnues plus sensibles comme *Cyclotella meneghiniana* et *Planothidium frequentissimum*.

Cette étude rapide montre une diversification des communautés diatomiques et une modification de leur composition spécifique en relation avec le niveau de contamination métallique. L'analyse ne tient ici pas compte des autres caractéristiques physico-chimiques importantes des eaux, cependant nous pouvons noter que certains paramètres (pH, température, disponibilité en nutriments notamment) sont peu variables entre les différentes dates où les échantillonnages de diatomées ont été réalisés (voir Say 1978, Gold 2002, Morin 2003). Les tendances sont donc en grande partie imputables à la baisse des concentrations métalliques dans les eaux.

En revanche, l'analyse est particulièrement limitée par les biais liés au prélèvement et, surtout, à l'identification des diatomées. La collecte des échantillons ne fait l'objet d'une procédure normalisée que depuis 2003 (NF EN 13946), et l'identification jusqu'au niveau de l'espèce est fortement dépendante du niveau de maîtrise de la systématique de l'opérateur. On peut supposer que la différence entre le faible nombre d'espèces identifiées par Say (1978) et la cinquantaine de taxons identifiés par Coste sur les échantillons de 1973 est en relation avec la précision du travail d'inventaire (liée à la qualité du microscope, au niveau de maîtrise de la systématique du groupe et à l'effort de comptage consenti par échantillon), mais également avec les évolutions taxinomiques récentes. Les relevés de 1973 sont néanmoins dominés largement par *Aulacoseira subarctica* (35%), puis par *Nitzschia palea* (10%), *Aulacoseira ambigua* (7%) et *Surirella brebissonii* var. *brebissonii* (6%) ; les autres espèces ne sont représentées qu'à des abondances relatives bien inférieures à 5%.

## **2- Perspectives : un suivi des flores diatomiques pour valider les effets de la démarche de remédiation entreprise par Umicore ?**

### ***2.1 – Un contexte favorable à la mise en place d'un suivi.***

Le groupe Umicore s'est engagé dans une démarche de réhabilitation du site de "Vieille Montagne", à Viviez. Une évaluation détaillée des risques a été réalisée afin d'identifier et de caractériser les sources polluantes sur l'ensemble de l'ancienne zone exploitée par "Vieille Montagne", et de permettre à terme la remédiation des terrains de son usine. Des actions de restauration sont en cours à différents endroits du site, et la caractérisation des effets sur les organismes aquatiques et rivulaires sera vraisemblablement nécessaire pour valider les actions mises en œuvre.

L'utilisation des assemblages diatomiques passés et présents pour reconstruire l'histoire des contaminations anthropogéniques est relativement courante en paléolimnologie (Dixit *et al.* 1992). Cunningham *et al.* (2005) ont montré que les concentrations métalliques dans les couches sédimentaires expliquent en grande partie la variation de composition des communautés de diatomées benthiques. Verb et Vis (2005) mettent en évidence une relation forte et quantifiable entre gradients environnementaux induits par les activités humaines et structure des communautés périphytiques ; la structure du périphyton leur sert à déterminer une situation pré-impact motivant les stratégies de réhabilitation. A une échelle de temps plus restreinte, le suivi des communautés algales doit permettre d'estimer les efforts à consentir et d'évaluer les effets de la remédiation. L'augmentation de la richesse spécifique comme conséquence de l'amélioration de l'état de santé de l'écosystème a été décrite par Reavie *et al.* (1998), cet indicateur devrait permettre de surveiller les effets souhaités de la restauration de l'environnement aquatique.

### ***2.2 – Objectifs de réhabilitation : vers quelle structure de communauté ?***

Nous avons pu montrer que la composition spécifique des communautés diatomiques avait évolué dans le temps, avec la réduction du niveau de contamination métallique. Il serait intéressant de poursuivre le suivi des communautés du Riou-Mort aval, à raison d'un échantillonnage annuel. Afin de favoriser la comparaison inter-dates, il est nécessaire de se placer dans des conditions comparables entre les prélèvements : échantillonnage en conditions estivales et sur substrats naturels.

Il n'existe pas d'étude des communautés antérieures à la mise en place de l'activité industrielle dans le bassin de Decazeville, nous ne disposons donc pas de référence "non impactée". En revanche, il semble logique de considérer la composition d'une station amont comme objectif

possible à atteindre. Si nous raisonnons la structure des assemblages en termes de sensibilité et tolérance des espèces présentes aux métaux, la finalité des opérations de réhabilitation est d'atteindre des proportions comparables pour chaque catégorie à l'amont et à l'aval de la confluence Riou-Mort / Riou-Viou, au regard des connaissances actuelles et à venir des caractéristiques de tolérance des différentes espèces (Figure 47).

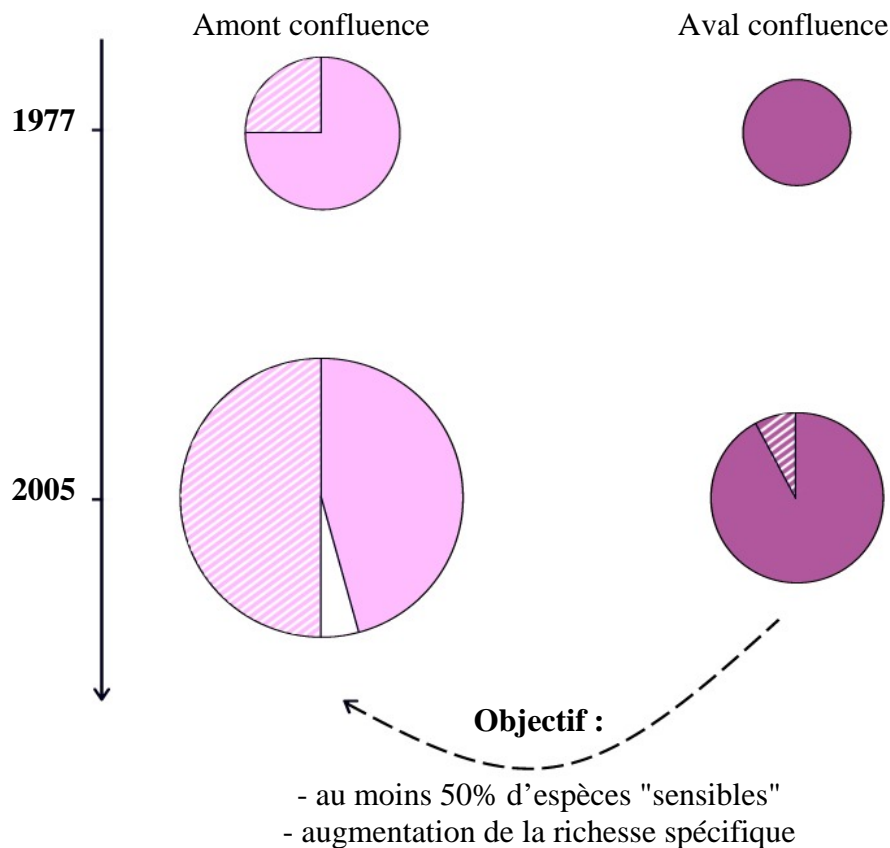


Figure 47 : Structure des communautés diatomiques collectées sur le Riou-Mort, à l'amont et à l'aval de sa confluence avec le Riou-Viou (● : Decazeville, ● : Boisse-Penchat) : évolution temporelle et objectifs de remédiation. En hachures : espèces sensibles, en plein : espèces tolérantes, en blanc : espèces sans préférence connue.

Enfin, il semble plus pertinent de se fixer comme objectif à atteindre une référence "actuelle". De fait, les données historiques relatives à la contamination du bassin versant du Riou-Mort indiquent que la station appelée Decazeville dans cette étude présentait en 1977 des concentrations métalliques non négligeables (en moyenne 0,56mgZn/L), ce qui peut expliquer la part importante des espèces tolérantes en amont de la confluence. Depuis, des actions ont été mises en place, qui ont réduit le niveau de pollution métallique au bruit de fond géochimique de la région (Andres 1997). Pour cette raison, il semble plus approprié de comparer la composition spécifique des stations aval aux inventaires réalisés simultanément à l'amont.

## C - IMPLICATIONS POUR LA GESTION

### 1- Qualification des effets de substances prioritaires définies par la DCE<sup>1</sup>.

La Commission Européenne (2000/60/CE) présente une liste de 33 "substances polluantes prioritaires", avec pour objectifs d'en réduire voire d'en éliminer les émissions, rejets et pertes. Ces substances présentent un risque significatif, pour ou via l'environnement aquatique ; parmi ces substances dangereuses on trouve les métaux, et notamment le cadmium, le mercure, le nickel et le plomb.

Il s'agit d'établir des normes de qualité (valeurs limites) basées sur leur toxicité, leur persistance dans l'environnement et les capacités de bioaccumulation par les organismes. Par conséquent, il est nécessaire de mieux connaître les substances et leurs effets intrinsèques et dans le milieu pour pouvoir mener ensuite une politique de l'eau efficace et cohérente.

Les études de terrain réalisées au cours de cette thèse fournissent des éléments d'estimation de la toxicité chronique pour les diatomées de rivières, compartiment biologique pris en compte dans la mise en œuvre de la Directive. Les définitions normatives des états écologiques "très bon", "bon" et "moyen" pour les diatomées sont les suivantes :

Tableau 8 : Définition générale de la qualité écologique pour le phytobenthos (DCE / Annexe V).

Très bon état	Bon état	Moyen état
La composition taxinomique correspond totalement ou presque totalement aux conditions non perturbées.	Légères modifications dans la composition et l'abondance des taxa par rapport aux communautés caractéristiques.	La composition des taxa diffère modérément de la communauté caractéristique et est sensiblement plus perturbée que le bon état.
Pas de modification dans l'abondance moyenne phytobenthique.	Ces changements n'indiquent pas de croissance accélérée du phytobenthos entraînant des perturbations indésirables de l'équilibre des organismes présents dans la masse d'eau ou de la qualité physico-chimique de l'eau ou du sédiment.	Des modifications modérées dans l'abondance moyenne phytobenthique sont perceptibles.

Les travaux du Cemagref de Bordeaux, et particulièrement de Tison *et al.* (2005a), ont permis de caractériser des communautés des communautés de référence (*i.e.* caractéristiques de milieux non

<sup>1</sup> Directive Cadre européenne sur l'Eau.



impactés) pour les hydroécorégions françaises. A partir des notes d'IPS<sup>1</sup> obtenues pour les assemblages de référence et celles calculées pour nos échantillons, il est possible d'obtenir un ratio de qualité écologique (EQR) qui détermine l'état de santé des milieux considérés, selon la

formule :  $EQR = \frac{IPS_{\text{échantillon}}}{IPS_{\text{référence}}}$ . Ainsi, nous obtenons pour les différents sites les notes d'EQR

reportées dans le Tableau 9.

Tableau 9 : EQR calculés pour les sites Firmi, Decazeville, Joanis, Moulin et Usine, d'après les calculs d'IPS réalisés sur échantillons prélevés en été sur substrats naturels.

	Riou-Mort			Riou-Viou		
	Firmi	Decaz.	Joanis	Moulin	Usine	
2004	0,46	0,42	0,41	1,04	0,54	
2005		0,21	0,56	0,77	0,59	

- Très bon état :  $EQR \geq 0,88$
- Bon état :  $0,88 > EQR \geq 0,75$
- Etat moyen :  $0,75 > EQR \geq 0,56$
- Etat médiocre :  $0,56 > EQR \geq 0,38$
- Mauvais état :  $EQR < 0,38$

Ces valeurs traduisent un fort impact anthropique à Firmi, Decazeville, Joanis et Usine. On constate entre 2004 et 2005 un décalage des notes vers une classe de qualité inférieure à Decazeville et Moulin, et une tendance à l'amélioration des valeurs d'indice à Joanis et Usine, en lien essentiellement avec des variations sensibles de la conductivité au niveau de ces stations. Cependant, les notes obtenues à Joanis et Usine ne sont pas significativement inférieures à celles de Firmi et Decazeville. En effet, l'IPS a été conçu pour la révélation des altérations de la qualité générale des eaux au regard de la physicochimie classique et de déterminants biologiques (DBO), ce qui explique une prise en compte limitée des effets toxiques.

Les résultats présentés dans cette thèse apportent de nouvelles informations susceptibles d'être prises en compte dans l'établissement d'indicateurs spécifiques des pollutions toxiques, par l'intégration des caractéristiques de tolérance des espèces particulièrement typiques de stress métallique, et / ou par l'utilisation de fréquences des anomalies morphologiques supérieures au bruit de fond de 5‰ décrit dans les chapitres précédents. Ils peuvent également fournir des éléments favorables au développement d'indices multimétriques de diagnostic de stress métallique (voir plus loin, "Proposition d'un indice de pollution métallique probable").

<sup>1</sup> Comme de nombreux autres indices diatomiques, le calcul de l'IPS est basé sur la formule de Zelinka et Marvan (1961).  $IPS = \frac{\sum a_i \cdot v_i \cdot s_i}{\sum a_i \cdot v_i}$ , où :  $a_i$  : abondance relative de l'espèce i,  $s_i$  : polluosensibilité de l'espèce i,  $v_i$  : valeur indicatrice de l'espèce i.

## 2- Conséquences pour le biomonitoring en routine et perspectives.

### 2.1 – Utilisations actuelles et futures des descripteurs morphologiques.

Le calcul de la nouvelle version de l'IPS (2004) intègre désormais la fréquence des anomalies morphologiques, en attribuant aux taxons déformés :

- la note de polluo-sensibilité minimale prévue, c'est-à-dire 1 (sur une échelle de notation allant de 1 - taxon fortement résistant à la pollution - à 5 - taxon très sensible à la pollution) ;
- la valeur indicatrice maximale prévue, soit 3 (pour des degrés de sténoécie variant de 1 - taxon ayant une grande amplitude écologique, donc de faible poids écologique - à 3 - taxon ayant une faible amplitude écologique, à fort poids écologique).

Cependant, ce mode de calcul ne déprécie que peu les notes d'indice. Le Tableau 10 indique un déclassement peu marqué des sites par rapport aux notes obtenues avant la prise en compte des anomalies morphologiques. En effet, les taxons tératogènes sont rencontrés en abondances relatives qui, bien que significatives, restent faibles (<5%) ; la note d'indice n'est donc que légèrement affectée par les modifications dans la formule de calcul. Cette constatation nous amène à souhaiter le développement de métriques plus spécifiques des contaminations métalliques (voir le paragraphe "Proposition d'un indice de pollution métallique probable").

Tableau 10 : Comparaison des notes d'IPS version 1982 (Coste *in* Cemagref 1982) et 2004 pour le site Riou-Mort à Joanis lors des étés 2004 et 2005.

Référence échantillon	Date de prélèvement	Note d'IPS v1982	Note d'IPS v2004
# 12293	15/07/04	10,3	9,9
# 12336	21/07/04	9,7	9,2
# 12427	17/08/04	9,6	9,6
# 12443	07/09/04	10,2	10,1
# 13212	08/06/05	9,4	9,2
# 13355	27/07/05	9,7	9,4
# 13372	17/08/05	10,7	10,3

Notons que la détermination de la fréquence d'apparition des anomalies morphologiques reste fortement tributaire de facteurs techniques et humains. En effet, l'identification de déformations, notamment au niveau de la désorganisation des stries, est conditionnée par la résolution du microscope. Elle est d'autant plus difficile à observer que la qualité de restitution de l'image est grossière, mais également que les espèces affectées par les déformations sont de petite taille. L'expérience des opérateurs est aussi à mettre en cause : le soin apporté depuis le prélèvement

jusqu'à l'étude microscopique conditionne les résultats. Ainsi, la récupération des échantillons doit être réalisée sur un nombre minimum de substrats, afin de limiter l'expression d'effets locaux de micro-habitat sur les communautés. La préparation des échantillons nécessite également une attention particulière, l'observation d'anomalies morphologiques étant desservie par la présence d'impuretés sur les lames réalisées. Enfin, l'expérience de l'opérateur effectuant les identifications favorise la détection de formes anormales, en raison d'une connaissance approfondie de la morphologie "normale" des diatomées observées, et évite la confusion avec les cellules initiales (plus grosses).

Nous avons également vu, dans le Chapitre 3, que l'exposition aux métaux induisait une diminution de taille chez les individus. Le caractère long et fastidieux des mesures de longueur des cellules les rend inutilisables en routine. Néanmoins, les progrès dans l'automatisation des identifications (Rivognac *et al.* 2005) pourraient favoriser, à plus ou moins brève échéance, la prise en compte de la réduction de taille pour le diagnostic des pollutions métalliques.

## ***2.2 – Proposition d'un indice de pollution métallique probable.***

### **Construction de l'indice**

Les études visant à mettre en relation contaminations métalliques et structure des communautés diatomiques sont relativement récentes (depuis les années 2000) et insuffisamment nombreuses pour pouvoir mettre en place avec certitude un indice de pollution métallique. Cependant, il existe un certain nombre d'acquis dans le domaine, renforcés ou complétés par ces travaux de thèse. Sur cette base, nous pouvons proposer un indice de pollution métallique probable, à affiner avec la progression de travaux futurs sur le sujet. La méthode envisagée suit le modèle américain des indices multimétriques (Hill *et al.* 2000a, Fore et Grafe 2002, Hill *et al.* 2003, Griffith *et al.* 2005), qui font appel à la compilation de différents critères biologiques en un seul "score". Ici nous retenons les attributs (Tableau 11) :

- "abondances relatives des espèces identifiées comme tolérantes"

Les espèces sélectionnées ont été recensées à plusieurs reprises en milieux contaminés par les métaux et leur statut n'est pas sujet à discussion ; les taxons reconnus comme très saprophiles ont été exclus (citons les exemples de *Gomphonema parvulum* ou *Nitzschia palea*) de manière à éviter d'introduire un biais dans le calcul de l'indice qui révélerait une contamination organique. De cette manière, on se préserve également d'une redondance avec l'IPS.

- "fréquence des anomalies morphologiques"

Les frustules déformés sont trouvés en abondances relatives faibles dans les échantillons, cependant nous avons montré la pertinence de cet indicateur pour la diagnose des pollutions métalliques. Afin de conférer plus de poids à ce critère, nous utilisons la fréquence des déformations multipliée par 10.

Le calcul de l'indice se fait selon la formule suivante :

$$\text{Indice de pollution métallique probable} = \sum RA(n)_i + 10 \times \sum RA(a)_i$$

Où :  $RA(n)_i$  : abondances relatives de la forme normale de l'individu  $i$ ,  $RA(a)_i$  : abondances relatives de la forme anormale de l'individu  $i$ .

Tableau 11 : Abondances relatives des espèces identifiées comme tolérantes aux métaux et prises en compte dans la construction d'un indice de pollution métallique probable. Les références bibliographiques motivant la qualification d'espèce tolérante sont consultables en Annexe A.

Espèces	Synonymes
<i>Diatoma vulgare</i>	
<i>Eunotia exigua</i>	
<i>Eolimna minima</i>	<i>Navicula minima</i>
<i>Fragilaria capucina</i> var. <i>capucina</i>	
<i>Fragilaria crotonensis</i>	
<i>Fragilaria tenera</i>	<i>Synedra tenera</i>
<i>Neidium ampliatus</i>	<i>Neidium iridis</i> var. <i>ampliata</i>
<i>Navicula lanceolata</i>	<i>Navicula avenacea</i> , <i>N. viridula</i> var. <i>avenacea</i>
<i>Navicula(dicta) seminulum</i>	<i>Navicula seminulum</i> , <i>Sellaphora seminulum</i>
<i>Nitzschia amphibia</i>	
<i>Nitzschia frustulum</i>	<i>Nitzschia hiemalis</i>
<i>Pinnularia parvulissima</i>	<i>Pinnularia parva</i>
<i>Pinnularia subcapitata</i>	
<i>Planothidium lanceolatum</i>	<i>Achnantheiopsis lanceolata</i> , <i>Achnanthes lanceolata</i>
<i>Surirella angusta</i>	<i>Surirella ovata</i> var. <i>angustata</i>
<i>Surirella ovalis</i>	
Formes anormales ×10	

### Evaluation des propriétés statistiques de l'indice

Cet indice simple a ensuite été testé sur notre jeu de données, acquis sur le bassin versant du Riou-Mort. Les notes obtenues pour plus de 200 inventaires ont ensuite été classées par site (Figure 48).

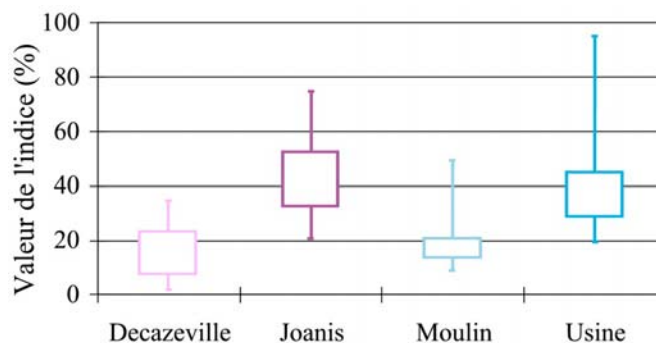


Figure 48 : Calcul de l'indice de pollution métallique probable pour les sites Decazeville et Joanis sur le Riou-Mort, Moulin et Usine sur le Riou-Viou .

Les notes obtenues pour les stations "amont" sont inférieures à 20% :  $15,5 \pm 9,4\%$  à Decazeville et  $18,2 \pm 7,5\%$  à Moulin A l'aval, en revanche, on trouve des valeurs moyennes de l'ordre de 40%, soit  $44,4 \pm 14,4\%$  à Joanis et  $39,7 \pm 18,4\%$  à Usine. Les calculs d'indice réalisés à partir de notre jeu de données permettent ainsi de discriminer les échantillons sur la base du niveau de contamination métallique.

Nous avons comparé plus précisément les évolutions temporelles de l'indice avec les concentrations en cadmium et en zinc mesurées aux mêmes dates dans les phases dissoute et particulaire.

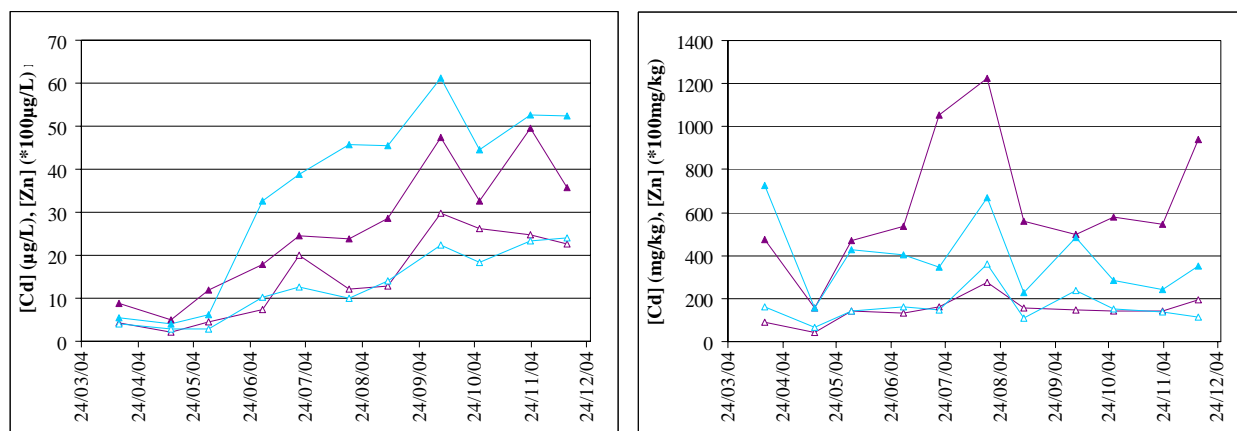


Figure 49 : Evolution sur l'année 2004 des concentrations en cadmium (▲) et en zinc (Δ) dissous et particulaire à Joanis (en mauve) et Usine (en bleu).

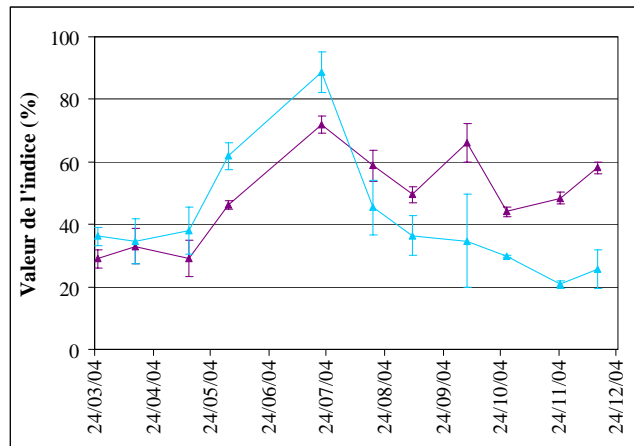


Figure 50 : Evolution des notes d'indice sur l'année 2004 pour les stations Joanis (▲) et Usine (▲).

L'évolution des notes d'indice à Joanis traduit relativement bien les évolutions temporelles des concentrations métalliques (et notamment dans la phase dissoute). Ainsi, on associe des notes "moyennes" (20-40%) à une qualité d'eau médiocre : 5 à 10  $\mu\text{gCd/L}$  et 200 à 500  $\mu\text{gZn/L}$ . Les notes augmentent fortement, autour de 60%, alors que l'on atteint des niveaux de contamination métallique plus élevés dès le 6 juin 2004.

A Usine en revanche, le parallèle est plus délicat à réaliser. De la même façon qu'à Joanis, on obtient de mars à mai des notes d'indices de l'ordre de 30 à 40%, alors que le niveau de pollution métallique est comparable à celui mesuré à Joanis pour la même période. Les notes d'indices augmentent ensuite à mesure que la contamination s'amplifie. La chute des notes d'indice à partir du mois de septembre 2004 ne semble cependant pas directement corrélée avec une diminution nettement observable de la contamination métallique. En effet, les concentrations en métaux dissous entre juin et décembre 2004 tendent plutôt à augmenter à Usine ; il semble que la baisse du niveau de contamination dans la phase particulaire, qui décroît sur la fin de l'année, pourrait alors expliquer le retour de la note d'indice aux valeurs observées en début d'année. L'indice pourrait donc prendre en compte les deux types de pollution (dissoute et particulaire).

Notons que les valeurs des concentrations métalliques correspondent à des mesures ponctuelles, qui ne reflètent pas nécessairement au mieux les conditions d'exposition des communautés dans le cours d'eau, puisqu'elles intègrent les paramètres environnementaux sur toute la durée (un mois) d'immersion des substrats artificiels. Ceci peut expliquer en grande partie les imprécisions dans l'interprétation que nous rencontrons ici.

Les premiers résultats de cette ébauche d'indicateur sont prometteurs mais nécessitent une validation à plus grande échelle. De plus, des adaptations seraient probablement nécessaires pour la mise en œuvre de l'indice à partir d'échantillons collectés sur substrats naturels. De cette façon, à partir d'un prélèvement destiné au calcul de l'IPS, il serait également possible de déterminer une note de pollution métallique probable.

### **Développements ultérieurs : vers un indice diatomique de qualité globale des eaux ?**

La qualité des eaux en termes de physicochimie classique et de déterminants biologiques tels que la DBO est évaluée de façon performante par l'IPS. Cet indice est insuffisant à mettre en évidence les pollutions toxiques, il est donc légitime de souhaiter lui adjoindre des indicateurs révélant ces types de contamination. L'indice de pollution métallique probable proposé ici devrait permettre une meilleure évaluation de concentrations élevées en métaux lourds. Le Cemagref a également initié des travaux de diagnose des effets des pesticides sur les communautés diatomiques (Debenest *en cours*). Cependant, il est vraisemblable que les indicateurs de ce type de pollution seront sensiblement différents des descripteurs utilisés pour la mise en évidence des contaminations métalliques (Morin *et al.* 2004). Cependant, s'il existe un jour un estimateur des pollutions à pesticides, l'état de santé des écosystèmes aquatiques pourrait être mesuré au travers de ces trois indicateurs complémentaires : trophique (IPS), métallique (indice de pollution métallique probable) et pesticide, soit par une combinaison des trois notes, soit par un déclassement des eaux en fonction de la plus faible note obtenue.





## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**



A

Admiraal, W., Blanck, H., Buckert- De Jong, M., Guasch, H., Ivorra, N., Lehmann, V., Nystrom, B.A.H., Paulsson, M. et Sabater, S. 1999a. Short-term toxicity of zinc to microbenthic algae and bacteria in a metal polluted stream. *Water Research* - **33**(9): 1989-1996.

Admiraal, W., Ivorra, N., Jonker, M., Bremer, S., Barranguet, C. et Guasch, H. 1999b. Distribution of diatom species in a metal polluted Belgian-Dutch river : an experimental analysis. - In: Prygiel, J., Whitton, B.A. et Bukowska, J. (eds.), Use of algae for monitoring rivers III, 240-244.

AFNOR. 2000. Qualité de l'Eau. Détermination de l'indice biologique diatomées (IBD) - Norme NF T90-354 -. -: 63p.

AFNOR. 2003. Qualité de l'Eau. Guide pour l'échantillonnage en routine et le pré-traitement des diatomées benthiques de rivières - Norme NF EN 13946. -: 16p.

Agence de l'Eau Adour-Garonne. 1993. Les micropolluants organiques et métalliques dans le bassin Adour-Garonne. Campagnes de mesures 1992. Les études de l'Agence de l'Eau Adour-Garonne, 78.

Agence de l'Eau Adour-Garonne. 1995. Les micropolluants organiques et métalliques dans le bassin Adour-Garonne. Campagnes de mesures 1993. Les études de l'Agence de l'Eau Adour-Garonne. - Agence de l'Eau, 51.

Agence de l'Eau Adour-Garonne. 1996. Les micropolluants organiques et métalliques dans le bassin Adour-Garonne. Campagnes de mesures 1994. Les études de l'Agence de l'Eau Adour-Garonne, 51.

Agence de l'Eau Adour-Garonne. 2005. Bilan sur la qualité des eaux du Bassin Adour-Garonne en 2004. Les études de l'Agence de l'Eau Adour-Garonne, 54.

Ahner, B.A. et Morel, F.M.M. 1995. Phytochelatin production in marine algae. 2. Induction by various metals. *Limnology and Oceanography* - **40**(4): 658-665.

Ahner, B.A., Wei, L.P., Oleson, J.R. et Ogura, N. 2002. Glutathione and other low molecular weight thiols in marine phytoplankton under metal stress. *Marine Ecology-Progress Series* - **232**: 93-103.

Allen, T.F.H. et Starr, T.B. 1982. Hierarchy : Perspectives for Ecological Complexity. - University of Chicago Press, Chicago.

Andres, S. 1997. Etude écotoxicologique des transferts de cadmium et zinc entre la colonne d'eau et les sédiments du Lot (France) et les organismes aquatiques - Approches *in situ* et expérimentale. - PhD thesis - Univ. Paul Sabatier, Toulouse, 135p. + annexes.

Andres, S., Baudrimont, M., Lapaquellerie, Y., Ribeyre, F., Maillet, N., Latouche, C. et Boudou, A. 1999. Field transplantation of the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* along a polymetallic contamination gradient (river Lot, France): I. Geochemical characteristics of the sampling sites and cadmium and zinc bioaccumulation kinetics. *Environmental Toxicology and Chemistry* - **18**(11): 2462-2471.

Andres, S., Ribeyre, F., Tourencq, J.N. et Boudou, A. 2000. Interspecific comparison of cadmium and zinc contamination in the organs of four fish species along a polymetallic pollution gradient (Lot River, France). *Science of the Total Environment* - **248**(1): 11-25.

Andresen, N.A. et Tuchman, M.L. 1991. Anomalous diatom populations in Lakes Michigan and Huron in 1983. *Journal of Great Lakes Research* - **17**(1): 144-149.

Audry, S. 2003. Bilan géochimique du transport des éléments traces métalliques dans le système fluvial anthropisé Lot-Garonne-Gironde. - PhD thesis - Univ. Bordeaux I Ecole Doct. Sciences du vivant, Géosciences et Sciences de l'Environnement, 343p. + annexes.

Audry, S., Blanc, G. et Schafer, J. 2005. The impact of sulphide oxidation on dissolved metal (Cd, Zn, Cu, Cr, Co, Ni, U) inputs into the Lot-Garonne fluvial system (France). *Applied Geochemistry* - **20**(5): 919-931.

Audry, S., Blanc, G. et Schäfer, J. 2004a. Cadmium transport in the Lot-Garonne River system (France) - temporal variability and a model for flux estimation. *Science of the Total Environment* - **319**(1-3): 197-213.

Audry, S., Schäfer, J., Blanc, G., Bossy, C. et Lavaux, G. 2004b. Anthropogenic components of heavy metal (Cd, Zn, Cu, Pb) budgets in the Lot-Garonne fluvial system (France). *Applied Geochemistry* - **19**(5): 769-786.

Audry, S., Schafer, J., Blanc, G. et Jouanneau, J.-M. 2004c. Fifty-year sedimentary record of heavy metal pollution (Cd, Zn, Cu, Pb) in the Lot River reservoirs (France). *Environmental Pollution* - **132**(3): 413-426.

## **B** \_\_\_\_\_

Baars, J.W. 1983. Autoecological investigations on freshwater diatoms. 1. Generation times of some species. *Archiv für Hydrobiologie - Supplement* - **67**: 11-18.

Baos, R., Garcia-Villada, L., Agrelo, M., Lopez-Rodas, V., Hiraldo, F. et Costas, E. 2003. Short-term adaptation of microalgae in highly stressful environments : an experimental model analysing the resistance of *Scenedesmus intermedius* (Chlorophyceae) to the heavy metals mixture from the Aznalcollar mine spill. *European Journal of Phycology* - **37**(4): 593-600.

Barbault, R. 1992. Ecologie des peuplements. Structure, dynamique et évolution. - Masson, Paris.

Barranguet, C., Plans, M., van der Grinten, E., Sinke, J.J. et Admiraal, W. 2002. Development of photosynthetic biofilms affected by dissolved and sorbed copper in a eutrophic river. *Environmental Toxicology and Chemistry* - **21**(9): 1955-1965.

- Barranguet, C., van den Ende, F.P., Rutgers, M., Breure, A.M., Greijdanus, M., Sinke, J.J. et Admiraal, W. 2003. Copper-induced modifications of the trophic relations in riverine algal-bacterial biofilms. *Environmental Toxicology and Chemistry* - **22**(6): 1340-1349.
- Bate, N. et Newall, P. 2002. Techniques for the use of diatoms in water quality assessment: how many valves? - In: John, J. (ed.) Proceedings of the 15th International Diatom Symposium. Ganter, A.R.G. Verlag K.G., 153-160.
- Baudrimont, M., Andres, S., Durrieu, G. et Boudou, A. 2003a. The key role of metallothioneins in the bivalve *Corbicula fluminea* during the depuration phase, after *in situ* exposure to Cd and Zn. *Aquatic Toxicology* - **63**(2): 89-102.
- Baudrimont, M., Andres, S., Metivaud, J., Lapaquellerie, Y., Ribeyre, F., Maillet, N., Latouche, C. et Boudou, A. 1999. Field transplantation of the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* along a polymetallic contamination gradient (river Lot, France): II. Metallothionein response to metal exposure. *Environmental Toxicology and Chemistry* - **18**(11): 2472-2477.
- Baudrimont, M., Schäfer, J., Marie, V., Maury-Brachet, R., Bossy, C., Boudou, A. et Blanc, G. 2005. Geochemical survey and metal bioaccumulation of three bivalve species (*Crassostrea gigas*, *Cerastoderma edule* and *Ruditapes philippinarum*) in the Nord Medoc salt marshes (Gironde estuary, France). *Science of the Total Environment* - **337**(1-3): 265-280.
- Baudrimont, M., Schäfer, J., Marie, V., Maury-Brachet, R., Bossy, C., Durrieu, G., Palvadeau, A., Maneux, E., Boudou, A. et Blanc, G. 2003b. Cadmium contamination of three bivalve species (oysters, cockles and clams) in Nord Medoc salt marshes (Gironde estuary, France): Geochemical survey and metal bioaccumulation kinetics. *Journal De Physique IV* - **107**: 135-138.
- Behra, R., Landwehrjohann, R., Vogel, K., Wagner, B. et Sigg, L. 2002. Copper and zinc content of periphyton from two rivers as a function of dissolved metal concentration. *Aquatic Sciences - Research Across Boundaries* - **64**(3): 300-306.
- Berard, A., Pelte, T., Menthon, E., Druart, J.C. et Bourrain, X. 1998. Caractérisation du phytoplancton de deux systèmes limniques vis-à-vis d'un herbicide inhibiteur de la photosynthèse. La méthode PICT (Pollution-Induced Community Tolerance): application et signification. *Annales de Limnologie (International Journal of Limnology)* - **34**(3): 269-282.
- Berland, B.R., Bonin, D.J., Guerin-Ancey, O.J., Kapkov, V.I. et Arlhac, D.P. 1977. Action de métaux lourds à des doses sublétales sur les caractéristiques de la croissance chez la diatomée *Skeletonema costatum*. *Marine Biology* - **42**: 17-30.
- Bertrand, J. 1995. Contribution à l'étude taxonomique des diatomées. Reconnaissance du vivant. *Vie et Milieu (Life and Environment)* - **45**(3/4): 283-293.
- Bertrand, M., Schoefs, B., Siffel, P., Rohacek, K. et Molnar, I. 2001. Cadmium inhibits epoxidation of diatoxanthin to diadinoxanthin in the xanthophyll cycle of the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *FEBS Letters* - **508**(1): 153-156.

Blanc, G. 2005. Quantification des sources de cadmium dans le bassin versant de Decazeville - Agence de l'Eau Adour-Garonne, 90.

Blanc, G., Bossy, C., Lavaux, G., Lissalde, J.P., Maneux, E. et Schäfer, J. 2003. Suivi des flux de cadmium dans le Riou-Mort, le Lot et la Garonne - Année 2003. - Agence de l'Eau Adour-Garonne, 94.

Blanc, G., Lapaquellerie, Y., Maillet, N. et Anschutz, P. 1999. A cadmium budget for the Lot-Garonne fluvial system (France). *Hydrobiologia* - **410**: 331-341.

Blanc, G., Schäfer, J., Audry, S., Robert, S., Bossy, C., Lavaux, G., Lissalde, J.P. et Maneux, E. 2006. La ballade du cadmium dans le système Lot-Garonne-Gironde : flux naturels et anthropisation. - In: GIS ECOBAG (ed.) Système fluvio-estuarien de la Gironde, 14-20.

Blanck, H., Admiraal, W., Cleven, R.F.M.J., Guasch, H., van den Hoop, M., Ivorra, N., Nystrom, B., Paulsson, M., Petterson, R.P., Sabater, S. et Tubbing, G.M.J. 2003. Variability in zinc tolerance, measured as incorporation of radio-labeled carbon dioxide and thymidine, in periphyton communities sampled from 15 European river stretches. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* - **44**(1): 17-29.

Blanck, H., Wängberg, S.A. et Molander, S. 1988. Pollution-Induced Community Tolerance - A new ecotoxicological tool. - In: Functional Testing of Aquatic Biota for estimating Hazards of Chemicals. Cairns J. Jr, Pratt J.R. (Eds), 219-230.

Boivin, M.E., Breure, T. et Rutgers, M. 2001. Adaptation to toxicants and ecological performance of microbial communities. *Stimulation Programme System-oriented Ecotoxicological Research Newsletter* - **4**: 4-6.

Boutier, B., Chiffolleau, J.-F., Jouanneau, J.C., Latouche, C. et Philipps, I. 1989. La contamination de la Gironde par le cadmium. Origine, extension, importance. - Sci Tech. IFREMER.

Brosse, S., Giraudel, J.L. et Lek, S. 2001. Utilisation of non-supervised neural networks and principal component analysis to study fish assemblages. *Ecological Modelling* - **146**(1-3): 159-166.

Bruno, J.F., Stachowicz, J.J. et Bertness, M.D. 2003. Inclusion of facilitation into ecological theory. *Trends in Ecology & Evolution* - **18**(3): 119-125.

## C

---

Campbell, P.G.C., Errecalde, O., Fortin, C., Hiriart-Baer, W.R. et Vigneault, B. 2002. Metal bioavailability to phytoplankton - applicability of the biotic ligand model. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology* - **133**(1-2): 189-206.

Cardozo, K.H.M., De Oliveira, M.A.L., Tavares, M.F.M., Colepicolo, P. et Pinto, E. 2002. Daily oscillation of fatty acids and malondialdehyde in the dinoflagellate *Lingulodinium polyedrum*. *Biological Rhythm Research* - **33**(4): 371-381.

- Cattaneo, A., Asioli, A., Comoli, P. et Manca, M. 1998. Organisms' response in a chronically polluted lake supports hypothesized link between stress and size. *Limnology and Oceanography* - **43**(8): 1938-1943.
- Cattaneo, A., Couillard, Y., Wunsam, S. et Courcelles, M. 2004. Diatom taxonomic and morphological changes as indicators of metal pollution and recovery in Lac Dufault (Québec, Canada). *Journal of Paleolimnology* - **32**: 163-175.
- Cazaubon, A. 1991. Problems and objectives of sampling river algae for monitoring. - In: Whitton, B.A., Rott, E. et Friedrich, G. (eds.), Use of algae for monitoring rivers. Institut für Botanik, Universität Innsbruck, 17-20.
- Cemagref. 1982. Etude des méthodes biologiques d'appréciation quantitative de la qualité des eaux. - Rapport Q.E. Lyon A.F. - Bassin Rhône-Méditerranée-Corse, 218.
- Chang, S.I. et Reinfelder, J.R. 2000. Bioaccumulation, subcellular distribution and trophic transfer of copper in a coastal marine diatom. *Environmental Science & Technology* - **34**(23): 4931-4935.
- Charles, D.F., Knowles, C. et Davies, R.S. 2002. Protocols for the analysis of algal samples collected as part of the U.S. Geological Survey National Water-Quality Assessment Program. - Patrick Center for Environmental Research, The Academy of Natural Sciences, Philadelphia, PA.
- Charles, D.F. et Smol, J.P. 1994. Long-term chemical changes in lakes - Quantitative inferences from biotic remains in the sediment record. - In: Environmental Chemistry of Lakes and Reservoirs. Amer Chemical Soc, 3-31.
- Codina, J.C., Cazorla, F.M., Perez-Garcia, A. et de Vicente, A. 2000. Heavy metal toxicity and genotoxicity in water and sewage determined by microbiological methods. *Environmental Toxicology and Chemistry* - **19**(6): 1552-1558.
- Colwell, F.S., Hornor, S.G. et Cherry, D.S. 1989. Evidence of structural and functional adaptation in epilithon exposed to zinc. *Hydrobiologia* - **171**: 79-90.
- Conner, S.D. et Schmid, S.L. 2003. Regulated portals of entry into the cell. *Nature* - **422**(6927): 37-44.
- Conway, H.L. 1978. Sorption of arsenic and cadmium and their effects on growth, micronutrient utilization, and photosynthetic pigment composition of *Asterionella formosa*. *Journal of Fisheries Research Board of Canada* - **35**(3): 286-294.
- Conway, H.L. et Williams, S.C. 1979. Sorption of cadmium and its effects on growth and the utilization of inorganic carbon and phosphorus of two freshwater diatoms. *Journal of Fisheries Research Board of Canada* - **36**(5): 579-586.
- Coste, M. 1999. Atlas des diatomées pour la mise en œuvre de l'Indice Biologique Diatomées (IBD). - Agences de l'Eau - Cemagref QEBX Bordeaux, 130.

Cox, E.J. 1996. Identification of Freshwater Diatoms from live material. - Chapman & Hall London.

Coynel, A. 2005. Erosion mécanique des sols et transferts géochimiques dans le bassin Adour-Garonne. - PhD thesis - Univ. Bordeaux I Ecole Doct. Sciences du vivant, Géosciences et Sciences de l'Environnement.

Coynel, A., Schafer, J., Hurtrez, J.E., Dumas, J., Etcheber, H. et Blanc, G. 2004. Sampling frequency and accuracy of SPM flux estimates in two contrasted drainage basins. *Science of the Total Environment* - **330**(1-3): 233-247.

Cunningham, L., Raymond, B., Snape, I. et Riddle, M.J. 2005. Benthic diatom communities as indicators of anthropogenic metal contamination at Casey Station, Antarctica. *Journal of Paleolimnology* - **33**(4): 499-513.

Cunningham, L., Stark, J.S., Snape, I., McMinn, A. et Riddle, M.J. 2003. Effects of metal and petroleum hydrocarbon contamination on benthic diatom communities near Casey Station, Antarctica: An experimental approach. *Journal of Phycology* - **39**(3): 490-503.

## D

---

De Filippis, L.F. et Pallaghy, C.K. 1994. Heavy metals : Sources and Biological effects. - In: Rai, L.C., Gaur, J.P. et Soeder, C.J. (eds.), Algae and water pollution. E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, 31-77.

De La Rocha, C.L., Hutchins, D.A., Brzezinski, M.A. et Zhang, Y.H. 2000. Effects of iron and zinc deficiency on elemental composition and silica production by diatoms. *Marine Ecology-Progress Series* - **195**: 71-79.

Debenest, T. 2004. Caractérisation de descripteurs globaux et phénotypiques simples et pertinents de l'impact de pollutions polymétalliques (Cd et Zn) sur les phytocénoses de diatomées benthiques. - ENSA de Toulouse, 65p. + annexes.

Debenest, T. *en cours*. Caractérisation et modélisation de l'impact des pollutions agricoles (trophiques, toxiques) sur les cortèges de diatomées benthiques à l'aide de nouvelles méthodes de bioindication. Application aux cours d'eau de la zone-pilote des Côteaux de Gascogne.

Decho, A.W. 2000. Microbial biofilms in intertidal systems: an overview. *Continental Shelf Research* - **20**(10-11): 1257-1273.

Descy, J.P. et Coste, M. 1991. A test of methods for assessing water quality based on diatoms. *Verhandlung Internationale Vereinigung Limnologie* - **24**(4): 2112-2116.

Di Toro, D.M., Allen, H.E., Bergman, H.L., Meyer, J.S., Paquin, P.R. et Santore, R.C. 2001. Biotic ligand model of the acute toxicity of metals. 1. Technical basis. *Environmental Toxicology and Chemistry* - **20**(10): 2383-2396.

Dickman, M.D. 1998. Benthic marine diatom deformities associated with contaminated sediments in Hong Kong. *Environment International* - **24**(7): 749-759.



Dixit, S.S., Smol, J.P., Kingston, J.C. et Charles, D.F. 1992. Diatoms - Powerful Indicators of Environmental change. *Environmental Science & Technology* - **26**(1): 22-33.

Duke, E.L. et Reimann, B.E.F. 1977. Chapter 3: The ultrastructure of the diatom cell. - In: Werner, D. (ed.) The Biology of Diatoms. Bot. Monogr. 13. Blackwell Sci. Publ., 65-109.

Duong, T.T., Coste, M., Feurtet-Mazel, A., Dang, D.K., Gold, C., Park, Y.S. et Boudou, A. 2006. Impact of urban pollution from the Hanoi area on benthic diatom communities collected from the Red, Nhue and Tolich rivers (Vietnam). *Hydrobiologia* - **563**: 201-216.

## E \_\_\_\_\_

Edlund, M.B. et Stoermer, E.F. 1997. Ecological, evolutionary and systematic significance of diatom life histories. *Journal of Phycology* - **33**(6): 897-918.

Eppley, R.W. 1977. Chapter 2: The growth and culture of diatoms. - In: The Biology of Diatoms. Bot. Monogr. 13. Blackwell Sci. Publ., 24-64.

Ernst, W.H.O., Verkleij, J.A.C. et Schat, H. 1992. Metal tolerance in plants. *Acta Botanica Neerlandica* - **41**(3): 229-248.

Estes, A. et Dute, R.R. 1994. Valve abnormalities in diatom clones maintained in long-term culture. *Diatom Research* - **9**(2): 249-258.

## F \_\_\_\_\_

Feldt, L.E., Stoermer, E.F. et Schelske, C.L. 1973. Occurrence of morphologically abnormal *Synedra* populations in Lake Superior phytoplankton. *Proc. 16th Conf. Great Lakes Res.* -: 34-39.

Ferreira Da Silva, E., De Almeida, S.F.P., Nunes, M.L., Patinha, C., Borg, F. et Hedlund, M. unpubl. Response of stream diatom communities along a gradient of metal pollution resulting from old mining activities (coval da mo mine - Portugal). -.

Feurtet-Mazel, A., Gold, C., Coste, M. et Boudou, A. 2003. Study of periphytic diatom communities exposed to metallic contamination through complementary field and laboratory experiments. *Journal De Physique IV* - **107**: 467-470.

Fisher, N.S., Jones, G.J. et Nelson, D.M. 1981. Effects of copper and zinc on growth, morphology, and metabolism of *Asterionella japonica* (Cleve). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* - **51**: 37-56.

Fisher, S.G., Grimm, N.B., Martí, E., Holmes, R.M. et Jones, J.B.J. 1998. Material spiraling in stream corridors: a Telescoping Ecosystem Model. *Ecosystems* - **1**(1): 19-34.

Fore, L.S. et Grafe, C. 2002. Using diatoms to assess the biological condition of large rivers in Idaho (U.S.A.). *Freshwater Biology* - **47**(10): 2015-2037.

Foster, P.L. 1982. Species associations and metal contents of algae from rivers polluted by heavy metals. *Freshwater Biology* - **12**: 17-39.

Fuchs, S., Haritopoulou, T. et Wilhelmi, M. 1996. Biofilms in freshwater ecosystems and their use as a pollutant monitor. *Water Science and Technology* - **34**(7-8): 137-140.

## G

---

Gaur, J.P. et Rai, L.C. 2001. Heavy metal tolerance in algae. - In: L.C. Rai and J.P. Gaur Editors (ed.) Algal Adaptation to Environmental Stresses: Physiological, Biochemical and Molecular Mechanisms. Springer-Verlag, 363-388.

Gensemer, R.W. 1990. Role of aluminium and growth rate on changes in cell size and silica content of silica-limited populations of *Asterionella ralfsii* var. *americana* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology* - **26**: 250-258.

Genter, R.B. 1995. Benthic algal populations respond to aluminium, acid, and aluminium- acid mixtures in artificial streams. *Hydrobiologia* - **306**: 7-19.

Genter, R.B. et Amyot, D.J. 1994. Freshwater benthic algal population and community changes due to acidity and aluminum-acid mixtures in artificial streams. *Environmental Toxicology and Chemistry* - **13**(3): 369-380.

Genter, R.B., Cherry, D.S., Smith, E.P. et Jr, J.C. 1987. Algal periphyton population and community changes from zinc stress in stream mesocosms. *Hydrobiologia* - **153**: 261-275.

Genter, R.B. et Lehman, R.M. 2000. Metal toxicity inferred from algal population density, heterotrophic substrate use, and fatty acid profile in a small stream. *Environmental Toxicology and Chemistry* - **19**(4): 869-878.

Gerringa, L.J.A., Rijstenbil, J.W., Poortvliet, T.C.W., Vandrie, J. et Schot, M.C. 1995. Speciation of copper and responses of the marine diatom *Ditylum brightwellii* upon increasing copper concentrations. *Aquatic Toxicology* - **31**(1): 77-90.

Ghosh, M. et Gaur, J.P. 1998. Current velocity and the establishment of stream algal periphyton communities. *Aquatic Botany* - **60**(1): 1-10.

Gold, C. 2002. Etude des effets de la pollution métallique (Cd/Zn) sur la structure des communautés de diatomées périphytiques des cours d'eau. Approches expérimentales *in situ* et en laboratoire. - PhD thesis - Univ. Bordeaux I Ecole Doct. Sciences du vivant, Géosciences et Sciences de l'Environnement, 175.

Gold, C., Feurtet-Mazel, A., Coste, M. et Boudou, A. 2002. Field transfer of periphytic diatom communities to assess short-term structural effects of metals (Cd,Zn) in rivers. *Water Research* - **36**(14): 3654-3664.

Gold, C., Feurtet-Mazel, A., Coste, M. et Boudou, A. 2003a. Effects of cadmium stress on periphytic diatom communities in indoor artificial streams. *Freshwater Biology* - **48**: 316-328.

- Gold, C., Feurtet-Mazel, A., Coste, M. et Boudou, A. 2003b. Impacts of Cd and Zn on the development of periphytic diatom communities in artificial streams located along a river pollution gradient. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* - **44**: 189-197.
- Gomez, N. et Licursi, M. 2003. Abnormal forms in *Pinnularia gibba* (Bacillariophyceae) in a polluted lowland stream from Argentina. *Nova Hedwigia* - **77**(3-4): 389-398.
- Gonzalezdavila, M. 1995. The role of phytoplankton cells on the control of heavy-metal concentration in seawater. *Marine Chemistry* - **48**(3-4): 215-236.
- Grachev, M., Sherbakova, T., Masyukova, Y. et Likhoshway, Y. 2005. A potential zinc-binding motif in silicic acid transport proteins of diatoms. *Diatom Research* - **20**(2): 409-411.
- Griffith, M.B., Hill, B.H., McCormick, F.H., Kaufmann, P.R., Herlihy, A.T. et Selle, A.R. 2005. Comparative application of indices of biotic integrity based on periphyton, macroinvertebrates, and fish to southern Rocky Mountain streams. *Ecological Indicators* - **5**(2): 117-136.
- Guanzon, N.G., Nakahara, H. et Nishimura, K. 1995. Accumulation of copper, zinc, cadmium, and their combinations by 3 freshwater microalgae. *Fisheries Science* - **61**(1): 149-156.
- Guanzon, N.G., Nakahara, H. et Yoshida, Y. 1994. Inhibitory effects of heavy-metals on growth and photosynthesis of 3 freshwater microalgae. *Fisheries Science* - **60**(4): 379-384.
- Guasch, H., Admiraal, W. et Sabater, S. 2003. Contrasting effects of organic and inorganic toxicants on freshwater periphyton. *Aquatic Toxicology* - **64**(2): 165-175.
- Guasch, H., Ivorra, N., Lehmann, V., Paulsson, M., Real, M. et Sabater, S. 1998. Community composition and sensitivity of periphyton to atrazine in flowing waters: the role of environmental factors. *Journal of Applied Phycology* - **10**(2): 203-213.
- Guasch, H., Navarro, E., Serra, A. et Sabater, S. 2004. Phosphate limitation influences the sensitivity to copper in periphytic algae. *Freshwater Biology* - **49**(4): 463-473.
- Guasch, H. et Sabater, S. 1998. Light history influences the sensitivity to atrazine in periphytic algae. *Journal of Phycology* - **34**(2): 233-241.
- Gueguen, C., Gilbin, R., Pardos, M. et Dominik, J. 2004. Water toxicity and metal contamination assessment of a polluted river: the Upper Vistula River (Poland). *Applied Geochemistry* - **19**(1): 153-162.
- Gustavson, K. et Wangberg, S.-A. 1995. Tolerance induction and succession in microalgae communities exposed to copper and atrazine. *Aquatic Toxicology* - **32**(4): 283-302.
- Güttinger, W. 1999. Diatoms on CD-ROM. *Cymbella / Encyonema and Navicula*. - Koeltz Scientific.

**H**

Hart, B.A. et Scaifes, B.D. 1977. Toxicity and bioaccumulation of cadmium in *Chlorella pyrenoidosa*. *Environmental Research* - **14**: 401-413.

Heijerick, D.G., De Schamphelaere, K.A.C. et Janssen, C.R. 2002. Biotic ligand model development predicting Zn toxicity to the alga *Pseudokirchneriella subcapitata*: possibilities and limitations. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology* - **133**(1-2): 207-218.

Hellawell, J.M. 1978. Biological surveillance of rivers : a biological monitoring handbook. - Water Research Centre, Hertz, 332.

Hellebust, J.A. et Lewin, J. 1977. Chapter 6: Heterotrophic nutrition. - In: Werner, D. (ed.) The Biology of Diatoms. Bot. Monogr. 13. Blackwell Sci. Publ., 169-197.

Hill, B.H., Herlihy, A.T., Kaufmann, P.R., DeCelles, S.J. et Vander Borgh, M.A. 2003. Assessment of streams of the eastern United States using a periphyton index of biotic integrity. *Ecological Indicators* - **2**(4): 325-338.

Hill, B.H., Herlihy, A.T., Kaufmann, P.R., Stevenson, R.J., McCormick, F.H. et Johnson, C.B. 2000a. Use of periphyton assemblage data as an index of biotic integrity. *Journal of the North American Benthological Society* - **19**(1): 50-67.

Hill, B.H., Willingham, W.T., Parrish, L.P. et McFarland, B.H. 2000b. Periphyton community responses to elevated metal concentrations in a Rocky Mountain stream. *Hydrobiologia* - **428**(1-3): 161-169.

Hill, W.R. 1996. Factors affecting benthic algae. Effects of light. - In: Stevenson, R.J., Bothwell, M.L. et Lowe, R.L. (eds.), Algal ecology. Freshwater benthic ecosystems. Academic Press, San Diego, CA, 121-144.

Hill, W.R., Bednarek, A.T. et Larsen, I.L. 2000c. Cadmium sorption and toxicity in autotrophic biofilms. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* - **57**(3): 530-537.

Hirata, K., Tsujimoto, Y., Namba, T., Ohta, T., Hirayanagi, N., Miyasaka, H., Zenk, M.H. et Miyamoto, K. 2001. Strong induction of phytochelatin synthesis by zinc in marine green alga, *Dunaliella tertiolecta*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* - **92**(1): 24-29.

Hirst, H., Jüttner, I. et Ormerod, S.J. 2002. Comparing the responses of diatoms and macroinvertebrates to metals in upland streams of Wales and Cornwall. *Freshwater Biology* - **47**(9): 1752-1765.

Hoagland, K.D., Rosowski, J.R., Gretz, M.R. et Roemer, S.C. 1993. Diatom extracellular polymeric substances : function, fine structure, chemistry and physiology. *Journal of Phycology* - **29**: 537-566.

Holding, K.L., Gill, R.A. et Carter, J. 2003. The relationship between epilithic periphyton (biofilm) bound metals and metals bound to sediments in freshwater systems. *Environmental Geochemistry and Health* - **25**(1): 87-93.

Hudson, R.J.M. 2005. Trace metal uptake, natural organic matter, and the free-ion model. *Journal of Phycology* - **41**(1): 1-4.

Husaini, Y. et Rai, L.C. 1991. Studies on nitrogen and phosphorus-metabolism and the photosynthetic electron-transport system of *Nostoc linckia* under cadmium stress. *Journal of Plant Physiology* - **138**(4): 429-435.

## I —————

IFREMER. 2005a. Résultats de la surveillance de la qualité du milieu marin littoral - Départements : Charente-Maritime & Vendée (sud). - In: Environnement, I. (ed.). - Laboratoire Environnement Ressources des Pertuis Charentais, 70.

IFREMER. 2005b. Résultats de la surveillance de la qualité du milieu marin littoral - Départements : Gironde, Landes et Pyrénées-Atlantiques. - In: Environnement, I. (ed.). - Laboratoire côtier d'Arcachon, 76.

Interlandi, S.J. 2002. Nutrient-toxicant interactions in natural and constructed phytoplankton communities: results of experiments in semi-continuous and batch culture. *Aquatic Toxicology* - **61**(1-2): 35-51.

Ivorra, N. 2000. Metal induced succession in benthic diatom consortia. - PhD thesis - University of Amsterdam, Faculty of Science, Department of Aquatic Ecology and Ecotoxicology, 157.

Ivorra, N., Barranguet, C., Jonker, M., Kraak, M.H.S. et Admiraal, W. 2002a. Metal-induced tolerance in the freshwater microbenthic diatom *Gomphonema parvulum*. *Environmental Pollution* - **116**(1): 147-157.

Ivorra, N., Bremer, S., Guasch, H., Kraak, M.H.S. et Admiraal, W. 2000. Differences in the sensitivity of benthic microalgae to Zn and Cd regarding biofilm development and exposure history. *Environmental Toxicology and Chemistry* - **19**(5): 1332-1339.

Ivorra, N., Hettelaar, J., Kraak, M.H.S., Sabater, S. et Admiraal, W. 2002b. Responses of biofilms to combined nutrient and metal exposure. *Environmental Toxicology and Chemistry* - **21**(3): 626-632.

Ivorra, N., Hettelaar, J., Tubbing, G.M.J., Kraak, M.H.S., Sabater, S. et Admiraal, W. 1999. Translocation of microbenthic algal assemblages used for *in situ* analysis of metal pollution in rivers. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* - **37**(1): 19-28.

## J —————

John, J. 1998. Evaluation of attached diatoms as a tool for riverine bio-assessment of water quality. - LWRRDC, 175.

John, J. 2000a. Diatom prediction and classification system for urban streams. - LWRRDC, 156.

John, J. 2000b. A guide to diatoms as indicators of urban stream health. - LWRRDC, 181.

Jørgensen, E.G. 1977. Chapter 5: Photosynthesis. - In: Werner, D. (ed.) The Biology of Diatoms. Bot. Monogr. 13. Blackwell Sci. Publ., 150-168.

Joux-Arab, L., Berthet, B. et Robert, J.M. 2000. Do toxicity and accumulation of copper change during size reduction in the marine pennate diatom *Haslea ostrearia*? *Marine Biology* - **136**(2): 323-330.

## K

---

Khoshmanesh, A., Lawson, F. et Prince, I.G. 1997. Cell surface area as a major parameter in the uptake of cadmium by unicellular green microalgae. *Chemical Engineering Journal* - **65**(1): 13-19.

Knauer, K., Ahner, B., Xue, H.B. et Sigg, L. 1998. Metal and phytochelatin content in phytoplankton from freshwater lakes with different metal concentrations. *Environmental Toxicology and Chemistry* - **17**(12): 2444-2452.

Kooistra, W. et Medlin, L.K. 1996. Evolution of the diatoms (Bacillariophyta). 4. Reconstruction of their age from small subunit rRNA coding regions and the fossil record. *Molecular Phylogenetics and Evolution* - **6**(3): 391-407.

Krammer, K. et Lange-Bertalot, H. 1986 - 1991. Bacillariophyceae 1. Teil: Naviculaceae. 876 p.; 2. Teil: Bacillariaceae, Epithemiaceae, Surirellaceae, 596 p.; 3. Teil: Centrales, Fragilariaceae, Eunotiaceae, 576 p.; 4. Teil: Achnanthaceae. Kritische Ergänzungen zu *Navicula* (Lineolatae) und *Gomphonema*. 437 p. - G. Fischer Verlag.

## L

---

Lafont, M. 2001. A conceptual approach to the biomonitoring of freshwater: the Ecological Ambience System. *Journal of Limnology* - **60**(Suppl. 1): 17-24.

Lage, O.M., Soares, H.M.V.M., Vasconcelos, M.T.S.D., Parente, A.M. et Salema, R. 1996. Toxicity effects of copper(II) on the marine dinoflagellate *Amphidinium carterae*: Influence of metal speciation. *European Journal of Phycology* - **31**(4): 341-348.

Lai, S.D., Chen, P.C. et Hsu, H.K. 2003. Benthic algae as monitors of heavy metals in various polluted rivers by energy dispersive X-ray spectrometer. *Journal of Environmental Science and Health Part A: Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering* - **38**(5): 855-866.

Lane, T.W. et Morel, F.M.M. 2000. A biological function for cadmium in marine diatoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* - **97**(9): 4627-4631.

Lange-Bertalot, H. 1979. Pollution tolerance of diatoms as a criterion for water quality estimation. *Nova Hedwigia* - **64**: 285-304.

- Lapaquellerie, Y., Jouanneau, J.M., Maillet, N. et Latouche, C. 1995. Cadmium pollution in sediments of the Lot river (France). Estimate of the mass of cadmium. *Environmental Technology* - **16**(12): 1145-1154.
- Lapaquellerie, Y. et Maillet, N. 1993. Evaluation du cadmium stocké dans les sédiments fins de la zone aval du bassin du Lot. Etude de son éventuelle remobilisation. - DGO, 17.
- Lapaquellerie, Y., Maillet, N., Jouanneau, J.M., Coakley, J.P. et Latouche, C. 1996. Flux de matières en suspension et de cadmium dans le Lot. *Hydroécologie Appliquée* - **8**(1-2): 173 - 191.
- Latouche, C. 1992. La pollution par le cadmium des huîtres sauvages de l'Estuaire de la Gironde. Origine. Mécanismes responsables de la fixation du cadmium. *Ichthyophysiological Acta* - **15**: 139 -152.
- Laviale, M. *en cours*. Mise au point d'un test biologique de terrain détectant une contamination récente de rivière par l'estimation de l'état physiologique des communautés phytoplanctoniques et microphytobenthiques.
- Lawrence, J.R., Chenier, M.R., Roy, R., Beaumier, D., Fortin, N., Swerhone, G.D.W., Neu, T.R. et Greer, C.W. 2004. Microscale and molecular assessment of impacts of nickel, nutrients, and oxygen level on structure and function of river biofilm communities. *Applied and Environment Microbiology* - **70**(7): 4326-4339.
- Lecoite, C., Coste, M. et Prygiel, J. 1993. Omnidia - Software for taxonomy, calculation of diatom indexes and inventories management. *Hydrobiologia* - **269**: 509-513.
- Lee, J.G., Ahner, B.A. et Morel, F.M.M. 1996. Export of cadmium and phytochelatin by the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*. *Environmental Science & Technology* - **30**(6): 1814-1821.
- Lee, J.G., Roberts, S.B. et Morel, F.M.M. 1995. Cadmium - A nutrient for the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*. *Limnology and Oceanography* - **40**(6): 1056-1063.
- Lehmann, V., Tubbing, G.M.J. et Admiraal, W. 1999. Induced metal tolerance in microbenthic communities from three lowland rivers with different metal loads. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* - **36**(4): 384-391.
- Leland, H.V. et Carter, J.J. 1984. Effects of copper on species composition of periphyton in a Sierra Nevada, California, stream. *Freshwater Biology* - **14**: 281-296.
- Lemaire, E., Blanc, G., Schäfer, J., Coynel, A. et Etcheber, H. 2006. Dissolved Trace Metal-Organic Complexes in the Lot-Garonne River System Determined Using the C18 Sep-Pak System. *Aquatic Geochemistry* - **12**(1): 21-38.
- Lenoir, A. et Coste, M. 1996. Development of a practical diatom index of overall water quality applicable to the French national water Board network. - In: Whitton, B.A. et Rott, E. (eds.), Use of Algae for monitoring rivers II. Studia Student. G.m.b.H., 29-43.

Lindstrøm, E.-A. et Rørslett, B. 1991. The effects of heavy metal pollution on periphyton in a Norwegian soft-water river. *Verhandlung Internationale Vereinigung Limnologie* - **24**: 2215-2219.

Lortie, C.J., Brooker, R.W., Choler, P., Kikvidze, Z., Michalet, R., Pugnaire, F.I. et Callaway, R.M. 2004. Rethinking plant community theory. *Oikos* - **107**(2): 433-438.

Lozano, R.B. et Pratt, J.R. 1994. Interaction of toxicants and communities - the role of nutrients. *Environmental Toxicology and Chemistry* - **13**(3): 361-368.

## M

---

Marie, V., Baudrimont, M. et Boudou, A. accepted. Cadmium and zinc bioaccumulation and metallothionein response in two freshwater bivalves (*Corbicula fluminea* and *Dreissena polymorpha*) transplanted along a polymetallic gradient. *Chemosphere* - .

McCune, B. et Mefford, M.J. 1999. Multivariate analysis of ecological data, version 4.01. - MJM Software, Gleneden Beach, Oregon USA.

McFarland, B.H., Hill, B.H. et Willingham, W.T. 1997. Abnormal *Fragilaria* spp. (Bacillariophyceae) in streams impacted by mine drainage. *Journal of Freshwater Ecology* - **12**(1): 141-149.

McQuoid, M.R. 2002. Pelagic and benthic environmental controls on the spatial distribution of a viable diatom propagule bank on the Swedish west coast. *Journal of Phycology* - **38**(5): 881-893.

Medley, C.N. et Clements, W.H. 1998. Responses of diatom communities to heavy metals in streams: The influence of longitudinal variation. *Ecological Applications* - **8**(3): 631-644.

Meharg, A.A. 1994. Integrated tolerance mechanisms - Constitutive and adaptive plant responses to elevated metal concentrations in the environment. *Plant Cell and Environment* - **17**(9): 989-993.

Meylan, S., Behra, R. et Sigg, L. 2003. Accumulation of copper and zinc in periphyton in response to dynamic variations of metal speciation in freshwater. *Environmental Science & Technology* - **37**(22): 5204-5212.

Michalet, R., Brooker, R.W., Cavieres, L.A., Kikvidze, Z., Lortie, C.J., Pugnaire, F.I., Valiente-Banuet, A. et Callaway, R.M. 2006. Do biotic interactions shape both sides of the humped-back model of species richness in plant communities? *Ecology Letters* - **9**(7): 767-773.

Monteiro, M.T., Oliveira, R. et Vale, C. 1995. Metal stress on the plankton communities of Sado River (Portugal). *Water Research* - **29**(2): 695-701.

Morel, F.M.M. 1983. Principles of aquatic chemistry. - John Wiley & Sons.

Morel, F.M.M., Hudson, R.J.M. et Price, N.M. 1991. Limitation of productivity by trace-metals in the sea. *Limnology and Oceanography* - **36**(8): 1742-1755.



Morelli, E. et Pratesi, E. 1997. Production of phytochelatins in the marine diatom *Phaeodactylum tricornerutum* in response to copper and cadmium exposure. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* - **59**(4): 657-664.

Morin, S. 2003. Amélioration des techniques de bioindication diatomique et d'analyse des données, appliquées à la révélation des effets des pollutions à toxiques. - ENITA de Bordeaux, 70p. + annexes.

Morin, S. et Coste, M. 2006a. Atlas des diatomées du bassin versant du Riou-Mort. - Cemagref Bordeaux, 109.

Morin, S. et Coste, M. 2006b. Metal-induced shifts in the morphology of diatoms from the Riou-Mort and Riou-Viou streams (South West France). - In: Ács, É., Kiss, K.T., Padisák, J. et Szabó, K. É. (eds.), *Use of algae for monitoring rivers VI*, Hungarian Algological Society, Göd, Hungary, 97-106.

Morin, S., Delmas, F., Coste, M. et Giraudel, J.L. 2004. Impact de différents produits toxiques sur les communautés de diatomées épilithiques des rivières-pilotes de Lacq. Rapport final - tranche 2003. - UR Qualité des eaux, Cemagref, 67.

Morin, S., Vivas-Nogues, M., Duong, T.T., Boudou, A., Coste, M. et Delmas, F. 2006. Dynamics of benthic diatom colonization in a cadmium/zinc-polluted river (Riou-Mort, France). *Archiv für Hydrobiologie* - **(accepted)**.

Muller, F.L.L., Larsen, A., Stedmon, C.A. et Sondergaard, M. 2005. Interactions between algal-bacterial populations and trace metals in fjord surface waters during a nutrient-stimulated summer bloom. *Limnology and Oceanography* - **50**(6): 1855-1871.

## N \_\_\_\_\_

Nakanishi, Y., Sumita, M., Yumita, K., Yamada, T. et Honjo, T. 2004. Heavy-metal pollution and its state in algae in Kakehashi River and Godani River at the foot of Ogoya mine, Ishikawa prefecture. *Analytical Sciences* - **20**(1): 73-78.

Nalewajko, C. 1995. Effects of cadmium and metal-contaminated sediments on photosynthesis, heterotrophy, and phosphate uptake in MacKenzie river delta phytoplankton. *Chemosphere* - **30**(7): 1401-1414.

Nassiri, Y., Mansot, J.L., Wery, J., GinsburgerVogel, T. et Amiard, J.C. 1997. Ultrastructural and electron energy loss spectroscopy studies of sequestration mechanisms of Cd and Cu in the marine diatom *Skeletonema costatum*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* - **33**(2): 147-155.

Navarro, E., Guasch, H. et Sabater, S. 2002. Use of microbenthic algal communities in ecotoxicological tests for the assessment of water quality: the Ter river case study. *Journal of Applied Phycology* - **14**(1): 41-48.

Newman, M.C., Alberts, J.J. et Greenhut, V.A. 1985. Geochemical factors complicating the use of aufwuchs to monitor bioaccumulation of arsenic, cadmium, chromium, copper and zinc. *Water Research* - **19**(9): 1157-1165.

Niyogi, D.K., Lewis, W.M. et McKnight, D.M. 2002. Effects of stress from mine drainage on diversity, biomass, and function of primary producers in mountain streams. *Ecosystems* - **5**(6): 554-567.

Nunes, M.L., Da Silva, E.F. et De Almeida, S.F.P. 2003. Assessment of water quality in the Caima and Mau River basins (Portugal) using geochemical and biological indices. *Water Air and Soil Pollution* - **149**(1-4): 227-250.

## P

---

Parlement Européen. 2000. Directive 2000/60/CE du Parlement Européen et du Conseil du 23 Octobre 2000 établissant un cadre pour la politique communautaire dans le domaine de l'eau, J.O.C.E. du 22.12.2000, L327/1-L327/72.

Patrick, R. 1977. Chapter 10: Ecology of freshwater diatoms and diatom communities. - In: Werner, D. (ed.) *The Biology of Diatoms. Bot. Monogr. 13*. Blackwell Publ., 284-332.

Paulsson, M., Nystrom, B. et Blanck, H. 2000. Long-term toxicity of zinc to bacteria and algae in periphyton communities from the river Göta Älv, based on a microcosm study. *Aquatic Toxicology* - **47**(3-4): 243-257.

Pawlik-Skowronska, B. 2001. Phytochelatin production in freshwater algae *Stigeoclonium* in response to heavy metals contained in mining water; effects of some environmental factors. *Aquatic Toxicology* - **52**(3-4): 241-249.

Payne, C.D. et Price, N.M. 1999. Effects of cadmium toxicity on growth and elemental composition of marine phytoplankton. *Journal of Phycology* - **35**(2): 293-302.

Peres, F. 1996. Etude des effets de quatre contaminants: - herbicide (Isoproturon), dérivés du mercure (mercure inorganique, méthylmercure), cadmium - sur les communautés au sein de microcosmes d'eau douce. - PhD thesis - Univ. Paul Sabatier, Toulouse, 176p. + annexes.

Peres, F. 2000. Mise en évidence des effets toxiques des métaux lourds sur les diatomées par l'étude des formes tératogènes. - Rapport d'étude, Agence de l'Eau Artois Picardie, 24.

Peres, F., Coste, M., Ribeyre, F., Ricard, M. et Boudou, A. 1997. Effects of methylmercury and inorganic mercury on periphytic diatom communities in freshwater indoor microcosms. *Journal of Applied Phycology* - **9**(3): 215-227.

Peres, F., Coste, M., Ricard, M., Boudou, A. et Ribeyre, F. 1995. Effets des métaux lourds (Cd, Hg) sur les communautés de diatomées périphytiques développées sur substrats artificiels en microcosmes. *Vie et Milieu (Life and Environment)* - **45**(3/4): 210-230.

- Peres, F., Florin, D., Grollier, T., Feurtet-Mazel, A., Coste, M., Ribeyre, F., Ricard, M. et Boudou, A. 1996. Effects of the phenylurea herbicide isoproturon on periphytic diatom communities in freshwater indoor microcosm. *Environmental Pollution* - **94**(2): 141-152.
- Perrein-Ettajani, H., Amiard, J.C., Haure, J. et Renaud, C. 1999. Effects of metals (Ag, Cd, Cu) on the biochemical composition and compartmentalization of these metals in two microalgae *Skeletonema costatum* and *Tetraselmis suecica*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* - **56**(10): 1757-1765.
- Peterson, C.G. 1996. Mechanisms of lotic microalgal colonization following space-clearing disturbances acting at different spatial scales. *Oikos* - **77**(3): 417-435.
- Philipps, I. et Jouanneau, J.M. 1986. Cadmium et autres métaux lourds dans les bassins du Riou-Mort et du Lot : principaux résultats d'une campagne de mesures réalisée en janvier 1986. - In: Institut Géologique du Bassin d'Aquitaine (ed.). - Université de Bordeaux 1, 24.
- Pielou, E.C. 1975. Ecological diversity. - Wiley, New York.
- Pinto, E., Sigaud-Kutner, T.C.S., Leitao, M.A.S., Okamoto, O.K., Morse, D. et Colepicolo, P. 2003. Heavy metal-induced oxidative stress in algae. *Journal of Phycology* - **39**(6): 1008-1018.
- Pistocchi, R., Guerrini, F., Balboni, V. et Boni, L. 1997. Copper toxicity and carbohydrate production in the microalgae *Cylindrotheca fusiformis* and *Gymnodinium* sp. *European Journal of Phycology* - **32**(2): 125-132.
- Pistocchi, R., Mormile, M.A., Guerrini, F., Isani, G. et Boni, L. 2000. Increased production of extra- and intracellular metal-ligands in phytoplankton exposed to copper and cadmium. *Journal of Applied Phycology* - **12**(3-5): 469-477.
- Pokrovsky, O.S., Pokrovsky, G.S., Gelabert, A., Schott, J. et Boudou, A. 2005. Speciation of Zn associated with diatoms using X-ray absorption spectroscopy. *Environmental Science & Technology* - **39**(12): 4490-4498.
- Potapova, M. et Snoeijs, P. 1997. The natural life cycle in wild populations of *Diatoma moniliformis* (Bacillariophyceae) and its disruption in an aberrant environment. *Journal of Phycology* - **33**(6): 924-937.
- Prygiel, J. et Coste, M. 1998. Mise au point de l'indice Biologique Diatomée, un indice diatomique pratique applicable au réseau hydrographique français. *L'Eau, l'Industrie, les Nuisances* - **211**: 40-45.
- Prygiel, J. et Coste, M. 1999. Progress in the use of diatoms for monitoring rivers in France. - In: Prygiel, J., Whitton, B.A. et Bukowska, J. (eds.), Use of algae for monitoring rivers III. Agence de l'Eau Artois Picardie, 165-179.
- Prygiel, J., Coste, M. et Bukowska, J. 1999a. Review of the major diatom-based techniques for the quality assessment of rivers - State of the art in Europe. - In: Prygiel, J., Whitton, B.A. et Bukowska, J. (eds.), Use of algae for monitoring rivers III. Agence de l'Eau Artois Picardie, 224-238.

Prygiel, J., Whitton, B.A. et Bukowska, J. 1999b. Use of algae for monitoring rivers III. - Agence de l'Eau Artois-Picardie, 271.

## R

---

Ramelow, G.J., Biven, S.L., Zhang, Y., Beck, J.N., Young, J.C., Callahan, J.D. et Marcon, M.F. 1992. The identification of point sources of heavy metals in an industrially impacted waterway by periphyton and surface sediment monitoring. *Water, Air, & Soil Pollution* - **65**(1 - 2): 175-190.

Rames, V. 1995. Evolution de la contamination par le cadmium des eaux du Lot et de la Garonne. - Agence de l'Eau / INSA, 113.

Reavie, E.D., Smol, J.P., Carignan, R. et Lorrain, S. 1998. Diatom paleolimnology of two fluvial lakes in the St. Lawrence River: A reconstruction of environmental changes during the last century. *Journal of Phycology* - **34**(3): 446-456.

Revsbech, N.P., Nielsen, L.P., Christensen, P.B. et Sørensen, J. 1988. Combined oxygen and nitrous oxide microsensor for denitrification studies. *Applied and Environment Microbiology* - **54**(9): 2245-2249.

Rijstenbil, J.W., Dehairs, F., Ehrlich, R. et Wijnholds, J.A. 1998. Effect of the nitrogen status on copper accumulation and pools of metal-binding peptides in the planktonic diatom *Thalassiosira pseudonana*. *Aquatic Toxicology* - **42**(3): 187-209.

Rijstenbil, J.W., Derksen, J.W.M., Gerringa, L.J.A., Poortvliet, T.C.W., Sandee, A., Berg, M.v.d., Drie, J.v. et Wijnholds, J.A. 1994a. Oxidative stress induced by copper : defense and damage in the marine planktonic diatom *Ditylum brightwellii*, grown in continuous cultures with high and low zinc levels. *Marine Biology* - **119**: 583-590.

Rijstenbil, J.W. et Gerringa, L.J.A. 2002. Interactions of algal ligands, metal complexation and availability, and cell responses of the diatom *Ditylum brightwellii* with a gradual increase in copper. *Aquatic Toxicology* - **56**(2): 115-131.

Rijstenbil, J.W., Sandee, A., Vandrie, J. et Wijnholds, J.A. 1994b. Interaction of toxic trace-metals and mechanisms of detoxification in the planktonic diatoms *Ditylum brightwellii* and *Thalassiosira pseudonana*. *FEMS Microbiology Reviews* - **14**(4): 387-396.

Rivognac, L., Georges, A. et Horn, M. 2005. IDAO : "Identification des Diatomées Assistée par Ordinateur". - 24<sup>ème</sup> colloque de l'ADLaF.

RNDE. 2000. Les Diatomées. La qualité biologique des cours d'eau en France, 6-9.

Rodier, J. 1978. L'analyse de l'eau : eaux naturelles, eaux résiduaires, eau de mer. - Bordas, Paris.

Rosen, B.H. 1995. Use of periphyton in the development of biocriteria. - In: Davis, W.S. et Simon, T.P. (eds.), Biological assessment and criteria: Tools for water resource planning and decision making. Lewis Publishers, 209-215.

Rosen, B.P. 1996. Bacterial resistance to heavy metals and metalloids. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* - **1**(4): 273-277.

Rott, E. 1991. Methodological aspects and perspectives in the use of periphyton for monitoring and protecting rivers. - In: Whitton, B.A., Rott, E. et Friedrich, G. (eds.), Use of algae for monitoring rivers. Institut für Botanik, Universität Innsbruck., 9-16.

Round, F.E., Crawford, R.M. et Mann, D.G. 1990. The Diatoms. Biology & morphology of the genera. - Cambridge Univ.Press Ed.

Ruggiu, D., Luglie, A., Cattaneo, A. et Panzani, P. 1998. Paleoecological evidence for diatom response to metal pollution in Lake Orta (N. Italy). *Journal of Paleolimnology* - **20**(4): 333-345.

## S

---

Sabater, S. 2000. Diatom communities as indicators of environmental stress in the Guadiamar River, S-W. Spain, following a major mine tailings spill. *Journal of Applied Phycology* - **12**(2): 113-124.

Samsera, R. 2004. Etude des effets de la pollution métallique (Cd/Zn) sur la densité des communautés de diatomées périphtiques des cours d'eau. - Université de Bordeaux1, 10p.

Say, P.J. 1978. Le Riou-Mort, affluent du Lot pollué par les métaux. I. Etude préliminaire de la chimie et des algues benthiques. *Annales de Limnologie (International Journal of Limnology)* - **14**(1-2): 113-131.

Scarano, G. et Morelli, E. 2002. Characterization of cadmium- and lead- phytochelatin complexes formed in a marine microalga in response to metal exposure. *Biometals* - **15**(2): 145-151.

Schäfer, J. et Blanc, G. 2002. Relationship between ore deposits in river catchments and geochemistry of suspended particulate matter from six rivers in southwest France. *Science of the Total Environment* - **298**(1-3): 103-118.

Schäfer, J., Blanc, G., Lapaquellerie, Y., Maillet, N., Maneux, E. et Etcheber, H. 2002. Ten-year observation of the Gironde tributary fluvial system: fluxes of suspended matter, particulate organic carbon and cadmium. *Marine Chemistry* - **79**(3-4): 229-242.

Shannon, C.E. et Weaver, W. 1949. The mathematical theory of communication. - Univ.Illinois Press.Urbana III.

Shehata, S.A., Lasheen, M.R., Kobbia, I.A. et Ali, G.H. 1999. Toxic effect of certain metals mixture on some physiological and morphological characteristics of freshwater algae. *Water Air and Soil Pollution* - **110**(1-2): 119-135.

Simkiss, K. et Taylor, M.G. 1989. Metal fluxes across the membranes of aquatic organisms. *Aquatic Sciences* - **1**(1): 173-188.

Sirenko, L.A. et Shevchenko, T.F. 1999. Experience of using algological indices for monitoring water bodies affected by chemical and radioactive contamination (on the example of the water bodies of Ukraine). - In: Prygiel, J., Whitton, B.A. et Bukowska, J. (eds.), Use of algae for monitoring rivers III. Agence de l'Eau Artois Picardie, 261-265.

Soldo, D. et Behra, R. 2000. Long-term effects of copper on the structure of freshwater periphyton communities and their tolerance to copper, zinc, nickel and silver. *Aquatic Toxicology* - **47**(3-4): 181-189.

Steinberg, C. et Schiefele, S. 1988. Biological indication of trophy and pollution of running waters. *Z. Wasser - Abwasser-Forsch.* - **21**: 227-234.

Stevenson, R.J. 1997. Scale-dependent determinants and consequences of benthic algal heterogeneity. *Journal of the North American Benthological Society* - **16**(1): 248-262.

Stevenson, R.J. et Bahls, L. 1999. Periphyton protocols. - In: Barbour, M.T., Gerritsen, J., Snyder, B.D. et Stribling, J.B. (eds.), Rapid bioassessment protocols for use in streams and wadeable rivers : Periphyton, benthic macroinvertebrates and fish. 2nd ed., 1-22.

Stevenson, R.J. et Pan, Y. 1999. Assessing environmental conditions in rivers and streams with diatoms. - In: Stoermer, E.F. et Smol, J.P. (eds.), The Diatoms - Applications for the Environmental and Earth Sciences. Cambridge University Press., 11-40.

Stevenson, R.J. et Peterson, C.G. 1991. Emigration and immigration can be important determinants of benthic diatom assemblages in streams. *Freshwater Biology* - **26**(2): 279-294.

Stevenson, R.J., Peterson, C.G., Kirschtel, D.B., King, C.C. et Tuchman, N.C. 1991. Density-dependent growth, ecological strategies and effects of nutrients and shading on benthic diatom succession in streams. *Journal of Phycology* - **27**: 59-69.

Sunda, W.G. et Huntsman, S.A. 1998. Control of Cd concentrations in a coastal diatom by interactions among free ionic Cd, Zn, and Mn in seawater. *Environmental Science & Technology* - **32**(19): 2961-2968.

Sunda, W.G. et Huntsman, S.A. 2000. Effect of Zn, Mn, and Fe on Cd accumulation in phytoplankton: Implications for oceanic Cd cycling. *Limnology and Oceanography* - **45**(7): 1501-1516.

Szabó, K., Kiss, K.T., Taba, G. et Ács, É. 2005. Epiphytic diatoms of the Tisza River, Kisköre Reservoir and some oxbows of the Tisza River after the cyanide and heavy metal pollution in 2000. *Acta Botanica Croatica* - **64**(1): 1-46.

## T \_\_\_\_\_

Takamura, N., Hatakeyama, S. et Sugaya, Y. 1990. Seasonal changes in species composition and production of periphyton in an urban river running through an abandoned copper mining region. *Japanese Journal of Limnology* - **51**(4): 225-235.

- Takamura, N., Kasai, F. et Watanabe, M.M. 1989. Effects of Cu, Cd and Zn on photosynthesis of freshwater benthic algae. *Journal of Applied Phycology* - **1**: 39-52.
- Taylor, D.R., Aarssen, L.W. et Loehle, C. 1990. On the relationship between r/K selection and environmental carrying capacity : a new habitat templet for plant life history strategies. *Oikos* - **58**: 239-250.
- Teissier, S. et Torre, M. 2002. Simultaneous assessment of nitrification and denitrification on freshwater epilithic biofilms by acetylene block method. *Water Research* - **36**(15): 3803-3811.
- Teitzel, G.M. et Parsek, M.R. 2003. Heavy metal resistance of biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environment Microbiology* - **69**(4): 2313-2320.
- ter Braak, C.J.F. et van Dam, H. 1989. Inferring pH from diatoms: a comparison of old and new calibration methods. *Hydrobiologia* - **178**: 209-223.
- Thomas, W.H., Hollibaugh, J.T. et Seibert, D.L.R. 1980. Effects of heavy metals on the morphology of some marine phytoplankton. *Phycologia* - **19**(3): 202-209.
- Tien, C.J. 2004. Some aspects of water quality in a polluted lowland river in relation to the intracellular chemical levels in planktonic and epilithic diatoms. *Water Research* - **38**(7): 1779-1790.
- Tien, C.J., Sigeo, D.C. et White, K.N. 2005. Copper adsorption kinetics of cultured algal cells and freshwater phytoplankton with emphasis on cell surface characteristics. *Journal of Applied Phycology* - **17**(5): 379-389.
- Tilman, D. 1990. Constraints and tradeoffs: toward a predictive theory of competition and succession. *Oikos* - **58**: 3-15.
- Tingey, D.T. 1989. Bioindicators in air pollution research - applications and constraints. - In: National Research Council - National Academy Press (ed.) Biologic markers of air pollution stress and damage in forests. Committee on biological markers of air pollution damage in trees.
- Tison, J. 2006. Utilisation de la modélisation neuronale de des caractéristiques des communautés diatomiques pour la bioévaluation de l'état écologique des cours d'eau et l'accompagnement de leur restauration. - PhD thesis - Univ. Bordeaux I Ecole Doct. Sciences du vivant, Géosciences et Sciences de l'Environnement, 139.
- Tison, J., Coste, M., Delmas, F., Chandesris, A., Mengin, N. et Wasson, J.G. 2005a. Flores diatomiques des cours d'eau : proposition de valeurs limites du "Bon Etat" pour l'IPS et l'IBD. - Ministère de l'Environnement et du Développement Durable - Direction de l'Eau, 20.
- Tison, J., Coste, M., Delmas, F., Giraudel, J.-L., Lek, S. et Park, Y.S. 2003. Réponse structurale des communautés de diatomées benthiques à l'anthropisation des systèmes aquatiques. Application d'un réseau artificiel de neurones au cas du bassin Adour-Garonne. Vèmes journées de l'Ecologie Fonctionnelle.

Tison, J., Park, Y.S., Coste, M., Wasson, J.G., Ector, L., Rimet, F. et Delmas, F. 2005b. Typology of diatom communities and the influence of hydro-ecoregions: A study on the French hydrosystem scale. *Water Research* - **39**(14): 3177-3188.

Torres, E., Cid, A., Herrero, C. et Abalde, J. 1998a. Removal of cadmium ions by the marine diatom *Phaeodactylum tricornerutum* Bohlin accumulation and long-term kinetics of uptake. *Bioresource Technology* - **63**(3): 213-220.

Torres, E., Cid, A., Herrero, C. et Abalde, J. 2000. Effect of cadmium on growth, ATP content, carbon fixation and ultrastructure in the marine diatom *Phaeodactylum tricornerutum* Bohlin. *Water Air and Soil Pollution* - **117**(1-4): 1-14.

Torres, M., Goldberg, J. et Jensen, T.E. 1998b. Heavy metal uptake by polyphosphate bodies in living and killed cells of *Plectonema boryanum* (Cyanophyceae). *Microbios* - **96**(385): 141-147.

Townsend, C.R. 1989. The patch dynamics concept of stream community ecology. *Journal of the North American Benthological Society* - **8**: 36-50.

Townsend, C.R. et Hildrew, A.G. 1994. Species traits in relation to a habitat templet for river systems. *Freshwater Biology* - **31**(3): 265-275.

Tsuji, N., Hirayanagi, N., Iwabe, O., Namba, T., Tagawa, M., Miyamoto, S., Miyasaka, H., Takagi, M., Hirata, K. et Miyamoto, K. 2003. Regulation of phytochelatin synthesis by zinc and cadmium in marine green alga, *Dunaliella tertiolecta*. *Phytochemistry* - **62**(3): 453-459.

Twiss, M.R. et Nalewajko, C. 1992. Influence of phosphorus nutrition on copper toxicity to three strains of *Scenedesmus acutus* (Chlorophyceae). *Journal of Phycology* - **28**(3): 291-298.

## V \_\_\_\_\_

van Dam, H. et Mertens, A. 1990. A comparison of recent epilithic diatom assemblages from the industrially acidified and copper polluted lake Orta (Northern Italy) with old literature data. *Diatom Research* - **5**(1): 1-13.

van Dam, H., Mertens, A. et Sinkeldam, J. 1994. A coded checklist and ecological indicator values of freshwater diatoms from the Netherlands. *Netherlands Journal of Aquatic Ecology* - **28**(1): 117-133.

Vasconcelos, M.T.S.D. et Leal, M.F.C. 2001. Adsorption and uptake of Cu by *Emiliania huxleyi* in natural seawater. *Environmental Science & Technology* - **35**(3): 508-515.

Verb, R.G. et Vis, M.L. 2005. Periphyton assemblages as bioindicators of mine-drainage in unglaciated western allegheny plateau lotic systems. *Water, Air, and Soil Pollution* - **161**(1-4): 227-265.



W —————

Wang, W.-X. et Dei, R.C.H. 2001. Metal uptake in a coastal diatom influenced by major nutrients (N, P, and Si). *Water Research* - **35**(1): 315-321.

Whitton, B.A. 1975. *River Ecology*.

Whitton, B.A. 1991. Aims of monitoring. - In: Whitton, B.A., Rott, E. et Friedrich, G. (eds.), Use of algae for monitoring rivers, 5-8.

Whitton, B.A. 2003. Use of plants for monitoring heavy metals in freshwaters. - In: Ambasht, R.S. et Ambasht, N.K. (eds.), Modern Trends in Applied Aquatic Ecology. Kluwer Academic / Plenum Publishers, 43-63.

Whitton, B.A. et Kelly, M.G. 1995. Use of algae and other plants for monitoring rivers. *Australian Journal of Ecology* - **20**: 45-56.

Whitton, B.A. et Rott, E. 1996. Use of Algae for monitoring rivers II. - Studia Student. G.m.b.H., 196.

Whitton, B.A., Rott, E. et Friedrich, G. 1991. Use of algae for monitoring rivers. - Studia Student. G.m.b.H.

Wong, P.T.S. 1987. Toxicity of cadmium to freshwater microorganisms, phytoplankton, and invertebrates. - In: Nriagu, J.O. et Sprague, J.B. (eds.), Cadmium in the aquatic environment. Wiley, 117-138.

Wu, J.T., Chang, S.C. et Chen, K.S. 1995. Enhancement of intracellular proline level in cells of *Anacystis nidulans* (Cyanobacteria) exposed to deleterious concentrations of copper. *Journal of Phycology* - **31**(3): 376-379.

Wu, J.T., Hsieh, M.T. et Kow, L.C. 1998. Role of proline accumulation in response to toxic copper in *Chlorella* sp. (Chlorophyceae) cells. *Journal of Phycology* - **34**(1): 113-117.

Y —————

Yang, J.R. et Duthie, H.C. 1993. Morphology and ultrastructure of teratological forms of the diatoms *Stephanodiscus niagarae* and *S. parvus* (Bacillariophyceae) from Hamilton Harbor (Lake-Ontario, Canada). *Hydrobiologia* - **269**: 57-66.



## **ANNEXES**



**ANNEXE A – CARACTERISTIQUES DE TOLERANCE / SENSIBILITE AUX METAUX  
RECENSEES DANS LA LITTERATURE**

<b>espèce</b>	<b>sensible</b>	<b>tolérante</b>
<i>Achnanthes biasolettiana</i>	Chanson <i>et al.</i> 2005	
<i>Achnanthes brevipes</i>	Pistocchi <i>et al.</i> 2000	
<i>Achnanthes linearis</i>		Takamura <i>et al.</i> 1989
<i>Achnanthes microcephala</i>		Whitton 1975
<i>Achnanthes oblongella</i>	Hirst <i>et al.</i> 2002	
<i>Achnanthidium minutissimum</i>	Sabater 2000, Blanck <i>et al.</i> 2003, Whitton 2003	Leland et Carter 1984, Takamura <i>et al.</i> 1989, van Dam et Mertens 1990, Genter 1995, Monteiro <i>et al.</i> 1995, Peres <i>et al.</i> 1997, Cattaneo <i>et al.</i> 1998, Gold 1998, Medley et Clements 1998, Ruggiu <i>et al.</i> 1998, Admiraal <i>et al.</i> 1999b, Ivorra <i>et al.</i> 1999, Lehmann <i>et al.</i> 1999, Genter et Lehman 2000, Ivorra <i>et al.</i> 2000, Gold <i>et al.</i> 2002, Ivorra <i>et al.</i> 2002b, Feurtet-Mazel <i>et al.</i> 2003, Gold <i>et al.</i> 2003a, b, Nunes <i>et al.</i> 2003, Cattaneo <i>et al.</i> 2004, Guasch <i>et al.</i> 2004, Nakanishi <i>et al.</i> 2004, Chanson <i>et al.</i> 2005, Szabó <i>et al.</i> 2005, Ferreira Da Silva <i>et al.</i> unpubl.
<i>Adlafia minuscula</i>		Bahls 2005, <i>comm. pers.</i>
<i>Amphora lanceolata</i>		Ivorra <i>et al.</i> 2002b, Guasch <i>et al.</i> 2004
<i>Amphora montana</i>		Szabó <i>et al.</i> 2005

<b>espèce</b>	<b>sensible</b>	<b>tolérante</b>
<i>Amphora pediculus</i>	Whitton 2003	Szabó <i>et al.</i> 2005
<i>Asterionella formosa</i>	Conway et Williams 1979, Ruggiu <i>et al.</i> 1998, Gold <i>et al.</i> 2002, Interlandi 2002, Cattaneo <i>et al.</i> 2004, Tien <i>et al.</i> 2005	
<i>Asterionella japonica</i>	Fisher <i>et al.</i> 1981	
<i>Aulacoseira ambigua</i>	Gold <i>et al.</i> 2002	
<i>Aulacoseira distans</i>		Szabó <i>et al.</i> 2005
<i>Aulacoseira varians</i>	Tien <i>et al.</i> 2005	
<i>Brachysira vitrea</i>		Cattaneo <i>et al.</i> 2004
<i>Cerataulina pelagica</i>	Sanders et Riedel 1998	
<i>Cocconeis placentula</i>	Genter <i>et al.</i> 1987, Peres <i>et al.</i> 1995, Genter et Lehman 2000, Feurtet-Mazel <i>et al.</i> 2003, Chanson <i>et al.</i> 2005	Gold <i>et al.</i> 2002, Szabó <i>et al.</i> 2005
<i>Cocconeis placentula</i> var. <i>lineata</i>		Gold <i>et al.</i> 2003b
<i>Cyclostephanus dubius</i>	Gold <i>et al.</i> 2002	
<i>Cyclotella bodanica</i>	Ruggiu <i>et al.</i> 1998	
<i>Cyclotella comensis</i>	van Dam et Mertens 1990	
<i>Cyclotella comta</i>	Shehata <i>et al.</i> 1999	
<i>Cyclotella stelligera</i>	Ruggiu <i>et al.</i> 1998, Gold <i>et al.</i> 2002	
<i>Cylindrotheca fusiformis</i>	Pistocchi <i>et al.</i> 1997, Pistocchi <i>et al.</i> 2000	
<i>Cymbella affinis</i>	Whitton 1975	Guasch <i>et al.</i> 2004
<i>Diatoma ehrenbergii</i>		Chanson <i>et al.</i> 2005
<i>Diatoma elongatum</i>		Shehata <i>et al.</i> 1999

espèce	sensible	tolérante
<i>Diatoma hiemale</i>	Whitton 1975	Bahls 2005, <i>comm. pers.</i>
<i>Diatoma mesodon</i>		Bahls 2005, <i>comm. pers.</i>
<i>Diatoma moniliformis</i>		Szabó <i>et al.</i> 2005
<i>Diatoma vulgare</i>	Medley et Clements 1998	Blanck <i>et al.</i> 2003, Gold <i>et al.</i> 2003b, Guasch <i>et al.</i> 2004
<i>Diatoma vulgare</i> var. <i>ehrenbergii</i>	Ivorra <i>et al.</i> 1999	
<i>Didymosphenia geminata</i>	Lindstrøm et Rørslett 1991	
<i>Encyonema minutum</i> <i>Cymbella minuta</i>	Admiraal <i>et al.</i> 1999b, Ivorra <i>et al.</i> 1999, Chanson <i>et al.</i> 2005, Ferreira Da Silva <i>et al.</i> unpubl.	Feurtet-Mazel <i>et al.</i> 2003, Gold <i>et al.</i> 2003a, Bahls 2005, <i>comm. pers.</i>
<i>Encyonema silesiacum</i>		Bahls 2005, <i>comm. pers.</i>
<i>Eolimna minima</i>		Peres <i>et al.</i> 1997, Gold 1998, Gold <i>et al.</i> 2002, Feurtet-Mazel <i>et al.</i> 2003, Chanson <i>et al.</i> 2005, Szabó <i>et al.</i> 2005, Bahls 2005, <i>comm. pers.</i> , Ferreira Da Silva <i>et al.</i> unpubl.
<i>Eunotia arcus</i>	Whitton 1975	
<i>Eunotia exigua</i>		Whitton 1975, van Dam et Mertens 1990
<i>Eunotia pectinalis</i> var. <i>minor</i>		Takamura <i>et al.</i> 1989
<i>Eunotia soleilrolii</i>	Peres <i>et al.</i> 1995, Gold 1998	
<i>Eunotia subarcuatoides</i>		Hirst <i>et al.</i> 2002
<i>Fallacia pygmaea</i>		Peres <i>et al.</i> 1997
<i>Fragilaria capitata</i> var. <i>rumpens</i>		Ferreira Da Silva <i>et al.</i> unpubl.

<b>espèce</b>	<b>sensible</b>	<b>tolérante</b>
<i>Fragilaria capucina</i>	Gold <i>et al.</i> 2002	Lehmann <i>et al.</i> 1999, Shehata <i>et al.</i> 1999, Ivorra <i>et al.</i> 2002b, Szabó <i>et al.</i> 2005, Bahls 2005, <i>comm. pers.</i>
<i>Fragilaria capucina</i> var. <i>rumpens</i>	Hirst <i>et al.</i> 2002	
<i>Fragilaria construens</i>	Leland et Carter 1984, Peres <i>et al.</i> 1997	
<i>Fragilaria crotonensis</i>	Ruggiu <i>et al.</i> 1998	Conway et Williams 1979, Leland et Carter 1984, Gold <i>et al.</i> 2002, 2003b, Nunes <i>et al.</i> 2003
<i>Fragilaria tenera</i>		Cattaneo <i>et al.</i> 2004
<i>Fragilaria vaucheriae</i>		Medley et Clements 1998, Ivorra <i>et al.</i> 2002b, Bahls 2005, <i>comm. pers.</i>
<i>Fragilaria virescens</i>		Whitton 1975
<i>Gomphonema angustatum</i>	Whitton 1975	
<i>Gomphonema contraturiis</i>	Peres <i>et al.</i> 1995	
<i>Gomphonema micropus</i> var. <i>micropus</i>	Chanson <i>et al.</i> 2005	
<i>Gomphonema parvulum</i>	Ivorra <i>et al.</i> 2002b	Monteiro <i>et al.</i> 1995, Admiraal <i>et al.</i> 1999b, Shehata <i>et al.</i> 1999, Gold <i>et al.</i> 2002, Ivorra <i>et al.</i> 2002a, Feurtet-Mazel <i>et al.</i> 2003, Gold <i>et al.</i> 2003b; WHITTON, 2003 #259; Bahls, 2005, <i>comm. pers.</i> , Ferreira Da Silva <i>et al.</i> unpubl. }
<i>Klebsormium klebsii</i>		Takamura <i>et al.</i> 1989
<i>Lemnicola hungarica</i>		Peres 2000
<i>Mayamaea atomus</i>		Bahls 2005, <i>comm. pers.</i>



espèce	sensible	tolérante
<i>Mayamaea atomus</i> var. <i>permitis</i>		Bahls 2005, <i>comm. pers.</i>
<i>Melosira granulata</i>	Shehata <i>et al.</i> 1999	
<i>Melosira varians</i>	Genter <i>et al.</i> 1987, Monteiro <i>et al.</i> 1995, Peres <i>et al.</i> 1995, Peres <i>et al.</i> 1997, Medley et Clements 1998, Ivorra <i>et al.</i> 1999, Ivorra <i>et al.</i> 2000, Ivorra <i>et al.</i> 2002b, Feurtet-Mazel <i>et al.</i> 2003, Gold <i>et al.</i> 2003a, b	Barranguet <i>et al.</i> 2002, Blanck <i>et al.</i> 2003
<i>Meridion circulare</i>		Bahls 2005, <i>comm. pers.</i>
<i>Navicula arvensis</i>		Bahls 2005, <i>comm. pers.</i>
<i>Navicula cancellata</i>		Cunningham <i>et al.</i> 2003
<i>Navicula cryptocephala</i> var. <i>intermedia</i>	Genter <i>et al.</i> 1987	
<i>Navicula gregaria</i>		Chanson <i>et al.</i> 2005
<i>Navicula lanceolata</i>		Chanson <i>et al.</i> 2005, Szabó <i>et al.</i> 2005
<i>Navicula pupula</i>		Blanck <i>et al.</i> 2003
<i>Navicula pygmaea</i>		Peres <i>et al.</i> 1995
<i>Navicula radiosa</i>		Navarro <i>et al.</i> 2002
<i>Naviculadicta seminulum</i> <i>Navicula seminulum</i> <i>Sellaphora seminulum</i>		Peres <i>et al.</i> 1997, Ivorra <i>et al.</i> 1999, Hirst <i>et al.</i> 2002, Chanson <i>et al.</i> 2005, Bahls 2005, <i>comm. pers.</i> , Ferreira Da Silva <i>et al.</i> unpubl.
<i>Navicula tripunctata</i>		Szabó <i>et al.</i> 2005
<i>Neidium ampliatum</i>		Admiraal <i>et al.</i> 1999b, Ivorra <i>et al.</i> 1999

<b>espèce</b>	<b>sensible</b>	<b>tolérante</b>
<i>Nitzschia amphibia</i>		Gold 1998, Peres 2000, Szabó <i>et al.</i> 2005
<i>Nitzschia archibaldii</i>		Chanson <i>et al.</i> 2005
<i>Nitzschia closterium</i>		Szabó <i>et al.</i> 2005
<i>Nitzschia communis</i>		Szabó <i>et al.</i> 2005
<i>Nitzschia dissipata</i>	Feurtet-Mazel <i>et al.</i> 2003, Gold <i>et al.</i> 2003a, b	Gold <i>et al.</i> 2002, Szabó <i>et al.</i> 2005
<i>Nitzschia frustulum</i>		Monteiro <i>et al.</i> 1995, Shehata <i>et al.</i> 1999, Peres 2000
<i>Nitzschia gracilis</i>	Genter et Amyot 1994	Szabó <i>et al.</i> 2005
<i>Nitzschia linearis</i>	Leland et Carter 1984, Genter <i>et al.</i> 1987	Shehata <i>et al.</i> 1999, Gold <i>et al.</i> 2002, Chanson <i>et al.</i> 2005, Szabó <i>et al.</i> 2005
<i>Nitzschia palea</i>		Genter <i>et al.</i> 1987, Takamura <i>et al.</i> 1989, De Filippis et Pallaghy 1994, Peres <i>et al.</i> 1995, Peres <i>et al.</i> 1997, Medley et Clements 1998, Admiraal <i>et al.</i> 1999a, Admiraal <i>et al.</i> 1999b, Peres 2000, Gold <i>et al.</i> 2003b, Lai <i>et al.</i> 2003, Whitton 2003, Bahls 2005, <i>comm. pers.</i>
<i>Nitzschia sociabilis</i>	Chanson <i>et al.</i> 2005	
<i>Nitzschia veneta</i>		Peres 2000
<i>Pinnularia brevicostata</i>		Takamura <i>et al.</i> 1989
<i>Pinnularia burkii</i>		Takamura <i>et al.</i> 1989
<i>Pinnularia gibba</i> (= <i>parvulissima</i> ?)		Admiraal <i>et al.</i> 1999b, Gomez et Licursi 2003

espèce	sensible	tolérante
<i>Pinnularia interrupta</i> f. <i>biceps</i>		Whitton 1975
<i>Pinnularia microstauron</i>		Gold <i>et al.</i> 2002
<i>Pinnularia subcapitata</i>		van Dam et Mertens 1990, Hirst <i>et al.</i> 2002
<i>Pinnularia substomatophora</i>		Takamura <i>et al.</i> 1989
<i>Planothidium frequentissimum</i>		Chanson <i>et al.</i> 2005
<i>Planothidium lanceolatum</i>		Bahls 2005, <i>comm. pers.</i> , Szabó <i>et al.</i> 2005
<i>Planothidium dubium</i>		Bahls 2005, <i>comm. pers.</i>
<i>Psammothidium helveticum</i>		Hirst <i>et al.</i> 2002
<i>Pseudostaurosira brevistriata</i>	Cunningham <i>et al.</i> 2005a	Bahls 2005, <i>comm. pers.</i>
<i>Rhizosolenia fragilissima</i>	Sanders et Riedel 1998	
<i>Rhoicosphenia abbreviata</i>		Szabó <i>et al.</i> 2005
<i>Skeletonoma costatum</i>	Guanzon <i>et al.</i> 1994	
<i>Staurosira construens</i>	Ruggiu <i>et al.</i> 1998, Genter et Lehman 2000, Cunningham <i>et al.</i> 2005b	Bahls 2005, <i>comm. pers.</i>
<i>Staurosirella leptostauron</i>		Bahls 2005, <i>comm. pers.</i>
<i>Staurosirella pinnata</i>		Bahls 2005, <i>comm. pers.</i>
<i>Stephanodiscus hantzschii</i>	Navarro <i>et al.</i> 2002	
<i>Stephanodiscus oregonica</i>		Interlandi 2002
<i>Surirella angusta</i>		Takamura <i>et al.</i> 1989, Gold <i>et al.</i> 2002, Feurtet-Mazel <i>et al.</i> 2003, Bahls 2005, <i>comm. pers.</i> , Ferreira Da Silva <i>et al.</i> unpubl.

<b>espèce</b>	<b>sensible</b>	<b>tolérante</b>
<i>Surirella minuta</i>		Bahls 2005, <i>comm. pers.</i>
<i>Surirella ovata</i>		Takamura <i>et al.</i> 1989, Bahls 2005, <i>comm. pers.</i>
<i>Synedra acus</i>		Admiraal <i>et al.</i> 1999a
<i>Synedra delicatissima</i>	Genter et Amyot 1994, Genter 1995	
<i>Synedra rumpens</i>	Genter et Amyot 1994	
<i>Synedra tenera</i>		Ruggiu <i>et al.</i> 1998, Bahls 2005, <i>comm. pers.</i>
<i>Synedra ulna</i>	Monteiro <i>et al.</i> 1995, Shehata <i>et al.</i> 1999	Blanck <i>et al.</i> 2003, Bahls 2005, <i>comm. pers.</i>
<i>Tabellaria flocculosa</i>	Adshead-Simonsen <i>et al.</i> 1981, Hirst <i>et al.</i> 2002, Blanck <i>et al.</i> 2003, Cattaneo <i>et al.</i> 2004	

**ANNEXE B – VALORISATION SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE.****Publications scientifiques**

Duong, T.T., Morin, S., Herlory, O., Feurtet-Mazel, A., Coste, M. et Boudou, A. Periphytic diatom communities and their relation to cadmium accumulation kinetics in biofilms: A field study. **(in prep.)**.

Duong, T.T., Morin, S., Coste, M., Herlory, O., Feurtet-Mazel, A. et Boudou, A. Toxicity and bioaccumulation of cadmium in freshwater diatom biofilms in relation to organic matrix characteristics. **(in prep.)**.

Morin, S., Coste, M., Duong, T.T., Herlory, O. et Feurtet-Mazel, A. Cadmium toxicity and bioaccumulation in freshwater biofilms. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* - **(submitted)**.

Morin, S., Duong, T.T., Dabrin, A., Coynel, A., Herlory, O., Baudrimont, M., Delmas, F., Durrieu, G., Schäfer, J., Winterton, P., Blanc, G., Boudou, A. et Coste, M. Long term survey of heavy metal pollution, biofilm contamination and diatom community structure in the Riou-Mort watershed, South West France. - **(in prep.)**.

Morin, S., Duong, T. et Coste, M. 2006. Anomalies morphologiques en conditions de stress métallique. *Diatomania* - **(accepted)**.

Morin, S., Vivas-Nogues, M., Duong, T.T., Boudou, A., Coste, M. et Delmas, F. 2006. Dynamics of benthic diatom colonization in a cadmium/zinc-polluted river (Riou-Mort, France). *Archiv für Hydrobiologie* - **(accepted)**.

Morin, S. et Coste, M. 2006. Metal-induced shifts in the morphology of diatoms from the Riou-Mort and Riou-Viou streams (South West France). - In: Ács, É., Kiss, K.T., Padisák, J. et Szabó, K. É. (eds.), Use of algae for monitoring rivers VI, Hungarian Algological Society, Göd, Hungary, 97-106.

Morin, S., Coste, M., Duong, T., Gold, C. et Delmas, F. 2004. Diatom biomonitoring of heavy metal pollution using biometrics and abnormal forms : a case study in the Lot river basin (France). - In: Witkowski, A., Radziejewska, T., Wawrzyniak-Wydrowska, B., Daniszewska-Kowalczyk, G. et Bak, M. (eds.), Proceedings of the 18th International Diatom Symposium, p. 192.

**Rapports d'études**

Morin, S., Coste M. 2006. Atlas des diatomées du bassin versant du Riou-Mort – Cemagref Bordeaux, 109p.

Morin, S., Delmas, F., Coste, M. et Giraudel, J.L. 2004. Impact de différents produits toxiques sur les communautés de diatomées épilithiques des rivières-pilotes de Lacq. Rapport final - tranche 2003. - UR Qualité des eaux, Cemagref, 67p.

Morin, S. 2003. Amélioration des techniques de bioindication diatomique et d'analyse des données, appliquées à la révélation des effets des pollutions à toxiques. - ENITA de Bordeaux, 70p. + annexes.

Morin, S. 2002. Diatoms as a tool for the bio-assessment of wetlands health. The influence of pH on diatom assemblages. Department of Environmental Biology. - Curtin University of Technology, 33p. + annexes.

*Séminaires, colloques nationaux et internationaux*

Coste, M et Morin, S. 2006. Metal-induced shifts in the morphology of diatoms from the Riou-Mort and Riou-Viou streams (South West France). – 6<sup>th</sup> International Symposium Use of Algae for Monitoring Rivers , Balatonfüred, Hungary.

Morin, S., Duong, T.T., Herlory O. et Coste M. 2006. Etude des effets du cadmium sur les communautés de diatomées benthiques en microcosmes. – 25<sup>ème</sup> colloque de l'ADLaF, Caen.

Morin, S., Duong, T.T., Herlory O., Boudou A. et Coste M. 2006. Cadmium toxicity to diatom communities assessed in freshwater microcosms. – 19<sup>th</sup> International Diatom Symposium, Irkutsk, Russia.

Morin, S. et Coste, M. 2006. Réponses des diatomées périphtiques à une contamination métallique : les manifestations tératologiques. - Séminaire Microbiologie et Gestion des Milieux Aquatiques", Antony.

Morin, S., Coste, M., Duong, T. et Delmas, F. 2006. Identification et validation de descripteurs spécifiques des pollutions métalliques. - Journée ECOBAG "Caractérisation de l'état des systèmes aquatiques du Bassin Adour-Garonne et évaluation des effets biologiques et économiques des pressions", Bordeaux.

Morin, S., Vivas-Nogues, M., Coste, M., Duong, T., Delmas, F. et Boudou, A. 2005. Dynamique de colonisation en conditions de stress métallique (Riou-Mort, Aveyron). - 24<sup>ème</sup> Colloque ADLaF, Bordeaux.

Morin, S., Vivas-Nogues, M., Coste, M., Duong, T.T., Delmas, F. et Boudou, A. 2005. Dynamique de colonisation de communautés diatomiques soumises à une contamination métallique sur le Riou-Mort (Aveyron, France). - 6<sup>ème</sup> CILO, Vaulx-en-Velin.

Morin, S., Vivas-Nogues, M., Coste, M., Duong, T.T., Delmas, F. et Boudou, A. 2005. Settlement of diatom communities under metal stress : a case study of the Riou-Mort river basin (Aveyron, France). - SETAC Europe 15<sup>th</sup> Annual Meeting, Lille.

Debenest, T., Morin, S., Coste, M. et Delmas, F. 2004. Effets des pollutions métalliques sur les communautés de diatomées benthiques : fiabilité relative du critère d'abondance des formes anormales. - 47<sup>ème</sup> Congrès de l'AFL.

Morin, S., Coste, M. et Delmas, F. 2004. Apports de la biométrie à la bioindication diatomique des effets des pollutions métalliques. – 6<sup>ème</sup> Journées d'Ecologie Fonctionnelle, Rennes.

Morin, S., Coste, M., Duong, T., Gold, C. et Delmas, F. 2004. Diatom biomonitoring of heavy metal pollution using biometrics and abnormal forms : a case study in the Lot river basin (France). - 18<sup>th</sup> International Diatom Symposium, Miedzydroje, Poland.

Morin, S., Coste, M., Duong, T., Gold, C. et Delmas, F. 2004. Impacts des pollutions métalliques sur les phytocénoses de diatomées benthiques : exemple du bassin du Lot (Aveyron, France). - 23<sup>ème</sup> colloque de l'ADLaF, Orléans.

Delmas, F., Coste, M., Morin, S. et Giraudel, J.-L. 2003. Validation des réponses biomarqueurs: substances pures. Etude des effets de 6 micropolluants toxiques sur les communautés de diatomées périphtiques des Rivières-Pilotes de Lacq. – Séminaire Validation des réponses biomarqueurs d'exposition aux Rivières Pilotes, Mont.