

UNIVERSITE BORDEAUX 1

U.F.R. des Sciences de la Terre et de la Mer
Ecole Doctorale : Sciences du Vivant, Géosciences, Sciences de l'Environnement

THÈSE

présentée par

Clara OTHONIEL

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE BORDEAUX 1

Spécialité : Biogéochimie de l'Environnement

**LA CROISSANCE DU BIOFILM PHOTOSYNTHETIQUE :
UN INDICATEUR DU STATUT TROPHIQUE DES RIVIERES ?**

soutenue publiquement le 6 octobre 2006

à l'Université Bordeaux 1

après avis de :

Bernard MONTUELLE Rapporteur
Directeur de Recherche, UR QEPP, Equipe Ecologie Microbienne des Hydrosystèmes Anthropisés, Cemagref de Lyon
Sergi SABATER Rapporteur
Professeur, Institut d'Ecologie Aquatique, Université de Gérone - Catalogne

devant la commission d'examen formée de :

Pierre ANSCHUTZ Examineur
Professeur, Département de Géologie et Océanographie, Equipe Traceurs Géochimiques et Minéralogiques, Université
Bordeaux 1
Michèle CAPDEPUY Examineur
Professeur, Station marine d'Arcachon, Laboratoire d'Océanographie Biologique, Université Bordeaux 1
François DELMAS Examineur
Ingénieur en Chef du GREF, UR REQUE, Equipe Fonctionnement des Ecosystèmes Aquatiques Continentaux, Cemagref
de Bordeaux
Rutger DE WIT Directeur de thèse
Chargé de Recherche, Unité CNRS 5119 Ecoystèmes Lagunaires, Equipe Ecologie Microbienne des Milieux Aquatiques,
Université Montpellier II
Bernard MONTUELLE Rapporteur
Directeur de Recherche, UR QEPP, Equipe Ecologie Microbienne des Hydrosystèmes Anthropisés, Cemagref de Lyon
Sergi SABATER Rapporteur
Professeur, Institut d'Ecologie Aquatique, Université de Gérone - Catalogne

Référence

OTHONIEL C., 2006. *La croissance du biofilm photosynthétique : un indicateur du statut trophique des rivières ?* Thèse de Doctorat en Biogéochimie de l'Environnement, Université Bordeaux 1, 277 p.

Les travaux présentés ici ont été réalisés au Cemagref de Bordeaux, au sein de l'unité de recherche Qualité des Eaux (renommée Réseaux, Epuration et Qualité des Eaux suite à une fusion avec l'unité Ouvrages et Réseaux Hydrauliques), grâce à un financement conjoint du Cemagref et du Conseil Régional d'Aquitaine et dans le cadre de l'Ecole Doctorale "Sciences du Vivant, Géosciences, Sciences de l'Environnement" de l'Université Bordeaux 1.



LA CROISSANCE DU BIOFILM PHOTOSYNTHETIQUE : UN INDICATEUR DU STATUT TROPHIQUE DES RIVIERES ?

Cemagref - Groupement de Bordeaux, Unité de Recherche Réseaux, Epuration et Qualité des Eaux

Directeur de thèse : Rutger DE WIT - Unité CNRS 5119 Ecoystèmes Lagunaires, Equipe Ecologie Microbienne des Milieux Aquatiques, Université Montpellier II (case courrier 093, Place Eugène Bataillon, F-34095 Montpellier Cedex 05)

RÉSUMÉ

A l'heure actuelle, les outils permettant d'évaluer le statut trophique des eaux sont inappropriés pour les milieux lotiques. La bibliographie montre que les relations entre la quantité de biofilm développé par unité de surface de support et les teneurs en nutriments des eaux ne sont pas significatives et ne permettent pas l'établissement de modèles prédictifs de quantité de biomasse algale. Ce constat nous a incités à analyser les liens entre la qualité de l'eau et la dynamique de croissance des biofilms, à travers leur taux de croissance. Nous avons étudié dans quelle mesure cette relation pouvait être intégrée à un outil de diagnostic du niveau d'enrichissement des cours d'eau.

Cette étude comporte deux volets : une approche en laboratoire, avec production de biofilm en conditions maîtrisées et une approche *in situ*, avec l'immersion en rivières de supports de colonisation de biofilm.

Le travail en canaux expérimentaux montre que le taux de croissance du biofilm est une fonction linéaire des teneurs en PO_4^{3-} (facteur limitant) sur une gamme de concentrations identifiée de 0 à 0,09 mg P- $\text{PO}_4^{3-} \cdot \text{L}^{-1}$ (teneurs d'un environnement moyennement pollué). Avec des concentrations supérieures, il semble que l'on atteigne les niveaux de concentrations saturantes et le taux de croissance n'est plus influencé par les teneurs en PO_4^{3-} , ce qui implique qu'il n'est alors plus possible de discriminer deux situations trophiques distinctes. Les résultats obtenus *in situ* soulignent, d'une part, la difficulté de la mise en évidence d'une relation claire entre le compartiment biologique et la qualité du milieu, du fait de la très grande sensibilité du biofilm envers l'ensemble des conditions naturelles et, d'autre part, la nécessité d'un échantillonnage de biomasse à un pas de temps très resserré. Du point de vue qualitatif, les caractéristiques de N-hétérotrophie des communautés diatomiques ont permis de différencier des situations trophiques fortement contrastées sans être généralisables à l'ensemble des cas étudiés.

Mots clefs : *statut trophique ; biofilm ; bioindication ; canaux expérimentaux ; rivières.*

PHOTOSYNTHETIC BIOFILM GROWTH RATE: AN INDICATOR OF TROPHIC STATE IN RIVERS?

ABSTRACT

At present, tools making it possible to assess trophic state of water are inappropriate for rivers. Literature shows that methods based on the analyses of interconnections between biofilm quantities developed per unit of substratum area and water column nutrient concentrations appear not to be relevant to construct algal biomass predictive models. These facts prompted us to study methods using analyses of the links between water quality and the growth dynamics of biofilm, through their growth rate. We studied this indicator's potential for inclusion into a diagnostic tool for the enrichment levels in rivers.

Our study is in two parts: (i) a laboratory approach consisting of the production of biofilm in controlled environment, and (ii) an *in situ* approach in rivers using the immersion of biofilm colonization supports.

Work in experimental channels shows that biofilm growth rate is a linear function of PO_4^{3-} amounts (limiting factor), on an identified range of concentrations from 0 to 0.09 mg P- $\text{PO}_4^{3-} \cdot \text{L}^{-1}$ (indication of a moderately polluted environment). For higher concentrations, it seems that the saturation point is reached, growth rate is not influenced any more by PO_4^{3-} contents and two distinct trophic situations can no longer be differentiated. Results obtained in the field underline, on the one hand, the difficulty of the establishment of an unambiguous relationship between the biological compartment and water quality because of biofilm's extreme sensitivity to any variation in natural conditions and, on the other hand, the need for a biomass sampling with interval of very tightened time. From a qualitative point of view, the N-heterotrophy characteristics of diatoms communities made it possible to differentiate from strongly contrasted trophic situations without being generalized to account for all studied cases.

Keywords: *trophic state; biofilm; bioindication; experimental channels; rivers.*

RESUMEN

Actualmente, los métodos que permiten evaluar el estado trófico de las aguas no son apropiados en el medio lótico. La bibliografía pone de manifiesto que las relaciones entre la cantidad de biofilm desarrollado por unidad de superficie de substrato y el contenido en nutrientes de las aguas, no son significativas y no permiten el establecimiento de modelos predictivos de la cantidad de biomasa algal. Este hecho, nos ha incitado a estudiar la relación entre la calidad del agua y la dinámica de crecimiento de los biofilms a través de su índice de crecimiento. De esta manera, hemos estudiado en qué medida esta relación podía integrarse a un método de diagnóstico del nivel de enriquecimiento de los cursos de agua.

Este estudio incluye dos aspectos: una experiencia en el laboratorio, con la producción de biofilm en condiciones controladas y una experiencia *in situ*, con la inmersión de substratos de colonización de biofilm en ríos.

Los resultados obtenidos en los canales experimentales ponen de manifiesto que el índice de crecimiento del biofilm es una función lineal del contenido de PO_4^{3-} (factor limitante) en una gama de concentraciones de 0 a 0,09 mg P- PO_4^{3-} .L⁻¹ (contenido de un medio ambiente moderadamente contaminado). En presencia de concentraciones superiores, pareciera que se alcanzan los niveles de saturación y la tasa de crecimiento deja de ser influenciada por la concentración en PO_4^{3-} , por lo que no es posible discriminar dos situaciones tróficas distintas. Los resultados obtenidos *in situ* destacan, por una parte, la dificultad de poner en evidencia una relación clara entre el compartimento biológico y la calidad de la agua, a causa de la gran sensibilidad del biofilm hacia el conjunto de condiciones naturales y, por otra parte, la necesidad de un muestreo de la biomasa en intervalos de tiempo mas cortos. Desde el punto de vista cualitativo, las características de N-heterotrofia de las comunidades de diatomeas han permitido distinguir situaciones tróficas bien diferenciadas, sin que por ello sean generalizables en el conjunto de los casos estudiados.

Palabras clave: estado trófico; biofilm; bioindicación; canales experimentales; ríos.

REMERCIEMENTS

Je me fais tout d'abord un devoir de remercier toutes les personnes qui m'ont aidée au cours de ces années d'études doctorales.

En premier lieu, je tiens vivement à remercier François Delmas, Ingénieur en Chef du GREF, qui en tant que chef de l'unité Qualité des Eaux a initié le sujet de la thèse et accepté ma candidature à ce travail. Je le remercie de sa sollicitude pérenne, d'avoir toujours été là pour moi avec une vision positive des progressions du travail. Sa motivation et ses idées toujours renouvelées ont été pour moi autant d'encouragements quotidiens.

J'exprime toute ma gratitude à mon directeur de thèse Rutger De Wit, Chargé de Recherche CNRS à l'unité Ecosystèmes Lagunaires de l'Université Montpellier II. Vous avez été présent tout au long de ma thèse en m'encourageant pour mener à terme ce projet. Votre approche conceptuelle du sujet m'a permise de travailler également dans ce sens. J'ai apprécié votre sollicitude autant professionnelle que personnelle.

Au Cemagref, j'ai été accompagnée quotidiennement par Henri Beuffe, Chargé de Recherche, Mathieu Torre, Ingénieur d'Etudes et Michel Coste, Directeur de Recherche. De la conception des canaux expérimentaux à l'accompagnement sur le terrain et aux aides multiples pour les comptages algaux et bactériologiques, ils m'ont aidée sans retenue et je les en remercie très chaleureusement.

Je tiens à remercier Bernard Montuelle, Directeur de Recherche au Cemagref de Lyon et Sergi Sabater, Professeur de l'Université de Gérone, d'avoir accepté de juger ce travail. Je remercie également Michèle Capdepuy et Pierre Anschutz, Professeurs de l'Université Bordeaux 1, d'être membres du jury de thèse.

Frédéric Garabetian, Caroline Gold, Samuel Teissier et Philippe Vervier ont fait partie du comité de pilotage de la thèse. Je les remercie chaleureusement pour avoir été attentifs à ce travail et pour m'avoir transmis des connaissances essentielles pour sa réalisation. Une mention spéciale pour Frédéric qui m'a particulièrement aidée en me donnant beaucoup de son temps.

Je remercie également les responsables du programme « Hydroécologie de la Garonne » du GIS ECOBAG¹, mon sujet de thèse s'y insérant, j'ai pu bénéficier de leurs connaissances.

Les résultats de la thèse n'auraient pas pu être acquis sans l'aide dynamique de Muriel Bonnet et Maryse Boudigues, Techniciennes de laboratoire, qui ont réalisé les nombreux dosages chimiques nécessaires. Merci également à Jean-Claude Grégoire, Technicien de l'équipe Epuration, qui a toujours pu répondre à mes demandes diverses de matériel.

¹ Groupement d'Intérêt Scientifique "Environnement, Ecologie et Economie du bassin Adour-Garonne".

Je remercie les personnes qui m'ont aidée en ce qui concerne le traitement statistique des résultats : Yves Le Gat, Ingénieur du GREF, de l'unité Réseaux, Epuration et Qualité des eaux que je remercie de sa grande disponibilité et de sa sympathie ainsi que Daniel Balas, Professeur à l'Université de Nice, le Docteur Christine Defez, du Département d'Information Médicale de Montpellier (Professeur Pierre Dujols) et Laurence Volatier, pour avoir répondu à mes nombreuses questions.

J'ai été également aidée au cours de mon travail par trois étudiantes en stage, Katixa Huguenard, Isabelle Jouanneau et Noémie Gardès. Je vous remercie toutes les trois pour votre travail consciencieux et motivé ainsi que pour les bons moments que nous avons partagés sur le terrain entre sandwiches d'autoroute, pluie, chutes dans la Garonne et autres !

M. Sobesto, responsable de la station de pompage de la commune de Merville, M. Chargé, chef de la subdivision de Muret de la Direction Départementale de l'Équipement de Haute-Garonne ainsi que les passeurs du bac de la commune de l'Aouach, nous ont permis d'installer des supports de colonisation sur leur site ; qu'ils en soient ici remerciés.

Je remercie Marie-Hélène Montel et Catherine Ferrière, secrétaires de l'unité, pour leur aide aux entrelacs administratifs et leurs encouragements constants. Je remercie également toute l'équipe du Service Documentation, Chantal Gardes, Patricia Lamayson-Couillaux, Marie-Pierre Maleyran, pour leur aide à la recherche d'articles "introuvables". Je n'oublie pas Jean-Max Caupenne et Gilles Veyssières, du service Informatique, qui ont permis le bon fonctionnement du réseau ! Mes remerciements vont également à Jean-Marie Boudigues et Philippe Camoin pour leur contribution à la reprographie ainsi qu'à la fabrication des différents supports. Je remercie vivement Jean-Jacques Pernelle, Directeur de Recherche au Cemagref d'Antony, pour ses relectures attentives.

Au Cemagref, ces quatre années ont été fructueuses en rencontres. Merci à tous les stagiaires et doctorants pour l'ambiance du laboratoire, Emilie, Aurélien, Timothée, Philippe et Juliette qui a contribué très largement au traitement des échantillons de Diatomées et préparé les lames de comptages avec la participation de Soizic. Je remercie Maria pour son aide à la traduction du résumé de la thèse en Espagnol et Jean-Marc, avec qui nous avons partagé le bureau pendant un an et demi, ce qui nous a donné l'occasion d'aller au ski et de passer de bons moments autour de "tartiflettes".

Enfin, je remercie particulièrement mes amis qui ont suivi ce travail et veillé à ma bonne forme pendant cette période. Béatrice, pour ses bons petits plats, sa bonne humeur communicative et son écoute. Je remercie Aude, pour son soutien indéfectible et son aide pour rattraper les débordements des canaux expérimentaux au Cemagref, Anne-Sophie, pour son amitié chaleureuse, son aide durant la fin de la thèse et les week-end "découverte de la région" partagés. Mes anciennes colocataires "de choc", Béatrice et Dorothée, pour leur soutien et la fantaisie qu'elles ont apportée à ma vie à Bordeaux et Fabrice pour son appui et son attention. Merci également à mes amies du volley, Karine et Emilie, et à celles de longue date, Sèverine, Audrey et Céline, toutes trois également passées par cette délicate épreuve de la thèse !

* *

* * *

A ma mère Marie-France, pour l'affection qu'elle répand sur ses enfants et l'attention qu'elle porte aux malades dans son activité quotidienne de médecin et de soignant.

A mon père Jacques, médecin et professeur à la faculté de médecine de Montpellier, pour sa générosité et pour m'avoir transmis son goût pour les sciences.

A mes sœurs Michèle et Annie, pour leur sollicitude active, réconfortante et indispensable.

A mes frères Frédéric et Patrice, pour leur regard plus distant mais assurément ô combien affectueux.

A Maryse, toujours présente et encourageante.

A ma chère grand-mère, déconcertante et épatante.

Je n'oublie pas mes cousins et cousines, Sylvie, Gilberte, Francis, Samuel, Christine et Sandra avec qui j'ai grandi et partagé tellement de moments.

Le reste de ma famille est très important à mes yeux. Qu'ils soient en France, aux Antilles ou en Suisse, je pense à eux.

Une pensée particulière pour mon grand-père.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES

TABLE DES ILLUSTRATIONS	1
NOTATIONS	11
AVANT-PROPOS	15
INTRODUCTION	19
CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	27
I. 1 • Pollution des cours d'eau	29
I. 1.1. Les différents types de pollution	30
I. 1.2. L'eutrophisation, une altération nutritionnelle	32
I. 1.2.1. Définition - L'eutrophisation	32
I. 1.2.2. Facteurs de l'eutrophisation	35
<i>a) Facteurs chimiques : les nutriments</i>	35
<i>b) Facteurs physiques</i>	39
I. 1.2.3. Impacts de l'eutrophisation sur le système aquatique	40
<i>a) Influence sur les gaz dissous</i>	40
<i>b) Conséquences sur la faune et la flore en place</i>	40
<i>c) Autres conséquences</i>	41
I. 2 • Diagnostic d'état des rivières	43
I. 2.1. Aspects réglementaires	43
I. 2.1.1. Cadre législatif	43
I. 2.1.2. Cadre administratif	44
I. 2.2. Outils d'évaluation de la qualité de l'eau	46
I. 2.2.1. Complémentarité des analyses chimiques et biocénologiques	46
I. 2.2.2. Les différents indicateurs biologiques	47
I. 2.3. Critère "Statut trophique"	50
I. 2.3.1. Définition et méthodes d'évaluation	50
I. 2.3.2. Difficultés de mise en œuvre en eaux courantes	51
I. 3 • Le biofilm des rivières : indicateur biologique	53
I. 3.1. Caractérisation du biofilm photosynthétique	53
I. 3.1.1. Définition	53
I. 3.1.2. Cycle de développement	55
<i>a) Attachement</i>	56
<i>b) Phase de croissance</i>	57
<i>c) Sénescence et détachement du biofilm</i>	58
<i>d) Calcul du taux de croissance</i>	59
<i>e) Fonctionnement interne</i>	60
I. 3.2. Bioindication par le biofilm	61
I. 3.3. Facteurs de contrôle du développement du biofilm	62

I. 3.3.1. Facteurs physiques	62
a) Paramètres hydrologiques	62
b) Température	63
c) Eclairage	63
d) Nature des supports de colonisation	64
I. 3.3.2. Facteurs biologiques	64
I. 3.3.3. Facteurs chimiques : Interactions Biofilms - Nutriments	65
a) Effets des nutriments sur le développement du biofilm	65
b) Action du biofilm sur les teneurs en nutriments	66
I. 3.3.4. Conclusions	66
I. 4 • Conclusions - Points d'appui du travail de la thèse	68
CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES	69
<hr/>	
II. 1 • Conduite des expérimentations en laboratoire	73
II. 1.1. Dispositif expérimental	73
II. 1.1.1. Description des canaux expérimentaux	73
II. 1.1.2. Contrôle des conditions expérimentales	76
II. 1.2. Déroulement des expériences	78
II. 1.2.1. Ensemencement des canaux en biofilm	78
II. 1.2.2. Choix du milieu de culture	83
II. 1.2.3. Modalités et rythme d'ajouts de nutriments	84
II. 2 • Expérimentations <i>in situ</i>	85
II. 2.1. Présentation des zones d'étude	85
II. 2.1.1. Expérimentations en Garonne	85
a) Description des stations d'étude	85
b) Régime hydrologique	88
c) Suivi de la qualité des eaux	89
II. 2.1.2. Autres sites d'expérimentation	94
II. 2.2. Caractéristiques des expérimentations	99
II. 3 • Traitement des échantillons	101
II. 3.1. Analyses physico-chimiques	101
II. 3.2. Préparation des échantillons de biofilm	101
II. 3.3. Analyses quantitatives de la biomasse	104
II. 3.3.1. Matière sèche sans cendre	104
II. 3.3.2. Dosage de la chlorophylle <i>a</i>	104
II. 3.3.3. Compartiment bactérien	105
II. 3.3.4. Communautés algales	107
II. 3.4. Analyses qualitatives	108
II. 3.4.1. Index Autotrophique	108
II. 3.4.2. Communautés diatomiques	108
II. 4 • Modalités du traitement statistique des données	111
CHAPITRE III : RESULTATS - SECTION 1 : EXPERIMENTATIONS EN LABORATOIRE : PRODUCTION DE BIOFILM EN CANAUX EXPERIMENTAUX SOUS CONDITIONS VARIEES D'ENRICHISSEMENT	115
<hr/>	
III. 1 • Validation du dispositif expérimental	117
III. 1.1. Caractérisation physico-chimique de la réserve de biofilm et de l'eau des canaux	118
III. 1.2. Descripteurs quantitatifs de la croissance du biofilm	122
III. 1.3. Evolution des teneurs en nutriments	127
III. 1.4. Descripteurs qualitatifs de la croissance du biofilm	130

III. 1.5. Conclusions - Reproductibilité des canaux	138
III. 2 • Croissance de biofilms soumis à des enrichissements artificiels	143
III. 2.1. Première expérimentation	143
III. 2.1.1. Caractérisation physico-chimique de la réserve de biofilm et de l'eau des canaux	143
III. 2.1.2. Descripteurs quantitatifs de la croissance du biofilm	144
III. 2.1.3. Evolution des teneurs en nutriments	148
III. 2.1.4. Descripteurs qualitatifs de la croissance du biofilm	150
III. 2.2. Seconde expérimentation	154
III. 2.2.1. Caractérisation physico-chimique de la réserve de biofilm et de l'eau des canaux	154
III. 2.2.2. Descripteurs quantitatifs de la croissance du biofilm	156
III. 2.2.3. Evolution des teneurs en nutriments	160
III. 2.2.4. Descripteurs qualitatifs de la croissance du biofilm	162
III. 2.3. Conclusions	166
III. 3 • Croissance de biofilms en eaux naturelles	167
III. 3.1. Caractérisation physico-chimique de la réserve de biofilm et de l'eau des canaux	167
III. 3.2. Descripteurs quantitatifs de la croissance du biofilm	169
III. 3.3. Evolution des teneurs en nutriments	173
III. 3.4. Descripteurs qualitatifs de la croissance du biofilm	175
III. 3.5. Conclusions	181
III. 4 • Discussion	183
III. 4.1. Calcul de la vitesse de croissance des biofilms	183
III. 4.1.1. Méthodologie	183
III. 4.1.2. Résultats - Remarques	184
III. 4.2. Relations "Vitesse de croissance des biofilms - Charge en nutriments"	186
III. 4.2.1. Application aux données expérimentales	186
III. 4.2.2. Conclusions	194
III. 4.3. Apports des descripteurs qualitatifs	196
CHAPITRE IV : RESULTATS - SECTION 2 : EXPERIMENTATIONS <i>IN SITU</i> : PRODUCTION DE BIOFILM SUR SUPPORTS ARTIFICIELS EN DIFFERENTS SITES	201
IV. 1 • Expérimentations en Garonne	203
IV. 1.1. Etude sur le site "Toulouse" (du 3.08 au 31.08.04)	203
IV. 1.1.1. Conditions expérimentales	203
IV. 1.1.2. Descripteurs quantitatifs de la croissance du biofilm	205
IV. 1.1.3. Descripteurs qualitatifs de la croissance du biofilm	208
IV. 1.1.4. Conclusions	212
IV. 1.2. Etude sur le site "St Pierre de Gaubert" (du 21.08 au 8.09.03)	213
IV. 1.2.1. Conditions expérimentales	213
IV. 1.2.2. Descripteurs quantitatifs de la croissance du biofilm	215
IV. 1.2.3. Descripteurs qualitatifs de la croissance du biofilm	217
IV. 1.2.4. Conclusions	219
IV. 2 • Expérimentations en petites rivières	221
IV. 2.1. Expérimentation sur le Nasseys (du 1.06 au 29.06.04)	221
IV. 2.1.1. Conditions expérimentales	221
IV. 2.1.2. Descripteurs quantitatifs de la croissance du biofilm	223
IV. 2.1.3. Descripteurs qualitatifs de la croissance du biofilm	225
IV. 2.1.4. Conclusions	227
IV. 2.2. Expérimentation sur l'Eau Bourde (du 1.06 au 29.06.04)	228
IV. 2.2.1. Conditions expérimentales	228

IV. 2.2.2. Descripteurs quantitatifs de la croissance du biofilm	230
IV. 2.2.3. Descripteurs qualitatifs de la croissance du biofilm	232
IV. 2.2.4. Conclusions	235
IV. 2.3. Expérimentation sur la Jalle d'Eysines (du 1.06 au 29.06.04)	235
IV. 2.3.1. Conditions expérimentales	235
IV. 2.3.2. Descripteurs quantitatifs de la croissance du biofilm	237
IV. 2.3.3. Descripteurs qualitatifs de la croissance du biofilm	239
IV. 2.3.4. Conclusions	242
IV. 3 • Discussion	243
IV. 3.1. Relations "Vitesse de croissance des biofilms - Charge en nutriments"	243
IV. 3.2. Bilan de la réponse des descripteurs qualitatifs	247
IV. 3.3. Conclusions	249
CHAPITRE V : CONCLUSIONS GENERALES - PERSPECTIVES	251
V. 1 • Applicabilité des outils décrits dans notre étude	253
V. 1.1. Rappel du contexte de travail et des objectifs	253
V. 1.2. Bilan des résultats - Conclusions	254
V. 2 • Critiques et perspectives	257
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	261
VALORISATION	275

TABLE DES ILLUSTRATIONS

TABLE DES ILLUSTRATIONS

FIGURES :

Chapitre I : Synthèse bibliographique

Figure I-1 : Représentation schématique des différents types de pollution.....	31
Figure I-2 : Courbes de l'auto-épuration en rivière en aval d'un rejet organique.....	32
Figure I-3 : Principales sources et formes majoritaires de N et P en rivière.....	37
Figure I-4 : Cycle du phosphore dans un hydrosystème.....	38
Figure I-5 : Facteurs physiques favorisant le phénomène d'eutrophisation.....	39
Figure I-6 : Niveau de prise en compte du milieu aquatique à travers les différentes lois sur l'eau (source : Ministère de l'Ecologie et du Développement Durable - Direction de l'Eau, 2001).....	43
Figure I-7 : Positionnement des trois volets d'étude de la qualité d'un cours d'eau (source : Roux M., 2001).....	45
Figure I-8 : Différentes vues de biofilm en rivières (a-b-c) et sur lames issues de nos canaux expérimentaux de laboratoire (d).....	54
Figure I-9 : Les différentes phases du cycle de développement d'un biofilm (d'après Biggs B.J.F., 1996).....	55
Figure I-10 : Etapes de l'accrochage de micro-organismes et de la formation d'un biofilm sur des surfaces solides (d'après Mozes N., 1995).....	56
Figure I-11 : Représentation du mode de transfert des solutés au sein de la couche limite d'un biofilm.....	57
Figure I-12 : Représentation schématique de l'évolution du taux de croissance d'un biofilm (d'après Meyer A. <i>et al.</i> , 1991).....	60
Figure I-13 : Principaux facteurs contrôlant les processus de gain et de perte de biomasse du biofilm (source : Biggs B.J.F., 2000).....	62

Chapitre II : Matériels et méthodes

Figure II-1 : Méthodologie globale suivie.....	72
Figure II-2 : Représentation schématique d'un canal de type Hürlimann.....	74
Figure II-3 : Cliché d'un canal expérimental réalisé.....	74
Figure II-4 : Schéma d'un canal expérimental : Vue transversale du canal (a), Vue des lames supports de colonisation à l'intérieur du canal (b).....	76
Figure II-5 : Canaux expérimentaux placés dans l'enceinte thermorégulée.....	76
Figure II-6 : Spectres d'émission des tubes Gro-Lux et d'absorption de la chlorophylle (source : www.sylvania.com).....	77
Figure II-7 : Teneurs en chlorophylle a en fonction du temps au cours des deux expériences de précolonisation.....	80
Figure II-8 : Méthodologie suivie pour la mise en route des canaux expérimentaux au laboratoire.....	82
Figure II-9 : Présentation des stations d'étude, groupées pour chaque site en station amont et station aval.....	86
Figure II-10 : Flux de phosphore en Garonne ($t P-PO_4^{3-}.an^{-1}$) (période 1987-1997, d'après SIEE, 1998).....	90
Figure II-11 : Bassin de la Garonne : Principaux foyers de pollution industrielle et domestique.....	92
Figure II-12 : Bassin de la Garonne : Pollution par les nitrates.....	93

Figure II-13 : Localisation des stations d'étude amont/aval sur les trois cours d'eau de la région aquitaine étudiés (Nasseys (a), Eau Bourde et Jalle d'Eysines (b))	97
Figure II-14 : Clichés des stations amont/aval sur les trois cours d'eau de la région aquitaine étudiés.....	98
Figure II-15 : Vues des différents systèmes d'accrochage utilisés pour la mise en place des supports de colonisation du biofilm	100
Figure II-16 : Préparation des échantillons de biofilm	103
Figure II-17 : Protocole de coloration des bactéries pour observation sous microscope à épifluorescence	107
Figure II-18 : Illustration des deux directions possibles pour la conduite des tests statistiques.....	112

Chapitre III : Résultats - Section 1 : Expérimentations en laboratoire : Production de biofilm en canaux expérimentaux sous conditions variées d'enrichissement

Figure III-1 : Expérimentations de Reproductibilité : Caractéristiques des réserves d'inoculum dans les deux types de conditions expérimentales	118
Figure III-2 : ER Réserve Commune : Paramètres physico-chimiques au sein de la réserve à T4, T8, T11 et T15	121
Figure III-3 : ER Alimentation Séparée : Paramètres physico-chimiques au sein des 4 canaux à T14 (en bleu) et T18 (en rouge)	121
Figure III-4 : Expérimentations de Reproductibilité : Teneurs en matière sèche sans cendre	123
Figure III-5 : Expérimentations de Reproductibilité : Teneurs en chlorophylle a	123
Figure III-6 : Expérimentations de Reproductibilité : Nombre total de bactéries	125
Figure III-7 : Expérimentations de Reproductibilité : Proportions de bactéries viables	125
Figure III-8 : ER Réserve Commune : Consommations en nutriments en fonction du temps	127
Figure III-9 : ER Alimentation Séparée : Consommations en nutriments en fonction du temps.....	129
Figure III-10 : Expérimentations de Reproductibilité : Index Autotrophique (seuils marqués à IA=100 et IA=400)	132
Figure III-11 : Expérimentations de Reproductibilité : Dénombrement des populations algales à T18	135
Figure III-12 : Expérimentations de Reproductibilité : Indice diatomique IPS.....	137
Figure III-13 : 1ère expérimentation Enrichissements Artificiels : Caractéristiques de la réserve d'inoculum.....	143
Figure III-14 : 1ère expérimentation Enrichissements Artificiels : Teneurs en matière sèche sans cendre	146
Figure III-15 : 1ère expérimentation Enrichissements Artificiels : Teneurs en chlorophylle a	146
Figure III-16 : 1ère expérimentation Enrichissements Artificiels : Proportion de bactéries viables	147
Figure III-17 : 1ère expérimentation Enrichissements Artificiels : Consommations en nutriments en fonction du temps	149
Figure III-18 : 1ère expérimentation Enrichissements Artificiels : Index Autotrophique (seuil marqué à IA=400)	150
Figure III-19 : 1ère expérimentation Enrichissements Artificiels : Dénombrement des populations algales à chaque date d'échantillonnage.....	151
Figure III-20 : 1ère expérimentation Enrichissements Artificiels : Indice diatomique IPS.....	153
Figure III-21 : 1ère expérimentation Enrichissements Artificiels : Répartition des communautés diatomiques en fonction de leur tolérance à l'azote organique.....	154
Figure III-22 : 2nde expérimentation Enrichissements Artificiels : Caractéristiques de la réserve d'inoculum	155
Figure III-23 : 2nde expérimentation Enrichissements Artificiels : Paramètres physico-chimiques au sein des 4 canaux à T8, T11, T15 et T18	156
Figure III-24 : 2nde expérimentation Enrichissements Artificiels : Teneurs en matière sèche sans cendre.....	158
Figure III-25 : 2nde expérimentation Enrichissements Artificiels : Teneurs en chlorophylle a.....	158
Figure III-26 : 2nde expérimentation Enrichissements Artificiels : Proportion de bactéries viables.....	159

Figure III-27 : 2nde expérimentation Enrichissements Artificiels : Consommations en nutriments en fonction du temps	161
Figure III-28 : 2nde expérimentation Enrichissements Artificiels : Index Autotrophique (seuil marqué à IA=400)	162
Figure III-29 : 2nde expérimentation Enrichissements Artificiels : Dénombrement des populations algales à T11 et T18	163
Figure III-30 : 2nde expérimentation Enrichissements Artificiels : Indice diatomique IPS	164
Figure III-31 : 2nde expérimentation Enrichissements Artificiels : Répartition des communautés diatomiques en fonction de leur tolérance à l'azote organique	165
Figure III-32 : Expérimentation Eaux naturelles : Caractéristiques des deux réserves d'inoculum	168
Figure III-33 : Expérimentation Eaux naturelles : Teneurs en matière sèche sans cendre	170
Figure III-34 : Expérimentation Eaux naturelles : Teneurs en chlorophylle a	170
Figure III-35 : Expérimentation Eaux naturelles : Proportions de bactéries viables	172
Figure III-36 : Expérimentation Eaux naturelles : Consommations en nutriments en fonction du temps	174
Figure III-37 : Expérimentation Eaux naturelles : Index Autotrophique (seuils marqués à IA=100 et IA=400)	176
Figure III-38 : Expérimentation Eaux naturelles : Dénombrement des populations algales à T8, T15 et T19	178
Figure III-39 : Expérimentation Eaux naturelles : Indice diatomique IPS	179
Figure III-40 : Expérimentation Eaux naturelles : Répartition des communautés diatomiques en fonction de leur tolérance à l'azote organique	180
Figure III-41 : Mise en relation des variables " $\mu_{C.MSSC}$ " et "concentrations en nutriments"	189
Figure III-42 : 1ère expérimentation Enrichissements Artificiels : Relation linéaire entre $\mu_{C.MSSC}$ et $[PO_4^{3-}]_{consommable}$..	190
Figure III-43 : 2nde expérimentation Enrichissements Artificiels : Relation linéaire entre $\mu_{C.MSSC}$ et $[PO_4^{3-}]$ pour tous les canaux (a) et pour les canaux C1 à C3 (b)	190
Figure III-44 : Expérimentations Enrichissements Artificiels : Relation linéaire entre $\mu_{C.MSSC}$ et $[PO_4^{3-}]_{consommable}$ (prise en compte de C1 à C3 pour la 2nde expérimentation)	190
Figure III-45 : Expérimentation Eaux naturelles : Relation linéaire entre $\mu_{C.MSSC}$ et $[PO_4^{3-}]$	191
Figure III-46 : 1ère expérimentation Enrichissements Artificiels : Relation linéaire entre $\mu_{C.Chla}$ et $[PO_4^{3-}]_{consommable}$	193
Figure III-47 : 2nde expérimentation Enrichissements Artificiels : Relation linéaire entre $\mu_{C.Chla}$ et $[PO_4^{3-}]$ pour tous les canaux (a) et pour les canaux C1 à C3 (b)	193
Figure III-48 : Expérimentations Enrichissements Artificiels : Relation linéaire entre $\mu_{C.Chla}$ et $[PO_4^{3-}]_{consommable}$ (prise en compte de C1 à C3 pour la 2nde expérimentation)	193
Figure III-49 : Expérimentation Eaux naturelles : Relation linéaire entre $\mu_{C.Chla}$ et $[PO_4^{3-}]$	194
Figure III-50 : Recherche d'un taux de croissance maximum en fonction de la concentration en $[PO_4^{3-}]_{consommable}$	195
Figure III-51 : Evolution de la réponse des indicateurs Index Autotrophique et IPS pour l'ensemble des expérimentations en canaux au cours du temps (dates de prélèvement prises en compte : 1er prélèvement, avant-dernier et dernier)	198

Chapitre IV : Résultats - Section 2 : Expérimentations *in situ* : Production de biofilm sur supports artificiels en différents sites

Figure IV-1 : Expérimentation en Garonne, Site Toulouse : Concentrations en nutriments aux stations amont et aval	204
Figure IV-2 : Expérimentation en Garonne, Site Toulouse : Paramètres physico-chimiques à chaque date d'échantillonnage	205
Figure IV-3 : Expérimentation en Garonne, Site Toulouse : Teneurs en matière sèche sans cendre et chlorophylle a	206

Figure IV-4 : Expérimentation en Garonne, Site Toulouse : Evolution des vitesses du courant au niveau des supports (a) et des débits (b) aux stations amont et aval sur la période d'étude	207
Figure IV-5 : Expérimentation en Garonne, Site Toulouse : Proportion de bactéries viables.....	208
Figure IV-6 : Expérimentation en Garonne, Site Toulouse : Cliché des supports de colonisation des stations amont et aval à T22.....	209
Figure IV-7 : Expérimentation en Garonne, Site Toulouse : Index Autotrophique (seuils marqués à IA=100 et IA=400)	209
Figure IV-8 : Expérimentation en Garonne, Site Toulouse : Dénombrement des populations algales à chaque date d'échantillonnage.....	210
Figure IV-9 : Expérimentation en Garonne, Site Toulouse : Indice diatomique IPS.....	211
Figure IV-10 : Expérimentation en Garonne, Site Toulouse : Répartition des communautés diatomiques en fonction de leur tolérance à l'azote organique.....	212
Figure IV-11 : Expérimentation en Garonne, Site St Pierre de Gaubert : Concentrations en nutriments aux stations amont et aval	214
Figure IV-12 : Expérimentation en Garonne, Site St Pierre de Gaubert : Paramètres physico-chimiques à chaque date d'échantillonnage.....	214
Figure IV-13 : Expérimentation en Garonne, Site St Pierre de Gaubert : Teneurs en matière sèche sans cendre et chlorophylle a.....	215
Figure IV-14 : Expérimentation en Garonne, Site St Pierre de Gaubert : Proportion de bactéries viables	216
Figure IV-15 : Expérimentation en Garonne, Site St Pierre de Gaubert : Index Autotrophique (seuil marqué à IA=400) (a), Indice diatomique IPS (b), Répartition des communautés diatomiques en fonction de leur tolérance à l'azote organique (c).....	218
Figure IV-16 : Expérimentation Nasseys : Concentrations en nutriments aux stations amont et aval	222
Figure IV-17 : Expérimentation Nasseys : Paramètres physico-chimiques à chaque date d'échantillonnage	222
Figure IV-18 : Expérimentation Nasseys : Teneurs en matière sèche sans cendre et chlorophylle a.....	223
Figure IV-19 : Expérimentation Nasseys : Proportion de bactéries viables.....	224
Figure IV-20 : Expérimentation Nasseys : Index Autotrophique (a), Indice diatomique IPS (b), Répartition des communautés diatomiques en fonction de leur tolérance à l'azote organique (c).....	226
Figure IV-21 : Expérimentation Eau Bourde : Concentrations en nutriments aux stations amont et aval	229
Figure IV-22 : Expérimentation Eau Bourde : Paramètres physico-chimiques à chaque date d'échantillonnage	229
Figure IV-23 : Expérimentation Eau Bourde : Teneurs en matière sèche sans cendre et chlorophylle a	231
Figure IV-24 : Expérimentation Eau Bourde : Proportion de bactéries viables	232
Figure IV-25 : Expérimentation Eau Bourde : Index Autotrophique	233
Figure IV-26 : Expérimentation Eau Bourde : Indice diatomique IPS.....	234
Figure IV-27 : Expérimentation Eau Bourde : Répartition des communautés diatomiques en fonction de leur tolérance à l'azote organique	234
Figure IV-28 : Expérimentation Jalle d'Eysines : Concentrations en nutriments aux stations amont et aval	236
Figure IV-29 : Expérimentation Jalle d'Eysines : Paramètres physico-chimiques à chaque date d'échantillonnage ...	237
Figure IV-30 : Expérimentation Jalle d'Eysines : Teneurs en matière sèche sans cendre et chlorophylle a.....	238
Figure IV-31 : Expérimentation Jalle d'Eysines : Proportion de bactéries viables.....	239
Figure IV-32 : Expérimentation Jalle d'Eysines : Index Autotrophique (a), Indice diatomique IPS (b), Répartition des communautés diatomiques en fonction de leur tolérance à l'azote organique (c).....	241
Figure IV-33 : Expérimentations <i>in situ</i> : mise en relation des paramètres $\mu_{C.MSSC}/\mu_{C.Chla}$ et $[PO_4^{3-}]$	244

TABLEAUX :**Chapitre I : Synthèse bibliographique**

Tableau I-I : Types de végétaux en cause dans les phénomènes d'eutrophisation (d'après Bormans M., 2005).....	34
Tableau I-II : Origines du phosphore en France (d'après Deronzier G. & Choubert J.-M., 2004)	37
Tableau I-III : Revue des différentes méthodes de bioindication normalisées ou en cours de normalisation	49
Tableau I-IV : Paramètres utilisés dans le cadre de l'évaluation de l'état d'eutrophisation des milieux aquatiques d'eau douce ("causes" et "conséquences")	50
Tableau I-V : Limites des classes de trophie en lacs (source : OCDE, 1982).....	51
Tableau I-VI : Terminologie associée au biofilm selon le type de surface colonisée	54

Chapitre II : Matériels et méthodes

Tableau II-I : Revue des principaux avantages et inconvénients associés aux études expérimentales en laboratoire et <i>in situ</i>	71
Tableau II-II : Exemples de relevé d'éclairement au niveau des canaux expérimentaux ($\mu\text{E}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$)	78
Tableau II-III : Caractéristiques des deux expériences de précolonisation en laboratoire	80
Tableau II-IV : Principales caractéristiques des stations d'étude sur la Garonne	87
Tableau II-V : Caractéristiques des stations d'épuration encadrées	88
Tableau II-VI : Classification de la qualité de l'eau en amont et aval de Toulouse selon la grille du SEQ-Eau, les distances sont calculées par rapport à Toulouse (source : www.eau-adour-garonne.fr)	89
Tableau II-VII : Caractérisation chimique de l'eau en amont et aval de Toulouse, les distances sont calculées par rapport à Toulouse (données Agence de l'Eau, moyennes sur l'année 2004, à partir de 11 à 20 mesures réparties sur toute l'année de mesure).	90
Tableau II-VIII : Caractérisation de la station d'épuration de Mano (source : Générale des Eaux, 2003b).....	95
Tableau II-IX : Caractérisation de la station d'épuration de Cantinolle (source : Communauté Urbaine de Bordeaux, 2005)	96

Chapitre III : Résultats - Section 1 : Expérimentations en laboratoire : Production de biofilm en canaux expérimentaux sous conditions variées d'enrichissement

Tableau III-I : Expérimentations de Reproductibilité : Valeurs nominales moyennes des teneurs en nutriments ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) (mesurées après chaque renouvellement bihebdomadaire d'eau et ajouts de nutriments)	119
Tableau III-II : ER Réserve Commune : Valeurs moyennes sur les 4 canaux, écart-types, coefficients de variation et résultats des tests statistiques calculés sur les résultats de MSSC, Chla, Nombre total de bactéries et Proportion de bactéries viables	126
Tableau III-III : ER Alimentation Séparée : Valeurs moyennes sur les 4 canaux, écart-types, coefficients de variation et résultats des tests statistiques calculés sur les résultats de MSSC, Chla, Nombre total de bactéries et Proportion de bactéries viables	126
Tableau III-IV : ER Alimentation Séparée : Calcul moyen du taux de consommation des nutriments PO_4^{3-} et NO_3^- entre T11 et T14	130
Tableau III-V : Expérimentations de Reproductibilité : Index Autotrophique : Valeurs moyennes sur les 4 canaux, écart-types et coefficients de variation	132

Tableau III-VI : ER Alimentation Séparée : Valeurs moyennes des teneurs en chlorophylle a du canal 3 à chaque pas d'échantillonnage, calculées selon l'équation de Lorenzen et l'équation trichromatique (Chla en $\mu\text{g.cm}^{-2}$).....	134
Tableau III-VII : Expérimentations de Reproductibilité : Teneurs en algues : Valeurs moyennes sur les 4 canaux, écart-types et coefficients de variation dans le cas des deux protocoles.....	135
Tableau III-VIII : Expérimentations de Reproductibilité : IPS : Valeurs moyennes sur les 4 canaux, écart-types et coefficients de variation	137
Tableau III-IX : Expérimentations de Reproductibilité : Coefficients de variation obtenus sur les paramètres descripteurs de la croissance du biofilm dans les deux types de conditions expérimentales (RC : Réserve Commune, AS : Alimentation Séparée). Les chiffres en bleu signalent les cas où $CV_{AS} < CV_{RC}$	140
Tableau III-X : 1ère expérimentation Enrichissements Artificiels : Modalités d'enrichissements (a) et valeurs nominales moyennes des teneurs en nutriments des canaux (b) (mg.L^{-1}) (ligne grisée : canal témoin).....	144
Tableau III-XI : 1ère expérimentation Enrichissements Artificiels : Résultats des tests d'Anova à un facteur sur MSSC et Chla	146
Tableau III-XII : 1ère expérimentation Enrichissements Artificiels : Résultats des tests du Chi^2 sur Prop. bact. viables	147
Tableau III-XIII : 2nde expérimentation Enrichissements Artificiels : Modalités d'enrichissements (a) et valeurs nominales moyennes des teneurs en nutriments des canaux (b) (mg.L^{-1}) (ligne grisée : canal témoin).....	155
Tableau III-XIV : 2nde expérimentation Enrichissements Artificiels : Résultats des tests d'Anova à un facteur sur MSSC et Chla	158
Tableau III-XV : 2nde expérimentation Enrichissements Artificiels : Résultats des tests du Chi^2 sur Prop. bact. viables	159
Tableau III-XVI : 2nde expérimentation Enrichissements Artificiels : Moyenne (Moy) et coefficients de variation (CV) sur le paramètre IPS en fonction du temps pour les canaux enrichis C2, C3, C4.....	164
Tableau III-XVII : Expérimentation Eaux naturelles : Valeurs nominales moyennes des teneurs en nutriments des canaux (mg.L^{-1}).....	168
Tableau III-XVIII : Expérimentation Eaux Naturelles : Résultats des tests d'Anova à un facteur sur MSSC et Chla ...	170
Tableau III-XIX : Expérimentation Eaux naturelles : Résultats des tests du Chi^2 sur Prop. bact. viables.....	172
Tableau III-XX : Expérimentations de Reproductibilité : Valeurs du taux de croissance sur les paramètres MSSC et Chla	185
Tableau III-XXI : Expérimentations de Reproductibilité : Valeurs moyennes et coefficients de variation de $\mu_{C.MSSC}$ et $\mu_{C.Chla}$	185

Chapitre IV : Résultats - Section 2 : Expérimentations *in situ* : Production de biofilm sur supports artificiels en différents sites

Tableau IV-I : Expérimentation en Garonne, Site Toulouse : Classification de l'eau des stations amont et aval de Toulouse selon la grille du SEQ-Eau	204
Tableau IV-II : Expérimentation en Garonne, Site Toulouse : Résultats des tests de Student sur MSSC et Chla.....	206
Tableau IV-III : Expérimentation en Garonne, Site de Toulouse : Résultats des tests du Chi^2 sur Prop. bact. viables	208
Tableau IV-IV : Expérimentation en Garonne, Site de St Pierre de Gaubert : Résultats des tests de Student sur MSSC et Chla	216
Tableau IV-V : Expérimentation en Garonne, Site St Pierre de Gaubert : Résultats des tests du Chi^2 sur Prop. bact. viables.....	217
Tableau IV- VI : Expérimentation en Garonne, Site St Pierre de Gaubert :Teneurs en azote organique.....	217
Tableau IV-VII : Expérimentation Nasseys : Classification du cours d'eau selon la grille du SEQ-Eau	221

Tableau IV-VIII : Expérimentation Nasseys : Résultats des tests de Student sur MSSC et Chla	224
Tableau IV-IX : Expérimentation Nasseys : Résultats des tests du Khi^2 sur Prop. bact. viables	225
Tableau IV-X : Vitesses du courant relevées sur l'Eau Bourde.....	228
Tableau IV-XI : Expérimentation Eau Bourde : Résultats des tests de Student sur MSSC et Chla	231
Tableau IV-XII : Expérimentation Eau Bourde : Résultats des tests du Khi^2 sur Prop. bact. viables	232
Tableau IV-XIII : Expérimentation Jalle d'Eysines : Classification du cours d'eau selon la grille du SEQ-Eau	236
Tableau IV-XIV : Expérimentation Jalle d'Eysines : Résultats des tests de Student sur MSSC et Chla	238
Tableau IV-XV : Expérimentation Jalle d'Eysines : Résultats des tests du Khi^2 sur Prop. bact. viables	239
Tableau IV-XVI : Expérimentation en Garonne, Site Toulouse : Valeurs du taux de croissance sur les paramètres MSSC et Chla (j^{-1}).....	245
Tableau IV-XVII : Expérimentation en Garonne, Site St Pierre de Gaubert : Valeurs du taux de croissance sur les paramètres MSSC et Chla (j^{-1}).....	245
Tableau IV-XVIII : Expérimentation sur les trois cours d'eau d'aquitaine (Nasseys, Eau Bourde, Jalle d'Eysines) : Valeurs du taux de croissance sur les paramètres MSSC et Chla (j^{-1})	246
Tableau IV-XIX : Bilan des descripteurs qualitatifs du biofilm dans le cadre des expérimentations <i>in situ</i>	248

NOTATIONS

NOTATIONS

MES	Matières en suspension	N ₂	Azote moléculaire
MO	Matières organiques	N _{org}	Azote organique
MV	Matières volatiles	P _{org}	Phosphore organique
MSSC	Matières sèches sans cendre	O ₂	Oxygène
MA	Matières azotées	CO ₂	Dioxyde de carbone
MP	Matières phosphorées	CH ₄	Méthane
ADN	Acide désoxyribonucléique	H ₂ S	Sulfure d'hydrogène
ARN	Acide ribonucléique	Ca ²⁺	Calcium
ATP	Adénosine tri-phosphate	CO ₃ ²⁻	Carbonate
UV	Ultra-violet	C ₆ H ₁₂ O ₆	Glucose
DCEE	Directive Cadre Européenne sur l'Eau	CaCO ₃	Carbonate de calcium
RNB	Réseau national de bassin	C	Elément Carbone
SEQ	Système d'évaluation de la qualité	N	Elément Azote
EH	Equivalent-habitant	P	Elément Phosphore
IPS	Indice de Polluo-sensibilité Spécifique	Si	Elément Silice
DBL	Diffusive boundary layer (couche limite de diffusion)	E	Einstein
EPS	Extracellular Polymeric Substances	Ci	Canal (1, 2, 3 ou 4)
PO ₄ ³⁻	Phosphate	ER	Expérimentation(s) de reproductibilité
P _T	Phosphore total	Chla	Chlorophylle a
NO ₃ ⁻	Nitrate	IA	Index Autotrophique
NO ₂ ⁻	Nitrite	Ntot bact.	Nombre total de bactéries
NH ₄ ⁺	Ammonium	Prop. bact. viables	Proportion de bactéries viables
NH ₃	Ammoniac	ex.	Exemple
N-NO ₃ ⁻	Azote sous forme de nitrate	nbre	Nombre
N-NO ₂ ⁻	Azote sous forme de nitrite	cell	Cellules
N-NH ₄ ⁺	Azote sous forme ammoniacale	conduc.	Conductivité
N _K	Azote Kjeldhal (azote organique + azote ammoniacal)	temp.	Température
N _T	Azote total	hab	Habitants
		moy.	Moyenne
		EC	Ecart-type
		CV	Coefficient de variation

AVANT-PROPOS

AVANT-PROPOS

Le Groupement d'Intérêt Scientifique GIS ECOBAG, "Environnement, Ecologie et Economie du bassin Adour-Garonne", créé en 1992, a pour but d'harmoniser les recherches portant sur le bassin Adour-Garonne afin de produire des bases scientifiques pour l'aide à la gestion. Cette structure associe des partenaires des universités, des organismes de recherche des régions Aquitaine et Midi-Pyrénées et de l'Agence de l'Eau Adour-Garonne.

Le sujet de la thèse s'intègre au sein du programme P1 qui est organisé autour de sept axes thématiques présentés dans l'encadré ci-dessous :

Composition du P1 (2000-2006) :
1.1. Bilan et impact des matières au niveau du Bassin Adour-Garonne.
1.2. Fonctionnement de l'estuaire de l'Adour et de l'hydrosystème Nives.
1.3. Diagnostic du fonctionnement de l'écosystème de l'estuaire Girondin.
1.4. Hydroécologie du bassin de la Garonne.
1.5. Analyses sociologiques des conditions d'optimisation des dispositifs de gestion d'eau.
1.6. Poissons migrateurs sur les bassins Garonne et Adour.
1.7. Recherches interdisciplinaires.

Axes thématiques du programme de recherche P1 ECOBAG

Notre travail prend sa place au niveau du thème « Hydroécologie du bassin de la Garonne » auquel participent plusieurs équipes de laboratoires différents : IMFT¹, LEH², Cemagref³ et ENSAT⁴. Le but, à long terme, est la modélisation du fonctionnement hydraulique et biogéochimique du fleuve Garonne à l'étiage, ceci pour mieux appréhender le fonctionnement du fleuve en vue d'une bonne adéquation avec la gestion des rejets des stations d'épuration le long de son cours. A l'issue des quatre précédentes années du programme (1995-1999), les avancées scientifiques ont permis la production d'un modèle couplant hydrodynamique et biogéochimie de la Garonne moyenne (Sauvage S. *et al.*, 1999).

L'action du Cemagref se situe au sein de l'opération « Niveau Trophique » de l'axe de recherche et porte notamment sur :

- la caractérisation du statut trophique de la Garonne ;
- l'évaluation de l'impact trophique de rejets d'effluents urbains et leur mise en adéquation avec les potentialités du milieu.

¹ IMFT : Institut de Mécanique des Fluides de Toulouse

² LEH : Laboratoire d'Ecologie des Hydrosystèmes UMR 5177 Toulouse

³ Cemagref de Bordeaux - Unité Réseaux, Epuration et Qualité des Eaux

⁴ ENSAT : Ecole Nationale des Sciences Appliquées de Toulouse

INTRODUCTION

INTRODUCTION

« Il est désormais banal de rappeler que la protection des espèces sauvages n'est possible que si l'on protège en même temps les milieux dont elles dépendent pour l'accomplissement de leur cycle vital. Il est non moins banal d'affirmer que ce n'est pas en transformant en sanctuaires quelques lopins de terre et en artificialisant tout le reste que l'on conservera le patrimoine naturel » (Blandin P., 1986, Professeur au Muséum National d'Histoire Naturelle - Paris).

Les rivières sont des milieux vivants. Outre leur rôle physique, qui est d'écouler les eaux issues de leur bassin versant tout en modelant le relief, les rivières présentent un rôle biologique car elles sont le support de communautés végétales et animales. A ces propriétés naturelles se sont rajoutés des usages anthropiques telles que des pratiques sanitaires (évacuation des eaux usées, production d'eau potable), économiques (irrigation, industries, élevages piscicoles, navigation) et ludiques (baignade, pêche). Ainsi, les milieux aquatiques sont soumis à de nombreuses pressions qui conduisent à une dégradation plus ou moins importante de leur qualité.

L'évacuation des eaux usées a toujours constitué une source importante de pollution pour les milieux aquatiques. En effet, outre le rejet de micro-organismes potentiellement pathogènes, la principale gêne réside dans l'apport en matières organiques qui conduit à la désoxygénation du milieu suite aux processus de minéralisation réalisés par les micro-organismes. A partir des années 50, la généralisation de l'implantation de stations d'épuration, traitant les eaux usées des communes et agglomérations, a permis de diminuer de manière significative les teneurs en matières organiques déversées dans les cours d'eau. Mais, par les traitements biologiques des eaux usées, est apparue une nouvelle source potentielle de perturbation des milieux aquatiques, constituée par les rejets plus importants d'azote et de phosphore sous forme minérale (Angelier E., 2000).

Cet apport d'éléments nutritifs, sous forme assimilable par les communautés végétales du cours d'eau, a conduit à un autre type de dysfonctionnement du milieu : l'eutrophisation. L'eutrophisation (du grec *eu-* : bien et *-trophein* : nourri, nourrissant) peut être définie comme « *un enrichissement des cours d'eau et plans d'eau en éléments nutritifs, essentiellement le phosphore et l'azote, qui constituent un véritable engrais pour les plantes aquatiques. L'eutrophisation se manifeste par la prolifération excessive des végétaux dont la respiration nocturne puis la décomposition à leur mort provoquent une diminution notable de la teneur en oxygène. Il s'en suit, entre autres, une diversité animale et végétale amoindrie et des usages perturbés (alimentation en eau potable, loisirs,...)* » (Réseau de Bassin Rhône-Méditerranée, 1999).

L'évaluation de la qualité des hydrosystèmes est essentielle, d'une part, pour adapter les usages en fonction de la qualité effective du milieu et, d'autre part, pour situer l'effet des perturbations sur le milieu en vue d'une meilleure adaptation des stratégies de gestion des cours d'eau. P. Blandin (1986) rappelle que les mesures physiques et chimiques, qui caractérisent l'hydrosystème au moment de l'analyse, ne permettent pas à elles seules de conclure sur l'état de l'écosystème. Les organismes aquatiques étant en interaction avec toutes les composantes du milieu (physiques, chimiques ou biologiques), toute dégradation de ce milieu aura une influence sur la composition et/ou la structure des peuplements. En conséquence, l'étude des modifications des biocénoses en place, qui représentent l'intégration dans le temps des altérations des différentes composantes du milieu, permet une appréciation synthétique de la qualité du cours d'eau (Verneaux J., 1984). Cette démarche est désignée sous le terme de "bioindication". Ainsi, les outils d'évaluation du degré d'enrichissement en nutriments de l'eau, utilisés dans les systèmes à écoulement lent (type lacs, retenues, cours d'eau de petite taille ou modifiés par l'implantation de barrages), reposent sur l'étude de la biomasse phytoplanctonique (paramètre chlorophylle *a*, étude des communautés algales, dosage de la matière organique,...).

S'agissant des systèmes d'eau courante, J. Verneaux (1984) indique clairement que « *les fluctuations temporelles des populations à cycle court, l'incertitude de leurs origines et le fait que les données se rapportent à un volume d'eau en transit, compromettent la signification du plancton relativement à la qualité des sites d'eau courante* ». En effet, en raison des conditions hydrodynamiques fortes qui rendent la production phytoplanctonique souvent faible en rivières, pour des raisons de temps de résidence insuffisants, le compartiment pélagique n'est pas le plus approprié pour aborder ces questions. De ce fait, un enrichissement en nutriments avéré de la rivière ne se traduirait donc pas de manière aussi claire que dans le cas d'eaux plus stagnantes (Capblancq J. & Décamps H., 2002).

Dans le cas du fleuve Garonne, les travaux de T. Améziane *et al.* (2003) sur le compartiment phytoplanctonique ont montré que les teneurs en chlorophylle *a* présentes dans la masse d'eau sont faibles et ne présentent effectivement pas de relation évidente avec la charge en nutriments transportée par le fleuve. De plus, l'étude plus fine des populations algales de la pleine eau a révélé que la part majoritaire des algues circulantes résulte en fait de l'abrasion des couches du phytobenthos et non d'une production phytoplanctonique propre au compartiment pélagique. En parallèle, la production intrinsèque de phytoplancton n'est observée que dans deux secteurs lenticques du cours d'eau (retenues de Mancies et de Malause).

Actuellement, il n'existe pas de critère approprié pour décrire l'état trophique du milieu dans le cas des rivières à écoulement rapide. Or, comme nous l'avons vu précédemment, la caractérisation de l'état du cours d'eau est indispensable pour adapter l'usage à la qualité du milieu et cerner le taux de dépollution à appliquer aux rejets qui y parviennent. De plus, cette nécessité de disposer d'outils de diagnostic adaptés est renforcée par le contexte de la Directive Cadre Européenne sur l'Eau du 23 octobre 2000¹, qui impose une révision profonde des méthodes d'analyse et des objectifs de qualité attendus : « *en 2015, la*

¹ Directive 2000/60/CE du Parlement européen et du Conseil du 23 octobre 2000, établissant un cadre pour une politique communautaire dans le domaine de l'eau (Journal officiel n° L 327 du 22/12/2000 p. 0001 - 0073).

ressource en eau, toutes catégories confondues (cours d'eau, eaux souterraines, eaux littorales,...) doit être en "bon état" ». Or, ce bon état écologique doit être évalué, d'une part, à partir de critères physico-chimiques de qualité d'eau et, d'autre part, à partir de critères biologiques nécessairement représentatifs de la qualité réelle du milieu.

En eaux courantes, les organismes aquatiques sont sous l'influence de facteurs physiques particuliers, notamment l'hydraulique et le temps de transit, qui conditionnent leur développement au sein du milieu (Angelier E., 2000). Dans les rivières à forte énergie et à temps de résidence courts de l'eau, les populations algales et bactériennes présentes à l'état fixé de biofilm, ou périphyton, sont majoritaires comparativement aux populations libres au sein de la masse d'eau. Dans la suite du travail, nous qualifierons ce type de rivières de systèmes "à biomasse fixée dominante". Nous reviendrons plus largement sur le compartiment du périphyton dans la revue bibliographique, mais précisons ici qu'il peut être défini comme : « *l'ensemble des organismes aquatiques tant autotrophes (Diatomées par exemple) qu'hétérotrophes (protistes, petits invertébrés) vivant fixés à la surface des substrats immergés qu'ils soient minéraux (rochers lisses) ou biologiques (plantes aquatiques ou amphibiés)* » (Ramade F., 1993). Ce compartiment, en raison de ses fractions autotrophe et hétérotrophe (producteurs primaires et secondaires, Wetzel R.G., 1983 ; Tank J.L. & Dodds W.K., 2003), interagit sur les cycles biogéochimiques en participant au recyclage des nutriments et à la dégradation des polluants (Liu D. *et al.*, 1993 ; Battin T.J. *et al.*, 2003). Le biofilm constitue une part fondamentale de l'écosystème rivière et est à la base des réseaux trophiques car il représente une source importante de nourriture et, donc, d'énergie nécessaire aux niveaux supérieurs de la chaîne trophique (insectes, poissons, ...) (Biggs B.J.F. & Kilroy C., 2000 ; Burns A. & Ryder D.S., 2001).

La relation qui est faite en milieu lentique entre les algues du phytoplancton et le niveau de trophie des eaux doit pouvoir être transposée en milieu lotique avec les algues benthiques du biofilm. Néanmoins, les travaux de T. Améziane *et al.* (2002) sur le fleuve Garonne, autour de l'agglomération de Toulouse, ont montré qu'il n'est pas possible de discriminer les statuts trophiques de deux stations soumises à des flux nutritifs différents par la quantité de biofilms présente à l'équilibre sur supports naturels (galets) (biomasse développée par unité de surface : 1/ en été, amont : 24 g MSSC.cm⁻² - aval : 25 g MSSC.cm⁻² ; 2/ en automne, amont : 27 g MSSC.cm⁻² - aval : 23 g MSSC.cm⁻²). En effet, qu'il s'agisse de stations en amont ou en aval de rejets polluants, la biomasse périphytique atteint rapidement un équilibre qui résulte de sa croissance influencée très fortement par les facteurs hydrauliques ainsi que par les actions de broutage par la faune benthique.

Il est donc nécessaire de rechercher un paramètre univoque caractérisant le biofilm dans sa dynamique de croissance et sa réponse à un enrichissement de l'hydrosystème, puis de tester sa fonction bioindicatrice.

Positionnement de la thèse

De la même manière que le sédiment est considéré comme un compartiment fonctionnel gardant la mémoire des altérations d'un cours d'eau (Montuelle B., 2003), nous avons cherché à vérifier que le biofilm est un compartiment susceptible de bio-intégrer le niveau de trophie de cours d'eau à biomasse fixée dominante.

En nous attachant à étudier un hydrosystème à biomasse fixée dominante particulier, tel que le fleuve Garonne, travail complété par des expérimentations sur d'autres rivières de la région aquitaine, la question à laquelle nous cherchons à répondre peut être ainsi formulée :

Quels paramètres descriptifs du biofilm développé en rivières peuvent nous permettre de repérer différents niveaux d'enrichissement des eaux ?

Ceci en vue de proposer un outil de bioindication pertinent du niveau d'enrichissement des eaux dans le cas des milieux lotiques.

En se basant sur différents travaux réalisés en Garonne¹, l'hypothèse de départ, testée au cours de ce travail, est que c'est au niveau de la vitesse de croissance du biofilm que peuvent se repérer des différences entre statuts trophiques.

Nous avons choisi de réaliser cette recherche à travers une association complémentaire d'expérimentations en laboratoire et *in situ*.

- Tout d'abord, la possibilité de maîtriser les conditions expérimentales en laboratoire nous permet d'isoler le facteur de contrôle "enrichissement en nutriments". Ceci afin d'identifier, parmi les métriques permettant de décrire les biofilms et leur dynamique de croissance, celles rendant le mieux compte d'un gradient de statut trophique des eaux.
- Dans un deuxième temps, en conditions réelles de terrain, notre but est de valider la pertinence des descripteurs sélectionnés au laboratoire et de définir le cadre de leur application possible. Le but à moyen terme étant la conception d'un outil d'évaluation du niveau de trophie des rivières à biomasse fixée dominante applicable en routine sur le terrain.

En ce qui concerne les paramètres *a priori* ciblés pour décrire la dynamique de mise en place du biofilm, la sélection des méthodes appropriées est sujette à discussion. Le suivi de l'abondance et de la distribution des espèces est fréquemment employé dans l'évaluation de la santé des rivières (Patrick, 1949 ; Bouchy J.-M. & Garnier-Zarli E., 1994 ; Angelier E., 2000). J. Verneaux (1984) indique qu'il existe un choix à faire entre cette analyse biocénotique approfondie, portant sur un seul groupe, et une analyse globale simplifiée.

¹ (Benmoussa M., 1995 ; Eulin A., 1997 ; Améziane T., 2000 ; Teissier S., 2001 ; Améziane T. *et al.*, 2002 ; Teissier S. *et al.*, 2002 ; Améziane T. *et al.*, 2003)

Dans le cadre de ce travail, nous avons choisi, d'une part, d'examiner l'intérêt d'un paramètre de description de la biomasse totale de biofilm (matière sèche sans cendre correspondant à la matière organique) et, d'autre part, de tirer parti des informations portées par les deux principaux compartiments du biofilm que sont les algues et les bactéries. Ce volet est abordé à l'aide de paramètres quantitatifs, tels que le dosage de la chlorophylle *a* et des numérations bactériennes, ainsi qu'à l'aide de paramètres qualitatifs, par l'usage de descripteurs tels que le pourcentage de bactéries dites viables ou la détermination de différentes communautés algales.

Cette thèse est structurée en cinq chapitres. Le premier, relatif à la revue de la littérature, présente le contexte théorique de l'étude, la problématique du diagnostic des eaux en rivières ainsi que des éléments sur la caractérisation du compartiment du biofilm ; le deuxième chapitre fait état des méthodologies et matériels utilisés pour réaliser cette étude ; dans les troisième et quatrième chapitres, nous présentons les résultats obtenus ainsi que la discussion et le cinquième concerne les conclusions générales suivies de la formulation de perspectives.

* *

* * *

CHAPITRE I :

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I :

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Le premier chapitre est consacré à la revue de la littérature, à la présentation du contexte théorique de l'étude et de la problématique du diagnostic des eaux en rivières et à la caractérisation du compartiment périphytique. Les cours d'eau sont soumis à divers types de pollution (thermique, chimique, radioactive, biologique,...), mais notre attention a porté spécifiquement sur la pollution due aux apports d'éléments nutritifs dans la masse d'eau. Ainsi se pose immédiatement la question des méthodes de diagnostic des milieux aquatiques. L'approche par bioindication, associée à l'étude physico-chimique, est standardisée. Cependant, elle se révèle insuffisante dans le cas des grandes rivières à cause de la faiblesse des teneurs en phytoplancton de ces eaux. Il était intéressant, dans ce contexte, d'envisager l'étude du biofilm et de ses différents descripteurs.

La compréhension de ces éléments permettra, d'une part, de poser la question du lien entre le biofilm et la qualité trophique des eaux et, d'autre part, de montrer la nécessité de cibler certains descripteurs du biofilm pour mieux définir la relation établie. Au-delà des avancées significatives déjà réalisées dans ce domaine, cette approche est nécessaire pour la meilleure compréhension des relations biocénoses-qualité d'eau et des actions éventuelles à définir.

I. 1 • POLLUTION DES COURS D'EAU

Un système aquatique est dit "pollué" lorsqu'il est soumis à des agressions extérieures susceptibles de nuire à la qualité de l'écosystème, telles que des rejets d'eaux usées ou industriels. Quels que soient la nature de la pollution et le type de milieu concerné, à partir d'un certain niveau d'intensité de la pollution, l'effet se traduit par une simplification de l'édifice trophique. En effet, suite à une altération, le milieu évolue plus ou moins rapidement et devient inhospitalier à un certain nombre d'espèces en fonction de leur propre tolérance, les plus sensibles disparaissant en premier (Verneaux J., 1984).

Notons que les notions de "pollution" (ou "nuisance") et de "qualité" ne s'entendent qu'en regard d'un usage potentiel du milieu (Gaujous D., 1995). En effet, B. Genin *et al.* (1997) donnent comme exemple la forte production primaire d'un plan d'eau qui est une nuisance pour le traiteur d'eau mais un avantage du point de vue du pisciculteur. De même, en ce qui concerne la réglementation, les objectifs de qualité ne sont pas du même ordre envers la production d'eau potable ou la pratique des sports nautiques.

I. 1.1. Les différents types de pollution

Les cours d'eau sont soumis à divers types de pression. D'une part, les débits peuvent être modifiés suite à l'implantation de barrages, à un recalibrage ou aux prélèvements d'eau effectués par des industries ou centrales de production d'énergie. D'autre part, la qualité de l'eau peut être altérée suite à des rejets polluants.

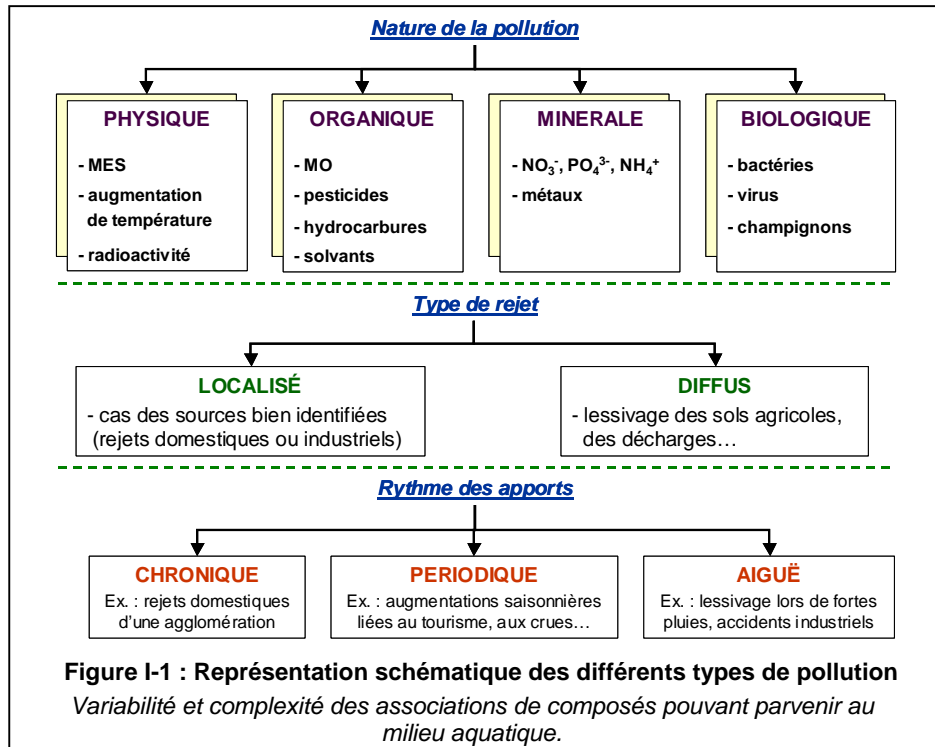
Les rejets polluants présentent principalement trois origines distinctes : domestique (y compris urbaine), agricole et industrielle, avec ou sans traitement en station d'épuration avant leur rejet dans le milieu naturel. Du fait de ces différentes sources d'effluents polluants, les composés susceptibles de parvenir au milieu naturel sont très variés. On classe généralement la nature des rejets polluants en quatre catégories : physique, organique, minérale et biologique (Figure I-1).

Les eaux usées domestiques sont caractérisées par de fortes teneurs en matières organiques, en composés minéraux (NH_4^+ et PO_4^{3-}), en détergents et en germes fécaux. En milieu urbain, les eaux pluviales qui ruissellent se chargent de matières minérales en suspension (sables, graviers), d'hydrocarbures et de débris solides divers. La pollution d'origine agricole résulte des effluents d'élevage et de l'emploi de pesticides et d'engrais organiques ou minéraux pour la fertilisation des terres (sources de NO_3^- et PO_4^{3-}). Ces composés peuvent être lessivés lors de précipitations et entraînés vers le milieu aquatique. La pollution industrielle est quant à elle très diversifiée. En effet, selon le type d'activité concerné, les rejets peuvent être composés de matières organiques (industrie agroalimentaire), d'hydrocarbures (usines pétrolières), de matières radioactives ou encore de substances chimiques (métaux, acides, bases, micro-polluants organiques de synthèse comme les pesticides, PCB¹,...). Les polluants toxiques affectent les organismes, alors que les polluants trophiques affectent le fonctionnement de l'écosystème.

Le type de rejet est un autre critère qui doit être intégré dans cette caractérisation. En effet, le mode d'écoulement des pollutions vers le milieu aquatique conditionne la réponse de l'écosystème ainsi que les moyens potentiellement à mettre en œuvre pour quantifier, collecter et traiter ces rejets (Genin B. *et al.*, 1997). Ainsi, une pollution peut être localisée, dans le cas de déversements d'effluents domestiques, ou diffuse, dans le cas du lessivage de sols agricoles.

Enfin, la périodicité des apports est également à prendre en compte, puisque les effets et les traitements consécutifs sont totalement distincts dans le cas de rejets chroniques, du type de ceux d'une station d'épuration, ou dans le cas de déversements accidentels qui donnent lieu à une pollution aiguë (ex. : accident d'une usine chimique).

¹ PCB : Polychlorobiphényles.

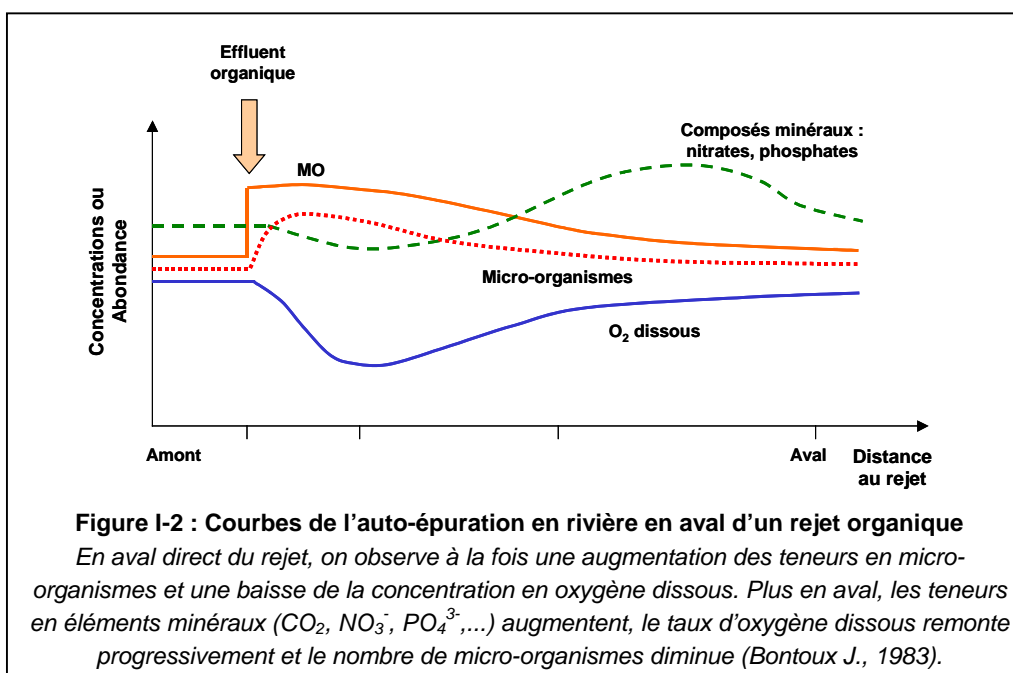


Face à ces diverses pollutions, les milieux récepteurs peuvent mettre en jeu un ensemble de processus d'élimination naturelle des polluants. Cette capacité est désignée sous le terme global d'"auto-épuration" et comprend à la fois des processus biologiques (assimilation, minéralisation,...), chimiques (oxydoréductions,...) et physiques (dilution, dispersion, adsorption,...)¹.

Notons le devenir particulier des polluants organiques biodégradables qui sont transformés en composés minéraux par mise en œuvre de dégradations bactériennes oxydatives (Angelier E., 2000). Ainsi, dans le cas d'un rejet de station d'épuration domestique, J. Bontoux (1983) rappelle le principe de zonation du cours d'eau et des organismes associés en aval du point de rejet (Figure I-2).

La première zone en aval immédiat est celle de la décantation des particules minérales et organiques. On observe ensuite une zone où les communautés de micro-organismes sont fortement développées et présentent une activité bactérienne intense. Cette minéralisation des matières organiques par les bactéries avec consommation d'oxygène dissous, ainsi que les respirations bactériennes associées, induisent un fort déficit des teneurs en oxygène de la colonne d'eau. Plus en aval, les teneurs en matières organiques reviennent à des valeurs faibles tandis que celles en matières minérales sont plus élevées qu'en amont du rejet, en particulier pour les substances azotées et phosphorées. Les concentrations en oxygène dissous remontent progressivement et, parallèlement, les teneurs en bactéries diminuent.

¹ Auto-épuration : On distingue l'auto-épuration vraie (élimination de la pollution) de l'auto-épuration apparente (dilution, transformation, transfert dans l'espace ou dans le temps de la pollution). Les organismes vivants (bactéries, champignons, algues,...) jouent un rôle essentiel dans ce processus. Les rendements d'auto-épuration augmentent avec la température et le temps de séjour (Pôle Observatoire de l'Environnement de l'Institut de Formation et de Recherche en Education à l'Environnement & Observatoire Régional de l'Environnement, 2005).



Cette capacité d'auto-épuration de l'hydrosystème, qui peut être inhibée dans le cas de la présence de toxiques, dépend des possibilités de réoxygénation du milieu (Bontoux J., 1983 ; Gaujous D., 1995). Lorsque le seuil est dépassé, la matière organique est dégradée en conditions d'anaérobiose avec formation de composés potentiellement toxiques pour la faune en place (NH₃, H₂S, CH₄) (Lévêque C., 1996). En rivières, les conditions hydrodynamiques permettent en général une aération suffisante, mais les quantités de polluants rejetés augmentant, les cas de dysfonctionnement deviennent fréquents.

I. 1.2. L'eutrophisation, une altération nutritionnelle

Dans ce panel des différents cas d'altération des milieux aquatiques, nous nous sommes intéressés à celui des rejets d'éléments nutritifs dans le milieu. Cet apport de nutriments peut être de type localisé, dans le cas des rejets d'une station d'épuration, ou de type diffus, dans le cas des rejets issus de l'agriculture. Ces deux types de pollution du milieu peuvent être considérés comme chroniques, même s'il existe une saisonnalité des apports issus des pratiques agricoles.

I. 1.2.1. Définition - L'eutrophisation

Les éléments chimiques constitutifs de la masse d'eau peuvent être classés en deux grands groupes : les éléments conservatifs, qui ne subissent pas de transformation au sein de la masse d'eau, et les éléments biogènes, ou nutriments, dont les teneurs varient suite à l'action des organismes vivants du milieu. Les

nutriments nécessaires au développement des algues et végétaux supérieurs sont le carbone, la silice (essentielle au développement des Diatomées, car constitutive de leur squelette), l'azote et le phosphore.

Les éléments nutritifs influent sur la croissance des végétaux à travers leurs concentrations propres ainsi que leurs proportions relatives (Garnier J. *et al.*, 2001). Ce postulat renvoie directement à la notion du Rapport de Redfield¹ (Redfield A.C. *et al.*, 1963). En l'absence de toute activité humaine, les concentrations des éléments nutritifs dans le milieu aquatique sont faibles. Néanmoins, comme nous l'avons vu précédemment, les activités anthropiques, telles que le déversement dans le milieu naturel des rejets domestiques et industriels ainsi que les pratiques d'agriculture intensive, ont engendré une augmentation importante des teneurs en éléments nutritifs des milieux aquatiques, avec l'apparition d'un phénomène particulier : l'eutrophisation.

Notons que, à l'origine, l'eutrophisation d'un hydrosystème est un processus évolutif naturel d'enrichissement des eaux, mais les activités anthropiques ont eu pour conséquence d'amplifier largement ce phénomène qui apparaît désormais à une échelle de temps humaine.

F. Ramade (1993), dans le *Dictionnaire encyclopédique de l'écologie et des sciences de l'environnement*, marque la différence entre ces deux cas (phénomène naturel ou phénomène résultant des activités humaines) en leur attribuant deux termes distincts :

- Eutrophisation : « *phénomène d'enrichissement des eaux continentales ou littorales en sels minéraux nutritifs (phosphates, nitrates,...) résultant de phénomènes naturels. Il se caractérise par une prolifération d'algues et de plantes supérieures aquatiques qui conduit à une désoxygénation des couches profondes des eaux* » ;
- Dystrophisation : « *phénomène caractérisé par un enrichissement excessif par des éléments minéraux nutritifs des eaux (...). Cet enrichissement peut être produit par le déversement d'effluents urbains pollués par des matières organiques fermentescibles ou au contraire par des pollutions diffuses liées à l'usage excessif d'engrais chimiques dans les terres cultivées du bassin versant. Il en résulte une prolifération massive du phytoplancton et de la végétation aquatique* ».

On note que dans leur définition, ces termes englobent l'augmentation de la ressource en nutriments et celle, consécutive, de la production primaire (Genin B. *et al.*, 1997).

Dans la suite du texte, afin d'être en harmonie avec l'emploi qu'il est fait de ce terme dans les textes réglementaires ou dans les rapports publics, nous utiliserons un seul et même terme, celui d'eutrophisation, pour signifier les phénomènes de proliférations végétales, même s'ils résultent du rejet d'effluents d'origine urbaine ou des activités agricoles.





Ce sont les organismes autotrophes qui sont impliqués dans ce processus. Le tableau suivant (Tableau I-I) indique les différents types de communautés végétales qui peuvent être sensibles à un enrichissement du milieu et révéler alors des signes d'eutrophisation.

¹ Le rapport de Redfield exprime le rapport d'équilibre entre les nutriments contenus dans la matière organique des organismes photosynthétiques du phytoplancton. Ce rapport, qui conduit au développement optimal des algues, est égal à : C/N/P=106/16/1, en rapports atomiques.

Parmi les végétaux du milieu aquatique, c'est le compartiment algal (algues libres et fixées) qui est le principal compartiment impliqué dans les phénomènes d'eutrophisation. Les algues utilisent les éléments minéraux et l'énergie solaire pour produire leur biomasse à travers les réactions de photosynthèse. Sous l'effet d'une augmentation massive des concentrations en nutriments au sein du milieu aquatique, on assiste à un développement excessif des communautés algales pouvant donner à l'eau une coloration prononcée de verte à brune ("bloom algal").

Tableau I-I : Types de végétaux en cause dans les phénomènes d'eutrophisation (d'après Bormans M., 2005)

Ce sont principalement les algues phytoplanctoniques et benthiques qui sont associées aux épisodes d'eutrophisation.

Formes végétales concernées		Aspect du milieu aquatique	Illustration
PHYTOPLANCTON		Eau colorée, réduction de la transparence	
ALGUES FIXEES	DIATOMEES	Dépôt sur le fond des cours d'eau	
	ALGUES FILAMENTEUSES	Grandes algues pouvant envahir toute la masse d'eau	
VEGETAUX SUPERIEURS		Allure de végétaux terrestres	

I. 1.2.2. Facteurs de l'eutrophisation

Nous distinguerons les facteurs chimiques et les facteurs physiques.

a) Facteurs chimiques : les nutriments

Un ajout de nutriments au sein de la masse d'eau déclenche un développement excessif des communautés algales parce qu'il y a levée de la limitation en nutriments du milieu (Dodds W.K. *et al.*, 2002). Issue du contexte des pratiques agricoles, la notion de "facteur limitant", formulée par J. Liebig (1840), est à l'origine de la "loi du minimum" selon laquelle la croissance des végétaux est limitée par l'élément dont la concentration est inférieure à une valeur minimum sous laquelle les synthèses ne peuvent plus se faire. Ainsi, le premier objectif concernant les problèmes d'eutrophisation en eau douce a été d'identifier le facteur limitant afin d'en réduire les apports au milieu. Toutefois, rappelons le principe selon lequel l'effet des nutriments résulte tout autant de leur propre concentration que de leur quantité relative les uns par rapport aux autres.

• Carbone et Silice

En considérant les sources naturelles et anthropiques des éléments nutritifs en eaux courantes, on observe que ce n'est ni le carbone ni la silice qui sont bio-limitants. En effet, le carbone inorganique provient de la dissolution par l'eau des roches carbonatées et de la dissolution puis dissociation du CO₂ de l'atmosphère. Il est consommé en surface par les organismes photosynthétiques pour former des composés organiques et est restitué lors de la minéralisation de la matière organique. Le système calco-carbonique¹, c'est-à-dire l'équilibre dynamique entre la calcite et les ions carbonates et bicarbonates, assure la pérennité de la présence de l'élément C. De ce fait, le carbone n'est que rarement un élément limitant pour la croissance des végétaux (Pourriot R. *et al.*, 1982 ; Picot B., 2001).

En ce qui concerne la silice, le cycle de cet élément, qui n'a pas de réservoir atmosphérique, est régi par des processus géochimiques lors de la formation et de la dissolution des roches silicatées et par les activités biologiques une fois que la silice est en solution (Tett P., 2003). Cet élément n'intervient que dans le développement des communautés de Diatomées où il est nécessaire pour l'élaboration de leur frustule (squelette siliceux). En eaux douces, la silice n'est généralement pas limitante par rapport aux besoins des Diatomées. Toutefois, on note que si les quantités d'azote et de phosphore sont massives et qu'il y a un déséquilibre dans les rapports en éléments nutritifs N/Si et P/Si, comme cela peut être le cas en milieu marin, cela peut engendrer la production de micro-algues toxiques (Garnier J. & Boët P., 2000 ; Ifremer, 2002 ; Cugier P. *et al.*, 2005). En effet, lorsque la silice est limitante, les Diatomées, qui ont besoin de cet élément pour se développer, sont supplantées par d'autres espèces de micro-algues moins exigeantes en silice (Dinoflagellés) dont certaines espèces sont toxiques.

¹ Equation de l'équilibre calco-carbonique : $\text{CaCO}_3 + \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{Ca}(\text{HCO}_3)_2 \leftrightarrow \text{Ca}^{2+} + 2 \text{HCO}_3^-$

• Azote et Phosphore

Concernant les éléments azote et phosphore, leur implication dans les phénomènes d'eutrophisation en cours d'eau est souvent envisagée conjointement. Or, en référence à la loi du minimum, il ne peut y avoir qu'un seul facteur limitant à un moment donné, même s'il peut exister une forte interaction entre les différents facteurs de contrôle (par exemple : N/P, N/Si, N/lumière).

■ L'azote est essentiel pour la croissance des micro-organismes car il s'intègre dans les molécules des protéines et des acides nucléiques. Les sources de N pour le milieu aquatique sont représentées par les précipitations, la fixation par les cyanobactéries de l'azote gazeux atmosphérique (où N₂ est présent à plus de 78%)¹ (Lévêque C., 1996), les apports par les eaux souterraines et les eaux de surface (lessivage des engrais du sol) ainsi que les eaux usées urbaines (rejet de 12-15 g N.hab⁻¹.j⁻¹) (Comité de Bassin Adour Garonne, 1997) (Figure I-3). L'ensemble des sources de N représente un apport important au milieu et, de ce fait, l'azote n'est pas considéré comme limitant en milieu d'eau douce (Barroin G., 2003 ; Faurie C. *et al.*, 2003). De plus, en cas de carence d'azote en solution, les communautés de cyanobactéries fixatrices d'azote gazeux deviennent prédominantes et pallient ainsi le manque éventuel de N (Lévêque C., 1996 ; Faurie C. *et al.*, 2003).

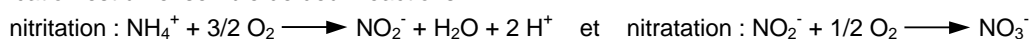
Au sein de la colonne d'eau oxygène, l'azote se retrouve majoritairement sous forme de nitrates. En effet, l'azote organique est rapidement minéralisé en NH₄⁺ tandis que l'azote ammoniacal est oxydé en nitrites puis en nitrates lors de la nitrification². La forme préférentielle d'assimilation de l'élément N par les végétaux est la forme réduite NH₄⁺ car c'est elle qui nécessite un besoin moindre en énergie pour être assimilée. Cependant, en raison de la présence beaucoup plus importante de nitrates, c'est cette forme d'azote (la plus oxydée et la plus stable) qui est la plus utilisée.

■ L'élément phosphore est lui aussi essentiel au développement des organismes puisqu'il participe à la synthèse des acides nucléiques ADN et ARN et entre en jeu dans les cycles énergétiques cellulaires (ATP).

Une particularité du cycle du phosphore est qu'il n'a pas de réservoir atmosphérique. La source naturelle de phosphore est l'érosion des roches de surface (apatite [Ca₅(PO₄)₃OH] et autres minéraux phosphorés) (Figure I-3). Toutefois, d'une part, l'élément P y est présent en quantité peu importante (0,1% en poids) et, d'autre part, il est transporté principalement sous forme particulaire (de 90 à 95%) non accessible aux biocénoses qui assimilent préférentiellement le P sous forme minérale dissoute (PO₄³⁻) (Lévêque C., 1996). Les sources anthropiques du phosphore sont quant à elles liées aux apports domestiques (≈ 5 g P.hab⁻¹.j⁻¹) (Genin B. *et al.*, 1997) et aux apports d'origines industrielle et agricole. Les proportions de phosphore déversé dans le milieu naturel en France, selon son origine, sont présentées dans le tableau suivant (Tableau I-II). On observe que la moitié des apports est d'origine agricole et le tiers d'origine domestique.

¹ Equation de fixation de N₂ par les cyanobactéries : N₂ + 8 H⁺ + 8 e⁻ + 16 ATP ↔ 2 NH₃ + H₂ + 16 ADP + 16 Pi

² La nitrification est un ensemble de deux réactions :



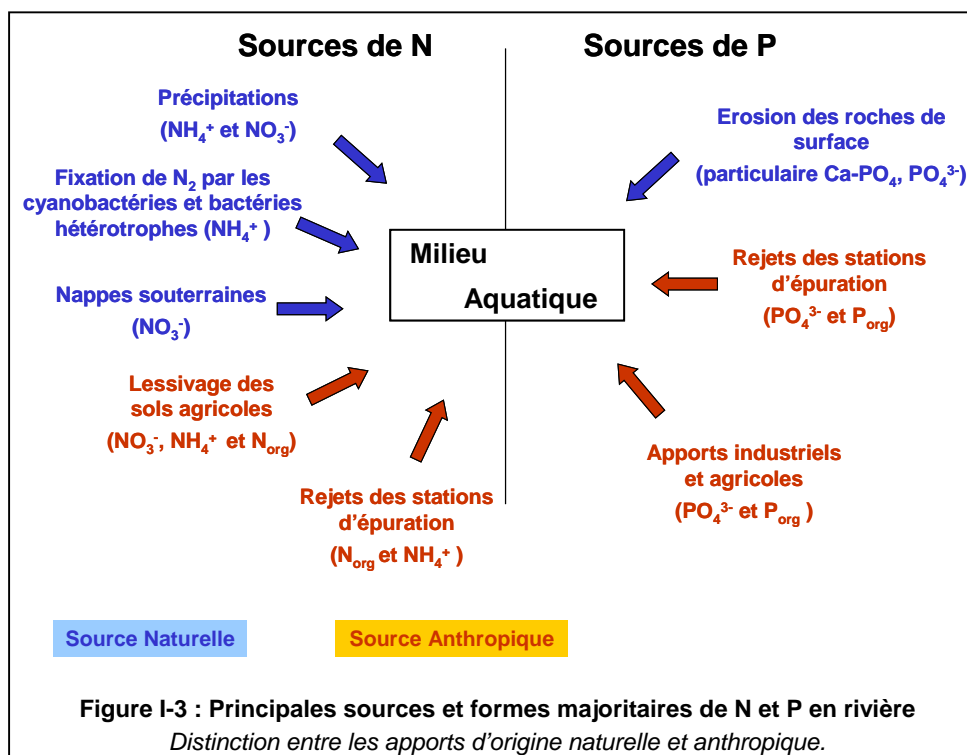


Tableau I-II : Origines du phosphore en France (d'après Deronzier G. & Choubert J.-M., 2004)

Origine		Quantité déversée en %
Industrielle		6 %
Naturelle		11 %
Agricole		
	Engrais	19 %
	Elevages	31 %
	Total	50 %
Domestique		
	Détergents	15 %
	Métabolisme	18 %
	Total	33 %

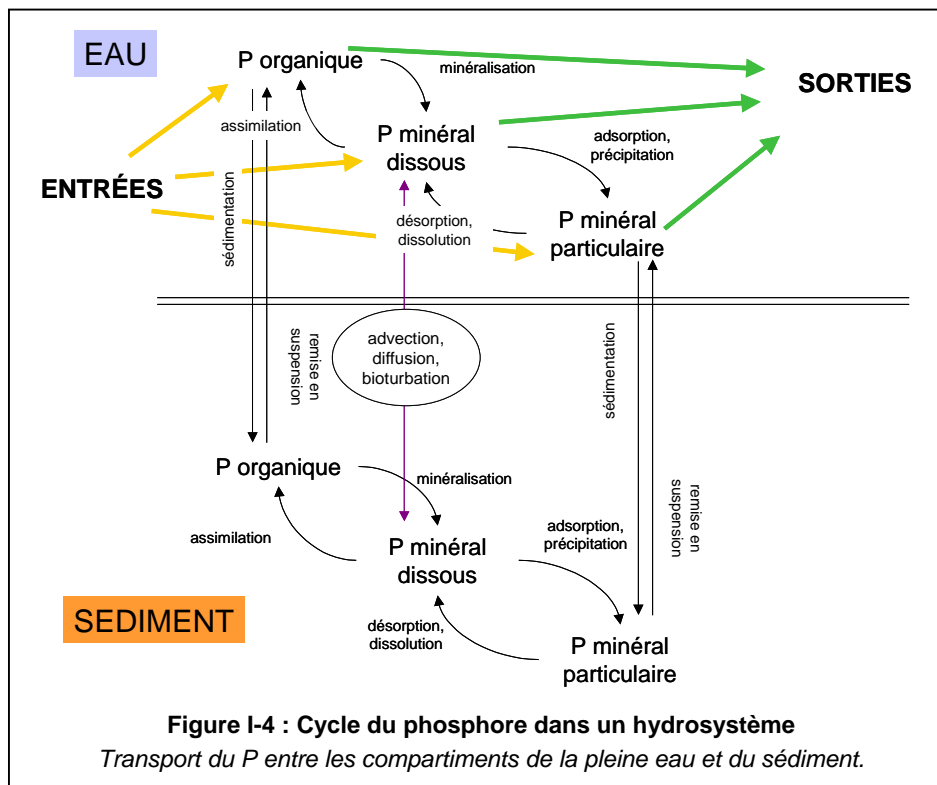
S'agissant du lessivage des sols agricoles, par comparaison à l'élément azote (les nitrates sont très solubles et aisément lessivés par les eaux d'infiltration s'ils ne sont pas absorbés par les plantes), le phosphore épandu est plus fortement fixé (sous forme phosphates de calcium) et sera lessivé, en dehors des fortes pluies, en quantité moindre (Loiseau J. *et al.*, 2003).

Ainsi, on observe globalement que les quantités de phosphore biodisponible susceptibles de parvenir au sein du milieu aquatique sont relativement faibles en comparaison à celles de l'azote. Ceci est renforcé par le rôle important joué par les sédiments sur le cycle de l'élément P. En effet, le cycle du phosphore dans le milieu aquatique répond à un ensemble d'équilibres dynamiques au sein de la colonne d'eau mais aussi à l'interface eau-sédiment (Figure I-4). En conditions d'aérobiose, les phosphates se complexent aux ions

ferriques (également aluminium et calcium), sont stockés dans le sédiment et sont indisponibles pour le milieu, ce qui contribue à rendre le phosphore limitant. A l'inverse, la baisse importante des teneurs en O₂ dissous peut induire des conditions réductrices du milieu qui favorisent le relargage du phosphore par les sédiments (Faurie C. *et al.*, 2003). Ainsi, le phénomène d'eutrophisation, qui comme on l'a vu, implique une baisse des teneurs en O₂ dissous, peut être aggravé par des apports en P internes au milieu.

Ces processus de fixation et de relargage de P sont influencés indirectement par la température du milieu. Quand celle-ci augmente, il y a un accroissement de l'activité bactérienne, et donc de la dégradation, avec une élévation de la demande en O₂ et un relargage du phosphore.

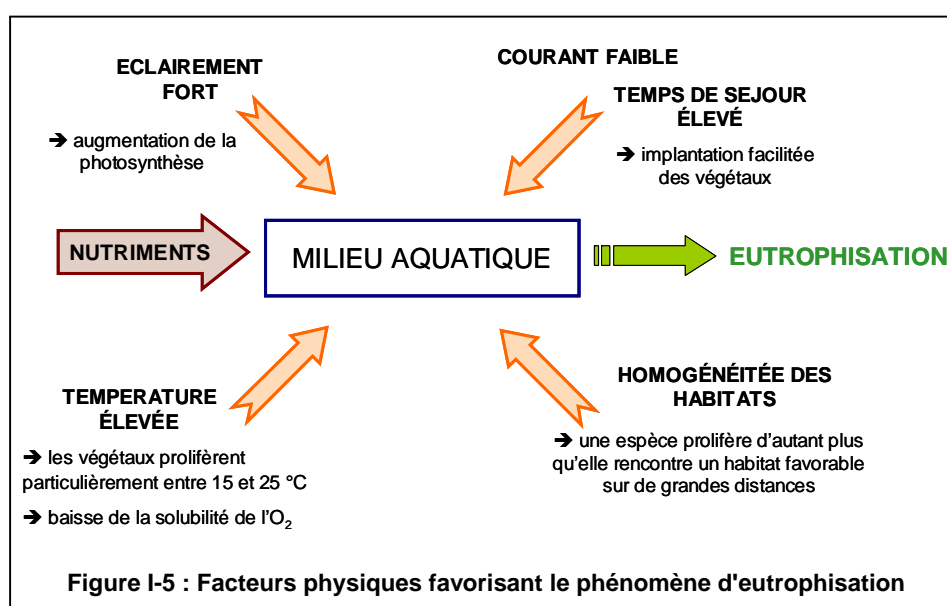
En conclusion, les teneurs en phosphates sont faibles à l'état naturel dans les eaux non polluées et c'est cet élément qui limite le plus souvent la production primaire en milieu d'eau douce (Lévêque C., 1996 ; Angelier E., 2000 ; Garnier J. *et al.*, 2001 ; Tett P., 2003). La présence de phosphore dans l'eau ne présentant pas de conséquences sanitaires directes, elle n'avait jamais été considérée comme polluante, jusqu'à la prise en compte dans les années 70 d'une pollution dite nutritionnelle conduisant à l'eutrophisation (Genin B. *et al.*, 1997).



b) Facteurs physiques

Comme nous l'avons vu précédemment, le premier déterminant de l'eutrophisation des milieux aquatiques est l'augmentation des entrées en éléments nutritifs dans la masse d'eau. Néanmoins des facteurs physiques interagissent également sur ce phénomène. Ces facteurs sont présentés à la figure I-5.

On observe que l'ensemble des conditions favorisant l'eutrophisation du milieu est particulièrement rencontré dans le cas d'un étiage (faible vitesse du courant, temps de séjour plus long) et notamment lors de l'étiage estival durant lequel les intensités lumineuses et la température de l'eau sont plus fortes. C'est donc précisément à cette période que les nuisances de l'eutrophisation sont susceptibles de se manifester.



Ainsi, B. Genin *et al.* (1997) font remarquer qu'il est essentiel de différencier :

- le niveau de risque potentiel d'eutrophisation, illustré par les quantités de fertilisants disponibles dans le milieu ;
- l'expression effective d'une eutrophisation, caractérisée par l'intensité du développement des communautés végétales et ses effets sur la physico-chimie de l'eau.

De ce fait, un hydrosystème peut être caractérisé par de fortes teneurs en nutriments disponibles, sans toutefois présenter les conditions favorables au développement des signes répertoriés de l'eutrophisation (bloom algal, développement des macrophytes). La charge nutritive continue à être transportée et peut parvenir plus en aval, dans une zone propice à l'eutrophisation (l'exemple le plus caractéristique est celui des zones de retenues (Champiat D. & Larpent J.P., 1988)).

En conclusion, d'une part ce n'est pas parce qu'un milieu ne manifeste par les symptômes de l'eutrophisation qu'il ne constitue pas une nuisance déportée pour l'écosystème global de la rivière. D'autre part, s'ouvre une voie de recherche qui est celle d'identifier d'autres signes potentiels de

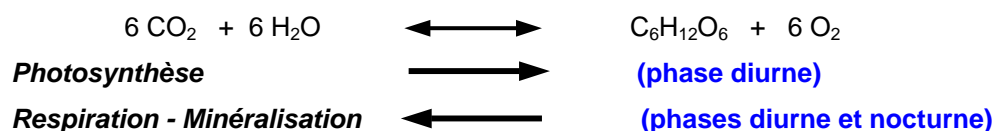
dysfonctionnement que ceux recensés actuellement pour repérer des indicateurs de l'eutrophisation en rivières à haute énergie et à biomasse fixée dominante.

I. 1.2.3. Impacts de l'eutrophisation sur le système aquatique

a) Influence sur les gaz dissous

Les deux grandes fonctions du cycle biologique du carbone, production primaire par photosynthèse et dégradation par respiration, s'articulent autour des deux principaux gaz dissous : le gaz carbonique et l'oxygène.

Rappelons en l'équation :



En phase diurne, la production d'oxygène est très forte du fait de la présence massive des communautés végétales et la teneur en oxygène dissous en milieu de journée peut atteindre des valeurs toxiques pour le zooplancton et le zoobenthos (Genin B. *et al.*, 1997). En phase nocturne, la respiration de l'ensemble des organismes n'est pas compensée par la photosynthèse. Ainsi, la prolifération excessive des végétaux peut conduire à une désoxygénation totale de la masse d'eau.

Notons qu'à la fin du cycle de vie des végétaux produits, leur décomposition tend également à utiliser tout l'oxygène disponible dans le milieu, avec pour conséquence potentielle la mort par asphyxie des communautés de poissons (Yang M.D. & Sykes R.M., 1998 ; Riskin M.L. *et al.*, 2003). Par ailleurs, les teneurs en gaz dissous interviennent sur les valeurs de pH.

b) Conséquences sur la faune et la flore en place

Comme conséquence de l'eutrophisation, on note une simplification de l'édifice trophique. En effet, les explosions végétales peuvent éliminer les diverses espèces algales au profit d'une seule espèce.

Nous avons précédemment vu que l'excès de biomasse influe sur les teneurs en gaz dissous. Outre l'effet direct des variations de pH sur les organismes, il faut également considérer les changements des formes chimiques des éléments sous l'effet de ces variations de pH. Ainsi, en conditions basiques, les ions NH_4^+ peuvent être transformés en ammoniac gazeux (NH_3) toxique pour la faune. On note également le développement préférentiel de cyanobactéries, productrices de toxines, qui en tant que fixatrices d'azote atmosphérique peuvent proliférer tant qu'il y a du phosphore disponible.

c) Autres conséquences

Apparaissent des gênes hydrauliques et mécaniques à l'écoulement, par exemple au niveau des prises d'eau (par les algues filamenteuses), ainsi que des perturbations des activités de loisirs (navigation, baignade).

On note aussi des nuisances olfactives du fait des fortes odeurs dégagées lors de la décomposition de cette importante biomasse de végétaux et, également, des difficultés de traitement et donc une augmentation des coûts lors de la production d'eau potable (colmatage des filtres) (Yang M.D. & Sykes R.M., 1998).

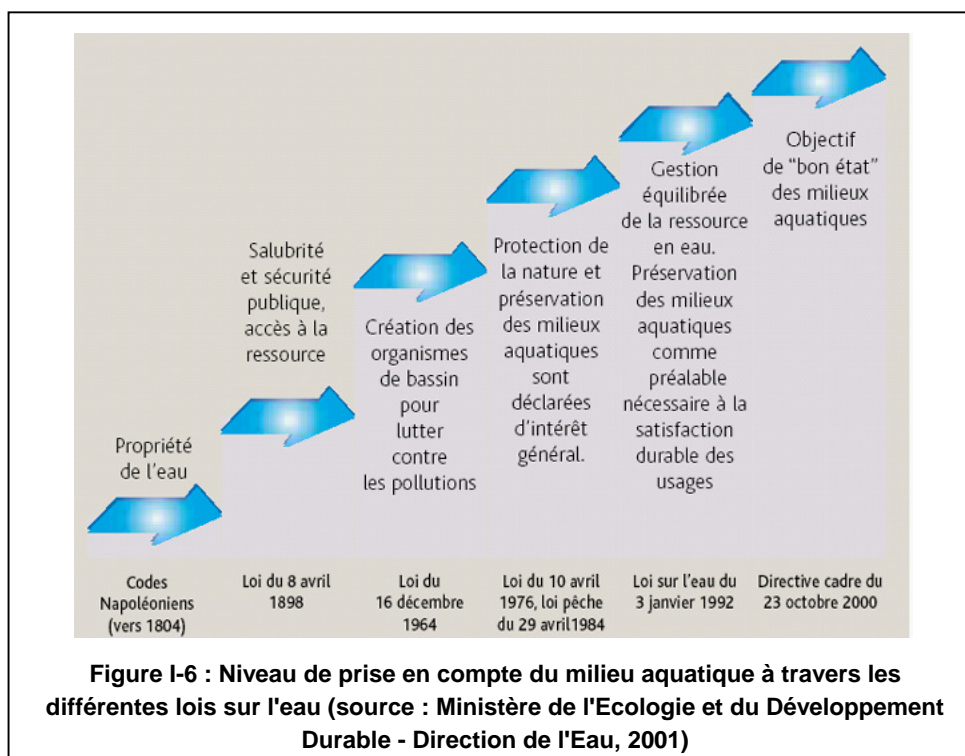
I. 2 • DIAGNOSTIC D'ETAT DES RIVIERES

I. 2.1. Aspects réglementaires

I. 2.1.1. Cadre législatif

Depuis que la notion de "Gestion de l'eau" existe en France, elle a beaucoup évolué. En effet, alors que les premières dispositions sur le régime de propriété et d'usage de l'eau apparaissent dans les codes Napoléoniens du début du 19^{ème} siècle¹, il faudra attendre la loi du 16 décembre 1964² pour que soit prise en compte la question de l'état écologique des milieux aquatiques (Figure I-6).

C'est suite à cette loi que sont créés les organismes de bassin, Comités de bassin et Agences de l'Eau, dont la mission établie est « *d'initier une utilisation rationnelle des ressources en eau, de lutter contre leur pollution et de veiller à la protection des milieux aquatiques* ». Les agences de l'eau fonctionnent sur le principe du "pollueur-payeur" selon lequel « *les frais nécessaires à la prévention, la réduction ou la lutte contre toute forme de pollution doivent être supportés par ceux qui en sont à l'origine* ».



¹Code Civil des Français (21 mars 1804), contenant la réunion des lois civiles en un seul corps de lois (Bull. des Lois, 3e S., B. 354, n° 3677).

² Loi n° 64-1245 du 16 décembre 1964 relative au régime et à la répartition des eaux et à la lutte contre leur pollution.

La loi sur l'eau du 3 janvier 1992¹ renforce la prise en considération plus globale des milieux aquatiques en énonçant que « *l'eau fait partie du patrimoine commun de la nation* » et que « *sa protection, sa mise en valeur (...) dans le respect des équilibres naturels sont d'intérêt général* ». La préservation des milieux aquatiques est alors fixée comme un préalable nécessaire à la satisfaction des différents usages de l'eau. Dès lors, sont créés les outils de planification de la ressource en eau qui fixent les orientations fondamentales de la politique de l'eau, ce sont les Schémas Directeurs d'Aménagement et de Gestion des Eaux (SDAGE et SAGE).

Au niveau européen, c'est environ une quinzaine de directives qui ont été édictées depuis 1975, transposées par la suite en droit français. On peut citer par exemple la directive 91/271 relative au "Traitement des eaux urbaines résiduaires"² ou la directive 91/676, baptisée "Directive Nitrates"³, concernant la protection des eaux contre la pollution des nitrates à partir de sources agricoles.

Plus récemment, la directive cadre européenne sur l'eau (DCEE) du 23 octobre 2000 a établi le cadre d'une politique communautaire dans le domaine de l'eau pour la protection et l'amélioration de tous les milieux aquatiques continentaux au sein de chaque Etat membre. La DCEE reprend les principes de gestion par bassin et de planification des lois de 1964 et de 1992. Elle impose, avec une notion importante d'obligation de résultat, d'atteindre d'ici à 2015 « *le "bon état" écologique pour tous les milieux naturels, de préserver ceux qui sont en très bon état et d'atteindre un "bon potentiel" dans les milieux fortement artificialisés* ». Dans cet objectif, il a été établi un calendrier d'étapes avec notamment, en 2004, l'achèvement de l'état des lieux des districts hydrographiques⁴. Devront suivre, en 2006, la mise en place du programme de suivi de l'état des milieux et, en 2009, l'adoption du plan de gestion avec une réalisation étalée de 2010 à 2015.

I. 2.1.2. Cadre administratif

Comme nous l'avons vu précédemment, c'est au niveau des Agences de l'eau qu'est réalisé le suivi de la qualité des eaux superficielles. Sur l'initiative du ministère chargé de l'environnement, un système de surveillance de la qualité des eaux et des milieux aquatiques a été mis en place au début des années 70. L'"Inventaire National de la Pollution", créé en 1971, a été remplacé en 1987 par le "Réseau National de Bassin" (RNB). Ce dernier, qui compte environ 1100 points de mesures répartis sur l'ensemble du territoire français, est complété par des réseaux complémentaires d'agences.

Pour rendre compte de la qualité des eaux et de l'aptitude du milieu à satisfaire les différents usages qui en sont faits, le principe général d'évaluation est de comparer les valeurs de chaque paramètre observé à

¹ Loi sur l'Eau n° 92-3 du 3 janvier 1992.

² Directive 91/271 du Conseil, du 21 mai 1991, relative au traitement des eaux urbaines résiduaires.

³ Directive 91/676 du Conseil, du 12 décembre 1991, concernant la protection des eaux contre la pollution par les nitrates à partir des sources agricoles.

⁴ Les districts rassemblent plusieurs bassins hydrographiques et peuvent être internationaux. Pour chaque district, une autorité compétente a été désignée.

des critères de qualité¹ préalablement définis. Ensuite, en vue de synthétiser la totalité des mesures, les résultats sont analysés à travers un outil de classification des cours d'eau qui comporte un ensemble de paramètres de qualité physico-chimique, biologique et microbiologique.

Les premières grilles de qualité multi-usages (datant de 1971) ont été peu à peu remplacées par de nouveaux outils de classification. En effet, suite à l'évolution des réglementations et des connaissances scientifiques en matière de nature de polluants, de nouveaux systèmes d'évaluation de la qualité (dénommés SEQ) ont été élaborés depuis 2000 (Agence de l'eau Adour Garonne, 2001).

Les SEQ ont une portée plus large que les anciennes grilles de qualité parce qu'ils concernent, en plus des cours d'eau, les eaux souterraines, les lacs et les milieux littoraux et estuariens. De plus, le volet "biologique" du milieu est réellement intégré au calcul du niveau de qualité. Une autre modification est aussi une analyse non plus paramètre par paramètre, mais par "grands types de pollution" ou "altérations" qui regroupent les polluants de même nature ou qui présentent le même effet (Simonet F., 2001).

La santé des cours d'eau reposant à la fois sur la qualité physico-chimique de l'eau, l'intégrité des habitats des organismes vivants et la richesse biologique, les SEQ ont été déclinés comme suit (Figure I-7) (Agence de l'eau Adour Garonne, 2000a) :

- le SEQ-Eau, pour évaluer la qualité de l'eau au niveau physico-chimique et bactériologique et son aptitude à satisfaire les fonctions naturelles des milieux aquatiques et les usages de l'eau ;
- le SEQ-Physique, qui concerne l'étude de paramètres hydrologiques et morphologiques (degré d'artificialisation ou de perturbation du milieu) ;
- le SEQ-Bio, qui vise à caractériser les peuplements animaux et végétaux du cours d'eau.



¹ Critère de qualité : concentration d'un contaminant qui, si elle est dépassée, risque d'entraîner la perte complète ou partielle de l'usage pour lequel le milieu a été défini.

I. 2.2. Outils d'évaluation de la qualité de l'eau

I. 2.2.1. Complémentarité des analyses chimiques et biocénologiques

Les méthodes d'analyses chimiques permettent d'identifier la nature des substances polluantes ainsi que de les quantifier. Toutefois, elles présentent plusieurs d'inconvénients. Dans le cas d'analyses ponctuelles, un problème de représentativité se pose car elles ne prennent pas en compte les variations journalières, voire horaires, de certains types de pollutions (type rejets de stations d'épuration). Dans le cas d'analyses en continu, qui incluraient les fluctuations, seul un nombre limité de paramètres peut être mesuré compte tenu des coûts élevés des analyses (Bouchy J.-M. & Garnier-Zarli E., 1994).

De plus, les analyses chimiques ne considèrent que les paramètres préalablement choisis et excluent ainsi les autres types (ou formes chimiques) de polluants non connus ou jugés non préoccupants (Bouchy J.-M. & Garnier-Zarli E., 1994 ; Solacroup F., 2001). Par ailleurs, en fournissant une réponse isolée par paramètre, elles ne prennent pas en considération les aspects possibles de synergie ou d'antagonisme entre les divers polluants (Solacroup F., 2001).

L'image bien connue attribuée aux analyses physico-chimiques est celle d'une "photographie instantanée" de la rivière (Mattila J. & Räisänen R., 1998). En effet, elles caractérisent le milieu au moment du prélèvement mais n'apportent qu'une information très limitée concernant l'impact des polluants sur la santé et le fonctionnement de l'écosystème dans sa globalité (Blandin P., 1986).

Pour pallier ce manque d'information, les études d'évaluation de la qualité des hydrosystèmes se sont orientées vers la composante biologique (Blandin P., 1986 ; Lévêque C., 1996). Les bioindicateurs intègrent le facteur temps : alors qu'un dosage chimique donne une image ponctuelle de la qualité de l'eau, un organisme, qui accomplit tout ou partie de son cycle vital dans le milieu aquatique, témoigne des conditions passées et présentes du milieu (Bouchy J.-M. & Garnier-Zarli E., 1994 ; Solacroup F., 2001).

Cette méthode de "bioindication" ou de "bioévaluation" est définie comme « *l'ensemble des procédures à fondements biologiques qui peuvent servir à l'établissement de diagnostics écologiques* » (Blandin P., 1986). Elle repose sur l'observation qualitative et/ou quantitative des communautés, de leur abondance et de leur biodiversité spécifique au sein de l'écosystème, comparées à des situations de référence. Cette démarche est relativement ancienne, elle débute autour de la fin du 19^{ème} siècle et du début du 20^{ème} (Capblancq J. & Cassan M., 1979b ; Bouchy J.-M. & Garnier-Zarli E., 1994). On peut citer la "Méthode des Saprobies", proposée au tout début du 20^{ème} siècle par Kolkwitz et Marsson (Kolkwitz R. & Marsson M., 1908 ; 1909) qui informe sur la qualité de l'eau envers son niveau de pollution organique.

La démarche biocénotique, bien qu'elle soit plus révélatrice du fonctionnement de l'écosystème que l'analyse physico-chimique, présente tout de même des inconvénients, cités ci-après :

- nécessité d'un bon niveau de connaissance de l'écologie des communautés et de taxonomie nécessaire à l'identification précise des espèces (Bouchy J.-M. & Garnier-Zarli E., 1994 ; Genin B. *et al.*, 1997) ;
- protocoles difficilement adaptables à la grande variabilité des écosystèmes (Bouchy J.-M. & Garnier-Zarli E., 1994 ; Genin B. *et al.*, 1997) ;
- manque de renseignement sur la nature des polluants responsables du déséquilibre observé (Bouchy J.-M. & Garnier-Zarli E., 1994) ;
- coûts relativement élevés du fait du temps nécessaire au travail de prélèvement des organismes sur le terrain et à leur détermination (Blandin P., 1986).

En outre, B. Genin *et al.* (1997) rappellent que le peuplement d'un secteur de cours d'eau dépend en premier lieu des capacités naturelles de l'écosystème (incluant notamment les variations saisonnières), les modifications de l'environnement n'intervenant qu'en second lieu. De ce fait, il paraît indispensable d'avoir une bonne connaissance du milieu préalablement au contexte de pollution afin d'être en mesure d'interpréter les résultats de bioindication (Bouchy J.-M. & Garnier-Zarli E., 1994).

Globalement, les analyses physico-chimiques caractérisent les perturbations par leurs causes tandis que les méthodes biologiques les caractérisent par leurs effets sur les organismes vivants. Nous retiendrons que les méthodes physico-chimiques et biologiques sont complémentaires et que c'est leur association qui peut permettre de fournir une information fiable et détaillée sur la nature et les origines de la pollution ainsi que sur son impact sur l'écosystème (Amiard J.-C. *et al.*, 1997 ; Agence de l'eau Adour Garonne, 2001).

I. 2.2.2. Les différents indicateurs biologiques

Pour expliciter la notion de bioindicateur, la définition la plus utilisée est celle de P. Blandin (1986) : « *Un indicateur biologique (ou bioindicateur) est un organisme ou un ensemble d'organismes qui, par référence à des variables biochimiques, cytologiques, physiologiques, éthologiques ou écologiques, permet de façon pratique et sûre, de caractériser l'état d'un écosystème et de mettre en évidence aussi précocement que possible les modifications, naturelles ou provoquées, de ce dernier* ».

Toutefois, dans cette définition, plusieurs notions sont associées et dans certains cas, il est préférable de distinguer la notion de bioindicateur au sens strict qui peut être définie comme : « *espèces ou groupes d'espèces qui, par leur présence (ou leur absence) et/ou leur abondance, sont significatifs d'une ou de plusieurs propriétés de l'écosystème dont ils font partie* (Amiard J.-C. *et al.*, 1997) ».

Ainsi, trois groupes principaux d'indicateurs se distinguent :

- les biomarqueurs : dans le cas où la variable observée est de nature biochimique, moléculaire ou cellulaire (Amiard J.-C. *et al.*, 1997) (ex. : inhibition de l'acétylcholinestérase par les insecticides organophosphorés et carbamates) ;
- les bioaccumulateurs : ces organismes ont la particularité d'accumuler les polluants et ce dans une relation simple avec les concentrations présentes dans le milieu. Ils sont particulièrement employés dans le cas de suivi des pollutions où les éléments seraient en quantités trop faibles pour être dosés correctement. C'est le cas des pollutions métalliques et radioactives (dosage dans les lichens, mousses, mollusques) et des pollutions par les pesticides (utilisation du compartiment poissons) ;
- les bioindicateurs : les différents organismes utilisés pour apprécier la qualité des écosystèmes sont nombreux. J. Verneaux (1984) indique que les méthodes varient sur le choix des organismes pris en compte, les protocoles associés ainsi que sur les types d'analyse des données. P. Blandin (1986), dans son chapitre "Bioindicateurs et diagnostic des systèmes écologiques", fait une large revue des différents organismes utilisés. Ce sont : les macroinvertébrés, les macrophytes, les algues, les bactéries et virus, les actinomycètes, les nématodes, les rotifères, les oligochètes et, au niveau des vertébrés, les poissons et les oiseaux. Les bioindicateurs dont le suivi fait l'objet d'une norme ou dont la méthode est en cours de normalisation sont présentés dans le tableau I.III.

Tableau I-III : Revue des différentes méthodes de bioindication normalisées ou en cours de normalisation

Groupe faunistique ou floristique concerné	Méthode	Informations relatives à	Avantages	Inconvénients	Références
Macro-invertébrés benthiques	Indice Biologique Global Normalisé (IBGN, Norme AFNOR 1992, NFT 90-350)	azote et matières organiques et oxydables, fonctionnement physique des milieux aquatiques	- échantillonnage standardisé - bonne connaissance de leur écologie - sensibilité différente aux pollutions selon les groupes taxonomiques - longue durée de vie, donc bons intégrateurs	- non utilisable au niveau des sources, de certains cours inférieurs de fleuves et des milieux atypiques tels que les canaux et les zones estuariennes	(Verneaux J. & Tuffery G., 1967)
Diatomées	Indice de Polluosensibilité Spécifique (IPS, Cemagref 1982), Indice Biologique Diatomées (IBD, Norme AFNOR 2000, NFT 90-354)	température, pH, salinité, trophie (N, P), charge organique	- aptitude à coloniser tous les milieux aquatiques - facilités de prélèvement, de conservation et de stockage - applicables aux cours d'eau saumâtres, aux zones estuariennes	- lourdeur de traitement pour les déterminations - identification spécifique difficile - applicable uniquement dans la partie aval des cours d'eau	(Coste M., 1978 ; Descy J.-P., 1980)
Macrophytes	Indice Biologique Macrophytes en Rivières (IBMR, Norme AFNOR 2003, NFT 90-395 PR)	niveau trophique (PO_4^{3-} , NH_4^+), et dans une moindre mesure la charge organique	- rapidement reconnaissables à l'œil nu	- pour les cours d'eau avec un développement macrophytique suffisant et à diversité végétale significative - méthode applicable seulement en été (période de croissance maximale) - non applicable quand les dommages physiques sont nombreux - peu sensibles aux faibles pollutions	(Meriaux J.L. & Watterz J.R., 1980 ; Haslam S.M., 1982)
Oligochètes	Indice Oligochètes Biologique Sédiments (IOBS, Norme AFNOR 2004, NFT 90-390)	métaux lourds, charge organique	- application aux sédiments	- ne permettent pas de détecter les pollutions légères - non applicable sur les cours d'eau salés ou saumâtres - difficultés pour la détermination	(Lang C. & Hutter P., 1981 ; Lafont M., 1984)
Poissons	Indice Poissons non normalisé	évaluation globale du niveau de dégradation des cours d'eau	- identification facile et rapide - présence dans tous les systèmes aquatiques - représentation de tous les niveaux du réseau trophique	- problème de représentativité dans l'échantillonnage - non applicable aux cours d'eaux profondément modifiés (canaux)	(Laurent M. & Calvet F., 1977 ; Verneaux J., 1981)

I. 2.3. Critère "Statut trophique"

I. 2.3.1. Définition et méthodes d'évaluation

Le niveau de trophie d'un hydrosystème peut être défini comme le degré d'enrichissement en nutriments de l'eau associé à la quantité de biomasse végétale produite (Genin B. *et al.*, 1997). Cette définition indique que l'on prend en compte non seulement la teneur en nutriments du milieu mais également sa capacité à "nourrir" les communautés végétales présentes (Verneaux J., 1984).

Ainsi, les outils d'évaluation du statut trophique des milieux aquatiques d'eau douce portent en particulier sur :

- **la teneur en phosphore** de la colonne d'eau, car c'est l'élément phosphore qui est reconnu comme facteur limitant de l'eutrophisation en eaux douces ;
- **l'étude du compartiment phytoplanctonique**, étant donné qu'il est l'utilisateur majeur du phosphore en pleine eau. Le phytoplancton est caractérisé indirectement par la teneur en chlorophylle a de la colonne d'eau.

A ces variables se rajoutent d'autres mesures qui peuvent identifier les causes ou les conséquences d'un état d'eutrophisation du milieu. Selon les grilles du SEQ, elles sont regroupées ainsi (Tableau I-IV) :

Tableau I-IV : Paramètres utilisés dans le cadre de l'évaluation de l'état d'eutrophisation des milieux aquatiques d'eau douce ("causes" et "conséquences")

ALTERATION	PARAMETRES MESURES
Matières phosphorées	PO_4^{3-} Phosphore total
Nitrates	NO_3^-
Matières azotées	NH_4^+ N_K NO_2^-
Phytoplancton	Chlorophylle a + Phéopigments Algues ($unité.mL^{-1}$) $\% O_2, \Delta O_2$ pH

I. 2.3.2. Difficultés de mise en œuvre en eaux courantes

Les phénomènes d'eutrophisation dans les lacs ont été largement étudiés depuis plus de trente ans (Bosca C. *et al.*, 1994 ; Riskin M.L. *et al.*, 2003). A ce titre, une classification reliant les teneurs en phosphore de la colonne d'eau et d'autres paramètres de la qualité de l'eau aux quantités de chlorophylle *a* qui y sont présentes a été élaborée par R.A. Vollenweider (1969) et reprise dans le cadre de l'OCDE¹ (Tableau I-V).

Tableau I-V : Limites des classes de trophie en lacs (source : OCDE, 1982)

Niveau trophique	Concentrations en phosphore ($\mu\text{g P.L}^{-1}$)	Chlorophylle <i>a</i> ($\mu\text{g.L}^{-1}$)		Transparence (m)	
		Moyenne	Maximum	Moyenne	Minimum
ultra-oligotrophie	0 - 4	< 1	< 2,5	> 12	>6
oligotrophie	4 - 10	1-2,5	2,5-8	12-6	6-3
mésotrophie	10 - 35	2,5-8	8-25	6-3	3-1,5
eutrophie	35 - 100	8-25	25-75	3-1,5	1,5-0,7
hyper-eutrophie	> 100	> 25	>75	<1,5	<0,7

Cette classification n'est pas applicable en milieu courant car les temps courts de transit ne permettent pas au phytoplancton d'exploiter les ressources en nutriments (Bosca C. *et al.*, 1994 ; Angelier E., 2000 ; Dodds W.K. *et al.*, 2002) et deux raisons semblent limiter l'élaboration d'une classification similaire applicable aux cours d'eau.

D'une part, en milieu courant, les études sur l'évaluation des effets des nutriments sur le compartiment végétal ne sont pas aussi développées qu'en lacs (Riskin M.L. *et al.*, 2003) et semblent être plus régionalisées (Dodds W.K. *et al.*, 2002).

D'autre part, le compartiment pélagique ne paraît pas être le plus adapté pour l'estimation du potentiel de production du milieu. En effet, les organismes photosynthétiques peuvent être planctoniques (développés au sein de la masse d'eau) ou benthiques (présents sur les galets, rochers ou lit du cours d'eau). Au sein des grands cours d'eau lents de plaine, ce sont essentiellement les populations phytoplanctoniques qui se développent. En revanche, dans les rivières plus rapides à faible profondeur, ce sont les algues benthiques qui prolifèrent abondamment (filaments verts macroscopiques développés au sein du biofilm) (Lévêque C., 1996 ; Asaeda T. & Son D.H., 2001).

De ce fait, le dosage du phytoplancton de la colonne d'eau ne caractérise pas le développement réel des communautés végétales au sein du cours d'eau et ce paramètre ne peut pas être représentatif du statut trophique de la rivière.

¹ OCDE : Organisation de Coopération et du Développement Economique.

➤ Ainsi, on observe que les outils proposés actuellement pour la détermination du niveau de trophie des milieux aquatiques sont adaptés pour les lacs, les retenues ou les rivières à écoulements lents et dominées par le phytoplancton, mais ne le sont pas pour les rivières plus rapides où domine le compartiment du biofilm. Dans le cas des rivières où l'essentiel de la biomasse est sous forme benthique, c'est sur le compartiment du biofilm que peuvent être recherchés des signes de manifestation de l'eutrophisation.

I. 3 • LE BIOFILM DES RIVIERES : INDICATEUR BIOLOGIQUE

Dans un environnement aqueux, l'adhésion de micro-organismes à la surface de matériaux est un processus naturel (Sekar R. *et al.*, 2004). Le terme "biofilm" désigne ce tout premier arrangement de micro-organismes entre eux (en premier lieu bactéries) au sein d'une fine couche adhérant rapidement au support. En raison de leur ubiquité, les biofilms sont étudiés dans de très nombreux domaines : l'ingénierie (colonisation des systèmes de production, des réseaux de distribution d'eau ou de climatisation (Bott T.R. & Grant D.M., 2001)), l'écologie (développement sur les fonds de rivières, sur les coques de bateaux dont ils favorisent la corrosion (Dukan S. *et al.*, 1995)), la médecine (contamination des biomatériaux implantés, plaque dentaire).

D'un point de vue médical, les biofilms peuvent être une source importante de nuisances. En effet, les bactéries organisées en biofilms sont souvent plus résistantes aux antibiotiques ou aux défenses immunitaires que les bactéries sous forme libre (Bellon-Fontaine M.N. & Fourniat J., 1995 ; An Y.H. *et al.*, 2001 ; Costerton B. & Stewart P., 2001). Cette différence de sensibilité envers les agents antibactériens, entre les bactéries libres et les bactéries fixées en biofilms, suggère que l'établissement de cette structure s'accompagne de modifications physiologiques de celles-ci (Gelle M.-P. *et al.*, 1995).

L'étude des différents types de biofilms est un domaine en plein essor en raison du développement des techniques d'observation microscopique, notamment la microscopie confocale à balayage laser, qui rendent possibles leur visualisation et le suivi de leur évolution (Costerton B. & Stewart P., 2001).

En rivières, le biofilm désigne la couche de couleur verte à brune, plus ou moins épaisse et glissante, qui recouvre les rochers et galets du fond du lit ainsi que les sédiments. C'est exclusivement à ce type de biofilm que nous nous intéressons dans notre étude.

I. 3.1. Caractérisation du biofilm photosynthétique

I. 3.1.1. Définition

Comme nous l'avons vu, le terme **biofilm** renvoie à la notion de micro-organismes agrégés entre eux. Le terme de **tapis microbien**, qui est employé dans le domaine de l'écologie microbienne, désigne les assemblages où la cohérence entre les micro-organismes est très forte et est maintenue même lorsqu'on sépare ce tapis de son support d'accrochage¹. Le **biofilm photosynthétique** inclut, lui, la notion de la présence de communautés algales, fraction autotrophe capable de réaliser les réactions de photosynthèse. Les biofilms pouvant se développer autant sur des supports solides (on parle d'"haptobenthos") que sur des surfaces meubles ("herpobenthos"), une terminologie spécifique indique le type de surface sur laquelle ils sont développés (Tableau I-VI).

¹ R. De Wit, communication personnelle.

Tableau I-VI : Terminologie associée au biofilm selon le type de surface colonisée

	<i>épilithique</i>	<i>épixylique</i>	<i>épiphytique</i>	<i>épisamnique</i>	<i>épizoïque</i>
HAPTOBENTHOS	rocher, galet, plastique	bois	plantes aquatiques	sable	organisme animal
HERPOBENTHOS	<i>épipélique</i> boue, vase				

Le terme **périphyton** a été défini par R.G. Wetzel (1983) comme « *une communauté complexe de micro-organismes (algues, bactéries, champignons, débris inorganiques et organiques) attachée à un substrat. Les substrats peuvent être inorganiques ou organiques, vivants ou morts* ». Ce terme, discuté car indiquant trop fortement un support de colonisation de type végétal, est celui qui est le plus couramment utilisé pour désigner les différentes communautés de biofilms. Dans la suite du texte, nous utiliserons de manière analogue les termes "biofilm" et "périphyton" pour désigner l'ensemble des organismes développés sur des supports en rivières ou lors de nos expérimentations en canaux artificiels (Figure I-8). Notons également que les termes "support" et "substrat" seront utilisés indifféremment du fait de l'analogie avec le terme anglais "substratum", même si dans le domaine de la microbiologie, le terme "substrat" renvoie davantage à l'idée d'une "substance consommée".

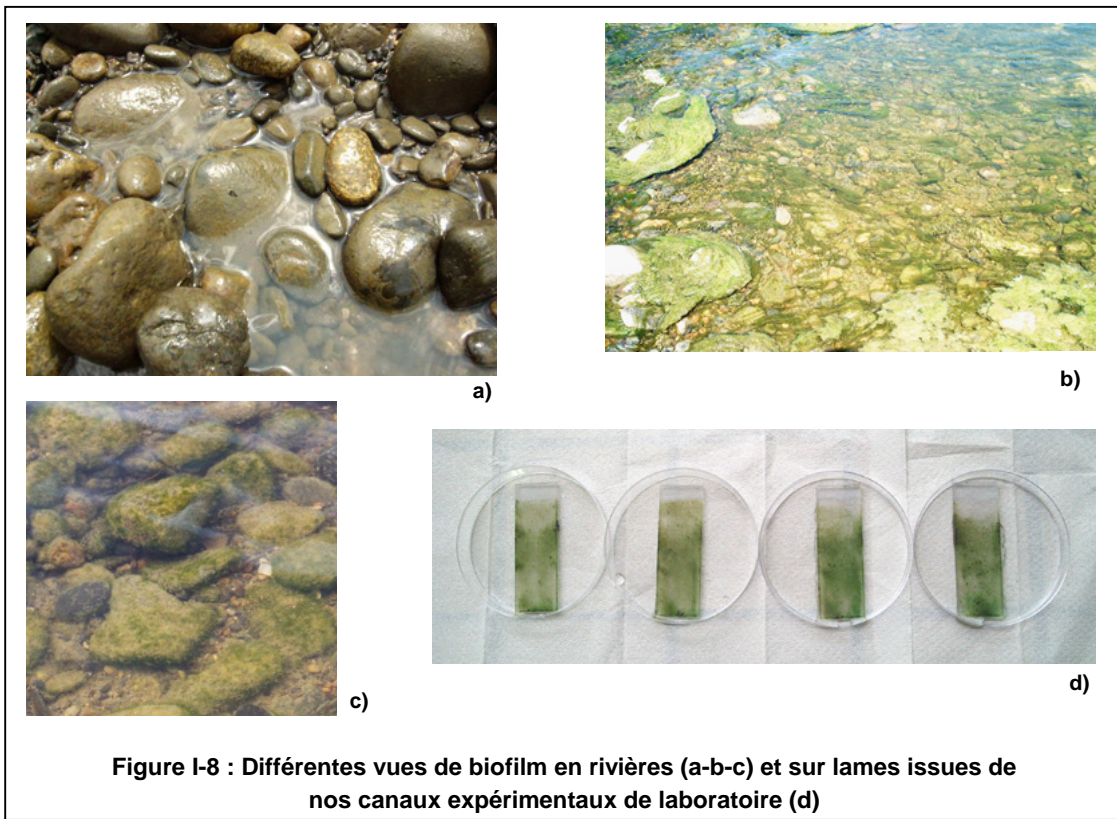
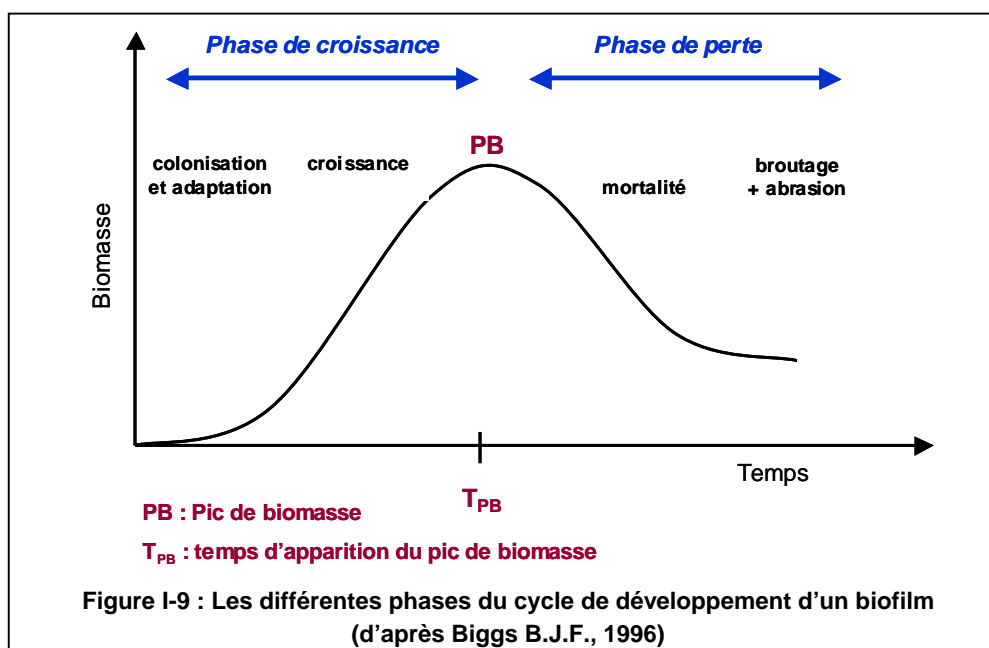


Figure I-8 : Différentes vues de biofilm en rivières (a-b-c) et sur lames issues de nos canaux expérimentaux de laboratoire (d)

I. 3.1.2. Cycle de développement

A chaque instant t , la biomasse de biofilm présente par unité de surface est la résultante des processus de gain (attachement + croissance) et de perte (mortalité + décrochement) (Meyer A. *et al.*, 1991). Lorsque ce bilan est positif, alors il y a croissance du biofilm (Pavé A., 1994).

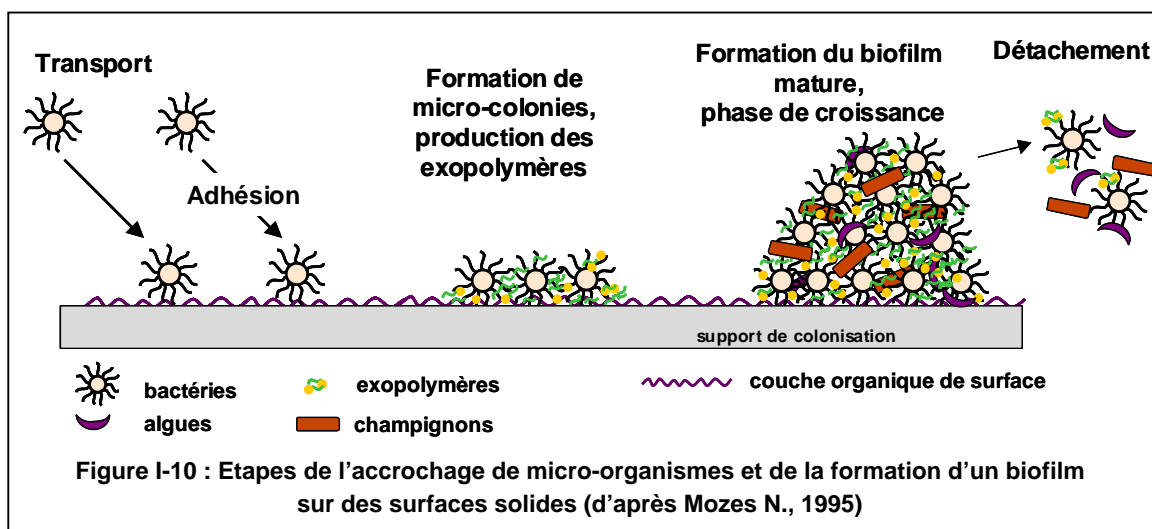
La figure I-9 représente le modèle conceptuel de croissance d'un biofilm à dominante algale décrit par B.J.F. Biggs (1996). L'auteur souligne que ce modèle a pu être observé autant en rivières qu'en canaux expérimentaux, sur substrats naturels et artificiels.



L'évolution théorique de la biomasse totale du biofilm en fonction du temps suit un modèle général de croissance et décrit une courbe sigmoïde correspondant aux phases successives suivantes (Capblancq J. & Cassan M., 1979b ; Watanabe T. *et al.*, 1988) :

- colonisation et adaptation (phase de latence) ;
- croissance ;
- équilibre ;
- décroissance de la biomasse.

L'étape initiale de la formation d'un biofilm est celle du dépôt et de l'attachement sur le support des premiers micro-organismes qui s'organisent alors en groupes. Suivent une phase de piégeage d'autres micro-organismes par la matrice visqueuse produite et la croissance de l'ensemble, puis une phase de sénescence et de détachement des particules, certaines cellules pouvant alors aller former de nouveaux biofilms (Costerton B. & Stewart P., 2001) (Figure I-10).



a) Attachement

De nombreux auteurs ont montré que ce sont les bactéries qui sont à la base de la colonisation des supports (Watanabe T. *et al.*, 1988 ; Liu D. *et al.*, 1993 ; Bishop P.L., 1997). L'adhésion microbienne est un processus physico-chimique qui dépend des propriétés de surface du support (énergie de surface, rugosité), des micro-organismes eux-mêmes ainsi que du liquide environnant (pH, force ionique) ; et l'adhésion n'est généralement possible que lorsque les répulsions électrostatiques sont réduites (Bellon-Fontaine M.N. & Fourniat J., 1995). Ainsi, une cellule ne colonise pas une surface "propre" mais une surface dite "conditionnée", enduite d'une couche de matériel adsorbé qui peut être organique ou minéral (ions, petites molécules de protéines, polysaccharides,...). Ce matériel peut venir de la cellule elle-même (biosurfactant, protons, substances exopolymères) ou de l'environnement (cellules des tissus animaux ou végétaux) (Mozes N., 1995).

L'adhésion sur la surface débute avec une mono-couche de cellules microbiennes. Il a été montré que les micro-organismes ne sont pas répartis uniformément au sein du biofilm, qui est plutôt un assemblage de micro-colonies entre lesquelles se trouvent des zones vides (Costerton B. & Stewart P., 2001).

Le taux d'attachement est corrélé à la concentration de bactéries en suspension ainsi qu'à la structure du substrat et la vitesse de l'eau (Biggs B.J.F., 1996). Les micro-organismes adhèrent aux surfaces grâce à un réseau de fibrilles extracellulaires. Le développement de ces fibrilles vient à former une matrice extracellulaire appelée "glycocalyx" ou "EPS" pour "*Extracellular Polymeric Substances*". Cette matrice, composée de polysaccharides, de glycoprotéines et de lipides, est un complexe muqueux qui va agir comme un piège pour les micro-organismes (et résidus détritiques) circulant dans le milieu environnant du biofilm.

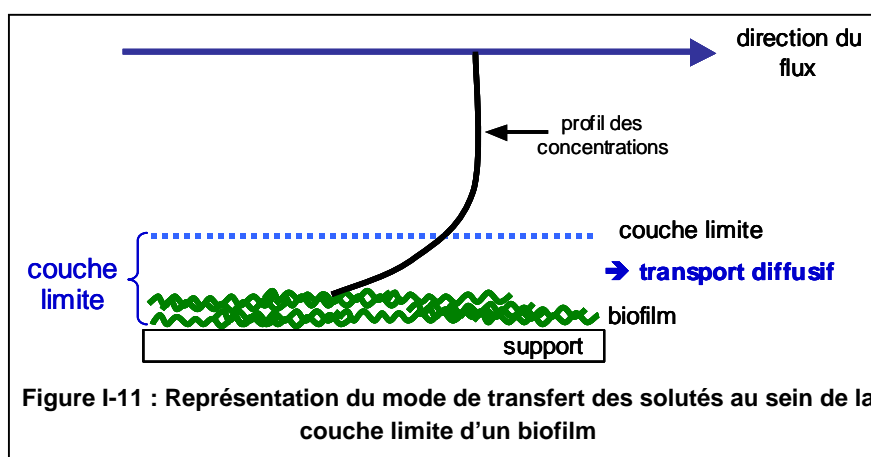
La matrice extracellulaire peut représenter 50 à 95% du poids sec du biofilm (Cerf O. & Carpentier B., 1995). Outre son rôle dans l'accrochage de nouveaux micro-organismes (bactéries, algues, champignons) et la cohésion de l'ensemble, il lui est reconnu un rôle de piège pour des sources de nutriments (retenue

d'éléments colloïdaux, organiques ou minéraux) (Sabater S. *et al.*, 2002). Ce mucus joue également le rôle de protecteur (Bishop P.L., 1997 ; Neu T.R. *et al.*, 2003), par exemple, envers des éléments toxiques comme l'eau de Javel (chlorites).

b) Phase de croissance

La description de la phase de croissance d'un biofilm, qui se décompose en deux étapes successives, croissance exponentielle puis croissance linéaire, fait intervenir le rôle joué par la couche limite de diffusion existant à l'interface entre la surface du biofilm et l'eau courante. Cette couche limite, ou en anglais "*Diffusive Boundary Layer*" (DBL), influence fortement les échanges internes et externes de nutriments et l'ambiance chimique à proximité des communautés périphytiques peut être très différente des conditions environnantes (Riber H.H. & Wetzel R.G., 1987) (Figure I-11).

Au sein de cette couche limite, la composante verticale du flux de transport est fortement contrainte et c'est la diffusion moléculaire qui devient le mode de transfert prédominant des composés dissous vers le biofilm (Jørgensen B.B., 1994 ; Borchardt M.A., 1996). Pour qu'il y ait diffusion, l'existence d'un gradient de concentration entre le milieu et le biofilm est nécessaire (Bott T.R. & Grant D.M., 2001) et le taux de diffusion moléculaire est proportionnel à la pente de ce gradient (Borchardt M.A., 1996). On peut noter que la consommation des nutriments par le biofilm pour son développement assure le maintien de ce gradient (Bott T.R. & Grant D.M., 2001).



Lorsque le biofilm est fin, la concentration en nutriments au-dessus reste importante et le transport actif, prépondérant par rapport à la diffusion, implique une croissance de type exponentiel. En fin de croissance exponentielle et avant la phase d'équilibre, la croissance devient progressivement linéaire car la biomasse nouvellement synthétisée est moindre en comparaison à la biomasse déjà accumulée (Biggs B.J.F., 1996). En effet, lorsque le biofilm s'épaissit, les facteurs limitants dans le biofilm deviennent de plus en plus

contraignants. Si le système est limité par un nutriment en solution, c'est la diffusion qui gouverne la croissance du biofilm en impliquant ainsi une croissance linéaire, car le flux diffusif est plus faible que le taux potentiel de consommation des nutriments par les cellules (Borchardt M.A., 1996). Les processus de régulations internes deviennent de plus en plus importants et l'activité métabolique du périphyton devient davantage fonction de la densité du bioderme fixé sur les substrats que des conditions externes du milieu.

Il existe une succession écologique au sein du biofilm car toutes les espèces n'ont pas le même rythme de croissance. En effet, les algues présentent un développement plus lent que celui des bactéries. Lors d'expérimentations de colonisation de biofilms *in situ* sur substrats artificiels, T. Watanabe *et al.* (1988) observent que la colonisation initiale des substrats est due aux communautés hétérotrophes qui représentent plus de 75% du poids de matière organique à l'issue de la première semaine d'immersion. Pour les communautés algales, les auteurs notent une phase d'équilibre atteinte après 4 à 5 semaines d'immersion.

Au sein même de la population algale, on observe également une succession des espèces. Il est admis que ce sont les Diatomées qui sont les premières algues colonisatrices du substrat, car leur disponibilité dans le plancton est supérieure à celle des autres algues. Selon J. Capblancq et M. Cassan (1979b), la colonisation primaire par des bactéries ne serait pas indispensable à certaines Diatomées pour leur implantation (Diatomées pionnières, de petites formes, à raphé).

Le biofilm mature est une entité physiologique complexe. La formation de réseaux de pores et de canaux de circulation permet l'accumulation de nutriments, l'élimination des déchets, les échanges gazeux et la communication entre les cellules, comme le ferait le liquide intérieur d'un organisme pluricellulaire (Costerton B. & Stewart P., 2001). Lors de la phase d'équilibre, les gains et les pertes du biofilm s'équilibrent peu à peu et maintiennent ainsi la biomasse à un niveau constant bien que la couche externe de biofilm soit en croissance permanente (Capblancq J. & Cassan M., 1979a).

c) Sénescence et détachement du biofilm

La mort des organismes au sein du biofilm, des conditions hydrodynamiques plus fortes ou l'activité bioturbatrice des invertébrés aquatiques peuvent être à l'origine du décrochage de tout ou partie du biofilm. Les particules ainsi détachées circulent au sein de la colonne d'eau en participant au pool de MES. En ce qui concerne la structure interne du biofilm, J. Capblancq et M. Cassan (1979a) indiquent que la décomposition des cellules les plus profondes et l'existence probable de conditions anaérobies dans les couches de base du périphyton favorisent son décrochage du support.

d) Calcul du taux de croissance

L'expression générale de l'évolution de la biomasse en fonction du temps ($B=f(t)$), s'écrit :

$$\frac{dB}{B} = \mu \times dt$$

avec

B : biomasse du biofilm ;

t : temps ;

μ : taux ou vitesse spécifique de croissance, facteur dépendant des conditions expérimentales.

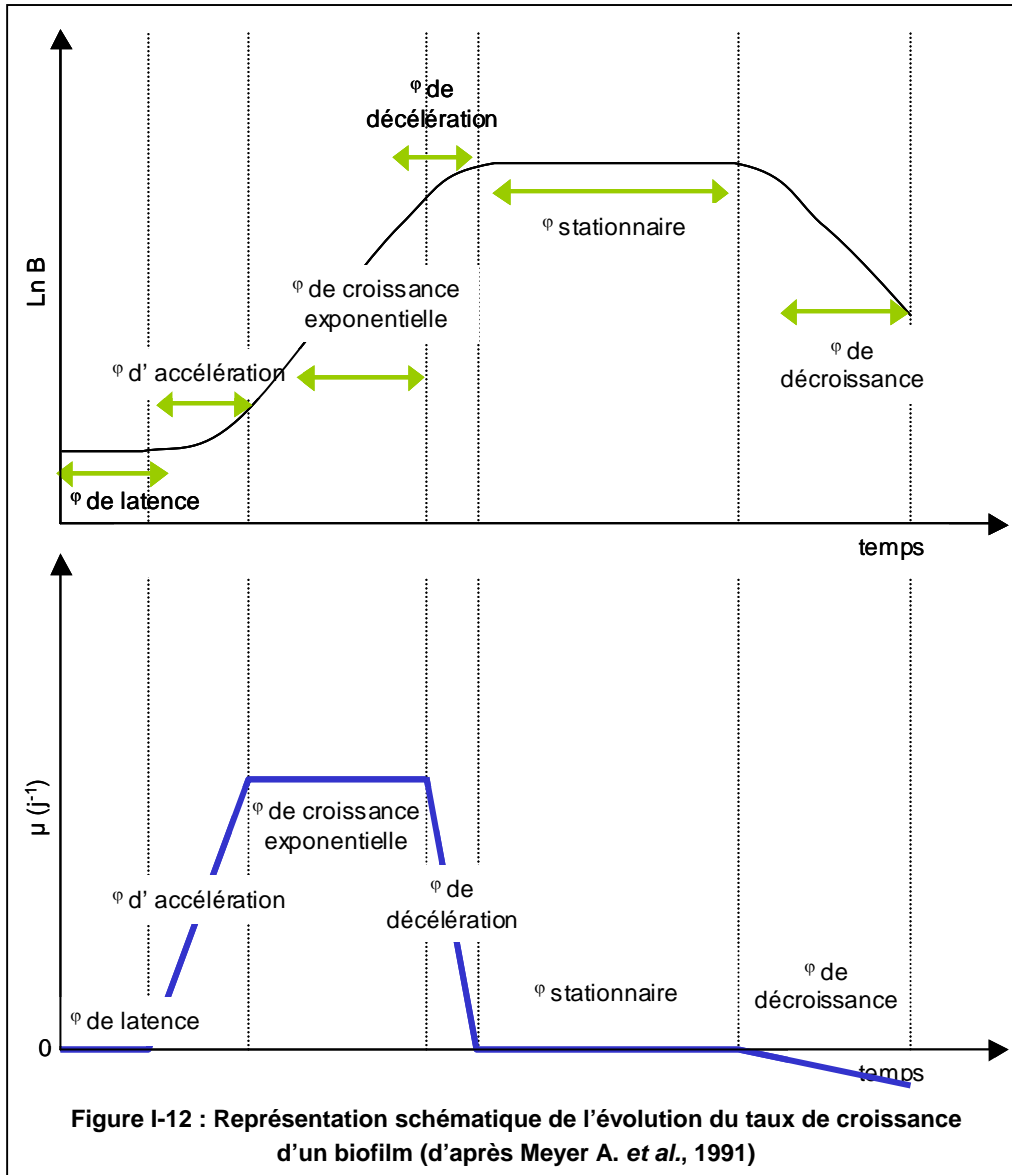
Les différentes phases décrivant l'évolution de la croissance peuvent être caractérisées par le taux de croissance. La figure I-12 présente l'évolution de la biomasse transformée en données logarithmiques qui permet de tracer en parallèle l'évolution de μ .

Le coefficient μ est propre à chaque phase (Meyer A. *et al.*, 1991) :

- phase de latence : $\mu=0$;
- phase d'accélération : μ augmente ;
- phase de croissance exponentielle : μ est constant et maximal pour une concentration en nutriments donnée (noté μ_c dans la suite du texte) ;
- phase de décélération : μ diminue ;
- phase stationnaire, $\mu=0$;
- phase de déclin, on définit un taux de mortalité avec $\mu<0$.

Le taux de croissance ne peut être calculé que sur la phase exponentielle de croissance, c'est-à-dire lorsqu'il n'y a aucune limitation (ni de lumière, ni par les nutriments). En effet, durant cette phase, l'augmentation de biomasse par unité de temps est proportionnelle à la biomasse de chaque instant (Pourriot R. & Meybeck M., 1995) et ce n'est que durant cette phase que le taux de croissance est constant, il est calculé par :

$$\text{phase de croissance exponentielle : } B = B_0 \cdot e^{\mu t} \quad \Longrightarrow \quad \mu_c = \frac{(\ln B - \ln B_0)}{t}$$



e) Fonctionnement interne

Le biofilm mature, composé de plusieurs couches de cellules empilées, est structuré dans son épaisseur. On peut schématiser l'existence de trois couches distinctes :

- une première couche aérobie, en contact direct avec la colonne d'eau, en croissance continue ;
- une couche plus profonde, toujours aérobie, mais où les substances ne diffusent que si elles n'ont pas été utilisées plus en surface ;
- une dernière couche, généralement anaérobie, où les espèces ont un métabolisme fermentatif et un accès nettement moindre aux nutriments (Gelle M.-P. *et al.*, 1995).

Ainsi, il a pu être mesuré de fortes variations des teneurs en oxygène (mesurées par micro-électrodes) au sein d'un biofilm.

Un biofilm est un ensemble complexe qui tend à fonctionner de manière autonome quand il devient mature : la matrice, par les particules qu'elle piège, permet de fournir des sources d'azote pour la photosynthèse chlorophyllienne et, en fait, la plupart des produits nécessaires au métabolisme sont conservés et recyclés à l'intérieur du système (Steinman A.D. *et al.*, 1995).

Au sein du système, les micro-organismes interagissent les uns avec les autres sur la base de relations d'aide ou de compétition. Il a été montré que différentes espèces de bactéries peuvent cohabiter, certaines transformant les nutriments en substrats pour d'autres espèces (Costerton B. & Stewart P., 2001). Entre les communautés algales et bactériennes, plusieurs types de relations ont été décrits :

- relation de compétition envers les ressources nutritives (azote minéral et orthophosphates) (Sabater S. *et al.*, 2002) ;
- régulation réciproque : les exsudats algaux (source de C) assurent la nutrition bactérienne (Romaní A.M. & Sabater S., 1999 ; Sekar R. *et al.*, 2004), en retour les algues utilisent les composés minéraux issus de la dégradation bactérienne ;
- phénomènes d'inhibition : des effets inhibiteurs des algues sur le développement bactérien (Watanabe T. *et al.*, 1988) ou l'inverse (Brunet C., 2000) ont été décrits.

I. 3.2. Bioindication par le biofilm

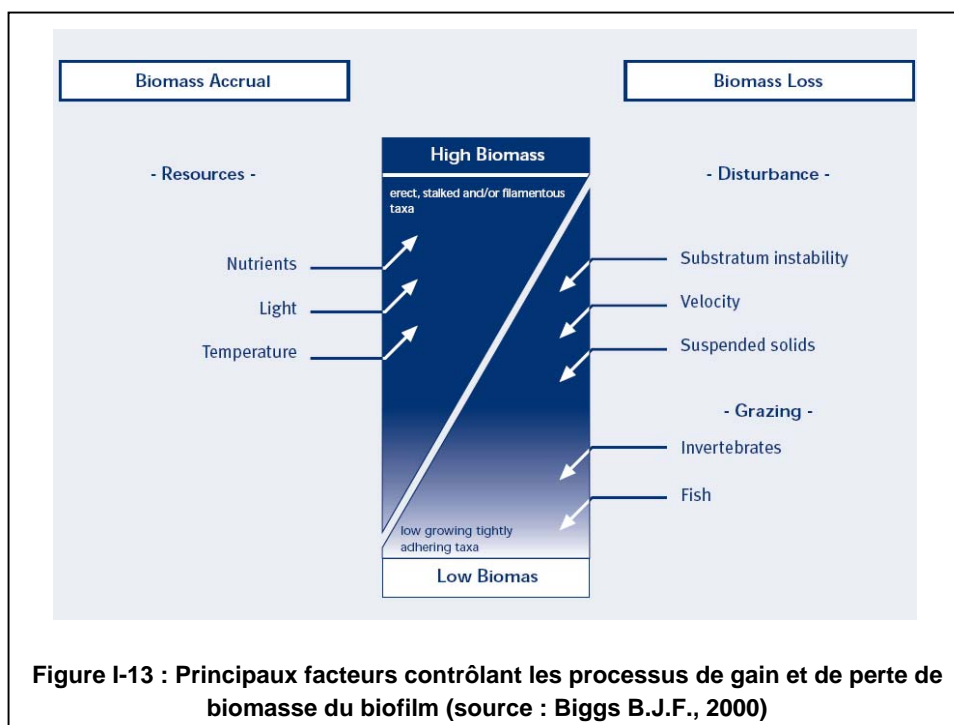
Le compartiment du biofilm a été largement reconnu comme pouvant être utile dans les démarches d'évaluation de la qualité de l'eau (Chessman B.C., 1985 ; Lowe R.L. & Pan Y., 1996 ; Burns A. & Ryder D.S., 2001). De nombreuses caractéristiques des biofilms permettent d'en souligner l'efficacité en termes de bioindication. Par exemple (et comme l'ont montré Biggs B.J.F., 2000 ; Burns A. & Ryder D.S., 2001 ; Parent-Raoult C., 2004 ; Volatier L., 2004) :

- leur ubiquité ;
- leur sensibilité aux modifications environnementales, y compris de faibles variations ;
- leur faible temps de génération ;
- la possibilité de les quantifier facilement de manière fiable et reproductible.

Pour suivre le développement des biofilms, deux voies d'approche coexistent : une analyse des paramètres structuraux (matière organique, chlorophylle *a*, composition taxonomique,...) et une analyse des paramètres fonctionnels (respiration, activité de la phosphatase alcaline,...). Nous exposerons dans le chapitre suivant les paramètres que nous avons utilisés et nous renvoyons à la thèse de C. Parent-Raoult (2004) et/ou aux travaux de J. F. B. Biggs (2000) pour une revue plus complète des différents paramètres de mesure généralement employés.

I. 3.3. Facteurs de contrôle du développement du biofilm

Les paramètres contrôlant la biomasse et la composition du périphyton en rivières, outre la nature géologique et topographique du milieu ainsi que le climat, sont de trois types : physique, chimique et biologique (Capblancq J. & Cassan M., 1979b ; Biggs B.J.F., 2000). Les paramètres physiques associent l'hydrodynamique, la pénétration de la lumière, la température de l'eau et la nature des substrats de colonisation (Biggs B.J.F., 1987). Les facteurs chimiques sont la qualité de l'eau et plus particulièrement la disponibilité en nutriments. Enfin, les paramètres biologiques sont représentés par l'action des brouteurs (ou grazing) (Stevenson R.J. *et al.*, 1996) (Figure I-13). L'importance d'un paramètre ou de la combinaison de plusieurs facteurs sur la croissance des algues varie d'une rivière à l'autre (Riskin M.L. *et al.*, 2003).



I. 3.3.1. Facteurs physiques

a) Paramètres hydrologiques

Les paramètres hydrologiques englobent de nombreux facteurs. On peut noter principalement la fréquence et l'intensité des crues, la vitesse du courant et la stabilité du lit du cours d'eau (Biggs B.J.F. & Close M.E., 1989). Les crues, en réinitialisant la dynamique des communautés, créent de nouveaux cycles d'accumulation de biomasse et de succession d'espèces et peuvent ainsi contribuer à augmenter la

diversité des communautés benthiques (Biggs B.J.F. & Close M.E., 1989). En revanche, les crues provoquent en général une instabilité du substrat, ce qui ne favorise pas l'accrochage des micro-organismes et le développement du périphyton et déstabilise celui déjà installé (Biggs B.J.F., 2000).

Par ailleurs, lors de la hausse des débits durant la montée de crue, l'augmentation subséquente des vitesses du courant peut présenter deux effets opposés :

- un effet direct : le décrochage, par augmentation des forces de cisaillement, des biofilms épais à algues filamenteuses alors que les biofilms fins sont plus résistants. Cet effet abrasif peut être accentué par les MES présentes dans la colonne d'eau suite à la crue ;
- un effet indirect : la vitesse du courant joue un rôle sur la disponibilité en éléments nutritifs. Lorsque cette vitesse augmente, la couche limite de diffusion peut être déstabilisée et diminuée ce qui favorise l'accessibilité aux nutriments et le développement de la biomasse (Watanabe T. *et al.*, 1988 ; Biggs B.J.F., 1990 ; Borchart M.A., 1996).

b) Température

La température de l'eau présente des variations journalières et saisonnières. Outre son influence directe, qui est d'augmenter les taux de production du biofilm dans le cas de températures élevées (Biggs B.J.F., 1990 ; DeNicola D.M., 1996), J. Bontoux (1983) rappelle que toutes les constantes d'équilibre des réactions biologiques sont sous la dépendance de la température. Ainsi, la température du milieu a une forte incidence sur la sélection et le développement des différentes espèces présentes dans le cours d'eau.

Pour chaque espèce, il existe une relation qui suit une courbe de Gauss (ou courbe en "cloche") entre son développement et la température du milieu, avec une température optimale de croissance et une température létale (Perry J.J. *et al.*, 2004). D.M. DeNicola (1996) indique qu'on observe une augmentation des biomasses de périphyton sur l'intervalle de 0 à 30°C et une diminution de 30°C à 40°C, même si des tapis de Cyanobactéries peuvent survivre à 75°C. L'auteur indique également que la diversité des espèces du biofilm augmente généralement de 0 à 25°C et décroît lorsque la température est supérieure à 30°C.

Par ailleurs, B.J.F. Biggs (2000) indique qu'une température élevée peut augmenter le développement du périphyton de manière indirecte en réduisant la pression des macroinvertébrés brouteurs qui sont sensibles aux fortes températures.

c) Eclaircissement

La lumière est un paramètre structurant pour la fraction autotrophe du biofilm. Ce paramètre, décrit par son intensité et sa composition spectrale, peut devenir limitant dans le cas de rivières à fort ombrage ou présentant une importante turbidité, suite à une crue par exemple. Les végétaux aquatiques peuvent également gêner la pénétration de la lumière dans le cas d'un fort développement. Toutefois, B.J.F. Biggs

(2000) souligne que le périphyton peut s'acclimater à des niveaux relativement faibles de lumière en augmentant les concentrations en chlorophylle présente dans leurs cellules. A l'inverse, des cas d'inhibition par une trop forte intensité lumineuse ont été décrits (Hill W., 1996 ; Faurie C. *et al.*, 2003), certainement dus à une température trop élevée induite par l'éclairement (Pourriot R. & Meybeck M., 1995) En système lotique, A.D. Steinman et C.D. McIntire (1987) ont montré que l'accumulation de biomasse algale ainsi que les successions d'espèces au sein des assemblages sont fonction de l'éclairement reçu. Ainsi, ils ont observé que les Chlorophycées étaient prédominantes par rapport aux Diatomées dans les cours d'eau expérimentaux les plus fortement exposés.

d) Nature des supports de colonisation

L'adhésion des organismes benthiques dépend des caractéristiques des supports disponibles. Comme nous l'avons vu précédemment, les substrats de colonisation peuvent être durs, comme les galets, les rochers et les plantes aquatiques, ou meubles, comme la vase. Les caractéristiques des substrats qui peuvent influencer le développement des biofilms sont :

- la structure du substrat : une structure ouverte, c'est-à-dire permettant à l'eau et aux organismes de circuler facilement, favorise l'accrochage et le développement des organismes ;
- la stabilité du substrat : un substrat stable est plus hospitalier pour le développement des organismes ;
- la rugosité du support : un support lisse désavantage l'accrochage des organismes constitutifs du biofilm. Cependant, le nombre de cellules adhérentes n'augmente pas systématiquement avec la rugosité moyenne de la surface car il faut également prendre en compte la taille et la morphologie des cellules (Garry P. *et al.*, 1995).

I. 3.3.2. Facteurs biologiques

Le périphyton est à la base de la chaîne trophique et sert d'aliment principalement aux macroinvertébrés qui seront, ensuite, eux-mêmes consommés par les poissons et les oiseaux. L'action de prélèvement des biomasses végétale et microbienne par les animaux pour leur nourriture est nommée "brouillage" ou "*grazing*" en anglais.

S. Dukan *et al.* (1995) indiquent que dans le milieu naturel, les actions de brouillage expliquent souvent la plus grande partie des pertes de biofilm en conditions estivales, mais n'apportent qu'une contribution minimale durant les périodes où la température est plus faible et où les brouilleurs sont moins nombreux.

I. 3.3.3. Facteurs chimiques : Interactions Biofilms - Nutriments

a) Effets des nutriments sur le développement du biofilm

Les facteurs chimiques déterminants de la croissance du périphyton peuvent être différents au sein de chaque rivière : phosphore, azote, carbone, éléments traces, combinaison des facteurs (Peterson B.J. *et al.*, 1983). Ce sont cependant les éléments nutritifs, phosphore et azote, qui sont reconnus être les paramètres principaux (Bothwell M.L., 1985), le phosphore constituant généralement, comme pour les populations phytoplanctoniques, l'élément nutritif limitant de la croissance du périphyton (Benmoussa M., 1995). En outre, M.A. Borchardt (1996) souligne que lorsque la lumière n'est pas limitante, ce sont les nutriments qui constituent la ressource la plus déterminante pour le développement des biofilms.

Les enrichissements en nutriments stimulent la croissance du périphyton (Aizaki M. & Sakamoto K., 1988 ; Dodds W.K. *et al.*, 2002). Toutefois, on peut se demander à quels niveaux se lisent les effets des éléments nutritifs. Est-ce au niveau de la composition des flores ou dans la quantité globale de biofilm présente à un instant t ou bien dans la quantité de biomasse maximale atteignable ou encore dans la vitesse de croissance du biofilm ?

Au niveau de la composition interne du périphyton, dans les situations oligotrophes, un apport en nutriments se traduit par une augmentation de la biodiversité. En cas de situations eutrophes à hypereutrophes, il y a spécialisation et réduction de la richesse spécifique. En effet, M. Benmoussa (1995) indique que lorsque les concentrations optimales pour le développement du biofilm sont dépassées, un apport en continu d'éléments nutritifs, et notamment de phosphore, peut inhiber le développement de certaines espèces et réduire ainsi la biodiversité.

En ce qui concerne la quantité de biofilm, l'entrée d'éléments nutritifs dans le milieu a généralement pour conséquence une augmentation des biomasses périphytiques. Par exemple, B.J.F. Biggs (1990) cite le rejet d'effluents d'eaux usées contenant de fortes concentrations en P et N, qui accroît l'apparition et l'ampleur des proliférations algales en rivières. Les mécanismes de cette augmentation de biomasse sont de deux ordres :

- les niveaux maximum de biomasse peuvent être amplifiés car la diffusion dans la matrice du biofilm est améliorée lorsque le gradient de concentration est plus élevé (Bothwell M.L., 1989) ;
- les taux de croissance peuvent être augmentés du fait de la levée des limitations en nutriments (Bothwell M.L., 1988).

➤ C'est spécifiquement sur ce dernier point que porte notre travail puisque, comme nous l'avons vu précédemment, en conditions naturelles les niveaux maximums de biomasse ne sont que rarement atteints car régulés par l'ensemble des facteurs hydrauliques. De ce fait, il est difficile d'identifier un enrichissement en nutriments en liaison avec les biomasses de biofilm à un instant t. La piste de travail à explorer est alors l'étude de la dynamique de la croissance des biofilms.

b) Action du biofilm sur les teneurs en nutriments

Composé de micro-organismes actifs, le périphyton exerce une influence sur son milieu environnant en raison de ses activités métaboliques : photosynthèse et respiration. Les biofilms sont considérés comme des éléments clés dans les processus d'amélioration de la qualité de l'eau (Vymazal J., 1988 ; Sabater S. *et al.*, 2002). En effet, ils assurent le recyclage des nutriments dissous (Battin T.J. *et al.*, 2003) et ont un rôle dans la rétention d'éléments polluants, tels que les métaux lourds ou les pesticides. Les propriétés qui sont attribuées au périphyton sont donc principalement celles d'un rôle épuratoire du milieu aquatique (Biggs B.J.F., 2000 ; Sabater S. *et al.*, 2002).

Cette capacité auto-épuratoire des biofilms est mise à profit en milieu industriel où ils sont utilisés pour diminuer les teneurs en azote et phosphore dans les traitements par biomasse fixée des eaux résiduaires. S. Sabater *et al.* (2002) indiquent que les biofilms peuvent mettre en jeu d'autres mécanismes que l'assimilation et l'adsorption physique dans le recyclage des nutriments : lorsque les biofilms sont suffisamment épais, des zones d'anoxie peuvent se former et entraîner la dénitrification (Teissier S., 2001).

Ce sont les micro-organismes hétérotrophes qui sont les principaux agents de l'épuration biologique et ainsi leur abondance indique une forte pollution organique (Capblancq J. & Cassan M., 1979a). L. Aleya et J. Devaux (1989) précisent que c'est l'activité microbienne qui assure les processus biogéochimiques essentiels de recyclage des éléments et qui permet la remise à disposition des éléments minéraux aux producteurs primaires. Néanmoins, on peut noter que la fraction autotrophe du biofilm permet une mobilisation plus durable des éléments, comparé au compartiment hétérotrophe (2 à 3 mois au lieu de quelques jours).

Jusqu'à maintenant, nous avons discuté des facteurs de contrôle du développement des biofilms mais il existe également des facteurs de contrôle de leurs fonctions. Au niveau biologique, la composition taxonomique influence la fonction d'épuration des biofilms. L'efficacité de ce rôle épuratoire augmente de l'hiver à l'été avec le passage des Cyanobactéries aux algues vertes dominantes (Guasch H. & Sabater S., 1995).

I. 3.3.4. Conclusions

Nous avons pu voir que les paramètres qui influencent le développement des biofilms au sein du milieu aquatique sont nombreux et variés. La biomasse présente par unité de temps et de surface est fortement conditionnée par les caractéristiques hydrodynamiques de la période ayant présidé à l'installation du biofilm (Battin T.J. *et al.*, 2003). De ce fait, les facteurs hydrologiques doivent toujours être pris en compte dans l'étude de la dynamique de biomasse du périphyton, celui-ci ne pouvant réagir aux nutriments disponibles que lorsque les régimes du courant sont stables (Biggs B.J.F. & Close M.E., 1989).

En conclusion, plusieurs aspects singuliers de composition et de fonctionnement sont relatifs à un biofilm :

- le biofilm est accroché à un support ;
- la structure de l'assemblage est hétérogène (Bishop P.L., 1997) ;
- la biomasse du biofilm est structurée dans l'épaisseur, d'un point de vue chimique : par exemple, existence de micro-gradients d'oxygène et d'un gradient d'activité métabolique dans l'épaisseur du biofilm (Brisset L. *et al.*, 1995), d'un point de vue cellulaire : existence d'un gradient de lumière qui induit une répartition des espèces phototrophes en surface (Brunet C., 2000), d'un point de vue physique : la densité du biofilm augmente avec la profondeur tandis que la porosité diminue ;
- le biofilm présente un fonctionnement d'ensemble : les enzymes nécessaires au biofilm restent dans la matrice ainsi que dans la DBL, les ressources en nutriments proviennent à la fois du milieu environnant et de manière significative du recyclage interne (Steinman A.D. *et al.*, 1995) ;
- le taux de croissance du biofilm n'est pas facilement calculable car le développement en masse du biofilm comprend à la fois les processus de gain de biomasse : attachement et établissement des cellules, croissance des communautés déjà en place, piégeage de nouveaux micro-organismes au sein de la matrice polysaccharidique et des processus de perte de biomasse : mort des cellules, détachement sous l'influence de facteurs hydrauliques ou du broutage (Capblancq J. & Cassan M., 1979a ; Brunet C., 2000).

I. 4 • CONCLUSIONS - POINTS D'APPUI DU TRAVAIL DE LA THESE

Pour résumer les enseignements de la revue de la littérature, retenons les éléments suivants :

- il n'existe pas d'outil normalisé permettant de décrire le niveau d'eutrophisation en eaux courantes ;
- le compartiment du biofilm peut servir d'indicateur du niveau de trophie des eaux ;
- en ce qui concerne les paramètres mesurés, l'attention est focalisée sur les compartiments algal et bactérien ;
- nombreux sont les auteurs qui ont travaillé sur les corrélations entre les quantités de biofilm (mesurée en MSSC ou chlorophylle *a*) et les charges en nutriments de l'eau (Watanabe T. *et al.*, 1988 ; Biggs B.J.F. & Close M.E., 1989 ; Dodds W.K. *et al.*, 1997 ; Dodds W.K. *et al.*, 2002 ; Bernhardt E. & Likens G.E., 2004, par exemple), soulignant souvent, comme nous l'avons évoqué dans l'introduction à propos de la Garonne, l'efficacité relative de ce type de mise en relation ;
 - C'est pourquoi nous avons choisi de nous intéresser dans le cadre de la thèse, à la dynamique d'installation des biofilms, autrement dit de travailler sur leur vitesse de croissance. L'objectif est donc de voir s'il existe une relation entre vitesse de croissance et charge en nutriments de l'eau en vue d'un outil de gestion de l'eutrophisation des cours d'eau à biomasse fixée dominante.
- le biofilm est un maillon représentatif du statut trophique, particulièrement durant sa phase de croissance active. En d'autres termes, il est davantage sensible aux conditions externes du milieu lorsqu'il est jeune et fin. Il l'est moins ensuite lors de son fonctionnement autonome, c'est-à-dire à la période de maturation ;
 - L'étude de la dynamique de croissance du biofilm dans sa phase de colonisation rapide présente donc les meilleures chances d'évaluer le statut de trophie du milieu. C'est cette piste que nous avons tenté d'explorer avec l'hypothèse de la définition d'un outil simple et rapide, utilisable *in situ*.

* *

* * *

CHAPITRE II :

MATERIELS ET METHODES

CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES

Dans ce chapitre, l'objectif est de présenter :

- les méthodes expérimentales au laboratoire ;
- les zones d'étude et les investigations réalisées *in situ* ;
- le traitement des échantillons de biofilm et les méthodes d'analyse des prélèvements d'eau ;
- le mode d'analyse statistique des données recueillies.

Le but du travail est de proposer des méthodologies transférables à la surveillance des milieux aquatiques ; il est nécessaire, une fois les relations démontrées en conditions expérimentales contrôlées, de vérifier leur applicabilité et leur interprétabilité dans les conditions plus complexes de terrain. C'est à cette condition qu'elles peuvent présenter un intérêt en bioindication et apporter une information utile aux gestionnaires des hydrosystèmes.

Ainsi, dans le cadre de notre étude, nous avons associé le travail en laboratoire et le travail *in situ*. Plusieurs auteurs ont décrit les informations fournies par ces deux voies d'approche avec leurs avantages et inconvénients respectifs (Gold C., 2002 ; Vidal M.L. *et al.*, 2002 ; Volatier L., 2004). Ces informations sont résumées dans le tableau II-I.

Tableau II-I : Revue des principaux avantages et inconvénients associés aux études expérimentales en laboratoire et *in situ*

ETUDES EN LABORATOIRE		ETUDES <i>IN SITU</i>	
Avantages	Inconvénients	Avantages	Inconvénients
- isolement du paramètre de contrôle désiré - compréhension de mécanismes ciblés - reproductibilité	- simplification du système qui ne permet pas d'appréhender l'ensemble des mécanismes en jeu - manque de représentativité des conditions environnementales réelles	- représentativité de l'écosystème - possibilité de synergie ou d'antagonisme des différents paramètres	- complexité de la réponse de l'écosystème empêchant généralement de remonter précisément à la cause des phénomènes observés et à la hiérarchisation de leur contribution

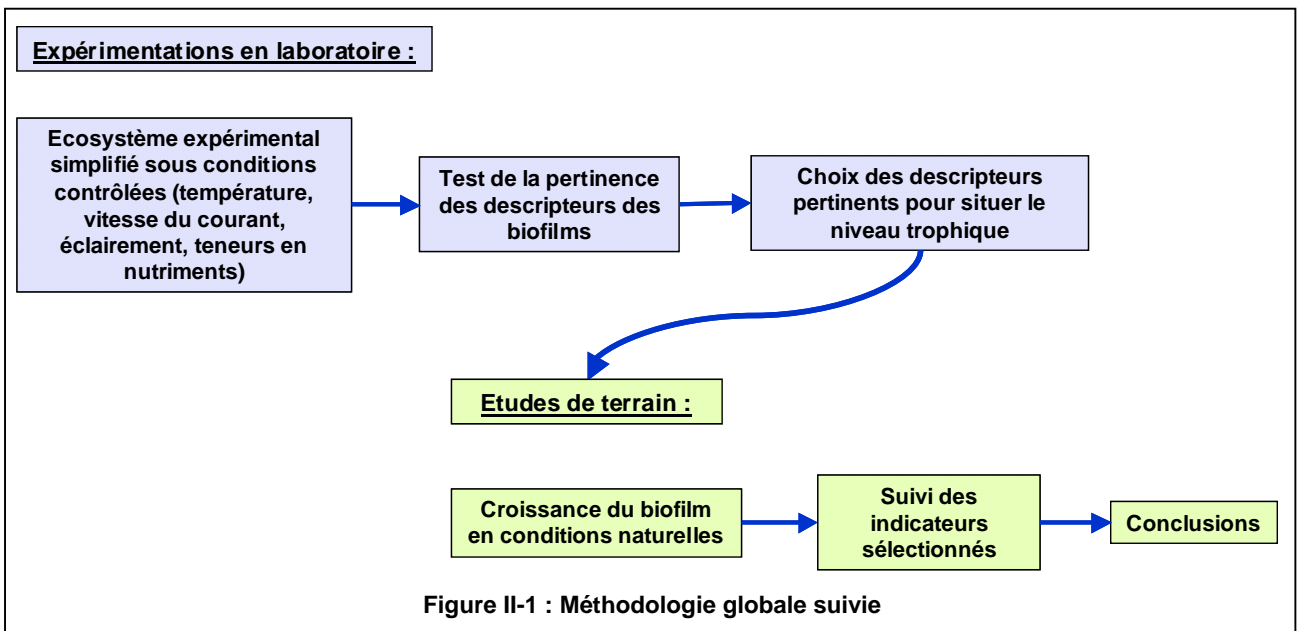
Les expériences en laboratoire permettent de contrôler différentes composantes de l'écosystème et de simplifier ainsi les mécanismes mis en jeu. De ce fait, il est possible de mieux isoler le facteur de contrôle que l'on souhaite étudier. Dans notre étude, le paramètre "teneurs en nutriments du milieu" a été dissocié des autres paramètres qui influencent le développement des biofilms, notamment les facteurs hydrodynamique, température et éclaircissement, afin de tenter de mettre en évidence des relations nettes de cause à effet entre la croissance du biofilm et la charge en nutriments.

Les deux types d'approches, conditions expérimentales et conditions réelles, sont complémentaires, sachant que les questions que l'on se pose peuvent être abordées dans les deux sens :

- soit par une étude préalable sur le terrain, suivie par une phase de validation en laboratoire pour tenter d'expliquer les observations relevées ;
- soit par des expérimentations en laboratoire que l'on essaye ensuite de valider par des observations *in situ*.

Nous avons choisi le deuxième cheminement afin :

- d'évaluer en laboratoire la pertinence et la sensibilité des indicateurs choisis ;
- puis de tester la pertinence des indicateurs retenus en conditions naturelles de rivières (Figure II-1).



II. 1 • CONDUITE DES EXPERIMENTATIONS EN LABORATOIRE

Au laboratoire, nous avons étudié la réponse du biofilm à des conditions variées d'enrichissement du milieu, en termes de croissance et d'aspects plus qualitatifs concernant les différentes communautés algales. Le principe général est d'utiliser un biofilm naturel prélevé à notre station de référence sur le fleuve Garonne¹ (c'est-à-dire une station faiblement enrichie en nutriments) comme inoculum pour la culture de biofilms artificiels en laboratoire. Ces biofilms artificiels sont soumis à des concentrations distinctes en nutriments et leurs dynamiques d'installation puis de croissance sont suivies au cours du temps.

II. 1.1. Dispositif expérimental

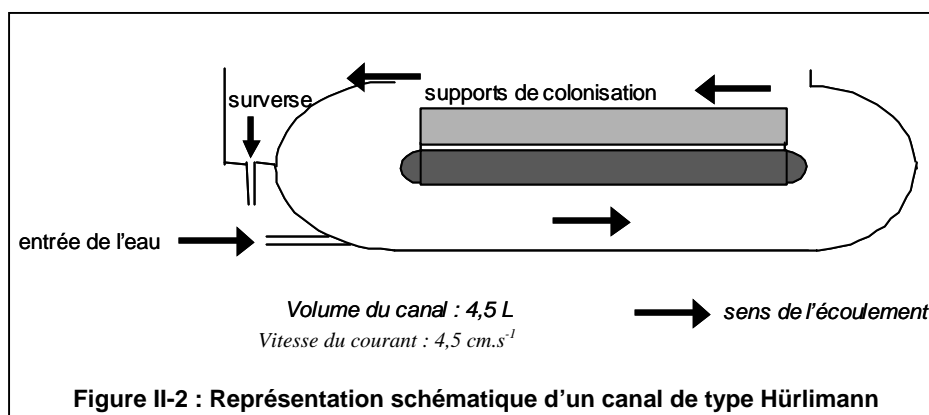
II. 1.1.1. Description des canaux expérimentaux

Le système expérimental utilisé, constitué de canaux expérimentaux, a été modifié au cours de notre travail pour les raisons présentées ci-après. Nous renvoyons en outre le lecteur à la thèse de L. Volatier (2004), qui établit une revue bibliographique portant sur les différents types de canaux artificiels rencontrés dans la littérature (en termes de forme, dimensionnement, fonctionnement, matériau, eau d'alimentation, emplacement,...).

Au début de notre étude, nous avons choisi d'utiliser des canaux expérimentaux de type Hürlimann (Figure II-2). Nous avons réalisé deux expériences de mise au point méthodologique lors de la première année de thèse avec ce matériel et nous avons rencontré deux types de problèmes dus à la configuration des canaux :

- formation d'écoulements hydrauliques préférentiels créant des phénomènes d'érosion hétérogènes sur nos supports de colonisation ;
- développement parasite important de biofilm s'installant sur toutes les parois des canaux ainsi que sur le fond. Ces biofilms parasites prélèvent certainement une forte part des nutriments, or, il est très difficile de nettoyer complètement ces canaux en cours d'expérimentation.

¹ Se reporter à la partie II. 2.1. Présentation des zones d'étude p. 85.

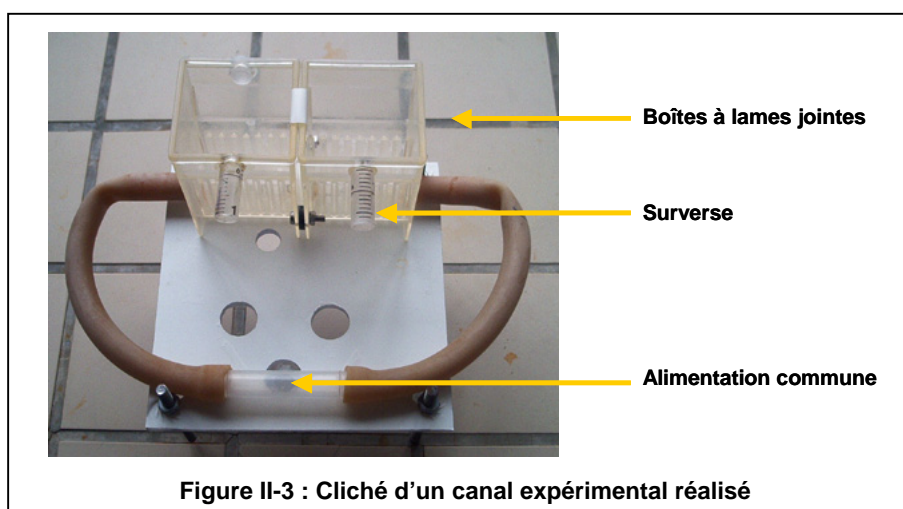


Nous avons, de fait, remplacé ce système par l'utilisation de mini-réacteurs conçus au Cemagref de Bordeaux, systèmes beaucoup plus faciles à nettoyer et constitués chacun par l'association de deux boîtes à coloration pour lames de microscopes, dont les dimensions internes unitaires sont : H=8 cm ; L=5 cm, P=3 à 5 cm¹ (Figure II-3).

Les canaux ainsi constitués (2 boîtes couplées) ont un volume total de 220 mL. Les deux cuves (boîtes à lames) ne communiquent pas directement entre elles mais sont au contact de la même réserve d'eau et constituent ainsi un canal.

Les canaux sont en polyéthylène. Même si ce matériau favorise davantage l'adhésion des biofilms que le verre, nous l'avons choisi pour des raisons pratiques car il était plus facile de le percer en vue de placer les tuyaux d'entrée et d'évacuation d'eau nécessaires.

Chaque canal est relié à une réserve d'eau de 5 L placée au-dessous du système. L'alimentation se fait en recirculation par le bas et est assurée par une pompe de type Aquarium (pompes Seltz S30, 9W, Qmax 600 L.h⁻¹) (Figure II-4a). Le tuyau qui passe sous les lames de colonisation est fendu dans toute sa longueur et permet une distribution régulière de l'eau (Figure II-4b). Ces systèmes de canaux permettent de contrôler le développement parasite des biofilms sur les parois et de le limiter par un nettoyage complet et régulier des canaux.



¹ H : hauteur, L : largeur, P : profondeur.

• **Choix du type de support de colonisation**

Les supports de colonisation sont constitués par l'assemblage de deux lames de polyéthylène placées autour d'une lame porte-objet en verre, pour que l'épaisseur de l'ensemble soit adaptée à la largeur des encoches des canaux. Pour chaque groupe de lames, la surface de colonisation est de 19,8 cm². Les lames porte-objet sont remplacées à chaque prélèvement afin de ne pas modifier la circulation de l'eau à l'intérieur du canal.

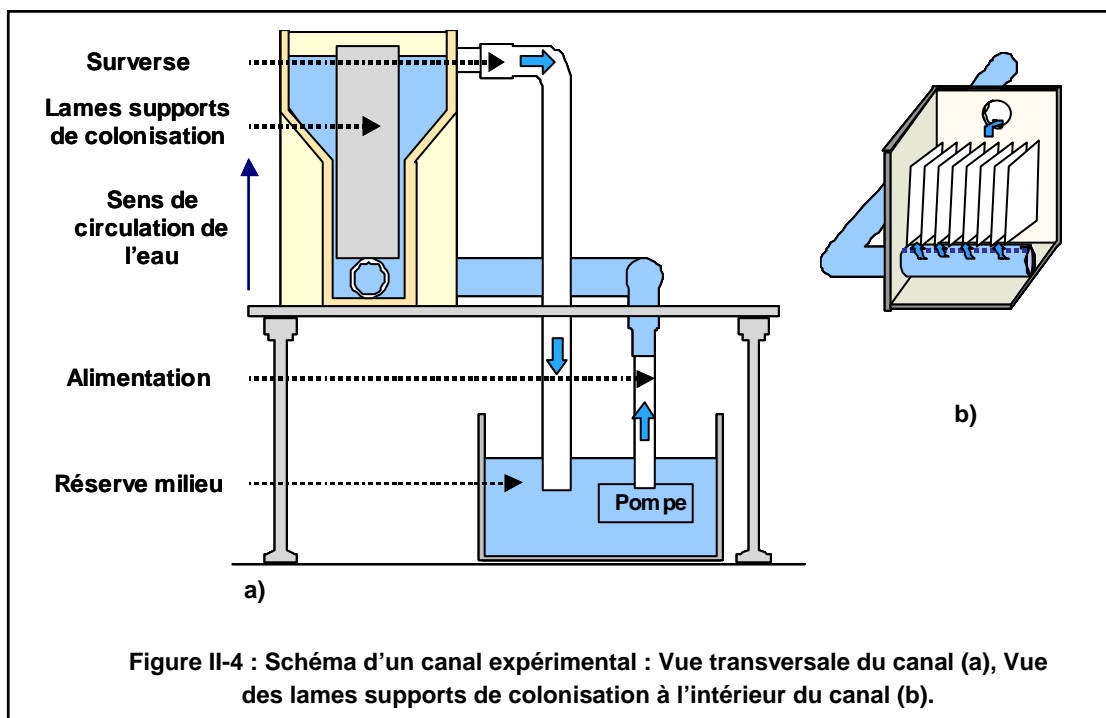
Pour permettre une colonisation plus facile des supports, nous avons choisi d'utiliser des lames en polyéthylène que nous avons préalablement dépolies à l'aide de papier de verre. Chaque canal comporte 2×8 lames, qui sont placées verticalement afin d'éviter un accroissement de biomasse du biofilm par simple décantation (Figure II-4b).

Entre les différentes expérimentations, les lames en polyéthylène qui sont réutilisées sont nettoyées au détergent sans phosphates, puis à l'eau de Javel, et sont rincées dans des bains successifs d'eau distillée afin d'éliminer toute trace d'eau de Javel.

• **Vidange des canaux, nettoyage partiel et nettoyage complet**

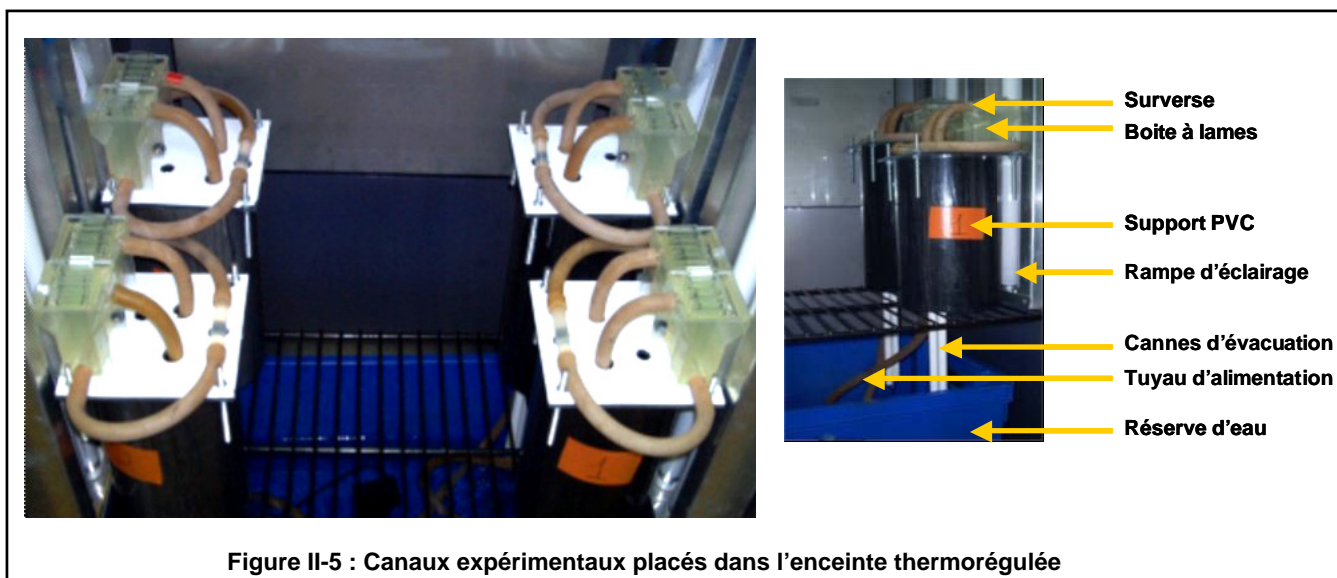
En vue de parer au développement incontournable du biofilm sur les parois des canaux et d'en réduire au minimum les conséquences sur la consommation des nutriments du milieu, nous avons choisi de procéder à la vidange des canaux deux fois par semaine afin de pouvoir les nettoyer. Pour effectuer ce nettoyage partiel, les lames sont temporairement placées sur un portoir, les canaux ainsi que les tuyaux d'alimentation sont nettoyés par brossage à l'eau claire.

Lors du nettoyage total des systèmes entre deux expériences, les canaux subissent le même traitement que les lames réutilisées, c'est-à-dire un nettoyage au détergent sans phosphates, un nettoyage à l'eau de Javel et des rinçages successifs à l'eau distillée.



II. 1.1.2. Contrôle des conditions expérimentales

L'ensemble des quatre canaux expérimentaux est placé en enceinte thermorégulée et à éclairage contrôlé (Figure II-5). La constance du paramètre "vitesse du courant" est assurée par l'utilisation de quatre pompes identiques préalablement testées avant chaque expérimentation.



• Température de l'enceinte

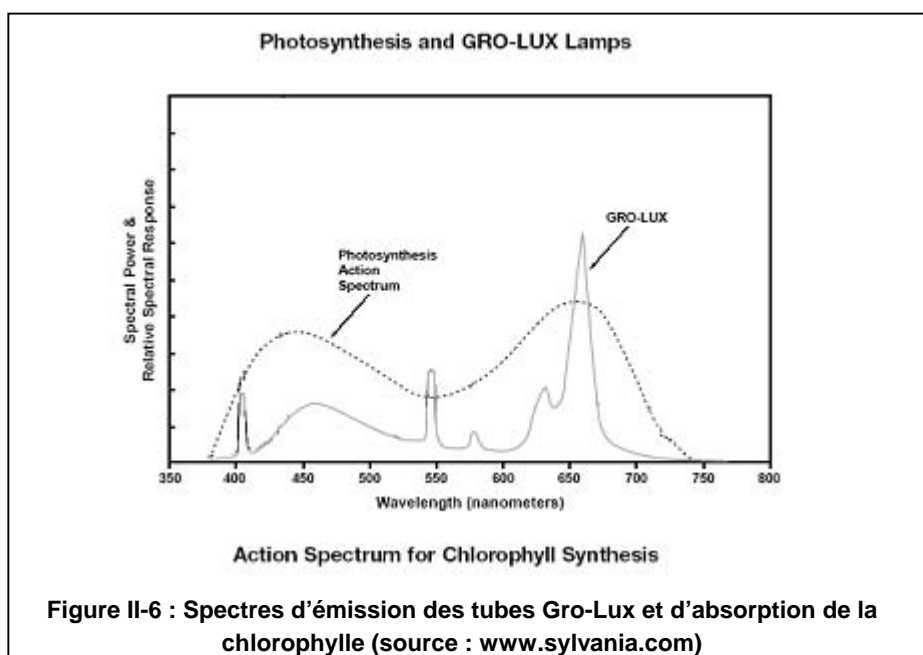
Pour le choix de la température de l'enceinte nous pouvons :

- travailler à la température de l'eau du jour du prélèvement du biofilm à la station de référence, afin de garder le biofilm dans ses conditions initiales, ce qui signifie modifier la température de l'enceinte à chaque nouvelle expérience avec notamment des différences importantes entre les saisons ;
- ou bien choisir une température moyenne que l'on garde pour toutes les expériences dans le cadre d'un essai de standardisation des paramètres.

Nous avons choisi de conserver la même température pour toutes les expériences. La température est fixée à 20°C, afin de stimuler le développement du biofilm et de se placer dans des conditions proches des conditions estivales (c'est en été que se déroule la majorité des expériences). La valeur moyenne de la température de l'eau des canaux mesurée au cours des différentes expérimentations est de $20,5 \pm 0,4^\circ\text{C}$.

• Eclairage

Nous avons utilisé des rampes d'éclairage comprenant deux tubes fluorescents Gro-Lux, usage horticole (F18W) qui émettent dans les longueurs d'onde d'absorption de la chlorophylle (Figure II-6). La photopériode appliquée est de 14h d'éclairage sur 24h. Chaque canal est placé face à une rampe de deux tubes. Nous avons utilisé des réhausseurs en PVC, afin de maintenir les canaux au niveau de la zone d'éclairage optimal des lampes.



La valeur moyenne d'éclairement relevée est de $160 \mu\text{E.s}^{-1}.\text{m}^{-2}$ et des mesures d'intensité lumineuse sont réalisées afin de tester l'homogénéité de l'éclairement entre les canaux ainsi qu'au niveau des lames (Tableau II-II).

Mesures 1					Mesures 2				
	Canal 1	Canal 2	Canal 3	Canal 4		Canal 1	Canal 2	Canal 3	Canal 4
Tube 1	170	169	183	168	Tube 1	168	145	167	141
Tube 2	177	163	168	164	Tube 2	155	143	161	154

Bien que l'homogénéité de l'éclairage ait été vérifiée, les canaux expérimentaux sont permutés chaque semaine pour assurer des conditions les plus similaires possibles au niveau de chaque canal (et réduire ainsi l'influence que peut avoir la position des canaux dans l'enceinte sur l'évaporation de leur réserve de milieu).

• **Débit des canaux, vitesse du courant**

Le débit mesuré en sortie de canal est de 530 mL.min^{-1} , ce qui correspond à une vitesse de l'ordre de 1 cm.s^{-1} au niveau des lames de colonisation. Cette vitesse est relativement faible, mais notons bien que l'objectif principal est de permettre un accès correct et homogène aux nutriments dissous, de permettre un développement satisfaisant des biofilms et d'assurer une vitesse comparable entre les différents canaux expérimentaux (maîtrise des conditions hydrodynamiques).

II. 1.2. Déroulement des expériences

II. 1.2.1. Ensemencement des canaux en biofilm

Lors d'essais préalables avec les canaux de Hürlimann, nous avons comparé deux modes possibles d'ensemencement des lames en biofilm :

- mise en eau de galets colonisés par du biofilm. Les galets sont placés dans la réserve tels que ramassés dans la rivière (galets non grattés) ;

- utilisation de biofilm mis en suspension dans la réserve de milieu après grattage des galets colonisés.

Les résultats de développement du biofilm nous ont montré qu'en utilisant des galets non grattés, le délai avant une colonisation satisfaisante des supports est relativement long. Ceci est dû au fait qu'il faut du temps avant que les cellules de micro-organismes des galets ne se décrochent de leur support pour ensuite aller migrer vers les lames des canaux expérimentaux.

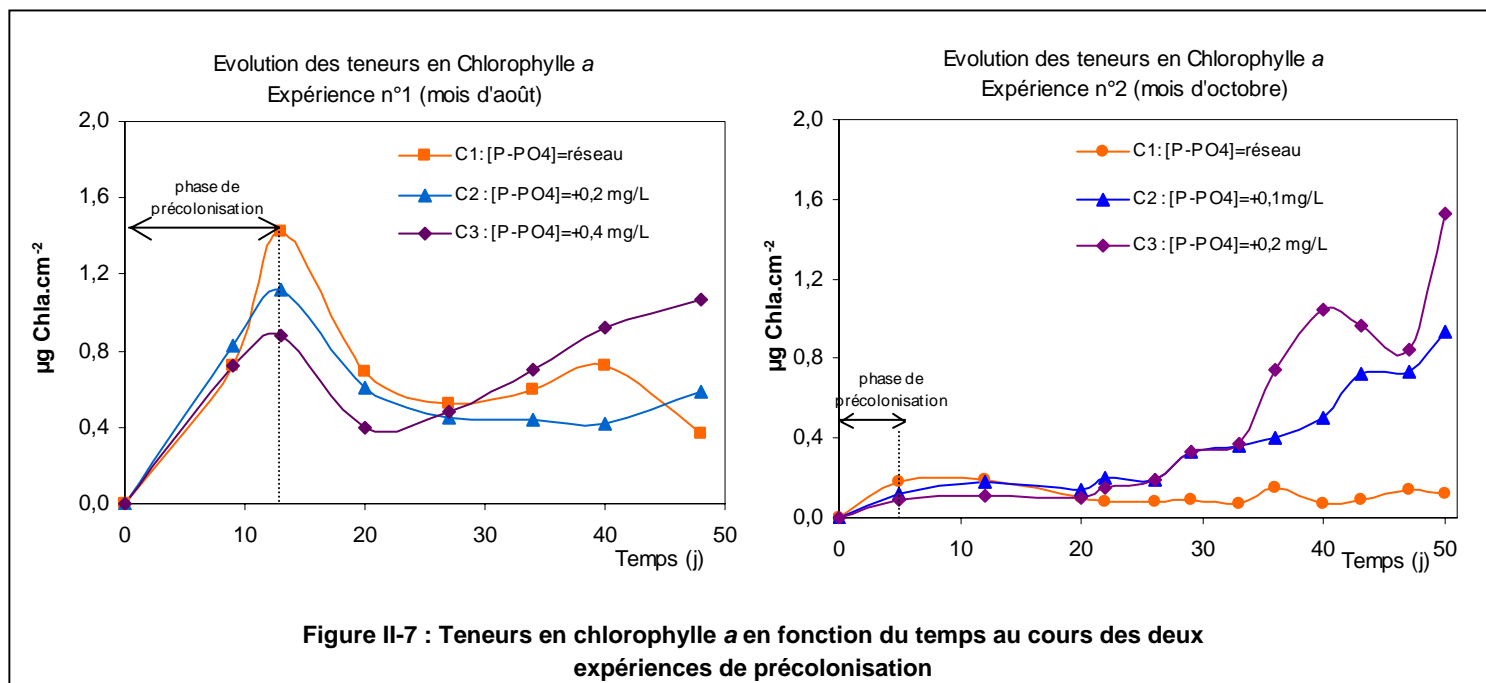
Par la suite, la colonisation a donc été réalisée par un inoculum composé d'eau de rivière et de biofilm en suspension pour favoriser un accrochage plus rapide du biofilm.

Pour réaliser la suspension d'inoculum de biofilm, les galets recouverts de biofilm récupérés en Garonne (échantillonnage en plusieurs points de la station de référence) sont grattés à la brosse à dents et le biofilm est récupéré avec de l'eau de la station de référence. La solution obtenue est homogénéisée au blender (WARING Commercial Blendor, durée : 2 min), afin d'éviter les amas (on cherche une colonisation des supports et non du dépôt sur les lames) et en vue d'assurer une bonne dispersion du biofilm dans les canaux. Un agitateur est placé dans la réserve d'inoculum afin d'assurer une bonne oxygénation du milieu ainsi qu'une bonne distribution de toute la suspension.

Pour connaître la durée de contact nécessaire entre les canaux et la réserve d'inoculum de biofilm, autrement dit, pour obtenir un développement satisfaisant de biomasse sur les lames, nous avons réalisé deux expériences successives d'essais avec un temps de contact respectivement de 8 jours et 5 jours (caractéristiques des expériences présentées au tableau II-III). Les comparaisons de développement sont réalisées sur le paramètre de la chlorophylle *a* (Figure II-7). Pour ces essais préalables, nous étions encore dans la phase de réglage des conditions expérimentales, ce qui explique la valeur des paramètres d'éclaircissement et de température de l'enceinte.

Tableau II-III : Caractéristiques des deux expériences de précolonisation en laboratoire

		Expérience n°1 (mois d'août)	Expérience n°2 (mois d'octobre)
Caractéristiques de la réserve commune	Volume de la réserve commune	25 L ; canaux=4x4,5 L	
	Concentrations au sein de la réserve commune	[NO ₃]=3 mg.L ⁻¹ , [PO ₄ ³⁻]=0,05 mg.L ⁻¹	
Paramètres de l'enceinte	Température	15°C (temp. eau <i>in situ</i> : 20°C)	15°C (temp. eau <i>in situ</i> : 13,5°C)
	Eclairement	50 µE.s ⁻¹ .m ⁻² (10h/24h)	
Modalités de la phase de précolonisation	Type d'ensemencement	2 L de suspension de biofilm	
	Durée	8 jours	5 jours
	Quantité de Chlorophylle a sur les lames à la fin de la précolonisation	C1=1,42 ; C2=1,12 ; C3=0,88 (µg Chla.cm ⁻²)	C1=0,18 ; C2=0,12 ; C3=0,09 (µg Chla.cm ⁻²)



Lors de l'expérience du mois d'août, le temps de précolonisation était probablement trop long : le taux de chlorophylle a parvient à un taux de saturation dès la fin de la précolonisation pour chuter ensuite. Nous avons donc décidé de réduire le temps de précolonisation de manière à obtenir un biofilm assez "jeune",

capable d'évoluer différemment selon les conditions imposées de l'expérience. L'évolution de la croissance des biofilms ainsi obtenue lors de l'expérience d'octobre est plus satisfaisante, car non limitée en fin de précolonisation.

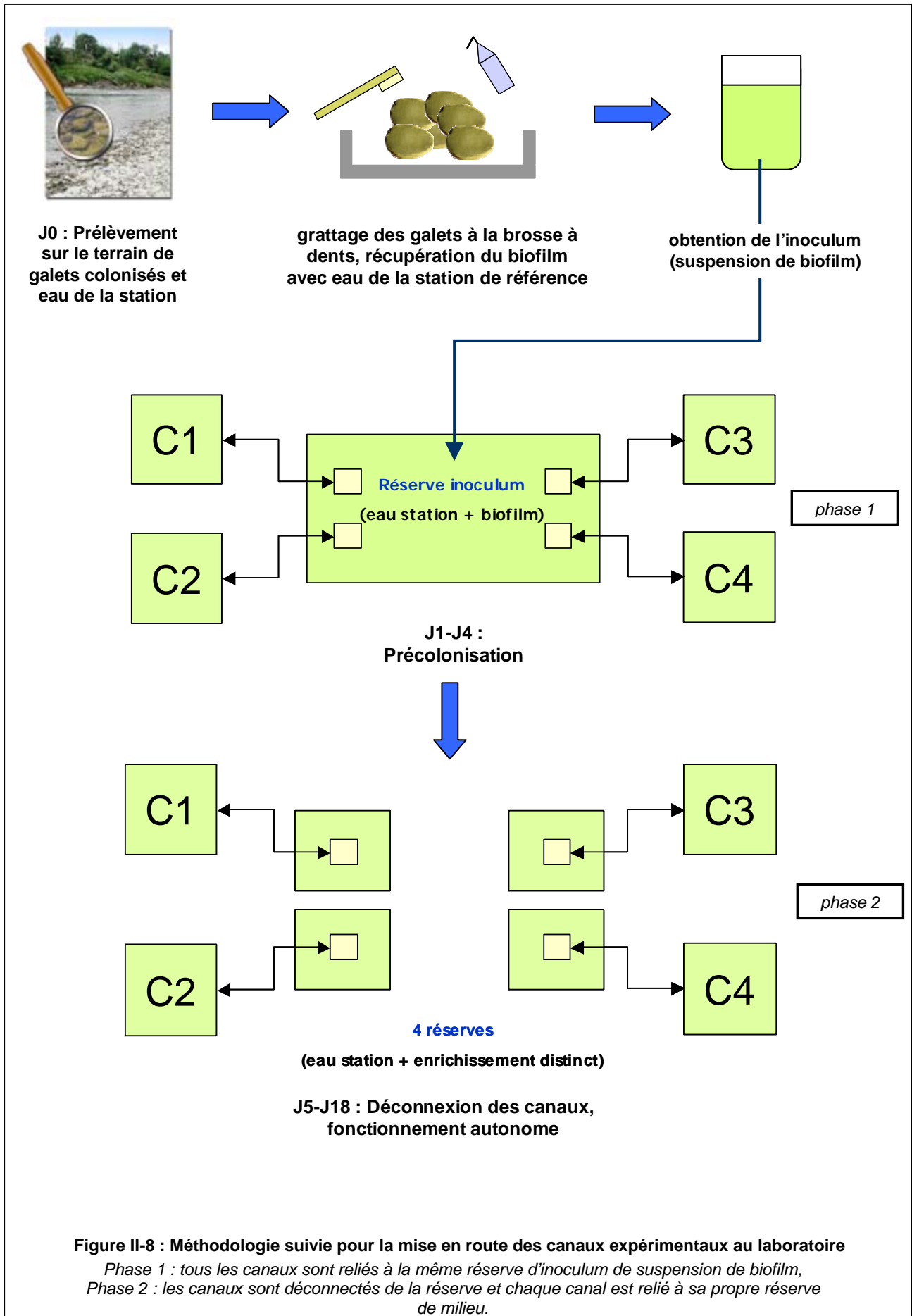
Pour des raisons de commodité, le temps de précolonisation est finalement fixé à 4 jours avec un ensemencement réalisé le jeudi et le premier renouvellement d'eau le lundi suivant. En outre, nous avons pu vérifier qu'après les 4 jours de précolonisation, lors de chaque expérimentation, les quantités de biofilm développé sont suffisantes pour effectuer les mesures de biomasse.

Précisons qu'un ajout de silice¹ (à 5 mg.L⁻¹) a été effectué lors de cette phase, afin de pallier d'éventuelles carences pour les communautés de Diatomées pouvant pénaliser leur implantation².

Le protocole général des expériences en canaux est présenté dans la figure II-8. Après la phase commune de précolonisation, où tous les canaux sont alimentés par le même inoculum de biofilm, se déroule la phase de développement, où chaque canal est autonome et relié à sa propre réserve de milieu (qui varie d'un canal à l'autre et selon le type d'expérience mené).

¹ Ajout de silice sous forme de SiO₂.Na₂O.5H₂O.

² Les Diatomées, qui sont des colonisateurs primaires, ont besoin de silicate de sodium, élément pouvant devenir limitant car non facilement recyclé dans le milieu une fois qu'il est mobilisé dans l'élaboration des frustules.



II. 1.2.2. Choix du milieu de culture

Pour le milieu de colonisation du biofilm, nous avons le choix entre :

- un véritable milieu de culture utilisé en routine, pour assurer le développement des algues ;
- l'eau du réseau, sur laquelle nous faisons les ajouts nécessaires en éléments N et P ;
- l'eau de Garonne, que l'on stocke au frais pour limiter l'évolution de sa composition.

L'avantage de l'utilisation d'un milieu de culture type est sa reproductibilité et, de fait, la comparaison plus aisée des expériences entre elles. Cependant, le principal inconvénient est le risque de ne favoriser le développement que d'un seul type d'algues à défaut du biofilm dans son ensemble.

Au début de notre recherche, nous avons pu voir les inconvénients liés à l'utilisation de l'eau du réseau. En effet, des développements assez faibles en biomasse de biofilm nous ont amenés à conclure qu'il manquait sans doute des éléments essentiels au développement de la biomasse ou que des produits de traitement de l'eau avaient un effet xénobiotique (résidus chlorés). Concernant l'hypothèse nutritive, nous avons tout d'abord pensé que la limitation portait sur la silice mais les analyses de l'eau du réseau ont montré que cet élément ne faisait pas défaut ($[Station\ de\ référence]_{moy}=4,1\ mg\ SiO_2.L^{-1}$, $[Eau\ du\ réseau]_{moy}=11,0\ mg\ SiO_2.L^{-1}$).

Pour pallier ces différents inconvénients, nous avons choisi d'utiliser de l'eau prélevée directement sur le terrain, au niveau de notre station de référence. S'est ensuite posée la question du stockage des grandes quantités d'eau nécessaire à une expérience (environ 100 L).

La difficulté est de conserver l'eau dans un état le plus proche possible de celui du jour du prélèvement. Le froid sans congélation (à 4°C) paraît être une solution efficace, car la congélation risquerait de modifier le partage entre les phases dissoute et particulaire, à cause de la précipitation des éléments (notamment les formes du phosphore).

Les bidons d'eau sont stockés au réfrigérateur pendant toute la durée de l'expérience et l'eau introduite dans les canaux est filtrée (sur préfiltre puis membrane à 0,16 µm) afin de ne pas réintroduire de micro-organismes lors de la réalimentation des canaux en milieu. Le suivi de la qualité de l'eau qui est stockée lors de chaque expérimentation, montre que les teneurs en nutriments évoluent peu au cours du temps ($EC[P-PO_4^{3-}]=0,005\ mg.L^{-1}$; $EC[N-NO_3^-]=0,01\ mg.L^{-1}$; $EC[N-NO_2^-]=0,005\ mg.L^{-1}$; $EC[N-NH_4^+]=0,021\ mg.L^{-1}$).

II. 1.2.3. Modalités et rythme d'ajouts de nutriments

La méthodologie de départ est d'étudier la croissance du biofilm soumis à différents niveaux d'enrichissement du milieu. Au laboratoire, nous avons réalisé 5 expérimentations qui peuvent être regroupées ainsi :

- Nous avons tout d'abord réalisé un test de la reproductibilité du dispositif, dont le but est d'évaluer et de comparer le développement du biofilm au sein des quatre canaux sous conditions expérimentales identiques (éclairage, vitesse du courant, température et teneurs en nutriments). Deux protocoles distincts ont été successivement mis en place :
 - dans une première expérience, les quatre canaux sont reliés à une réserve unique de milieu durant toute l'expérience (conditions expérimentales maximales de reproductibilité) ;
 - dans une seconde expérience, les quatre canaux sont déconnectés de la réserve après la phase de précolonisation et reliés ensuite à leur propre réserve de milieu pour le reste de l'expérience. La composition de l'eau dans les différents canaux est maintenue identique. Cette seconde expérience tient à la nécessité de déconnecter les canaux en fin de précolonisation lors des expériences ultérieures d'enrichissement. En effet, dans ce cas, les réserves sont nécessairement distinctes afin de pouvoir imposer des teneurs variées en nutriments selon les canaux.
- Par la suite, nous avons réalisé les expériences dites d'enrichissement, en vue d'évaluer la réponse du biofilm, en termes de croissance et de composition du peuplement, à différents niveaux de trophie du milieu, sous conditions contrôlées d'éclairage, de température et de vitesse du courant. Les enrichissements sont de deux types :
 - enrichissements artificiels, ou dopages, quand il s'agit d'eau de la station de référence à laquelle on ajoute des solutions nutritives de phosphore et/ou d'azote. Ces ajouts sont croissants d'un canal à l'autre et nous avons réalisé deux expérimentations de ce type ;
 - enrichissements "naturels", quand il s'agit d'utiliser directement les eaux de nos différentes stations d'étude situées sur le fleuve Garonne et qui illustrent un gradient trophique.

Dans ces expérimentations, l'un des canaux sert de témoin et ne subit aucun ajout de nutriments, les trois autres sont soumis aux enrichissements distincts en P et/ou N. Les ajouts sont réalisés à partir de solutions nutritives de KH_2PO_4 et NaNO_3 et nous avons vérifié, par dosage, les teneurs réelles présentes dans le milieu après chaque ajout.

Nous avons choisi de réaliser des expérimentations sur un mode semi-dynamique : l'eau est renouvelée tous les 3 ou 4 jours et les organismes sont exposés à la même dose en nutriments pendant des temps courts et répétés. Ainsi, les renouvellements d'eau, les ajouts correspondants et les prélèvements des lames sont effectués à intervalles réguliers, 2 fois par semaine durant 18 jours d'expérience (par exemple à T1, T4, T7, T11, T14 et T18).

II. 2 • EXPERIMENTATIONS *IN SITU*

L'objectif des expérimentations *in situ* est d'obtenir un développement de biofilm sur des supports artificiels de polyéthylène pour une analyse ultérieure au laboratoire. Il s'agit de vérifier, à partir des descripteurs sélectionnés à la suite de la phase expérimentale en laboratoire, s'il est possible de mettre en évidence le gradient trophique présenté par les stations d'étude de terrain, en caractérisant quantitativement et qualitativement la production de biofilm sur substrats vierges au cours du temps. Il s'agit bien d'établir la relation avec le statut trophique de la station (charge en nutriments).

II. 2.1. Présentation des zones d'étude

Les premiers essais ont été effectués en Garonne. Par la suite, il est apparu nécessaire d'élargir le plan d'expérimentation à des rivières de plus petite taille, dans lesquelles le compartiment benthique était également majoritaire par rapport au compartiment pélagique. Notre choix s'est porté sur trois rivières de la région Aquitaine : le Nasseys, dans le département des Landes, l'Eau Bourde et la Jalle de Blanquefort dans le département de la Gironde.

II. 2.1.1. Expérimentations en Garonne

La Garonne, fleuve du sud-ouest de la France, traverse, entre autres, les agglomérations de Toulouse (762000 hab), Bordeaux (755000 hab) et Agen (70000 hab)¹. Nous avons choisi de comparer deux situations de pression anthropique différentes : une pression forte dans le cas de l'agglomération de Toulouse et une pression moindre dans le cas de St Pierre de Gaubert (région d'Agen). Le principe est d'encadrer l'agglomération et ses rejets en travaillant sur une station amont et une station aval (Figure II-9).

a) Description des stations d'étude

Sur le site de Toulouse, la station amont est située à l'**Aouach**, à proximité de la commune du Fauga, et la station aval au lieu-dit du **Ramier de Bigorre** à proximité de la commune de Merville.

Pour le site de St Pierre de Gaubert, nous avons choisi de situer la station amont à **Sauveterre-Saint-Denis** et la station aval à **Boé**.

Les principales caractéristiques des stations d'étude sont présentées dans le tableau II-IV.

¹ Recensement de l'INSEE 1999 (sans doubles comptes).

Site de Toulouse



Stations
AMONT

Station Auouach



Stations
AVAL

Station Ramier

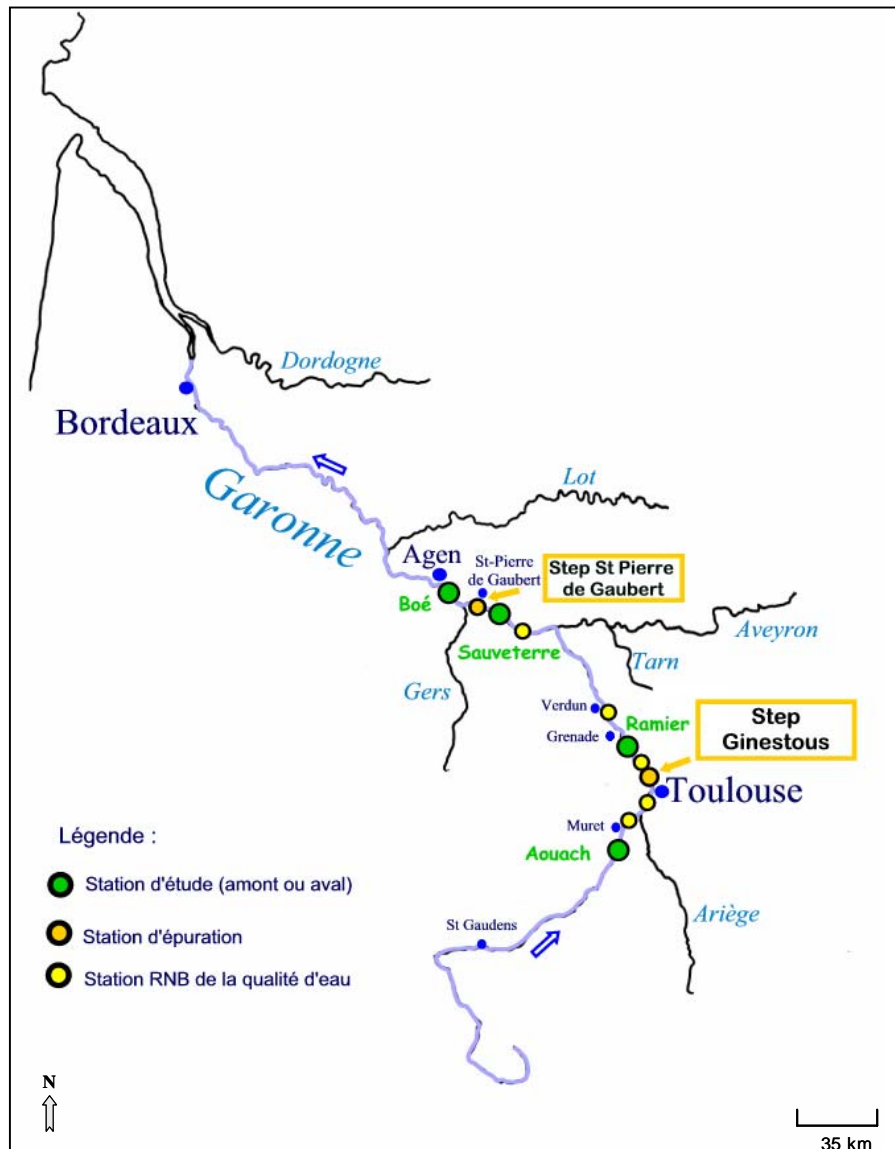


Figure II-9 : Présentation des stations d'étude, groupées pour chaque site en station amont et station aval

Site de St Pierre de Gaubert



Station Sauveterre



Station Boé

Tableau II-IV : Principales caractéristiques des stations d'étude sur la Garonne

Nom de la station	Critères de choix	Description de la station	Numéro d'ordre de la rivière	Distance à la station de référence (km)
Aouach (Dpt ¹ : Haute-Garonne)	Amont de l'agglomération de Toulouse, Station de référence	Station peu enrichie en nutriments, substrat : galets, cailloux	6	/
Ramier (Dpt : Haute-Garonne)	Influence de l'agglomération toulousaine et de la station d'épuration de Ginestous	substrat : radiers de galets, cailloux	7	46
Sauveterre (Dpt : Lot-et-Garonne)	Amont de la station d'épuration de St Pierre de Gaubert et de la confluence du Gers	substrat : radiers de galets, cailloux	7	133
Boé (Dpt : Lot-et-Garonne)	Influence de la station d'épuration de St Pierre de Gaubert et de la confluence du Gers	mouille	7	143

Le tableau suivant (Tableau II-Va,b) indique les principales caractéristiques des stations d'épuration encadrées par nos stations d'étude.

¹ Dpt : département.

Tableau II-V : Caractéristiques des stations d'épuration encadrées

Station d'épuration : Toulouse-Ginestous	Station d'épuration : Saint-Pierre de Gaubert
Capacité nominale : 550000 EH ¹	Capacité nominale : 40000 EH
Caractéristiques de la station : deux unités de traitement à rejet commun : File 1 : commune de Toulouse (400000 EH), boues activées - moyenne charge File 2 : communes de Balma, Ramonville, Quint-Fonsegrives, Saint-Orens, l'Union et en partie Colomiers et Tournefeuille (150000 EH), boues activées - forte charge avec un traitement d'affinage sur biofiltres	Communes raccordées : Castelculier, Bon Encontre, Boé Filières de traitement : boues activées - aération prolongée
Point de rejet : en aval du pont de Blagnac	Point de rejet : au pont de la voie ferrée au niveau de Saint-Pierre de Gaubert
Débit moyen journalier : 100000 m ³ .j ⁻¹ Contribution au débit de la rivière (sur la période étudiée) : entre 0,55 et 2,56%	Débit moyen journalier : 6040 m ³ .j ⁻¹ Contribution au débit de la rivière (sur la période étudiée) : entre 0,02 et 0,05%
Bilan 2003-2004 (avant travaux d'extension de la station) : pollution traitée : 520000 EH, rendements épuratoires : N _K : 38%, N _T : 31%, P _T : 47% (données fournies par l'Agence de l'Eau Adour-Garonne)	Bilan 2003-2004 : pollution traitée : 16000 EH, rendements épuratoires : N _K : 88%, N _T : 83%, P _T : 68% (données fournies par l'Agence de l'Eau Adour-Garonne)
a) Site de Toulouse	b) Site de St Pierre de Gaubert

b) Régime hydrologique

Le régime hydrologique de la Garonne est de type pluvio-nival². Les débits de la Garonne moyenne sont caractérisés par de hautes eaux au printemps et en hiver, dues respectivement aux écoulements des Pyrénées et du Massif central (Comité de Bassin Adour Garonne, 1997). En outre, la Garonne présente en général deux périodes d'étiage : un étiage hivernal et un étiage estival pouvant être marqué par des crues violentes et soudaines.

La Garonne est considérée comme un torrent de sa source jusqu'à Toulouse, mais conserve une forte pente également en plaine. Le régime irrégulier de la Garonne, assujéti à la fonte des neiges ainsi qu'aux pluies océaniques, en fait un cours d'eau aux crues fréquentes et importantes.

Le débit moyen inter-annuel du fleuve est d'environ 200 m³.s⁻¹ à la station de Portet-sur-Garonne, située juste en amont de l'agglomération toulousaine. Lors des étiages, il peut descendre à 40 m³.s⁻¹. En crue, le

¹ Equivalent-habitant : quantité de matières polluantes que l'on considère être produite journallement par personne (90 g MES, 57 g MO, 15 g MA (N_K), 4 g MP (P_T)) (Comité de Bassin Adour Garonne, 1997)

² Prédominance des pluies avec une influence marquée de la fonte des neiges.

débit moyen journalier est de 2000 m³.s⁻¹, mais de façon exceptionnelle des pics de 3000 à 4000 m³.s⁻¹ ont été atteints (Comité de Bassin Adour Garonne, 1996 ; SIEE, 1998).

c) Suivi de la qualité des eaux

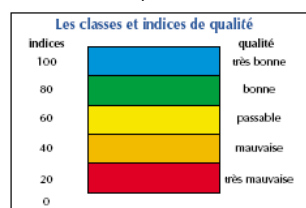
Les données relatives au SEQ-Eau¹, en amont et en aval de l'agglomération de Toulouse, sont présentées dans le tableau II-VI et les concentrations en éléments N et P sont résumées dans le tableau II-VII (année 2004). On observe globalement une dégradation de la qualité des eaux en aval de Toulouse, tant au niveau des paramètres azotés que phosphorés. Cette dégradation est due en partie à l'agglomération de Toulouse (augmentation des concentrations en NO₃⁻ et NH₄⁺ dès l'entrée dans Toulouse due aux différentes activités industrielles présentes au sein de l'agglomération) et aux rejets de la station d'épuration de Toulouse-Ginestous².

Tableau II-VI : Classification de la qualité de l'eau en amont et aval de Toulouse selon la grille du SEQ-Eau, les distances sont calculées par rapport à Toulouse (source : www.eau-adour-garonne.fr)

	- 19 km	0 km	+ 21 km	+ 35 km
PHOS	Vert	Vert	Vert	Vert
AZOT	Vert	Vert	Jaune	Jaune
NITR	Vert	Vert	Vert	Jaune

¹ Rappel de la signification des Altérations (Agence de l'eau Adour Garonne, 2000a).

Code	Altération	Paramètres
PHOS	Matières phosphorées	PO ₄ ³⁻ , P _T
AZOT	Matières azotées hors nitrates	NO ₂ ⁻ , NH ₄ ⁺ , N _K
NITR	Nitrates	NO ₃ ⁻



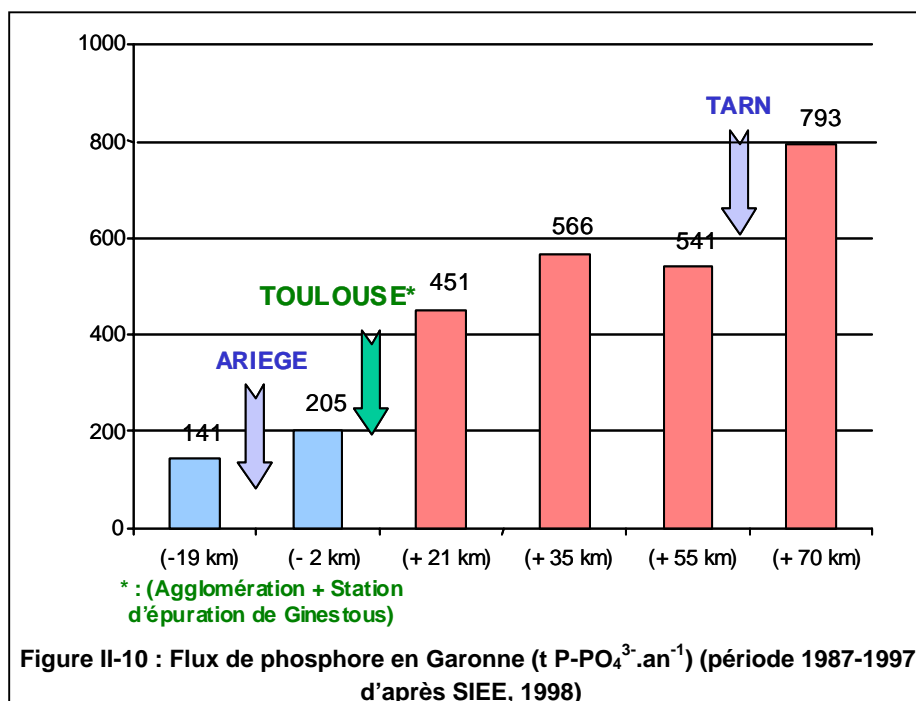
² Pour une revue des rejets de phosphore présentes sur le cours de la Garonne moyenne, de Toulouse à la retenue de Malausse, on peut se reporter à l'étude sur l'eutrophisation de la Garonne initiée par l'Agence de l'eau en 1998 et 2000 (SIEE, 1998 ; 2000a ; 2000b ; 2000c).

Tableau II-VII : Caractérisation chimique de l'eau en amont et aval de Toulouse, les distances sont calculées par rapport à Toulouse (données Agence de l'Eau, moyennes sur l'année 2004, à partir de 11 à 20 mesures réparties sur toute l'année de mesure).

Paramètre	Unité	- 19 km	0 km	+ 21 km	+ 35 km
pH		8,2	8,2	8,2	8,0
Conductivité à 25°C	µS.cm ⁻¹	254	256	271	292
PO ₄ ³⁻	mg P-PO ₄ ³⁻ .L ⁻¹	0,02	0,02	0,06	0,07
P _T	mg P.L ⁻¹	0,15	0,06	0,11	0,09
NO ₃ ⁻	mg N-NO ₃ ⁻ .L ⁻¹	0,79	1,06	1,49	2,08
NO ₂ ⁻	mg N-NO ₂ ⁻ .L ⁻¹	0,02	0,02	0,05	0,07
NH ₄ ⁺	mg N-NH ₄ ⁺ .L ⁻¹	0,09	0,12	0,22	0,16


TOULOUSE **Rejet STEP**
Toulouse-Ginestous

D'un point de vue général, les principales sources d'éléments nutritifs pour le milieu récepteur sont le réseau hydrographique, les rejets des collectivités riveraines et des industries, les pollutions diffuses dues à l'occupation des sols. L'évolution des flux moyens annuels de PO₄³⁻ transitant en Garonne, en amont et en aval de l'agglomération de Toulouse (Figure II-10) montre ainsi l'impact d'un affluent, le Tarn et l'impact de l'agglomération toulousaine dont une part importante est due aux rejets de la station d'épuration (flux dû au rejet de la station d'épuration de Toulouse-Ginestous estimé à 200 t P-PO₄³⁻.an⁻¹). En amont de Toulouse, l'Ariège (classée en bonne qualité sur les altérations "PHOS", "AZOT" et "NITR" avant sa confluence avec la Garonne) représente un apport en Garonne de 64 t P-PO₄³⁻.an⁻¹.



Le projet "Ginestous 2000" (mise en place prévue fin 2004), comportant la mise en œuvre de deux nouvelles unités de traitement, vise d'une part à augmenter les capacités de la station jusqu'à 825000 EH (616000 EH en MO et 825000 EH en pointe en MA réduit) et d'autre part, à améliorer le traitement de l'azote et du phosphore (Mairie de Toulouse, 2003).

Au niveau de l'azote, il s'agit d'un traitement biologique de l'azote réduit par biofiltration : biomasse fixée sur un matériau de type polystyrène (BIOSTYR[®]) (N_K : rejet actuel : 3,4 t.j⁻¹, rejet futur : 0,8 t.j⁻¹) (Générale des Eaux, 2003a).

En ce qui concerne le phosphore, l'extension de la station permettra un meilleur abattement par déphosphatation biologique (P_T : rejet actuel : 0,65 t.j⁻¹, rejet futur : 0,5 t.j⁻¹). Un module de déphosphatation physico-chimique par précipitation par chlorure ferrique est prévu mais ne sera mis en œuvre que si nécessaire suite aux obligations réglementaires. Dans ce cas, le rejet prévu est de 0,2 t.j⁻¹ (Générale des Eaux, 2003a).

Pour un aperçu plus large du bassin de la Garonne et des rejets qui y parviennent, on peut se référer aux deux cartes qui suivent (Figures II-10 et II-11, tirées du Cahier Géographique-Garonne¹ (Comité de Bassin Adour Garonne, 1996)).

¹ Ce document contient d'importantes informations relatives à la gestion des milieux aquatiques sur le bassin de la Garonne, à la gestion qualitative et quantitative de la ressource en eau ainsi qu'aux pollutions domestiques et industrielles recensées.

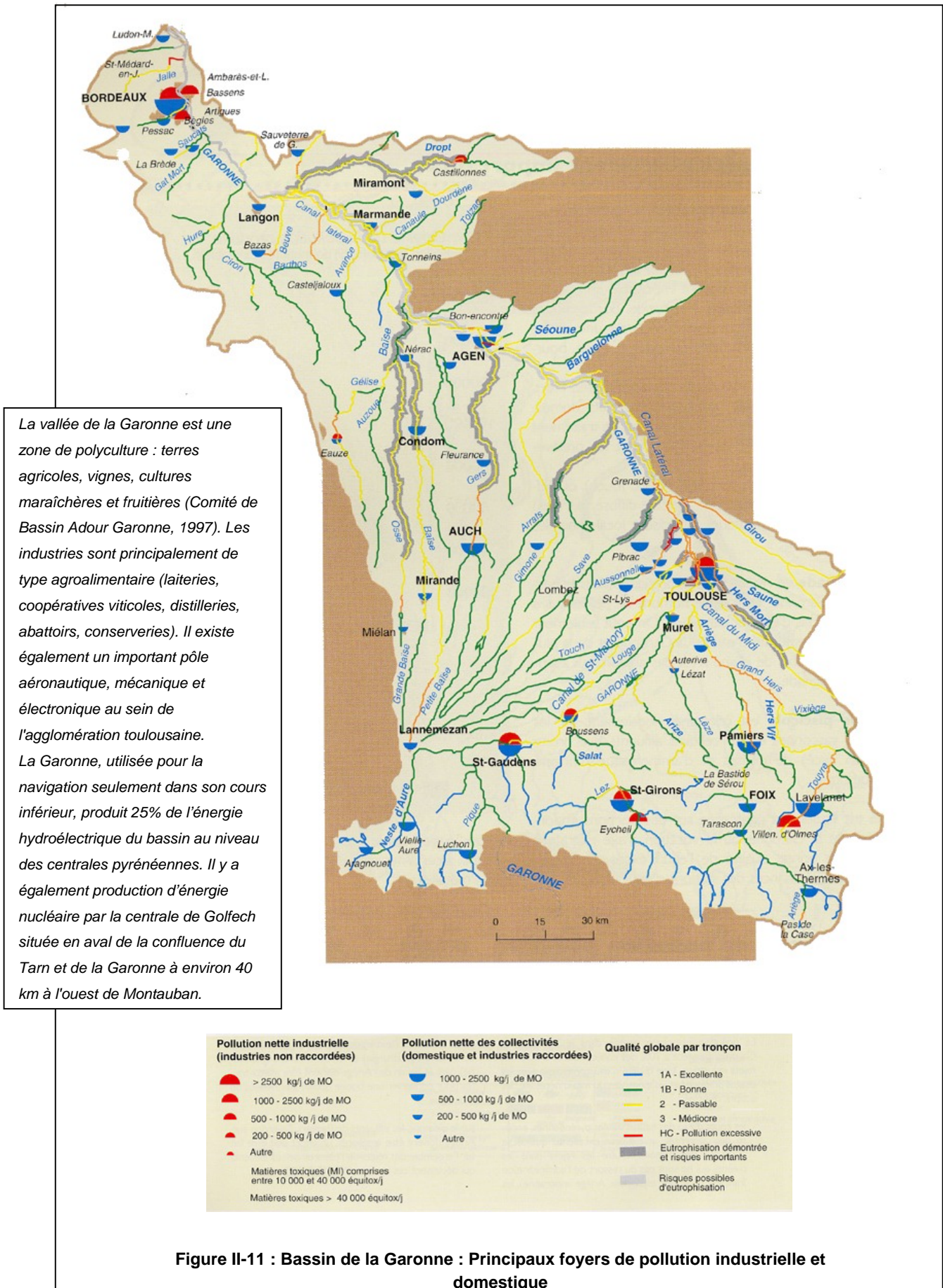
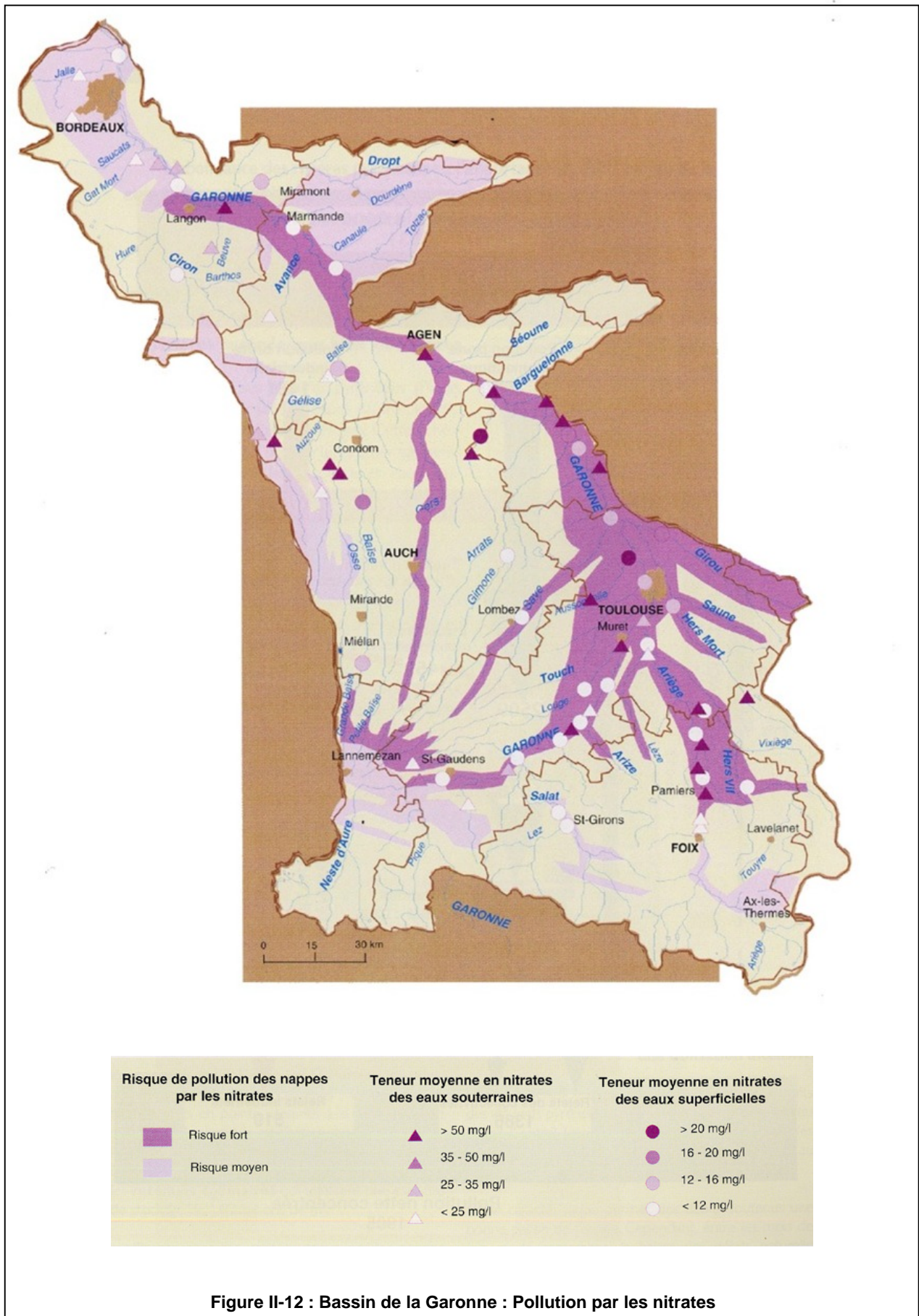


Figure II-11 : Bassin de la Garonne : Principaux foyers de pollution industrielle et domestique



II. 2.1.2. Autres sites d'expérimentation

Trois autres sites d'expérimentation ont été choisis en vue d'implanter des supports artificiels dans des rivières à statut trophique différencié mais à hydrodynamique plus atténuée qu'en Garonne. L'idée était d'établir un gradient de réponse des biofilms. Nous avons sélectionné les cours d'eau selon la nature des rejets qui y parviennent et en fonction du gradient d'enrichissement en nutriments qui existe entre les stations amont/aval de chaque site d'étude : pollution industrielle phosphorée faible au sein du Nasseys, rejets de station d'épuration dans l'Eau Bourde (pollution moyenne) et rejets agricoles associés au rejet d'une station d'épuration (pollution forte) dans le cas de la Jalle d'Eysines. Les figures II-12 et II-13 permettent de localiser et de visualiser les différentes stations d'étude.

■ Sur le Nasseys (Figure II-12a), cours d'eau à substrat de type sableux, l'objectif est d'encadrer les rejets d'une usine de fabrication de charbon actif (CECA, filiale d'Elf Atochem) à l'œuvre depuis 1949. Le charbon actif est fabriqué par attaque de l'acide phosphorique sur le charbon de bois. Cette activité entraîne un rejet de phosphore et de matière organique, avec comme conséquence potentielle, un impact sur la qualité des eaux du Nasseys et du lac de Parentis-Biscarosse dont il est le principal tributaire. Depuis 1987, l'usine s'est équipée d'une station d'épuration avec processus de déphosphatation (Brunel A., 2000) conduisant à une diminution des apports en phosphore dans l'eau. En effet, nous verrons que même si les teneurs en phosphates augmentent de l'amont vers l'aval de la rivière, elles restent relativement faibles.

■ Dans le cadre du travail sur la rivière de l'Eau Bourde (Figure II-13b), petit affluent de la Garonne situé dans le département de la Gironde, le but est d'encadrer le rejet de la station d'épuration de Mano, recueillant les rejets de l'agglomération de Cestas (≈ 17000 hab). Les données caractérisant le fonctionnement de cette station d'épuration sont présentées au tableau II-VIII.

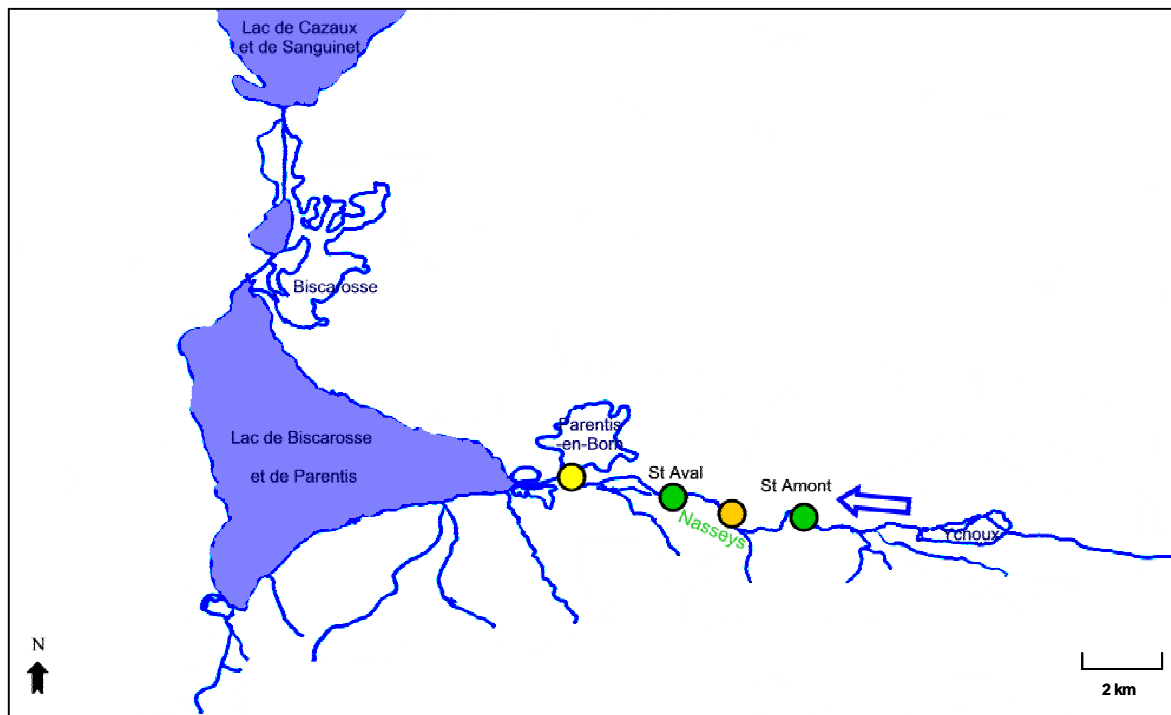
Tableau II-VIII : Caractérisation de la station d'épuration de Mano (source : Générale des Eaux, 2003b)

Station d'épuration : Mano
Capacité nominale : 21000 EH
Commune raccordée : Cestas Filières de traitement : boues activées - aération prolongée
Milieu récepteur : Eau Bourde
Débit moyen journalier : 2600 m ³ .j ⁻¹
Bilan sur 2002-2004 : pollution traitée : 18000 EH, rendements épuratoires : N _K : 78%, N _T : 65%, P _T : 79%
(données fournies par l'Agence de l'Eau Adour-Garonne)

■ En amont d'Eysines, la Jalle (Figure II-13b) affiche une bonne qualité vis-à-vis des matières organiques et oxydables et du phosphore, grâce à l'assainissement de Saint-Médard-en-Jalles. Le cours d'eau reste néanmoins de qualité passable par rapport à l'azote. En outre, les eaux de la Jalle sont de mauvaise qualité vis-à-vis des métaux (zinc et nickel), dus aux nombreux sites industriels présents sur son bassin versant malgré le traitement de la pollution métallique. La qualité du cours d'eau se détériore encore à l'aval des stations d'épuration d'Eysines et Blanquefort (Agence de l'eau Adour Garonne, 2000b). Sur notre tronçon d'étude (Jalle d'Eysines), le rejet de la station d'épuration de Cantinolle (Tableau II-IX) se déverse quelques centaines de mètres après notre station amont. De plus, la partie plus aval du tronçon est soumise à l'influence d'une zone de maraîchage.

Tableau II-IX : Caractérisation de la station d'épuration de Cantinolle (source : Communauté Urbaine de Bordeaux, 2005)

Station d'épuration : Cantinolle
Capacité nominale : 50000 EH
Communes raccordées : St. Aubin du Médoc, Le Haillan, St. Médard-en-Jalles et en partie de Mérignac et Eysines Filières de traitement : boues activées - moyenne charge, aération prolongée
Milieu récepteur : Jalle d'Eysines
Débit moyen journalier : $10000 \text{ m}^3 \cdot \text{j}^{-1}$
Bilan sur 2002-2004 : pollution traitée : 52000 EH, rendements épuratoires : N_K : 25%, N_T : 22%, P_T : 40%
(données fournies par l'Agence de l'Eau Adour-Garonne)



a) Nasseys

Légende :

- Station d'étude (amont ou aval)
- Station d'épuration
- Station RNB de la qualité d'eau

b) Jalle d'Eysines et Eau Bourde

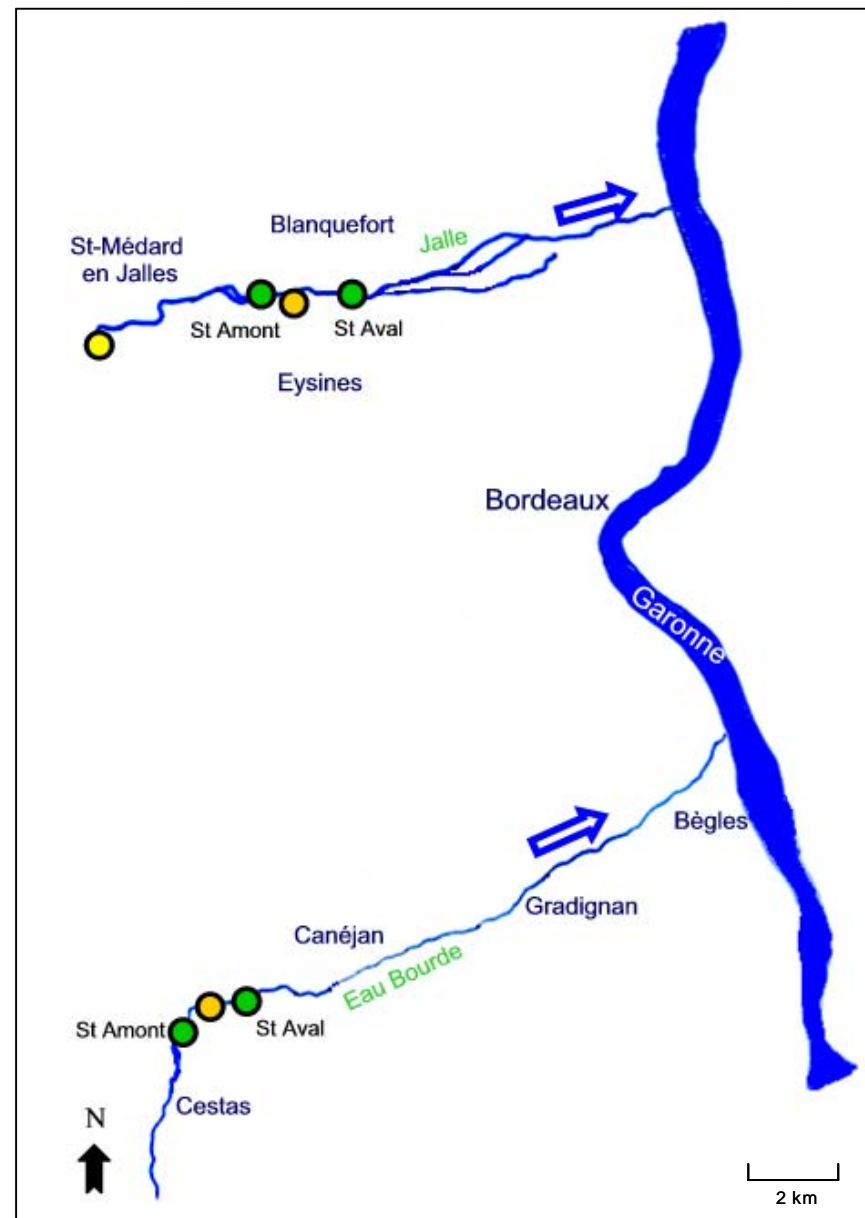


Figure II-13 : Localisation des stations d'étude amont/aval sur les trois cours d'eau de la région aquitaine étudiés (Nasseys (a), Eau Bourde et Jalle d'Eysines (b))

Nasseys



Station amont



Station aval

Eau Bourde



Station amont



Station aval

Jalle d'Eysines



Station amont



Station aval

Figure II-14 : Clichés des stations amont/aval sur les trois cours d'eau de la région aquitaine étudiés

II. 2.2. Caractéristiques des expérimentations

Le choix du support colonisable s'est porté sur les supports artificiels en raison des éléments suivants :

- meilleure accessibilité malgré des variations des hauteurs d'eau ;
- homogénéisation de la pénétration lumineuse même en cas de variation des niveaux d'eau ;
- meilleur repérage ;
- homogénéisation des supports entre les différentes stations (maîtrise d'un facteur de biais) ;
- possibilité de rapporter la production de biofilm à une unité de surface et de temps de colonisation.

Les substrats artificiels utilisés sont constitués d'une feuille de plastique striée et quadrillée de manière à faciliter l'échantillonnage (surface 16×21cm). Ils sont maintenus de manière verticale par un lest à 30 cm de la surface afin d'assurer une homogénéité au niveau de l'éclairement.

Assurer une immersion permanente des supports de colonisation afin d'éviter les à-secs, était une condition incontournable de l'expérience, condition rendue difficile par l'hydrologie propre de la Garonne. A l'Aouach, le support est suspendu par un poids au bac qui effectue la traversée de la rivière ; c'est la flottaison du bac qui assure une profondeur d'immersion constante du support. A Sauveterre et Ramier, le support est maintenu sous l'eau par un poids qui ne touche pas le fond du cours d'eau et c'est la mise en place d'une bouée qui assure l'immersion à une profondeur maîtrisée. A Boé, les supports sont fixés à un ponton. Dans les trois autres rivières, à débit plus faible, la fixation des supports dépendait de la configuration des berges : accrochage à des morceaux de bois ou des rochers immergés (Figure II-15).

La durée des expériences *in situ* est fixée à quatre semaines, afin d'obtenir des biofilms représentatifs des conditions des stations et n'ayant pas encore atteint leur stade de fonctionnement autonome. A chaque station d'étude, après prélèvement des supports, nous effectuons des mesures de physico-chimie (pH, conductivité et teneur en oxygène dissous), d'éclairement au niveau du support et de vitesse du courant. En effet, pour pouvoir comparer les résultats de colonisation du biofilm entre les stations amont et aval de chaque site, les supports doivent être immergés dans des conditions d'hydrodynamique similaires.

dispositif avant immersion



fixation avec bouée



fixation à un bac



fixation à un morceau de bois immergé

Figure II-15 : Vues des différents systèmes d'accrochage utilisés pour la mise en place des supports de colonisation du biofilm

II. 3 • TRAITEMENT DES ECHANTILLONS

II. 3.1. Analyses physico-chimiques

Sur le terrain, les prélèvements d'eau pour analyse sont effectués dans des flacons en polypropylène à usage unique de 1 L. Lors des expériences en laboratoire, les prélèvements sont réalisés dans des flacons plastique à usage unique de 100 mL. Les échantillons sont placés en glacière et conservés à 4°C jusqu'à l'analyse. Si un délai est nécessaire pour l'analyse (temps maximum de 2 jours), les échantillons sont acidifiés par ajout d'acide sulfurique (1/2) puis remis à pH initial avant analyse.

- Les mesures de pH, conductivité et température sont effectuées à l'aide d'un pH-mètre WTW type pH 340 et d'un conductimètre WTW type LF 340 avec sonde de température intégrée. Les mesures d'oxygène dissous sont réalisées avec un oxymètre WTW type Oxy 323. Les mesures de vitesse de courant sont réalisées avec un courantomètre de modèle Flo Mate 2000 (Marsh Mc Birney). Nous utilisons un quantamètre (LI-COR) à capteur de lumière différent pour les mesures d'éclairement sur le terrain et en canaux expérimentaux : sonde sphérique LI-193SA pour les mesures sous l'eau sur le terrain et capteur LI-190SA quantum sensor au laboratoire pour les mesures à l'air.
- Les méthodes de dosages employées au laboratoire de chimie sont les suivantes :
 - NO_3^- , NO_2^- : analyse en flux et détection spectrophotométrique NF EN ISO 13395, LD¹ : 0,07 et 0,002 mg N.L⁻¹ ;
 - NH_4^+ : analyse en flux et détection spectrométrique NF EN ISO 11732, LD : 0,004 mg N.L⁻¹ ;
 - PO_4^{3-} : méthode spectrométrique NF T 90-023 ;
 - P_T : minéralisation à l'acide perchlorique NF T 90-023 ;
 - N_K : minéralisation au sélénium NF EN 25663, LD : 0,2 mg N.L⁻¹ ;
 - Si : méthode colorimétrique NF T 90-007, LD : 0,05 mg SiO₂.L⁻¹ ;
 - MES : filtration selon NF T 90-105.

II. 3.2. Préparation des échantillons de biofilm

A chaque date d'échantillonnage, la première étape est la récupération du biofilm qui s'est développé sur les supports, que ce soit sur les lames en canaux expérimentaux ou sur les feuilles plastiques dans les expérimentations *in situ* (Figure II-16).

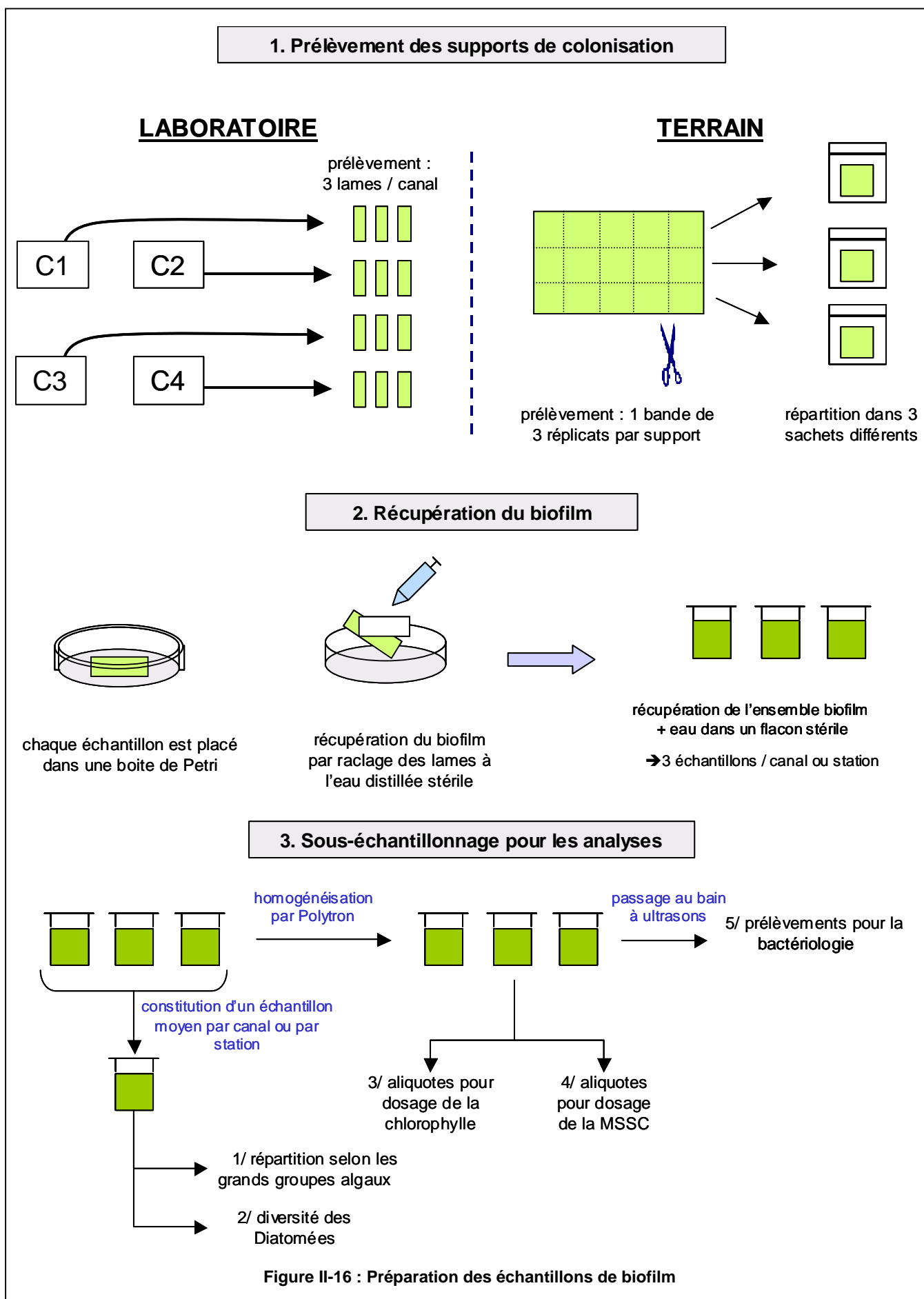
Après raclage des supports de colonisation à l'eau stérile, un échantillon moyen est constitué pour l'étude des compartiments algaux. Ensuite, chaque échantillon est traité séparément pour les autres analyses

¹ LD : limite de détection.

(MSSC, chlorophylle *a*, dénombrement et viabilité des bactéries) et est considéré comme un réplikat de l'échantillon de départ.

Ces échantillons individualisés sont passés au Polytron (PT 1600 E)¹ qui brise les floes et permet d'obtenir un mélange homogène (vitesse utilisée : 25000 t.min⁻¹ ; durée : 2 min). Des aliquotes sont prélevés pour les analyses de chlorophylle *a* et de MSSC. Ensuite, avant d'effectuer un prélèvement pour la bactériologie, les échantillons sont passés dans un bain à ultrasons (BRANSONIC 220, sans chauffage) durant 15 minutes. La durée de fonctionnement du Polytron et du bain à ultrasons ont été déterminées préalablement en vérifiant au microscope l'état des cellules algales et bactériennes après différents cycles d'homogénéisation.

¹ POLYTRON® PT 1600 E, marque Kinematica, sonde PT-DA 1612/2EC (∅ Stator : 12 mm, ∅ Rotor : 9 mm, Longueur : 154 mm).



II. 3.3. Analyses quantitatives de la biomasse

II. 3.3.1. Matière sèche sans cendre

Le dosage de la matière sèche sans cendre représente la quantité totale de matière organique contenue dans l'échantillon, ce qui inclut les micro-organismes vivants, qu'ils soient autotrophes ou hétérotrophes, les micro-organismes morts, les micro-invertébrés et les résidus détritiques (Biggs B.J.F. & Close M.E., 1989).

La quantité de matière organique contenue dans le biofilm est déterminée après filtration de l'échantillon sur filtre Whatman en fibre de verre de porosité 0,7 µm, préalablement rincé à l'eau distillée. Après séchage en étuve à 105°C, ce qui permet de déterminer la quantité de poids sec par unité de surface, le filtre est passé au four à 550°C pendant 1 heure. La perte de poids correspond à la fraction organique du biofilm (MV matières volatiles ou perte au feu).

Le teneur en matière sèche sans cendre en mg.cm⁻² est donnée par l'équation suivante :

$$MSSC = \left(\frac{P_E - P_F}{Vol\ filtré} \right) \times \frac{Vol\ total}{S}$$

avec

P_E : poids du filtre après séchage de l'échantillon à l'étuve (mg) ;

P_F : poids du filtre après calcination au four (mg) ;

Vol filtré : volume d'échantillon filtré (mL) ;

Vol total : volume total d'échantillon récupéré (mL) ;

S : surface de support grattée (cm²).

II. 3.3.2. Dosage de la chlorophylle a

Les communautés algales contiennent des associations diverses de pigments chlorophylliens selon les groupes taxonomiques. Cependant, c'est à travers le paramètre de la chlorophylle a, pigment majoritaire, qu'est appréhendée la composante algale du biofilm (Biggs B.J.F. & Kilroy C., 2000).

Nous avons suivi un protocole modifié de la norme AFNOR NFT 90-117 avec une extraction des pigments chlorophylliens par l'acétone et dosage des absorbances par spectrophotométrie. Cette méthode présente une sensibilité et une précision satisfaisantes pour le dosage de la chlorophylle a. Le principe du dosage est une filtration de l'échantillon sur membrane en fibre de verre GF/C, puis extraction de la chlorophylle par l'acétone à 90% et mesure de l'absorbance de l'extrait à 665 et 750 nm. Afin de tenir compte des

produits de dégradation de la chlorophylle (phéopigments), qui interfèrent dans le dosage par absorption aux mêmes longueurs d'onde que la chlorophylle *a*, on procède à deux mesures successives de l'absorbance de l'extrait en intercalant une acidification de l'échantillon (40 µL d'HCl 2N, [finale]≈2.10⁻² mol.L⁻¹). L'acidification permet de convertir l'ensemble de la chlorophylle de l'échantillon en phéopigments et d'appliquer ensuite les facteurs de correction.

Les calculs des concentrations en chlorophylle *a* sont réalisés d'après les équations de Lorenzen (1967).

La concentration en chlorophylle *a* en µg.cm⁻² est donnée par l'équation :

$$Chla = 26,7 \times [(A_0 665 - A_0 750) - (A_a 665 - A_a 750)] \times \frac{Vol\ acét.}{l \times S}$$

La concentration en indice phéopigments en µg.cm⁻² est donnée par l'équation :

$$Phéo = 26,7 \times [1,7 \times (A_a 665 - A_a 750) - (A_0 665 - A_0 750)] \times \frac{Vol\ acét.}{l \times S}$$

avec

A₀ 665, A₀ 750 : absorbances à 665 nm et 750 nm avant acidification ;

A_a 665, A_a 750 : absorbances à 665 nm et 750 nm après acidification ;

Vol acét. : volume de l'extrait acétonique (mL) ;

l : trajet optique de la cuve utilisée (cm) ;

S : surface de support gratté correspondante au volume filtré (cm²).

II. 3.3.3. **Compartiment bactérien**

Les bactéries présentes en milieu aquatique sont très variées, la composition de la flore bactérienne dépendant de nombreux facteurs tels que les charges organique et minérale, le pH, la température ou encore la turbidité (Champiat D. & Larpent J.P., 1988). Dans notre travail, nous nous sommes concentrés sur la caractérisation du peuplement bactérien dans son ensemble (mesures de biomasse). P. Monfort *et al.* (1995) précisent que l'utilisation des milieux de culture pour l'estimation de l'abondance bactérienne sous-estime celle-ci, soit parce que le milieu de culture peut ne pas être adapté à la croissance de certaines bactéries exigeantes, soit parce que la grande majorité des cellules bactériennes n'est pas cultivable. Ces dernières peuvent alors soit être viables, mais non cultivables, soit en dormance. Les techniques de microscopie en épifluorescence appliquées à l'écologie bactérienne permettent alors de quantifier directement l'ensemble des cellules contenues dans un échantillon.

Les numérations de bactéries viables et totales, sont réalisées après l'emploi du Kit LIVE/DEAD BacLight Viability L-13152, qui associe deux marqueurs fluorescents : le Syto 9, marqueur vert, et l'iodure de propidium (PI), marqueur rouge (Figure II-17).

L'association des deux fluorochromes permet d'évaluer l'intégrité membranaire des bactéries. Ils se fixent spécifiquement sur les molécules d'acides nucléiques. Le complexe ainsi formé, excité par la lumière UV, émet de la fluorescence. Le Syto9 colore indifféremment toutes les bactéries, quel que soit l'état de leur membrane. En revanche, le PI ne peut pénétrer que dans les bactéries dont la membrane est altérée. Ainsi, on peut différencier les bactéries à membrane altérée (coloration rouge) de celles à membrane intacte (coloration verte).

Après incubation de l'échantillon avec la solution de fluorochrome, les échantillons sont filtrés sur filtres noirs Millipore (porosité : 0,2 µm). Le mode de répartition des bactéries sur membrane le plus fréquemment rencontré est la répartition contagieuse sous forme d'agrégats. Le recours au bain à ultrasons permet alors d'améliorer la qualité des dénombrements (Delsart C., 1995). Pour l'observation sous microscope, le filtre est monté entre lame et lamelle avec deux gouttes d'huile BacLight (Figure II-16). Les dénombrements sont effectués à l'œil nu sous microscope à épifluorescence Olympus BX51TF.

Le nombre total de bactéries, en nombre de cellules.cm⁻², est donné par l'équation suivante :

$$N_{tot\ bact} = \frac{N \times surf\ membrane \times Vol\ total}{surf\ champ\ microscopique \times S} \times 10 \times Fd$$

avec

N : nombre moyen de bactéries par champ microscopique (sur 5 ou 10 champs observés) ;

Surf membrane : surface utile de filtration de la membrane (∅ utile de filtration : 22 mm) ;

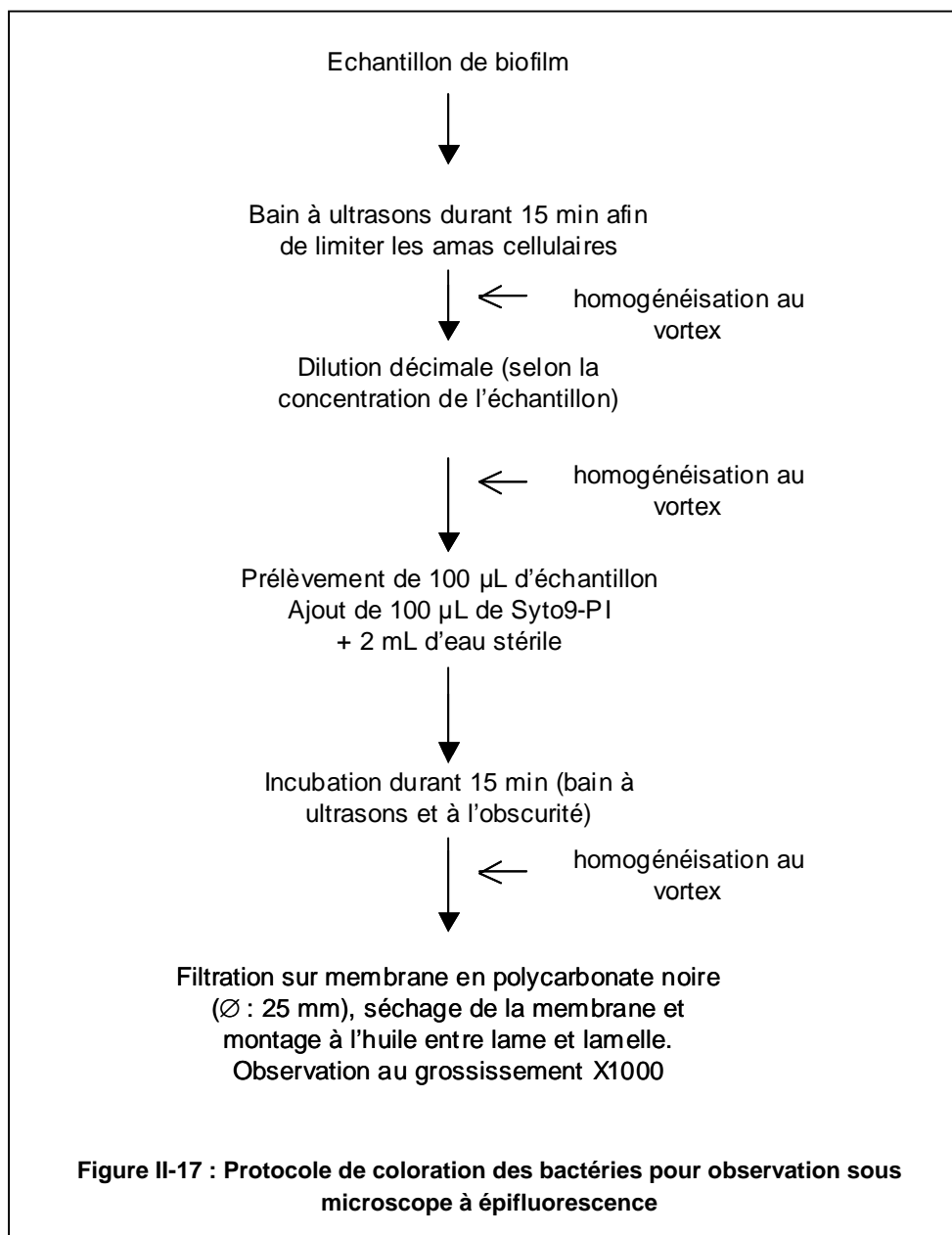
Surf champ microscopique : surface d'un champ microscopique (∅ : 0,18 mm) ;

Vol total : volume total d'échantillon récupéré (mL) ;

S : surface de support grattée (cm²) ;

Fd : facteur de dilution éventuellement appliqué lors du protocole ;

le facteur 10 est appliqué pour prendre en compte l'utilisation de 100 µL d'échantillon lors de la coloration et remonter ainsi à l'unité du mL.



II. 3.3.4. Communautés algales

Sur certaines expérimentations, conduites en laboratoire ou sur le terrain, et à certaines dates d'échantillonnage, nous avons procédé au comptage des différentes familles algales au sein du biofilm pour étudier la répartition algale selon trois groupes : Diatomées, Algues vertes, Cyanobactéries. Les dénombrements cellulaires sont réalisés au microscope inversé selon la méthode d'Uthermöhl (Uthermöhl H., 1958).

II. 3.4. Analyses qualitatives

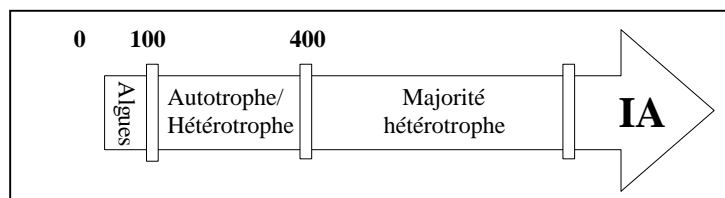
II. 3.4.1. Index Autotrophique

Les deux paramètres "Matières sèches sans cendre" et "Chlorophylle a" peuvent être combinés en un indice qualitatif qui donne une information complémentaire sur la structure des peuplements (Collins G.B. & Weber C.T., 1978) *in* (Biggs B.J.F., 2000), indépendamment des espèces qui composent le biofilm (Capblancq J. & Cassan M., 1979b). Cet indice (sans unité), nommé Index Autotrophique, donne une mesure de l'équilibre entre les composantes autotrophes algales et les composantes hétérotrophes du biofilm et est calculé ainsi :

$$IA = \frac{MSSC}{Chla}$$

avec les valeurs de MSSC et Chla exprimées dans la même unité de mesure.

Cet indice permet de retracer les changements survenus dans la composition des communautés du périphyton avec une répartition figurée par :



Les valeurs jusqu'à 100 indiquent une communauté dominée par les algues ; au dessus de 400, c'est une communauté dominée par les micro-organismes hétérotrophes et/ou les débris organiques (Biggs B.J.F. & Close M.E., 1989).

Précisons ici que, dans la suite du texte, malgré l'existence de bactéries autotrophes, nous associerons la notion de compartiment autotrophe à celle du compartiment algal.

II. 3.4.2. Communautés diatomiques

Dans le cas des communautés de Diatomées, en plus du comptage, nous avons réalisé des identifications à l'espèce en vue du calcul de l'Indice de Polluo-sensibilité Spécifique (IPS), mis au point au Cemagref en 1982 (Cemagref, 1982). En effet, les Diatomées, algues microscopiques unicellulaires colonisant tous les milieux aquatiques, reconnues pour leur capacité d'intégration des conditions environnementales, sont

particulièrement sensibles aux pollutions d'origine organique et à l'eutrophisation (Gaujous D., 1995 ; Angelier E., 2000). Ainsi, leur usage comme indicateur de la qualité des eaux est un complément au diagnostic des rivières. Les indices diatomiques sont intégrés depuis longtemps dans les méthodes d'évaluation de la qualité des eaux employées par les Agences de l'Eau. En revanche, si l'agence de l'Eau utilise l'IBD (Indice Biologique Diatomées), nous avons choisi d'utiliser l'IPS qui prend en compte toutes les espèces de l'inventaire.

Les comptages et les identifications des Diatomées sont réalisés après traitement chimique des échantillons par attaque à l'eau oxygénée puis centrifugation et observation microscopique des squelettes siliceux (comptage de 400 Diatomées par échantillon). L'IPS est dérivé de la formulation de Zelinka et Marvan établie en 1961 (Eulin A., 1997) :

$$IPS = \frac{\sum_{i=1}^n A_i S_i V_i}{\sum_{i=1}^n A_i V_i}$$

avec :

A_i : abondance relative de l'espèce i ;

V_i : valeur indicatrice de l'espèce i ($1 \leq V \leq 3$) ;

S_i : indice de polluo-sensibilité de l'espèce i ($1 \leq S \leq 5$).

L'indice varie de 1 à 20 suivant le degré de pollution de l'eau : 1 à 5 : pollution très forte, 5 à 9 : pollution forte, 9 à 13 : pollution moyenne, 13 à 17 : pollution modérée, 17 à 20 : pollution faible.

Outre l'IPS, nous avons utilisé la classification de Van Dam *et al.* (1994) portant sur les caractéristiques autoécologiques des Diatomées. Parmi les différents indicateurs proposés, nous nous sommes intéressés à la N-hétérotrophie, c'est-à-dire l'affinité des Diatomées envers l'azote organique, marqueur de pollution de l'eau. Cet indicateur permet de classer les Diatomées en quatre catégories correspondant à un degré de pollution de l'eau croissant :

- N-autotrophes sensibles à de faibles concentrations en Norg ;
- N-autotrophes tolérantes à de fortes concentrations en Norg ;
- N-hétérotrophes facultatives, qui nécessitent périodiquement des concentrations élevées en Norg ;
- N-hétérotrophes obligatoires, qui nécessitent en continu des concentrations élevées en Norg.

II. 4 • MODALITES DU TRAITEMENT STATISTIQUE DES DONNEES

Un certain nombre de travaux récents permettent de souligner la difficulté de travailler avec de vrais réplicats, c'est-à-dire indépendants les uns des autres (ce qui équivaldrait à utiliser un trop grand nombre de canaux) et proposent alors de considérer les prélèvements effectués au sein d'un même canal comme tels (Brunet C., 2000 ; Parent-Raoult C., 2004 ; Volatier L., 2004). La méthode, si elle ne répond pas de manière rigoureuse aux conditions d'application des tests statistiques, permet de comparer les données dans des conditions expérimentales (coût, temps, place,...) réalistes.

A chaque pas de temps, nous prélevons au hasard 3 lames par canal, ce qui constitue pour l'ensemble des 4 canaux un total de 12 échantillons sur lesquels les analyses seront conduites.

Les 3 lames prélevées par canal sont traitées séparément pour les analyses de MSSC, chlorophylle *a*, dénombrement et viabilité des bactéries et constituent ainsi des "réplicats".

En revanche, les dénombrements algaux et l'identification des espèces de Diatomées sont réalisés sur des échantillons moyens des 3 lames prélevées.

Les données seront représentées graphiquement en utilisant les méthodes de statistique descriptive simple, à l'aide des paramètres de dispersion suivants :

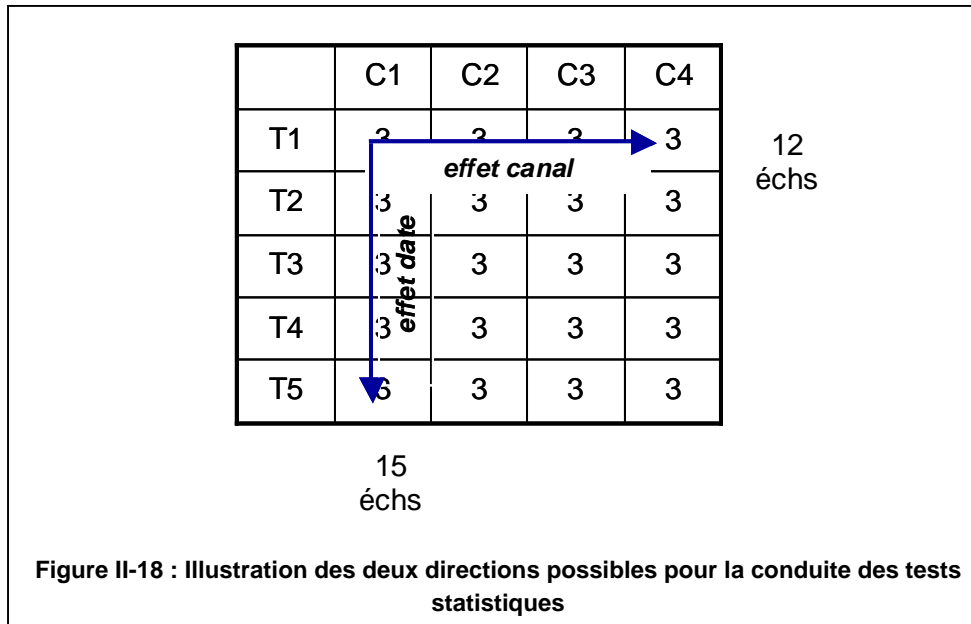
- moyenne des 3 réplicats ;
- écart-type (ou déviation standard) des 3 réplicats ;
- coefficient de variation (CV : rapport de l'écart-type à la moyenne en pourcentage).

Parmi les différentes variables mesurées (quantitatives ou qualitatives), les tests statistiques s'appliquent aux suivantes :

- MSSC ;
- chlorophylle *a* ;
- nombre total de bactéries ;
- proportion de bactéries viables.

Nous avons choisi d'appliquer aux données les tests paramétriques, dont le modèle demande de vérifier deux contraintes : normalité des distributions et égalité des variances (Ramousse R. *et al.*). Nous avons deux voies possibles sur lesquelles conduire les comparaisons (Figure II-18) :

- soit étudier, pour chaque canal ou station, son évolution au cours du temps, c'est l'"effet date" ;
- soit comparer, à chaque date de prélèvement, les résultats obtenus sur tous les canaux ou stations, c'est l'"effet canal".



Dans le cadre de notre recherche, c'est la comparaison entre les différents traitements appliqués aux canaux ou stations qui nous intéresse. Nous nous sommes donc concentrés sur l'évaluation de l'effet canal.

Précisons les conditions de déroulement du test statistique.

Hypothèses :

Hypothèse nulle H0 : les séries appartiennent à la même population, il n'y a pas de différence significative entre les séries.

Hypothèse alternative H1 : les séries n'appartiennent pas à la même population, il y a une différence significative entre les séries.

Choix du test statistique approprié pour tester H0 :

Deux tests ont été retenus en fonction du nombre de canaux ou de stations comparés.

Lorsque l'on veut comparer les résultats obtenus entre quatre canaux, nous appliquons le test d'Anova à un facteur (analyse de variance) (Scherrer B., 1984). Ce test permet de conduire une analyse globale de plusieurs échantillons indépendants y compris lorsqu'ils sont de tailles différentes.

Pour comparer deux échantillons (deux canaux ou deux stations amont et aval d'un rejet), on utilise le test t de Student qui compare deux échantillons indépendants en séries non appariées.

Pour effectuer des comparaisons de proportions, dans le cadre de l'étude de la viabilité des bactéries, nous avons utilisé le test du Khi^2 .

Calcul du test et décision statistique :

Le calcul de la probabilité p correspond à la probabilité que l'hypothèse nulle soit vraie ou à la probabilité de se tromper en rejetant l'hypothèse nulle alors que celle-ci est vraie. Le seuil de signification α est choisi à 5%, soit une probabilité de $p=0,05$. Si $p<0,05$, on rejette l'hypothèse nulle (différence significative entre les échantillons).

Afin de déterminer précisément l'origine des différences entre canaux, dans le cas de la comparaison des quatre canaux, on effectue les comparaisons multiples avec le test de Student-Newman-Keuls lorsque le nombre d'observations est équivalent dans chaque groupe (Scherrer B., 1984). Lorsque la taille des échantillons n'est pas identique, les comparaisons multiples sont conduites avec le test de Dunn (Glantz S.A., 2002).

* *
* * *

**CHAPITRE III : RESULTATS - SECTION 1 :
EXPERIMENTATIONS EN
LABORATOIRE : PRODUCTION DE
BIOFILM EN CANAUX EXPERIMENTAUX
SOUS CONDITIONS VARIEES
D'ENRICHISSEMENT**

CHAPITRE III : RESULTATS - SECTION 1 :

EXPERIMENTATIONS EN LABORATOIRE : PRODUCTION DE BIOFILM EN CANAUX EXPERIMENTAUX SOUS CONDITIONS VARIEES D'ENRICHISSEMENT

La programmation de notre recherche inclut une phase d'expérimentation de laboratoire en conditions maîtrisées, très importante pour l'identification :

- *de l'éventuelle relation "enrichissement-croissance du biofilm" ;*
- *d'autres descripteurs, plus qualitatifs, pour témoigner de l'effet des niveaux de trophie sur la composition du biofilm.*

L'objectif de ce chapitre est :

- *tout d'abord, de valider, en conditions contrôlées du dispositif expérimental, la reproductibilité des résultats et de sélectionner les descripteurs pertinents pour quantifier et qualifier les effets du statut trophique sur la croissance et la composition des assemblages constitutifs des biofilms ;*
- *ensuite, de décrire les biofilms soumis aux enrichissements artificiels ;*
- *de décrire les biofilms produits avec des eaux naturelles ;*
- *et enfin, de discuter les résultats obtenus.*

III. 1 • VALIDATION DU DISPOSITIF EXPERIMENTAL

De nombreux dispositifs expérimentaux ont été proposés pour obtenir des biofilms dans des conditions plus ou moins maîtrisées (Volatier L., 2004). L'une des motivations à travailler en laboratoire est d'obtenir des résultats fiables et reproductibles, pour pouvoir valider statistiquement les observations effectuées.

Afin de valider le dispositif expérimental sur ce plan, notre première préoccupation a donc été de comparer le développement du biofilm au sein des quatre canaux en conditions expérimentales contrôlées et identiques : luminosité, vitesse du courant, température et teneurs en nutriments.

Comme nous l'avons décrit dans le chapitre précédent, ces expérimentations, dites de reproductibilité (notées ER), suivent deux protocoles : avec réserve commune de milieu (conditions les plus maîtrisées et *a priori* les plus reproductibles), puis avec alimentation séparée des canaux après la phase de

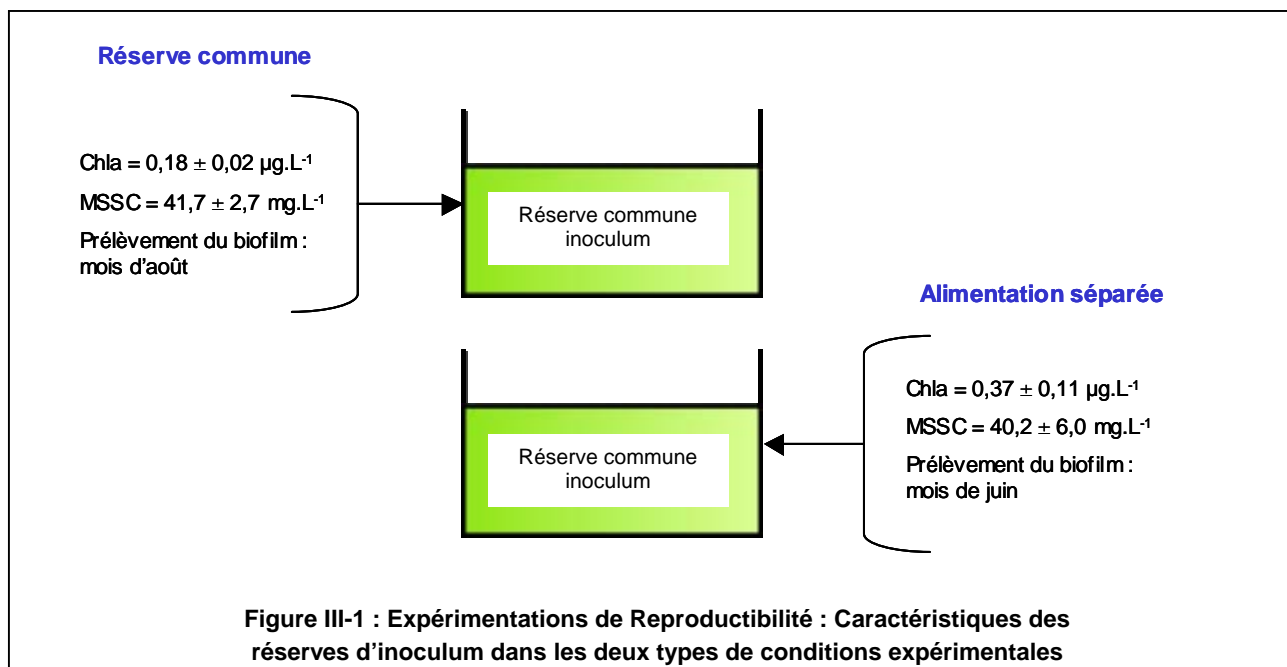
précolonisation (fonctionnement autonome de chaque canal). Rappelons que lors de la seconde expérience, le but est de se rapprocher des conditions ultérieures de mise en œuvre du dispositif expérimental, c'est-à-dire lorsque les quatre canaux sont déconnectés de la réserve commune après la phase d'ensemencement et sont reliés à une réserve individuelle de milieu, pour étude de l'influence du degré différent d'enrichissement du milieu sur les biofilms.

Dans ce point, nous avons choisi, pour chaque paramètre, de présenter les résultats issus des deux protocoles en vis-à-vis. De plus, sur les graphiques, quand nous parlons de "réserve commune", cela ne désigne pas la réserve de précolonisation commune à tous les canaux mais bien l'expérience de reproductibilité réalisée selon le premier protocole.

III. 1.1. Caractérisation physico-chimique de la réserve de biofilm et de l'eau des canaux

Phase de précolonisation :

La figure III-1 résume les principales caractéristiques des deux réserves d'inoculum¹ de biofilm en ce qui concerne les paramètres de chlorophylle a et MSSC.



¹ (réserve utilisée pour la phase de précolonisation des canaux)

Phase d'expérimentation :

En ce qui concerne le premier protocole, les valeurs des concentrations en nutriments de la réserve d'eau durant l'expérimentation ont été choisies en rapport avec les teneurs moyennes en NO_3^- et PO_4^{3-} mesurées en Garonne à l'aval de l'agglomération toulousaine (cf. Tableau II-VII). Lors du second protocole, nous avons conservé les mêmes concentrations en phosphates que dans l'expérience précédente, en revanche les teneurs en azote ont été divisées par deux afin d'imposer un rapport N/P équilibré avec des valeurs aux alentours de 16, conformes au rapport de Redfield (Tableau III-I).

Tableau III-I : Expérimentations de Reproductibilité : Valeurs nominales moyennes des teneurs en nutriments (mg.L^{-1}) (mesurées après chaque renouvellement bihebdomadaire d'eau et ajouts de nutriments)

	P-PO_4^{3-}	N-NO_3^-	N-NO_2^-	N-NH_4^+	N/P
Réserve Commune	0,089 ± 0,010	1,17 ± 0,12	0,021 ± 0,011	0,045 ± 0,020	31 ± 4
Alimentation Séparée					
Canal 1	0,093 ± 0,005	0,55 ± 0,12	0,004 ± 0,003	0,062 ± 0,026	15 ± 3
Canal 2	0,093 ± 0,007	0,55 ± 0,12	0,005 ± 0,004	0,071 ± 0,043	15 ± 3
Canal 3	0,096 ± 0,003	0,55 ± 0,12	0,005 ± 0,003	0,067 ± 0,015	15 ± 3
Canal 4	0,097 ± 0,001	0,56 ± 0,12	0,004 ± 0,003	0,057 ± 0,022	14 ± 3

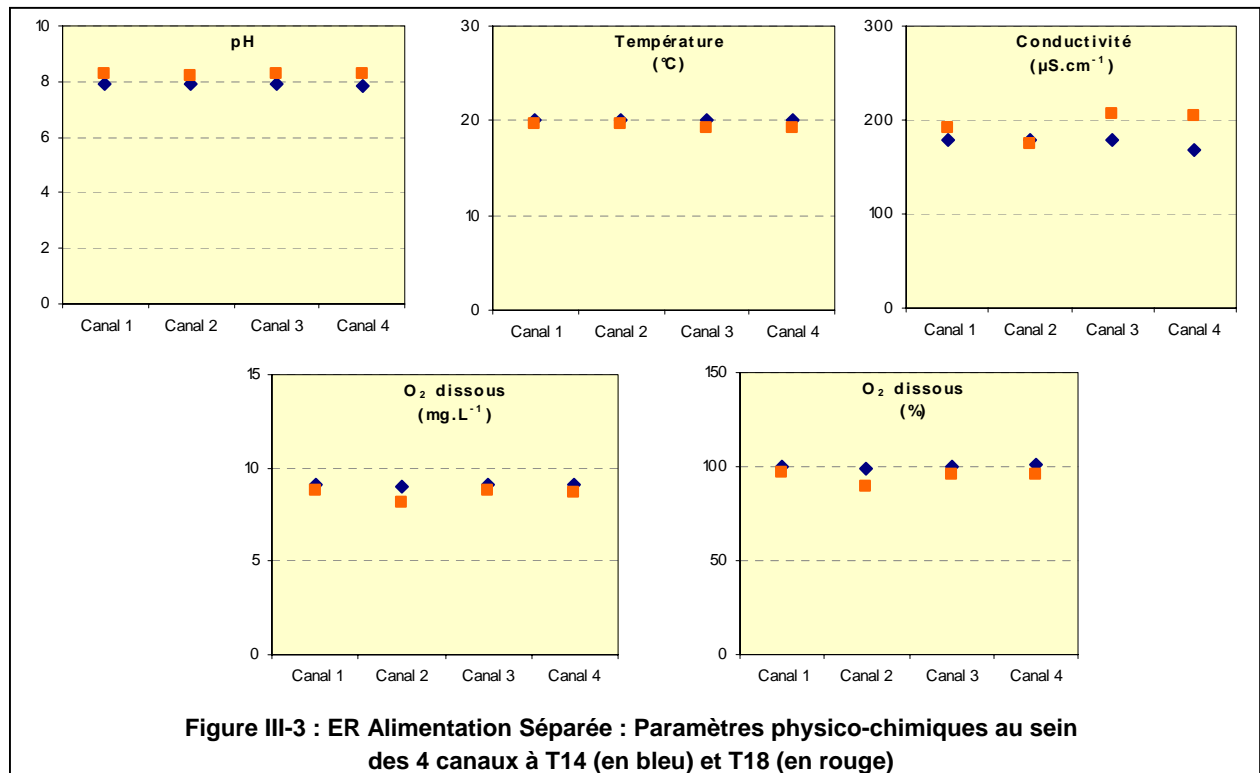
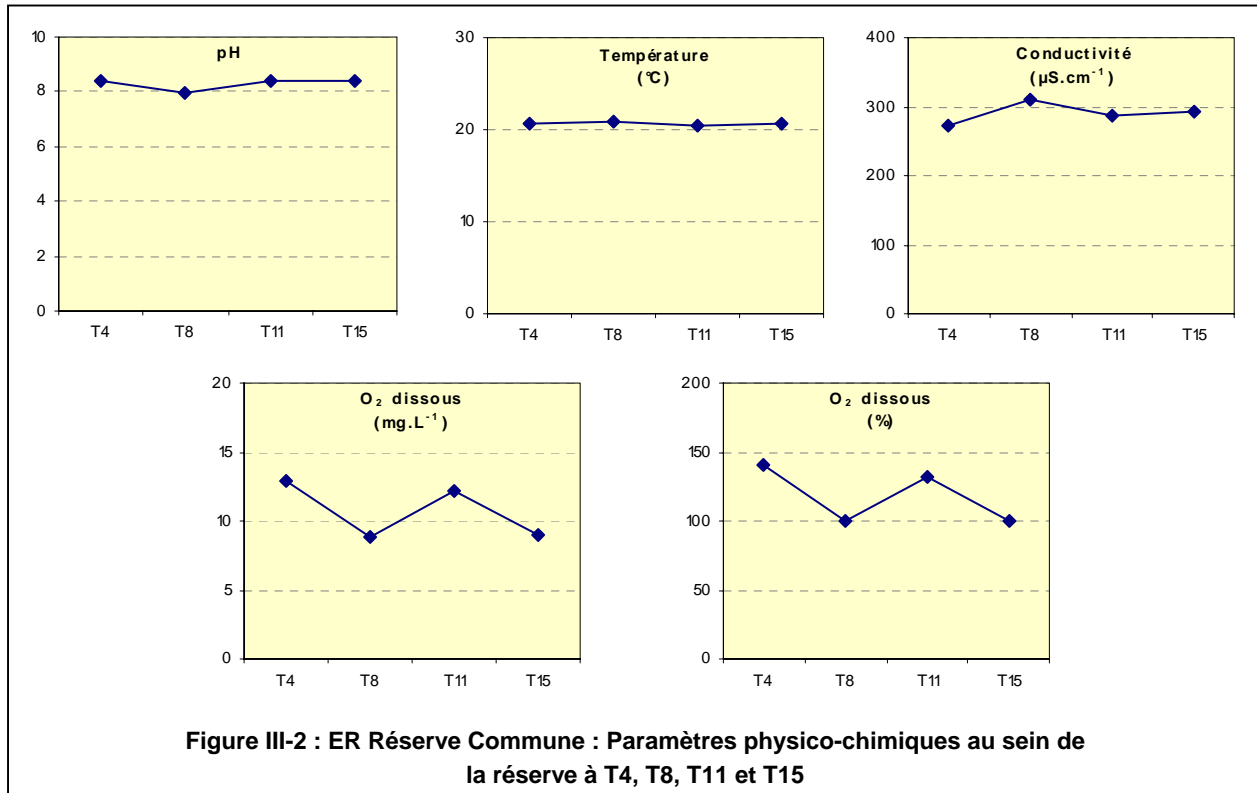
➤ **Mesures physico-chimiques :**

1er protocole (Figure III-2) :

La figure III-2 présente l'évolution des paramètres physico-chimiques mesurés au sein de la réserve à différents pas de temps de l'expérience (T4, T8, T11 et T15). Il n'y pas eu de mesure réalisée à T18. Ces différents graphiques montrent qu'il y a peu de variation sur les paramètres pH (CV=2,5%), température (CV=0,8%) et conductivité (CV=5,2%). Le paramètre de l'oxygène dissous présente des variations plus importantes (CV_[O₂ mg.L⁻¹]=19,5% et CV_[O₂ %]=18,2%). Il n'y pas de raison évidente à ces variations, d'autant que la température de l'eau ne varie pas de manière sensible au cours de l'expérience (en référence à la corrélation négative entre la température de l'eau et le taux de dissolution de l'oxygène). Une partie de cette variabilité peut être imputable à une question d'heure à laquelle nous avons effectué la mesure (relation rythme d'éclairement et activité photosynthétique des algues). Nous retiendrons seulement que lorsque les valeurs d'oxygène dissous sont plus faibles, elles indiquent néanmoins une très bonne aération du milieu (taux d'oxygénation autour de 99%).

2nd protocole (Figure III-3) :

La figure III-3 présente les mesures des paramètres physico-chimiques réalisées au sein des quatre réserves des canaux expérimentaux à T14 et T18. On observe que les valeurs sont bien homogènes, que ce soit entre les différents canaux ou en comparaison aux deux dates de mesures T14 et T18.



III. 1.2. Descripteurs quantitatifs de la croissance du biofilm

➤ **Matière sèche sans cendre** (Figure III-4)

Dans ces expériences, dites de reproductibilité, on attendait *a priori* une croissance similaire du biofilm au sein des différents canaux.

Lors du premier protocole, les valeurs observées de teneurs en matière sèche sans cendre, qui correspond à la fraction organique du biofilm, sont tout à fait comparables d'un canal à l'autre. On remarque tout de même qu'à la dernière date d'échantillonnage (T18), les valeurs du canal 1 commencent à diverger légèrement de celles observées sur l'ensemble des trois autres systèmes (MSSC (mg.cm^{-2}) : C1=0,57 ; C2=0,72 ; C3=0,67 ; C4=0,69). Toutefois, les résultats du test de l'analyse de variance¹ sur ce paramètre ne montrent aucune différence significative entre les moyennes des quatre canaux, quelle que soit la date d'échantillonnage.

Dans le cadre de la seconde expérience, l'évolution de la croissance du biofilm est également homogène au sein des quatre canaux sur le paramètre de la matière sèche sans cendre. La croissance est régulière mais assez faible (valeurs finales autour de 0,4 mg MSSC. cm^{-2}). On observe toutefois, à T14 et T18 des valeurs un peu plus faibles au sein du canal 3 (MSSC (mg.cm^{-2}) T14 : C3=0,17 ; Moy C1-C2-C4=0,25 ; T18 : C3=0,33 ; Moy C1-C2-C4=0,42). Cependant, pour chaque date d'échantillonnage, les moyennes ne sont pas significativement différentes, mais à T14 et T18 la valeur de p est proche de la limite de significativité ($p_{T14}=0,07$, $p_{T18}=0,07$ avec $\alpha=0,05$). Il semble donc qu'à partir de cette durée d'expérimentation, chaque canal puisse commencer à suivre un cheminement autonome pouvant altérer la reproductibilité des expérimentations, d'où l'adoption de cette limite de durée pour les expériences à venir.

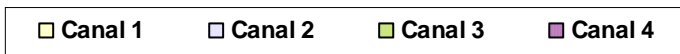
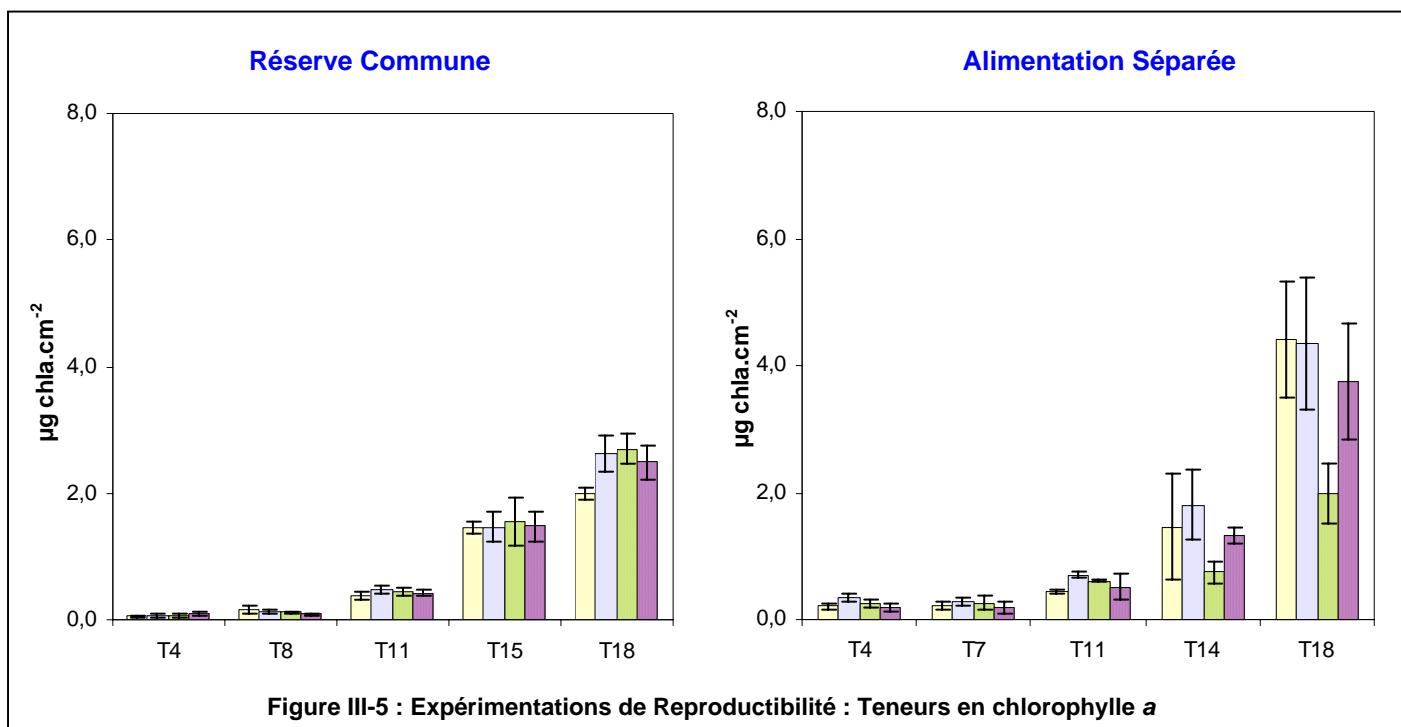
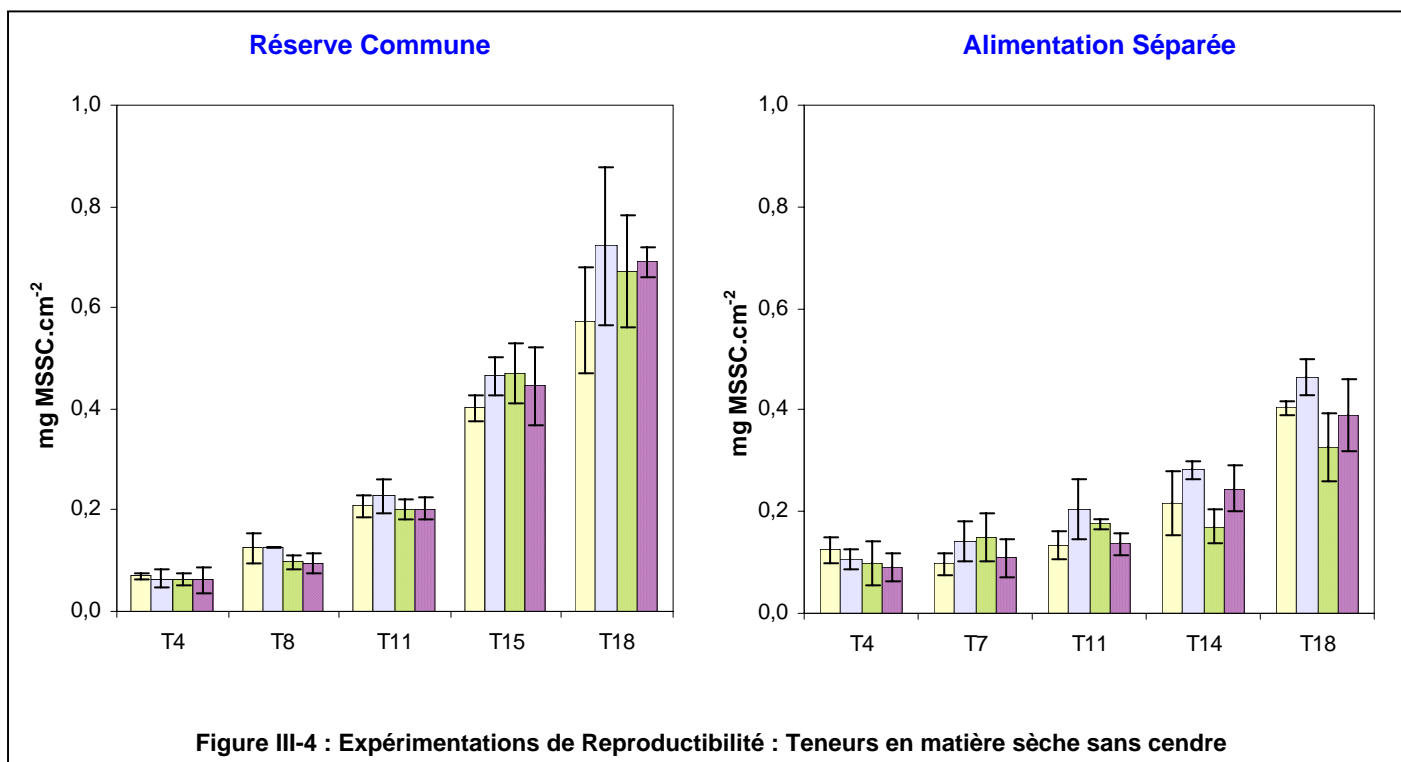
➤ **Chlorophylle a** (Figure III-5)

Dans l'expérience de reproductibilité avec réserve commune, les tendances observées sur le paramètre de la chlorophylle a sont identiques à celles de la MSSC, tant au niveau du développement homogène au sein des canaux que sur le détachement des valeurs du canal 1 à T18 (MSSC (mg.cm^{-2}) : C1=1,99 ; C2=2,62 ; C3=2,70 ; C4=2,48). A la différence des résultats de MSSC, les moyennes sont significativement différentes à T18 au seuil α de 5%, le canal 1 se différencie des canaux 2, 3 et 4 qui eux, restent dans le même groupe.

En ce qui concerne l'expérience de reproductibilité avec alimentation séparée, plus favorable à une divergence des canaux en fonction des caractéristiques de la biomasse endogène constituée, l'homogénéité de la réponse des canaux sur le paramètre chlorophylle a peut davantage être discutée. A T14 et T18, le canal 3 se différencie de l'ensemble des autres canaux (MSSC (mg.cm^{-2}) T18 : C3=1,98 ;

¹ L'ensemble des résultats des tests statistiques de comparaison des moyennes est présenté aux tableaux 3-II et 3-III.

Moy C1-C2-C4=4,17). Le test de comparaison des moyennes indique effectivement une différence significative à T18. A cette date, le canal 3, par des valeurs plus faibles, se dissocie des trois autres canaux qui restent groupés.



➤ **Nombre total de bactéries** (Figure III-6)

Globalement, les valeurs du paramètre "Nombre total de bactéries" ne semblent pas se différencier au sein des quatre canaux au cours des deux expériences de reproductibilité, sauf à la date T11 dans le cas de l'alimentation séparée. Toutefois, les résultats du test d'Anova indiquent plusieurs points de différence significative entre moyennes dont voici les plus marqués :

- ER Réserve Commune : les moyennes des 4 canaux sont significativement différentes de T8 à T18. Toutefois, lorsque l'on effectue les tests de comparaisons multiples, il n'apparaît pas de tendance nette entre les canaux (à T11 : C1≠ de C2, C3 et C4 ; à T15 : C2≠ de C1, C3 et C4 et à T18 : C4≠ de C2 et C3).
- ER Alimentation Séparée : à T4, le canal 1 se différencie des autres canaux par une teneur plus élevée en nombre total de bactéries. Le détachement du canal 4 que nous avons remarqué visuellement à T11 est effectif, le test indique qu'à cette date, C4 est différent de C1 et C3. En revanche, à T18, le nombre de bactéries total dénombré dans le canal 4 réaugmente et la moyenne est significativement différente de celles du canal 2 et du canal 3. Pour cette raison, on peut penser que les variabilité observée au sein du canal 4 serait plutôt due à un problème d'échantillonnage plutôt qu'à une réelle cause physiologique.

➤ **Proportion de bactéries viables** (Figure III-7)

En ce qui concerne la proportion en bactéries viables, les écarts-types sur les valeurs sont assez importants. Pour la première expérience, si l'on considère l'ensemble des canaux, on observe peu d'évolution de ce paramètre (Moy C1-C2-C3-C4≈30%), les valeurs des coefficients de variation sont entre 23 et 46% sur l'ensemble de l'expérience (Tableau III-II).

Dans la seconde expérience, on assiste à une tendance à l'augmentation des valeurs moyennes de proportion de bactéries viables (Moy C1-C2-C3-C4 de 36 à 83%) avec une dispersion assez stable (entre 20 et 32%) (Tableau III-III). Néanmoins, les données sont très dispersées ce qui rend difficile l'interprétation de ce paramètre et affaiblit l'hypothèse d'une augmentation du pourcentage de bactéries viables en fonction du temps.

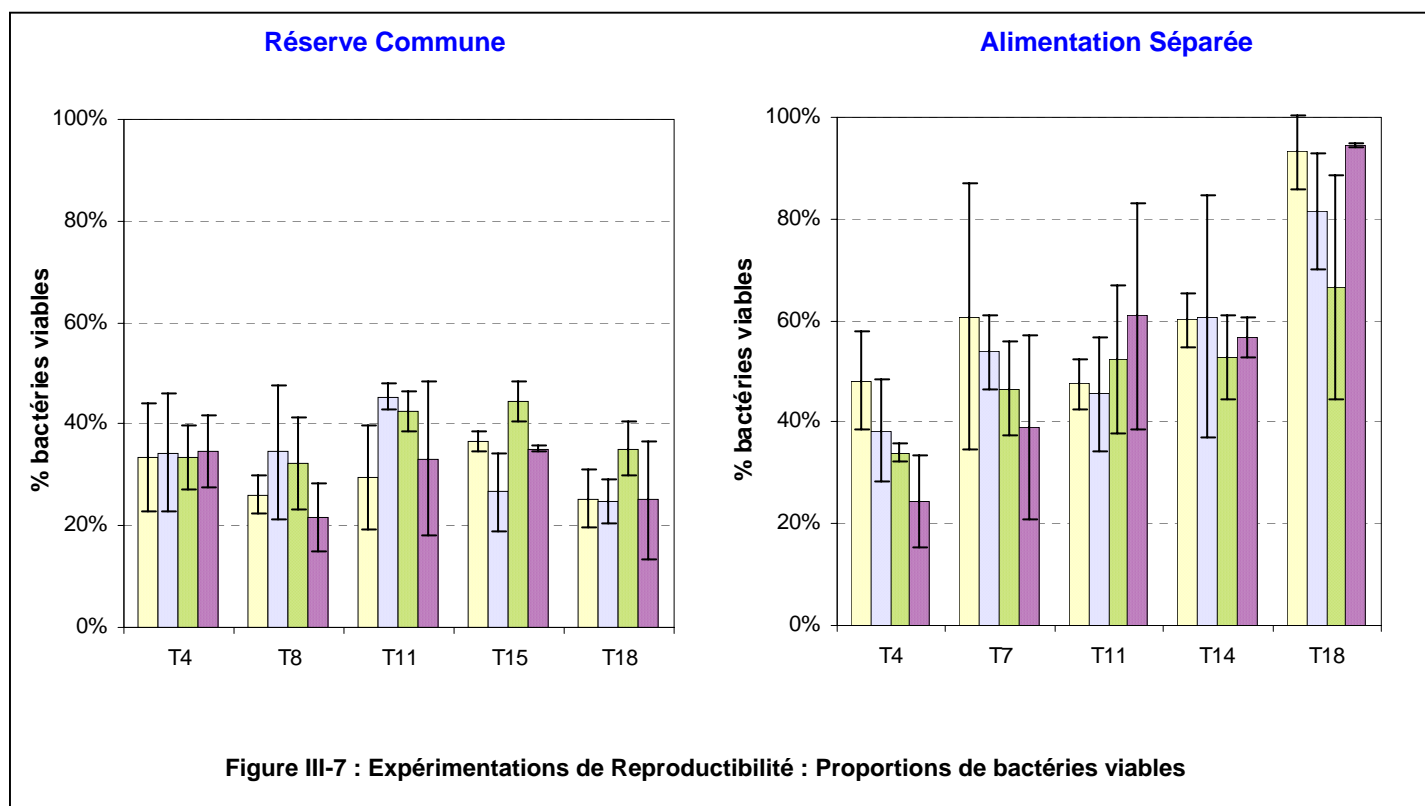
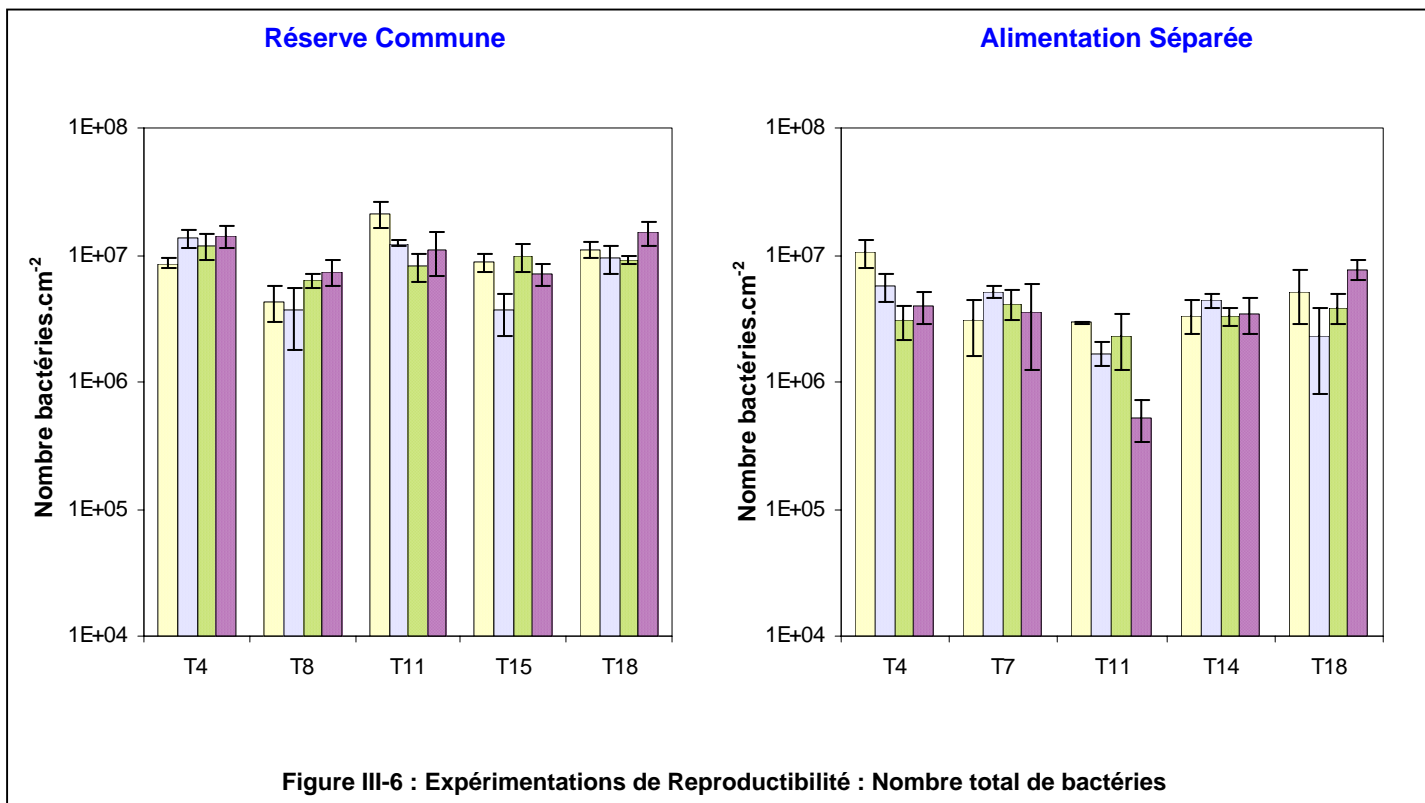


Tableau III-II : ER Réserve Commune : Valeurs moyennes sur les 4 canaux, écart-types, coefficients de variation et résultats des tests statistiques calculés sur les résultats de MSSC, Chla, Nombre total de bactéries et Proportion de bactéries viables

Date d'échantillonnage	MSSC				Chla				Nombre total de bactéries				Proportion de bactéries viables			
	Moy	EC	CV %	p	Moy	EC	CV %	p	Moy	EC	CV %	p	Moy	EC	CV %	p
T4	0,07	0,02	22,3	0,91 ns	0,07	0,026	38,9	0,46 ns	1,2E+07	3,0E+06	25,1	0,07 ns	0,35	0,08	23,2	0,60 ns
T8	0,11	0,02	20,1	0,15 ns	0,12	0,040	33,4	0,23 ns	5,4E+06	2,0E+06	37,6	0,049 *	0,30	0,11	36,3	0,03 *
T11	0,21	0,02	11,3	0,58 ns	0,43	0,067	15,8	0,20 ns	1,3E+07	6,0E+06	45,0	0,01 *	0,38	0,11	29,7	<0,001 *
T15	0,45	0,05	12,2	0,43 ns	1,49	0,222	14,9	0,98 ns	7,3E+06	2,8E+06	38,6	0,01 *	0,33	0,15	45,9	0,03 *
T18	0,67	0,11	16,5	0,43 ns	2,45	0,353	14,4	0,02 *	1,1E+07	3,0E+06	26,9	0,03 *	0,27	0,09	33,5	0,02 *

Tableau III-III : ER Alimentation Séparée : Valeurs moyennes sur les 4 canaux, écart-types, coefficients de variation et résultats des tests statistiques calculés sur les résultats de MSSC, Chla, Nombre total de bactéries et Proportion de bactéries viables

Date d'échantillonnage	MSSC				Chla				Nombre total de bactéries				Proportion de bactéries viables			
	Moy	EC	CV %	p	Moy	EC	CV %	p	Moy	EC	CV %	p	Moy	EC	CV %	p
T4	0,11	0,03	27,9	0,58 ns	0,25	0,083	33,4	0,06 ns	5,8E+06	3,3E+06	56,8	0,002 *	0,36	0,11	31,5	<0,001 *
T7	0,12	0,04	31,7	0,30 ns	0,24	0,084	35,1	0,49 ns	4,0E+06	1,5E+06	38,0	0,39 ns	0,50	0,17	33,8	0,009 *
T11	0,16	0,04	26,1	0,11 ns	0,57	0,143	25,2	0,11 ¹ ns	1,8E+06	1,0E+06	58,9	0,01 ¹ *	0,52	0,14	27,7	0,73 ns
T14	0,23	0,06	24,6	0,07 ns	1,33	0,599	45,0	0,17 ns	3,6E+06	8,5E+05	23,4	0,41 ns	0,58	0,12	20,1	0,61 ns
T18	0,40	0,07	17,0	0,07 ns	3,62	1,261	34,8	0,03 *	4,8E+06	2,5E+06	52,4	0,02 *	0,83	0,18	21,2	<0,001 *

(¹ : normalité non satisfaite)

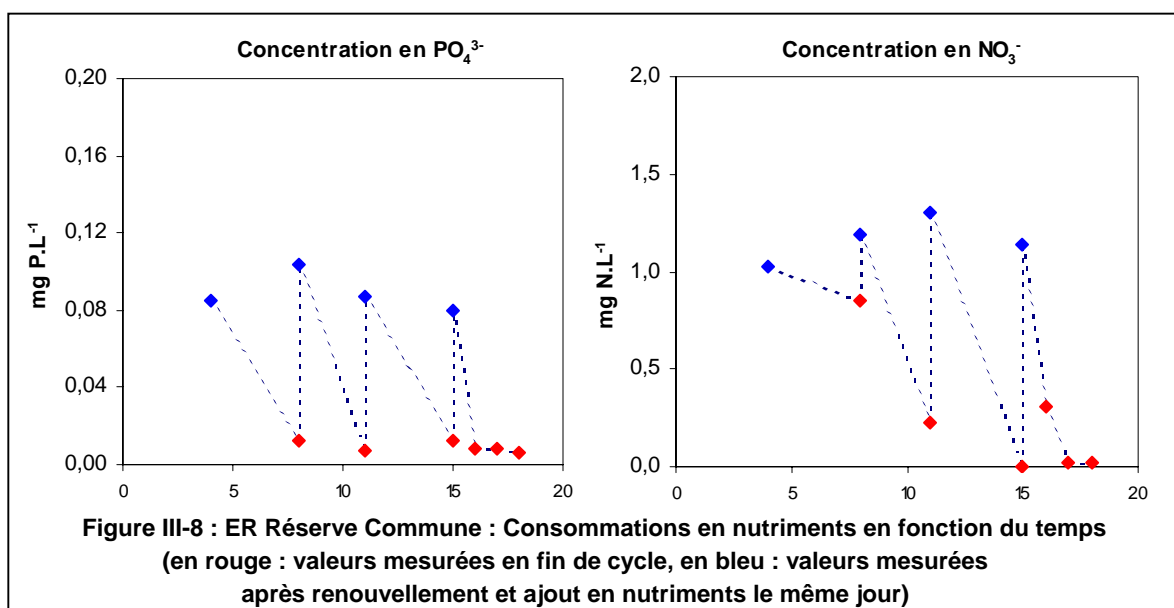
Légende : Moy : Moyenne
 EC : Ecart-type
 CV : Coefficient de variation
 p : probabilité du test statistique
 * : moyennes significativement différentes
 ns : moyennes non significativement différentes

III. 1.3. Evolution des teneurs en nutriments

Les figures III-8 et III-9 présentent les tendances de consommation des nutriments (PO_4^{3-} et NO_3^-) entre chaque date de renouvellement de milieu. Ce paramètre est un élément lié au cadre imposé à l'expérience et il peut en conditionner les résultats. Les concentrations mesurées après le renouvellement d'eau et l'ajout de nutriments (après un temps d'homogénéisation d'environ 20 min) sont marquées en bleu. Les concentrations mesurées au bout du cycle de 3 ou 4 jours d'intervalle entre deux renouvellements de milieu sont représentées en rouge.

Afin de visualiser à quel rythme pouvaient être consommés les nutriments, nous avons parfois effectué des prélèvements d'eau complémentaires lorsque le cycle¹ de 3 ou 4 jours n'était pas terminé (prélèvements à T16, T17, T18). Rappelons qu'il n'était pas possible de suivre tous les jours les teneurs en nutriments présents dans les réserves des canaux par suite de limitations logistiques (capacité d'analyse au niveau du laboratoire de chimie). De ce fait, nous ne connaissons pas la cinétique réelle d'assimilation des nutriments entre chaque renouvellement de milieu et les courbes tracées sont en pointillés pour le signifier.

Dans le cas de la première expérience de reproductibilité (Figure III-8), les graphiques montrent qu'il n'y a pas eu de limitation en PO_4^{3-} , car les valeurs mesurées à la fin de chaque cycle ne tombent pas à 0. En outre, rappelons que les algues sont capables de remobiliser un stock de réserve intracellulaire. En revanche, il semblerait qu'il y ait eu limitation en NO_3^- , puisque à T15 la valeur est à 0 : consommation de tout l'azote par les biofilms dans les canaux et valeurs très faibles à T17 et T18. Cela peut expliquer le fait que les teneurs en PO_4^{3-} ne redescendent pas à zéro, le biofilm étant auparavant limité par l'azote (cf. Principe de Liebig). Dans cette expérimentation, il semble alors que la première source de limitation rencontrée soit un épuisement de l'azote inorganique.



¹ Le terme "cycle" désigne ici l'intervalle de 3 ou 4 jours qui existe entre chaque renouvellement d'eau et de nutriments.

La figure III-9 présente les évolutions des consommations en nutriments lors de l'expérimentation de reproductibilité à alimentation séparée. Les teneurs en PO_4^{3-} en fin de cycle sont à 0 à partir de T14 (à T14 et T18) alors qu'elles le sont dès T11 (à T11, T13, T14 et T18) pour les NO_3^- , du moins pour les canaux C1, C2 et C4.

Dans cette expérience, le dosage intermédiaire des teneurs en nutriments a été réalisé entre les dates T11 et T14, ce qui illustre la vitesse à laquelle sont consommés les nutriments même si ce ne sont que des mesures partielles et à intervalles de temps importants (24h). On observe que la décroissance des teneurs en éléments nutritifs ne suit pas le même rythme au sein des différents canaux (taux de consommation indiqués au Tableau III-IV). C'est particulièrement au niveau du canal 3 qu'apparaissent les différences les plus importantes. Les taux de consommation, que ce soit en PO_4^{3-} ou en NO_3^- , sont plus faibles que ceux relevés pour les trois autres canaux. Ceci est bien relié aux teneurs plus faibles en MSSC et Chla observées au sein du canal 3 à T14 et T18.

Ainsi, on observe que les nutriments ne sont pas consommés de manière identique au cours de chaque cycle, même si leurs teneurs sont remises à leur niveau nominal à chaque renouvellement. L'explication tient aux différences qualitatives et quantitatives de la biomasse en place dans chaque canal qui, en fonction des peuplements présents, exploite le milieu à une vitesse et de façon différentes. Il faut toutefois tenir compte des incertitudes inévitables portant sur les résultats des dosages des éléments chimiques.

Pour les autres canaux (C1, C2 et C4), sur l'intervalle T11-14, les teneurs en PO_4^{3-} sont épuisées au bout de trois jours (de T11 à T14), en revanche, celles de NO_3^- le sont au bout de deux jours (de T11 à T13).

De façon générale, les suivis des teneurs en nutriments et l'allure de la répartition des valeurs obtenues au long de la durée de l'expérience et en fonction de l'accroissement de la biomasse en place doivent être gardés en mémoire pour l'interprétation des données car un épuisement des canaux les plus chargés en biomasse, avec possibilité de limitation en azote, peut expliquer certains résultats obtenus.

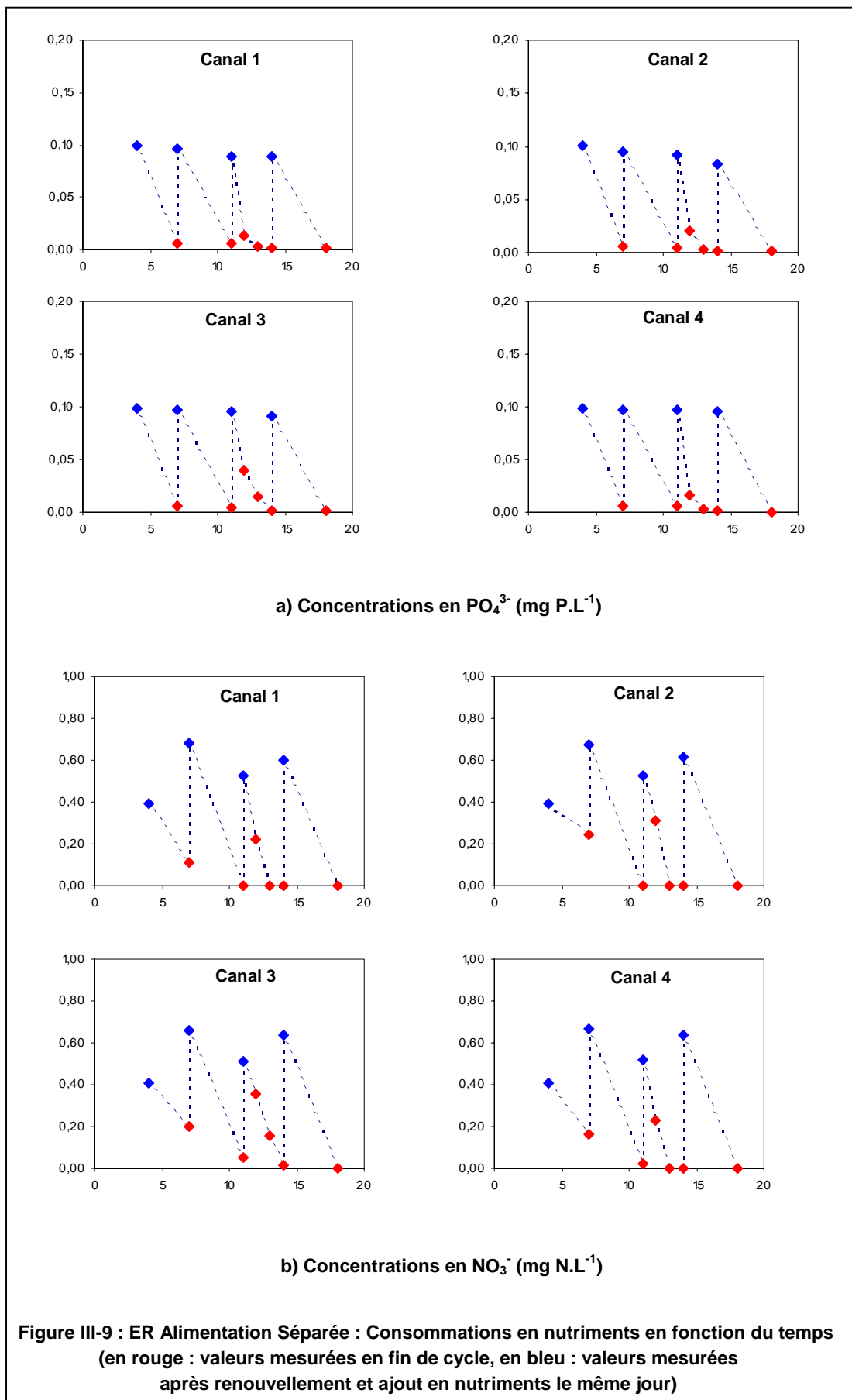


Tableau III-IV : ER Alimentation Séparée : Calcul du taux de consommation des nutriments PO_4^{3-} et NO_3^- entre T11 et T14

	Date	Canal 1	Canal 2	Canal 3	Canal 4
Taux de consommation en PO_4^{3-} (%)	T12	85,4	77,9	58,9	83,3
	T13	97,2	96,5	84,5	96,3
	T14	98,4	98,6	98,7	98,7
Taux de consommation en NO_3^- (%)	T12	57,8	40,3	31,0	55,7
	T13	100	100	69,9	100
	T14	100	100	97,3	100

III. 1.4. Descripteurs qualitatifs de la croissance du biofilm

➤ Index Autotrophique (Figure III-10)

Cet indice permet de caractériser les tendances d'évolution entre les communautés autotrophes et hétérotrophes du biofilm. Dans les représentations graphiques de l'IA, nous avons associé, pour les quatre canaux, les courbes moyennes¹ d'évolution du paramètre de la chlorophylle *a*, afin de déceler les origines de variation de l'IA.

Lors de l'expérimentation de reproductibilité avec réserve commune (Figure III-10a), en début de colonisation, les valeurs élevées de l'IA (autour de 1200) illustrent des biofilms à dominante hétérotrophe. Ensuite, on observe que tous les canaux suivent globalement la même tendance, à savoir une évolution de la composition du biofilm vers une majorité de communautés autotrophes au fur et à mesure de la durée de l'expérimentation (valeurs finales autour de IA=300). La baisse des valeurs de l'IA est due à l'augmentation des teneurs en chlorophylle *a*, dans un biofilm dont la biomasse algale s'accroît. Au niveau de la dispersion des valeurs (CV), elle est d'environ 27% à T4 et 13% à T8, puis diminue pour n'être qu'aux alentours de 6% à T18 (Tableau III-V).

En ce qui concerne l'expérience de reproductibilité avec alimentation séparée (Figure III-10b), les valeurs de l'IA présentent moins d'évolution en fonction du temps, les valeurs passant d'environ 500 à 120. Cependant la tendance globale converge avec celle vue dans l'expérience précédente, à savoir une évolution d'un caractère hétérotrophe vers un caractère autotrophe des communautés du biofilm, due également à l'augmentation des teneurs en chlorophylle *a*. Par ailleurs, les valeurs sont un peu plus

¹ (moyennes des valeurs des 4 canaux expérimentaux)

dispersées que dans l'ER Réserve Commune, entre 17 et 28%, mise à part à la date intermédiaire T11 où le coefficient de variation est de 3% (Tableau III-V).

Par comparaison entre les deux expérimentations, on observe que la forte variabilité aux deux premières dates d'échantillonnage est commune. Ensuite, c'est au cours de l'expérience avec alimentation séparée que la différenciation entre les canaux est plus importante et c'est notamment le canal 3 qui est à l'origine de cette plus forte variabilité avec, comme nous l'avons vu, des teneurs plus faibles en chlorophylle a et donc des valeurs plus fortes de l'IA.

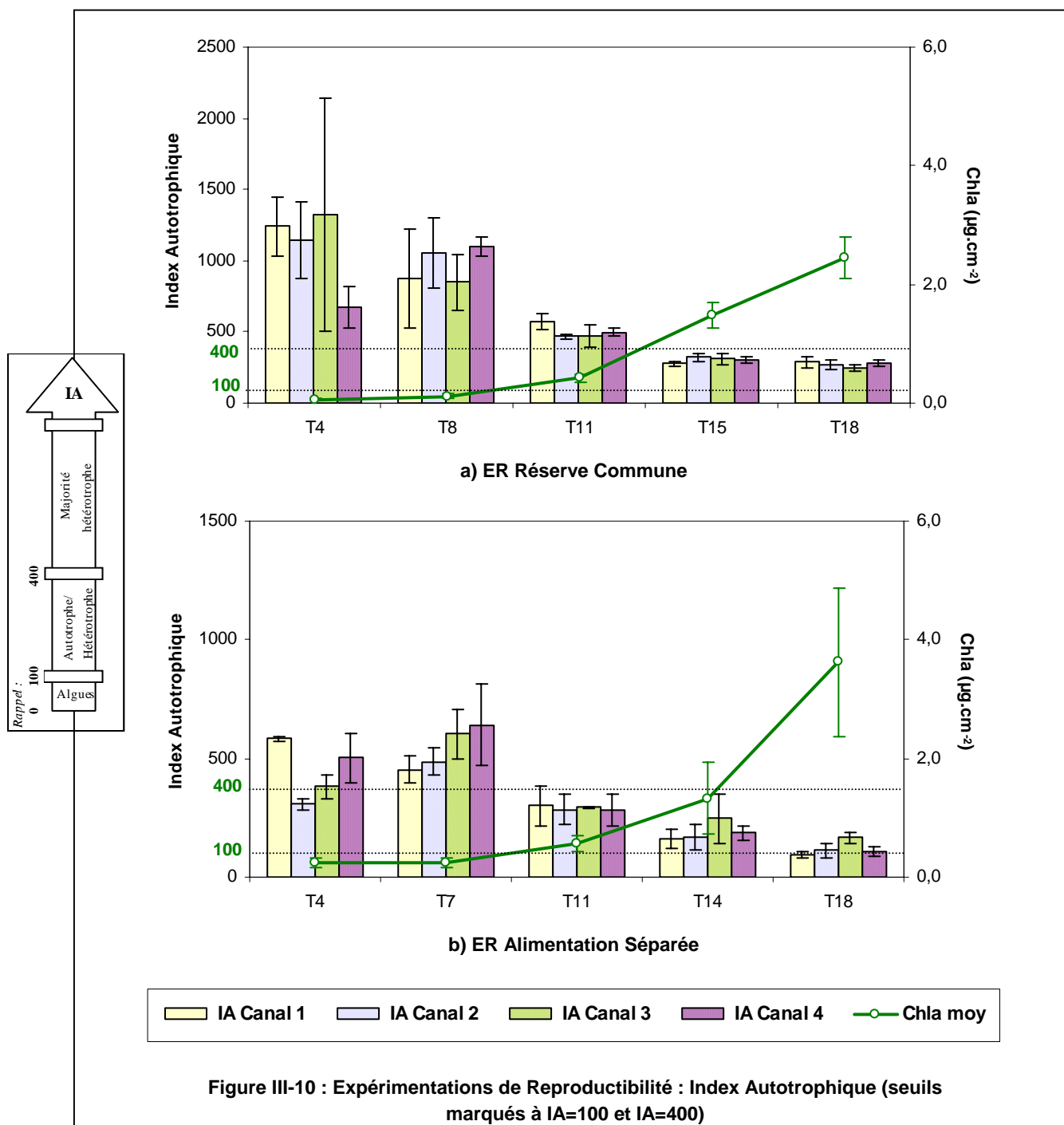


Tableau III-V : Expérimentations de Reproductibilité : Index Autotrophique : Valeurs moyennes sur les 4 canaux, écart-types et coefficients de variation

ER Réserve Commune				ER Alimentation Séparée			
Date	Moy	EC	CV %	Date	Moy	EC	CV %
T4	1095	293	26,7	T4	443	124	27,9
T8	970	127	13,1	T7	546	91	16,7
T11	501	47	9,4	T11	291	8	2,9
T15	303	20	6,6	T14	191	38	19,8
T18	272	17	6,4	T18	120	33	27,2

➤ **Communautés algales** (Figure III-11)

La composition algale des communautés du biofilm en fin d'expérience (T18) a été testée comme descripteur qualitatif des biofilms.

Dans l'expérimentation de reproductibilité avec réserve commune, le dénombrement ponctuel en fin d'expérience des différents groupes algaux présents, montre une bonne homogénéité de réponse entre les différents canaux, avec de faibles coefficients de variation sur chaque groupe d'algues (Figure III-11a et Tableau III-VII). Les communautés de Chlorophycées apparaissent comme largement majoritaires en fin d'expérimentation. Par ailleurs, on observe un développement non négligeable des populations de Cyanobactéries.

Lors de la seconde expérimentation (Figure III-11b), le dénombrement des populations algales a également été effectué à la dernière date d'échantillonnage (T18). La répartition en grands groupes de communautés algales indique une répartition homogène des communautés de Diatomées et à l'inverse une forte disparité sur la présence des communautés d'algues vertes (Tableau III-VII). En effet, le canal 3 se détache des autres canaux par une importante population en algues vertes (de 4 à 70 fois plus que dans les autres canaux). Ce résultat est de prime abord étonnant car c'est précisément ce canal qui présente des valeurs plus faibles en chlorophylle *a* que celles relevées dans les autres canaux.

Une des hypothèses proposées pour expliquer ce résultat est l'influence potentielle des communautés de Chlorophycées sur le résultat du dosage de la chlorophylle *a*, dans le cadre de la méthode par spectrophotométrie d'absorption avec acidification pour quantification des phéopigments. En effet, la chlorophylle *b*, pigment majoritaire du genre Chlorophycées, absorbe dans le spectre du visible dans une zone très proche de celle de la chlorophylle *a*. De ce fait, la chlorophylle *b*, en quantité importante, peut induire une sous-estimation des teneurs relevées en chlorophylle *a*.

Pour diminuer l'interférence de la chlorophylle *b*, il est possible de calculer les teneurs en chlorophylle *a* ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) en utilisant l'équation dite trichromatique décrite ci-après (Unesco, 1966) :

$$Chla = \left[(11,64 \times A_0 663) - (2,16 \times A_0 645) - (0,1 \times A_0 630) \right] \times \frac{Vol\ acét.}{l \times S}$$

avec

$A_0 663$, $A_0 645$, $A_0 630$: absorbances à 663 nm, 645 nm et 750 nm avant acidification ;

Vol acét. : volume de l'extrait acétonique (mL) ;

l : trajet optique de la cuve utilisée (cm) ;

S : surface de support gratté correspondante au volume filtré (cm^2).

Le tableau suivant (Tableau III-VI) détaille les valeurs calculées selon les deux équations. L'origine de la différence entre les teneurs en algues des 4 canaux ne réside pas là, car les résultats de ce nouveau calcul ne modifient pas de manière sensible les valeurs de chlorophylle a relevées dans le canal 3. Ainsi, l'explication de ces résultats divergents, conduisant à une numération élevée en Chlorophycées et une teneur plus faible en chlorophylle a, tient soit à des raisons d'ordre taxinomique (espèces de Chlorophycées présentes), soit à l'état physiologique de ces algues.

Tableau III-VI : ER Alimentation Séparée : Valeurs moyennes des teneurs en chlorophylle a du canal 3 à chaque pas d'échantillonnage, calculées selon l'équation de Lorenzen et l'équation trichromatique (Chla en $\mu\text{g.cm}^{-2}$)

	Chla par équation de Lorenzen	Chla par équation trichromatique
T4	0,26	0,28
T7	0,26	0,28
T11	0,61	0,67
T14	0,74	0,79
T18	1,98	2,09

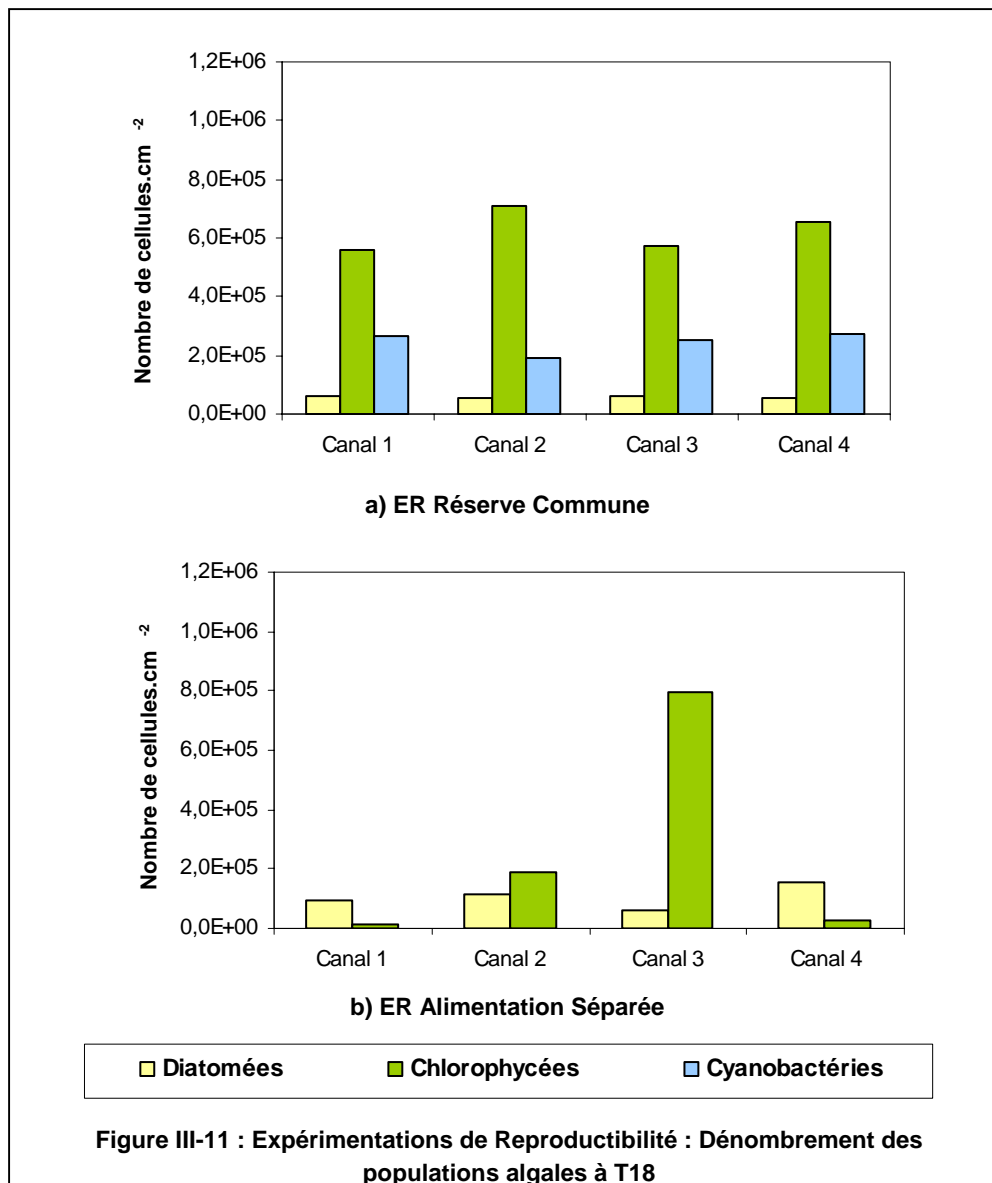


Tableau III-VII : Expérimentations de Reproductibilité : Teneurs en algues : Valeurs moyennes sur les 4 canaux, écart-types et coefficients de variation dans le cas des deux protocoles

Groupe d'algues	ER Réserve Commune			ER Alimentation Séparée		
	Moy	EC	CV %	Moy	EC	CV %
Diatomées	57920	4436	7,7	107762	37631	34,9
Chlorophycées	623994	69894	11,2	255273	369509	144,7
Cyanobactéries	245805	37050	15,1			

➤ **Compartment Diatomées : Indice de Polluo-sensibilité Spécifique** (Figure III-12)

Le calcul de l'indice diatomique IPS est intéressant pour statuer sur l'homogénéité des communautés de Diatomées du biofilm des différents canaux, sur la base de l'homologie des profils écologiques des espèces présentes, sachant que les indices donneront les mêmes notes si ce sont les mêmes espèces qui sont présentes ou si ce sont des espèces différentes mais avec une homologie de profil écologique.

Dans l'expérience de reproductibilité avec réserve commune (Figure III-12a), les valeurs de l'IPS sont autour de 12/20¹, note pouvant être interprétée comme révélatrice de conditions environnementales de qualité moyenne à médiocre. Les coefficients de variation sur l'IPS² sont assez faibles sauf à la date T11 où le canal 4 présente une valeur plus faible que celles des autres canaux et augmente ainsi la divergence des valeurs (IPS T11 : C4=9,9 ; Moy C1-C2-C3=12,8) (Tableau III-VIII). Les notes individuelles des quatre canaux redeviennent plus homogènes lors des deux dernières dates (T14, T18).

Dans l'expérimentation avec alimentation séparée, les valeurs de l'PS montrent globalement une tendance à la baisse au fur et à mesure du développement des biofilms (en moyenne valeurs ≈ de 19 à 13) (Figure III-12b et Tableau III-VIII). Cette baisse des valeurs de l'IPS indique une dégradation de la qualité du milieu qui passe d'un bon état à un état moyen.

En outre, on observe que la dispersion des valeurs s'accroît en fonction du temps et passe d'environ 1% à T4 à près de 14% à T18. Deux remarques peuvent être faites sur cette dispersion :

- le canal 3, qui se différencie sur le paramètre chlorophylle *a* et teneur en Chlorophycées se distingue également au niveau de l'indice IPS dont les valeurs sont plus élevées que celles relevées pour les trois autres canaux, ce qui ne correspond pas forcément à une loi générale dans les cours d'eau ;
- nous avons vu précédemment, au niveau des valeurs de l'IA, que la variabilité des données est plus faible à T11. Pour l'indice diatomique IPS, la dispersion des notes est croissante en fonction du temps ce qui nous fait penser qu'il rend compte d'une différenciation au niveau de la composition du peuplement en Diatomées. Il est possible que les conditions expérimentales (température assez élevée - 20°C - et peut-être des limitations en certains éléments) fassent évoluer les flores diatomiques vers une perte des taxons indicateurs des bonnes qualités et une différenciation des assemblages.

Pour expliciter cette dispersion des valeurs, le plus probable est que le "pied de cuve", qui s'est implanté dans chaque canal, soit un peu différent et subisse une évolution autonome, contrairement au cas de l'ER Réserve Commune où les 4 canaux pompent dans la même réserve avec, comme conséquence probable, une homogénéisation des flores.

¹ (l'Indice de Polluo-sensibilité Spécifique varie de 1 à 20)

² Rappelons que les comptages diatomiques de chaque canal sont réalisés sur l'échantillon moyen des trois réplicats (1 note/canal), ce qui implique des coefficients de variation plus faibles que ceux des autres descripteurs.

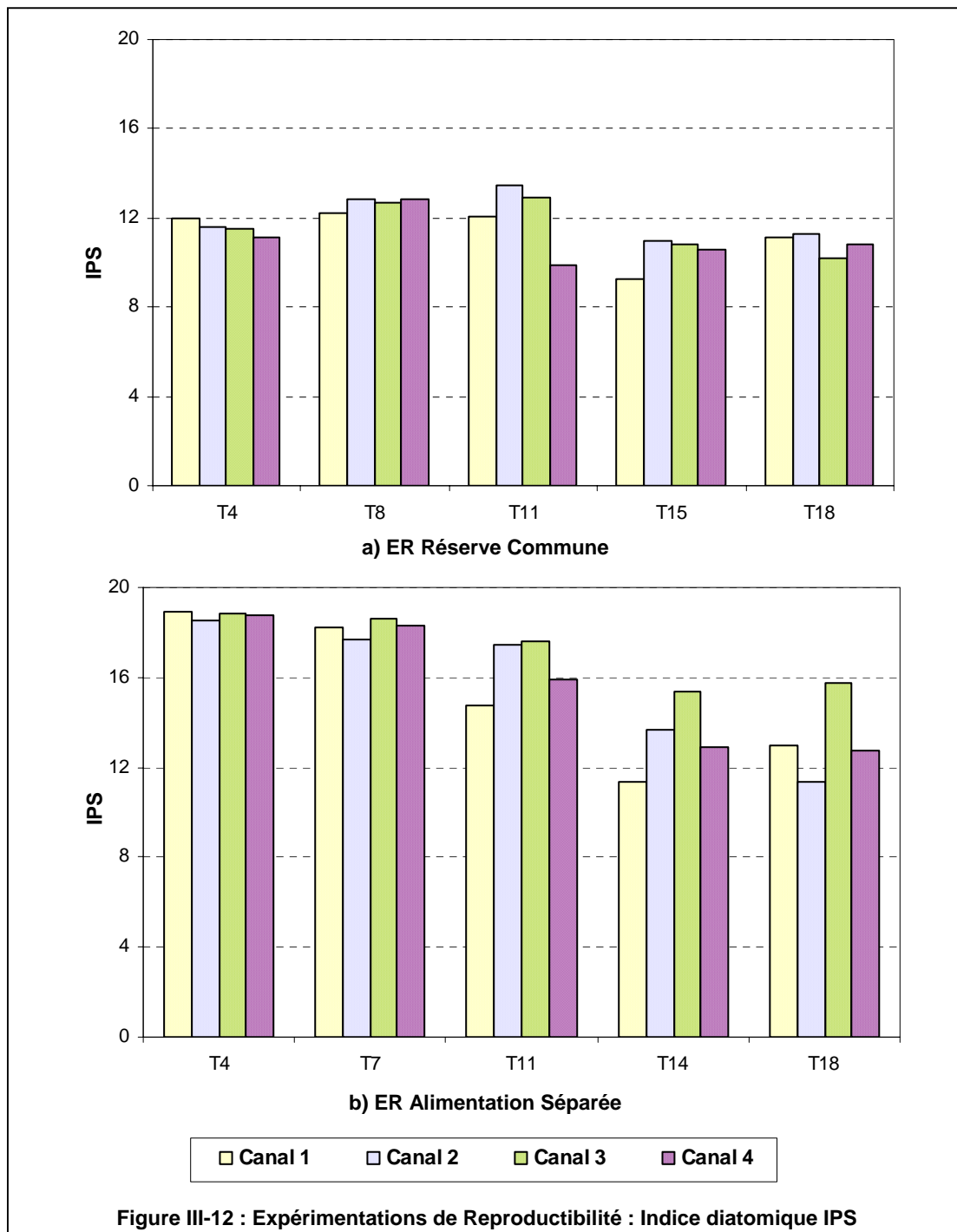


Figure III-12 : Expérimentations de Reproductibilité : Indice diatomique IPS

Tableau III-VIII : Expérimentations de Reproductibilité : IPS : Valeurs moyennes sur les 4 canaux, écart-types et coefficients de variation

ER Réserve Commune				ER Alimentation Séparée			
Date	Moy	EC	CV %	Date	Moy	EC	CV %
T4	11,6	0,3	3,0	T4	18,8	0,2	0,9
T8	12,6	0,3	2,3	T7	18,2	0,4	2,0
T11	12,1	1,6	13,2	T11	16,5	1,4	8,2
T15	10,4	0,8	7,6	T14	13,3	1,7	12,6
T18	10,9	0,5	4,6	T18	13,2	1,8	13,8

III. 1.5. Conclusions - Reproductibilité des canaux

L'objectif des expériences de reproductibilité était d'observer la réponse des quatre canaux du dispositif, soumis à des conditions expérimentales similaires, en termes de développement des biofilms. Ceci dans le but de pouvoir, par la suite, lors des expériences d'enrichissement, attribuer les différences observées d'un canal à l'autre dans le développement des biofilms aux modalités de traitement du canal et non à la variabilité induite par le dispositif expérimental lui-même.

Nous avons observé un fonctionnement relativement identique des quatre canaux avec des réponses homogènes. Assurément, quelques réserves doivent être ajoutées à ce constat et nous pouvons préciser les points suivants :

- sur les paramètres MSSC et Chla : on souligne les différenciations d'un canal dans chacun des deux protocoles : canal 1 lors de l'ER Réserve Commune et canal 3 lors de l'ER Alimentation Séparée. Néanmoins, ces différenciations, qui ne se produisent qu'en fin d'expérimentation, ne sont pas significatives au seuil de 5%. Les conclusions opérationnelles que nous pouvons en tirer pour la suite du travail sont qu'il faudra examiner avec une certaine précaution les résultats obtenus en fin de suivi et qu'en outre, notre choix de travailler sur des temps d'expérience assez courts avec nos dispositifs se révèle pertinent ;
- sur le paramètre "Nombre total de bactéries" : de manière analogue dans les deux expériences, l'évolution du nombre total de bactéries est faible. Il n'y a pas de tendance nette en fonction du temps et, compte tenu de ce fait et de la forte dispersion possible des valeurs due à la méthode de dénombrement, les variations entre canal que l'on pourrait observer ne peuvent pas être reliées clairement à une cause biologique ;
- sur le paramètre "Proportion de bactéries viables" : les deux expériences montrent deux évolutions différentes de ce paramètre. Dans le cas de l'ER Réserve Commune, la moyenne sur les 4 canaux est stable, dans le cas de l'ER Alimentation Séparée, on observe une augmentation de la valeur moyenne. Cependant, ce paramètre semble être variable (forts écart-types) et il est donc difficile de prononcer des conclusions assurées ;
- sur le volet des "Communautés algales" : on observe une bonne homogénéité du nombre de cellules algales par groupe pour l'ER Réserve Commune. Dans le cas de l'ER Alimentation Séparée, la bonne homogénéité des valeurs est fortement diminuée par la présence d'algues vertes en quantité très importante au sein du canal 3. Nous avons vu, auparavant, qu'il n'y a pas d'explication liée à des facteurs de forçages environnementaux imposés sur ces résultats mais nous pouvons rappeler que cette variabilité des assemblages existe aussi sur les supports naturels (colonisation de galets pouvant être très différente d'un galet à l'autre) ;
- sur l'IPS : il est intéressant de remarquer que les résultats sur ce paramètre peuvent être rapprochés à ceux obtenus sur le paramètre "Proportion de bactéries viables". En effet, dans le cas de l'ER Réserve Commune, les valeurs restent assez stables durant toute l'expérimentation. Au contraire, dans l'ER Alimentation Séparée, on observe une évolution du paramètre avec des valeurs passant de 18 à 13. On peut également observer que dans le cas de l'ER Alimentation

Séparée, c'est le canal 3, celui ayant une forte population d'algues vertes, qui garde les valeurs les plus hautes de l'IPS (valeur finale autour de 16).

En conclusion, suite aux résultats obtenus, il semble que les différents descripteurs du biofilm puissent être distingués selon leur robustesse :

- les paramètres MSSC et Chla fournissent des résultats reproductibles et présentent une évolution au cours du temps ;
- à l'inverse, les résultats obtenus sur le paramètre "Nombre total de bactéries" ne présentent que très peu ou pas d'évolution significative en fonction du temps. De ce fait, on peut considérer ce paramètre comme un descripteur "non discriminant". Bien que les valeurs aient été acquises systématiquement, il a été décidé de ne pas le retenir pour commenter les résultats des expérimentations ultérieures. En outre, on peut penser que ce paramètre atteint très rapidement un pallier et n'évolue pas de manière sensible après et il est certain que notre premier pas d'échantillonnage (4 jours) est trop élevé pour pouvoir déceler l'installation et donc l'évolution du nombre de bactéries ;
- enfin, on peut repérer un dernier type de descripteur, ayant la caractéristique d'être fortement marqué par un effet propre à chaque expérimentation réalisée, c'est le cas du paramètre "Proportion de bactéries viables". Ce paramètre pourra être intéressant à comparer d'un canal à l'autre dans une même expérimentation mais il semble qu'il soit difficile de l'utiliser de façon transversale entre expérimentations.

Par ailleurs, pour connaître l'effet induit par la déconnexion des canaux, sur la fluctuation des résultats dans l'ER Alimentation Séparée, déconnexion qui constitue une source de variation des conditions expérimentales, nous nous sommes intéressés aux variabilités inter-canal relevées, à travers la valeur des coefficients de variation calculés sur les quatre canaux pour chaque paramètre de développement des biofilms (Tableau III-IX).

On note que pour les paramètres MSSC, Chla et Ntot bact., mis à part à la date T4 pour Chla et T14 pour Ntot bact., c'est l'expérimentation avec réserve commune qui présente les plus petits CV. Ceci est également vérifié pour l'Index Autotrophique. En revanche, ce n'est pas le cas sur le paramètre Prop. bact. viables où c'est plus souvent l'ER Alimentation Séparée qui montre les plus petits CV. La remarque peut être appliquée à l'IPS également mais pour ce paramètre, dans les deux cas les valeurs des coefficients de variation sont faibles.

En conclusion, il était attendu que la déconnexion des canaux introduirait une source supplémentaire de variation par rapport à l'expérimentation de reproductibilité à réserve commune, ce qui s'est vérifié. Toutefois, cette déconnexion est rendue obligatoire pour la réalisation des expériences d'enrichissements distincts. Les résultats en alimentation séparée présentant une production de biomasses qualitativement et quantitativement comparables, sans différence significative au seuil de 5% et avec des coefficients de variation corrects, cela valide l'utilisation de ce protocole pour la suite des expérimentations.

Tableau III-IX : Expérimentations de Reproductibilité : Coefficients de variation obtenus sur les paramètres descripteurs de la croissance du biofilm dans les deux types de conditions expérimentales (RC : Réserve Commune, AS : Alimentation Séparée). Les chiffres en gras signalent les cas où CV AS < CV RC.

Date	MSSC		Chla		Ntot bact.		Prop. bact. viables	
	RC	AS	RC	AS	RC	AS	RC	AS
T4	22,3	27,9	38,9	33,4	25,1	56,8	23,2	31,5
T7 - T8	20,1	31,7	33,4	35,1	37,6	38,0	36,3	33,8
T11	11,3	26,1	15,8	25,2	45,0	58,9	29,7	27,7
T14 - T15	12,2	24,6	14,9	45,0	38,6	23,4	45,9	20,1
T18	16,5	17,0	14,4	34,8	26,9	52,4	33,5	21,2

Date	Index Autotrophique		IPS	
	RC	AS	RC	AS
T4	26,7	27,9	3,0	0,9
T7 - T8	13,1	16,7	2,3	2,0
T11	9,4	2,9	13,2	8,2
T14 - T15	6,6	19,8	7,6	12,6
T18	6,4	27,2	4,6	13,8

En outre, ces deux expériences nous apportent les informations détaillées ci-après :

- Au niveau des concentrations en nutriments :

Dans nos systèmes expérimentaux, la masse d'eau circulante est complètement renouvelée par de l'eau de même composition à intervalle régulier. Durant cet intervalle de temps (3 ou 4 jours), les canaux fonctionnent en systèmes fermés, ou batchs. Les conditions imposées d'enrichissement (conditions nominales), sont rétablies et vérifiées à chaque début de cycle. Ensuite, en fonction de la biomasse présente dans le canal, un appauvrissement de l'eau circulante intervient, faible au début des colonisations et de plus en plus rapide vers la fin des expériences, lorsque les lames portent davantage de biofilm. Rappelons qu'il n'a pas été possible d'analyser l'eau à cadence plus serrée.

Cette configuration d'alimentation peut entraîner un épuisement des nutriments de l'eau par la biomasse au cours de l'intervalle de 3 ou 4 jours. Cependant, du fait de la remobilisation possible d'un stock de phosphore par les algues (phosphore de luxe), ce sont les limitations en azote qui sont les plus probables.

Les conditions expérimentales appliquées induisent un gradient relatif de conditions trophiques, effectivement recherché, même si la stationnarité des conditions pendant le temps complet de chaque expérimentation n'est pas assurée. Cela n'aurait été possible qu'avec une logistique beaucoup plus lourde basée sur un fonctionnement en canaux ouverts avec de grosses réserves d'eau imposant d'autres

difficultés méthodologiques en cascade (contrôle des températures, installation de biofilms parasites à l'expérience, assimilation biologique des formes de l'azote, etc.)

- Au niveau de l'ensemencement :

Nous avons pu voir que la réserve de biofilm, nécessaire à l'ensemencement des canaux, est de composition différente d'une expérience à l'autre (cf. par exemple les teneurs en Chla Figure III-1). La composition de cette réserve ne peut pas répondre à une standardisation car le biofilm, même s'il est recueilli de manière systématique à la même station de Garonne et en prenant soin de prélever un échantillon représentatif des galets colonisés, ne présentera jamais la même composition algale ni la même densité de matières organiques/matières minérales, la période et donc la saison ainsi que toutes les caractéristiques du milieu étant différentes. Toutefois, rappelons que l'objectif primordial est que les quatre canaux soient ensemencés de manière comparable en fin de phase de précolonisation, ce qui est vérifié par la comparaison des moyennes de biomasse en Chla et MSSC à la date T4.

III. 2 • CROISSANCE DE BIOFILMS SOUMIS A DES ENRICHISSEMENTS ARTIFICIELS

Nous avons étudié la croissance de biofilms, soumis à des enrichissements artificiels en phosphore et azote à travers deux expériences successives, différenciées par la valeur des ajouts en nutriments réalisés. Ces expérimentations visent à obtenir des éléments de réponse concernant l'effet des concentrations "brutes" en nutriments sur la croissance des biofilms mais également des limitations de croissance du biofilm qui peuvent intervenir et sur le rôle joué par la valeur du rapport N/P sur leurs caractéristiques.

III. 2.1. Première expérimentation

III. 2.1.1. *Caractérisation physico-chimique de la réserve de biofilm et de l'eau des canaux*

Les caractéristiques de l'inoculum en chlorophylle a et MSSC sont présentées à la figure III-13.

En ce qui concerne le choix des concentrations en éléments nutritifs imposées, nous voulions tout d'abord tester majoritairement l'effet d'un ajout de phosphore sur les communautés de biofilm. Le canal 1, reproduisant les conditions amont Toulouse de la station de l'Aouach, sert de canal témoin, les canaux 2 et 3 sont enrichis de manière croissante en P et le canal 4 est soumis à un ajout de P à la même dose que le canal 3, associé à un ajout d'azote pour pallier une éventuelle limitation. Le tableau III-X présente les modalités d'enrichissements ainsi que les moyennes des concentrations en nutriments relevées au sein des quatre canaux durant l'expérience.

Au niveau du rapport N/P, on observe que les canaux 2 et 4 sont équilibrés avec des valeurs du rapport N/P légèrement supérieures à 16 et le canal 3 est un peu limité par l'azote (N/P≈10). Le canal 1, par sa faible teneur en PO_4^{3-} , est fortement limité en P.

Pour cette expérimentation, nous n'avons pas réalisé de mesure des paramètres physico-chimiques au sein des canaux.

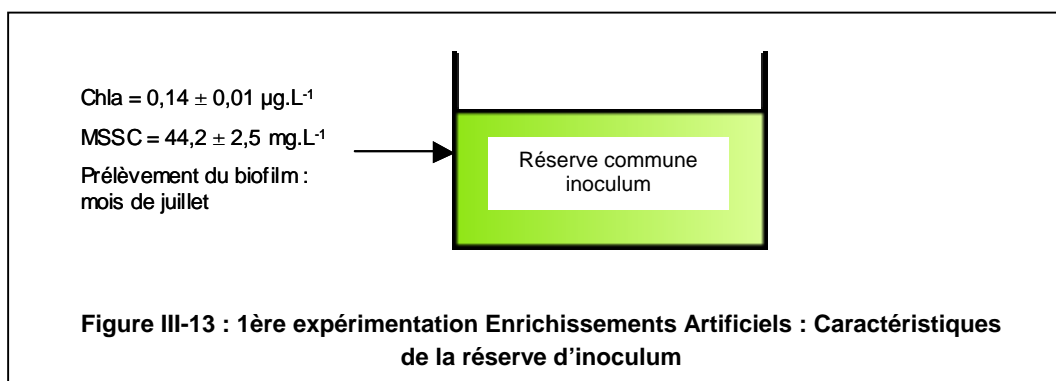


Tableau III-X : 1ère expérimentation Enrichissements Artificiels : Modalités d'enrichissements (a) et valeurs nominales moyennes des teneurs en nutriments des canaux (b) (mg.L⁻¹) (ligne grisée : canal témoin)

a)

	Canal 1	Canal 2	Canal 3	Canal 4
Charge en P	T	+P	+PP	+PP
Charge en N	T	T	T	+N

T = concentrations de l'eau de la station de référence

b)

	P-PO ₄ ³⁻	N-NO ₃ ⁻	N-NO ₂ ⁻	N-NH ₄ ⁺	N/P
Canal 1	0,006 ± 0,002	0,31 ± 0,05	0,009 ± 0,002	0,073 ± 0,016	148 ± 44
Canal 2	0,045 ± 0,004	0,31 ± 0,04	0,010 ± 0,001	0,070 ± 0,026	19 ± 2
Canal 3	0,087 ± 0,005	0,32 ± 0,04	0,009 ± 0,002	0,070 ± 0,025	10 ± 2
Canal 4	0,091 ± 0,007	0,69 ± 0,12	0,009 ± 0,002	0,098 ± 0,054	20 ± 5

III. 2.1.2. Descripteurs quantitatifs de la croissance du biofilm

➤ Matière sèche sans cendre (Figure III-14)

S'agissant du paramètre matière sèche sans cendre, on observe une croissance régulière du biofilm dans le cas des canaux enrichis (C2, C3, C4). La croissance du biofilm observée au sein des canaux 2 et 3 est très voisine. En revanche, les teneurs relevées au sein du canal 4 sont largement supérieures à celles des autres canaux (d'un facteur 1,5 à 5).

Les résultats des tests d'analyse de variance montrent des différences significatives entre les valeurs des canaux à partir de la date T11 (Tableau III-XI). Les tests effectués ensuite nous précisent que :

- à T11 : il y a deux groupes distincts : les canaux 1 et 2 d'un côté, les canaux 3 et 4 de l'autre ;
- à T14 et T18 : les canaux se répartissent en trois groupes différents : le canal 1 d'un côté, les canaux 2 et 3 qui ne se différencient pas entre eux et enfin le canal 4 distinct de C1 et C2-C3.

➤ Chlorophylle a (Figure III-15)

L'évolution en termes de chlorophylle est semblable à l'évolution en termes de MSSC. Globalement, on retrouve les mêmes groupes c'est-à-dire le canal 1 d'une part, les canaux 2 et 3 groupés et le canal 4 au-

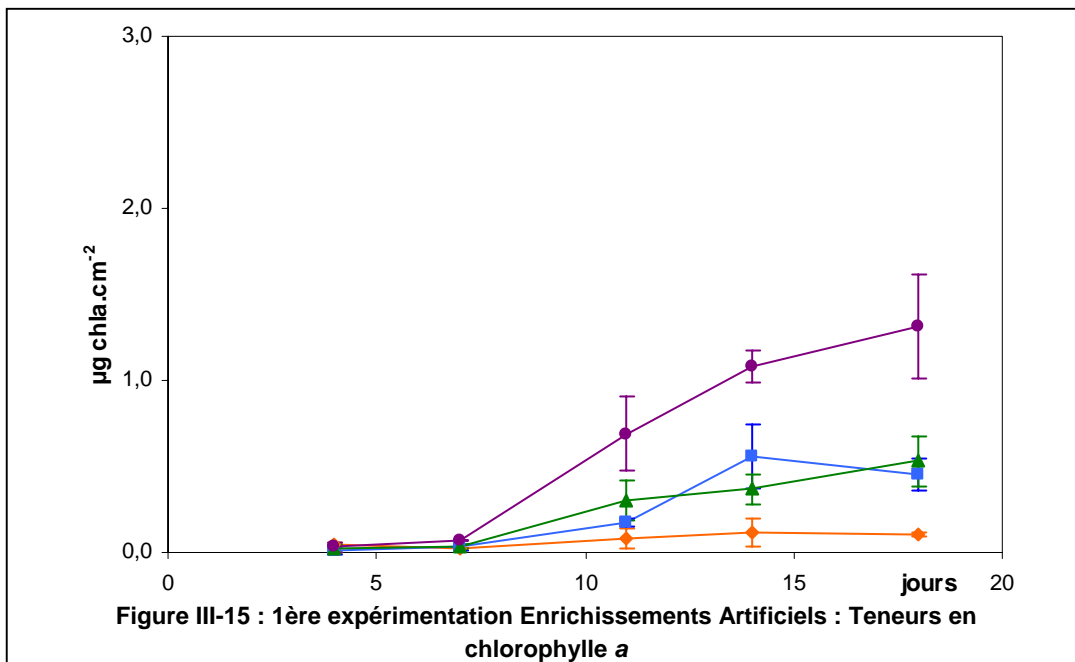
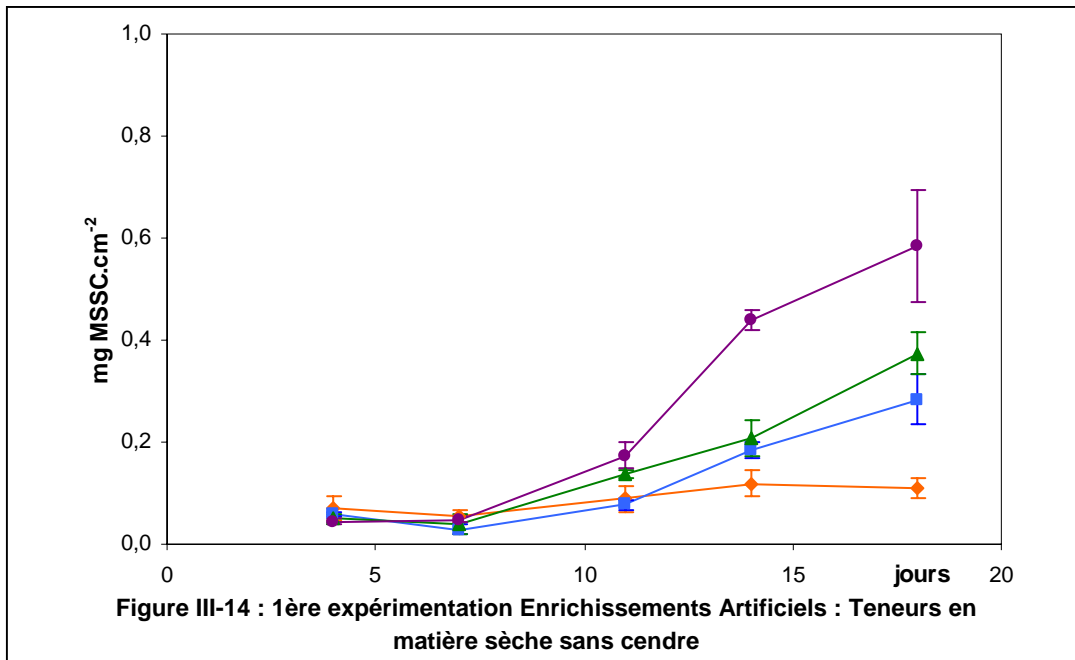
dessus de l'ensemble des autres canaux. On peut toutefois noter une différence à T14 où le canal 2 se place légèrement au-dessus du canal 3 ce qui n'est pas le cas en termes de MSSC.

Entre T11 et T14, le canal 3, plus fourni en biomasse à T11, a subi une limitation d'azote par rapport au phosphore disponible.

Le canal 1, canal témoin, présente des teneurs en chlorophylle *a* très faibles tout au long de l'expérience ($<0,2 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$). A l'opposé, le canal 4, canal le plus enrichi, présente les valeurs les plus élevées à partir de T11 et, en fin d'expérience, les teneurs en chlorophylle qui y sont relevées sont de 2,5 à 19 fois plus élevées que dans les autres canaux.

De manière analogue au paramètre MSSC, les résultats du test d'Anova indiquent une source d'hétérogénéité de T7 à T18 (Tableau III-XI) :

- à T7 et T11 : le canal 4 se différencie des autres canaux qui eux présentent des valeurs homogènes ;
- à T14 et T18 : on retrouve la même distribution que pour le paramètre de la MSSC : trois groupes distincts apparaissent avec C1 ; C2-C3 non différenciés ; C4.



—●— Canal 1 —■— Canal 2 —▲— Canal 3 —●— Canal 4

Tableau III-XI : 1ère expérimentation Enrichissements Artificiels : Résultats des tests d'Anova à un facteur sur MSSC et Chla

Date d'échantillonnage	MSSC		Chla	
	p		p	
T4	0,18	ns	0,63	ns
T7	0,11	ns	0,003	*
T11	<0,001	*	0,003	*
T14	<0,001	*	<0,001	*
T18	<0,001	*	<0,001	*

➤ **Proportion de bactéries viables** (Figure III-16)

Les résultats des proportions de bactéries viables présentent de forts écart-types. En ne considérant que les moyennes, on peut noter une tendance similaire pour les canaux 1, 3 et 4, à savoir une baisse à partir de la date intermédiaire T11. En revanche, le canal 2 présente une évolution davantage en dents de scie. On peut également noter que le canal 4 semble toujours présenter des moyennes plus faibles que celles des autres canaux et que, à la dernière date, les quatre canaux présentent des valeurs relativement proches, ce qui est confirmé par les tests statistiques qui indiquent qu'aucun canal ne se différencie à T18 (Tableau III-XII).

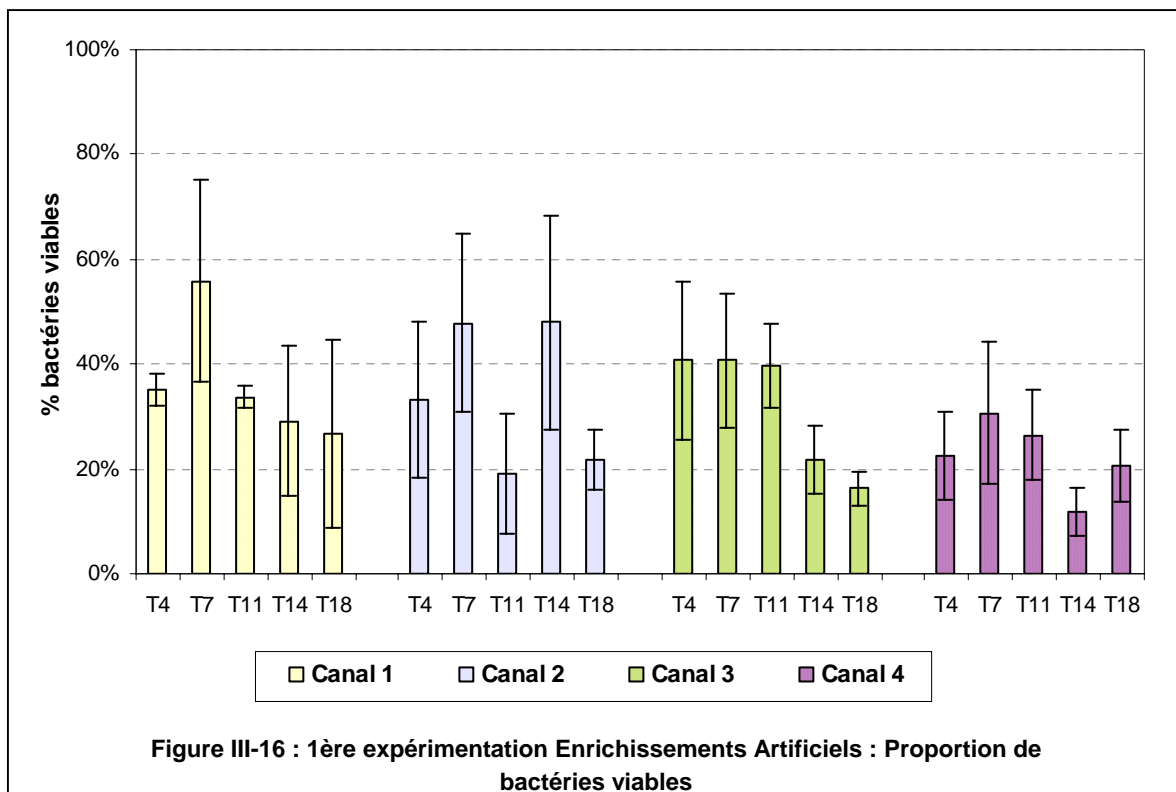


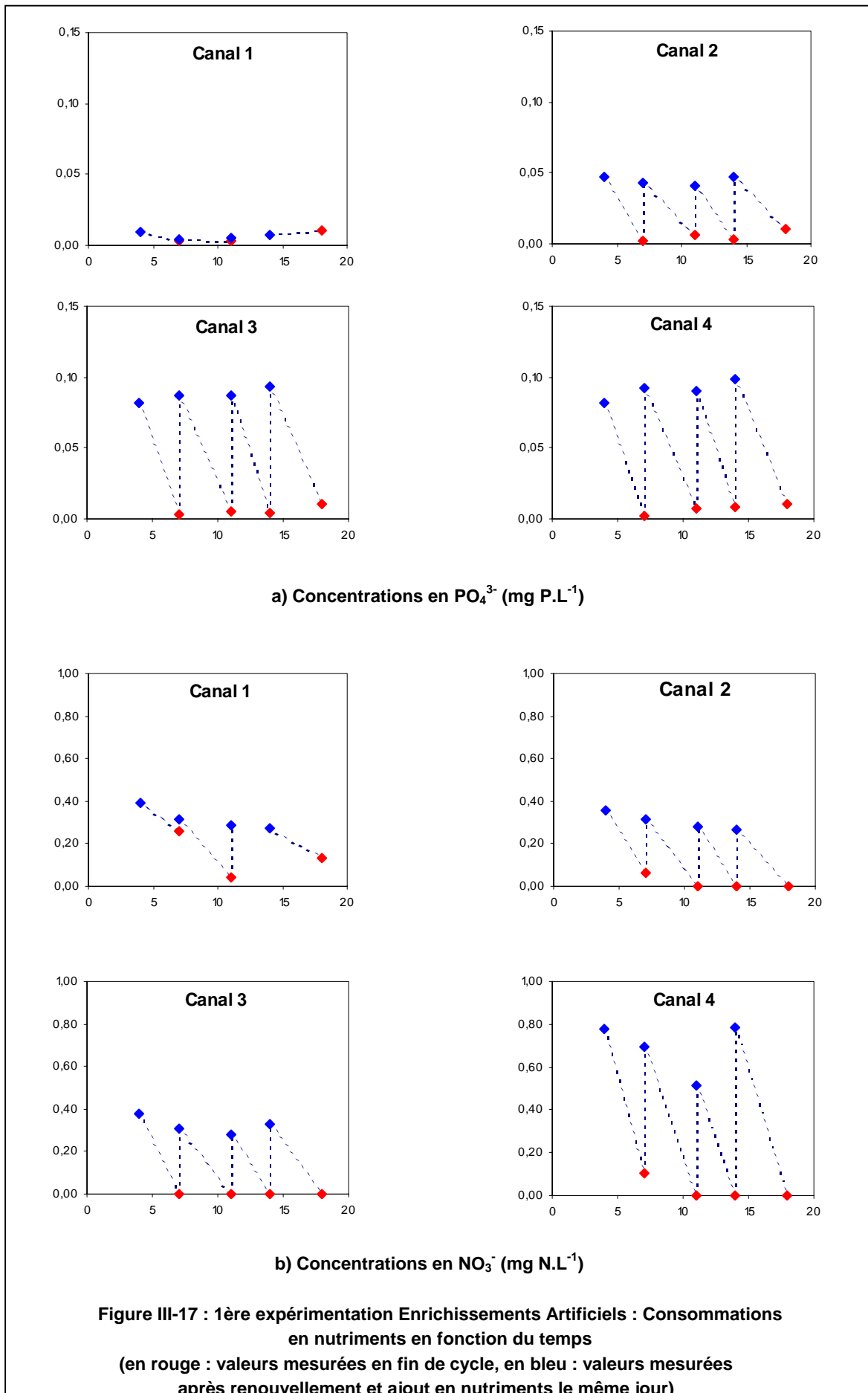
Tableau III-XII : 1ère expérimentation Enrichissements Artificiels : Résultats des tests du Khi^2 sur Prop. bact. viables

Date d'échantillonnage	Prop. bact. viables	
	p	
T4	0,02	*
T7	<0,001	*
T11	0,02	*
T14	<0,001	*
T18	0,62	ns

III. 2.1.3. Evolution des teneurs en nutriments

Les allures de consommation en nutriments sont présentées à la figure III-17. Sur le paramètre PO_4^{3-} , on observe qu'à T7, les teneurs sont épuisées dans les 4 canaux. En revanche, à T11, la limitation n'intervient que pour le canal 1 et à T14, elle s'observe pour les canaux 2 et 3. En outre, on observe qu'à T18, aucun canal ne présente de limitation en PO_4^{3-} , ce qui est certainement dû à la limitation coexistante en NO_3^- .

Sur le paramètre NO_3^- , on observe que les canaux 2 et 3 subissent tous les deux une limitation, mais que cette limitation intervient plus rapidement pour le canal 3 (dès la date T7) ce qui peut expliquer que l'on n'ait pas observé un développement de biomasse plus fort dans le canal 3 malgré l'enrichissement supplémentaire en P.



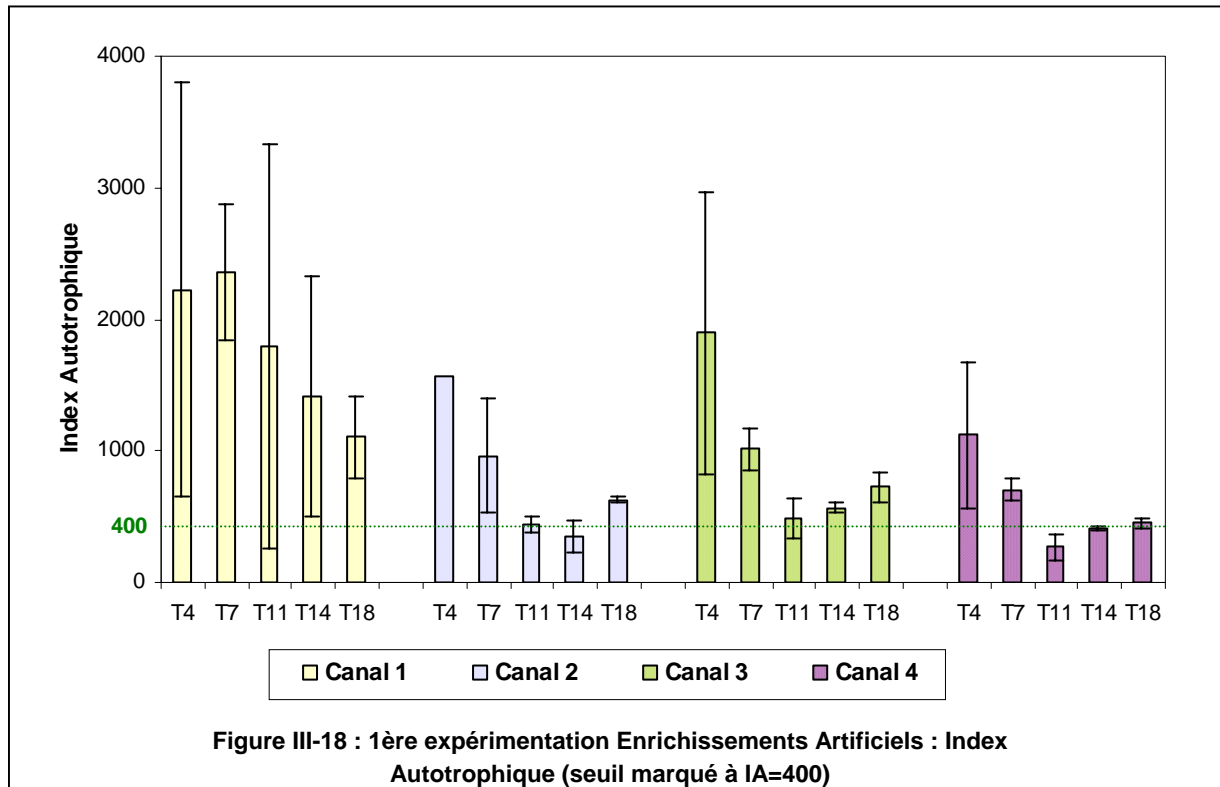
III. 2.1.4. Descripteurs qualitatifs de la croissance du biofilm

➤ **Index Autotrophique** (Figure III-18)

Au vu des résultats obtenus sur les paramètres MSSC et Chla, les données de l'Index Autotrophique doivent nécessairement afficher des valeurs et des tendances différentes selon les canaux.

Le canal 1 présente des valeurs élevées d'IA durant toute l'expérience (entre 1100 et 2400). Ces valeurs sont certainement dues, d'une part, aux faibles teneurs en chlorophylle a relevées sur les lames (qui présentent également de forts écarts-types). D'autre part, on peut penser que le peu de MSSC développée est constitué, de manière majoritaire, de communautés hétérotrophes, l'enrichissement n'étant probablement pas suffisant pour un développement significatif de communautés algales.

En ce qui concerne les trois canaux enrichis, on remarque qu'ils se dissocient du canal 1 dès la date T7, avec des valeurs plus faibles d'IA (autour de 900). Le canal 4 est celui qui présente les plus faibles valeurs d'IA, signant un développement majoritaire de communautés autotrophes lié à l'enrichissement en nutriments du canal. En revanche, on remarque que les valeurs des canaux 2 et 3 ne se différencient pas clairement et l'Index Autotrophique est un paramètre peu discriminant pour ces deux canaux.

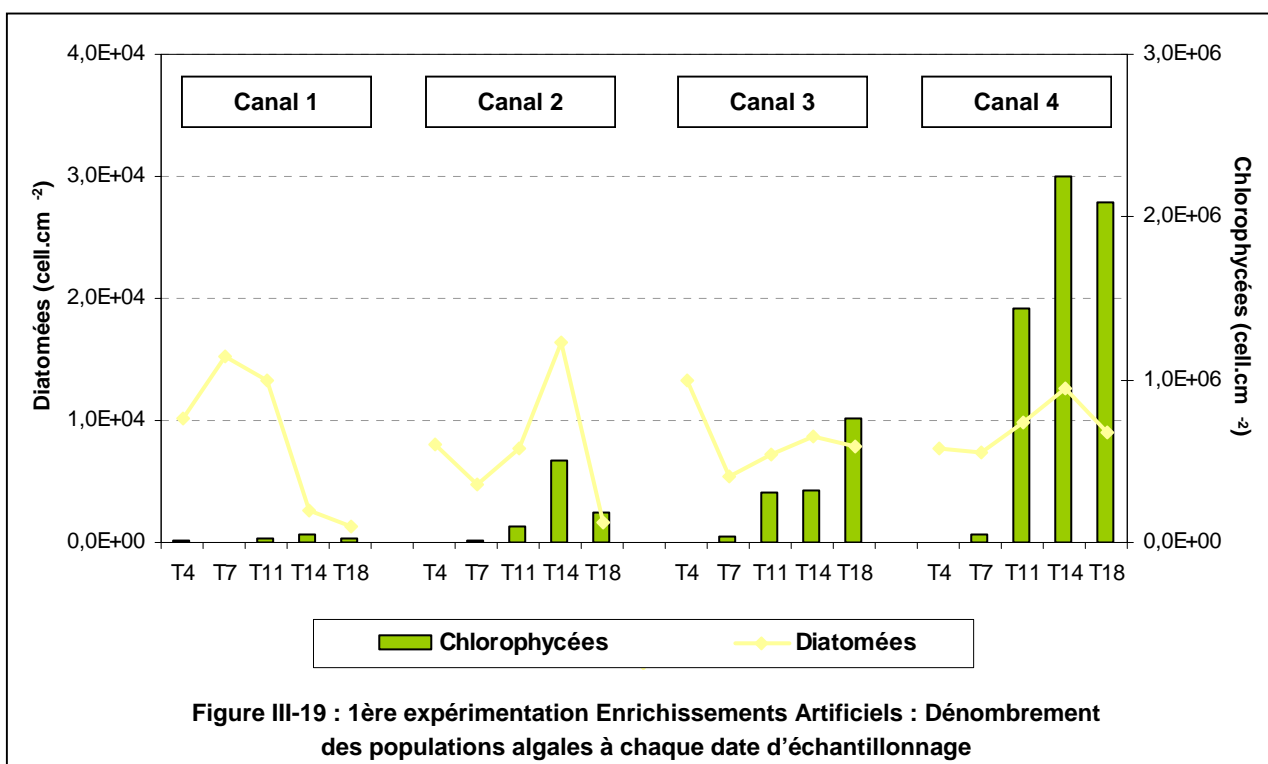


➤ **Communautés algales** (Figure III-19)

Les dénombrements algaux ont été réalisés à chaque date d'échantillonnage au sein des 4 canaux. Les communautés algales se répartissent en Diatomées et Chlorophycées.

On observe, en premier lieu, que les communautés de Diatomées sont présentes sur toute la durée de l'expérience, quel que soit le canal considéré, et sont les premières algues à coloniser les supports (espèces algales pionnières).

En ce qui concerne les canaux enrichis, l'évolution du nombre de Diatomées est commune, à savoir, une diminution des dénombrements en Diatomées à T7, une croissance jusqu'à T14 puis de nouveau une chute des valeurs. En revanche, ce n'est qu'au sein du canal 1 que l'on observe une augmentation des effectifs entre T4 et T7, suivie ensuite, d'un effondrement des valeurs jusqu'à T18.



Sur les communautés de Chlorophycées, les distinctions sont très nettes entre les 4 canaux. En fonction de la progression des quantités de nutriments apportées, les canaux enrichis C2, C3, C4 présentent des populations croissantes d'algues vertes et c'est au sein du canal le plus enrichi (C4) que l'on dénombre la part la plus importante d'algues vertes, signant les conditions les plus eutrophes. Le développement des algues vertes a été visiblement accéléré par les teneurs en nutriments.

En outre, on peut voir, dans le cas du canal 3, que même si les quantités de biomasse (en MSSC et Chla) ne se distinguent pas de celles relevées dans le canal 2, la signature en algues vertes est différente avec de plus fortes teneurs. Ainsi, même si le canal 3 a été ponctuellement limité par l'azote, le phosphore

ajouté a entraîné un développement plus important des Chlorophycées. Dans le cas du canal 4, c'est la présence conjointe des deux nutriments N et P en quantité importante qui a permis le fort taux de développement des algues vertes.

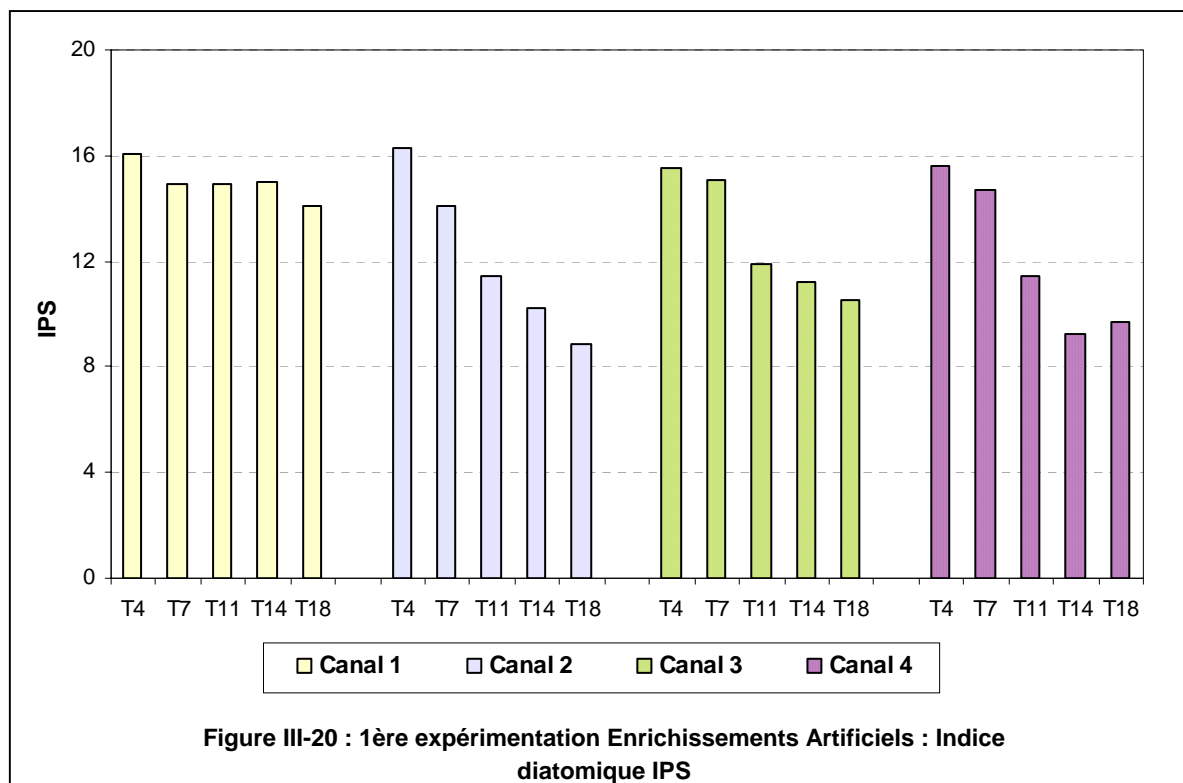
En conclusion, on observe que la composition algale du biofilm peut être un indicateur du niveau de trophie des eaux lorsque l'on compare des échantillons de biofilms qui ont le même "âge". En effet, les communautés d'algues vertes, majoritaires dans le cas du canal 4, signent l'enrichissement des canaux par un développement plus rapide que dans le canal non enrichi.

➤ **Compartiment Diatomées**

• **Indice de Polluo-sensibilité Spécifique** (Figure III-20)

Les notes d'IPS permettent d'identifier deux groupes de canaux à partir de T11 : le canal 1 d'une part, les canaux enrichis d'autre part. C'est le canal 1 qui présente les plus fortes valeurs d'IPS, aux alentours de 15, alors que la moyenne des canaux enrichis à la dernière date d'expérimentation se situe autour de 10. On peut également noter que, alors que les valeurs du canal 1 restent relativement constantes en fonction du temps (de 16 à 14), synonymes d'un milieu de bonne qualité sur la durée de l'expérience, celles des canaux enrichis ne cessent de diminuer et restent groupées.

On observe donc que l'enrichissement des eaux a eu pour effet de faire évoluer les communautés de diatomées vers des espèces à moindre exigence envers la qualité d'eau. On peut penser que dans les canaux enrichis, la biomasse totale étant plus importante, la composition de l'eau est plus rapidement dégradée (due à la décomposition des organismes morts) ce qui induit le développement de diatomées signant une eau de moins bonne qualité.



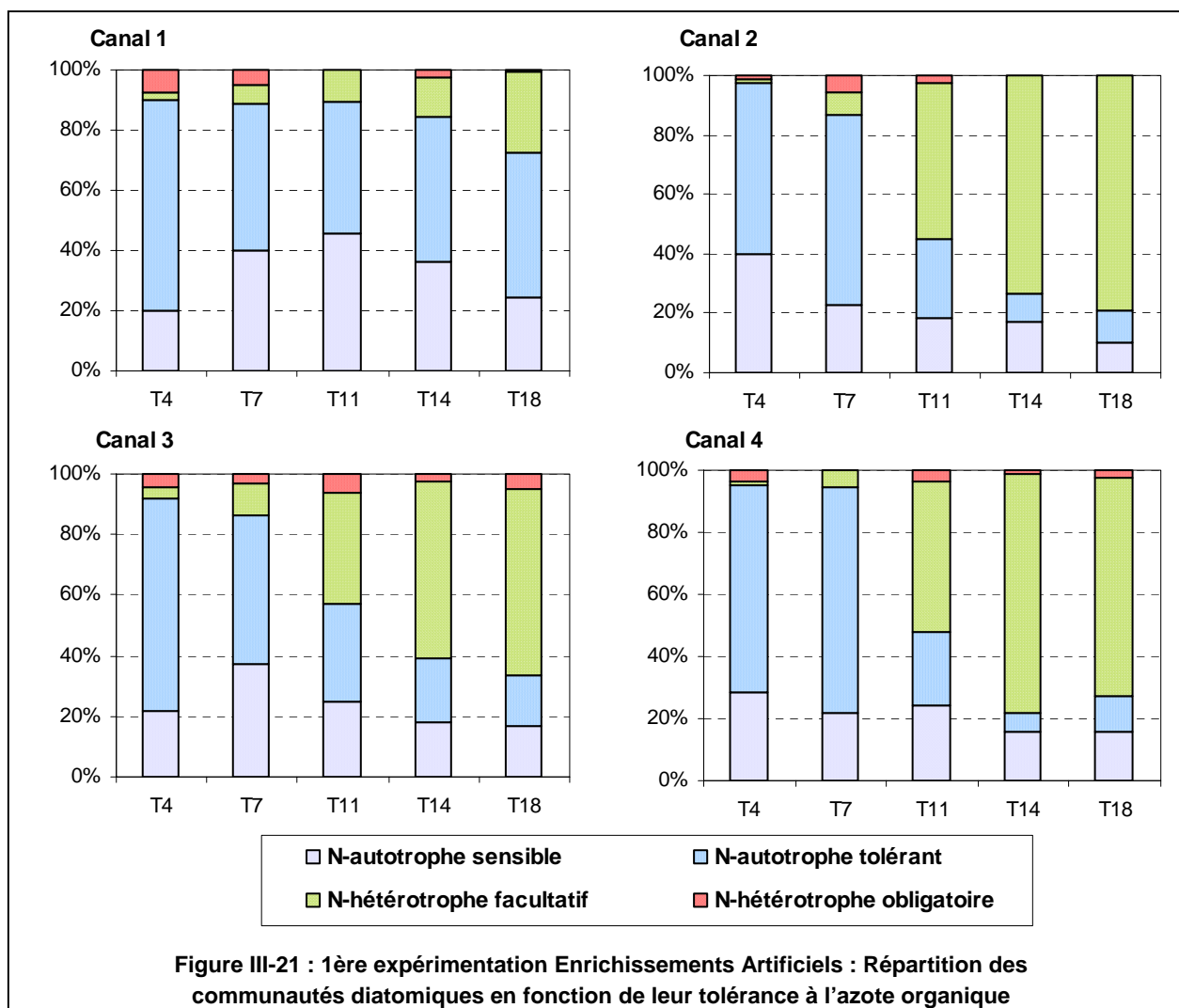
• **N-hétérotrophie** (Figure III-21)

Pour les expériences avec enrichissements différenciés selon les canaux, il a paru intéressant de représenter les abondances de Diatomées en fonction de leur affinité/sensibilité envers l'azote organique selon la classification de Van Dam *et al.* (1994). La figure III-21 présente l'évolution des répartitions de Diatomées ainsi classées, selon les canaux et en fonction du temps.

Les données indiquent une bonne cohérence de la répartition des Diatomées selon l'enrichissement imposé aux canaux. En effet, les communautés N-autotrophes sensibles et tolérantes sont en plus grande proportion dans le canal 1 que dans les autres canaux (valeurs cumulées entre 85 et 70% dans le canal 1 comparativement aux valeurs de 90 à 35% pour les autres canaux).

Au sein des canaux enrichis, les proportions des communautés N-autotrophes sensibles et N-autotrophes tolérantes diminuent au cours du temps contrairement au cas du canal 1. Parallèlement, c'est la quantité de communautés N-hétérotrophes facultatives qui augmente dans les canaux enrichis. Ceci est à corréler à la présence accrue d'azote dans le milieu. Le canal 1, canal témoin non enrichi, présente de faibles teneurs de biomasse (en MSCC) durant l'expérience. De ce fait, les teneurs en matières organiques sont assurément moins élevées que dans les canaux enrichis.

Enfin, on ne note pas d'évolution sensible de la proportion de communautés N-hétérotrophes obligatoires selon les canaux ou en fonction du temps.

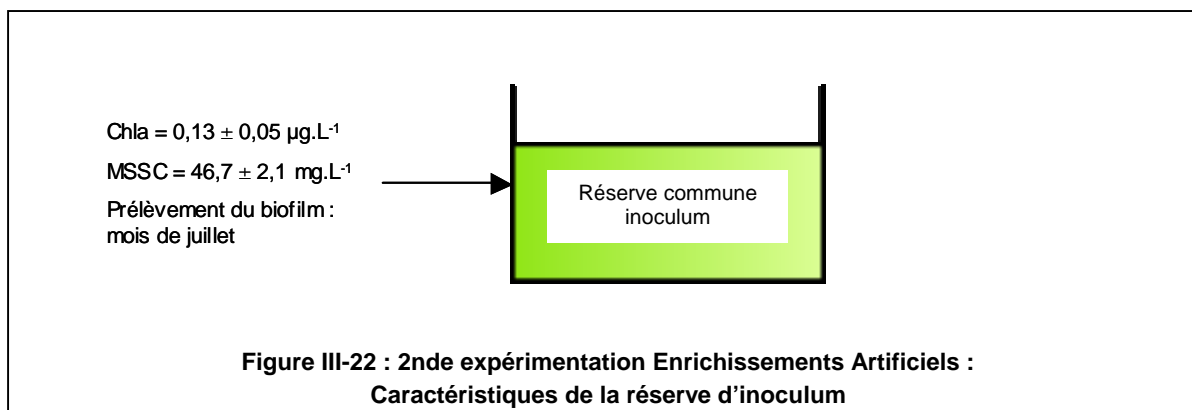


III. 2.2. Seconde expérimentation

III. 2.2.1. Caractérisation physico-chimique de la réserve de biofilm et de l'eau des canaux

Les principales caractéristiques de la réserve d'inoculum constituée pour cette expérience sont présentées à la figure III-22. Les teneurs ainsi que les modalités d'enrichissement en nutriments sont présentées au tableau III-XIII. Dans cette seconde expérimentation d'enrichissements artificiels, nous avons souhaité augmenter les concentrations imposées aux canaux afin de se rapprocher des teneurs rencontrées dans le milieu naturel du fleuve Garonne en aval de la station d'épuration de Toulouse-Ginestous (particulièrement pour le paramètre NO_3^-). De plus, nous voulions éviter un rapport N/P défavorable au

développement des algues (<16), tel que nous l'avons eu dans le canal 3 lors de la première expérience avec enrichissements artificiels.



Des mesures physico-chimiques au sein des quatre réserves des canaux expérimentaux de T8 à T18 nous montrent que les paramètres sont bien homogènes en fonction du temps et sont totalement identiques entre les canaux (Figure III-23). La seule différence apparaît au niveau du canal 1 à la date T15 : il présente une valeur de conductivité légèrement plus élevée que celles relevées dans les autres réserves. On peut également noter des valeurs plus fortes de teneurs en oxygène dissous à la date T8 au sein de tous les canaux (autour de 12 mg.L⁻¹), qui se stabilisent ensuite vers 9 mg.L⁻¹.

Tableau III-XIII : 2nde expérimentation Enrichissements Artificiels : Modalités d'enrichissements (a) et valeurs nominales moyennes des teneurs en nutriments des canaux (b) (mg.L⁻¹) (ligne grisée : canal témoin)

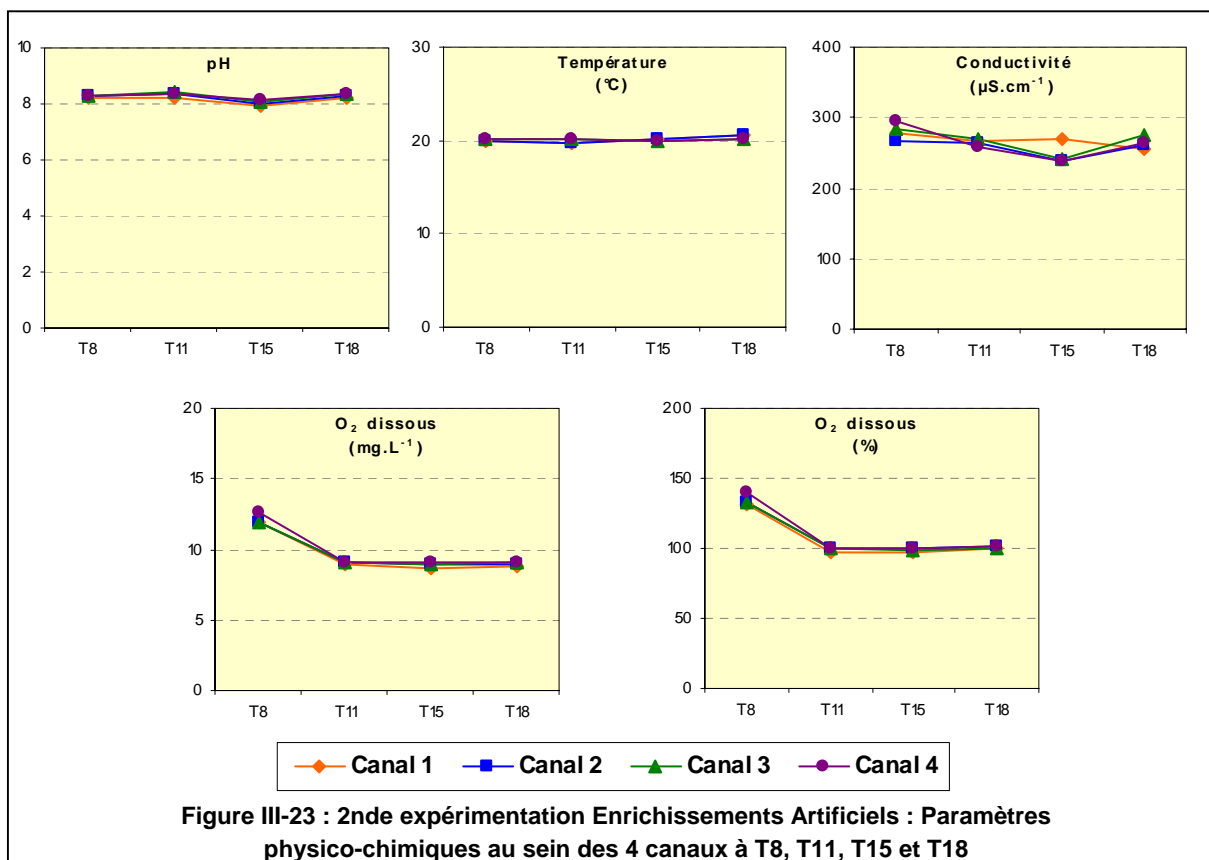
a)

	Canal 1	Canal 2	Canal 3	Canal 4
Charge en P	T	+P	+P	+PP
Charge en N	T	T	+N	+N

T = concentrations de l'eau de la station de référence

b)

	P-PO ₄ ³⁻	N-NO ₃ ⁻	N-NO ₂ ⁻	N-NH ₄ ⁺	N/P
Canal 1	0,012 ± 0,004	0,55 ± 0,09	0,012 ± 0,004	0,044 ± 0,021	123 ± 50
Canal 2	0,081 ± 0,003	0,54 ± 0,09	0,012 ± 0,004	0,039 ± 0,026	16 ± 3
Canal 3	0,079 ± 0,002	2,32 ± 0,21	0,012 ± 0,004	0,037 ± 0,024	66 ± 6
Canal 4	0,163 ± 0,011	2,48 ± 0,16	0,010 ± 0,002	0,035 ± 0,021	34 ± 1



III. 2.2.2. Descripteurs quantitatifs de la croissance du biofilm

➤ Matière sèche sans cendre (Figure III-24)

En termes de MSSC, deux groupes se détachent : d'une part, le canal 1, témoin, qui présente des teneurs en MSSC faibles durant toute l'expérience (autour de $0,1 \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-2}$) et, d'autre part, l'ensemble des canaux enrichis C2, C3 et C4, dont les teneurs évoluent régulièrement au cours du temps.

Entre les canaux enrichis, il n'y a pas de différenciation notable de la croissance du biofilm. Le canal 4 présente des valeurs plus élevées que celles des deux autres canaux enrichis (C2 et C3) mais le fort écart-type atténue tout de même cette différence. En revanche, on observe qu'au sein du canal 2, la biomasse diminue en fin d'expérience (limitation en azote induisant une sénescence du biofilm), tandis que la biomasse développée au sein de C3 et C4 semble continuer à croître.

Les résultats de l'analyse de variance n'indiquent une différence significative entre les canaux qu'aux dates T15 et T18 où les trois canaux enrichis se distinguent du canal 1 témoin (Tableau III-XIV).

➤ **Chlorophylle a** (Figure III-25)

Les résultats observés sur la chlorophylle *a* sont comparables à ceux obtenus sur le paramètre MSSC, avec, d'un côté, le canal témoin et, de l'autre, les trois canaux enrichis. En revanche, il y a une différence marquée sur l'évolution des courbes des canaux enrichis entre T15 et T18 : on observe une baisse de la chlorophylle *a* sur les canaux C3 et C4 (fin de croissance et début de sénescence des biofilms possible même s'il est difficile de l'affirmer compte tenu du faible nombre de réplicats échantillonnés) alors que les valeurs relevées au sein de C2 continuent à augmenter.

Sur le paramètre de la MSSC, les résultats sont significativement différents à T15 et T18. En revanche, en termes de chlorophylle *a*, la probabilité est significative au seuil de 5% de T8 à T18 (Tableau III-XIV). Les résultats du test de comparaisons multiples montrent que :

- à T8 et T11 : le canal 1 est différent des 3 autres canaux qui restent groupés ;
- à T15 : les 4 canaux présentent tous des valeurs significativement différentes ;
- à T18 : on retrouve la même distribution qu'aux dates T8 et T11 : les trois canaux enrichis ne se différencient plus entre eux mais sont distincts du canal 1 témoin. Les canaux les plus enrichis (C3 et C4) présentent une diminution de Chla par rapport à T14.

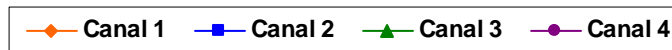
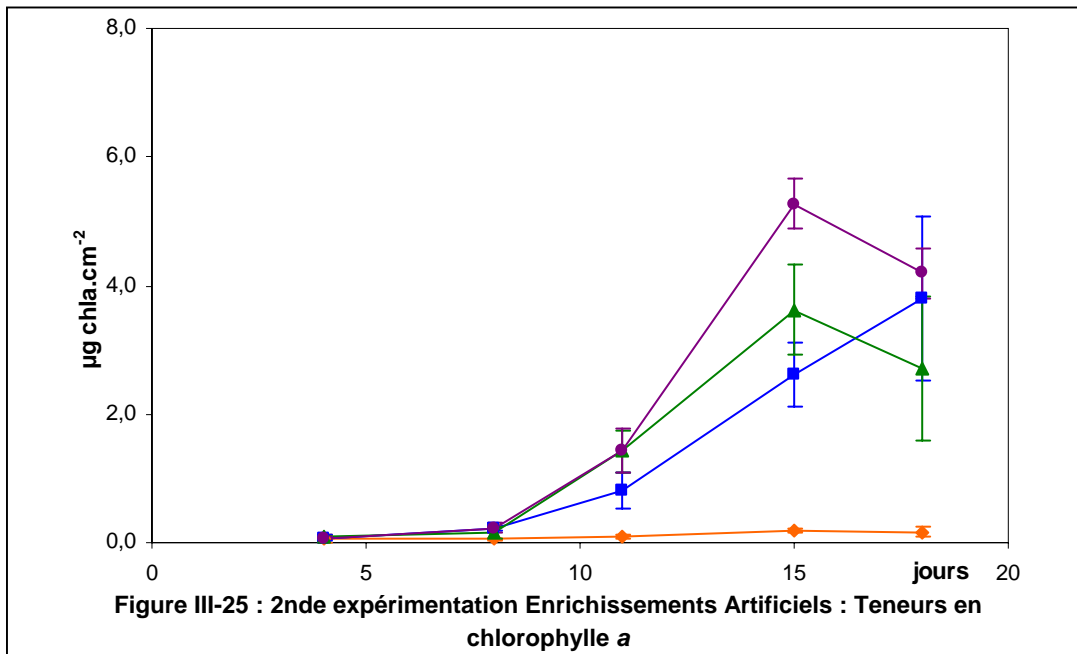
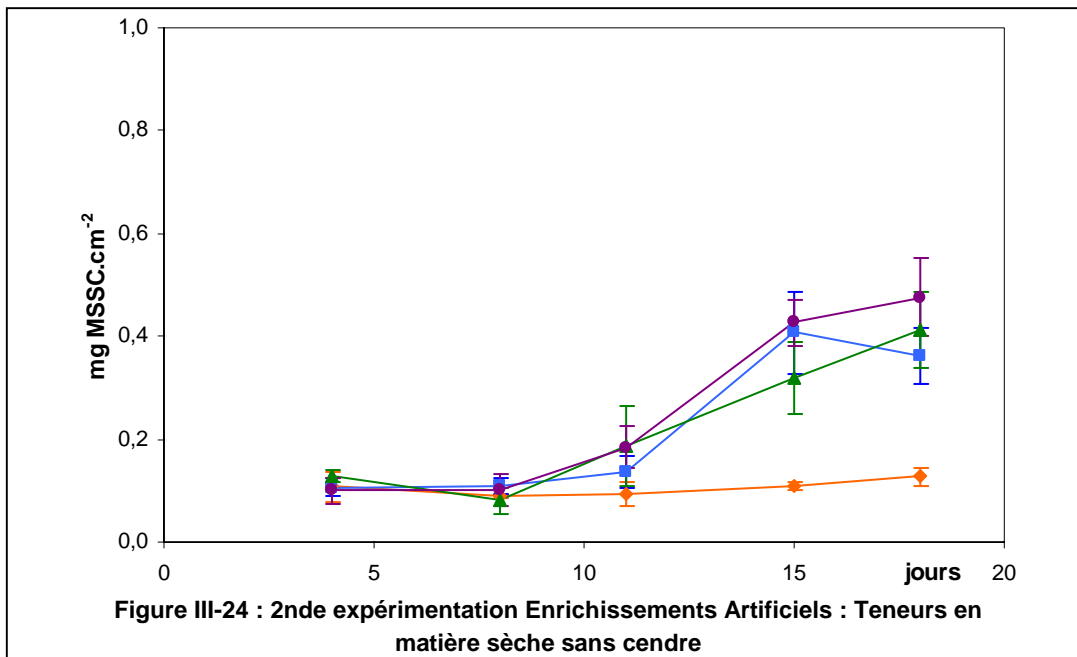


Tableau III-XIV : 2nde expérimentation Enrichissements Artificiels : Résultats des tests d'Anova à un facteur sur MSSC et Chla

Date d'échantillonnage	MSSC		Chla	
	p		p	
T4	0,41	ns	0,94 ¹	ns
T8	0,44	ns	0,02	*
T11	0,14	ns	0,001	*
T15	<0,001	*	<0,001	*
T18	<0,001	*	0,002	*

¹ (condition d'égalité des variances non satisfaite)

➤ **Proportion de bactéries viables** (Figure III-26)

En ce qui concerne le paramètre "Proportion de bactéries viables", les valeurs sont assez dispersées à la première date car le canal 4 présente une proportion beaucoup plus faible que celle des autres canaux. Ensuite, les valeurs s'homogénéisent entre elles et baissent toutes simultanément à la date T15 puis augmentent de nouveau. Il n'y a donc pas de tendance marquée et liée à l'enrichissement en nutriments des canaux. Ces résultats sont peu interprétables quant à leur signification écologique.

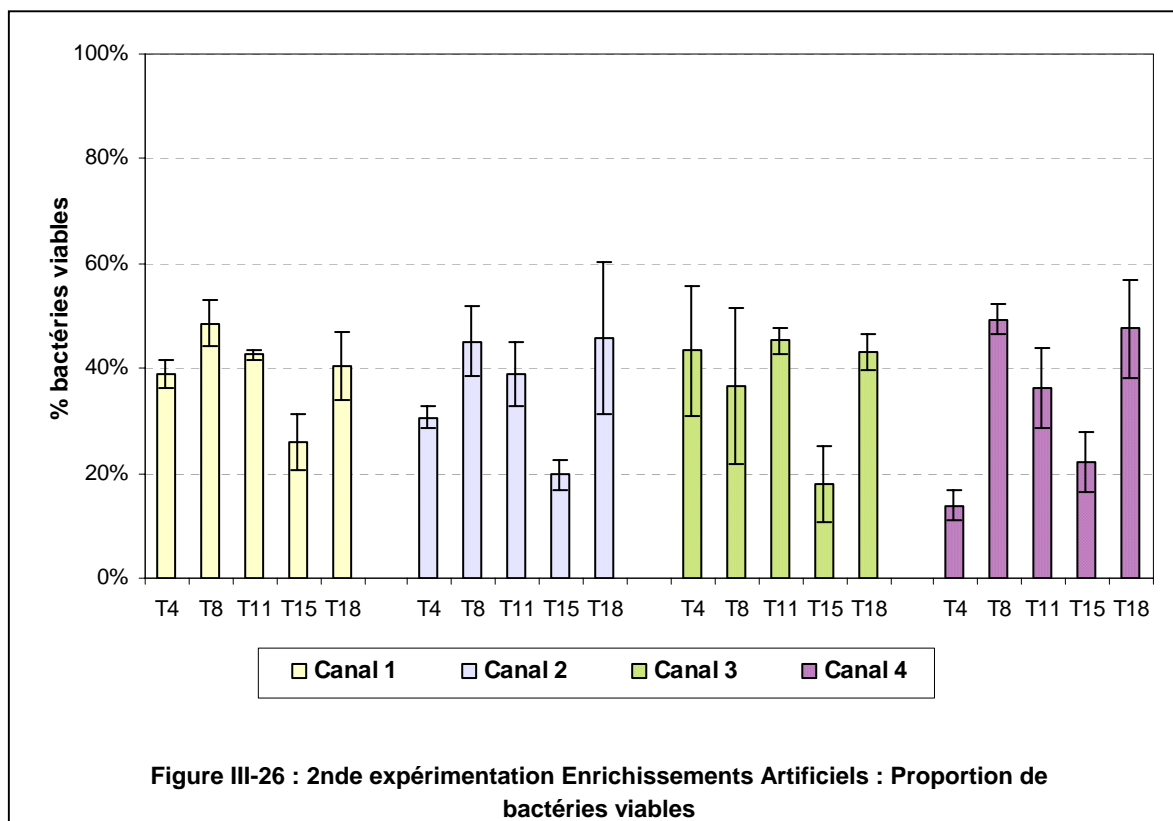


Tableau III-XV: 2nde expérimentation Enrichissements Artificiels : Résultats des tests du χ^2 sur Prop. bact. viables

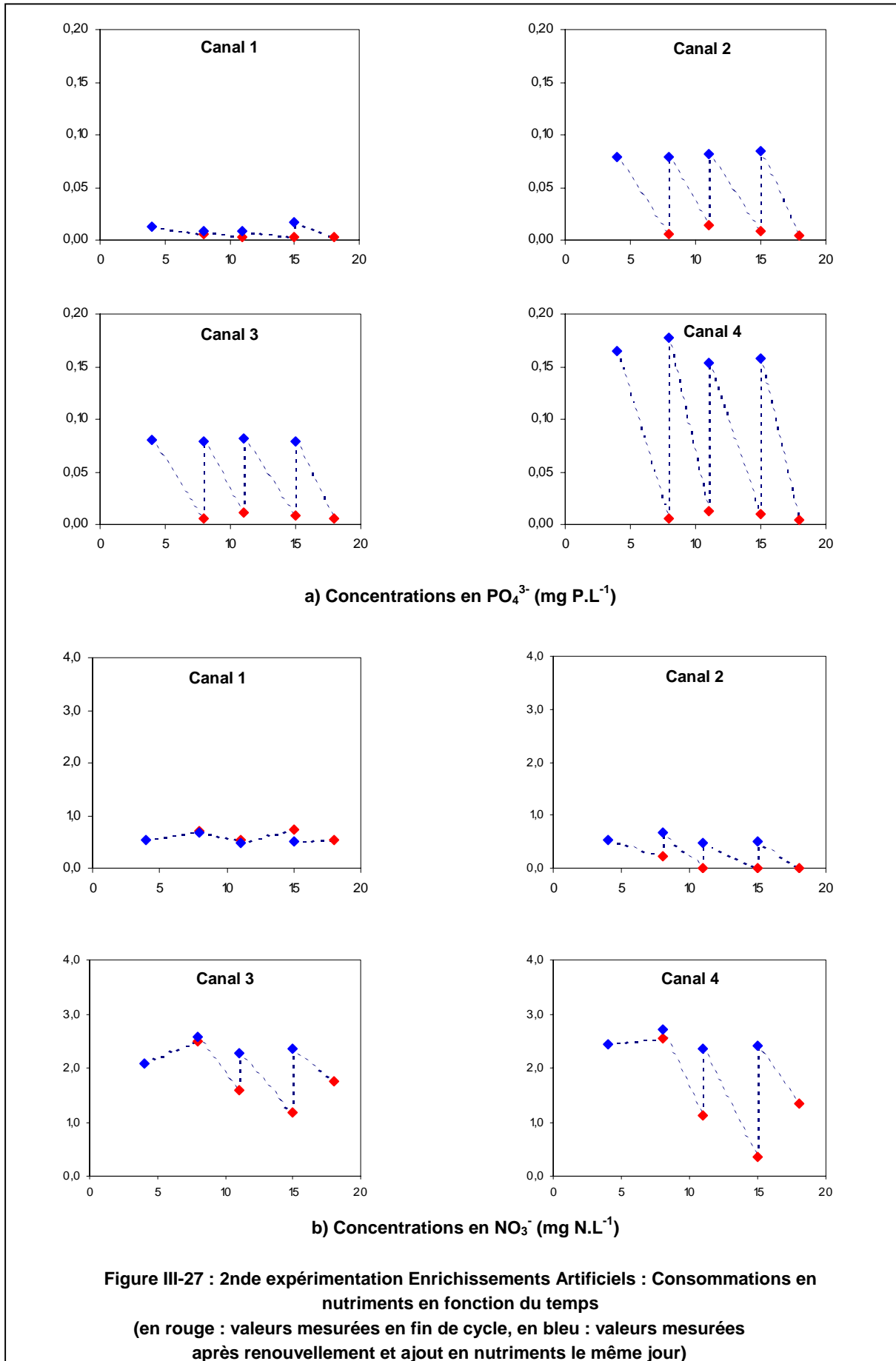
Date d'échantillonnage	Prop. bact. viables	
	p	
T4	<0,001	*
T8	<0,001	*
T11	0,01	*
T15	0,02	*
T18	0,14	ns

III. 2.2.3. Evolution des teneurs en nutriments

Les graphiques des tendances de consommation des nutriments au sein des quatre canaux sont présentés à la figure III-27.

Au niveau des concentrations en PO_4^{3-} , les teneurs en fin de cycle sont faibles mais détectables au sein des canaux 2, 3 et 4. En revanche, les teneurs en PO_4^{3-} dans le canal 1 sont épuisées aux dates T11 et T18 (canal 1 non enrichi et faibles teneurs en PO_4^{3-}).

En ce qui concerne les nitrates, leurs teneurs ne s'épuisent pas au sein des canaux 1, 3 et 4. Comme nous l'avons vu, nous avons souhaité augmenter les teneurs d'ajouts en azote afin d'éviter de créer des limitations en N comme lors de l'expérimentation précédente. Toutefois, au sein du canal 2, même si les teneurs nominales en PO_4^{3-} et NO_3^- induisent un rapport N/P équilibré ($\text{N/P} \approx 16$), la charge en N n'est pas suffisante par rapport au développement de la biomasse et on observe qu'il y a limitation par l'azote aux dates T11, T15 et T18.



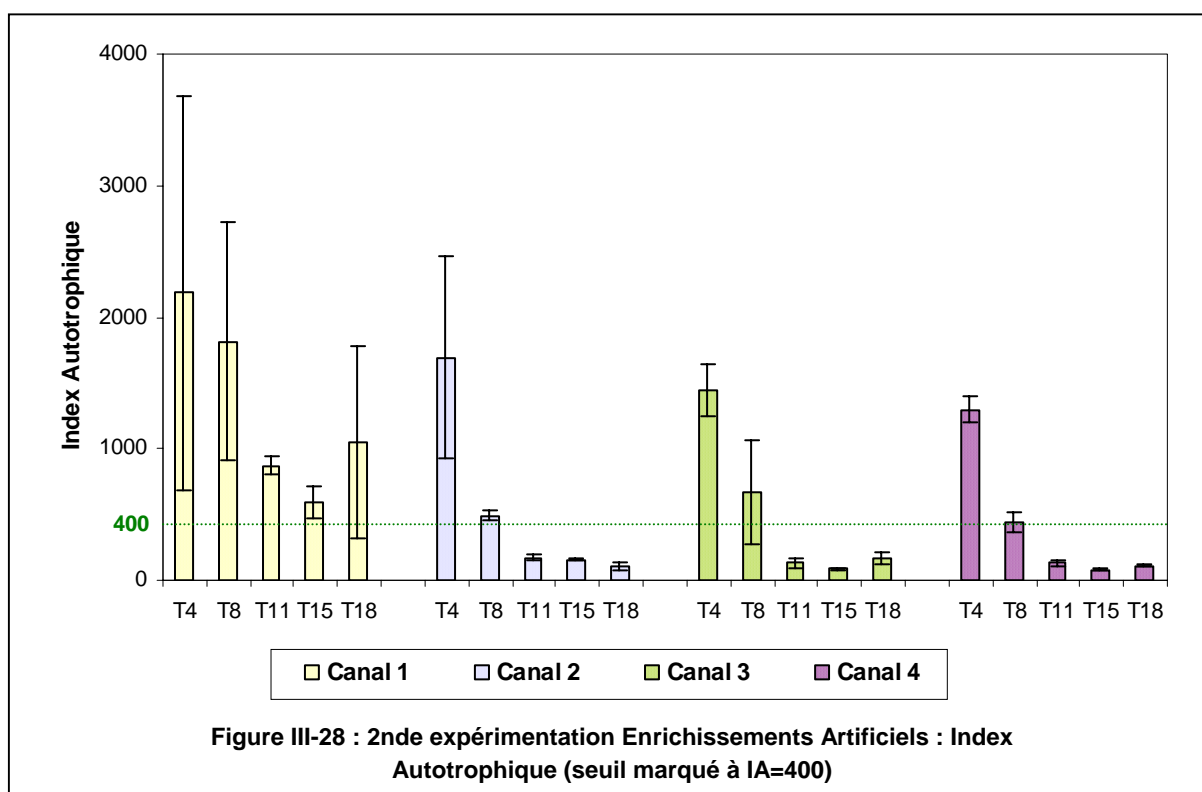
III. 2.2.4. Descripteurs qualitatifs de la croissance du biofilm

➤ **Index Autotrophique** (Figure III-28)

Les valeurs de l'Index Autotrophique signent, comme dans l'expérience précédente, une forte différenciation entre les canaux enrichis et le canal non enrichi. Le canal 1, témoin, conserve des valeurs élevées de l'IA (entre 600 et 1800 en moyenne).

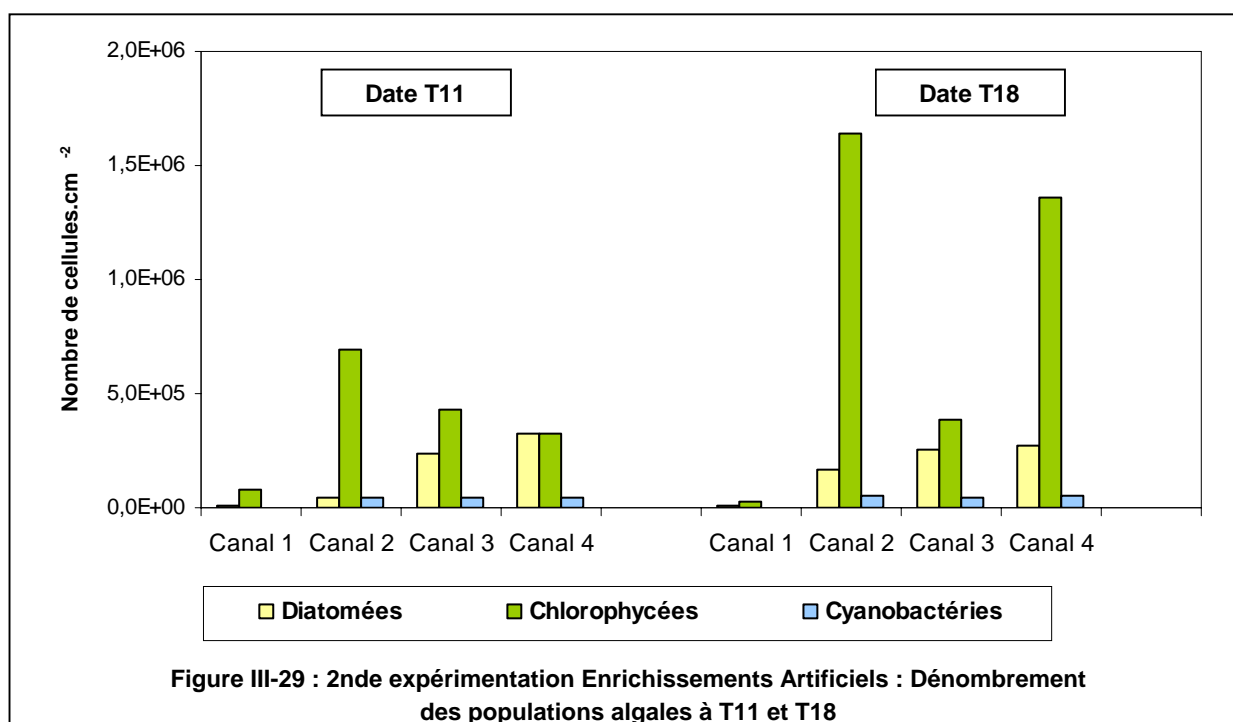
Au sein des canaux enrichis, les valeurs de l'IA diminuent dès la date T7 et sont proches du seuil de 400. Ensuite, les valeurs continuent de diminuer et atteignent des valeurs voisines de 150, indiquant un développement des communautés autotrophes, lié à l'enrichissement de l'eau des canaux en éléments minéraux.

Comme nous avons pu le voir précédemment, les canaux enrichis ne se distinguent que peu par leurs résultats en chlorophylle *a* et MSSC ce qui se reflète également dans l'Index Autotrophique.



➤ **Communautés algales** (Figure III-29)

Les dénombrements algaux ont été effectués à deux dates d'échantillonnage (T11 et T18). Au sein du canal 1, on note un très faible développement à la fois des communautés d'algues vertes et de Diatomées. Au sein des canaux enrichis (C2, C3 et C4), on observe qu'il n'y a pas de corrélation systématique avec les teneurs en Chla relevées. En effet, à T11, le canal 2 est celui qui présente la plus faible teneur en Chla alors qu'il indique une forte quantité en algues vertes. En revanche à T18, le canal 4 et le canal 2, qui affichent à peu près la même teneur en Chla, présentent des dénombrements en Chlorophycées proches et le canal 3 indique une baisse de Chla, ce qui est également visible sur les teneurs en algues vertes. En outre, le canal 4, qui montrait des dénombrements plus faibles en algues vertes que le canal 3 à T11, présente des valeurs nettement supérieures à celles relevées dans le canal 3 à la date T18.



➤ **Compartiment Diatomées**

• **Indice de Polluo-sensibilité Spécifique** (Figure III-30)

Le graphique présentant les notes d'IPS montre clairement la distinction entre le canal témoin non enrichi et les canaux dopés, avec des valeurs d'IPS toujours plus élevées au sein du canal 1. Toutefois, si les

valeurs de l'IPS baissent au cours de l'expérimentation pour les canaux enrichis (IPS de 15 à 3), c'est également le cas, dans une moindre mesure, pour le canal témoin (IPS de 15 à 8). En outre, on note qu'il y a très peu de variation des valeurs entre les trois canaux enrichis (Tableau III-XVI). Ces résultats montrent de nouveau que, malgré les enrichissements distincts imposés aux canaux C2, C3 et C4, les biofilms développés ne se différencient pas nettement.

Il y a là le double signe de conditions eutrophes (canaux enrichis) et d'une température élevée (20°C) imposée durant l'expérimentation et ne correspondant pas à un optimum pour les peuplements de Diatomées.

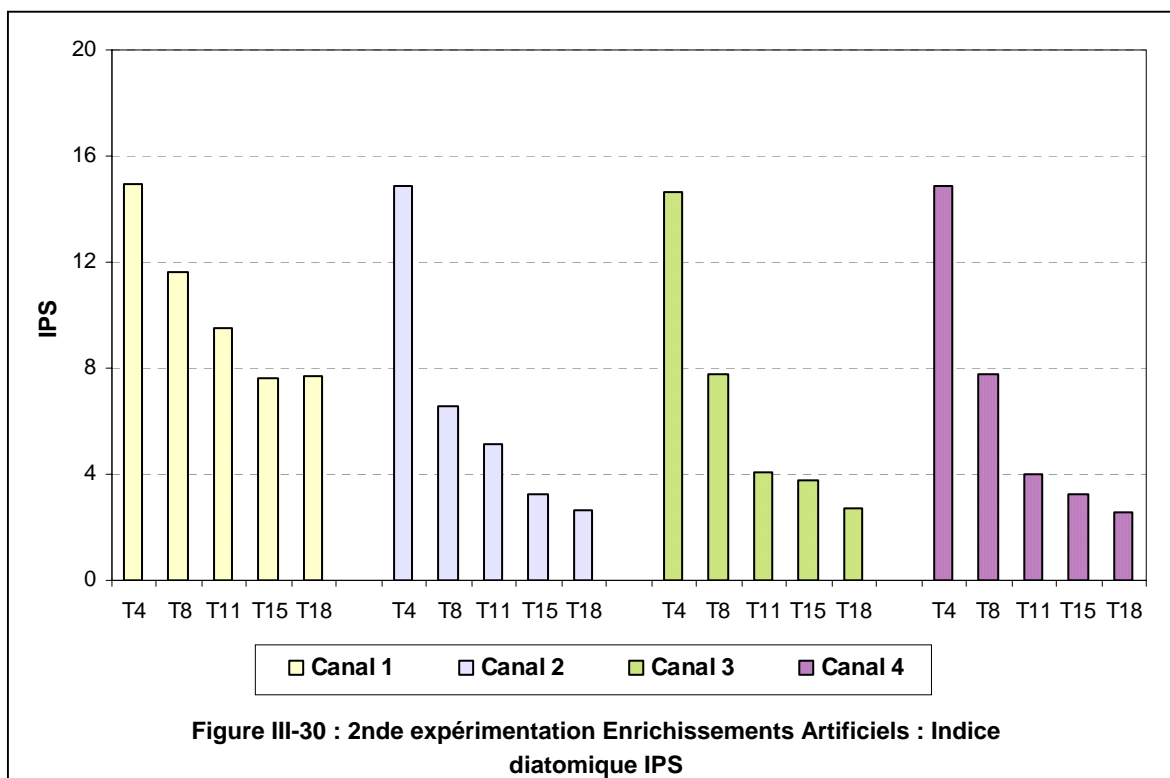


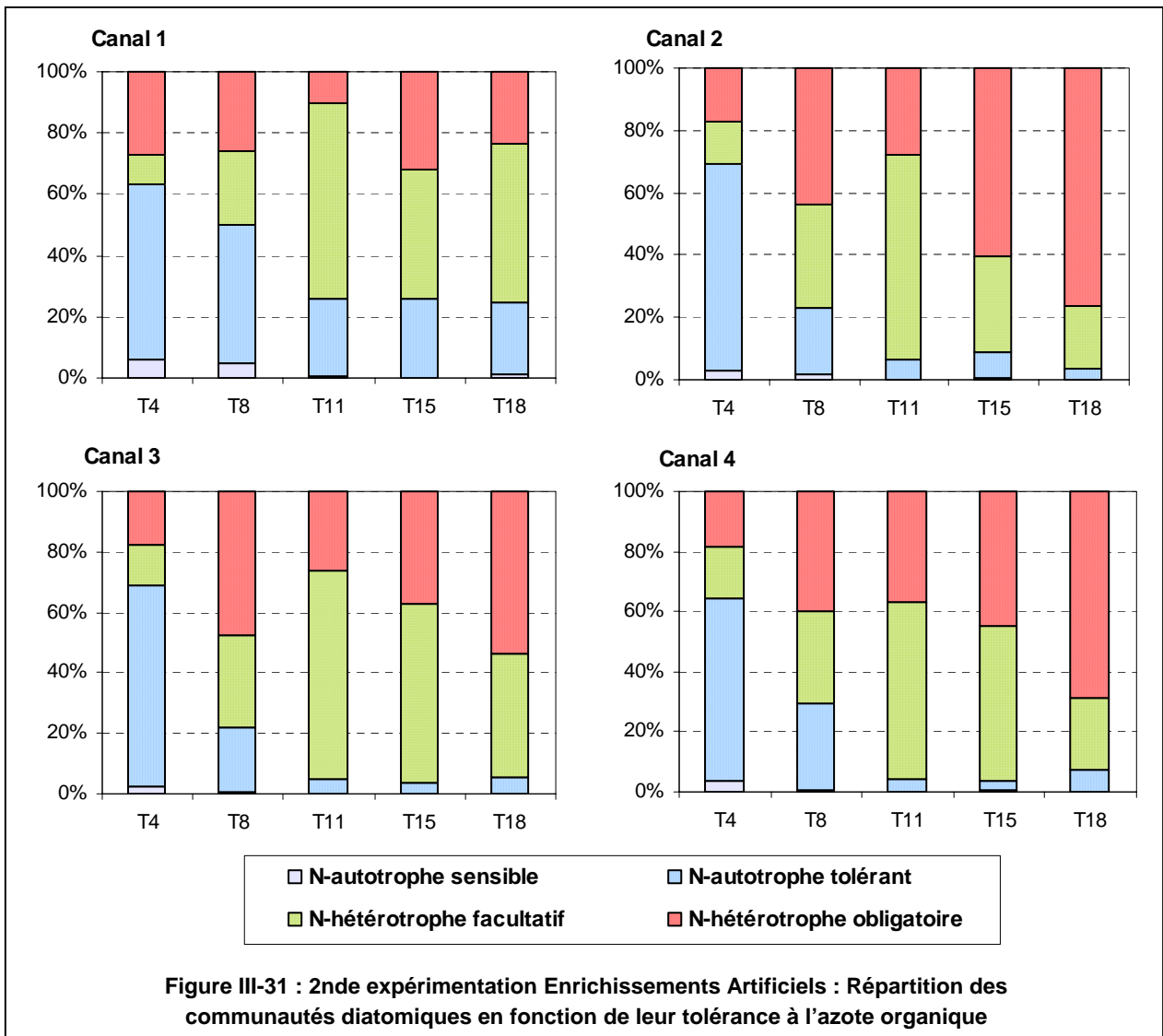
Tableau III-XVI : 2nde expérimentation Enrichissements Artificiels : Moyenne (Moy) et coefficients de variation (CV) sur le paramètre IPS en fonction du temps pour les canaux enrichis C2, C3, C4

Date	Moy	CV
T4	14,8	0,9
T8	7,4	9,7
T11	4,4	14,2
T15	3,4	9,2
T18	2,6	2,1

• **N-hétérotrophie** (Figure III-31)

Les répartitions de populations de Diatomées par classe de N-hétérotrophie, en fonction du temps et par canal, indiquent une différence importante par rapport à l'expérimentation précédente. En effet, on observe la présence à des taux non négligeables de communautés N-hétérotrophes obligatoires, ce qui signe la présence de matière organique tout au long de l'expérimentation (exsudats des algues vertes, fonctionnement autonome des biofilms en recyclage).

Cette proportion de communautés de N-hétérotrophes obligatoires est forte au sein des canaux enrichis (entre 17 et 77%) mais existe également au sein du canal 1 (entre 10 et 28%). Le canal témoin se distingue des autres canaux par une proportion de communautés N-autotrophes tolérantes marquée tout au long de l'expérimentation (entre 23 et 58%). En revanche, comme c'était le cas sur les autres descripteurs du biofilm, les canaux enrichis (C2, C3 et C4) sont peu différenciés sur le paramètre de N-hétérotrophie. La tendance commune à ces trois canaux est la faible part de communautés de Diatomées N-autotrophes sensibles/tolérantes.



III. 2.3. Conclusions

Les deux expérimentations de suivi de biofilms soumis à des enrichissements croissants et différenciés de nutriments ont montré des résultats distincts entre les canaux enrichis et le canal témoin, que ce soit en termes de paramètres quantitatifs ou de paramètres qualitatifs. En revanche, au sein même des canaux enrichis, les évolutions des descripteurs des biofilms ne sont pas toujours du même ordre :

- sur les paramètres MSSC et Chla : lors de la 1^{ère} expérimentation, on observe une croissance régulière dans les canaux enrichis avec des réponses échelonnées en fonction de l'enrichissement, toutefois, les canaux 2 et 3 ne se distinguent que peu étant donné que le canal 3 est limité par l'azote (rapport N/P \approx 10). Dans la 2^{nde} expérimentation, il n'y a pas de distinction entre les canaux enrichis en termes de MSSC. Sur le paramètre de la Chla, la distinction entre les canaux est un peu plus visible : C3 et C4 se détachent mais leur teneur en Chla diminue à la dernière date. Ceci peut faire penser que les teneurs en nutriments n'étaient pas suffisantes pour supporter les quantités de biomasses importantes développées (entre 3,5 et 5,5 $\mu\text{g Chla.cm}^{-2}$) et le canal 2 présente une croissance plus régulière ;
- sur le paramètre "Proportion de bactéries viables" : le caractère commun aux deux expérimentations de l'évolution de ce paramètre est qu'il n'y a pas de tendance marquée en fonction du temps et de l'enrichissement. En revanche, on peut noter qu'il y a de forts écart-types lors de la 1^{ère} expérimentation et des écart-types plus faibles lors de la 2^{nde} ;
- sur le volet des "Communautés algales" : dans la 1^{ère} expérimentation, on a observé une réponse très fortement marquée par les enrichissements et ce, de manière échelonnée. En effet, alors que les diatomées sont présentes dans tous les canaux et à chaque date, les teneurs en Chlorophycées sont de plus en plus importantes en fonction de l'enrichissement en nutriments. Dans la 2^{nde} expérimentation, l'évolution des teneurs en algues ne suit pas directement l'augmentation des teneurs en nutriments. On note que les teneurs du canal 3 diminuent entre T11 et T18 et pour le canal 4, on pouvait attendre une plus forte augmentation que celle que l'on a mesurée. Parallèlement, le canal 2 est celui qui montre la plus forte augmentation des teneurs en Chlorophycées ;
- sur l'IPS et la N-hétérotrophie : les résultats obtenus lors de la 1^{ère} expérimentation indiquent des valeurs d'IPS plus basses dans les canaux enrichis que dans le canal témoin. En outre, les valeurs des canaux enrichis restent groupées et ainsi on n'observe pas d'effet des enrichissements distincts. De la même manière, dans la 2^{nde} expérimentation, les canaux enrichis se distinguent bien du canal témoin mais pas entre eux. En ce qui concerne la N-hétérotrophie, les résultats ne sont pas similaires entre les deux expériences (tendance majoritaire de N-hétérotrophes facultatives dans la 1^{ère} expérimentation et de N-hétérotrophes obligatoires dans la 2^{nde}) mais le caractère commun est que l'on ne différencie pas les canaux enrichis entre eux dans chacune des expériences.

III. 3 • CROISSANCE DE BIOFILMS EN EAUX NATURELLES

L'objectif de cette expérimentation, également conduite en conditions maîtrisées de laboratoire, est d'étudier le développement de biofilms soumis aux eaux prélevées directement à nos stations d'étude sur la Garonne (cf. Chapitre II, II. 2.1.1. a) Description des stations d'étude p. 85). Dans cette expérimentation, l'eau est ramenée du terrain deux fois par semaine pour alimenter les canaux. De ce fait, à la différence des expérimentations précédentes, la qualité de l'eau au cours du temps est soumise aux fluctuations naturelles du cours d'eau.

Nous avons travaillé par paires de canaux :

- **Site Toulouse** : les canaux 1 et 2 sontensemencés par du biofilm de la station amont (Aouach) et soumis respectivement à l'eau des stations amont et aval encadrant la station d'épuration de Toulouse-Ginestous (Aouach et Ramier) ;
- **Site St Pierre de Gaubert** : les canaux 3 et 4 sontensemencés par du biofilm de la station amont (Sauveterre) et soumis respectivement à l'eau des stations amont et aval, qui encadrent la station d'épuration de Saint-Pierre de Gaubert (Sauveterre et Boé).

Les renouvellements d'eau et les prélèvements de lames suivent le même rythme que lors des expériences précédentes. Du fait de l'ensemencement différent par deux biofilms de stations "amont", les résultats de cette expérimentation ont été traités séparément et sont exposés en vis-à-vis.

III. 3.1. Caractérisation physico-chimique de la réserve de biofilm et de l'eau des canaux

La figure III-32 présente les caractéristiques des deux réserves d'inoculum en ce qui concerne les teneurs en MSSC et chlorophylle a.

Les valeurs moyennes des concentrations en nutriments relevées au sein des quatre canaux durant l'expérimentation sont présentées dans le tableau III-XVII.

Au niveau des canaux du site de Toulouse, on note que la qualité de l'eau des canaux amont et aval se différencie sur chaque paramètre dosé (PO_4^{3-} , NO_3^- , NO_2^- et NH_4^+), l'eau du canal aval étant nettement plus enrichie. En revanche, sur le paramètre N/P, les deux canaux présentent une limitation par le phosphore, ce qui est le cas le plus fréquent des eaux douces.

Au niveau du site de St Pierre de Gaubert, il faut noter que les teneurs en PO_4^{3-} et NO_3^- semblent se différencier entre les canaux amont et aval mais cela est dû à des teneurs en éléments N et P ponctuellement plus élevées pour le canal amont à la dernière date, induisant ainsi de forts écart-types. Si on ne tient pas compte de cette dernière valeur¹, les teneurs en nutriments sont du même ordre au sein

¹ (seconde ligne du Canal Amont P dans le tableau III-XVII)

des deux canaux. La valeur du rapport N/P, qui est du même ordre de grandeur pour les deux canaux, signe une limitation en P plus faible que pour les canaux du site précédent de Toulouse.

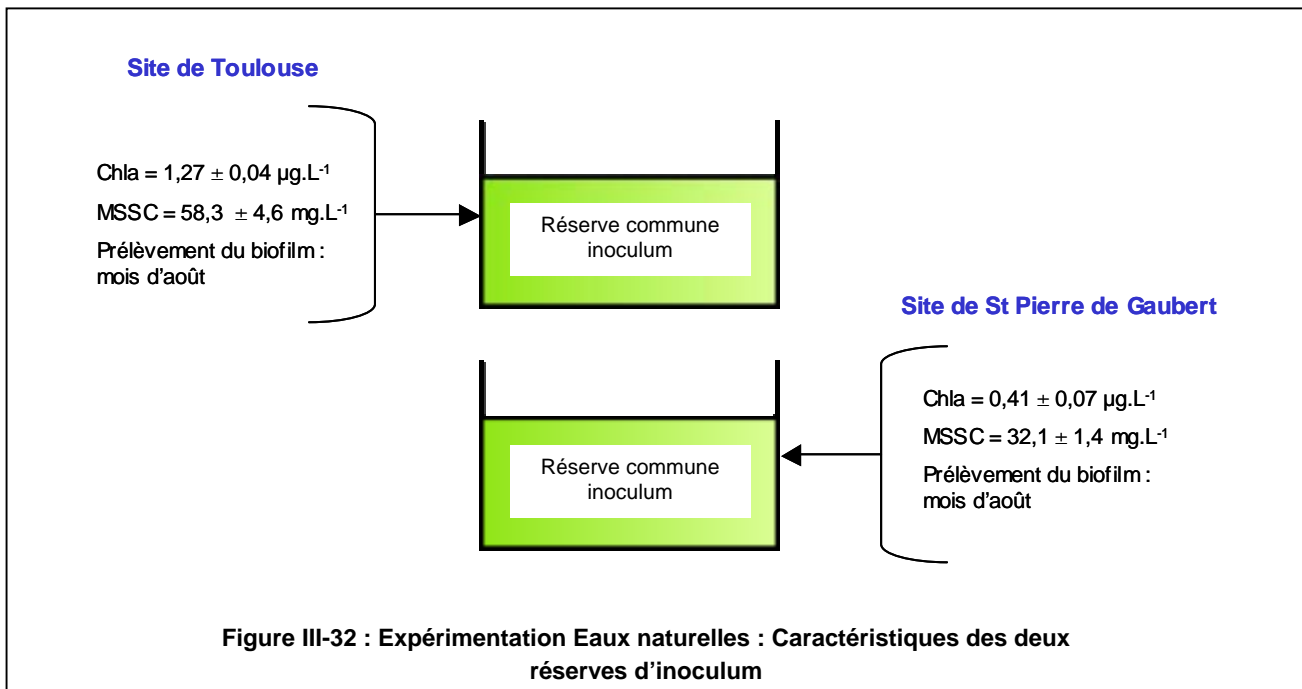


Tableau III-XVII : Expérimentation Eaux naturelles : Valeurs nominales moyennes des teneurs en nutriments des canaux (mg.L^{-1})

	P-PO_4^{3-}	N-NO_3^-	N-NO_2^-	N-NH_4^+	N/P
Canal Amont T*	$0,017 \pm 0,008$	$0,41 \pm 0,12$	$0,011 \pm 0,010$	$0,129 \pm 0,127$	85 ± 38
Canal Aval T*	$0,068 \pm 0,020$	$1,04 \pm 0,04$	$0,210 \pm 0,030$	$0,560 \pm 0,074$	62 ± 14
Canal Amont P**	$0,120 \pm 0,129$	$0,90 \pm 0,49$	$0,022 \pm 0,003$	$0,092 \pm 0,021$	27 ± 10
<i>Canal Amont P** sans prise en compte de la dernière date</i>	$0,056 \pm 0,017$	$0,66 \pm 0,14$	$0,021 \pm 0,003$	$0,093 \pm 0,026$	31 ± 3
Canal Aval P**	$0,064 \pm 0,008$	$0,66 \pm 0,16$	$0,025 \pm 0,002$	$0,090 \pm 0,029$	27 ± 3

* Amont / Aval T : Amont / Aval de la station d'épuration de Toulouse-Ginestous

** Amont / Aval P : Amont / Aval de la station d'épuration de St Pierre de Gaubert

III. 3.2. Descripteurs quantitatifs de la croissance du biofilm

➤ **Matière sèche sans cendre** (Figure III-33)

Site Toulouse :

L'évolution de la croissance des biofilms, décrite par le paramètre "Matière sèche sans cendre", est régulière mais relativement faible, que ce soit pour le canal amont ou pour le canal aval (valeurs en moyenne de 0,2 à 0,6 mg MSSC.cm⁻²).

Malgré l'enrichissement en nutriments nettement différent entre les eaux des deux stations, les canaux ne se différencient qu'à la dernière date d'échantillonnage (T19), où les résultats du test statistique de comparaison indiquent une différence significative au seuil de 5%, avec des teneurs en MSSC supérieures dans le canal aval (Tableau III-XVIII).

Site St Pierre de Gaubert :

Les résultats des teneurs en MSSC ne se distinguent pas au cours de l'expérimentation entre les deux canaux et présentent une évolution régulière (d'environ 0,3 à 0,8 mg MSSC.cm⁻²). Cette évolution analogue entre les deux canaux amont et aval est confirmée par les résultats du test de comparaison qui n'indiquent aucune différence significative au seuil de 5% (Tableau III-XVIII).

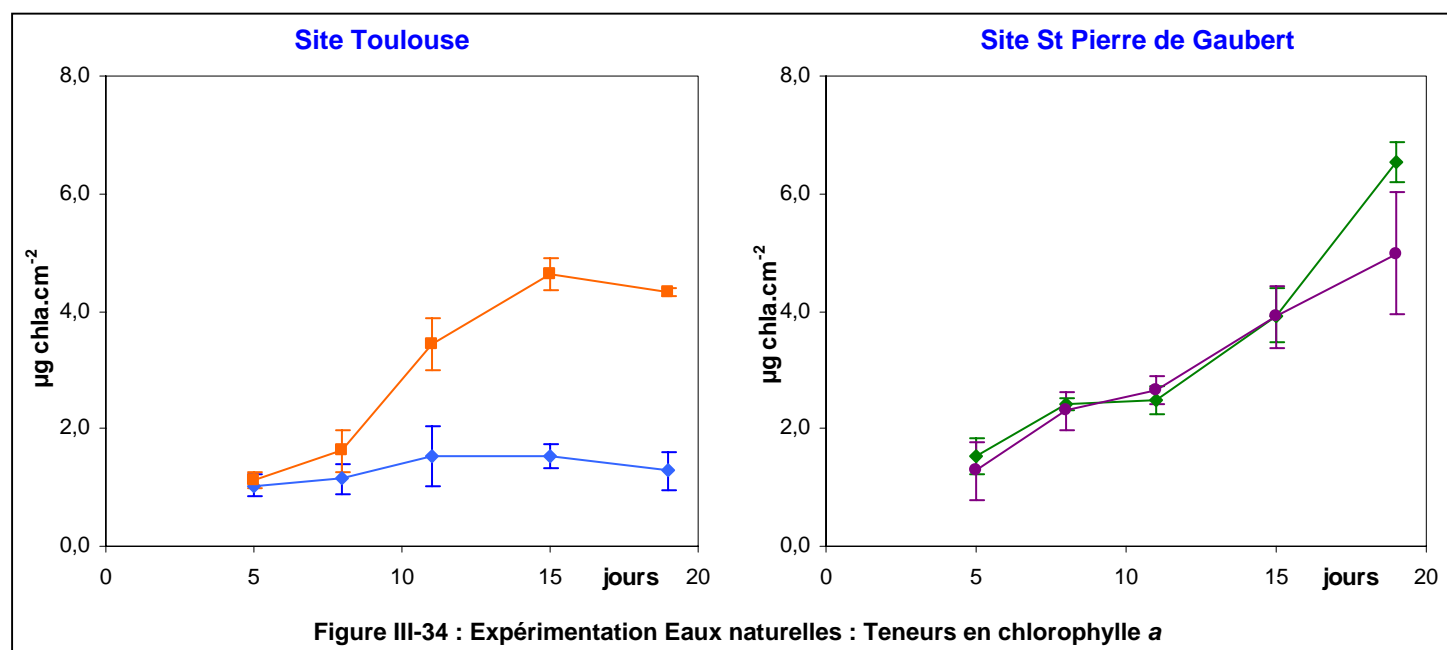
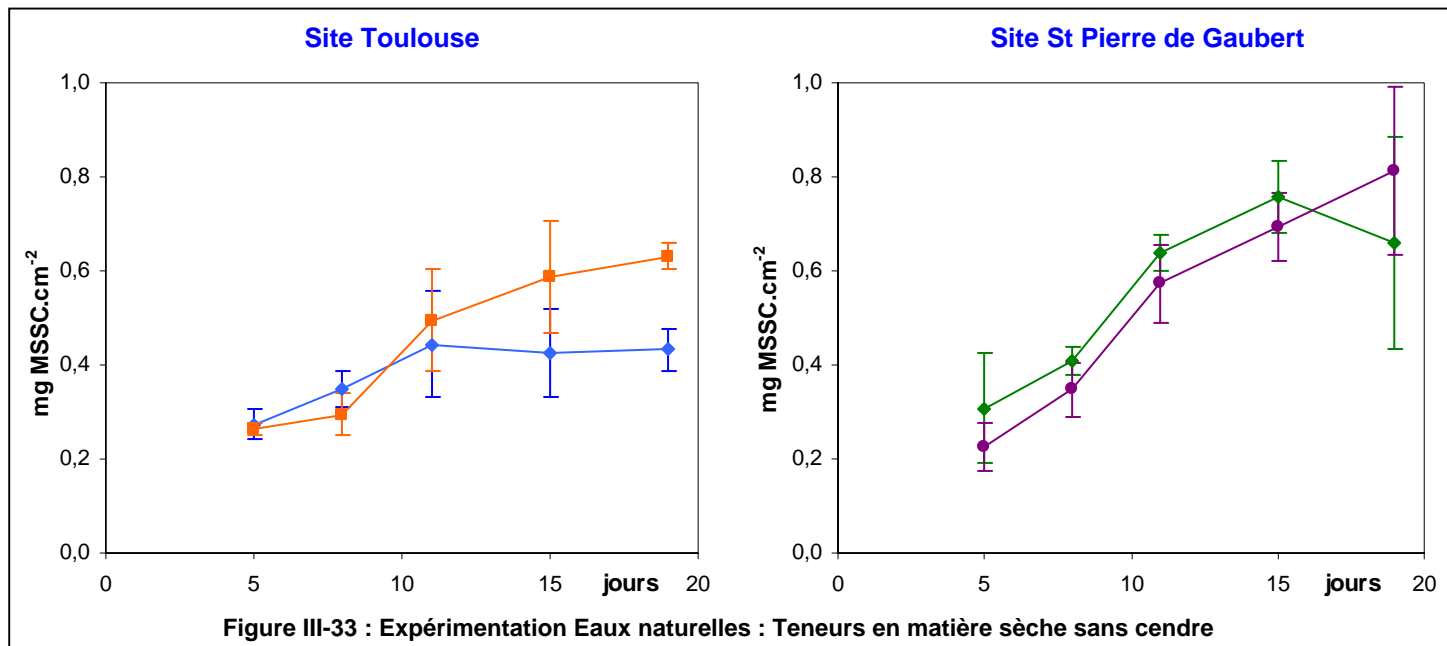
➤ **Chlorophylle a** (Figure III-34)

Site Toulouse :

Contrairement aux résultats de MSSC, l'évolution en chlorophylle a montre des résultats différenciés entre les canaux amont et aval. C'est dès la date T11 qu'il y a un décrochement entre les valeurs des deux canaux, ce qui est confirmé par les résultats du test de Student (Tableau III-XVIII). Les teneurs en chlorophylle a sont plus élevées au sein du canal aval (de 1 à 5 µg.cm⁻²), valeurs environ 3 fois supérieures à celles du canal amont en fin d'expérimentation. En revanche, les deux canaux présentent tous deux la même tendance en fin d'expérience à savoir une légère diminution des teneurs en chlorophylle a.

Site St Pierre de Gaubert :

Les résultats en termes de chlorophylle a rendent globalement compte des mêmes faits que ceux observés sur le paramètre MSSC, c'est-à-dire une évolution comparable entre les deux canaux. La seule différence se situe à la dernière date où les teneurs en chlorophylle a relevées dans le canal amont sont visuellement plus fortes que celles obtenues au sein du canal aval, même si ce constat ne ressort pas statistiquement au seuil de 5% ($p_{T19}=0,07$). Ceci peut être corrélé aux teneurs en nutriments plus élevées de l'eau du canal amont lors du dernier renouvellement des réserves de milieu. Et ainsi, ce résultat indiquerait que c'est avec un temps de réponse relativement court que le biofilm répond aux variations de qualité d'eau.



(T : Toulouse)

(P : St Pierre de Gaubert)

Tableau III-XVIII : Expérimentation Eaux Naturelles : Résultats des tests d'Anova à un facteur sur MSSC et Chla

Date d'échantillonnage	Canaux Site Toulouse				Canaux Site St Pierre de Gaubert			
	MSSC		Chla		MSSC		Chla	
	p		p		p		p	
T5	0,60	ns	0,52	ns	0,33	ns	0,50	ns
T8	0,19	ns	0,14	ns	0,17	ns	0,62	ns
T11	0,61	ns	0,008	*	0,28	ns	0,39 ¹	ns
T15	0,14	ns	<0,001	*	0,35	ns	0,96	ns
T19	0,003	*	<0,001	*	0,41	ns	0,07	ns

¹ (condition de normalité non satisfaite)

➤ **Proportion de bactéries viables** (Figure III-35)

Site Toulouse :

La proportion de bactéries viables augmente au sein des deux canaux en fonction du temps. Cette augmentation est plus marquée pour le canal amont au sein duquel les valeurs passent de 8% à 54% alors qu'elles n'évoluent que de 9% à 22% pour le canal aval. Toutefois, précisons que les valeurs des deux canaux ne sont significativement différentes qu'à la dernière date (Tableau III-XIX).

Les résultats obtenus sur le paramètre de la chlorophylle *a* indiquent un développement plus faible des algues dans le canal amont. Ainsi, on peut penser qu'au sein de ce canal, les phénomènes d'inhibition des algues envers les bactéries sont moins forts et permettent une proportion plus accrue de bactéries viables.

Site St Pierre de Gaubert :

Les résultats indiquent également une augmentation de la part en bactéries viables au cours de l'expérimentation, que ce soit pour le canal amont ou pour le canal aval. Les valeurs à la date finale se situent aux alentours de 40%.

Les proportions de bactéries viables sont assez proches entre les deux canaux sauf en début d'expérimentation (T5 et T8), où le canal amont présente des proportions plus élevées mais avec des écart-types importants (Tableau III-XIX).

On observe ici que l'on ne peut pas effectuer de comparaison entre les quantités de chlorophylle *a* et les proportions de bactéries viables de manière transversale entre deux expérimentations. En effet, pour le site de Toulouse, le canal aval présente à T19 environ 20% de bactéries viables pour un taux de Chla de 5 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ alors que pour le site de St Pierre de Gaubert, avec des teneurs en Chla autour de 6 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ à T19, la proportion moyenne de bactéries viables est assez élevée et se situe aux alentours de 40%.

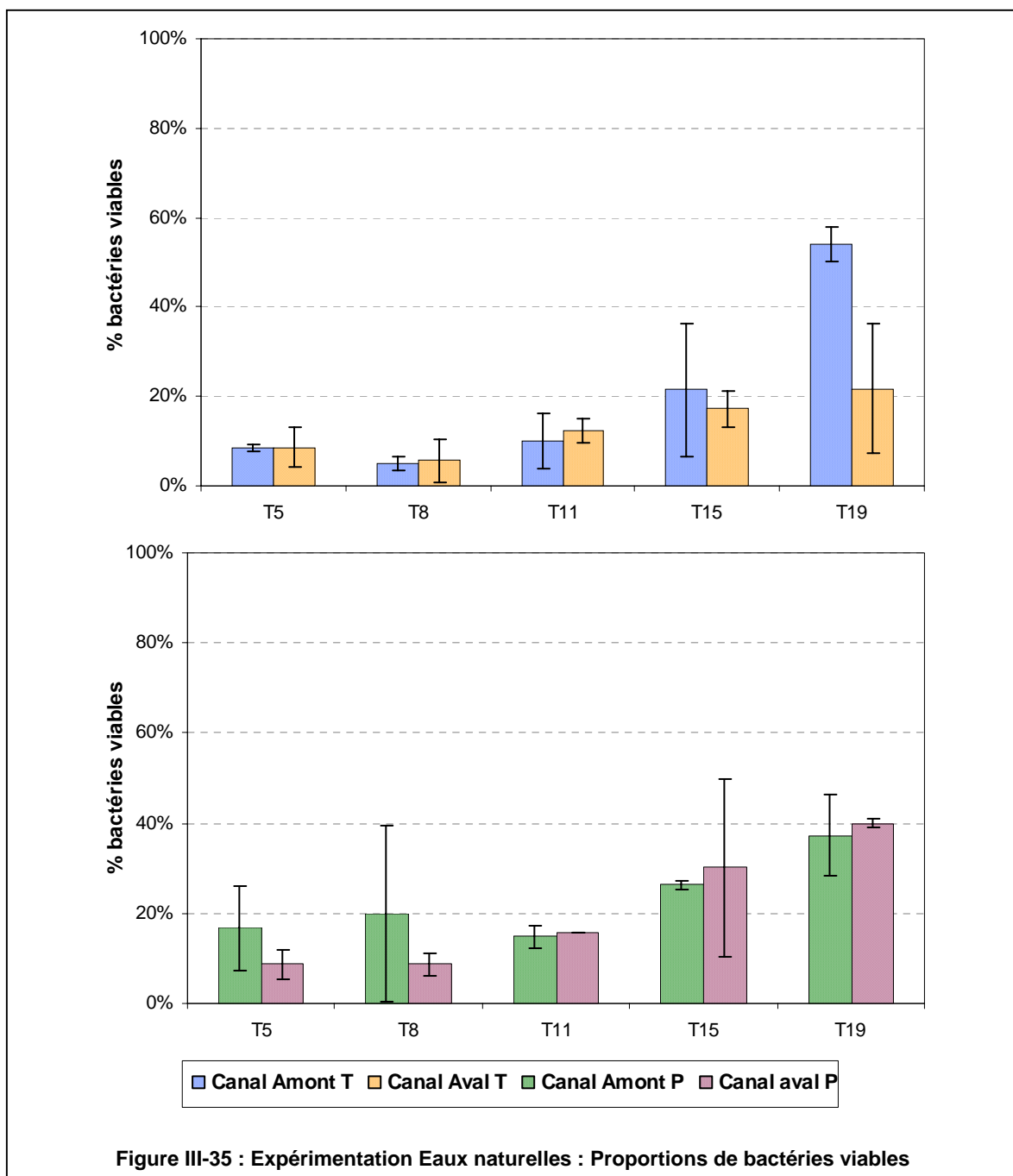


Tableau III-XIX : Expérimentation Eaux naturelles : Résultats des tests du Chi^2 sur Prop. bact. viables

Date d'échantillonnage	Canaux Site Toulouse		Canaux Site St Pierre de Gaubert	
	p		p	
T5	0,89	ns	0,02	*
T8	0,72	ns	0,78	ns
T11	0,55	ns	0,98	ns
T15	0,17	ns	0,50	ns
T19	<0,001	*	0,91	ns

III. 3.3. Evolution des teneurs en nutriments

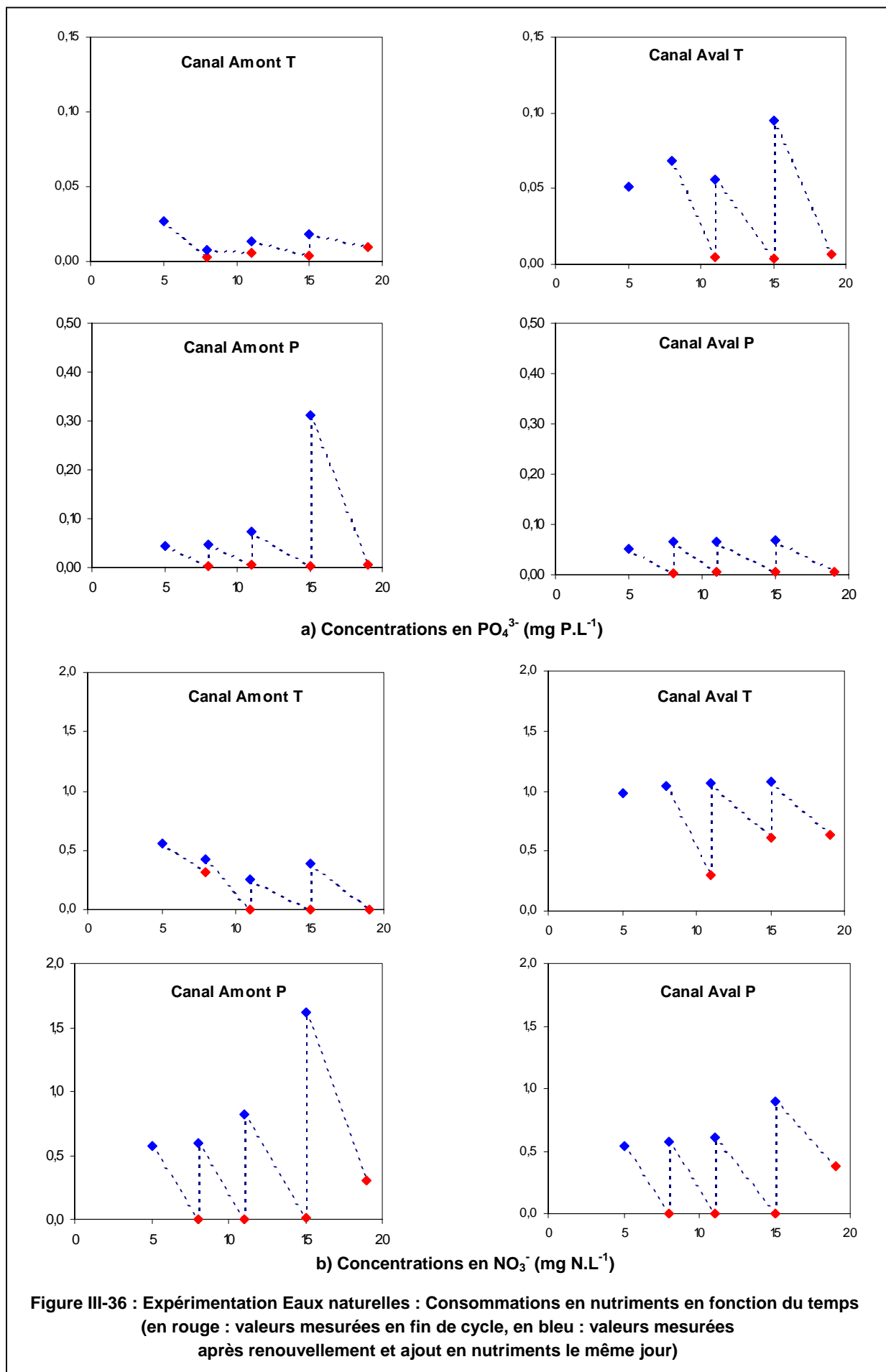
Site Toulouse :

Les graphiques des allures de consommation en nutriments sont présentés à la figure III-36. En ce qui concerne le phosphore, la tendance est commune pour les deux canaux, leur réserve de milieu est caractérisée par des teneurs en PO_4^{3-} proches de 0 à chaque fin de cycle, en restant toutefois détectables à l'analyse. Néanmoins, nous pouvons souligner le fait que des teneurs en nutriments basses ont pour effet de ralentir la croissance du biofilm même si elle n'est pas totalement arrêtée.

Au niveau des teneurs en NO_3^- , les résultats indiquent une différenciation intéressante. En effet, dans le cas du canal amont, une limitation en N intervient à partir de la date T11 alors que les teneurs en NO_3^- du canal aval ne sont pas épuisées en fin de cycle.

Site St Pierre de Gaubert :

Que ce soit sur le paramètre PO_4^{3-} ou NO_3^- , on observe la même allure de consommation des nutriments pour le canal amont et le canal aval. En ce qui concerne les phosphates, la quasi-totalité est consommée sur chacun des cycles pour les deux canaux (valeurs résiduelles proches du seuil de détection). Pour les nitrates, la consommation est totale sur chaque intervalle de temps sauf au dernier où l'on observe, à T19, une teneur résiduelle en NO_3^- au sein des deux canaux (due aux fluctuations de la qualité de l'eau rapportée de manière régulière du terrain).



III. 3.4. Descripteurs qualitatifs de la croissance du biofilm

➤ **Index Autotrophique** (Figure III-37)

Site Toulouse :

Comme nous avons pu le voir à travers les résultats précédents de MSSC et chlorophylle *a*, la source de variation des valeurs d'IA entre les deux canaux doit provenir des valeurs de chlorophylle *a* et non de MSSC.

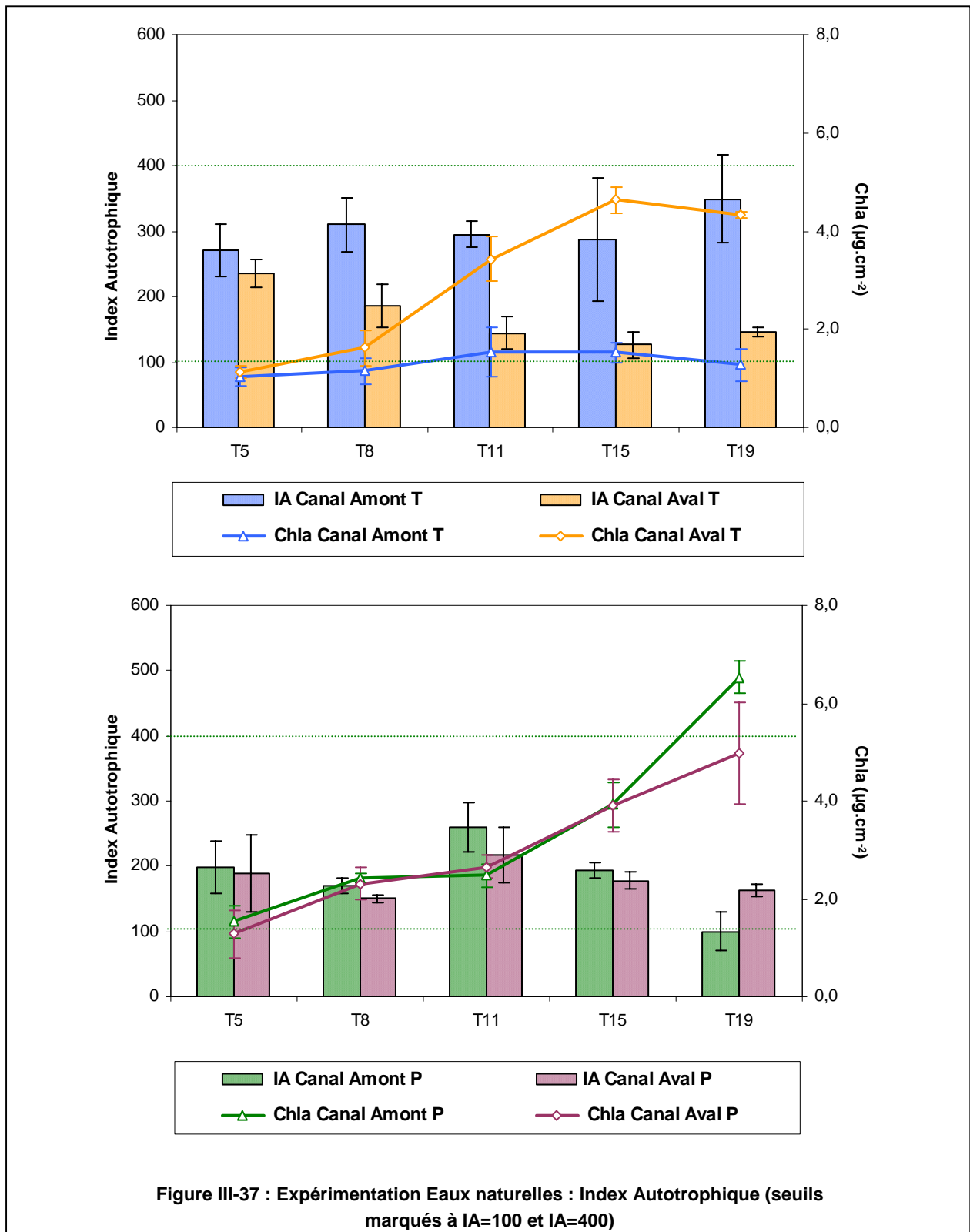
Que ce soit pour le canal amont ou le canal aval, les valeurs de l'IA sont comprises dans l'intervalle 100-400 tout au long de l'expérimentation, ce qui indique un assemblage entre les communautés autotrophes et hétérotrophes. En revanche, les valeurs de l'IA évoluent peu au sein du canal amont alors qu'elles tendent à diminuer dans le canal aval, illustrant ainsi une tendance vers une majorité de communautés autotrophes au fur et à mesure du développement du biofilm. Cette différenciation entre les canaux était déjà illustrée au niveau des teneurs en chlorophylle *a* (plus élevées pour le canal aval) et de la proportion de bactéries viables (plus importante pour le canal amont).

Ainsi, on peut conclure que, même si on ne dénote pas de différence sensible en termes de biomasse totale entre les deux canaux (en MSSC), la composition du peuplement évolue de manière différente, avec une tendance à l'autotrophie dans le cas du canal aval, enrichi en nutriments.

Site St Pierre de Gaubert :

Nous avons vu précédemment que les teneurs en MSSC et chlorophylle *a* restent comparables entre les canaux amont et aval au cours de l'expérimentation (mise à part à la date T19 sur le paramètre chlorophylle *a*). Ainsi, les valeurs d'Index Autotrophique pour les deux canaux sont proches.

Les résultats indiquent des valeurs d'IA relativement faibles tout au long de l'expérience (entre 100 et 260), illustrant une association de communautés autotrophes et hétérotrophes. Les valeurs de l'IA au sein du canal amont sont supérieures à celles observées dans le canal aval à toutes les dates, sauf à T19 où nous avons précédemment noté des teneurs plus élevées en chlorophylle *a*, reliées certainement aux modifications de la qualité d'eau du milieu.



➤ **Communautés algales** (Figure III-38)

Site Toulouse :

Le dénombrement des communautés algales a été effectué à trois dates d'échantillonnage : T8, T15 et T19. On observe, tout d'abord, une forte disparité dans le nombre total d'algues décomptées entre les deux canaux ; le canal aval affiche des teneurs en algues de 2 à 5 fois supérieures.

Au sein du canal amont, les Diatomées sont majoritaires aux trois dates d'échantillonnage, signant les conditions les plus oligotrophes, et leur nombre ne cesse d'augmenter de T8 à T19.

Au sein du canal aval, à l'inverse, il n'apparaît pas de prédominance d'une communauté algale : les Diatomées et les Cyanobactéries sont présentes en parts relativement égales, tandis que les Chlorophycées sont en quantité moins importante. Néanmoins, les quantités d'algues dénombrées dans ce canal ne cessent d'augmenter au cours de l'expérimentation que ce soit en termes de Diatomées, Chlorophycées ou Cyanobactéries.

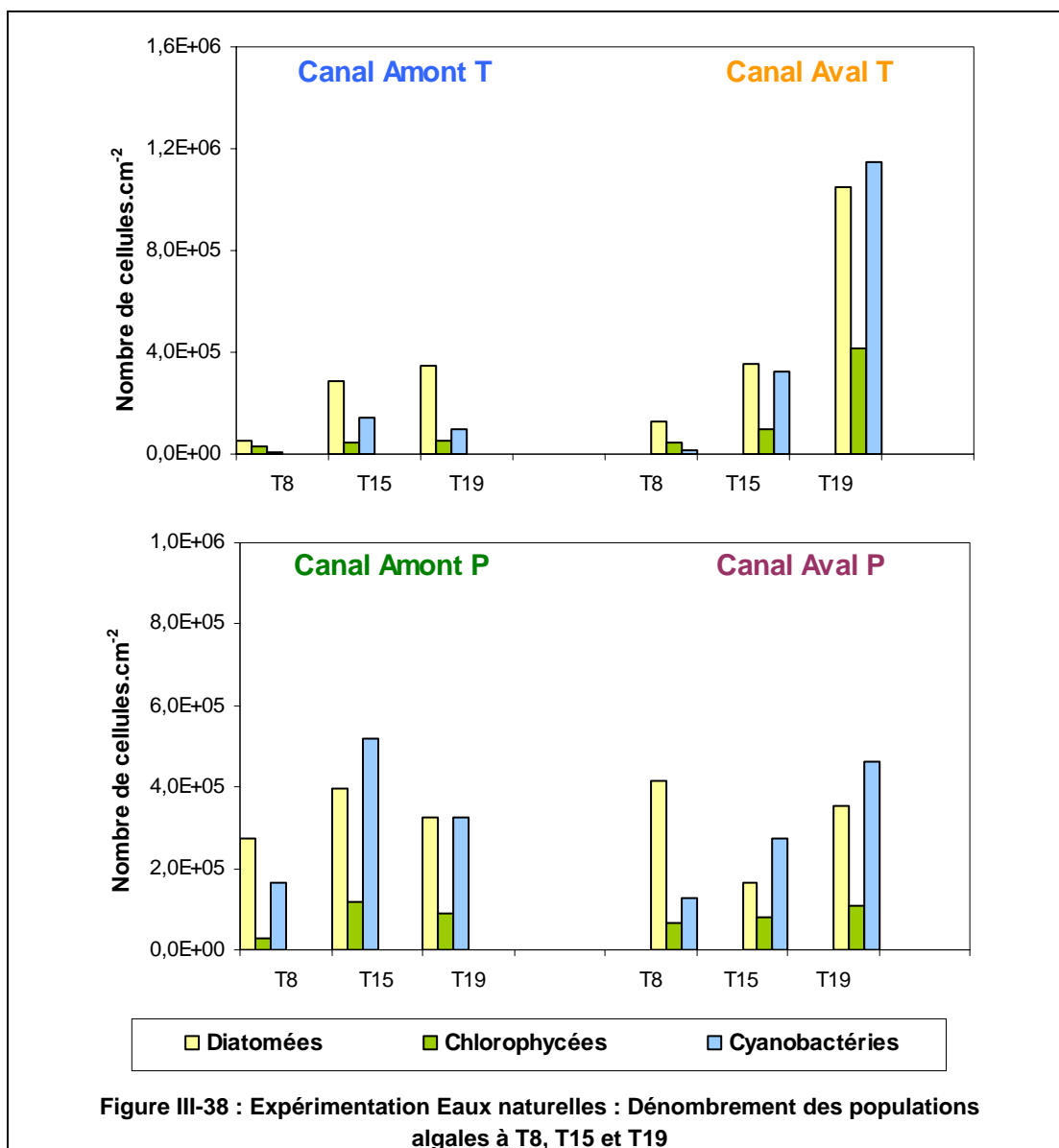
Site St Pierre de Gaubert :

Globalement, au sein des deux canaux, on identifie les mêmes grands groupes d'algues (Diatomées, Chlorophycées, Cyanobactéries) et les quantités dénombrées sont du même ordre.

En ce qui concerne le canal amont, ce sont les valeurs à T15 qui apparaissent comme les plus élevées. La part de Chlorophycées reste assez faible aux trois dates (aux alentours de 5 à 12%) tandis que celles de Diatomées et de Cyanobactéries restent équivalentes.

Au sein du canal aval, la part des Chlorophycées est faible également (entre 10 et 15%). En revanche, les quantités d'algues dénombrées augmentent jusqu'à T19, après une diminution de la présence de Diatomées entre T8 et T15.

Entre le canal amont et le canal aval il n'y a pas de tendance régulière. A T8 et T19, la population d'algues est plus forte dans le canal aval alors que c'est le contraire à T15 et on retiendra que les données sont dans la même échelle de valeurs pour ces deux canaux.



➤ **Indice diatomique IPS** (Figure III-39)

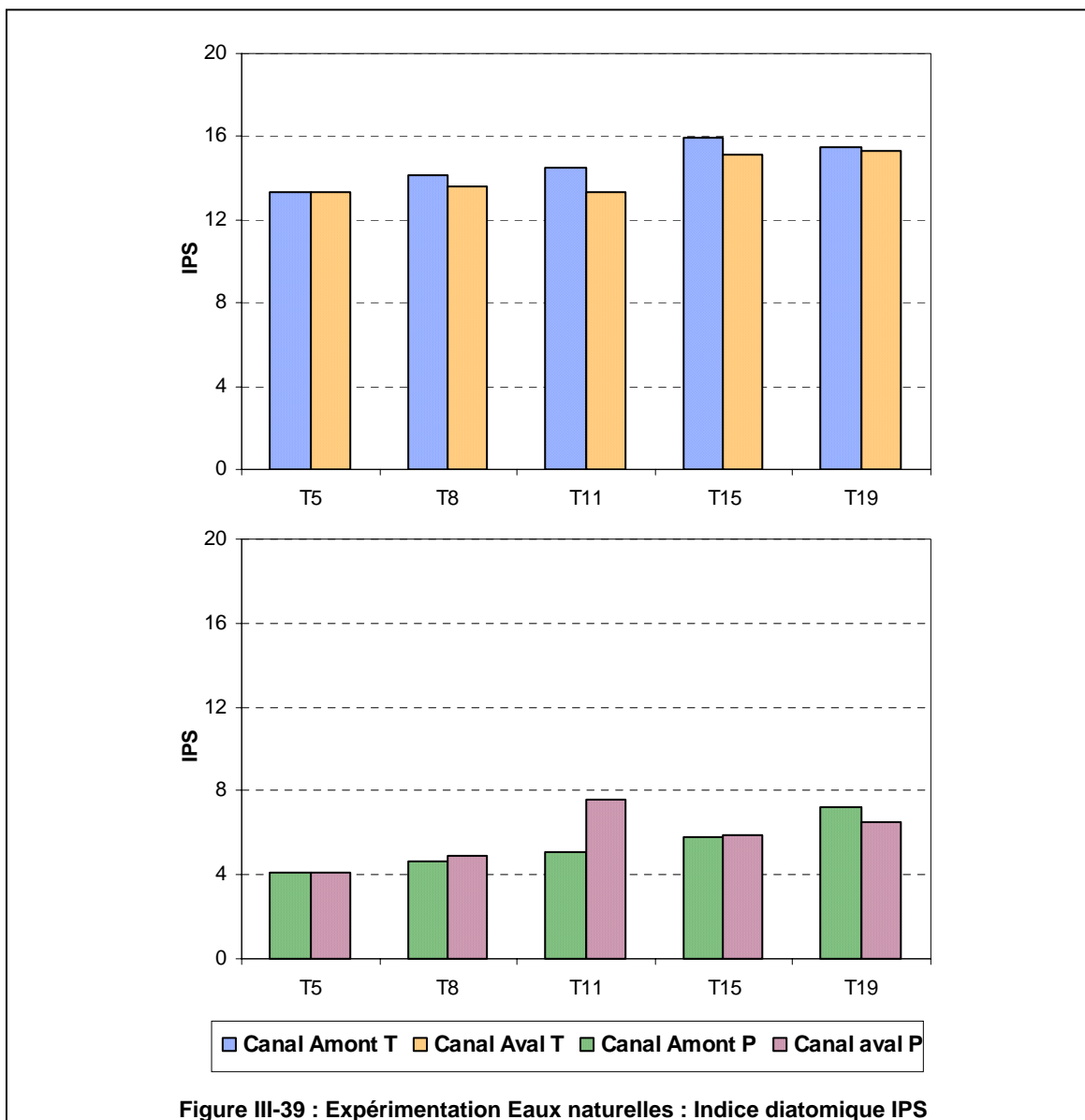
Site Toulouse :

Les notes de l'Indice de Polluo-sensibilité Spécifique évoluent peu en fonction du temps. Toutefois, contrairement à ce qui avait été observé dans les expériences précédentes, l'évolution va dans le sens d'une amélioration au cours de l'expérimentation (en moyenne, valeurs de 13 à 16, pollution modérée).

Entre les deux canaux, on note peu de différenciation des notes d'IPS, même si on observe, à partir de T8, des valeurs légèrement inférieures au sein du canal aval.

Site St Pierre de Gaubert :

Dans cette expérimentation, les notes de l'Indice de Polluo-sensibilité Spécifique sont très faibles et illustrent une pollution forte du milieu. Toutefois, elles ont tendance à augmenter durant l'expérimentation (valeurs entre 4 et 8). Les deux canaux présentent des valeurs similaires mis à part à la date T11 où le canal aval se différencie par des valeurs plus élevées de l'IPS.



➤ **N-hétérotrophie** (Figure III-40)

Site Toulouse :

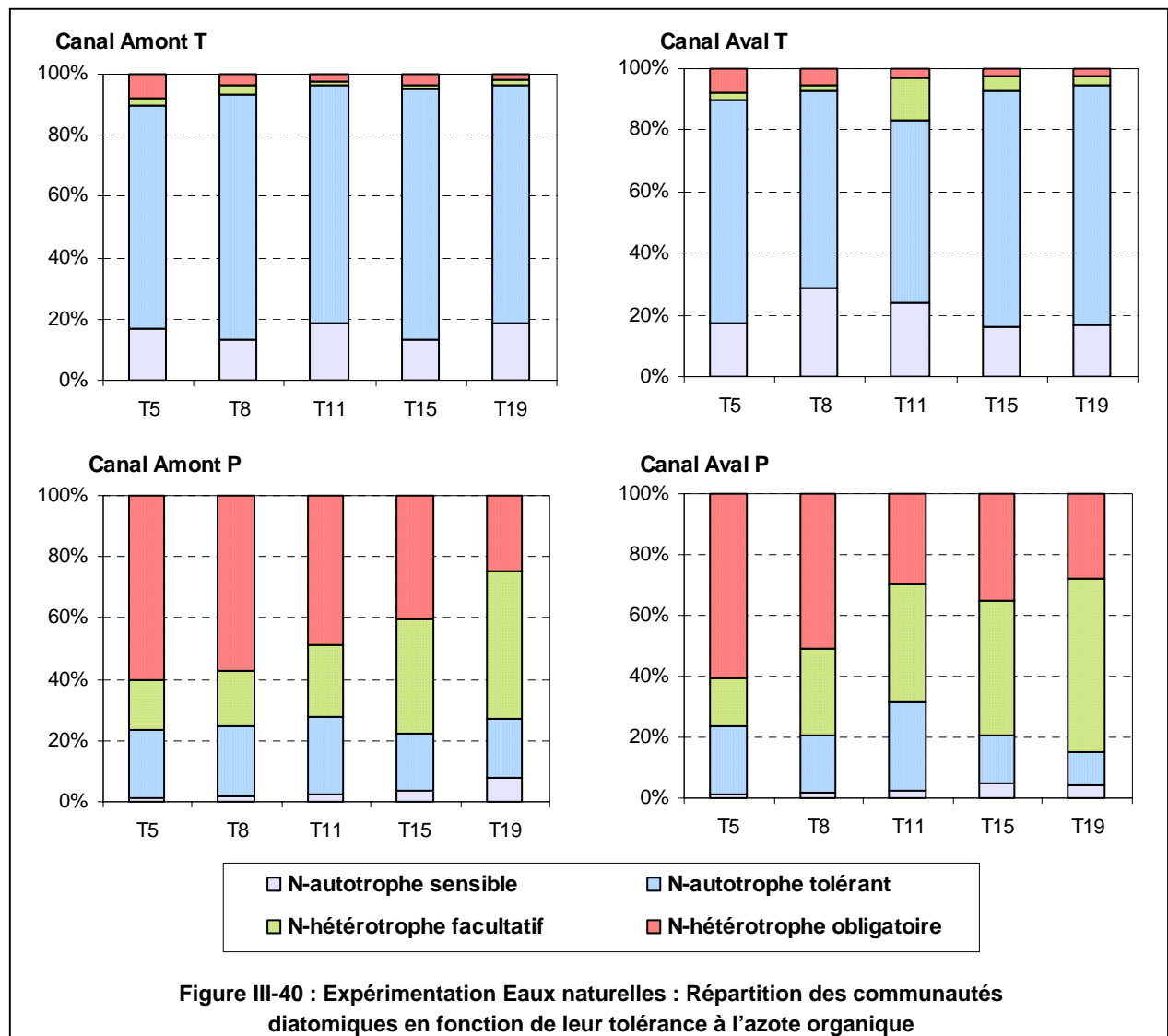
En ce qui concerne la répartition des espèces diatomiques, on observe que les résultats sont similaires d'un canal à l'autre. Globalement, la part des communautés N-autotrophes tolérantes est majoritaire quelle

soit la date d'échantillonnage (entre 60 et 80%), tandis que les parts des communautés N-hétérotrophes facultatives et obligatoires sont très faibles (entre 3 et 17%). Ceci tend à montrer que les teneurs en azote organique (azote résultant de la biomasse de biofilm développée) ont été relativement faibles tout au long de l'expérience.

Site St Pierre de Gaubert :

La différence visible sur le paramètre de l'IPS, entre les deux couples de canaux, l'est également sur le volet de la N-hétérotrophie. Ainsi, contrairement à ce que l'on a vu dans le cadre du site de Toulouse, on observe ici une très forte proportion de communautés de Diatomées N-hétérotrophes obligatoires et facultatives (somme entre 70 et 85%). Ceci signe la présence d'azote organique en quantité importante au sein des deux canaux.

Toutefois, la part de communautés N-hétérotrophes facultatives augmente au fur et à mesure de l'expérimentation au sein du canal amont et du canal aval ce qui corrobore l'augmentation des notes d'IPS.



III. 3.5. Conclusions

Concernant les canaux relatifs au site de Toulouse, la composition chimique de l'eau les alimentant présente des teneurs en nutriments nettement plus élevées pour le canal aval. Cependant, les résultats obtenus à travers les descripteurs quantitatifs et qualitatifs n'indiquent pas de différenciation permanente entre les deux canaux. Sur le site de St Pierre de Gaubert, les teneurs en nutriments ne présentent pas un contraste marqué.

Les éléments que l'on peut retenir de cette expérimentation sont les suivants :

- sur les paramètres MSSC et Chla : pour le site de Toulouse, on observe peu de différence entre les canaux amont et aval en termes de MSSC. Au contraire, en termes de Chla, la différenciation est visible beaucoup plus tôt (le canal aval présente des teneurs en Chla 3 fois plus élevées en fin d'expérience).

En ce qui concerne le site de St Pierre de Gaubert, les évolutions des paramètres MSSC et Chla des deux canaux sont similaires tout au long de l'expérimentation ;

- sur le paramètre "Proportion de bactéries viables" : les canaux amont/aval de Toulouse montrent tous deux une augmentation de la proportion de bactéries viables en fonction du temps. Les canaux se différencient à la dernière date, où le canal amont affiche une forte proportion (54%). Ceci peut être corrélé à la plus faible teneur en algues au sein de ce canal.

Au niveau du site de St Pierre de Gaubert, de même que pour les paramètres MSSC et Chla, les données au sein des deux canaux sont comparables tout au long de l'expérimentation et augmentent en fonction du temps ;

- sur le volet des "Communautés algales" : comme les résultats de Chla le montraient déjà, on observe une forte différenciation amont/aval, avec des dénombrements en algues élevés au sein du canal aval. Au niveau qualitatif, ce sont les Diatomées qui sont majoritaires dans le canal amont, et au sein du canal aval, on retrouve à parts égales les communautés de Diatomées et Cyanobactéries.

Les canaux qui concernent le site de St Pierre de Gaubert présentent des quantités voisines en algues avec une répartition identique entre les différents groupes : prédominance des communautés de Diatomées et Cyanobactéries ;

- sur l'IPS : contrairement à ce que l'on observe au niveau des communautés algales, on observe peu de différenciation entre les canaux amont et aval du site de Toulouse. En effet, les notes de l'IPS ne se distinguent pas et indiquent une pollution modérée.

Au sein des canaux encadrant le site de St Pierre de Gaubert, on observe peu de différenciation entre les canaux amont et aval. Dans cette expérimentation, les notes illustrent une pollution forte ;

- sur la N-hétérotrophie : de manière identique aux résultats de l'IPS, malgré l'enrichissement clairement distinct des eaux, on ne remarque pas de différence sur les résultats de ce paramètre dans le cas des canaux du site de Toulouse.

Confirmant les données de l'Indice de Polluo-sensibilité Spécifique, on observe des résultats très différents entre les sites Toulouse et St Pierre de Gaubert : une majorité des communautés N-

autotrophes tolérantes sur le site Toulouse et des communautés N hétérotrophes (obligatoires et facultatives) pour le site de St Pierre de Gaubert.

Ainsi, on constate une différenciation nette entre le canal alimenté par l'eau de la station aval de Toulouse et ceux alimentés par l'eau amont et aval du Site de St Pierre de Gaubert, indiquant une forte dégradation du milieu sur ce tronçon de la Garonne.

III. 4 • DISCUSSION

Comme nous l'avons vu dans le chapitre I, les relations mathématiques établies entre les quantités de biofilm développé et la qualité de l'eau (teneurs en nutriments) ne donnent pas des résultats satisfaisants. Aussi, dans cette partie, nous allons étudier, dans le cadre de nos travaux en canaux expérimentaux, la validité de notre choix qui est d'analyser la relation potentielle entre la vitesse de croissance du biofilm développé et les concentrations en nutriments de l'eau.

De nombreux auteurs ont indiqué la pertinence que peut représenter le critère du taux de croissance du périphyton dans une démarche d'évaluation de la qualité de l'eau (Capblancq J. & Cassan M., 1979a ; 1979b ; Bothwell M.L., 1988 ; Watanabe T. *et al.*, 1988 ; Biggs B.J.F., 1990). En régime hydraulique stable et en conditions saturantes d'éclairement, le développement des biofilms est dépendant de la concentration en éléments nutritifs du milieu. Ainsi, le taux de croissance des biofilms peut être représentatif de la qualité de l'eau. Toutefois, même s'il est attendu qu'un lien existe entre la productivité du biofilm et la composition chimique du milieu, il manque une relation plus quantitative, qui pourrait servir de base d'appui dans les démarches de gestion de l'eau.

Se pose alors le choix du descripteur quantitatif sur lequel calculer les vitesses de croissance. Nous avons constaté, lors de nos expérimentations en laboratoire, que les dénombrements bactériens n'évoluaient pas de manière sensible en fonction du temps. Ceci nous conduit à écarter ce paramètre dans notre démarche d'évaluation d'une vitesse de croissance des biofilms. Dans la littérature, le paramètre de la chlorophylle *a* (Chl*a*) est le plus fréquemment pris en compte pour le calcul de la vitesse de croissance du biofilm. Toutefois, dans notre étude, nous utiliserons également le paramètre de la matière sèche sans cendre (MSSC) afin de prendre en compte le biofilm dans sa totalité (algues, bactéries, champignons, débris éventuels,...).

III. 4.1. Calcul de la vitesse de croissance des biofilms

III. 4.1.1. Méthodologie

Le protocole des expérimentations en canaux est un intermédiaire entre un système de croissance en milieu non renouvelé (durant un cycle de 3 ou 4 jours) et un système de croissance continue en milieu renouvelé (expériences sur 18 jours avec renouvellement tous les 3-4 jours). Malgré les limitations (en N ou P) intervenues durant les cycles (intervalle de temps entre deux renouvellements complets du milieu), on assimile notre système à un milieu de croissance en continu et on cherche à caractériser la croissance des biofilms sur la période de 18 jours.

Comme vu au chapitre I, la valeur du taux de croissance ne peut être définie que durant la phase de croissance exponentielle (μ_C). Pour identifier l'intervalle de temps durant lequel se déroule la phase de croissance exponentielle des biofilms, on suit la démarche théorique de transformation logarithmique des données de biomasse, exprimées en MSSC et Chla, et prenons en compte les points situés dans la section droite de la courbe.

La sélection des points pour le calcul de μ_C est rigoureusement applicable dans le cas où l'échantillonnage est effectué à un pas de temps suffisamment réduit, permettant d'identifier avec certitude la phase de croissance exponentielle. Dans nos expérimentations, nous avons assez peu de dates d'échantillonnage (5 prélèvements sur 18 jours) ce qui peut gêner l'identification de l'intervalle de temps délimitant le mieux cette phase. En effet, la croissance exponentielle des biofilms est suivie d'une croissance plus linéaire (illustrant des conditions de limitation) et le point de rupture de pente entre les deux phases varie selon les conditions expérimentales (épaisseur de la couche limite de diffusion, teneurs en éléments nutritifs,...).

Nous ne possédons pas assez de dates de prélèvement pour situer ce point de décrochement entre ces deux types d'évolution au sein de nos canaux expérimentaux. La conséquence possible est une sous-estimation du taux de croissance (prise en compte de la section la plus droite de la courbe (en données logarithmiques) gênée par le faible nombre de points). Cependant, cela ne nous empêche pas de comparer les valeurs de μ_C obtenues sous des conditions d'enrichissement en nutriments différentes (soit entre canaux dans une expérimentation, soit de manière transversale entre expérimentations).

III. 4.1.2. Résultats - Remarques

En premier lieu, nous avons calculé μ_C dans le cas des Expérimentations de Reproductibilité (Tableau III-XX). Le protocole de ces deux expérimentations (conditions expérimentales identiques et, en particulier, la teneur en nutriments) nous permet de calculer la variabilité de la vitesse de croissance sur les quatre canaux du système dans le cadre de ces expérimentations. Les coefficients de variation sur les paramètres $\mu_{C.MSSC}$ et $\mu_{C.Chla}$ se situent entre 6,9 et 22,5% (Tableau III-XXI).

On remarque que la variabilité du taux de croissance est plus élevée dans le cas de l'expérimentation de reproductibilité à alimentation séparée. L'introduction d'une source de variation des conditions expérimentales (déconnexion des canaux et alimentation par réserve séparée) a influencé la variabilité de μ_C et les CV sont de 22,5% en termes de MSSC et de 19,2% en termes de Chla.

Tableau III-XX : Expérimentations de Reproductibilité : Valeurs du taux de croissance sur les paramètres MSSC et Chla (en j^{-1})

	ER Réserve Commune	
	$\mu_{C.MSSC}$	$\mu_{C.Chla}$
Canal 1	0,153 ($\pm 0,008$)	0,295 ($\pm 0,022$)
Canal 2	0,176 ($\pm 0,008$)	0,290 ($\pm 0,016$)
Canal 3	0,194 ($\pm 0,012$)	0,296 ($\pm 0,016$)
Canal 4	0,199 ($\pm 0,012$)	0,335 ($\pm 0,023$)

	ER Alimentation Séparée	
	$\mu_{C.MSSC}$	$\mu_{C.Chla}$
Canal 1	0,133 ($\pm 0,017$)	0,280 ($\pm 0,022$)
Canal 2	0,106 ($\pm 0,012$)	0,250 ($\pm 0,022$)
Canal 3	0,075 ($\pm 0,012$)	0,181 ($\pm 0,022$)
Canal 4	0,109 ($\pm 0,012$)	0,285 ($\pm 0,022$)

Tableau III-XXI : Expérimentations de Reproductibilité : Valeurs moyennes (en j^{-1}) et coefficients de variation de $\mu_{C.MSSC}$ et $\mu_{C.Chla}$

	$\mu_{C.MSSC}$	$\mu_{C.Chla}$
ER Réserve Commune	$\mu_{C.moy}=0,181$; CV=11,5%	$\mu_{C.moy}=0,304$; CV=6,9%
ER Alimentation Séparée	$\mu_{C.moy}=0,106$; CV=22,5%	$\mu_{C.moy}=0,249$; CV=19,2%

III. 4.2. Relations "Vitesse de croissance des biofilms - Charge en nutriments"

Après avoir calculé les vitesses de croissance (en MSSC et Chla), notre démarche est de caractériser les relations entre ces dernières et la quantité d'éléments nutritifs du milieu (Capblancq J. & Garabétian F., 1999).

Dans la littérature, nous n'avons pas vu de traduction mathématique de cette relation. On peut d'ores et déjà penser que la relation, si elle existe, ne sera pas univoque, car de nombreux facteurs, autres que les teneurs en nutriments, sont susceptibles d'intervenir sur la croissance du biofilm. Toutefois, on peut espérer que le fait de travailler sur une vitesse de croissance et non sur des quantités de biomasse réduit l'influence de certains de ces facteurs (Biggs B.J.F., 1990).

III. 4.2.1. Application aux données expérimentales

Pour relier le taux de croissance des biofilms aux teneurs en nutriments des canaux expérimentaux, nous prenons en compte les paramètres de chimie que l'on a fait varier dans les expérimentations : concentrations en PO_4^{3-} et en NO_3^- . En effet, étant donné le peu de variation qui existe sur les paramètres NO_2^- et NH_4^+ , il n'apparaît pas pertinent de les considérer.

La valeur retenue pour les concentrations en PO_4^{3-} et en NO_3^- , caractérisant chaque canal, est la moyenne des concentrations imposées à chaque renouvellement de milieu des canaux expérimentaux.

Ensuite, afin d'intégrer le rôle joué par la valeur du rapport N/P sur le développement des communautés algales, nous avons choisi d'utiliser une concentration en nutriments dite "concentration consommable" en appliquant le calcul suivant :

- lorsque $\text{N/P} < 16$, c'est l'élément N qui est le facteur limitant, le phosphore ne sera pas totalement consommé et la valeur de la concentration en P potentiellement consommable est :

$$[\text{P-PO}_4^{3-}]_{\text{consommable}} = [\text{N-NO}_3^-] / 7,23^1 ;$$

- lorsque $\text{N/P} > 16$, c'est l'élément P qui est le facteur limitant (l'azote ne sera pas totalement consommé) et la valeur de la concentration en P potentiellement consommable est :

$$[\text{P-PO}_4^{3-}]_{\text{consommable}} = [\text{P-PO}_4^{3-}]_{\text{nominale}}.$$

Les données sont présentées par expérimentation et par descripteur (MSSC ou Chla).

Paramètre MSSC (Figure III-41) :

■ En ce qui concerne la première expérimentation Enrichissements Artificiels, on observe une augmentation de $\mu_{\text{C.MSSC}}$ en fonction de l'enrichissement en P, du canal 1 au canal 4. Pour les canaux 2 et

¹ valeur du rapport N/P en masse.

3, les valeurs de $\mu_{C.MSSC}$ se différencient peu. L'ajout supplémentaire de P dans le canal 3 n'a pas pu être utilisé par le biofilm du fait de la limitation en N.

Le tracé des valeurs de $\mu_{C.MSSC}$ en fonction de la concentration en NO_3^- montre que les nitrates ne sont pas discriminants. En revanche, la prise en compte de la concentration en PO_4^{3-} consommable améliore la relation avec les vitesses de croissance.

La similitude des valeurs de $\mu_{C.MSSC}$ des canaux 2 et 3 rejoint le fait que les quantités de P consommable sont identiques pour ces deux canaux. L'existence d'une relation linéaire entre "vitesse de croissance" et $[\text{PO}_4^{3-}]_{\text{consommable}}$ est donc renforcée. De même, dans le canal 4, l'augmentation en $[\text{PO}_4^{3-}]_{\text{consommable}}$ induit une augmentation de la vitesse de croissance.

Ainsi, on peut tirer de cette expérimentation, une relation de type linéaire entre $\mu_{C.MSSC}$ et $[\text{PO}_4^{3-}]_{\text{consommable}}$, caractérisée par l'équation suivante, sur l'intervalle 0 à 0,09 mg P.L⁻¹ (Figure III-42) :

$$y = 2,44x + 0,099 \dots \dots \dots (R^2 = 0,993)$$

■ Dans le cas de la seconde expérimentation Enrichissements Artificiels, la prise en compte de $[\text{PO}_4^{3-}]_{\text{consommable}}$ ne modifie pas la relation car aucun canal n'est limité par l'azote (c'est pourquoi seulement deux graphiques sont présentés). La valeur de $\mu_{C.MSSC}$ est peu différente pour les trois canaux enrichis (C2, C3, C4) et ce, malgré le fort enrichissement en P ajouté au canal 4.

Si on considère uniquement les canaux C1, C2 et C3, il existe une forte relation linéaire entre $\mu_{C.MSSC}$ et $[\text{PO}_4^{3-}]$. Ensuite, la vitesse de croissance semble être saturée entre le canal 3 et le canal 4.

La relation linéaire existant pour les canaux 1 à 3 porte sur un intervalle de concentration en PO_4^{3-} de 0 à 0,08 mg P.L⁻¹ et est décrite selon l'équation suivante (Figure III-43) :

$$y = 2,32x + 0,008 \dots \dots \dots (R^2 = 0,999)$$

■ L'analogie du type de relation rencontrée dans les deux expérimentations Enrichissements Artificiels nous incite à rassembler les points concernés. Ainsi, sur la gamme de $[\text{PO}_4^{3-}] = 0$ à 0,09 mg P.L⁻¹, la relation linéaire entre les variables entre les variables $\mu_{C.MSSC}$ et $[\text{PO}_4^{3-}]$ est décrite par l'équation suivante (Figure III-44) :

$$y = 2,12x + 0,074 \dots \dots \dots (R^2 = 0,661)$$

On constate que la valeur du coefficient de régression est tout de même plus faible que lorsqu'on considère chaque expérience séparément. Ce sont les valeurs de la seconde expérimentation qui font baisser les valeurs de $\mu_{C.MSSC}$.

Ainsi, si la relation est du même ordre de grandeur dans les deux expérimentations, on peut penser qu'elle est sensible à l'inoculum de biofilm de départ (unique source de variation identifiée entre les deux expérimentations).

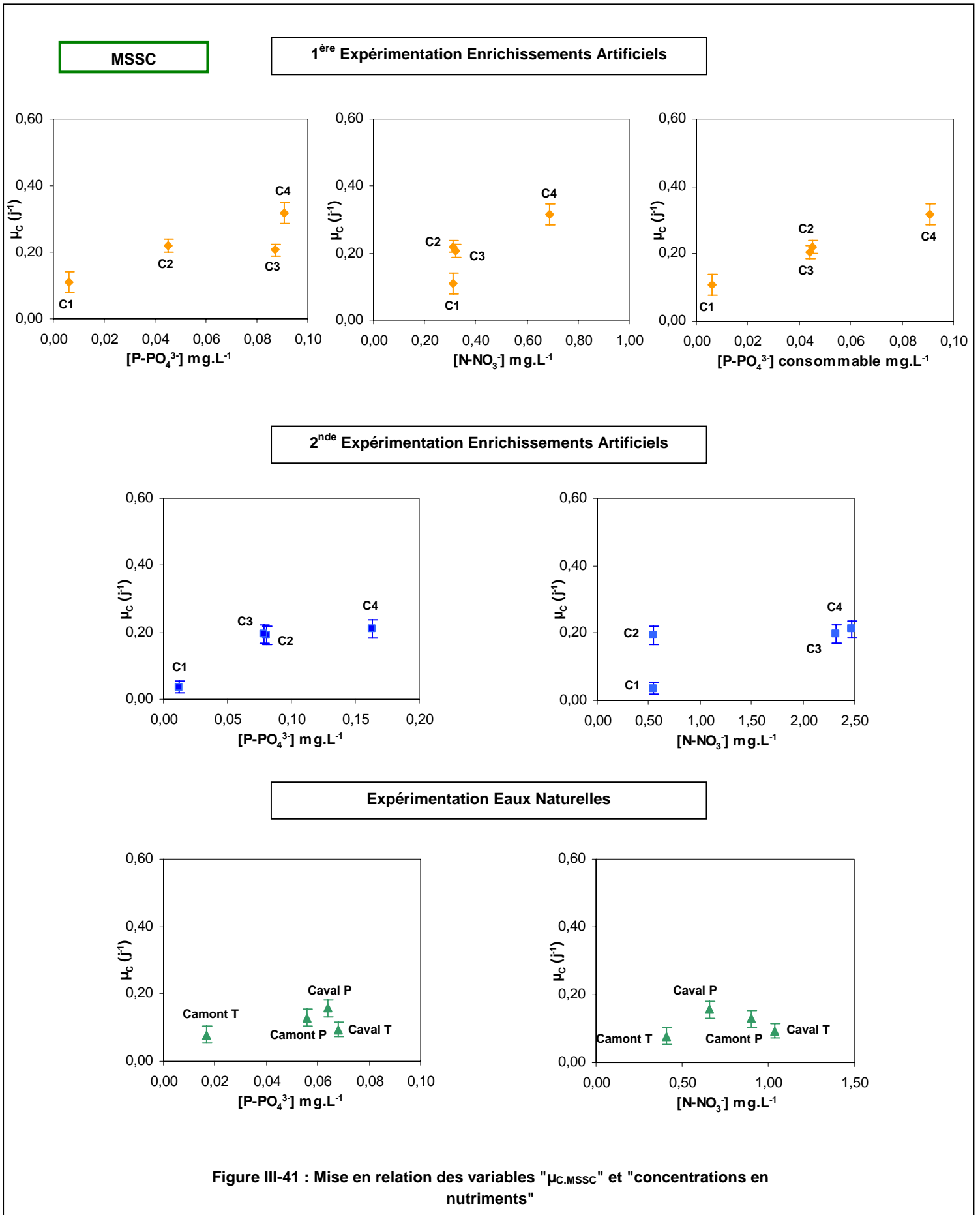
■ Dans le cas de l'expérimentation en Eaux Naturelles, il n'y a pas de modification de la relation $\mu_{C.MSSC}$ - $[PO_4^{3-}]$ quand on se rapporte à la concentration en $P_{\text{consommable}}$ car l'eau provient du milieu naturel et c'est le phosphore qui est majoritairement limitant *in situ*.

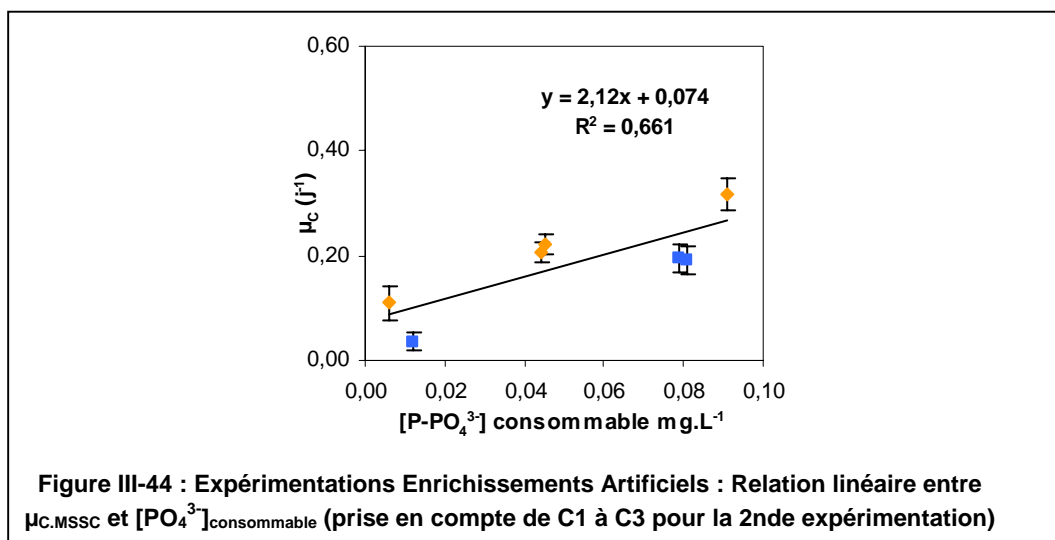
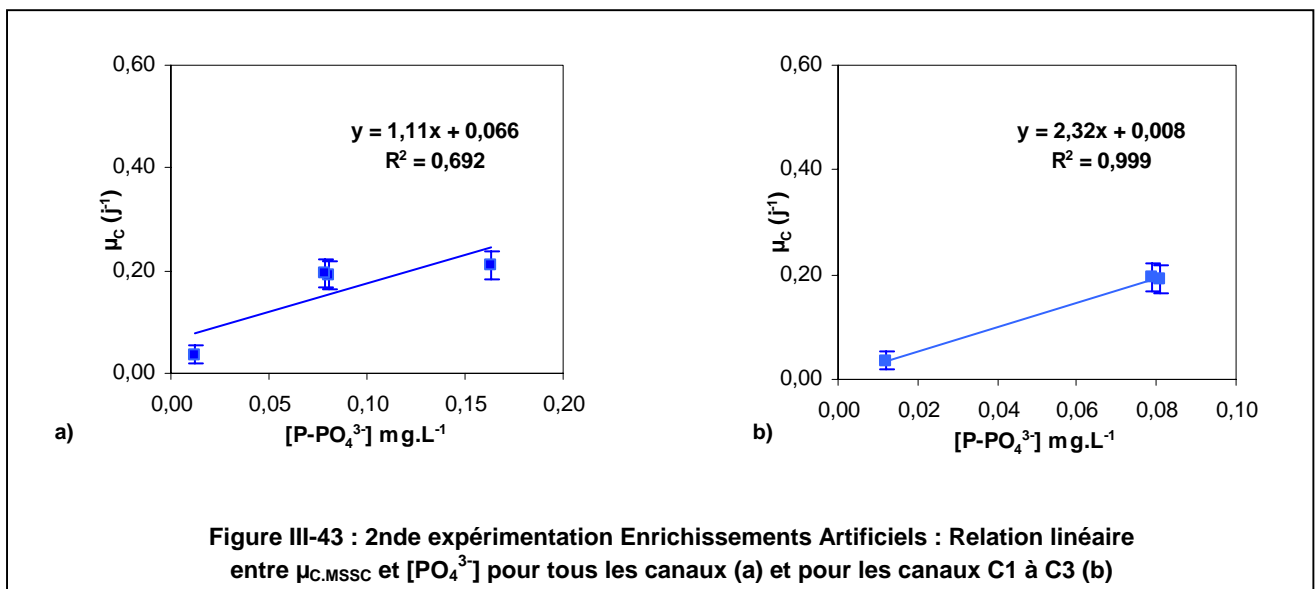
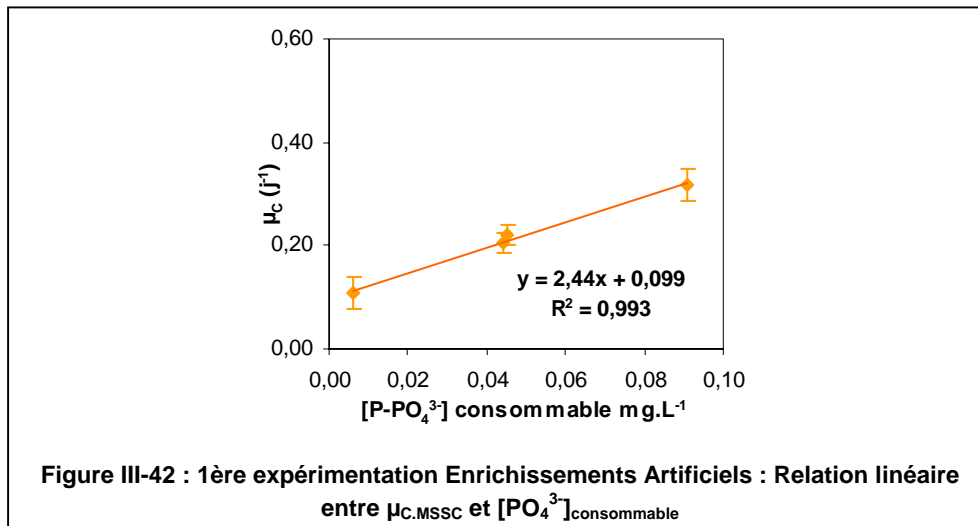
Les vitesses de croissance sont globalement faibles pour chacun des canaux. Si on tente une relation linéaire entre les deux variables $\mu_{C.MSSC}$ et $[PO_4^{3-}]$ ¹, on obtient l'équation suivante (Figure III-45) :

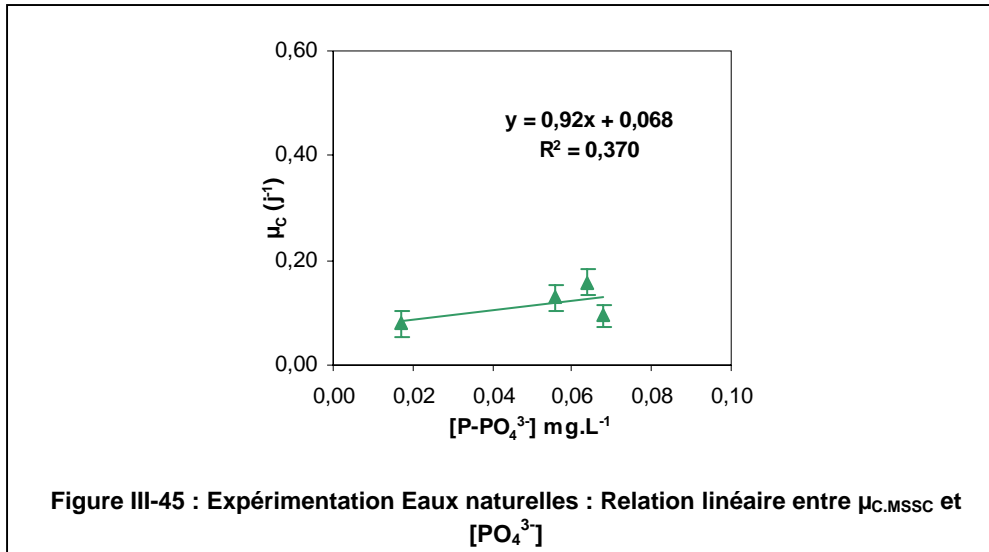
$$y = 0,92x + 0,068 \dots \dots \dots (R^2 = 0,370)$$

Le coefficient de pente n'est pas du même ordre que ceux des deux cas précédents. En effet, dans cette expérimentation, la valeur des taux de croissance n'est pas suffisante pour rendre compte de l'évolution globale des biofilms. Les faibles vitesses de croissance pourraient laisser penser que la croissance des biofilms est limitée dans les eaux naturelles. Pourtant, au vu des courbes d'évolution des quantités de MSSC et Chla (Figure III-33 et Figure III-34), qui montrent que le biofilm se développe fortement dans chacun des canaux sur le premier intervalle de temps (0-5 jours), nous pensons qu'il s'agit plus d'un effet de la configuration du système des canaux expérimentaux (faible espace pour le développement du biofilm entre les lames de colonisation) que de raisons propres aux caractéristiques de croissance naturelle du biofilm.

¹ Pour le canal Amont P, les teneurs en nutriments prises en compte sont celles calculés sans la dernière date d'échantillonnage afin de représenter au mieux l'ambiance moyenne du canal.







Paramètre Chla :

Pour le descripteur de la chlorophylle a, nous avons directement tracé l'évolution du taux de croissance ($\mu_{C.Chla}$) en fonction des teneurs en facteur limitant ($[PO_4^{3-}]_{consommable}$ pour la 1ère expérimentation et $[PO_4^{3-}]_{brute}$ pour la 2nde).

■ Dans la première expérimentation Enrichissement Artificiels (Figure III-46), on observe que, même si une relation linéaire peut être établie entre $\mu_{C.Chla}$ et $[PO_4^{3-}]_{consommable}$, elle est moins forte que celle obtenue sur la MSSC. L'équation qui la décrit est :

$$y = 4,27x + 0,242 \dots \dots \dots (R^2 = 0,823)$$

Le fait que le coefficient de régression soit plus élevé lorsque l'on considère la relation linéaire $\mu_{C.MSSC}$ - $[PO_4^{3-}]$ que lorsque l'on prend en compte le paramètre de la chlorophylle a, nous amène à déduire que le paramètre MSSC permet de mieux décrire le taux de croissance du biofilm que celui de la Chla.

■ Dans le cas de la seconde expérimentation Enrichissement Artificiels (Figure III-47), la relation linéaire que l'on avait identifiée sur le paramètre MSSC sur la gamme $[PO_4^{3-}] = 0$ à $0,08 \text{ mg P.L}^{-1}$ se vérifie également sur le paramètre de la chlorophylle a. Elle est décrite par :

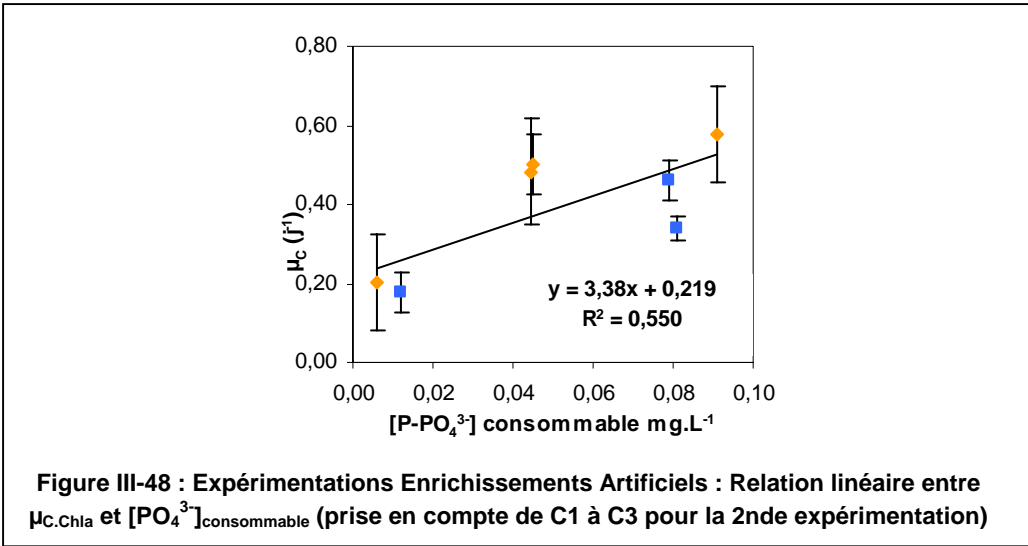
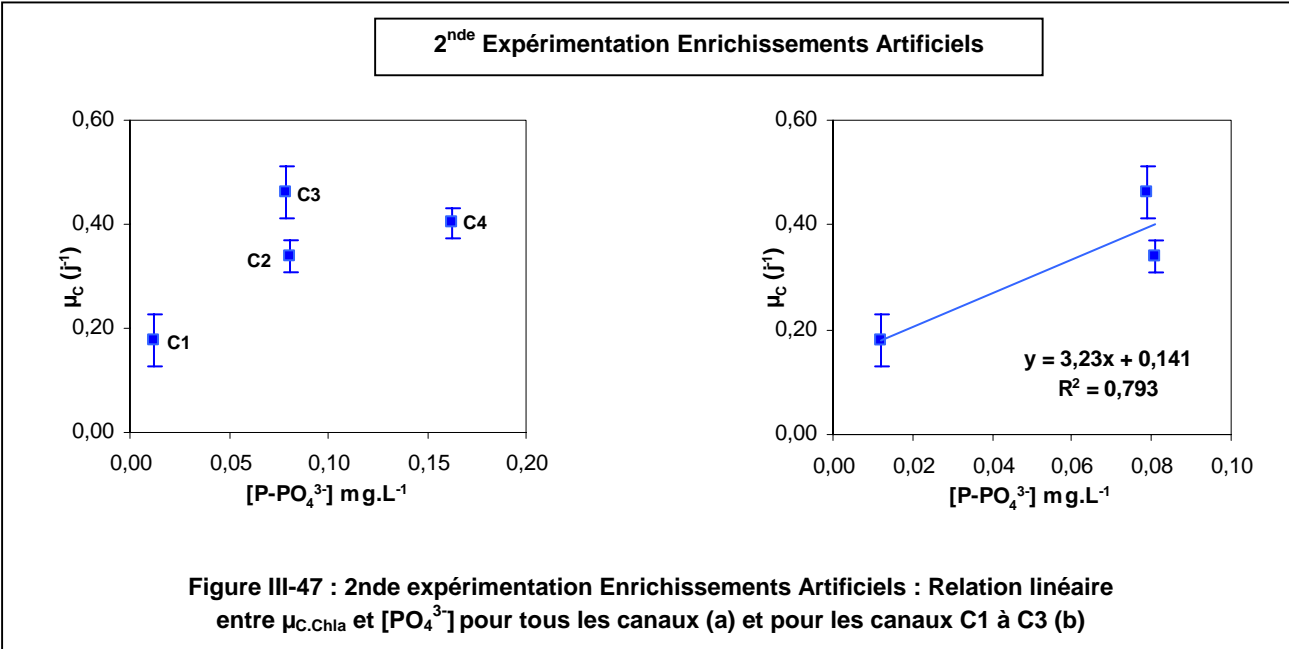
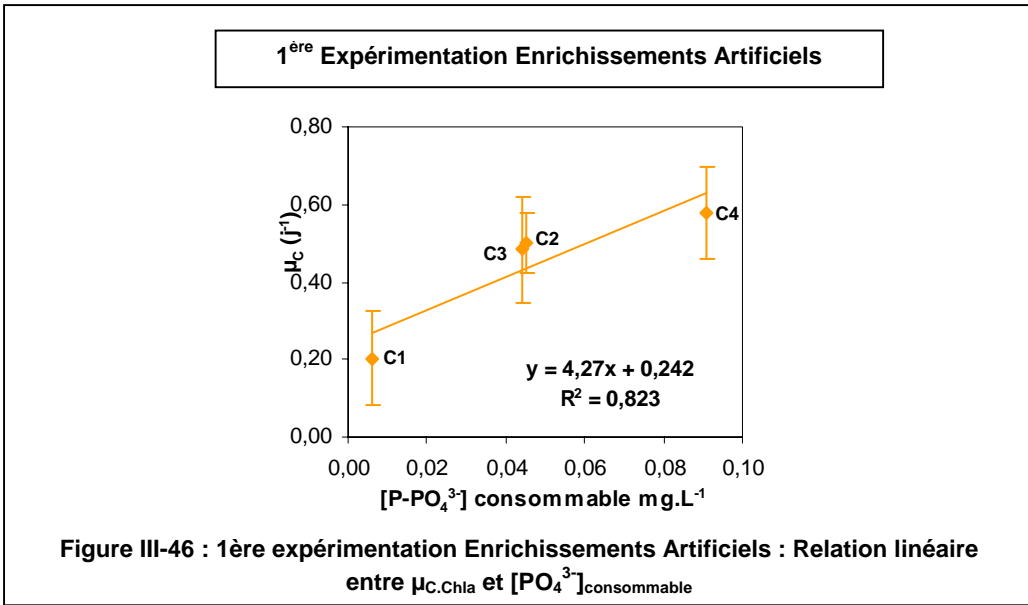
$$y = 3,23x + 0,141 \dots \dots \dots (R^2 = 0,793)$$

Notons toutefois que c'est également avec le paramètre de la MSSC que l'on observe la plus forte relation entre "vitesse de croissance" et "teneurs en phosphates" ($\mu_{C.MSSC}$ - $[PO_4^{3-}]$: $R^2=0,999$).

En revanche, contrairement aux résultats obtenus en considérant les données de MSSC, le fait d'associer les points des deux expérimentations Enrichissement Artificiels sur la gamme $[\text{PO}_4^{3-}] = 0$ à $0,09 \text{ mg P.L}^{-1}$ n'aboutit pas à un résultat satisfaisant car l'équation est du type : $y = 3,38x + 0,219$; avec un coefficient de régression faible ($R^2=0,550$) (Figure III-48). Il y a trop de variations entre les deux séries de $\mu_{\text{C.Chla}}$ pour établir une relation exploitable.

■ Comme le montre la figure III-49, dans le cas de l'expérimentation en Eaux Naturelles, le taux de croissance exprimé en chlorophylle a conduit également à une faible relation avec la teneur en PO_4^{3-} ($R^2=0,498$).

Chla



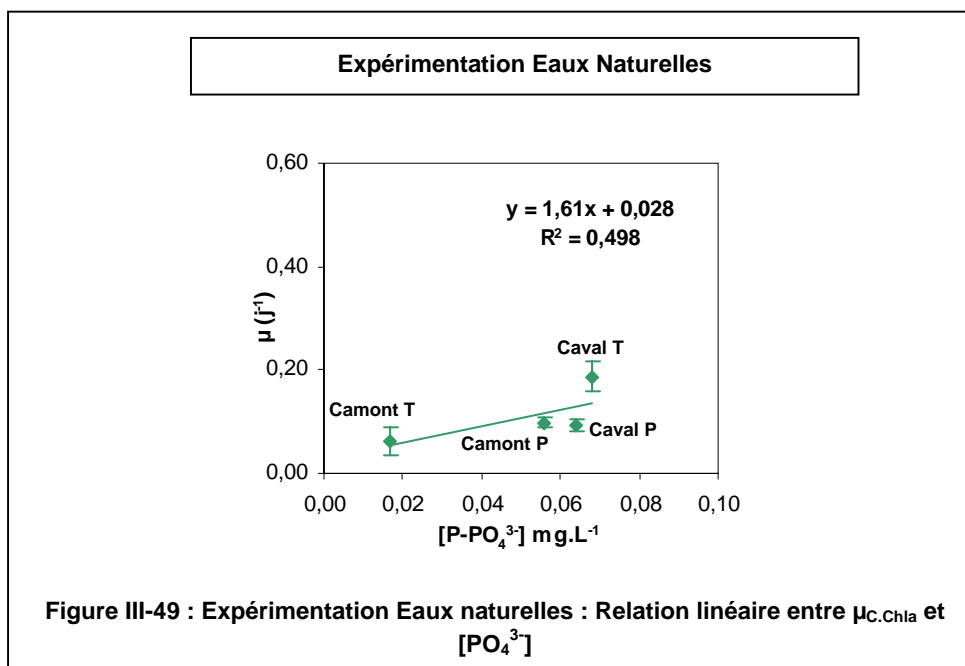


Figure III-49 : Expérimentation Eaux naturelles : Relation linéaire entre $\mu_{C.Chla}$ et $[PO_4^{3-}]$

III. 4.2.2. Conclusions

On a d'abord pu observer que la mise en relation du taux de croissance et de la concentration en NO_3^- n'est pas pertinente. En effet, ce n'est pas ce paramètre qui discrimine les différents canaux.

Le travail sur le facteur limitant ($[PO_4^{3-}]_{nominale}$ ou $[PO_4^{3-}]_{consommable}$ dans le cas d'une limitation en N) induit une nette amélioration de la relation entre les deux variables μ_C - $[PO_4^{3-}]$. En effet, cela permet de prendre en compte la valeur du rapport N/P qui influence le développement des communautés algales (United States Environmental Protection Agency, 2000)

De plus, en comparant les deux expérimentations Enrichissements Artificiels, on a identifié une relation de type linéaire entre le taux de croissance et la concentration en PO_4^{3-} sur la gamme de valeurs 0 à 0,09 mg P.L⁻¹.

Le calcul du taux de croissance sur le descripteur de la MSSC permet de mieux asseoir la relation μ_C - $[PO_4^{3-}]$. Ce résultat apparaît satisfaisant dans la mesure où le biofilm photosynthétique, bien que constitué majoritairement d'algues, contient une quantité non négligeable d'autres éléments tels que les constituants de la matrice (EPS).

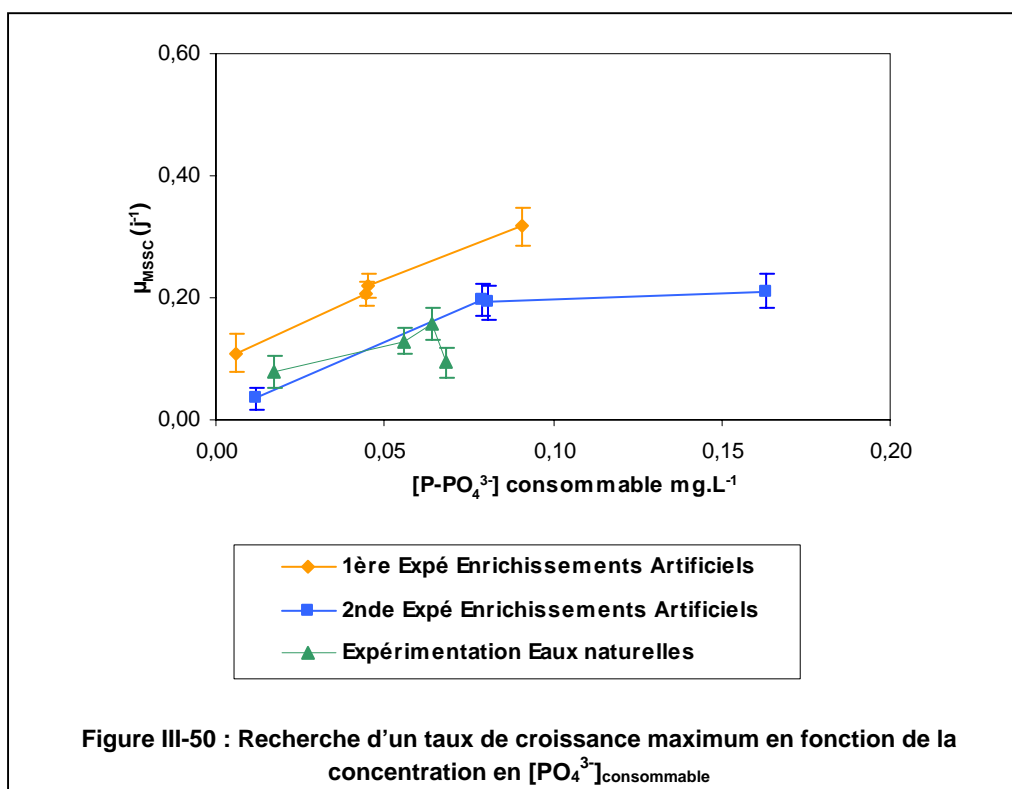
Enfin, lorsque l'on regarde sur quel intervalle de temps se déroule la phase exponentielle pour chaque canal et chaque expérimentation, on observe que le démarrage et la durée de cette phase ne sont pas dépendants de l'enrichissement en nutriments du milieu.

Théoriquement, le taux de croissance augmente proportionnellement à la quantité de facteur limitant jusqu'à une valeur fixe (μ_{max}) (Perry J.J. *et al.*, 2004) et il est intéressant d'identifier le seuil au-dessus duquel les ajouts en P n'ont plus d'effet sur la vitesse de croissance.

Certains auteurs indiquent que cette limitation peut être atteinte à des taux de phosphore relativement bas : autour de 0,3 à 0,6 $\mu\text{g P.L}^{-1}$ en rivières pour M.L. Bothwell (1988), tandis que des valeurs de 20 $\mu\text{g P.L}^{-1}$ ont été citées en canaux de laboratoire par R.R. Horner *et al.* (1983). L'existence d'une plage de variation pour les valeurs de concentrations saturantes repose sur le fait que cette notion de limitation doit prendre en compte à la fois les teneurs en nutriments de la colonne d'eau et les ratios entre nutriments, mais aussi le facteur de diffusion dans le biofilm qui augmente avec l'âge et l'épaisseur du biofilm (Asaeda T. & Son D.H., 2001 ; Améziante T. *et al.*, 2002).

Dans notre étude, seule la seconde expérimentation Enrichissements Artificiels laisse apparaître une limitation du taux de croissance (Figure III-50). Pour $\mu_{C.MSSC}$, il intervient à partir de $[\text{P-PO}_4^{3-}] \approx 0,08 \text{ mg.L}^{-1}$ (concentration nettement plus élevée que celles citées dans la littérature). Pour les deux autres expérimentations, la limitation du taux de croissance n'apparaît pas, des points de concentrations plus élevées auraient été nécessaires pour savoir à quel niveau elle se situe.

Si on se concentre sur les résultats issus de la seconde expérimentation Enrichissements Artificiels, on remarque qu'à partir d'une certaine valeur du taux de croissance ($\mu_{C.MSSC} \approx 0,20 \text{ j}^{-1}$), on ne différencie plus les concentrations en PO_4^{3-} correspondantes. Concrètement, cela signifie qu'au-delà d'une certaine teneur en PO_4^{3-} , ce critère ne permettrait pas de détecter un apport supplémentaire dans le milieu car les concentrations déjà présentes saturent la croissance du biofilm.



III. 4.3. Apports des descripteurs qualitatifs

L'autre partie de notre travail consiste en l'analyse de l'information fournie sur le niveau trophique de l'eau par l'utilisation des descripteurs qualitatifs du biofilm. Nous avons pris en considération les paramètres suivants :

- Proportion de bactéries viables ;
- Index Autotrophique ;
- Composition algale en grands groupes ;
- Indice de Polluo-sensibilité Spécifique (IPS) ;
- Caractéristiques de N-hétérotrophie pour le compartiment des Diatomées.

➤ *Proportion de bactéries viables*

Dans notre étude, nous observons que la proportion de bactéries actives :

- n'évolue pas systématiquement en fonction du temps ;
- qu'elle n'est pas corrélée, positivement ou négativement, avec la charge en nutriments ;
- et qu'elle présente en outre des écart-types importants.

Il paraît donc non pertinent d'utiliser ce descripteur à l'intérieur d'une même expérimentation et encore moins de manière transversale entre expérimentations. Ce descripteur est donc peu contributif par rapport à l'évaluation du niveau trophique du milieu.

➤ *Index Autotrophique*

Quel que soit le canal et l'enrichissement en nutriments imposé, nous observons que l'index autotrophique diminue en fonction du temps. Ceci est dû au développement de la biomasse des algues. Cet indice permet de différencier les canaux enrichis des canaux non enrichis au sein de chaque expérimentation. On observe en effet, une corrélation négative entre les valeurs de l'index autotrophique et les teneurs en nutriments. Capblancq et Cassan (1979a) décrivaient déjà l'intérêt de ce descripteur, qui caractérise, tout comme la vitesse de croissance, une communauté, indépendamment des espèces qui la composent, pour évaluer l'état d'un hydrosystème.

De manière à définir le caractère informatif de ce paramètre envers à l'enrichissement du milieu en nutriments, nous avons réuni l'ensemble des données d'IA, obtenues pour chaque canal, à travers les différentes expérimentations en canaux. Chaque canal est alors identifié par sa concentration moyenne en PO_4^{3-} (consommable, le cas échéant). Précisons qu'étant donné que les valeurs d'IA évoluent pour chaque canal en fonction du temps, nous avons choisi de représenter trois dates d'échantillonnage, la première (T4 ou T5), l'avant-dernière (T14 ou T15) et la dernière date (T18 ou T19) (Figure III-51).

Ce graphique nous montre que, même s'il est possible de tracer une courbe de tendance linéaire (de pente négative) entre l'IA et $[\text{PO}_4^{3-}]$ à partir des données issues de l'avant-dernière date et de la dernière date, il est difficile de relier clairement les valeurs de l'Index Autotrophique à une concentration correspondante de PO_4^{3-} (coefficient R^2 faible $\approx 0,32$).

➤ **Composition algale en grands groupes**

La réponse de cet indicateur est à nuancer selon les expérimentations menées. En effet, lors de la première expérimentation avec ajouts artificiels, la dominance des algues vertes est apparue suite à l'enrichissement et ce, proportionnellement à celui-ci. Les Diatomées étant alors non discriminantes car présentes sur toute l'expérience en quantités comparables. De plus, la proportion de Chlorophycées a permis de différencier les canaux 2 et 3 dans cette expérimentation alors que ce n'était pas le cas en termes de MSSC et Chla.

Cependant, dans la seconde expérimentation avec ajouts artificiels, même si les quantités d'algues différencient les canaux entre eux, ce n'est pas le cas en termes composition algale. En effet, on ne peut pas relier la distribution des différentes proportions algales à la teneur en nutriments des canaux.

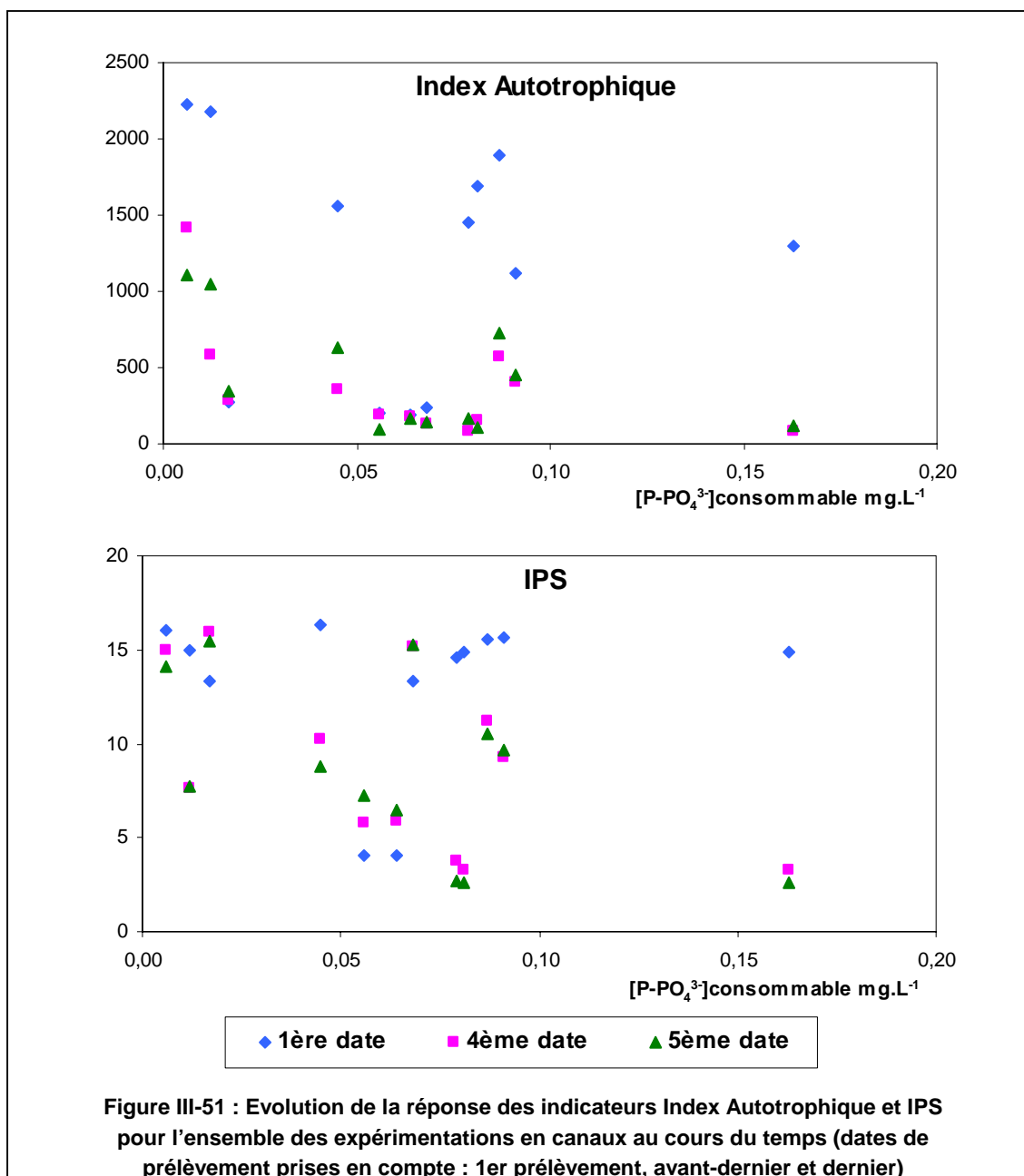
Enfin, l'expérimentation avec Eaux Naturelles a tout de même montré la tendance observée auparavant, à savoir que les canaux non enrichis sont ceux où la proportion de Diatomées est la plus forte.

➤ **Indice de Polluo-sensibilité Spécifique**

L'IPS permet de distinguer différents niveaux trophiques. En effet, on a pu observer des notes plus faibles d'indices dans les canaux soumis à un enrichissement en nutriments. Cependant, bien que les canaux enrichis se différencient du canal témoin par des notes plus faibles d'indice, cet indice ne se révèle pas très sensible pour distinguer les différents canaux enrichis.

En outre, étant donné que les notes d'IPS évoluent également en fonction du temps, on peut se demander à partir de quelle durée d'expérimentation les notes d'IPS sont à prendre en compte.

De manière identique au cas de l'Index Autotrophique, nous avons rassemblé les notes d'IPS issues des différentes expérimentations en fonction de l'enrichissement en PO_4^{3-} de chaque canal et ce, pour trois dates de prélèvement (1^{ère} date, avant-dernière et dernière date) (Figure III-51). Nous n'observons pas de relation forte entre les deux variables. L'indice de Polluo-sensibilité Spécifique peut relever de phénomènes qui ne sont pas nécessairement des perturbations d'origine anthropique, mais des conditions écologiques locales particulières (géologie du terrain par exemple). Aussi, les données de l'IPS sont difficilement exploitables de manière transversale entre différentes expérimentations (valeur de référence différente).



➤ **Caractéristiques de N-trophie pour le compartiment des Diatomées**

La distribution des espèces de Diatomées selon la classification de N-hétérotrophie proposée par Van Dam *et al.* (1994) est un indicateur utile du niveau trophique du milieu sans toutefois avoir permis de distinguer clairement les réponses des canaux enrichis. Globalement, on observe dans les canaux enrichis, davantage de communautés de Diatomées N-hétérotrophes facultatifs alors que les canaux non enrichis présentent une proportion majoritaire de communautés N-autotrophes sensibles et tolérants.

Pour ce descripteur, on peut toutefois se poser la même question que pour l'Indice de Polluo-sensibilité spécifique, à savoir à quelle date de l'expérimentation faut-il analyser la répartition des espèces, étant donné que celle-ci évolue en fonction du temps.

Dans la seconde expérience avec enrichissements artificiels, les communautés de Diatomées N-hétérotrophes obligatoires sont présentes tout au long de l'expérimentation. Toutefois, leur proportion reste plus faible au sein du canal témoin que dans les canaux enrichis. Ainsi, on retiendra que ce n'est pas la présence de ce groupe d'algues qui doit être reliée à une moins bonne qualité de l'eau, mais la proportion de ce groupe.

* *

* * *

CHAPITRE IV : RESULTATS - SECTION 2 :
EXPERIMENTATIONS *IN SITU* :
PRODUCTION DE BIOFILM SUR
SUPPORTS ARTIFICIELS EN
DIFFERENTS SITES

CHAPITRE IV : RESULTATS - SECTION 2 :

EXPERIMENTATIONS *IN SITU* : PRODUCTION DE BIOFILM SUR SUPPORTS ARTIFICIELS EN DIFFERENTS SITES

Dans ce chapitre, la première partie est consacrée aux résultats obtenus lors des campagnes de terrain en Garonne, où nous avons étudié plusieurs couples de stations amont/aval encadrant un rejet de station d'épuration. La seconde partie présente les résultats de la campagne effectuée sur trois plus petits cours d'eau de la région aquitaine présentés précédemment (cf. Chapitre II, II. 2.1.2. Autres sites d'expérimentation p. 94)

*En effet, lors des expérimentations *in situ*, nous avons tout d'abord travaillé en Garonne, où l'acquisition des données a été souvent gênée par le régime hydraulique très variable du fleuve. Aussi, nous avons voulu par la suite étayer les résultats acquis dans ce contexte, sur d'autres cours d'eau à hydrodynamique plus stable et illustrant des qualités d'eau clairement différenciées. Nous avons ainsi travaillé sur trois cours d'eau proches de Bordeaux : le Nasseys, l'Eau Bourde et la Jalle d'Eysines.*

IV. 1 • EXPERIMENTATIONS EN GARONNE

IV. 1.1. Etude sur le site "Toulouse" (du 3.08 au 31.08.04)

IV. 1.1.1. Conditions expérimentales

Comme nous l'avons vu dans le chapitre "Matériel et méthodes", les stations amont et aval du site d'étude de Toulouse sont distantes d'environ 50 km. Elles encadrent l'agglomération toulousaine et le rejet de la station d'épuration de Toulouse-Ginestous d'une capacité nominale de 550000 EH.

La figure IV-1 présente les caractéristiques chimiques des deux stations sur les paramètres PO_4^{3-} , NO_3^- , NO_2^- et NH_4^+ . On observe que les deux sites sont bien différenciés : la station aval présente un net enrichissement que ce soit en termes de PO_4^{3-} ou de NO_3^- .

Les valeurs du rapport N/P nous indiquent que les deux sites présentent une limitation en P (car éloignées du rapport de Redfield N/P=16), celle du site amont étant la plus forte (N/P : Amont=195 ± 83 ; Aval=44 ± 9) (Figure IV-2).

Si on se réfère à la grille d'évaluation du SEQ-Eau¹ établie sur les stations du Réseau National de Bassin les plus proches de nos stations d'études (cf. Figure II-9) (Tableau IV-I), on observe que la station amont est caractérisée par une bonne qualité d'eau sur les trois altérations considérées ("Matières phosphorées", "Matières Azotées", "Nitrates"). En revanche, à la station aval, l'eau est de qualité moyenne concernant les altérations "Matières Azotées" et "Nitrates".

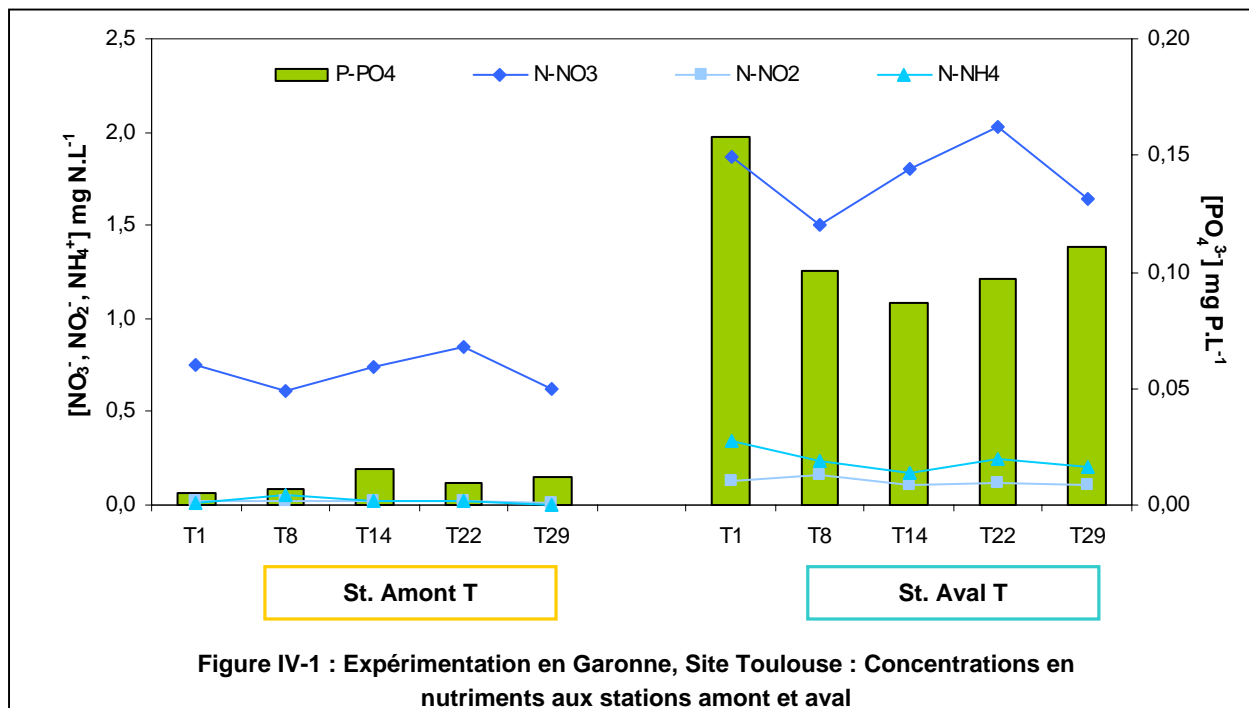
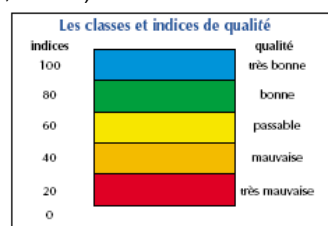


Tableau IV-I : Expérimentation en Garonne, Site Toulouse : Classification de l'eau des stations amont et aval de Toulouse selon la grille du SEQ-Eau

	PHOS	AZOT	NITR
Amont	bonne	bonne	bonne
Aval	bonne	passable	passable

¹ Rappel de la signification des Altérations (Agence de l'eau Adour Garonne, 2000a).

Code	Altération	Paramètres
PHOS	Matières phosphorées	PO ₄ ³⁻ , P _T
AZOT	Matières azotées hors nitrates	NO ₂ ⁻ , NH ₄ ⁺ , N _K
NITR	Nitrates	NO ₃ ⁻



En ce qui concerne les paramètres physico-chimiques (Figure IV-2), on n'observe pas de différences notables entre les deux stations que ce soit pour le pH, la température et l'oxygène dissous. Les deux stations présentent un bon taux d'oxygénation (entre 92 et 150%). Dans le cas de la conductivité, la station aval présente des valeurs légèrement plus fortes que la station amont, ce qui est certainement à relier à un enrichissement plus élevé.

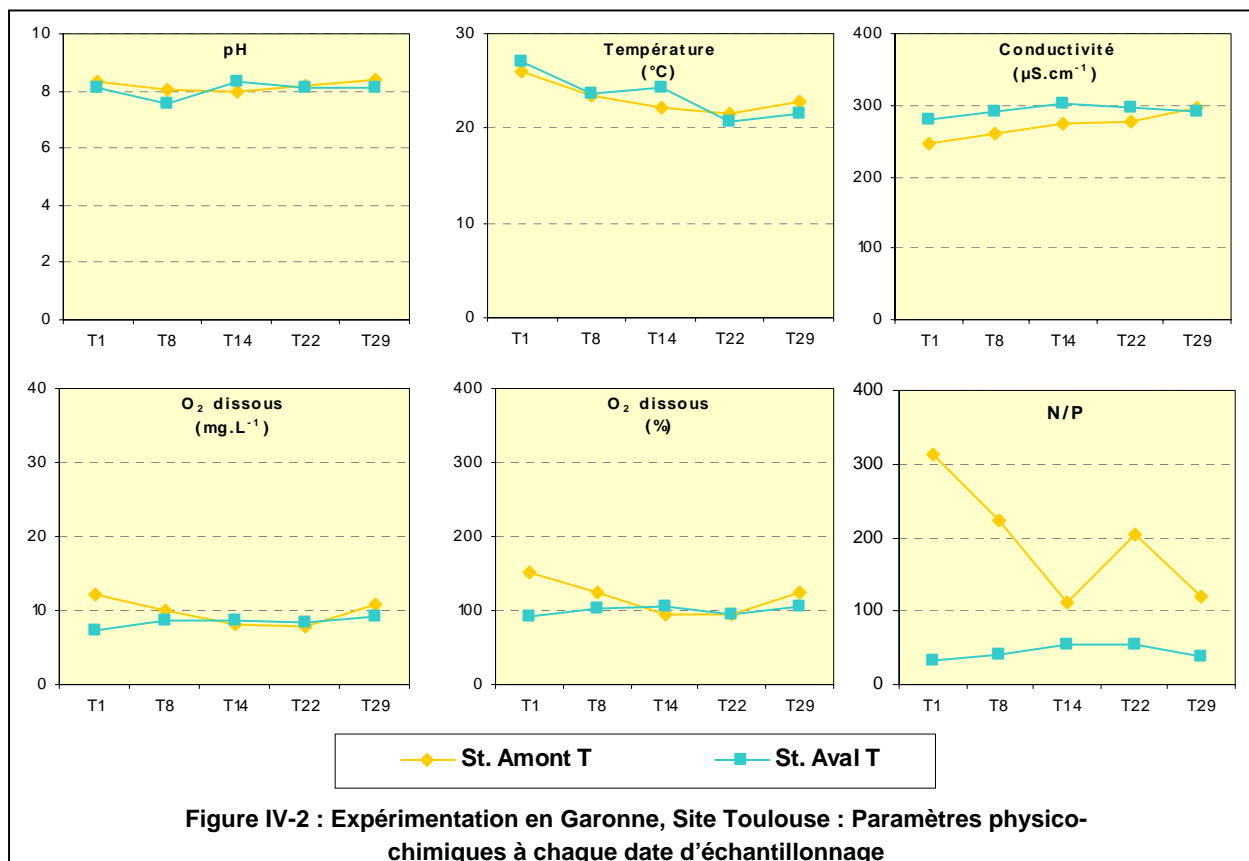


Figure IV-2 : Expérimentation en Garonne, Site Toulouse : Paramètres physico-chimiques à chaque date d'échantillonnage

IV. 1.1.2. Descripteurs quantitatifs de la croissance du biofilm

➤ Matière sèche sans cendre et chlorophylle a (Figure IV-3)

Compte tenu de la différence d'enrichissement en nutriments de l'eau entre les deux stations d'étude, on pouvait s'attendre à une production de biomasse plus élevée à la station aval. En termes de MSSC, on observe que c'est globalement le cas sauf à la date T29 où la station amont présente une teneur supérieure. En outre, on remarque que la station amont présente une croissance plus régulière comparée à la station aval. En effet, après une très forte augmentation de T8 à T14, la quantité de biomasse présente sur le support chute ensuite régulièrement sur cette dernière.

Le constat fait sur la MSSC peut être appliqué à l'évolution du paramètre de la chlorophylle a, tant au niveau des teneurs plus importantes relevées à la station aval (cela est également vrai à T29, toutefois le test de Student (Tableau IV-II) indique que les valeurs ne sont pas significativement différentes) qu'en termes d'évolution plus régulière à la station amont. La station aval présente toujours cette forte augmentation de T8 à T14 puis une chute jusqu'à T29.

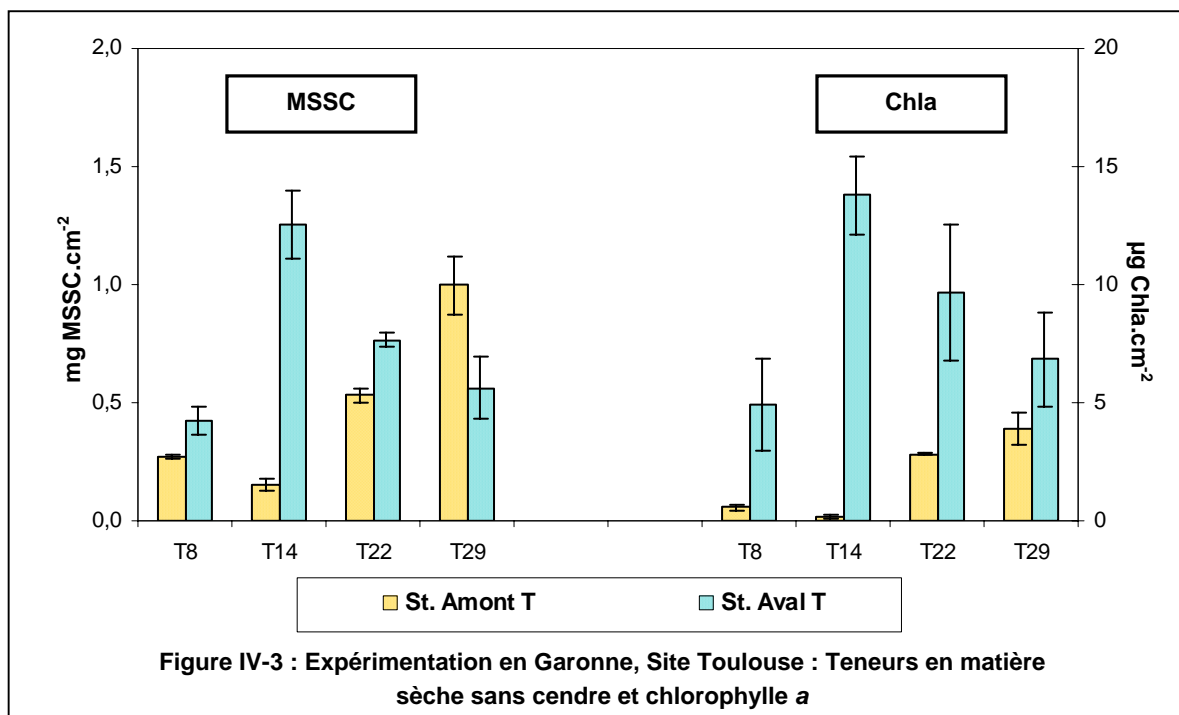


Tableau IV-II : Expérimentation en Garonne, Site de Toulouse : Résultats des tests de Student sur MSSC et Chla

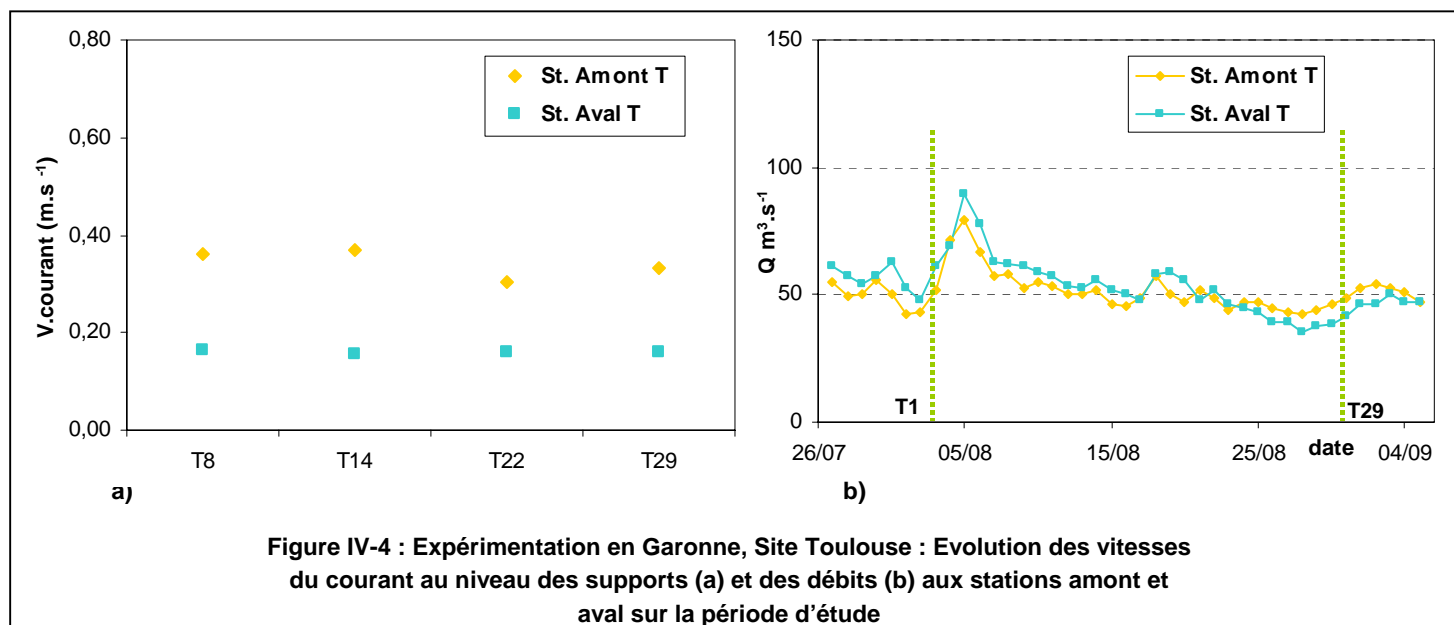
Date d'échantillonnage	MSSC		Chla	
	p		p	
T8	0,011	*	0,018	*
T14	<0,001	*	<0,001 ¹	*
T22	<0,001	*	0,014 ¹	*
T29	0,014	*	0,072	ns

¹ (condition d'égalité de variance ou de normalité non satisfaite)

On peut se demander si la diminution de biomasse observée à la station aval peut être reliée à une modification des débits (crue) qui aurait pu éroder le biofilm. Visuellement, lors des relevés, il ne nous a pas semblé que le substrat ait été lessivé. De plus, les mesures de vitesse du courant au niveau des supports de colonisation ne montrent pas de différence notable entre les dates T14, T22 et T29 (Figure IV-

4a). Les valeurs du rapport N/P évoluent peu sur cet intervalle de temps (de 42 à 55) et ne peuvent pas expliquer la chute de biomasse observée.

Les résultats nous amènent à penser qu'il y a un décalage dans le cycle de croissance observé aux deux stations (cycle de développement d'un biofilm (Biggs B.J.F., 1996)). Un maximum de biomasse apparaît plus tôt à la station aval ce qui est peut être relié aux teneurs en nutriments plus élevées.



Ainsi, on observe qu'une limite peut apparaître au niveau de la comparaison de la vitesse de croissance entre deux stations à niveau trophique différent : lorsque les courbes d'évolution ne sont pas du même ordre entre les deux stations (ce qui peut justement être dû à la différence d'enrichissement en nutriments), il ne serait pas correct de calculer la vitesse de croissance sur le même intervalle de durée car on risquerait de fausser l'un des deux résultats. Par exemple, dans le cas de cette expérience, pour la station aval, on peut penser qu'un suivi plus resserré entre T8 et T14 aurait été plus adapté pour obtenir une valeur de μ_c représentative de la réelle croissance du biofilm.

➤ **Proportion de bactéries viables** (Figure IV-5)

Sur le graphique présentant l'évolution du paramètre "Proportion de bactéries viables", on observe une tendance claire pour la station amont : un accroissement du ratio de bactéries viables en fonction du temps (valeurs de 6 à 55%). Une des hypothèses que l'on peut avancer pour expliquer ce résultat est qu'étant donné le faible accroissement en Chla, il est possible que le biofilm développé présente un relatif équilibre entre les communautés bactériennes et algales.

En revanche, en ce qui concerne la station aval, on ne note pas de tendance continue ; les valeurs évoluent en dents de scie et sont relativement faibles en fin d'expérimentation (autour de 9%). Le fait que

la proportion de bactéries viables diminue à T29 ne nous permet pas de relier l'évolution de ce paramètre à celle de la chlorophylle a.

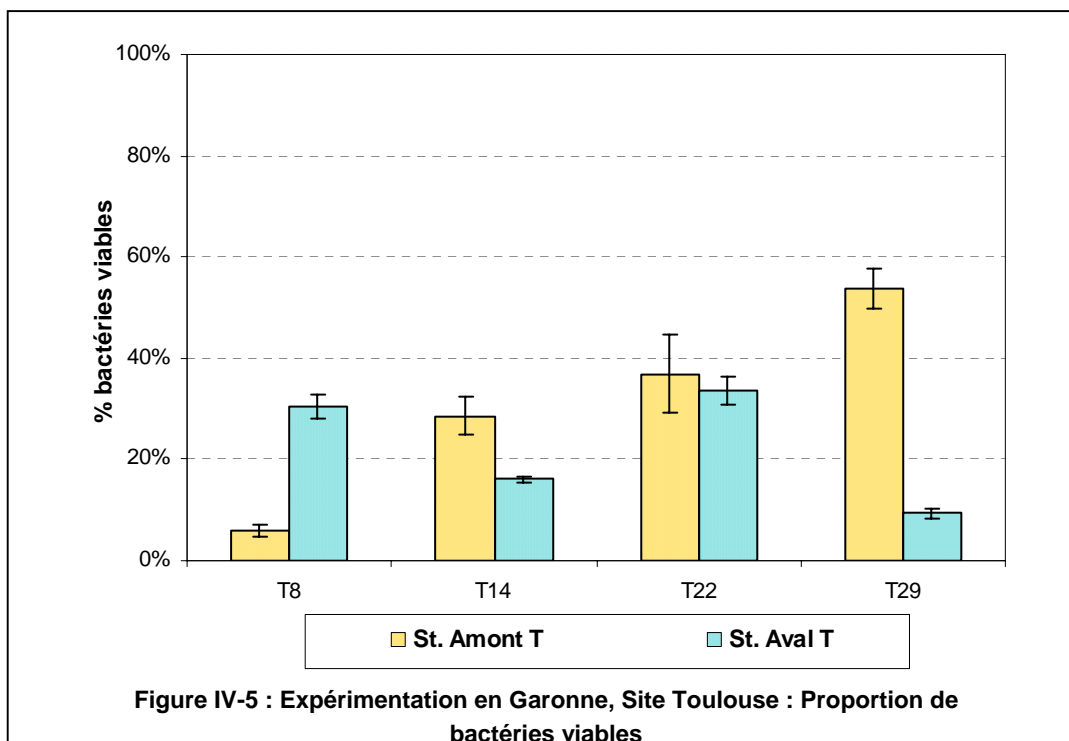


Tableau IV-III : Expérimentation en Garonne, Site Toulouse : Résultats des tests du Khi^2 sur Prop. bact. viables

Date d'échantillonnage	Prop. bact. viables	
	p	
T8	<0,001	*
T14	<0,001	*
T22	0,13	ns
T29	<0,001	*

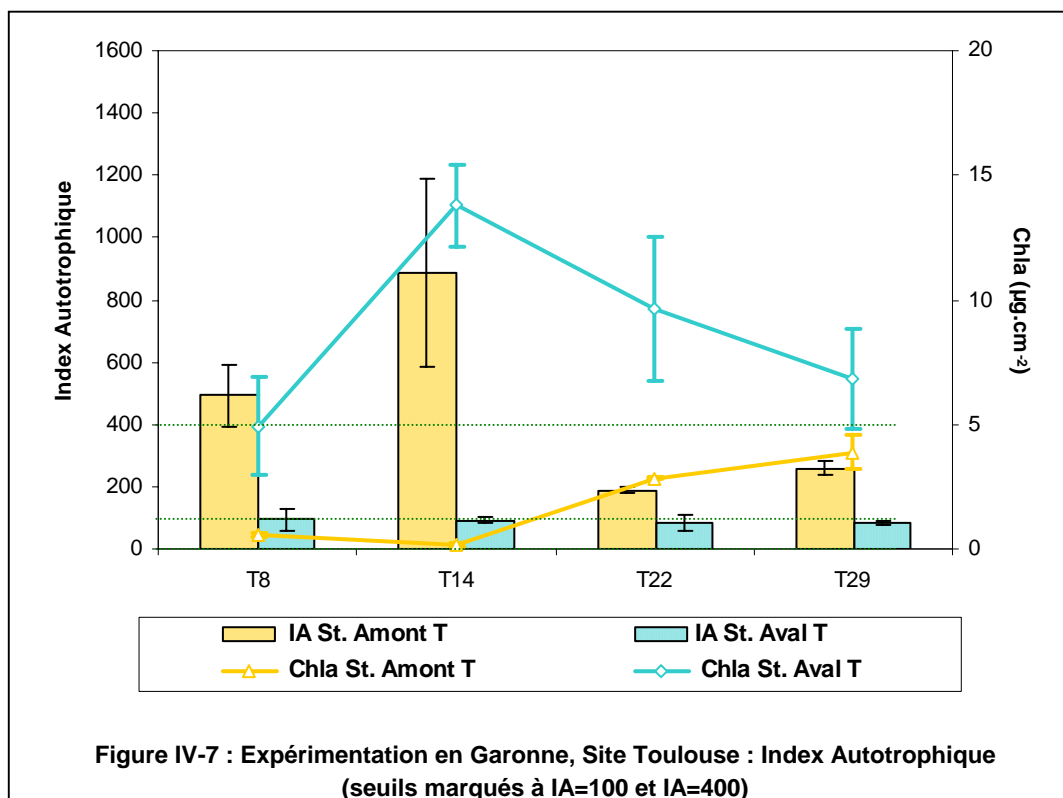
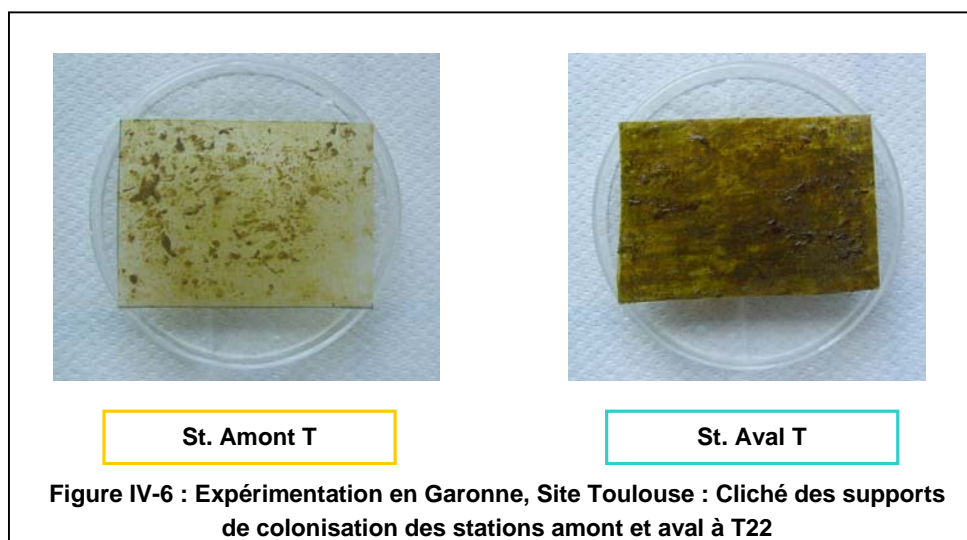
IV. 1.1.3. Descripteurs qualitatifs de la croissance du biofilm

➤ Index Autotrophique (Figure IV-7)

Le graphique de l'Index Autotrophique montre des écarts importants entre les deux stations. Les valeurs relativement élevées de la station amont à T8 et T14 indiquent un développement de communautés à

dominante hétérotrophe. Ensuite, les valeurs d'IA chutent mais restent dans la gamme 100-400, ce qui illustre un biofilm composé en quantités proches de communautés autotrophes et hétérotrophes.

A la station aval, on observe peu d'évolution de l'IA en fonction du temps, les valeurs se maintiennent sous la barre de 100, ce qui signifie que le biofilm développé est constitué majoritairement de communautés autotrophes. On peut poser l'hypothèse que ces valeurs autour de 100, qui caractérisent un fort développement algal (ce qui s'est confirmé visuellement (Figure IV-6)), résultent de la haute teneur en éléments minéraux de l'eau.

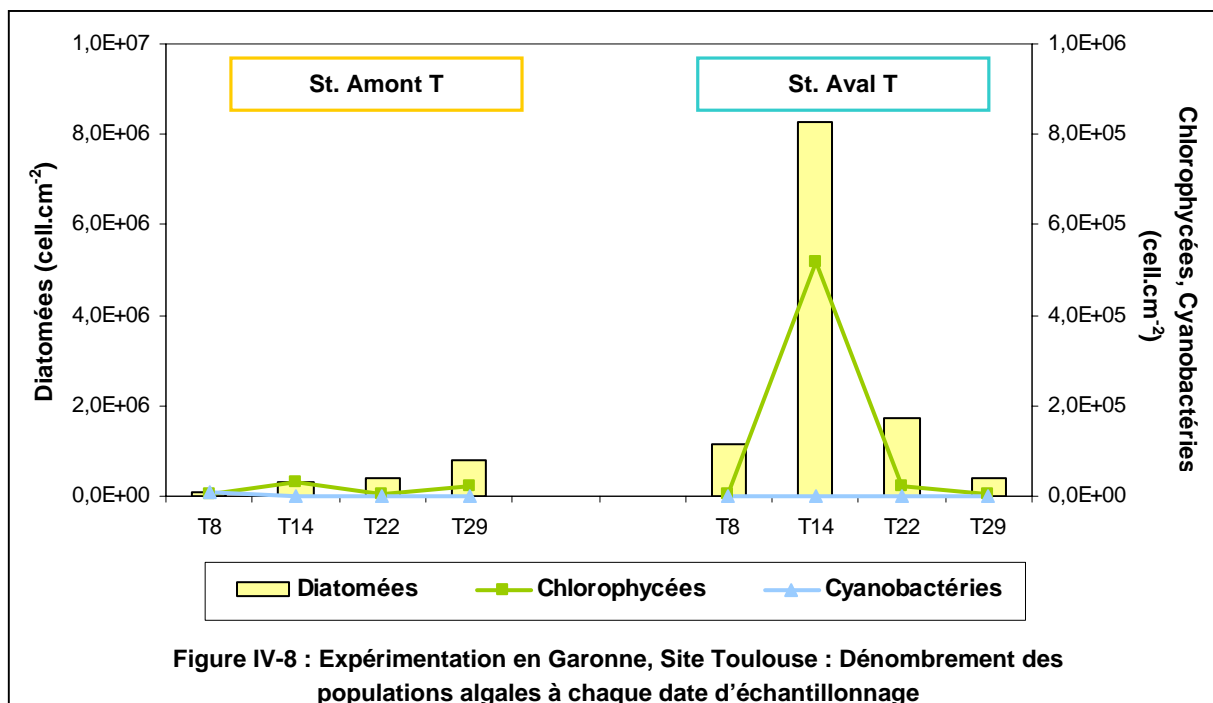


➤ **Communautés algales** (Figure IV-8)

Le graphique des communautés algales illustre ce que l'on observe sur celui de la chlorophylle *a* : globalement, les quantités d'algues présentes sur le support de la station aval sont largement supérieures. Sur l'intervalle T8 à T22, au niveau du groupe des Diatomées, la densité de cellules de la station aval est toujours supérieure (entre 4 et 27 fois). Pour les Chlorophycées, les quantités relevées sont plus élevées à T14 (17 fois) et T22 (4 fois). Ainsi, à la première date, c'est la quantité de Diatomées qui engendre des teneurs en algues élevées à l'aval. On voit ainsi de nouveau l'aspect pionnier de colonisation des assemblages diatomiques. En ce qui concerne le taux de Cyanobactéries, les quantités relatives étant très faibles, il n'y a pas de différence sensible entre les deux stations.

Comme cela a été vu, les dénombrements des communautés algales en aval désignent un pic de biomasse précoce (avec des teneurs totales plus de 20 fois plus fortes qu'à l'amont). A l'inverse de ce que l'on avait pu observer en laboratoire, la distinction entre les deux stations ne repose pas que sur un seul groupe algal mais à la fois sur les compartiments des Diatomées et des Chlorophycées.

Enfin, on observe qu'à la dernière date, les teneurs en algues sont plus faibles à la station aval (que ce soit pour les Diatomées et les Chlorophycées). Sur le graphique de l'évolution des teneurs en chlorophylle *a*, les teneurs en aval étaient supérieures à celles de l'amont mais les moyennes ne sont pas significativement différentes (Tableau IV-II).



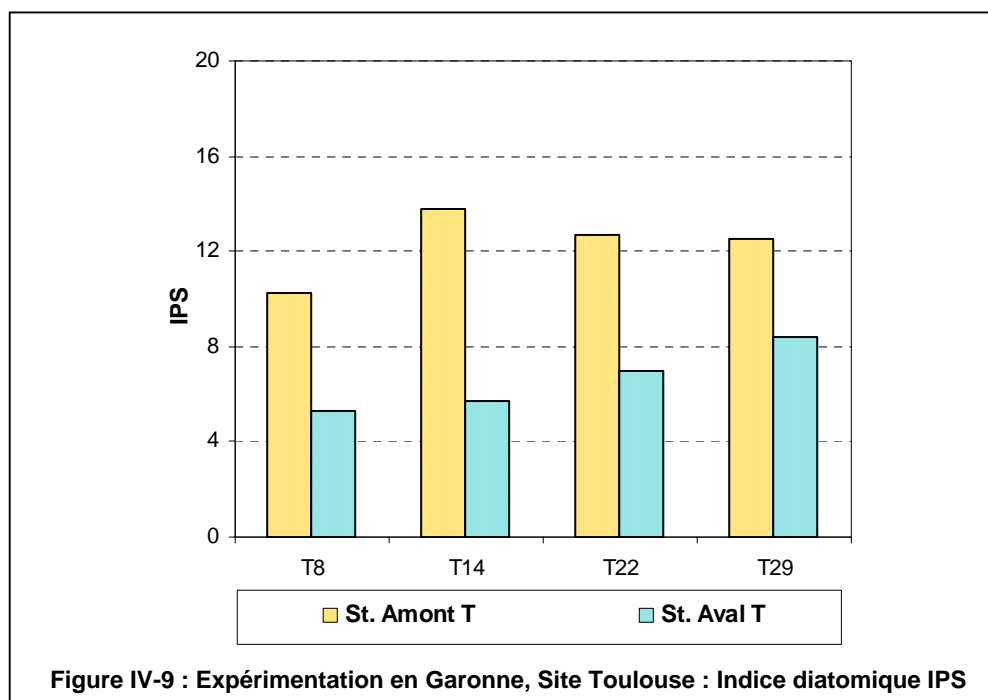
➤ **Compartiment Diatomées**

• **Indice de Polluo-sensibilité Spécifique (Figure IV-9)**

Au niveau de la station amont, les notes d'IPS évoluent peu en fonction du temps et se stabilisent autour de 12/20 (indiquant une pollution moyenne).

Au niveau de la station aval, l'IPS évolue peu mais avec un accroissement régulier des valeurs : les notes d'IPS augmentent de 5 à 8, néanmoins elles restent faibles et indiquent une pollution forte. Ici, on observe que la réponse de cet indice biologique n'est pas totalement cohérente avec les données du SEQ-Eau qui indiquent une pollution moyenne de la station aval.

Les différences de notes entre les deux stations, avec des valeurs plus faibles en aval, confirment l'existence d'un gradient de pollution amont/aval sur ce site d'étude.

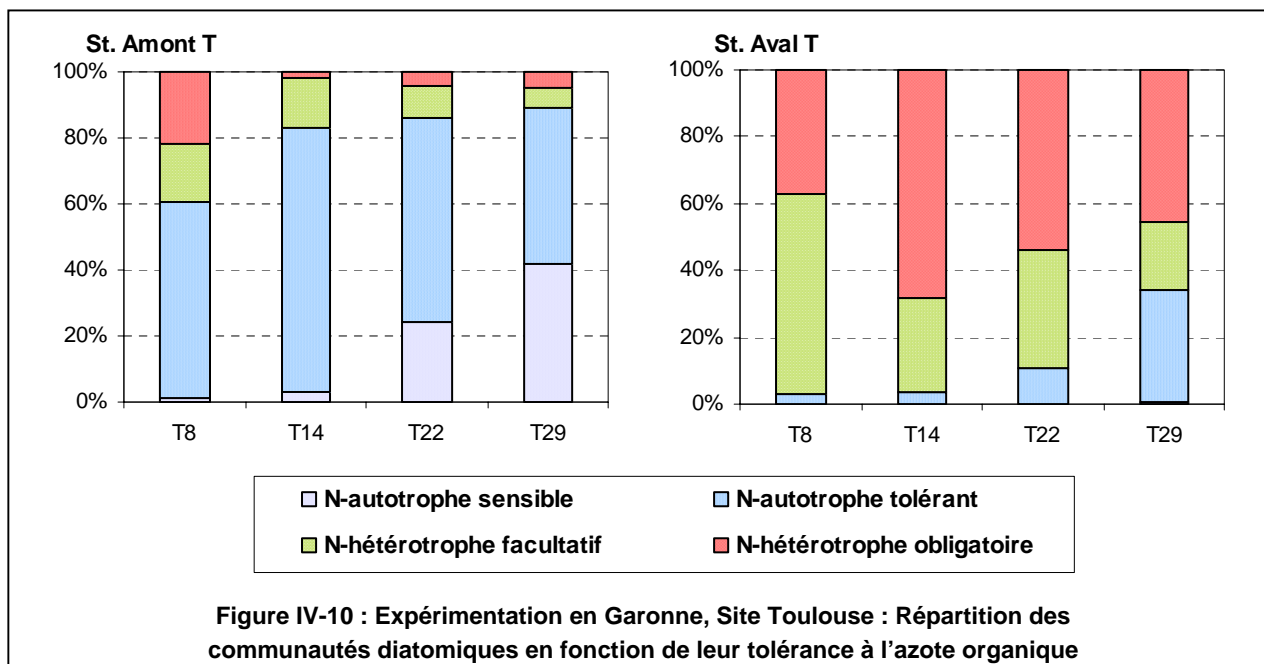


• **N-hétérotrophie (Figure IV-10)**

Les proportions des communautés diatomiques réparties en fonction de leur tolérance à l'azote organique sont très différentes d'une station à l'autre. On observe, pour la station aval, la présence en quantité importante de N-hétérotrophes obligatoires¹ (entre 37 et 68%) alors que les communautés majoritaires à la station amont sont les N-autotrophes tolérantes.

¹ (dont la proportion diminue à partir de la deuxième date toutefois)

En revanche, on note une tendance commune aux deux stations qui est l'augmentation au cours du temps de la proportion du groupe de Diatomées à sensibilité plus élevée envers l'azote organique : c'est la part des N-autotrophes sensibles qui augmente à la station amont et celle des N-autotrophes tolérantes dans le cas de la station aval. Dans le cas de la station aval, ceci peut être rapproché à l'augmentation des notes de l'IPS en fonction du temps.



IV. 1.1.4. Conclusions

En ce qui concerne les stations amont et aval de Toulouse, les caractéristiques chimiques et physico-chimiques des eaux illustrent deux stations bien différenciées, avec des teneurs en PO_4^{3-} et NO_3^- à la station aval plus élevées, d'un facteur respectivement 11 et 2,5. En résumé, les descripteurs de développement des biofilms font apparaître les éléments suivants :

- sur les paramètres MSSC et Chla : on relève, de manière générale, des teneurs en MSSC et Chla supérieures à la station aval. Cependant, l'évolution de la croissance du biofilm est nettement différenciée entre les deux stations, marquée par l'apparition d'un maximum de biomasse plus précoce à la station aval ;
- sur le paramètre "Proportion de bactéries viables" : on a pu observer une augmentation de la proportion en bactéries viables du biofilm développé à la station amont. En revanche, il n'existe pas de tendance claire pour la station aval ce qui rend ce paramètre difficile à exploiter ;
- sur le volet des "Communautés algales" : les dénombrements des algues et leur répartition en grands groupes montrent des teneurs supérieures au sein du biofilm de la station aval. Dans le

cas de cette expérimentation, c'est le développement conjoint du groupe des Diatomées et de celui des Chlorophycées qui indique un enrichissement supérieur de l'eau de la station aval ;

- sur l'IPS : les notes de l'Indice de Polluo-sensibilité Spécifique varient peu à la station amont, qui est caractérisée par une note d'indice moyenne de 12 (pollution moyenne). A la station aval, même si l'IPS s'améliore tout au long du suivi, jusqu'à une valeur de 8, il rend compte d'une forte contamination pour cette station. On remarque que ce résultat ne reflète les informations issues de l'évaluation par le SEQ-Eau, qui indique une pollution moyenne au niveau de la station aval. Toutefois, rappelons que les données du SEQ-Eau prennent en compte l'ensemble de l'année tandis que nos mesures sont ponctuelles ;
- sur la N-hétérotrophie : les résultats acquis témoignent d'une forte différenciation entre les assemblages diatomiques des deux stations. En effet, à l'opposé de celui de la station amont, le peuplement diatomique de la station aval est composé essentiellement de communautés N-hétérotrophes (facultatives et obligatoires), ce qui est indicateur d'une station polluée (on peut ici appliquer la même remarque s'agissant des données du SEQ-Eau).

IV. 1.2. Etude sur le site "St Pierre de Gaubert" (du 21.08 au 8.09.03)

IV. 1.2.1. Conditions expérimentales

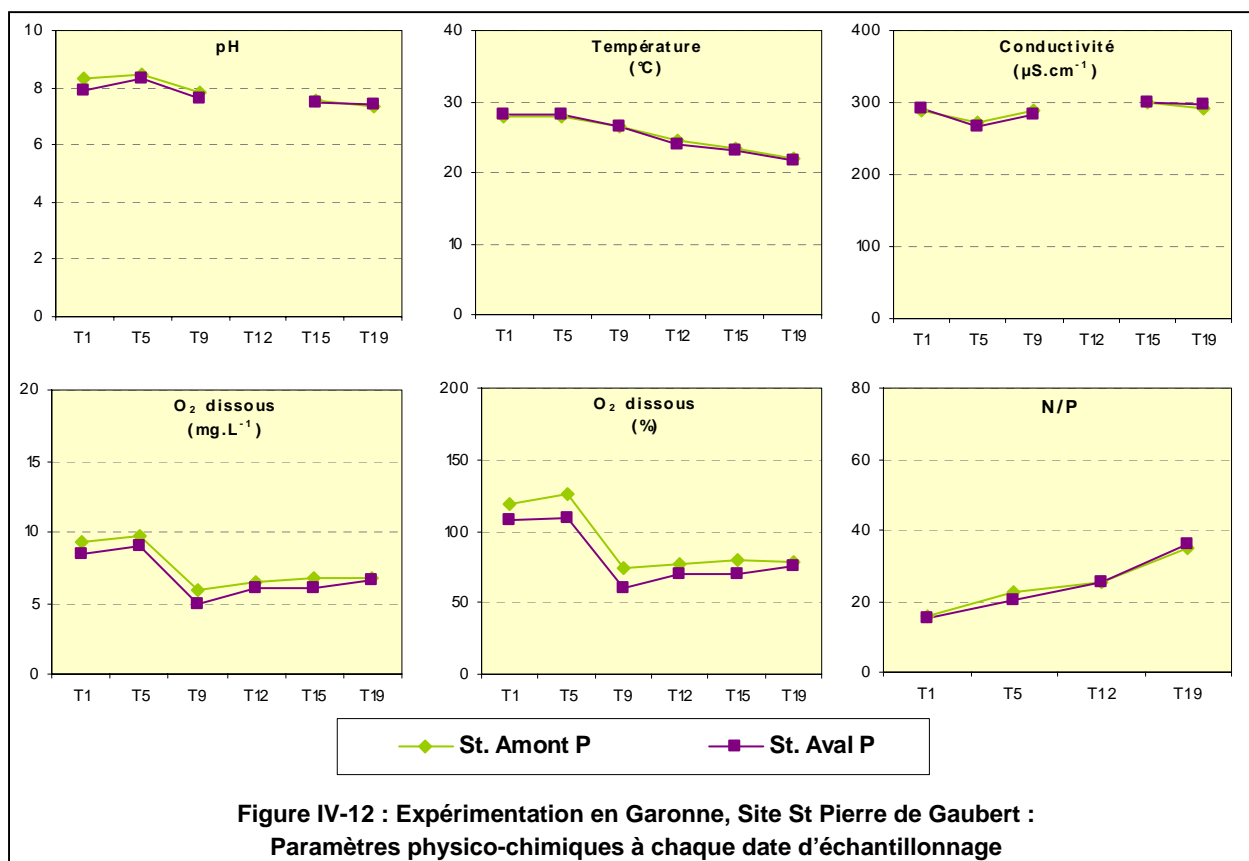
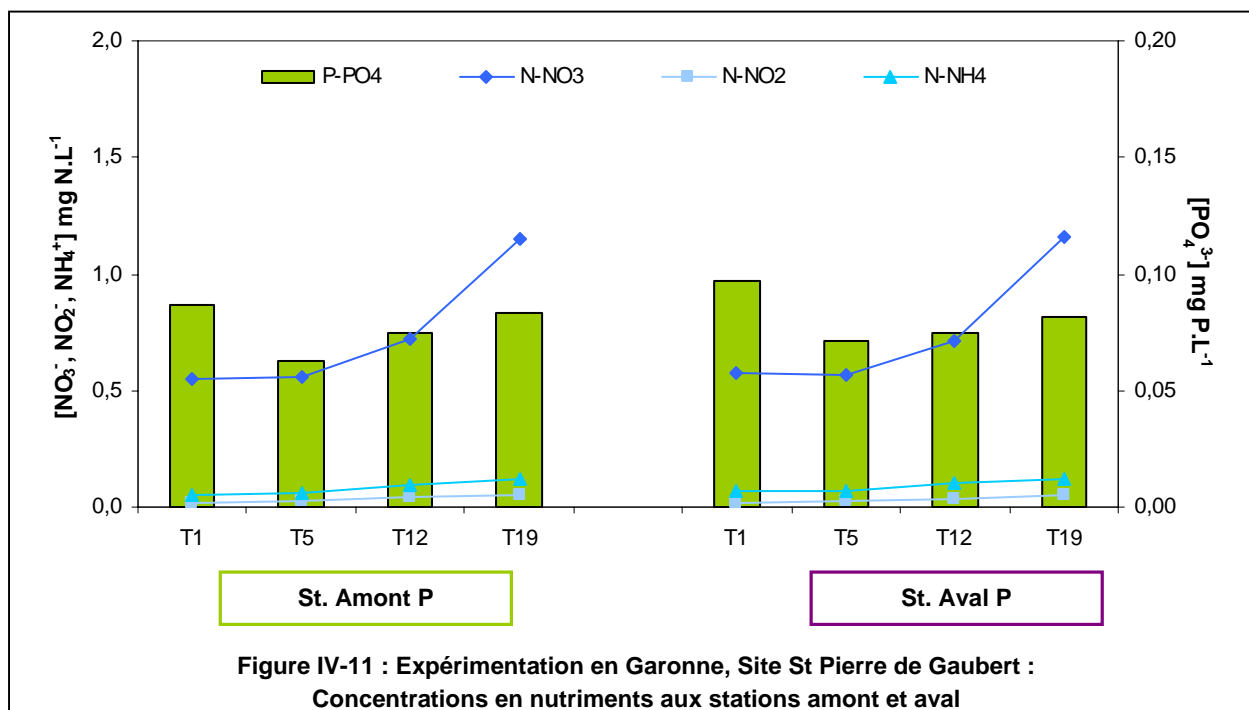
Comme on avait pu le constater lors des expérimentations en canaux, les stations amont et aval du site de St Pierre de Gaubert présentent une composition chimique proche (Figure IV-11). Les teneurs en PO_4^{3-} sont peu variables et la moyenne commune aux deux stations est de $0,08 \pm 0,01$ mg P.L⁻¹. Les concentrations en nitrates sont davantage fluctuantes et évoluent de manière identique pour les deux stations. En raison d'une valeur plus élevée en fin de suivi, la moyenne est de $0,75 \pm 0,26$ mg N.L⁻¹.

Pour ce site d'étude, nous ne disposons pas de données du SEQ-Eau car il n'y a pas de station RNB pouvant caractériser les stations amont et aval choisies (Figure II-9). S'agissant du Gers, dont la confluence avec la Garonne s'effectue entre nos deux stations d'étude, la qualité de ses eaux¹ est de niveau moyen sur les altérations "PHOS" et "AZOT". En revanche, on observe une forte pollution par les nitrates (qualité médiocre sur l'altération "NITR"). Toutefois, le débit moyen du Gers est faible ($Q_{\text{moy}} \approx 1,2$ m³.s⁻¹) par rapport à celui de la Garonne à ce niveau ($Q_{\text{moy}} \approx 80$ m³.s⁻¹).

Par ailleurs, les stations d'étude amont et aval ne se différencient sur aucun paramètre physico-chimique, mis à part au niveau des teneurs en oxygène dissous, sur lesquelles on note des valeurs légèrement plus élevées en amont (Figure IV-12). En outre, on observe une rupture de pente sur l'évolution de ce

¹ données sur la période d'étude de 2003, station RNB de qualité d'eau de Bigarrat (source : www.eau-adour-garonne.fr).

paramètre : à partir de T9, les quantités d'O₂ dissous sont plus faibles et se situent autour de 6 mg O₂.L⁻¹ et 75% de taux d'oxygénation, valeur toutefois non limitante pour les micro-organismes.



IV. 1.2.2. Descripteurs quantitatifs de la croissance du biofilm

➤ **Matière sèche sans cendre et chlorophylle a** (Figure IV-13)

En termes de MSSC, si, en début de colonisation, les teneurs relevées à chaque station sont proches, il apparaît une différenciation aux deux dernières dates d'échantillonnage (ce qui est confirmé par les résultats du test de Student à T15 et T19 (Tableau IV-IV)).

En ce qui concerne le paramètre de la chlorophylle a, on aboutit au même constat visuellement : les teneurs de Chla en aval sont plus faibles. Cependant, le test statistique n'appuie pas cette distinction entre les deux stations, les moyennes des valeurs n'étant significativement différentes qu'à la première date d'échantillonnage (Tableau IV-IV).

A la vue de ces résultats, il semble que le développement du biofilm soit plus faible en aval. Ceci est certainement à mettre en relation avec l'implantation des supports *in situ*. A cette station, nous étions contraints d'accrocher le support de colonisation au ponton. Le développement de macrophytes sur le ponton sur lequel est fixé le support de colonisation a certainement induit une ambiance lumineuse plus faible, responsable du développement moindre du biofilm. En effet, malgré les mesures d'éclairement similaires en début d'expérimentation, les deux sites ont montré des différences notables en cours d'expérimentation.

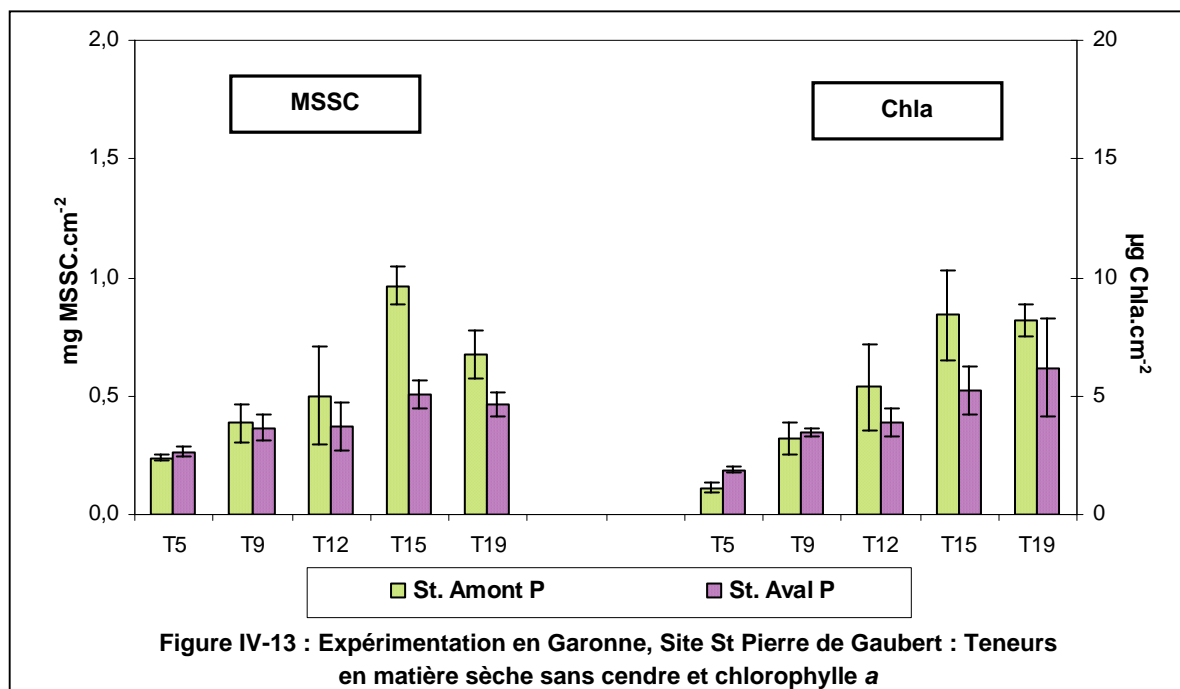


Tableau IV-IV : Expérimentation en Garonne, Site St Pierre de Gaubert : Résultats des tests de Student sur MSSC et Chla

Date d'échantillonnage	MSSC		Chla	
	p		p	
T5	0,214	ns	0,009	*
T9	0,731	ns	0,568	ns
T12	0,410	ns	0,234	ns
T15	0,001	*	0,064	ns
T19	0,031	*	0,188	ns

➤ **Proportion de bactéries viables** (Figure IV-14)

Le principal élément que l'on remarque dans ce graphique est que la proportion de bactéries viables est très faible tout au long du suivi, que ce soit à l'amont (Prop_{Moy}=15%) ou à l'aval (Prop_{Moy}=10%). En fait, il apparaît peu de différence de valeurs entre les deux stations, mis à part à T15 où la station aval se distingue avec des proportions de bactéries viables minimales, autour de 3% (Tableau IV-V).

En ce qui concerne l'évolution du paramètre, le profil est commun aux deux stations : on note un accroissement de T5 à T12 puis une diminution de la proportion de bactéries viables jusqu'à T19.

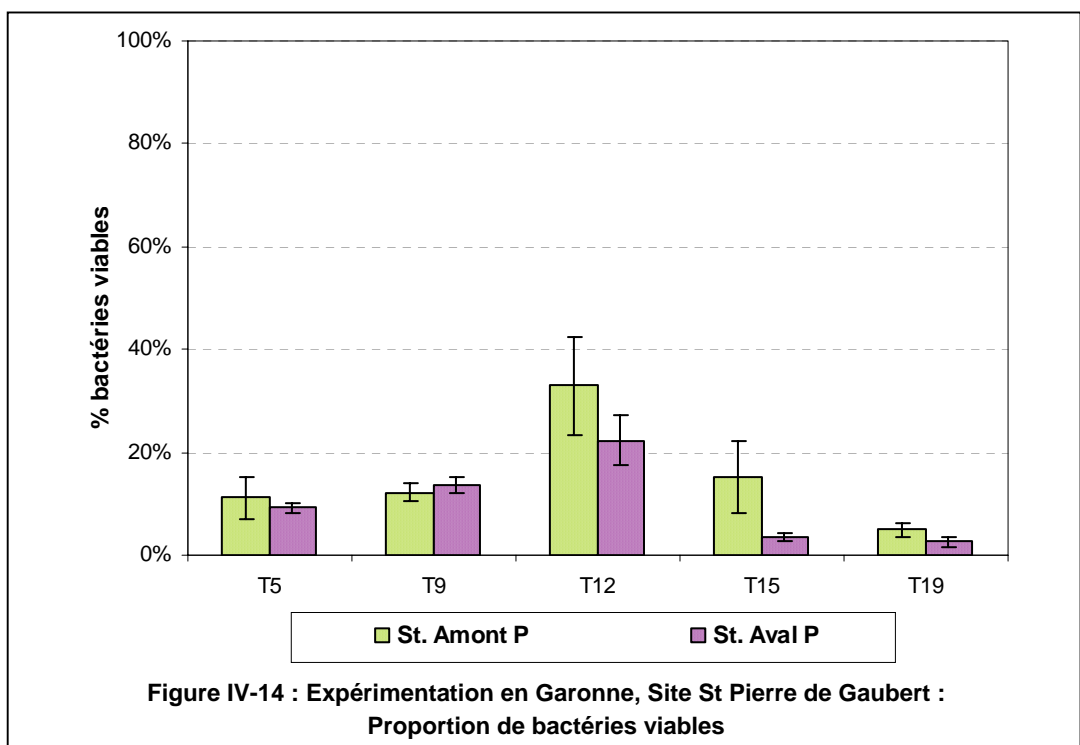


Tableau IV-V : Expérimentation en Garonne, Site St Pierre de Gaubert : Résultats des tests du χ^2 sur Prop. bact. viables

Date d'échantillonnage	Prop. bact. viables	
	p	
T5	0,71	ns
T9	0,96	ns
T12	<0,001	*
T15	<0,001	*
T19	0,12	ns

IV. 1.2.3. Descripteurs qualitatifs de la croissance du biofilm

L'ensemble des résultats obtenus à travers les descripteurs qualitatifs est présenté à la figure IV-15.

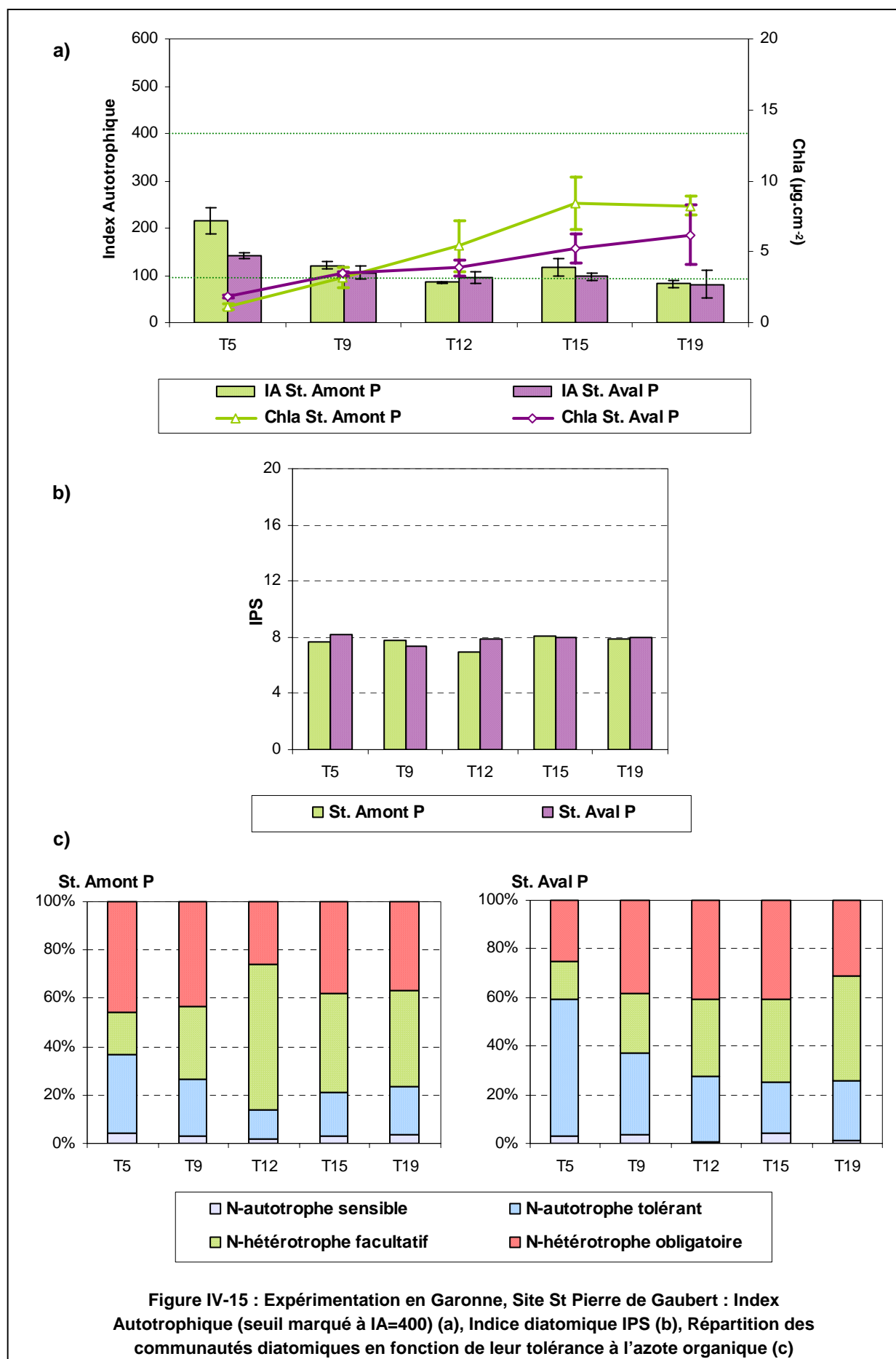
En ce qui concerne l'Index Autotrophique, quelle que soit la station considérée, après une baisse des valeurs de T5 à T9, on observe peu d'évolution en fonction du temps. Sur l'intervalle T9-T19, les valeurs se situent entre 80 et 120, indiquant une majorité autotrophe dans la composition des biofilms.

Au niveau du compartiment des Diatomées, les données d'Indice de Polluo-sensibilité Spécifique sont également très proches entre les deux stations et ne présentent pas d'évolution sensible au cours de l'expérimentation. La valeur moyenne est de 8 et souligne ainsi la pollution forte du milieu que ce soit en amont ou en aval de la station d'épuration de St Pierre de Gaubert.

En revanche, en ce qui concerne les caractéristiques de N-hétérotrophie, on observe une différenciation entre les résultats obtenus aux stations amont et aval. La part des N-hétérotrophes facultatives et obligatoires est plus importante à la station amont. Ceci est corrélé aux teneurs en azote organique plus élevées à cette station amont (Tableau IV-VI). En outre, on peut souligner l'aspect intégrateur des composantes du biofilm. En effet, les variations de la teneur en azote organique sont corrélées positivement aux variations de la population de N-hétérotrophes facultatives.

Tableau IV-VI : Expérimentation en Garonne, Site St Pierre de Gaubert :Teneurs en azote organique

$[N_{org}] \text{ mg N.L}^{-1}$	T1	T5	T12	T19
St. Amont P	0,64	1,62	0,53	0,86
St. Aval P	0,42	0,49	0,67	0,72



IV. 1.2.4. Conclusions

Dans le cas de cette expérimentation, il faut souligner que les stations amont et aval n'apparaissent pas différenciées en ce qui concerne la qualité de l'eau. Toutefois, on a pu observer des différences sensibles sur le développement du biofilm aux deux sites en termes de MSSC et Chla, avec des valeurs plus fortes en amont.

En outre, si l'Indice de Polluo-sensibilité Spécifique ne différencie pas les deux stations (note moyenne de 8, écart-type de 0,4), les graphiques de N-hétérotrophie, en revanche, les démarquent et indiquent une pollution plus importante à l'amont. En effet, on observe, à cette station, une proportion de N-hétérotrophes (facultatifs et obligatoires) nettement supérieure.

On disposait pour cette expérimentation des données de teneurs en azote organique et on a constaté une inter-dépendance entre ces concentrations et la part majoritaire de N-hétérotrophes à la station amont. Ainsi, ce sont les descripteurs quantitatifs et qualitatifs du biofilm qui ont permis la distinction de qualité d'eau entre les deux stations.

Par ailleurs, on peut également retenir que, sur ce site, le rejet de la station d'épuration de St Pierre de Gaubert n'entraîne pas une dégradation notable de la qualité de l'eau, l'amont étant déjà relativement pollué, certainement par les rejets et pollutions diffuses intervenant précédemment.

IV. 2 • EXPERIMENTATIONS EN PETITES RIVIERES

IV. 2.1. Expérimentation sur le Nasseys (du 1.06 au 29.06.04)

IV. 2.1.1. Conditions expérimentales

Sur le cours d'eau du Nasseys, nous encadrons une usine de fabrication de charbon actif dont le rejet est constitué principalement de phosphore. Cette usine est équipée depuis 1987 d'une unité de traitement en P et on observe effectivement que les teneurs relevées en aval ne sont que légèrement plus élevées qu'en amont ($[P-PO_4^{3-}]_{\text{amont}}=0,012 \pm 0,007 \text{ mg.L}^{-1}$ et $[P-PO_4^{3-}]_{\text{aval}}=0,030 \pm 0,015 \text{ mg.L}^{-1}$) (Figure IV-16).

Les teneurs en NO_3^- à l'amont et aval sont également proches et toutes inférieures à $0,5 \text{ mg N.L}^{-1}$. En revanche, le profil d'évolution diffère d'une station à l'autre. Contrairement à l'aval, les valeurs à la station amont diminuent continuellement de T8 à T29.

Les données du SEQ-Eau¹ de la station RNB (située en aval de nos deux points de mesure (Figure II-13)) affiche une qualité bonne sur les altérations "Matières Azotées", "Nitrates" et "Micro-polluants Minéraux sur Eau Brute". En revanche, sur l'altération "Matières phosphorées", l'eau est de qualité moyenne (Tableau IV-VII).

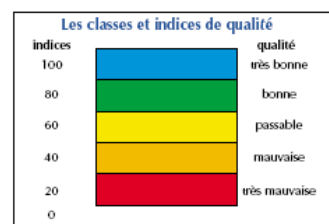
Tableau IV-VII : Expérimentation Nasseys : Classification du cours d'eau selon la grille du SEQ-Eau

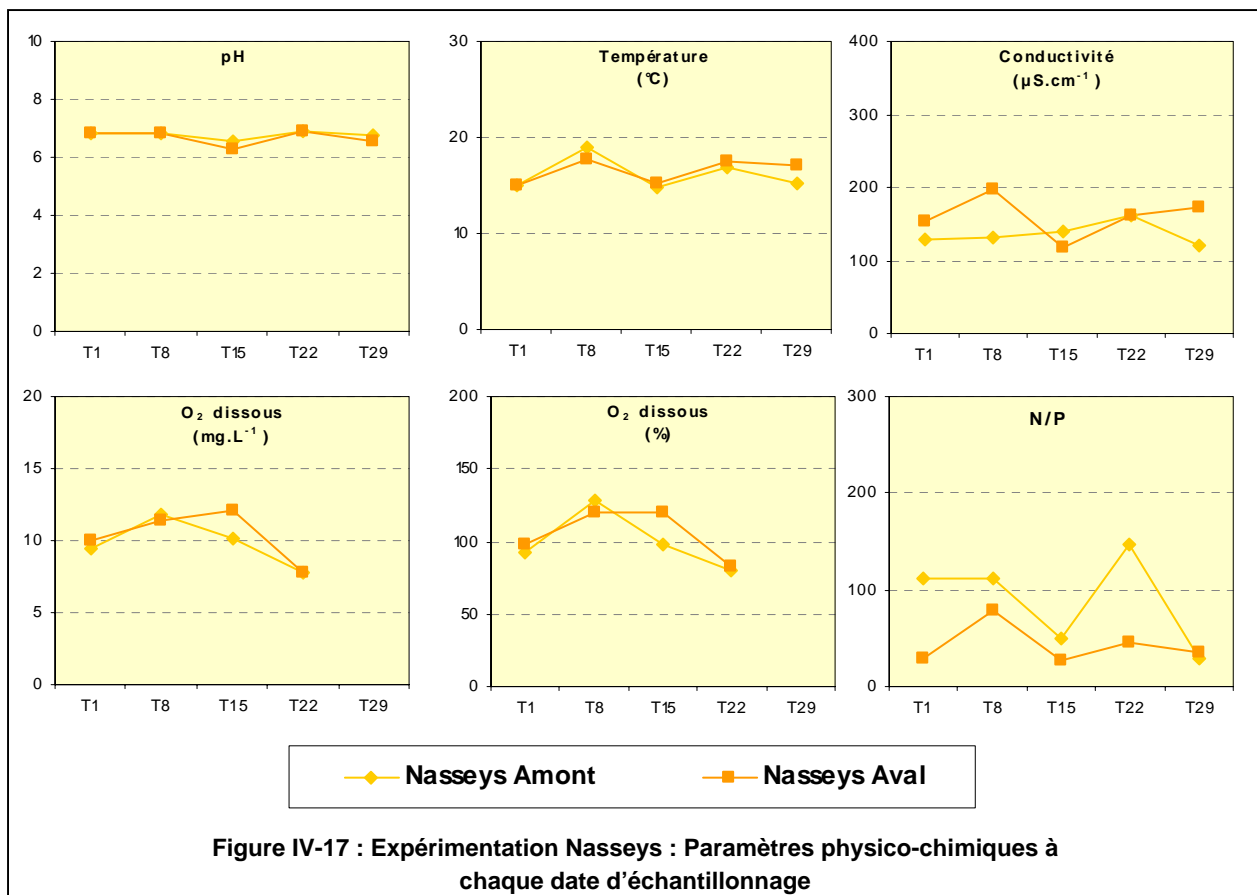
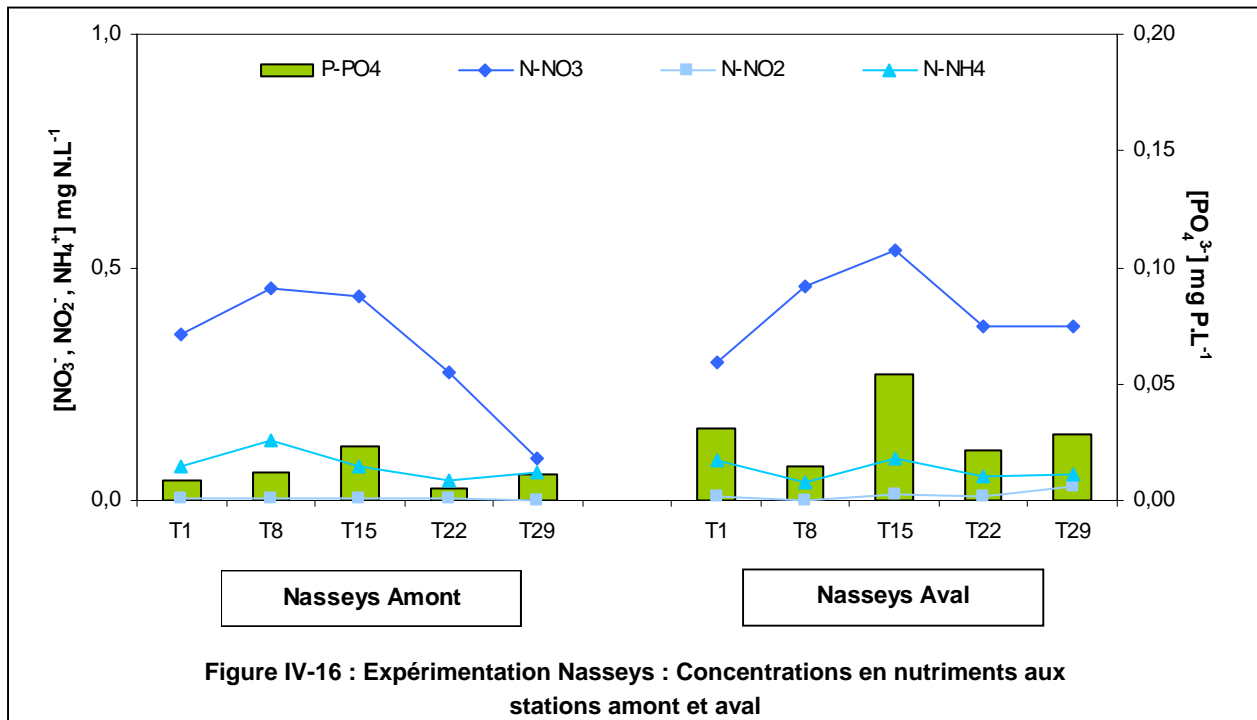
	PHOS	AZOT	NITR	MPMI
Station RNB Nasseys				

Les valeurs de pH, température et oxygène dissous mesurées sont proches entre les deux stations. Pour la conductivité, même si les données présentent davantage de variabilité, les différences de valeurs ne distinguent pas l'amont et l'aval (Figure IV-17).

¹ Rappel de la signification des Altérations (Agence de l'eau Adour Garonne, 2000a).

Code	Altérations	Paramètres
PHOS	Matières phosphorées	PO_4^{3-} , P_T
AZOT	Matières azotées hors nitrates	NO_2^- , NH_4^+ , N_K
NITR	Nitrates	NO_3^-
MPMI	Micropolluants minéraux sur eau brute	Hg, Cd, Cr, Pb, Ni, Zn, Cu, As, Se, CN^-





IV. 2.1.2. Descripteurs quantitatifs de la croissance du biofilm

➤ **Matière sèche sans cendre et chlorophylle a** (Figure IV-18)

Les valeurs de MSSC et Chla renforcent les résultats issus de la description des paramètres chimiques et physico-chimiques, à savoir le peu de différence entre les deux stations.

Si on se concentre sur les quelques différences observables, on remarque qu'en termes de MSSC, la croissance est régulière pour l'amont alors qu'elle stagne rapidement à l'aval (dès T15). Toutefois, les écarts entre stations ne sont significatifs qu'à T15 (Tableau IV-VIII).

Concernant le paramètre de la chlorophylle a, les écarts de valeurs entre les deux stations apparaissent plus prononcés. Cependant, la dispersion des données de l'aval nuance les différences visibles à T22. Il n'y a finalement qu'à T29 que les teneurs de la station aval sont plus fortes (Tableau IV-VIII).

Enfin, notons que pour les deux stations, on ne retrouve pas les mêmes profils d'évolution sur les deux descripteurs MSSC et Chla.

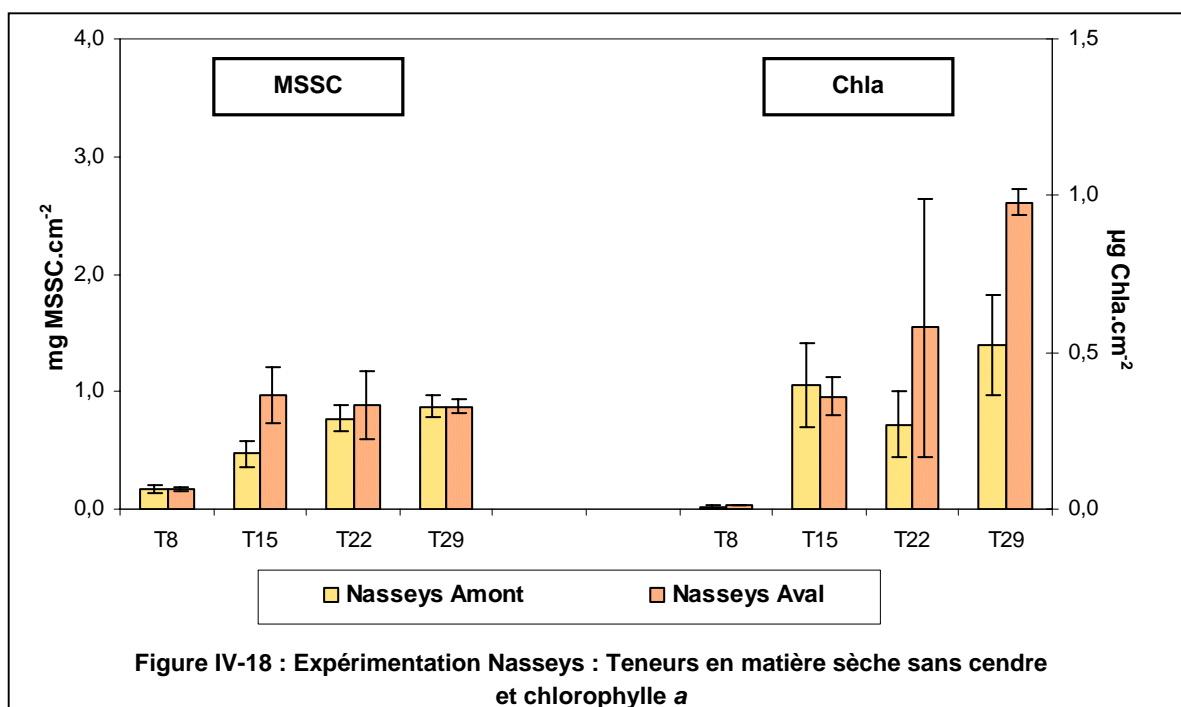


Tableau IV-VIII : Expérimentation Nasseys : Résultats des tests de Student sur MSSC et Chla

Date d'échantillonnage	MSSC		Chla	
	p		p	
T8	0,823	ns	0,397	ns
T15	0,032	*	0,700	ns
T22	0,574	ns	0,278	ns
T29	0,980	ns	0,009	*

➤ **Proportion de bactéries viables** (Figure IV-19)

Là encore on retrouve une similitude de valeurs entre les deux stations, excepté à T29 (Tableau IV-IX). En partant de l'hypothèse qu'un fort développement algal défavoriserait celui des bactéries, le taux de bactéries viables à la station aval est bien corrélé à la teneur en Chla, y compris à T29. En revanche, ce n'est pas le cas à la station amont pour T29 (augmentation de la part de bactéries viables), une tendance du graphique qu'il ne nous est pas possible d'expliquer.

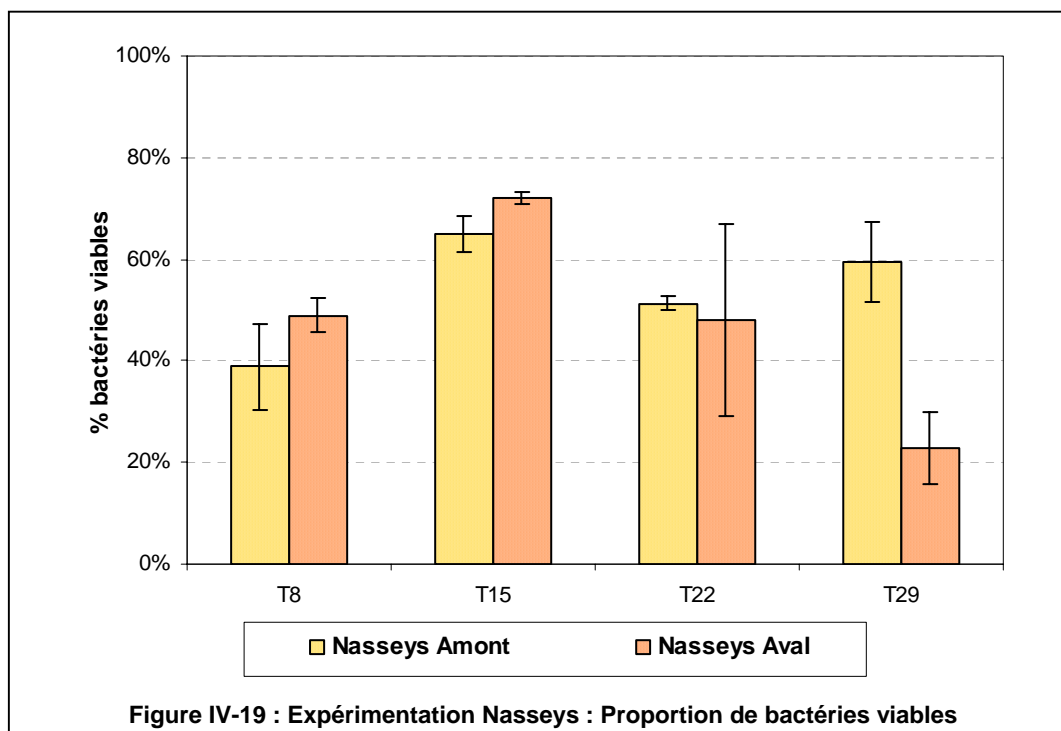


Tableau IV-IX : Expérimentation Nasseys : Résultats des tests du Khi^2 sur Prop. bact. viables

Date d'échantillonnage	Prop. bact. viables	
	p	
T8	0,38	ns
T15	0,41	ns
T22	0,83	ns
T29	<0,001	*

IV. 2.1.3. Descripteurs qualitatifs de la croissance du biofilm

Les descripteurs quantitatifs montrant des résultats amont/aval très proches, nous avons choisi de regrouper les données concernant les descripteurs qualitatifs (Figure IV-20).

Avec des valeurs toujours supérieures à 800, l'Index Autotrophique met en évidence l'hétérotrophie des biofilms développés aux deux stations tout au long de l'expérimentation. On peut quand même souligner que les données d'IA affichent un net décrochage entre T8 et T15 : pour les deux stations, l'IA évolue de 15000 à moins de 3000, ce qui toutefois ne modifie pas le caractère hétérotrophe du biofilm.

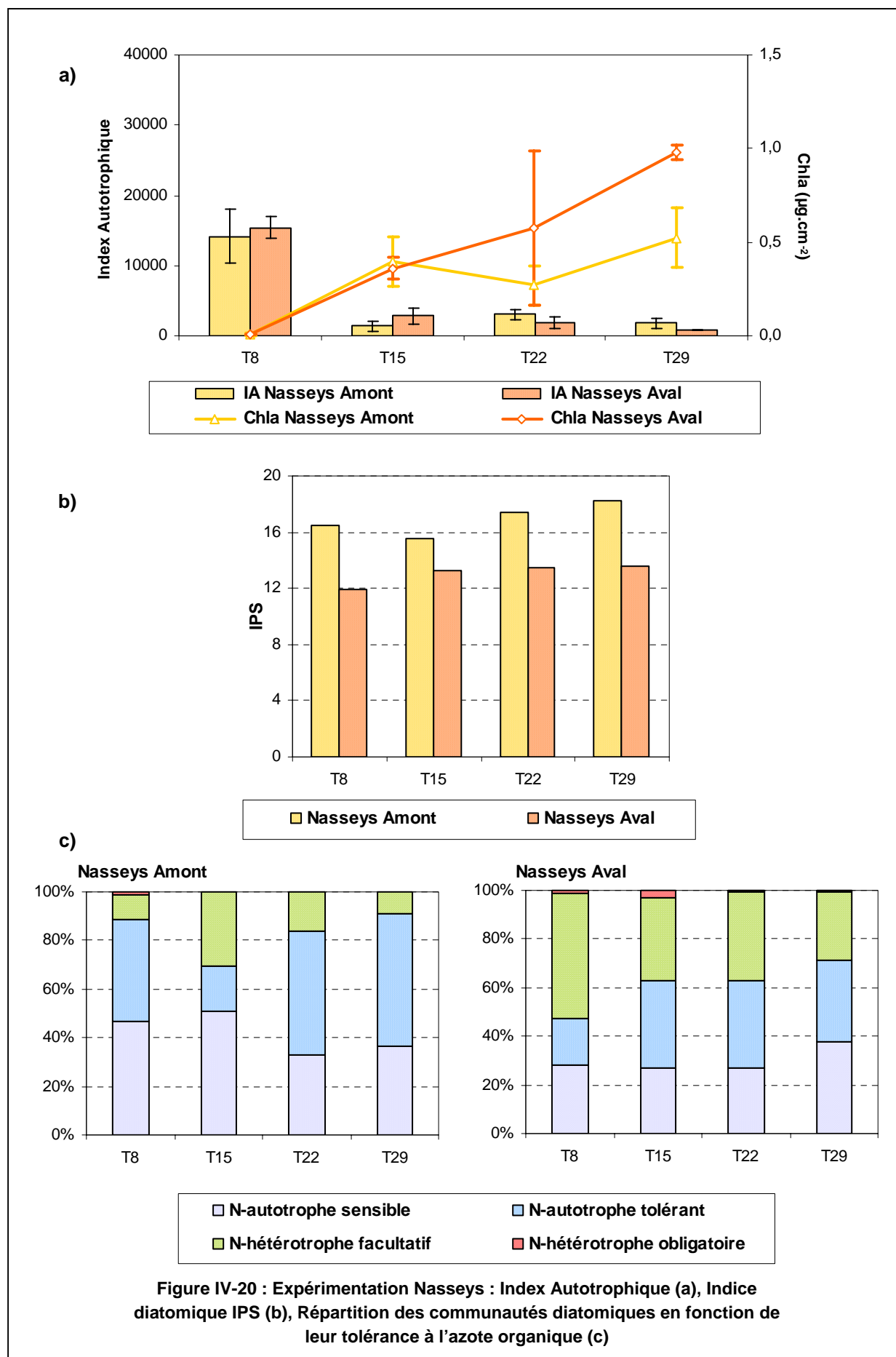
En ce qui concerne le compartiment des Diatomées, deux informations ressortent du graphique de l'IPS : les deux stations conservent une classe d'écart et, en fin d'expérimentation, elles sont toutes les deux passées à la classe directement supérieure (pollution faible à l'amont et modérée à l'aval).

Les graphiques de N-hétérotrophie indiquent que les deux stations ne se différencient pas beaucoup. La principale variation tient à la quantité plus importante des communautés N-hétérotrophes facultatives à l'aval, ce qui révèle une eau d'un peu moins bonne qualité.

Quant à l'évolution des communautés, s'il n'existe pas de tendance marquée de la répartition à la station amont, on observe pour la station aval, une réduction assez nette du groupe des N-hétérotrophes au cours du temps. Cette évolution de la population de Diatomées en faveur d'espèces à plus grande sensibilité envers l'azote organique, qui rejoint l'amélioration de la qualité de l'eau déjà constatée, mettrait en évidence que le biofilm n'a pas atteint sa phase mature et est toujours sensible aux conditions environnementales.

Au final, les données recueillies sur le Nasseys convergent toutes vers la même idée ; si la station aval est légèrement plus polluée que la station amont, les différences entre les deux restent faibles.

En outre, dans ce cas précis, ce sont les données issues des descripteurs qualitatifs qui révèlent les disparités entre les deux stations.



IV. 2.1.4. Conclusions

Sur ce cours d'eau, les caractéristiques physico-chimiques décrivent une station amont peu enrichie et une station aval légèrement plus enrichie (en PO_4^{3-}). Nous avons pu observer sur les descripteurs du développement des biofilms les points suivants :

- sur les paramètres MSSC et Chla : on note peu de différence entre les stations amont/aval. En revanche, la croissance est plus régulière en amont, la station aval montre une stagnation des valeurs dès la deuxième date d'échantillonnage. Ceci peut amener à penser qu'en aval, l'enrichissement plus élevé de l'eau induit un développement plus rapide du biofilm et donc une phase d'équilibre de croissance qui se produit plus tôt qu'en amont. En termes de chlorophylle *a*, nous avons observé de forts écarts entre les deux stations, la station aval présentant des teneurs plus élevées en fin de suivi, écarts cependant atténués ponctuellement par un fort écart-type en aval. Il faut également souligner que l'évolution du biofilm à la station aval ne paraît pas être limitée dès la deuxième date comme elle était en MSSC, ce qui remet en question l'hypothèse d'un équilibre de croissance du biofilm dès ce point ;
- sur le paramètre "Proportion de bactéries viables" : outre une similitude de résultats entre les deux stations, ce paramètre nous apporte, dans cette expérimentation, peu d'informations relatives à l'évolution de la croissance des biofilms ;
- sur l'IPS : en ce qui concerne l'Indice de Polluo-sensibilité Spécifique, les deux stations conservent un écart d'une classe de qualité tout au long de l'expérimentation mais remontent toutes les deux d'une classe entre le début et la fin de l'expérimentation ;
- sur la N-hétérotrophie : ce paramètre discrimine peu les stations entre elles, la seule différence notable réside dans la part plus importante de communautés N-hétérotrophes facultatives à l'aval. Ceci signe une eau de moins bonne qualité par rapport à l'amont. Toutefois, on note que la part globale des communautés N-hétérotrophes (facultatif et obligatoire) diminue en fonction du temps. On peut supposer que cela est relatif à l'amélioration de la qualité d'eau constatée et ainsi confirmer la réactivité des communautés du biofilm à la composition de l'eau.

IV. 2.2. Expérimentation sur l'Eau Bourde (du 1.06 au 29.06.04)

IV. 2.2.1. Conditions expérimentales

Dans le cas de l'Eau Bourde, les stations amont et aval, qui encadrent le rejet de la station d'épuration de Cestas (capacité 21000 EH), sont nettement différenciées sur les concentrations en nutriments, la station aval étant la plus enrichie (Figure IV-21).

En ce qui concerne la station amont, la teneur en PO_4^{3-} est relativement stable tout au long de l'expérimentation ($[\text{P-PO}_4^{3-}] = 0,025 \pm 0,009 \text{ mg.L}^{-1}$). En revanche, on observe une diminution de la concentration en NO_3^- en parallèle à une augmentation des concentrations en NH_4^+ et NO_2^- .

Au niveau de la station aval, les teneurs en PO_4^{3-} sont très variables ($[\text{P-PO}_4^{3-}] = 0,120 \pm 0,118 \text{ mg.L}^{-1}$) et peuvent augmenter d'un facteur 7 d'une date à l'autre¹. Pour cette station, les variations constatées sur les PO_4^{3-} s'observent également sur les NO_3^- et de manière encore plus nette sur NH_4^+ et NO_2^- .

Les vitesses de courant (Tableau IV-X) relevées au niveau des supports de colonisation sont dans la même gamme en amont et aval et diminuent régulièrement de T8 à T29 ce qui nous permet de penser que le débit du cours d'eau a eu tendance à diminuer au cours de l'expérimentation.

Tableau IV-X : Vitesses du courant relevées sur l'Eau Bourde

Vitesse du courant (m.s^{-1})	T8	T22	T29
Eau Bourde Amont	0,15	0,13	0,10
Eau Bourde Aval	0,47	0,36	0,27

Ainsi, à la station aval, l'augmentation des teneurs en nutriments peut être expliquée par une plus faible dilution des rejets de la station d'épuration², qui ont alors une plus forte incidence sur la qualité de l'eau (compte tenu du faible débit de la rivière³, $Q_{\text{moy}} \approx 0,10 \text{ m}^3.\text{s}^{-1}$ et du rejet de la station⁴, $Q_{\text{moy}} \approx 0,030 \text{ m}^3.\text{s}^{-1}$, le rejet de la station d'épuration constitue un apport important en volume au débit de la rivière). A l'amont, la baisse de la teneur en NO_3^- peut être due à une atténuation du lessivage des terrains environnants.

Sur l'Eau Bourde, il n'y a pas de station de mesure du Réseau National de Bassin, et donc pas de données de SEQ-Eau disponibles.

On ne note pas de différenciation entre les deux stations sur les paramètres pH, température et oxygène dissous (Figure IV-22). Seules les mesures de conductivité présentent des écarts : à la station aval, on a

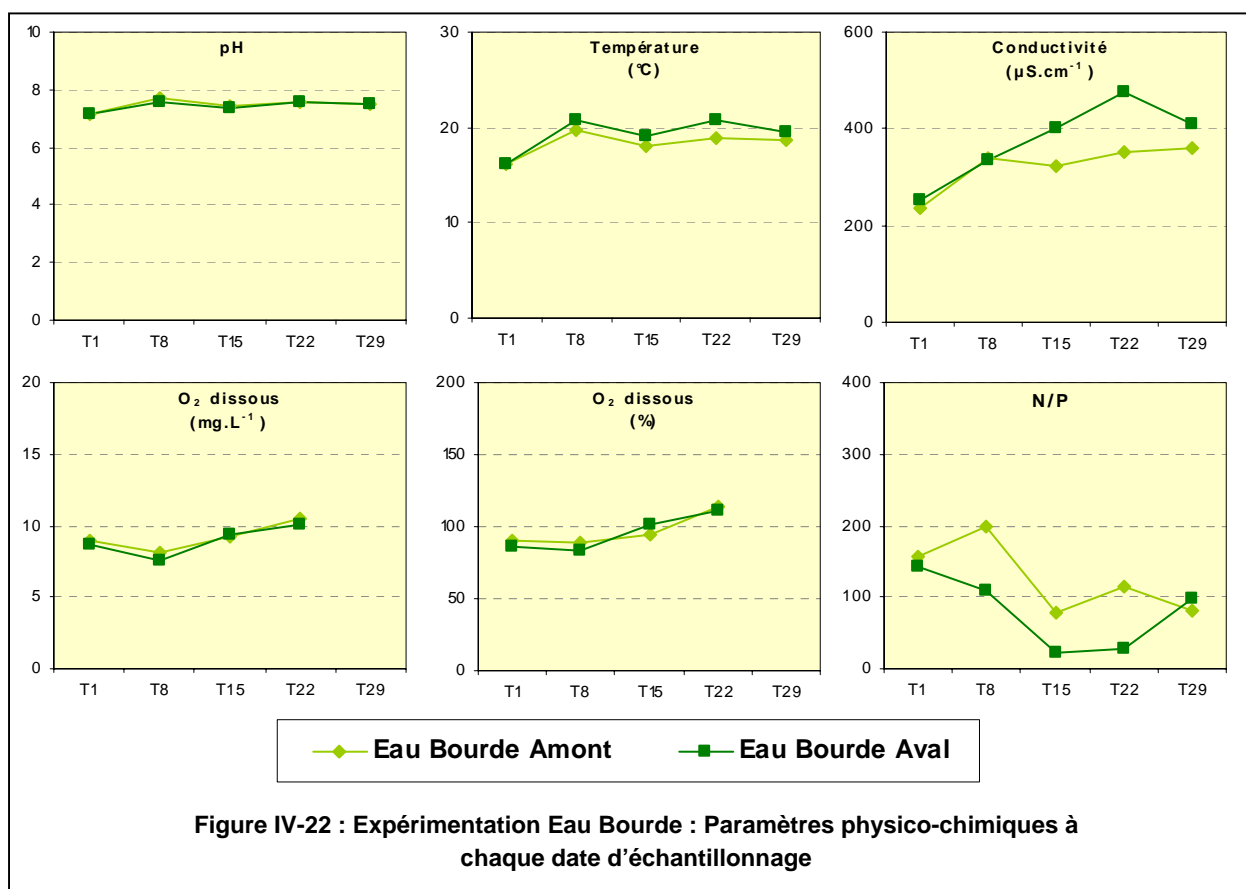
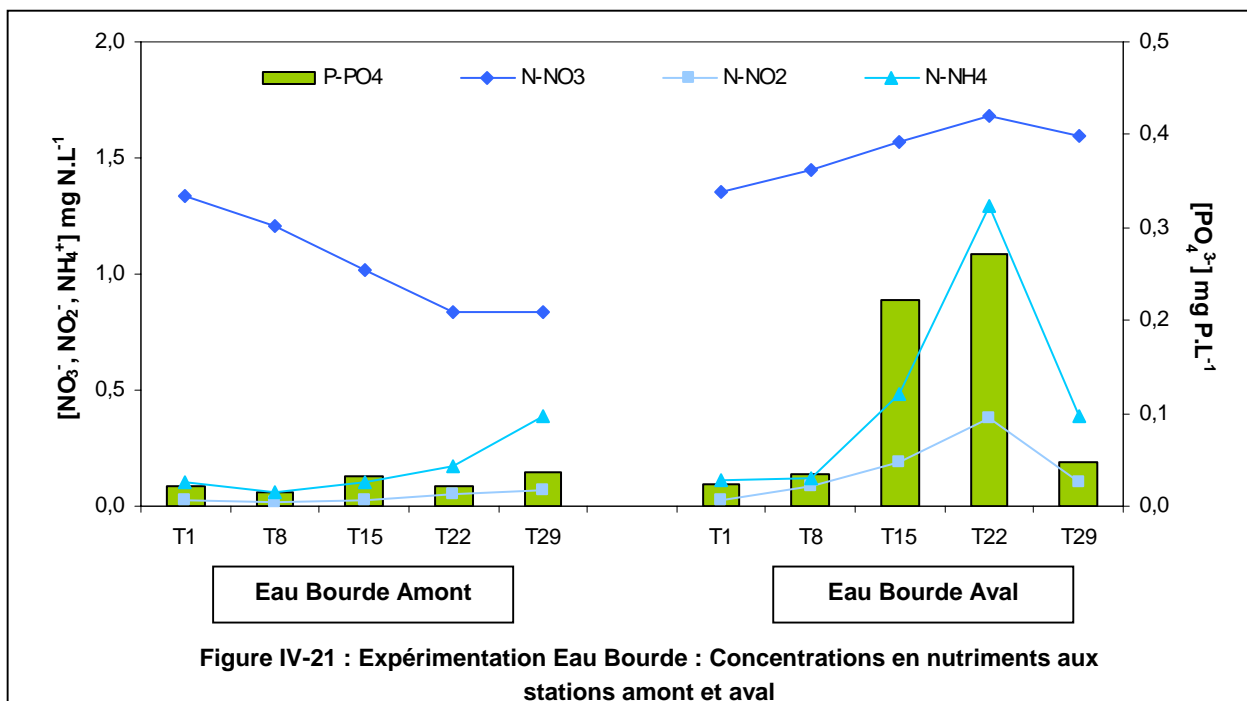
¹ le niveau de base en $[\text{PO}_4^{3-}]$ de la station aval est légèrement supérieur à celui de la station amont.

² N.B. : les prélèvements dans le cours d'eau ayant toujours été effectués dans la même tranche horaire, on suppose que les variations des teneurs en nutriments ne sont pas imputables à une variabilité de la composition et/ou quantité de rejets de la station d'épuration.

³ Donnée fournie par la Mairie de Cestas.

⁴ Donnée fournie par la Générale des Eaux (2003b).

mesuré de plus fortes valeurs qu'à la station amont de T15 à T29 et les plus forts écarts sont à T15 et T22, l'évolution de la conductivité suivant celle des nutriments.



IV. 2.2.2. Descripteurs quantitatifs de la croissance du biofilm

➤ **Matière sèche sans cendre et chlorophylle a** (Figure IV-23)

Sur le paramètre de la MSSC, on observe une évolution régulière des teneurs aux deux stations. Les valeurs de la station amont restent toutefois relativement faibles (entre 0,1 et 0,7 mg MSSC.cm⁻²). A la station aval, la biomasse augmente de manière significative tout au long de l'expérimentation (entre 0,2 et 2,4 mg MSSC.cm⁻²) et les valeurs sont nettement différentes de celles de l'amont à T22 et T29 (Tableau IV-XI).

Au niveau de la chlorophylle a, on observe également une évolution régulière et continue en fonction du temps pour les deux stations. Toutefois, les résultats sont de prime abord étonnants. En effet, les valeurs relevées sur la station aval sont plus faibles que celles de l'amont alors que ce n'était pas le cas en MSSC.

A la station aval, le support présente une forte colonisation, illustrée par des quantités élevées de matière organique, et peu d'organismes photosynthétiques, figuré par les faibles quantités de Chla (entre 0,02 et 0,09 µg Chla.cm⁻²). Les mesures de lumière, effectuées ponctuellement chaque jour de prélèvement des supports colonisés, ne permettent pas d'expliquer les faibles teneurs en Chla relevées. De ce fait, on peut supposer que les algues ont été bloquées dans leur développement, et alors poser la question de la toxicité de l'effluent du rejet de la station d'épuration. Comme nous l'avons vu précédemment, le rejet de la station peut avoir une forte influence sur la qualité de l'eau du cours d'eau car celui-ci a un faible débit ($Q_{moy} \approx 0,10 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$). De plus, notre station aval est située relativement près du rejet de la station d'épuration (environ 150 m), ce qui renforce son impact.

Cette expérimentation nous permet également de remarquer que le calcul du taux de croissance peut être gêné quand les teneurs en MSSC et Chla ne suivent pas la même tendance. Ceci amène à conclure qu'il faut suivre les deux descripteurs de la biomasse.

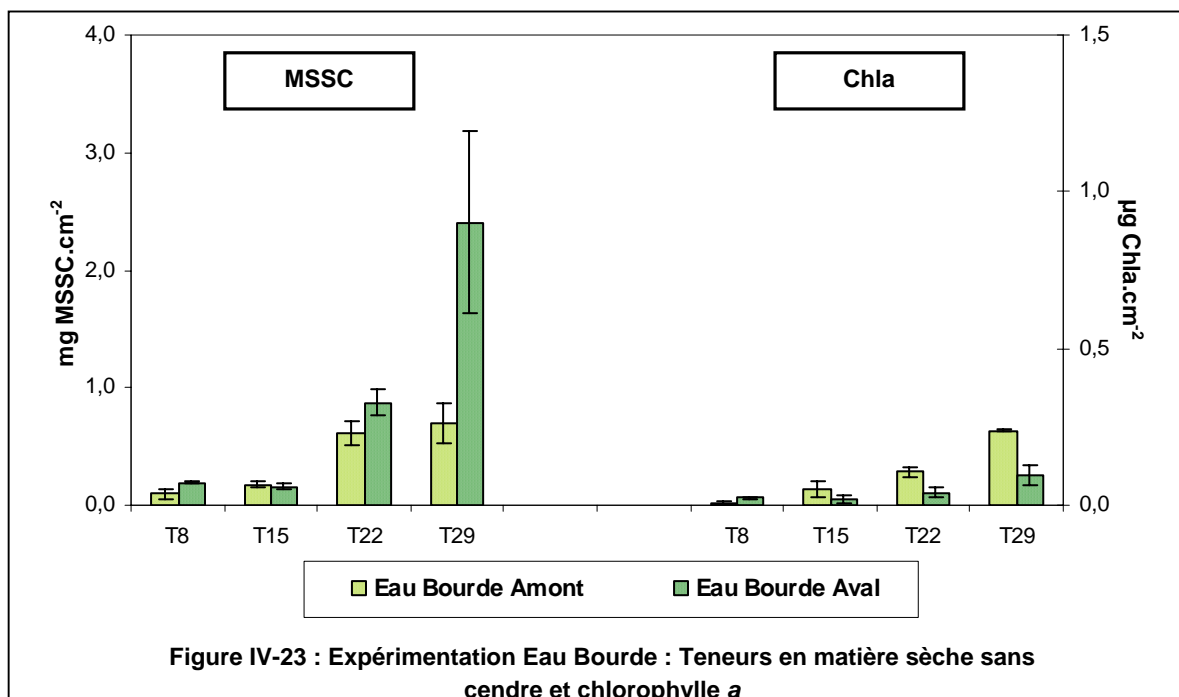


Tableau IV-XI : Expérimentation Eau Bourde : Résultats des tests de Student sur MSSC et Chla

Date d'échantillonnage	MSSC		Chla	
	p		p	
T8	0,027	*	0,016	*
T15	0,469	ns	0,128	ns
T22	0,042	*	0,007	*
T29	0,020	*	0,001	*

➤ **Proportion de bactéries viables** (Figure IV-24)

Aux deux stations, l'évolution du paramètre "Proportion de bactéries viables" est du même type : augmentation de T8 à T22 puis baisse à T29. La proportion en bactéries viables est plus importante au niveau de la station aval (valeurs significativement différentes au seuil de 5% à T22 et T29, et au seuil de 10% à T15 (Tableau IV-XII)) et les données en "Nombre total de bactéries" indiquent les mêmes tendances (données non présentées).

Ainsi, on observe qu'en aval, à proximité de la station d'épuration, c'est la composante bactérienne qui est majoritaire dans la composition du biofilm. En effet, malgré les fortes teneurs en nutriments, il n'y a pas de croissance significative d'algues, ceci est dû à la toxicité de l'effluent (hypothèse). De plus, il peut y avoir une colonisation directe par les bactéries issues du rejet de la station d'épuration.

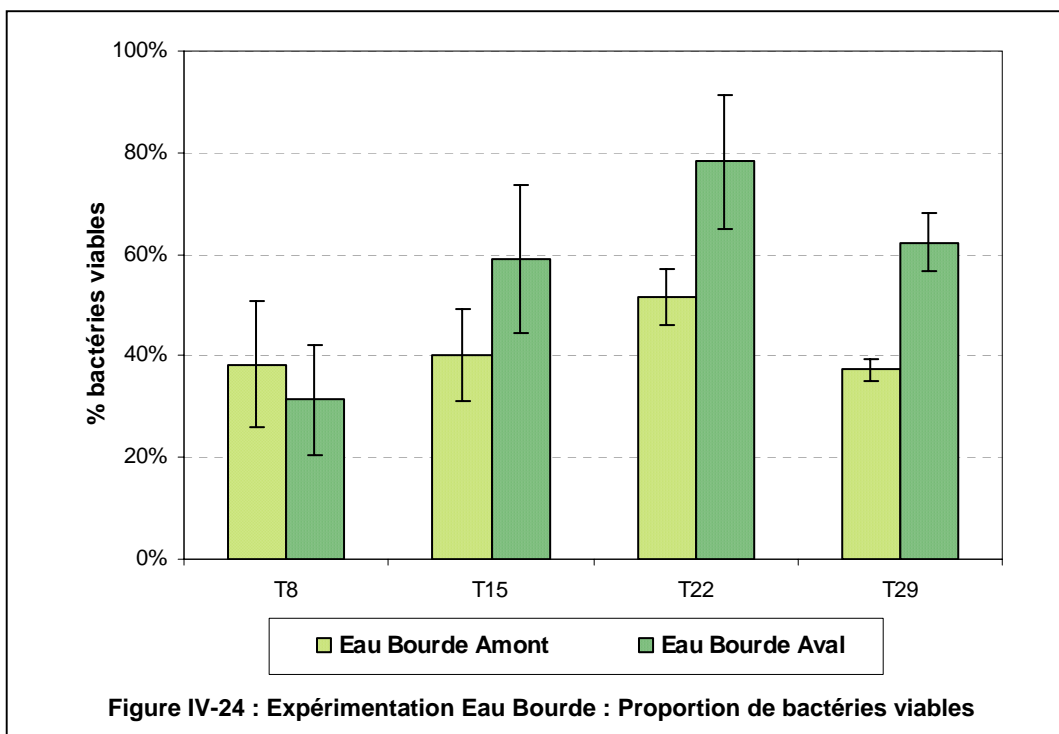


Tableau IV-XII : Expérimentation Eau Bourde : Résultats des tests du χ^2 sur Prop. bact. viables

Date d'échantillonnage	Prop. bact. viables	
	p	
T8	0,59	ns
T15	0,08	ns
T22	<0,001	*
T29	<0,001	*

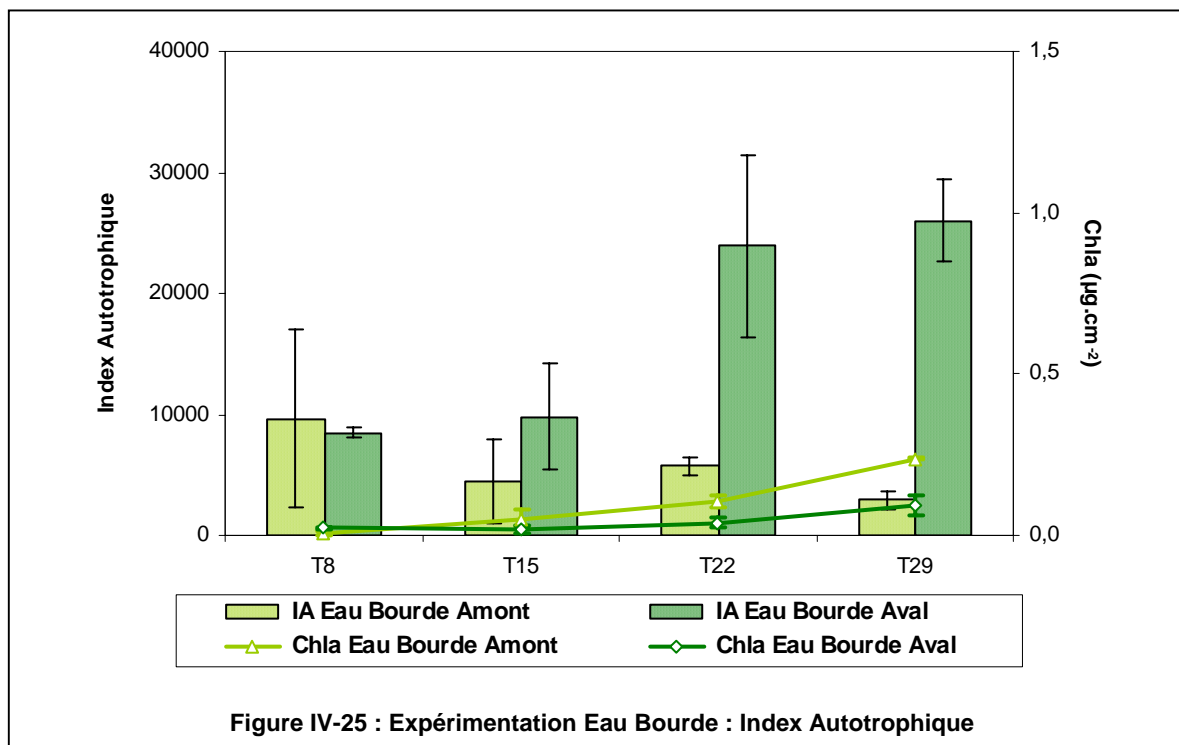
IV. 2.2.3. Descripteurs qualitatifs de la croissance du biofilm

➤ **Index Autotrophique** (Figure IV-25)

Comme les résultats précédents pouvaient le laisser penser, les relevés de l'IA sont très différents entre les stations amont et aval.

A la station aval, l'IA ne cesse d'augmenter vers des valeurs très élevées (\approx de 8500 à 25000). Ceci illustre la très forte prédominance des communautés hétérotrophes et caractérise l'effet d'un rejet de station d'épuration agissant fortement sur la qualité du cours d'eau.

Au niveau de la station amont, les valeurs de l'IA sont nettement plus basses et diminuent de 9600 à 2600 au cours de l'expérimentation. Ceci indique une évolution des communautés du biofilm vers l'autotrophie. Il faut toutefois noter que les valeurs restent élevées et supérieures au seuil de 400, fixé pour caractériser des communautés à l'équilibre entre autotrophie et hétérotrophie.

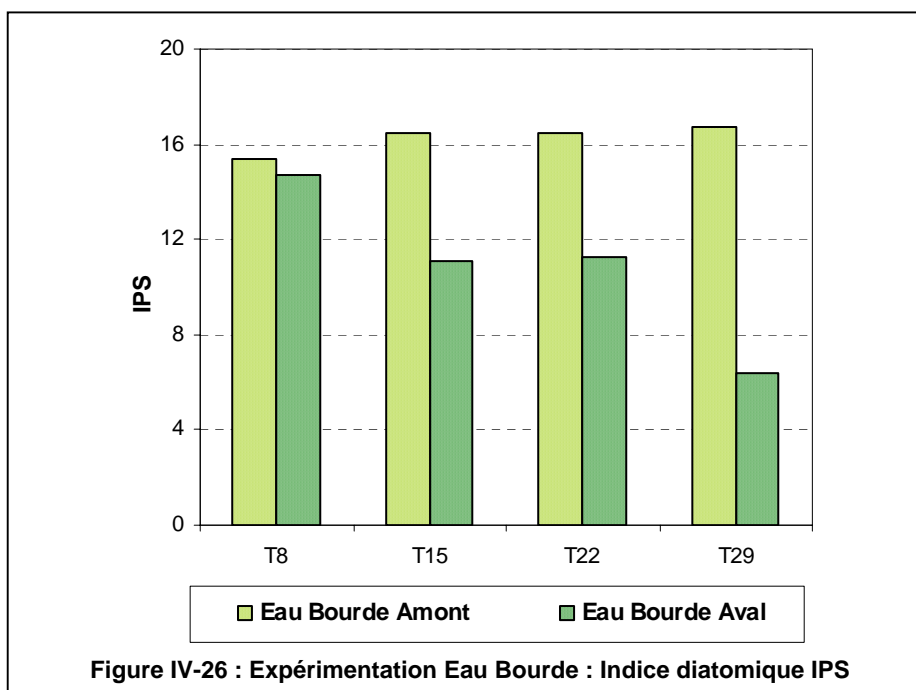


➤ Compartment Diatomées

• **Indice de Polluo-sensibilité Spécifique** (Figure IV-26)

Les résultats de l'IPS sont également très intéressants. Les valeurs relevées à l'amont indiquent une bonne qualité d'eau et varient peu (valeurs de 15 à 17/20). A la station aval, les valeurs sont plus faibles qu'à l'amont et ne cessent de diminuer, passant de 14,5 à 6,5 ce qui indique une eau très polluée et un gradient de pollution amont/aval induit par la station d'épuration.

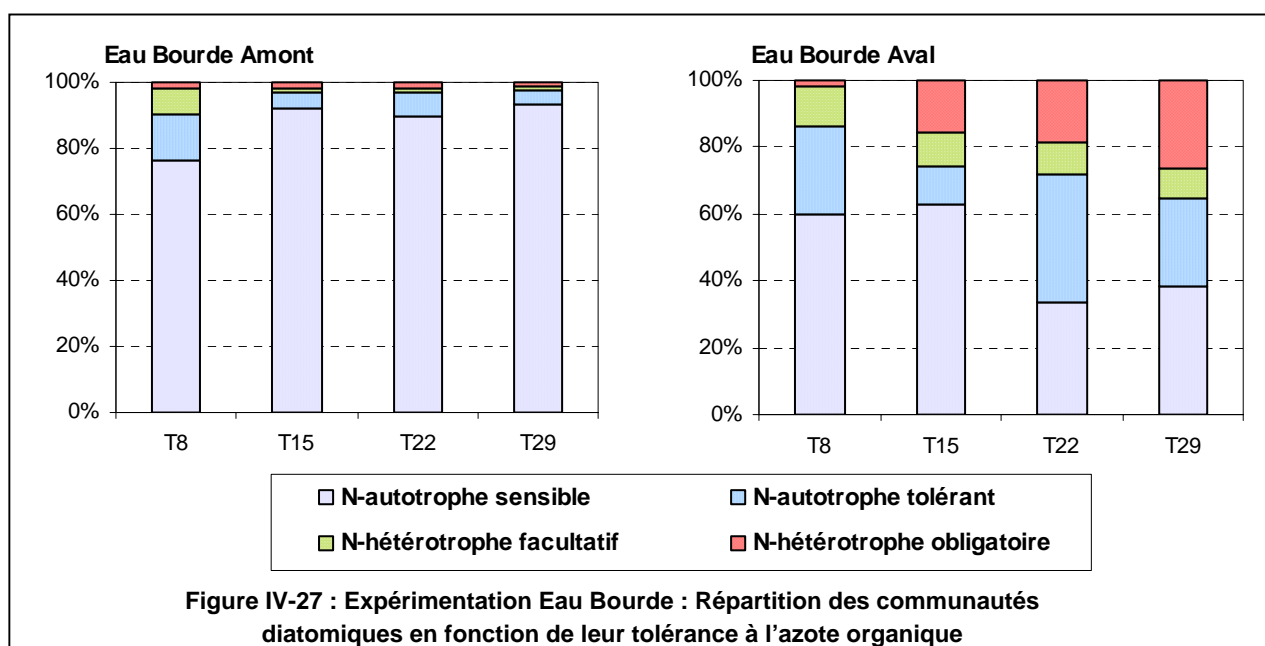
A la station amont, même si les teneurs en MSSC et Chla augmentent régulièrement, l'IPS ne varie pas. Ceci laisse à penser que dans ce cas, la communauté est stable. A la station aval, étant donné que les valeurs de l'IPS ne sont pas stables, même en fin d'expérimentation, on peut penser que la communauté n'a pas atteint son équilibre.



• **N-hétérotrophie** (Figure IV-27)

Au niveau de la station amont, la communauté paraît de nouveau assez stable même si la part de communautés de N-autotrophes sensibles varie légèrement en fonction du temps.

Au niveau de la station aval, on observe une augmentation continue de la part des communautés N-hétérotrophes obligatoires ; la composition de la communauté évolue et indique une moins bonne qualité d'eau. La proportion de communautés N-autotrophes sensibles diminue entre T8 et T22 puis réaugmente à T29, évolution due aux variations du compartiment des communautés N-autotrophes tolérantes.



IV. 2.2.4. Conclusions

En ce qui concerne l'Eau Bourde, la station amont est faiblement enrichie en nutriments, à l'opposé de la station aval, caractérisée par un fort enrichissement en PO_4^{3-} , NH_4^+ et NO_2^- .

Les éléments que nous pouvons retenir du suivi de ces stations sont :

- sur les paramètres MSSC et Chla : aux deux stations, on relève un profil régulier d'évolution des teneurs en MSSC et Chla. Les valeurs en MSSC restent faibles à l'amont et largement en deçà de celles relevées à la station aval (d'un coefficient *3 à T29). En revanche, en termes de chlorophylle *a*, on constate des teneurs inférieures en aval et on conclut à une inhibition du développement des algues par les composants de l'effluent de la station d'épuration (dont le rejet peut représenter jusqu'à 30% du débit de la rivière). De ce fait, les valeurs du coefficient μ_C n'amèneront pas à la même conclusion selon que l'on considère le descripteur MSSC ou Chla ;
- sur le paramètre "Proportion de bactéries viables" : le ratio de bactéries viables étant plus élevé à la station aval (pic jusqu'à 80%), cela corrobore la faible teneur en chlorophylle *a* du support et peut illustrer une colonisation directe par les bactéries du rejet de la station d'épuration ;
- sur l'IPS : les notes d'Indice de Polluo-sensibilité Spécifique permettent de différencier clairement les deux stations. En effet, la station amont est caractérisée par des notes élevées, entre 15 et 17, illustrant une pollution modérée. A la station aval, les notes diminuent de 14,5 à 6,5, indiquant une pollution forte ;
- sur la N-hétérotrophie : les résultats témoignent de la faible pollution de la station amont, dont les assemblages diatomiques sont composés à majorité de communautés N-autotrophes sensibles. A la station aval, la présence plus importante des communautés N-hétérotrophes et N-autotrophes tolérantes est indicatrice d'une station davantage polluée.

IV. 2.3. Expérimentation sur la Jalle d'Eysines (du 1.06 au 29.06.04)

IV. 2.3.1. Conditions expérimentales

Dans le cas de ce cours d'eau, les deux stations sont fortement distinctes en termes de qualité d'eau. La station aval est très fortement polluée, avec des valeurs en PO_4^{3-} autour de 1 mg P.L⁻¹ et surtout des concentrations en NH_4^+ autour de 7 mg N.L⁻¹ (Figure IV-28). La station amont, moins polluée, présente tout de même des teneurs relativement élevées en PO_4^{3-} ($\approx 0,07$ mg P.L⁻¹).

Le tableau IV-XIII, qui se réfère au SEQ-Eau (station RNB située en amont de nos deux stations d'étude), attribue au cours d'eau une bonne qualité sur les altérations "Matières phosphorées" et "Nitrates". En revanche, sur les matières azotées (NO_2^- , NH_4^+ et N_k), la qualité est moyenne et l'Agence de l'Eau précise

que les paramètres déclassants sont NO_2^- et NH_4^+ . Enfin, les données sur l'altération "Micro-polluants Minéraux sur Eau Brute" indique une eau de qualité moyenne.

En ce qui concerne les paramètres physico-chimiques (Figure IV-29), il n'y a que la conductivité qui marque la différence de qualité entre les deux stations avec des valeurs 1,5 fois plus élevées à l'aval.

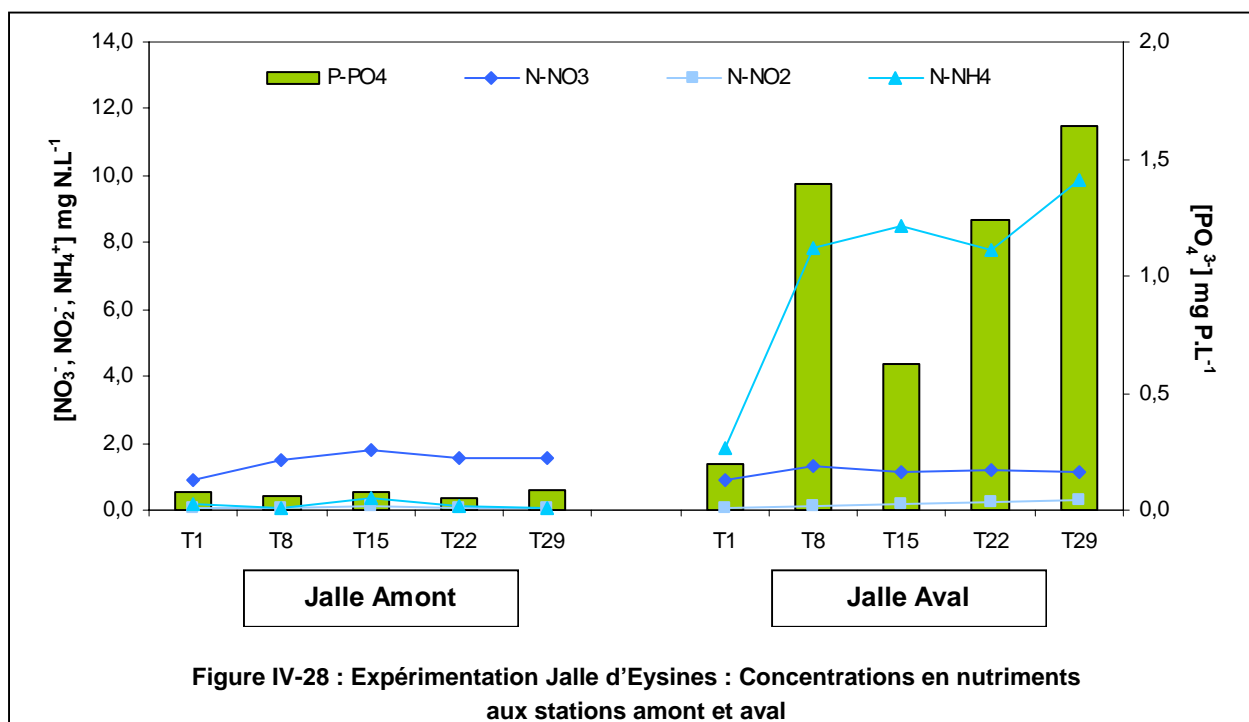
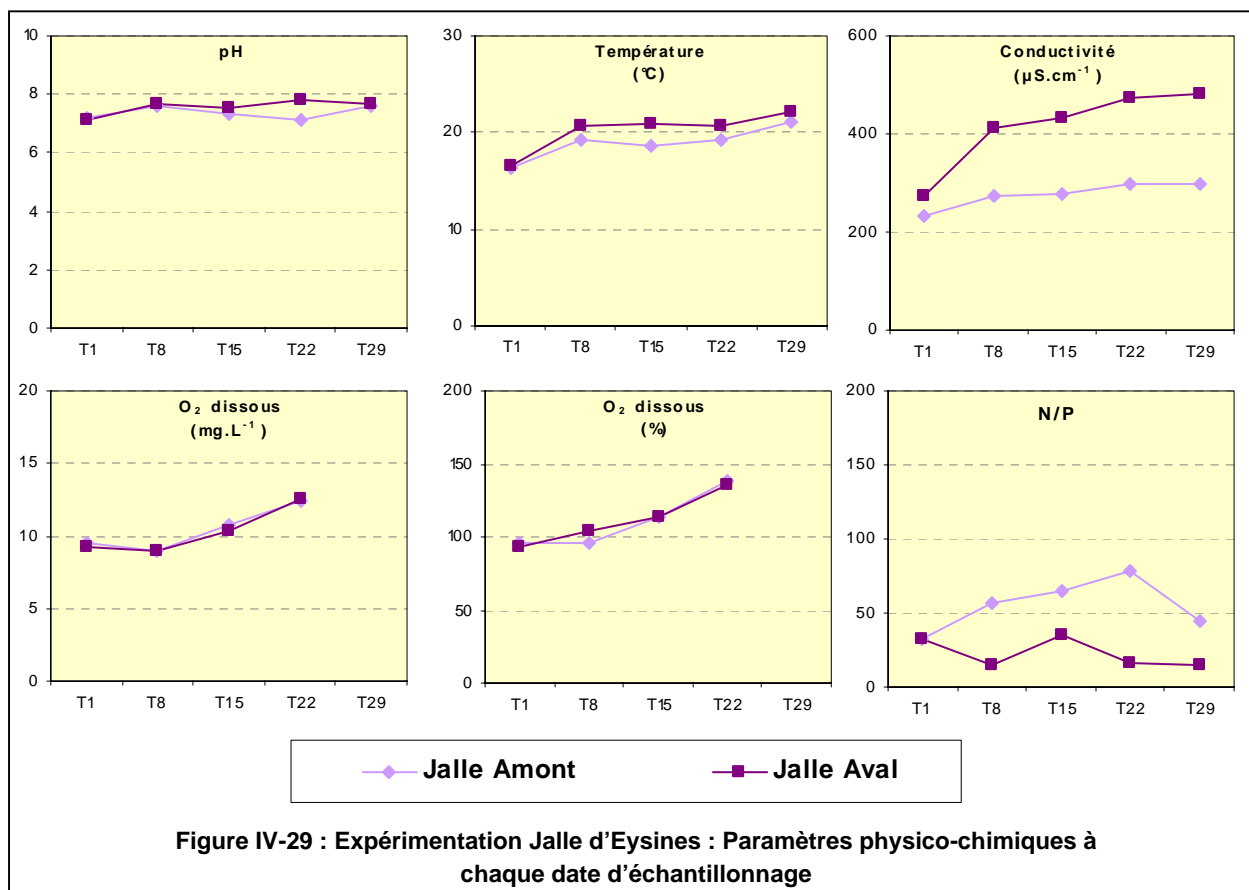


Tableau IV-XIII : Expérimentation Jalle d'Eysines : Classification du cours d'eau selon la grille du SEQ-Eau

	PHOS	AZOT	NITR	MPMI
Station RNB Jalle				



IV. 2.3.2. Descripteurs quantitatifs de la croissance du biofilm

➤ Matière sèche sans cendre et chlorophylle a (Figure IV-30)

Quel que soit le descripteur considéré, quantitatif ou qualitatif, il n'y a pas de donnée à la dernière date (T29) pour la station aval car le support a été balayé par des macro-algues développées aux abords du support.

Les relevés de biomasse en MSSC indiquent des teneurs plus élevées à la station amont mais les valeurs ne sont toutefois significativement différentes qu'à T22 (Tableau IV-XIV). S'agissant de l'évolution du paramètre, on observe à la station amont une croissance régulière. A la station aval, on note un léger maximum de biomasse à T15.

En termes de Chla, les valeurs plus fortes à l'amont sont conservées et les moyennes des stations sont significativement différentes à chaque date. En revanche, l'évolution de la chlorophylle a à l'amont est moins régulière que celle de la MSSC.

Pour la station aval, le profil d'évolution en Chla est le même que celui de la MSSC. C'est cette similitude des profils qui amène à penser qu'on a atteint le pic de biomasse à T15 (mais il est possible que la diminution observée à T22 soit due au début d'une érosion par les macro-algues identifiées en fin d'expérimentation). Toutefois, il aurait fallu les données à T29 pour vérifier cette hypothèse.

Malgré la similitude des teneurs en nitrates et des concentrations en phosphates largement plus élevées à l'aval, le biofilm est moins développé qu'à l'amont et, surtout, présente des quantités de chlorophylle a bien inférieures. On peut donc supposer la présence d'éléments inhibiteurs du développement algal au niveau de la station aval, station soumise au drainage des parcelles de cultures maraîchères ainsi qu'au rejet d'une station d'épuration (Station de Cantinolles, 65000 EH). En effet, sur les données du SEQ-Eau issue de la station RNB située à St-Médard-en-Jalles, on a pu voir que la Jalle est classée en qualité médiocre sur l'altération "Micro-polluants minéraux sur Eau Brute" en 2003 et en qualité moyenne en 2004.

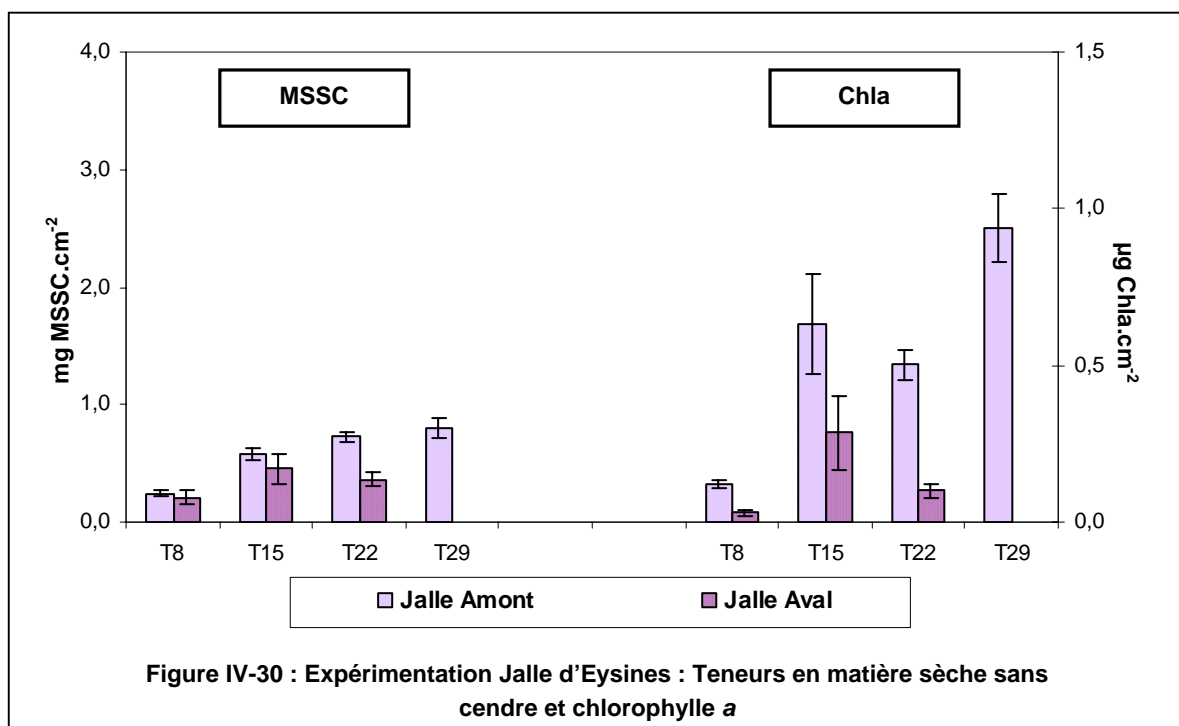


Tableau IV-XIV : Expérimentation Jalle d'Eysines : Résultats des tests de Student sur MSSC et Chla

Date d'échantillonnage	MSSC		Chla	
	p		p	
T8	0,379	ns	0,004	*
T15	0,195	ns	0,039	*
T22	<0,001	*	<0,001	*

➤ **Proportion de bactéries viables** (Figure IV-31)

Au niveau du paramètre "Proportion de bactéries viables", les stations amont et aval présentent, sur l'intervalle T8-T22, la même évolution. En outre, on ne constate pas de différence sensible entre les taux des deux stations (Moy_{Amont}=41%, Moy_{Aval}=33%).

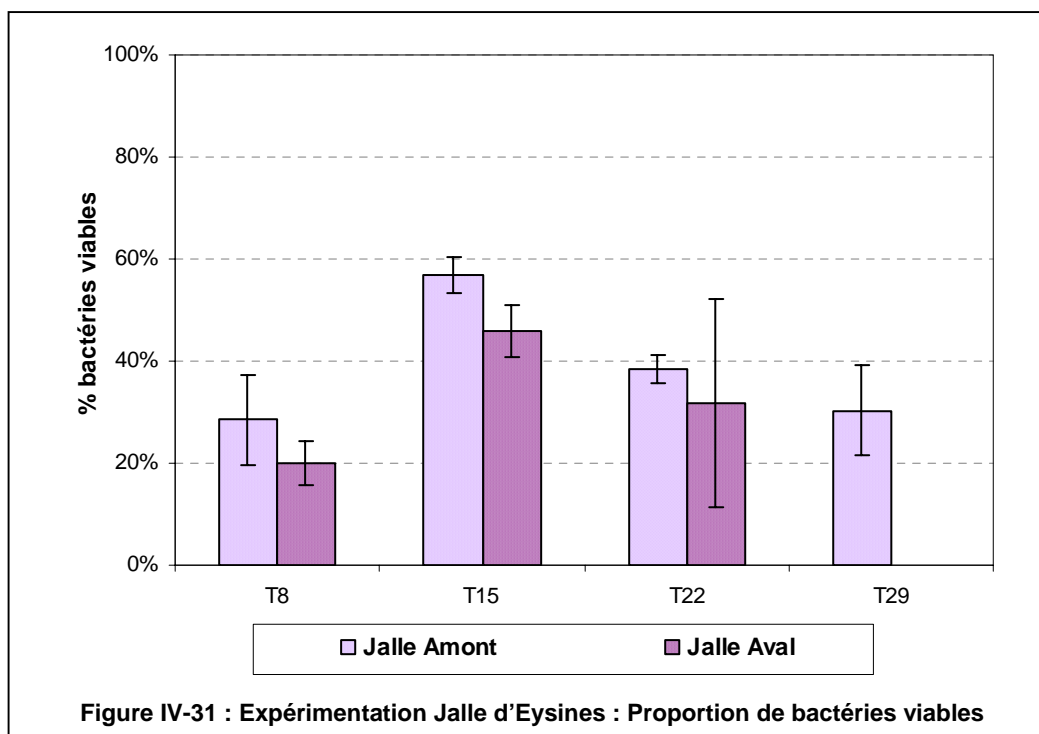


Tableau IV-XV : Expérimentation Jalle d'Eysines : Résultats des tests du χ^2 sur Prop. bact. viables

Date d'échantillonnage	Prop. bact. viables	
	p	
T8	0,20	ns
T15	0,04	*
T22	0,23	ns

IV. 2.3.3. Descripteurs qualitatifs de la croissance du biofilm

L'ensemble des résultats relatifs aux descripteurs qualitatifs est présenté à la figure IV-32.

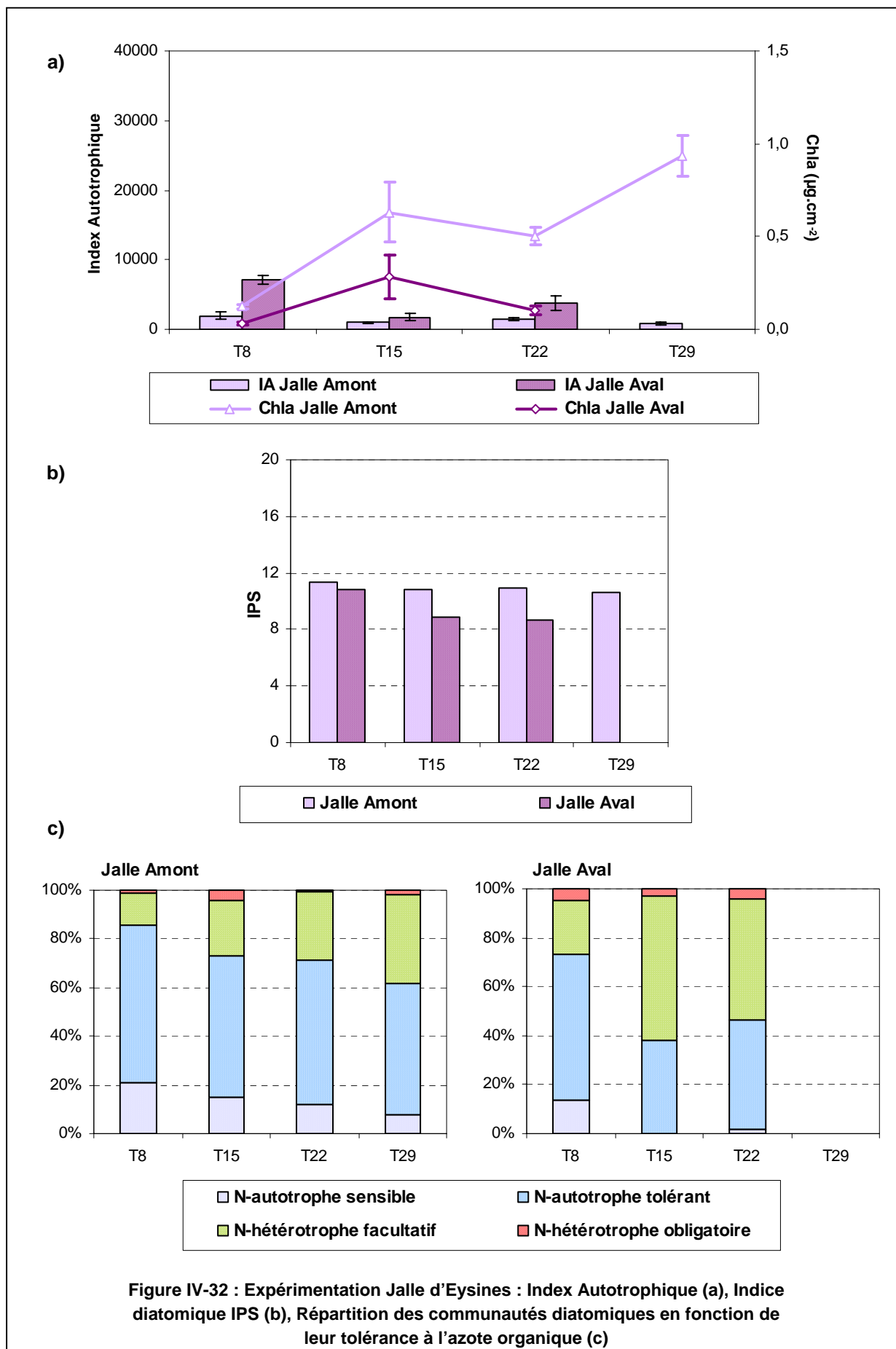
Les données de l'Index Autotrophique indiquent que la station aval est toujours caractérisée par des valeurs plus élevées (IA_{Amont} entre 900 et 2000, IA_{Aval} entre 1700 et 7000). Toutefois, on peut rappeler que

le seuil fixé pour la majorité hétérotrophe étant à 400, les biofilms des deux stations sont marqués par une large prédominance du volet hétérotrophe.

Les oscillations de valeurs à la station amont sont considérablement plus faibles que celles de l'aval. En outre, à cette station, les résultats de l'IA peuvent paraître en contradiction avec ceux du paramètre "Proportion de bactéries viables". En effet, le pic de valeurs observé à T15 aurait laissé penser que les valeurs de l'IA seraient plus fortes également à T15, ce qui n'est pas vérifié. De plus, lorsque l'on se reporte aux dénombrements bruts de bactéries totales, c'est également la valeur à cette date qui est la plus importante. Ceci nous permet de voir que ce n'est pas le paramètre de proportion de bactéries viables qui nous permettra de conclure sur une majorité hétérotrophe du biofilm car les valeurs sont en accord seulement dans le cas de très petites teneurs en Chla (exemple de l'Eau Bourde).

Au niveau du compartiment des Diatomées, les notes d'IPS sont comprises, pour les deux stations, dans la tranche 8-12, qui correspond à une pollution moyenne. Lorsque l'on compare les données entre stations, on observe que les valeurs diminuent pour chacune d'elles mais de manière un peu plus accentuée pour l'aval. Toutefois, les résultats de l'IPS ne rendent pas compte d'une pollution particulièrement élevée à l'aval, alors que c'est ce que l'on avait pu établir lors de la description des conditions expérimentales.

Le graphique de répartition des espèces diatomiques en fonction de leur tolérance à l'azote organique témoigne du même résultat. La station aval apparaît comme un peu plus polluée que l'amont car la part des communautés N-hétérotrophes facultatives y est, de manière significative, plus élevée et on note également une présence plus durable de communautés N-hétérotrophes obligatoires.



IV. 2.3.4. Conclusions

Sur la Jalle, les stations amont et aval sélectionnées sont fortement distinctes quant à la composition chimique de l'eau, et ce en particulier sur les éléments PO_4^{3-} et NH_4^+ . Les éléments retenus à travers l'expérimentation sur ce cours d'eau peuvent être résumés ainsi :

- sur les paramètres MSSC et Chla : quel que soit le descripteur considéré, les teneurs relevées à l'amont sont invariablement supérieures à celles de l'aval. Toutefois, il faut noter qu'en termes de MSSC, la différence entre les stations n'est significative qu'à la dernière date. Là encore l'existence d'un rejet d'eaux usées et de son éventuelle toxicité limite le développement du biofilm à l'aval ;
- sur le paramètre "Proportion de bactéries viables" : on note peu de différence entre les stations amont et aval, ce qui n'apporte pas d'indication quant au niveau trophique des deux stations ;
- sur l'IPS : les notes d'IPS discriminent davantage les deux stations, toutefois elles demeurent classées dans la même catégorie (pollution moyenne) malgré la forte différence d'enrichissement des eaux ;
- sur la N-hétérotrophie : de même, les résultats obtenus sur ce paramètre indiquent une pollution légèrement plus forte en aval, illustrée par la part plus élevée de communautés N-hétérotrophes facultatives. Cependant les résultats ne reflètent pas les forts écarts constatés sur la composition de l'eau des deux stations.

IV. 3 • DISCUSSION

L'objectif poursuivi à travers la conduite des expérimentations *in situ* était de vérifier l'applicabilité des indicateurs que nous avons retenus comme pertinents, vis-à-vis du niveau trophique, en conditions expérimentales de laboratoire.

Rappelons que le principe général des expérimentations *in situ* a été de placer en cours d'eau des supports artificiels de colonisation du biofilm, en amont et en aval d'un point de décharge d'eaux résiduaires.

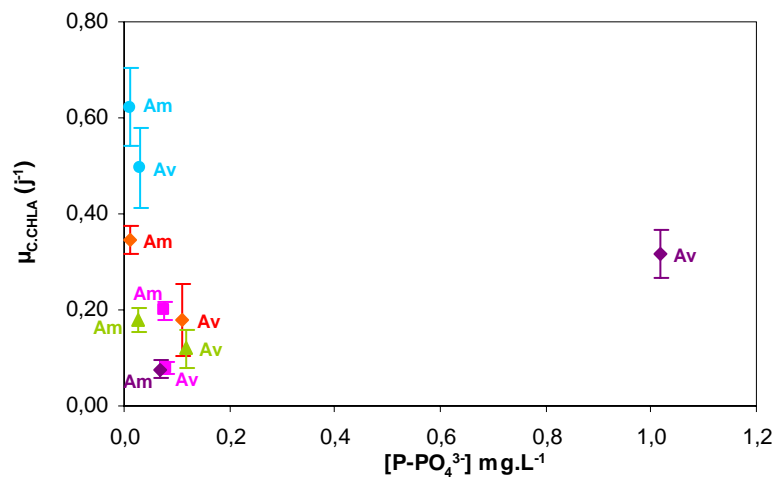
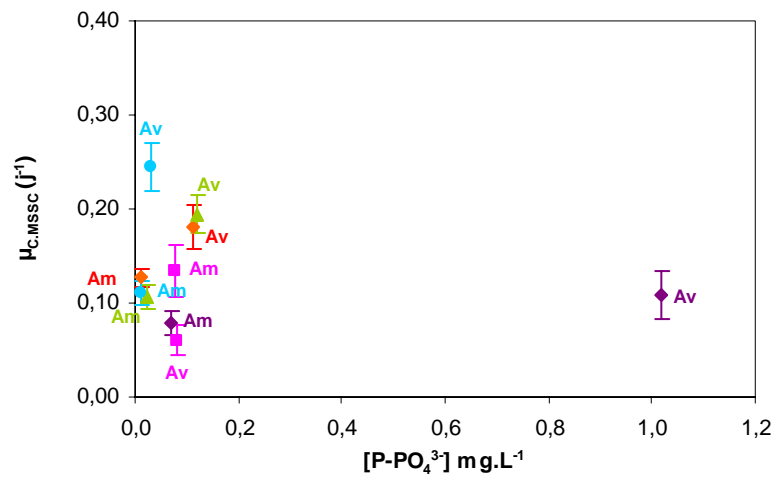
IV. 3.1. Relations "Vitesse de croissance des biofilms - Charge en nutriments"

Le but étant de parvenir à établir une relation opérationnelle entre les taux de croissance et les teneurs en P du milieu, quelle que soit la rivière considérée, nous avons tout d'abord voulu réunir l'ensemble des données obtenues *in situ* (Figure IV-33).

Que ce soit sur les paramètres de la MSSC ou de la chlorophylle *a*, on observe qu'aucun lien ne peut être fait entre les variables du taux de croissance et de la teneur en PO_4^{3-1} du milieu, dans la gamme de concentration étudiée.

Ceci nous amène à conclure que la teneur en PO_4^{3-} ne permet pas d'expliquer les variations du taux de croissance. Celui-ci est certainement trop dépendant du site d'étude (morphologie de la rivière, vitesse du courant,...). De ce fait, nous avons ensuite considéré les résultats séparément par expérimentation afin de pouvoir tirer des éléments de réponse quant à la variation du taux de croissance entre les stations amont et aval d'un même cours d'eau.

¹ Le phosphore est, de façon majoritaire, l'élément limitant en eaux douces. De ce fait, contrairement à certains cas du travail en laboratoire, on travaille directement sur les concentrations brutes (pas de prise en compte de la valeur du rapport N/P).



◆ Garonne Site Toulouse ■ Garonne Site St Pierre de Gaubert ▲ Eau Bourde ● Nasseys ◆ Jalle

Am : Station amont du cours d'eau correspondant

Av : Station aval du cours d'eau correspondant

Figure IV-33 : Expérimentations *in situ* : mise en relation des paramètres $\mu_{C.MSSC}/\mu_{C.Chla}$ et $[PO_4^{3-}]$

Expérimentation en Garonne, Site de Toulouse (Tableau IV-XVI) : les données des taux de croissance sur les paramètres MSSC et Chla ne varient pas dans le même sens d'une station à l'autre. Compte tenu des données obtenues sur les paramètres quantitatifs décrits précédemment, on observe que le taux de croissance ne rend pas systématiquement compte de l'évolution des descripteurs. En effet, si pour la MSSC, le pic élevé de biomasse arrivant après seulement 6 jours à la station aval se reflète par la valeur de $\mu_{C.MSSC}$, pour la chlorophylle *a*, le principe du calcul de μ_C n'est *a priori* pas adapté aux valeurs. On observe que lorsque les teneurs initiales en biomasse sont très faibles, le calcul de μ_C donne rapidement de fortes valeurs qu'il n'est pas possible de relier aux teneurs en nutriments.

Tableau IV-XVI : Expérimentation en Garonne, Site Toulouse : Valeurs du taux de croissance sur les paramètres MSSC et Chla (j^{-1})

	$\mu_{C.MSSC}$	$\mu_{C.Chla}$
Station Amont T	0,127 (\pm 0,009)	0,209 (\pm 0,029)
Station Aval T	0,181 (\pm 0,023)	0,179 (\pm 0,073)

Expérimentation en Garonne, Site de St Pierre de Gaubert (Tableau IV-XVII) : en ce qui concerne les teneurs en nutriments du milieu, on observait peu de différence entre les stations amont et aval. Toutefois, les taux de croissance en MSSC et Chla sont nettement plus faibles à la station aval.

On avait vu dans la description des résultats, que les quantités plus faibles de biomasse obtenues à la station aval pouvaient être dues à un ombrage exercé par des macrophytes s'accrochant au ponton de fixation du support. Cependant, on ne peut, à ce stade, être certain de la source de la variation des taux de croissance et écarter l'influence d'un facteur de qualité d'eau non dosé au cours de nos expérimentations.

Tableau IV-XVII : Expérimentation en Garonne, Site St Pierre de Gaubert : Valeurs du taux de croissance sur les paramètres MSSC et Chla (j^{-1})

	$\mu_{C.MSSC}$	$\mu_{C.Chla}$
Station Amont P	0,154 (\pm 0,028)	0,204 (\pm 0,020)
Station Aval P	0,060 (\pm 0,016)	0,081 (\pm 0,012)

Expérimentation en petites rivières, Sites du Nasseys, de l'Eau Bourde et de la Jalle d'Eysines (Tableau IV-XVIII) : Etant donné le manque de certitude quant aux sources de variations des valeurs des taux de croissance obtenues *in situ* en Garonne, nous regroupons les résultats pour les trois cours d'eau suivis en Aquitaine.

Comme nous l'avons vu pour la Garonne, les variations de $\mu_{C.MSSC}$ et $\mu_{C.Chla}$ sont davantage influencées par le mode de calcul du coefficient que par les teneurs en nutriments dosées dans le milieu. Ainsi, pour le Nasseys, même si les valeurs de $\mu_{C.MSSC}$ sont reliables à la qualité de l'eau, on se rend compte que celles de $\mu_{C.Chla}$ sont entachées d'erreur du fait des très faibles teneurs en chlorophylle *a* relevées à la première date d'échantillonnage (T8).

De même, les valeurs de taux de croissance acquises sur la Jalle n'illustrent pas les observations faites lors de l'étude des descripteurs quantitatifs et qualitatifs, à savoir un plus faible développement de biofilm à la station aval relié à une eau de moins bonne qualité.

En revanche, pour l'Eau Bourde, les données de $\mu_{C.MSSC}$ et $\mu_{C.Chla}$ peuvent sembler cohérentes. En effet, on avait observé de fortes quantités en MSSC associées à des quantités faibles en chlorophylle *a* à la station aval, explicables par la proximité du rejet de la station d'épuration. En outre, les descripteurs qualitatifs du biofilm avaient confirmé l'existence d'un gradient de pollution de la station amont à la station aval qui peut être également illustré par les valeurs de $\mu_{C.MSSC}$ et $\mu_{C.Chla}$ obtenues.

Tableau IV-XVIII : Expérimentation sur les trois cours d'eau d'aquitaine (Nasseys, Eau Bourde, Jalle d'Eysines) : Valeurs du taux de croissance sur les paramètres MSSC et Chla (j^{-1})

	$\mu_{C.MSSC}$	$\mu_{C.Chla}$
Nasseys Amont	0,110 (\pm 0,013)	0,625 (\pm 0,082)
Nasseys Aval	0,245 (\pm 0,026)	0,497 (\pm 0,082)
	$\mu_{C.MSSC}$	$\mu_{C.Chla}$
Eau Bourde Amont	0,106 (\pm 0,013)	0,180 (\pm 0,025)
Eau Bourde Aval	0,194 (\pm 0,020)	0,119 (\pm 0,039)
	$\mu_{C.MSSC}$	$\mu_{C.Chla}$
Jalle Amont	0,078 (\pm 0,013)	0,077 (\pm 0,017)
Jalle Aval	0,109 (\pm 0,025)	0,318 (\pm 0,050)

IV. 3.2. Bilan de la réponse des descripteurs qualitatifs

De manière identique au travail en laboratoire, nous avons cherché à analyser, de manière transversale, les informations portées par les descripteurs qualitatifs quant à la détermination du statut trophique des milieux.

Nous détaillerons les descripteurs suivants :

- Proportion de bactéries viables ;
- Index Autotrophique ;
- Indice de Polluo-sensibilité Spécifique (IPS) ;
- Caractéristiques de N-hétérotrophie pour le compartiment des Diatomées.

➤ **Proportion de bactéries viables**

La proportion de bactéries viables ne présente pas d'évolution, ni en fonction du temps, ni en fonction de l'enrichissement en nutriments de l'eau des sites étudiés. Suite aux conclusions des expérimentations en laboratoire, il n'apparaît pas nécessaire de détailler à nouveau cet aspect pour les expérimentations *in situ*. En effet, lorsqu'il existe des variations de ce paramètre à une station, celles-ci ne sont pas continues au cours du temps et ne peuvent pas être mises en relation avec la charge en nutriments du milieu.

Notons toutefois pour le cas de l'Eau Bourde que les fortes proportions de bactéries viables obtenues (une moyenne de 50% à l'amont et des taux de 40 à 80% à l'aval) peuvent être reliées à la proximité de la station aval avec la station d'épuration.

Les observations faites sur les autres descripteurs qualitatifs sont rassemblées dans le tableau IV-XIX.

Tableau IV-XIX : Bilan des descripteurs qualitatifs du biofilm dans le cadre des expérimentations *in situ*

Descripteur	Pertinence	Observations sur le terrain
Index Autotrophique	(+/-)	L'IA permet de bien différencier les différentes stations entre elles. Toutefois, une limite apparaît : il est possible de confondre deux situations à valeurs fortes d'IA : station peu enrichie en nutriments induisant un faible développement algal et station fortement enrichie mais dont l'eau contient également des inhibiteurs de la croissance algale (cas d'une station fortement influencée par un rejet de station d'épuration comme dans le cas de l'Eau Bourde).
Grands groupes d'algues	(-)	Nous n'avons les données que pour une seule expérimentation (en Garonne, site de Toulouse), dans laquelle nous avons observé que ce sont les deux groupes, Diatomées et Chlorophycées, qui augmentent conjointement avec la charge en nutriments. De ce fait, qualitativement, ce paramètre ne permet pas de différencier les stations. Des données complémentaires seraient nécessaires pour statuer sur l'apport que peut représenter ce paramètre.
Diatomées : Indice de Polluo-sensibilité Spécifique	(+/-)	L'IPS permet de bien différencier les stations sur un même cours d'eau. Toutefois, l'évolution constante de ce paramètre en fonction du temps amène à comparer les notes d'indice après un temps suffisant de colonisation (estimé à environ 15-20 jours). De plus, la dépendance des notes de l'IPS avec des facteurs abiotiques (géologie du cours d'eau, notion d'écorégion) rend difficile la comparaison des notes de manière transversale entre les expérimentations.
Diatomées : N-hétérotrophie	(+)	Les caractéristiques de N-hétérotrophie permettent de différencier clairement les stations entre elles et ce, assez tôt dans le développement des biofilms. L'étude de ce descripteur a permis, en outre, de déceler des différences non perceptibles lors de l'analyse d'autres paramètres qualitatifs ou quantitatifs des biofilms.

Les expérimentations menées *in situ* nous permettent de voir qu'il n'est pas nécessaire de mener les analyses conjointes d'Indice de Polluo-sensibilité Spécifique et de N-hétérotrophie, qui concernent toutes deux le compartiment des Diatomées. En effet, le volet de la N-hétérotrophie s'est révélée davantage porteur d'informations quant au statut trophique, avec notamment une différenciation plus fine des résultats.

De plus, le dosage de l'azote Kjeldhal, qui illustre en partie l'azote organique, n'est pas pratiqué en routine dans les services du suivi de la qualité de l'eau. On voit ainsi l'utilité du paramètre de N-hétérotrophie pour déceler des pollutions non visibles à travers les résultats de chimie classique.

IV. 3.3. Conclusions

L'un des éléments principaux de conclusion de cette partie est la difficulté d'exploiter nos données acquises *in situ*. En effet, sur le terrain, de nombreux facteurs conditionnent le développement des biofilms et notre mode échantillonnage n'est pas adapté aux variabilités inhérentes au milieu naturel.

Ce constat nous amène à formuler un certain nombre de remarques d'ordre méthodologique.

- Il aurait fallu suivre la croissance du biofilm sur de petits intervalles de temps, notamment en début de colonisation, afin d'éviter la trop forte influence de faibles valeurs de biomasse sur le calcul du taux de croissance et également d'éviter de prendre en compte des points de biomasse situés dans la phase de latence.
- En ce qui concerne les teneurs en nutriments, l'utilisation de concentrations moyennes, acquises sur des données ponctuelles (1 à 2 fois par semaine), est source de mauvaise interprétation des résultats de développement de biofilm et ce, en raison de fortes fluctuations parfois existantes sur le terrain (ruissellement, dilution, variation de la composition des rejets des stations d'épuration,...). De plus, le caractère ponctuel de nos mesures de chimie est opposé aux capacités intégratrices du compartiment du biofilm. Ainsi, comme on se situe dans la phase de test de l'outil de caractérisation du niveau trophique, il aurait été utile de travailler sur un suivi plus régulier de la qualité des eaux.
- Par ailleurs, concernant l'acquisition de biomasse de biofilm *in situ*, le travail effectué dans le cadre de la thèse montre qu'il est indispensable de protéger les supports de colonisation. En effet, des pertes de biomasse peuvent être causées par du lessivage dû à des objets flottants, des algues filamenteuses développées à proximité des supports ou par des variations importantes et soudaines de la hauteur d'eau. Les canaux déportés n'étant pas adaptés à un cours d'eau comme la Garonne (trop fort marnage, débit trop irrégulier), on peut proposer un système flottant (afin de palier les variations de niveaux d'eau), composé de déflecteurs, empêchant les débris d'atteindre le support de colonisation. Cependant, il faut prêter attention à ne pas modifier de manière trop sensible la vitesse du courant et également à maintenir un éclaircissement suffisant (par exemple avec l'utilisation d'un matériau transparent) .
- En outre, l'évaluation de l'action des brouteurs est certainement à prendre en compte. En effet, *in situ*, il s'agit d'un élément qui peut influencer sur l'épaisseur et la quantité de biomasse du biofilm. La présence/absence d'organismes brouteurs peut varier selon les stations d'étude et est à considérer afin de caractériser au plus juste la croissance réelle des biofilms.

De plus, il apparaît peu réaliste de penser que l'on peut sélectionner seulement deux stations d'étude d'une rivière en vue de comparer les résultats du développement des biofilms. Il aurait été nécessaire de multiplier les stations d'échantillonnage sur un même cours d'eau le long d'un gradient de pollution.

Enfin, on peut avancer que le paramètre du taux de croissance doit permettre de discriminer des stations à niveau trophique différent. Cependant, la très forte dépendance du développement des biofilms envers les spécificités du site d'étude conduit à penser que la mise en œuvre de cette variable dans une optique opérationnelle reste difficile. En effet, les sites d'étude pour lesquels les gestionnaires cherchent à évaluer la qualité de l'eau, ne sont pas nécessairement comparables en termes de morphologie du lit et donc de conditions d'écoulement.

Une alternative serait alors de travailler en laboratoire sur des prélèvements d'eau effectués *in situ* afin d'évaluer en conditions maîtrisées leur potentiel trophique.

* *

* * *

CHAPITRE V : CONCLUSIONS GENERALES - PERSPECTIVES

CHAPITRE V : CONCLUSIONS GENERALES - PERSPECTIVES

S'agissant des démarches de recherche d'un outil d'évaluation de la qualité de l'eau, la difficulté est de passer des observations effectuées lors des expérimentations, *in situ* et au laboratoire, à une méthode généralisable et à des éléments communs de réponse, applicables à des situations diversifiées (Verneaux J., 1984).

Au travers de la bibliographie sur le volet de l'eutrophisation des milieux aquatiques, nous avons vu que les études réalisées en rivières sont beaucoup moins nombreuses que celles réalisées en lacs (Van Nieuwenhuysse E.E. & Jones J.R., 1996 ; Riskin M.L. *et al.*, 2003). Ces derniers bénéficient de modèles robustes quant à la prévision de la quantité de biomasse algale produite en fonction de la charge en nutriments (N et P) de la colonne d'eau. Cependant, les problèmes d'eutrophisation en eaux courantes sont bien réels (Matlock M.D. *et al.*, 1999 ; Dodds W.K., 2006) et nécessitent l'établissement d'un référentiel reposant sur les teneurs en nutriments du milieu et permettant de prévenir les dommages causés par des développements algaux trop importants.

Notre travail s'ancre donc dans une problématique générale issue de l'absence de ce référentiel (Dodds W.K. & Welch E.B., 2000).

V. 1 • APPLICABILITE DES OUTILS DECRITS DANS NOTRE ETUDE

V. 1.1. Rappel du contexte de travail et des objectifs

Le but que nous avons poursuivi était de travailler dans le sens d'une recherche de qualification et de quantification du niveau trophique des eaux à partir de la réponse d'un assemblage de communautés biologiques (biofilm).

Les quantités de biofilm développées par unité de surface étant difficiles à mettre en relation avec les teneurs en nutriments des eaux, la piste que nous avons explorée est celle d'un lien existant entre la vitesse de croissance des biofilms et la charge en nutriments du milieu. La vitesse de croissance qualifie une réponse fonctionnelle des biofilms. Au niveau structural, nous avons cherché à évaluer l'intérêt d'autres descripteurs du biofilm, descripteurs qualitatifs, pour l'évaluation du niveau trophique des eaux.

Les motivations portant ces objectifs sont de deux ordres. D'un point de vue méthodologique, notre objectif était d'apporter des éléments de contribution au développement d'un outil de détermination du niveau trophique applicable en milieu lotique. D'un point de vue fondamental, nous avons cherché à explorer les liens pouvant exister entre la productivité des biofilms et ses descripteurs qualitatifs avec la concentration en nutriments des eaux mesurée. Nous nous sommes ainsi demandés dans quelle mesure le biofilm reflète les conditions du milieu et, également, quelles sont les précautions à prendre afin d'établir le plus clairement possible des relations potentielles et/ou réelles entre les variables prises en compte.

Les moyens que nous nous sommes donnés pour atteindre ces objectifs peuvent être synthétisés de la façon suivante :

- association d'expérimentations, afin de pouvoir tester les descripteurs du biofilm au laboratoire puis de les confronter aux résultats du travail *in situ* ;
- au laboratoire : nous avons testé différents types d'enrichissements : tout d'abord en quantité de nutriments (N et P), puis en modalités d'ajouts réalisés (N et/ou P), en jouant sur le rapport N/P et enfin en utilisant également directement les eaux issues des stations d'études sur le terrain ;
- sur le terrain : nous avons diversifié les sites d'études. Nous avons tout d'abord travaillé en Garonne, les stations d'étude étaient cependant soumises à l'influence forte d'une hydrodynamique très variable. Sur d'autres cours d'eau, où le paramètre hydraulique était plus stable, nous avons diversifié le type et l'intensité du rejet encadré (rejet industriel faible ; rejet de station d'épuration et rejet de station d'épuration associé à des zones de maraîchage).

V. 1.2. Bilan des résultats - Conclusions

Etant donné les observations et les remarques que l'on a pu formuler quant à l'acquisition des données dans le cadre de notre travail *in situ* (cf. Chapitre IV, IV. 3 • Discussion p. 243), nous avons choisi de centrer nos conclusions sur les éléments apportés par le travail réalisé en canaux expérimentaux de laboratoire.

Ainsi, le bilan des apports des différents types de descripteurs du biofilm utilisés dans nos expérimentations en laboratoire est résumé dans le tableau V-I.

Tableau V-I : Bilan des informations apportées par les différents descripteurs quantitatifs et qualitatifs du biofilm en canaux expérimentaux quant à l'évaluation du niveau trophique de l'eau.

Descripteur	Pertinence	Observations
Taux de croissance en MSSC	(+)	On a pu voir une relation linéaire entre le taux de croissance $\mu_{C.MSSC}$ et les concentrations en PO_4^{3-} dans la gamme 0-0,09 mg P.L ⁻¹ . Ensuite, pour les concentrations plus élevées, le taux de croissance semble stagner mais nous n'avons pas suffisamment de données pour identifier au mieux la concentration saturante en PO_4^{3-} .
Taux de croissance en Chla	(-)	Les données de taux de croissance exprimées en chlorophylle a sont moins exploitables que celles issues de la MSSC car elles présentent des résultats moins réguliers.
Index Autotrophique	(+/-)	La réponse de l'IA est largement informative dans le cas de la comparaison de différents canaux au sein d'une expérimentation. En revanche, il ne semble pas possible de qualifier, uniquement par la valeur de cet indice, des canaux issus de différentes campagnes d'expérimentations.
Proportion de bactéries viables	(-)	Les variations ne sont pas continues au cours d'une expérimentation, les résultats ne sont pas exploitables envers la détermination du degré d'enrichissement des eaux.
Grands groupes d'algues	(+/-)	La relation entre les pourcentages de groupes d'algues et la charge en nutriments des eaux n'est pas univoque même si elle est porteuse d'informations.
Diatomées : Indice de Polluo-sensibilité Spécifique	(+/-)	L'IPS et l'étude du caractère de N-hétérotrophie des communautés diatomiques n'ont pas permis de différencier finement les situations. Ces paramètres semblent avoir été sensible aux écarts de qualité d'eau entre les canaux témoins et les canaux enrichis, mais pas en ce qui concerne les canaux enrichis entre eux. De manière identique à l'IPS, les pourcentages relatifs des compartiments de Diatomées N-autotrophes et N-hétérotrophes n'ont pas permis de décrire directement la qualité d'eau (lorsque l'on prend en compte différentes expérimentations).
Diatomées : N-hétérotrophie		

Le travail de recherche effectué permet de dégager plusieurs points.

- Les paramètres caractérisant la fraction bactérienne du biofilm, choisis dans le cadre de cette étude (numérations totales et pourcentage de cellules actives), n'ont pas été retenus car n'apportant aucune information supplémentaire au stade de notre démarche.

- S'agissant des descripteurs de la biomasse des biofilms, il est apparu préférable de travailler sur le paramètre de la MSSC pour évaluer le taux de croissance des biofilms. Ce dernier semble être un indicateur du niveau trophique de l'eau, toutefois sa mesure nécessite un maillage serré du pas de temps de prélèvement, afin de bien cerner la seule phase exponentielle : cela évitera la sous-évaluation des valeurs du taux de croissance.
- En outre, on pense qu'il est nécessaire d'associer le descripteur de la vitesse de croissance des biofilms à l'étude d'un paramètre qualitatif (Diatomées) afin d'obtenir une réponse plus fine. Dans ce cas, l'étude du compartiment des Diatomées sous l'angle de la N-hétérotrophie nous a semblé être révélateur d'informations quant à la qualité de l'eau du milieu même si certaines situations ne sont pas discriminées.

V. 2 • CRITIQUES ET PERSPECTIVES

Le protocole expérimental adopté dans ce travail visait à utiliser un dispositif simple, peu encombrant et présentant le moins de sources de dysfonctionnement possible. La compacité du système et son faible coût devaient en assurer sa portabilité en analyse de routine.

La principale critique peut porter sur l'alimentation en nutriments, liée à l'utilisation d'un système fermé durant une période de 3 ou 4 jours, pouvant aboutir à un épuisement en nutriments et donc une limitation du développement des biofilms. De plus, les perturbations engendrées par les nettoyages réguliers des cuves ont pu nuire au bon déroulement des expérimentations.

Les résultats acquis au laboratoire permettent d'identifier les conditions expérimentales qu'il convient d'améliorer afin de pouvoir exploiter de manière plus fine et plus sûre le potentiel du taux de croissance dans la détermination du statut trophique des eaux. Aussi, les perspectives de ce travail sont ciblées spécifiquement sur des propositions d'amélioration des dispositifs expérimentaux et des stratégies d'échantillonnage dans les expériences conduites en laboratoire.

En premier lieu, nous aborderons le mode de fonctionnement des canaux expérimentaux.

- ❖ Il apparaît capital de travailler à concentrations en nutriments constantes au cours du temps afin de :
 - se placer dans des conditions similaires à celles propres au terrain (où les concentrations en éléments présentent peu ou pas de fluctuations) ;
 - ne pas créer de limitation de la croissance des biofilms due à un épuisement des nutriments au bout des cycles de 3-4 jours ;
 - relier la vitesse de croissance à la concentration en nutriments réelle du milieu.

- ❖ En ce qui concerne les caractéristiques des canaux expérimentaux, même si leur taille pourrait être augmentée (ce qui est le cas le plus fréquent car cela permet une meilleure homogénéité du courant, des réactifs, de la dispersion,... (Volatier L., 2004)), c'est surtout la question de l'espace qui existe entre les lames de colonisation qui se pose. En effet, nos résultats nous ont amenés à penser que la croissance du biofilm a pu être limitée non pour des raisons nutritives mais pour des raisons de trop faible espace entre deux lames de colonisation.

- ❖ Enfin, au niveau de l'ensemencement des canaux, le temps de colonisation adopté dans notre étude a été suffisant pour obtenir des données détectables en MSSC et chlorophylle *a*. Toutefois, même si l'homogénéité des lames a pu être vérifiée dans chaque expérimentation en fin de phase de précolonisation (T4/T5), il peut être préférable d'immerger toutes les lames dans un même bac

pendant la phase de précolonisation et ensuite de les distribuer dans les différents canaux, en vue de mieux homogénéiser l'ensemencement. Cependant, il faut alors prendre garde à ce que le paramètre de l'éclairement soit homogène pour l'ensemble des lames et du même ordre que celui utilisé dans la suite des expérimentations et également, à assurer une aération suffisante du bac durant cette phase (en effet, le risque de désoxygénation du milieu est élevé et entraînerait la création de conditions défavorables aux micro-organismes constitutifs du biofilm).

Le point suivant concerne le suivi de la chimie des eaux.

- ❖ Pour le choix des concentrations en nutriments étudiées, ressort clairement des données issues de ce travail, la nécessité de réduire la variabilité des paramètres de composition chimique de l'eau circulant dans les canaux.

En effet, dans nos expérimentations, nous avons choisi de tester conjointement l'effet de charges variées en P et du rôle joué par le rapport N/P sur le développement des communautés périphytiques. Or, les résultats acquis montrent que la notion à privilégier est celle du facteur limitant. Le phosphore étant l'élément majoritairement reconnu comme limitant en eaux douces, c'est sur ce paramètre uniquement qu'il faut appliquer une variabilité.

Il serait intéressant de tester différentes concentrations en phosphates, dans des gammes plus resserrées que celles testées au cours de notre travail et ceci sans variation du rapport N/P entre les différents canaux ($N/P > 16$).

De plus, il nous a également manqué, lors de la comparaison des expérimentations en canaux, des intervalles de chevauchement des concentrations en PO_4^{3-} testées, afin d'évaluer la robustesse des réponses et d'analyser leur dépendance avec l'ensemencement initial en biofilm des canaux.

- ❖ A propos des éléments analysés, un dosage de l'azote organique et du phosphore total serait judicieux. Il permettrait d'asseoir la relation entre vitesse de croissance des biofilms et teneurs en nutriments. Toutefois, il est vrai que le type de dosages rencontrés dans la littérature est très variable et il n'y a pas de guide établi (Dodds W.K., 2003). Il serait également utile de doser la silice, élément qui peut devenir rapidement limitant. Dans notre étude, nous avons vérifié que les silicates n'étaient pas limitants, mais selon les cas elle peut le devenir et ainsi freiner le développement des communautés diatomiques. Enfin, le suivi du carbone organique est également à prendre en compte, notamment pour l'étude du compartiment hétérotrophe.
- ❖ Afin de pouvoir calculer de la manière la plus fine possible cette vitesse de croissance des biofilms et d'évaluer au plus près sa variabilité, il semblerait intéressant de pouvoir disposer d'un plus grand nombre de réplicats (5 par exemple) à chaque pas d'échantillonnage et également de procéder à un

échantillonnage à un pas de temps plus resserré de manière à caractériser au mieux la cinétique du biofilm.

Ainsi, au niveau du rythme des prélèvements, la durée de 4 jours pour la phase de précolonisation est correcte car elle permet un développement suffisant pour être détectable (données de biomasse en MSSC et Chla). Ensuite, on peut proposer un prélèvement tous les deux jours afin de mieux suivre la phase de croissance exponentielle des biofilms (soit un prélèvement à T4, T6, T8, T10, T12, T14, T16 et T18).

Toutefois, nous avons vu que, pour les paramètres qualitatifs, les résultats varient fortement en début d'expérimentation et peuvent être analysés après environ 15 jours. De ce fait, le suivi de ces paramètres peut être plus lâche que celui des paramètres quantitatifs (par exemple, analyses tous les deux prélèvements).

Pour résoudre en grande partie les difficultés rencontrées lors de nos expérimentations, un dispositif moins compact pourrait être mis en place. Par exemple, l'alimentation en continu d'un réacteur en verre (type aquarium) de volume suffisant (5 L) peut se réaliser à partir d'une réserve réfrigérée (40 L) maintenue à l'obscurité¹. Les concentrations en nutriments restent ainsi constantes. Un débit de quelques mL.min⁻¹ assure le renouvellement journalier du contenu du réacteur et l'autonomie du dispositif durant une semaine. Une pompe de recirculation permet le maintien de la vitesse du courant sur les supports colonisés et le trop-plein du réacteur est évacué à l'égout.

Les développements de biofilm parasite (sur les parois) peuvent être limités en remplaçant le réacteur en verre toutes les semaines sur une durée d'expérimentation de 3 semaines, les supports colonisés étant immédiatement réimmergés dans un nouveau réacteur propre.

Ce travail a montré que l'enrichissement du milieu naturel en nutriments se traduit par un taux de croissance plus élevée du biofilm sur une gamme déterminée de concentration en facteur limitant en conditions de laboratoire.

Bien qu'il reste partiel, la méthodologie engagée doit permettre la caractérisation d'un état d'eutrophisation d'un hydrosystème par la mesure de la vitesse de croissance d'un biofilm, compartiment biologique majeur des rivières à forte hydrodynamique.

* *

* * *

¹ Précisons que dans les résultats du chapitre III, nous avons vu que la conservation de l'eau du terrain à 4°C a eu peu d'effet sur la composition chimique de l'eau et de ce fait, il nous paraît correct de préconiser cette méthode de stockage de l'eau.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

AGENCE DE L'EAU ADOUR GARONNE, 2000a. Méthodologie d'élaboration des cartes départementales de qualité des cours d'eau. Toulouse

AGENCE DE L'EAU ADOUR GARONNE, 2000b. Vivre avec la rivière - La qualité des eaux superficielles, Département de la Gironde, données 1998-1999. Toulouse

AGENCE DE L'EAU ADOUR GARONNE, 2001. Revue de l'Agence de l'Eau Adour Garonne n°81 - Spécial Les systèmes d'évaluation de la qualité de l'eau (S.E.Q.). Toulouse

AIZAKI M. & SAKAMOTO K., 1988. "Relationship between water quality and periphyton biomass in several streams in Japan." *Verhandlungen der Internationalen Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie*, 23, pp. 1511-1517

ALEYA L. & DEVAUX J., 1989. "Intérêts et signification écophysiological de l'estimation de la biomasse et de l'activité photosynthétique de diverses fractions de taille phytoplanctonique en milieu lacustre eutrophe". *Revue des Sciences de l'Eau*, 2 (3), pp. 353-372

AMEZIANE T., 2000. Développement des micro-organismes phytoplanctoniques et périphytiques en période d'étiage estival dans le fleuve Garonne. Thèse de Doctorat en Hydrobiologie, Université Paul Sabatier - Toulouse III, 139 p.

AMEZIANE T., GARABETIAN F., DALGER D., SAUVAGE S., DAUTA A. & CAPBLANCQ J., 2002. "Epilithic biomass in a large gravel-bed river (The Garonne, France): a manifestation of eutrophication?" *River Research and Applications*, 18, pp. 343-354

AMEZIANE T., DAUTA A. & LE COHU R., 2003. "Origin and transport of phytoplankton in a large river: the Garonne, France". *Archiv für Hydrobiologie*, 156 (3), pp. 385-404

AMIARD J.-C., CAQUET T. & LAGADIC L., 1997. "Introduction - Les biomarqueurs parmi les méthodes d'évaluation de la qualité de l'environnement". In *Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement*, L. Lagadic, T. Caquet, J.-C. Amiard & F. Ramade (eds), Paris, Lavoisier Tec & Doc, pp. XXI-XXXI

AN Y.H., MCGLOHORN J.B., BEDNARSKI B.K., MARTIN K.L. & FRIEDMAN R.J., 2001. "An open channel flow chamber for characterizing biofilm formation on biomaterial surfaces". In *Methods in Enzymology. Microbial Growth in Biofilms. Part B: Special environments and physicochemical aspects*, R.J. Doyle (ed), San Diego, Academic Press, pp. 79-88

- ANGELIER E.**, 2000. *Ecologie des eaux courantes*. Paris, Lavoisier Tec & Doc
- ASAEDA T. & SON D.H.**, 2001. "A model of the development of a periphyton community: resource and flow dynamics". *Ecological Modelling*, 137, pp. 61-75
- BARROIN G.**, 2003. "Phosphore, azote et prolifération des végétaux aquatiques". *Assises internationales envirobio 13-14/11/2000. Gestion des risques. Santé et environnement : le cas des nitrates*, Paris, Le Courrier de l'environnement de l'INRA, pp. 13-26
- BATTIN T.J., KAPLAN L.A., NEWBOLD J.D. & HANSEN C.M.E.**, 2003. "Contributions of microbial biofilms to ecosystem processes in stream mesocosms". *Nature*, 426, pp. 439-442
- BELLON-FONTAINE M.N. & FOURNIAT J.** (eds), 1995. *Adhésion des micro-organismes aux surfaces. Biofilms - Nettoyage - Désinfection*. Paris, Lavoisier Tec & Doc
- BENMOUSSA M.**, 1995. *Ecologie des communautés périphytiques. Etude en laboratoire et en milieu naturel des conditions de développement et des caractéristiques de fonctionnement de trois types de biodermes*. Thèse de Doctorat en Hydrobiologie, Université Paul Sabatier - Toulouse III, 207 p.
- BERNHARDT E. & LIKENS G.E.**, 2004. "Controls on periphyton biomass in heterotrophic streams". *Freshwater Biology*, 49, pp. 14-27
- BIGGS B.J.F.**, 1987. "Effects of sample storage and mechanical blending on the quantitative analysis of river periphyton." *Freshwater Biology*, 18, pp. 197-203
- BIGGS B.J.F. & CLOSE M.E.**, 1989. "Periphyton biomass dynamics in gravel bed rivers: the relative effects of flow and nutrients". *Freshwater Biology*, 22, pp. 209-231
- BIGGS B.J.F.**, 1990. "Use of relative specific growth rates of periphytic diatoms to assess enrichment of a stream". *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 24, pp. 9-18
- BIGGS B.J.F.**, 1996. "Patterns in benthic algae of streams". In *Algal Ecology - Freshwater Benthic Ecosystems*, R.J. Stevenson, M.L. Bothwell & R.L. Lowe (eds), San Diego, Academic Press, pp. 31-56
- BIGGS B.J.F.**, 2000. *New Zealand Periphyton Guideline: Detecting, monitoring and managing enrichment of streams*. Wellington, Ministry for the Environment
- BIGGS B.J.F. & KILROY C.**, 2000. *Stream Periphyton Monitoring Manual*. Christchurch, New Zealand, NIWA, for the New Zealand Ministry for the Environment
- BISHOP P.L.**, 1997. "Biofilm structure and kinetics". *Water Science & Technology*, 36 (1), pp. 287-294
- BLANDIN P.**, 1986. "Bioindicateurs et diagnostic des systèmes écologiques". *Bulletin d'Ecologie*, 17 (4), pp. 215-307
- BONTOUX J.**, 1983. *Introduction à l'étude des eaux douces. Eaux Naturelles, Eaux usées, Eaux de boisson*. Paris, Lavoisier Tec & Doc
- BORCHARDT M.A.**, 1996. "Nutrients". In *Algal Ecology - Freshwater Benthic Ecosystems*, R.J. Stevenson, M.L. Bothwell & R.L. Lowe (eds), San Diego, Academic Press, pp. 183-227

- BORMANS M.**, 2005. Comprendre et contrôler l'eutrophisation en rivières et retenues. Université de Rennes 1 - UMR Géosciences. Accessible sur http://www.geosciences.univ-rennes1.fr/ens/CoursEnLigne/docs/bormans_M1_STS_Eutroph.pdf
- BOSCA C., BENMOUSSA M., DAUTA A., EULIN A. & MOLES A.**, 1994. "Utilisation des végétaux aquatiques pour définir des zones de sensibilité à l'eutrophisation d'une rivière : la Garonne (France)". *4ème Conférence internationale des Limnologues d'expression française, 25- 28 avril 1994, Marrakech*
- BOTHWELL M.L.**, 1985. "Phosphorus limitation of lotic periphyton growth rates: an intersite comparison using continuous-flow troughs (Thompson River system, British Columbia)". *Limnology and Oceanography*, 30 (3), pp. 527-542
- BOTHWELL M.L.**, 1988. "Growth rate responses of lotic periphytic diatoms to experimental phosphorus enrichment: the influence of temperature and light". *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 45, pp. 261-270
- BOTHWELL M.L.**, 1989. "Phosphorus-limited growth dynamics of lotic periphytic diatom communities: areal biomass and cellular growth rate responses". *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 46, pp. 1293-1301
- BOTT T.R. & GRANT D.M.**, 2001. "Biofilms in flowing systems". In *Methods in Enzymology. Microbial Growth in Biofilms. Part B: Special environments and physicochemical aspects*, R.J. Doyle (ed), San Diego, Academic Press, pp. 88-103
- BOUCHY J.-M. & GARNIER-ZARLI E.**, 1994. "Les intégrateurs biologiques : des bioindicateurs aux indices biologiques". *Gestion intégrée des milieux aquatiques. Actes des 5èmes journées du Diplôme d'Etudes Approfondies Sciences et Techniques de l'Environnement, 19-20 mai, Paris, Presses de l'Ecole Nationale des Ponts et Chaussées*, pp. 79-88
- BRISSET L., JACQUELIN L.F., LE MAGREX E., CARQUIN J. & CHOISY C.**, 1995. "Quantification des biofilms bactériens *in vitro* : intérêt et limites". In *Adhésion des micro-organismes aux surfaces. Biofilms - Nettoyage - Désinfection*, M.N. Bellon-Fontaine & J. Fourniat (eds), Paris, Lavoisier Tec & Doc, pp. 220-235
- BRUNEL A.**, 2000. Evaluation de la qualité des eaux de 39 stations du bassin Adour-Garonne à l'aide de communautés de diatomées benthiques. DESS Qualité et traitement des eaux, Institut des Sciences et Techniques, Université de Franche-Comté - Besançon, 33 p. + annexes
- BRUNET C.**, 2000. Effets interactifs d'une forte charge en éléments nutritifs et de la vitesse du courant sur la communauté périphytique : Etudes en canaux artificiels. Thèse de Doctorat en Analyse et Modélisation des Systèmes Biologiques, Université Claude Bernard - Lyon, 181 p. + annexes
- BURNS A. & RYDER D.S.**, 2001. "Potential for biofilms as biological indicators in Australian riverine systems". *Ecological Management & Restoration*, 2 (1), pp. 53-63
- CAPBLANCQ J. & CASSAN M.**, 1979a. "Etude du périphyton d'une rivière polluée (l'Agout). I. Structure et développement des communautés sur substrats artificiels". *Annales de limnologie*, 15 (2), pp. 193-210

- CAPBLANCQ J. & CASSAN M.**, 1979b. "Etude du périphyton d'une rivière polluée (l'Agout). II. Métabolisme et dynamique de croissance sur substrats artificiels". *Annales de limnologie*, 15 (2), pp. 211-222
- CAPBLANCQ J. & GARABETIAN F.**, 1999. "Manifestations de l'eutrophisation dans la Garonne". *GIS ECOBAG. Recherche et gestion de l'eau, le dialogue constructif. Journées d'échanges, 30 et 31 mars 1999*, Toulouse
- CAPBLANCQ J. & DECAMPS H.**, 2002. "L'eutrophisation des eaux continentales : questions à propos d'un processus complexe". *Nature Sciences Sociétés*, 10 (2), pp. 6-17
- CEMAGREF**, 1982. Etude des méthodes biologiques d'appréciation quantitative de la qualité des eaux. Bassin Rhône-Méditerranée-Corse
- CERF O. & CARPENTIER B.**, 1995. "L'hygiène dans les bio-industries". In *Adhésion des micro-organismes aux surfaces. Biofilms - Nettoyage - Désinfection*, M.N. Bellon-Fontaine & J. Fourniat (eds), Paris, Lavoisier Tec & Doc, pp. 251-273
- CHAMPIAT D. & LARPENT J.P.**, 1988. Biologie des eaux : méthodes et techniques. Paris, Masson
- CHESSMAN B.C.**, 1985. "Artificial-substratum periphyton and water quality in the lower La Trobe river, Victoria". *Australian Journal of Marine and Freshwater Research*, 36, pp. 855-871
- COLLINS G.B. & WEBER C.T.**, 1978. "Phycoperiphyton (algae) as indicators of water quality". *Transactions of the American Microscopical Society*, 97, pp. 36-43
- COMITE DE BASSIN ADOUR GARONNE**, 1996. Cahier géographique Garonne. Toulouse, SDAGE Adour Garonne
- COMITE DE BASSIN ADOUR GARONNE**, 1997. Atlas et données sur l'eau. Toulouse, AEAG et Diren Midi-Pyrénées
- COMMUNAUTE URBAINE DE BORDEAUX**, 2005. Unité de traitement des eaux usées de Cantinolle. Eysines
- COSTE M.**, 1978. Sur l'utilisation des Diatomées benthiques pour l'appréciation de la qualité biologique des eaux courantes. Thèse de 3ème cycle, Université de Franche-Comté - Besançon, 142 p.
- COSTERTON B. & STEWART P.** 2001 Les biofilms. *Pour la Science*. pp. 48-53
- CUGIER P., BILLEN G., GUILLAUD J.-F., GARNIER J. & MÉNESGUEN A.**, 2005. "Modelling the eutrophication of the Seine Bight (France) under historical, present and future riverine nutrient loading". *Journal of Hydrology*, 304, pp. 381-396
- DELSART C.**, 1995. Les bactéries de station d'épuration : rôle et devenir en rivière. DESS Géosciences appliquées aux équipements en milieux urbains, ruraux, littoraux et côtiers, Université Bordeaux 1, 65 p. + annexes
- DENICOLA D.M.**, 1996. "Periphyton responses to temperature at different ecological levels". In *Algal Ecology - Freshwater Benthic Ecosystems*, R.J. Stevenson, M.L. Bothwell & R.L. Lowe (eds), San Diego, Academic Press, pp. 149-181

- DERONZIER G. & CHOUBERT J.-M.**, 2004. Traitement du phosphore dans les petites stations d'épuration à boues activées. Comparaisons techniques et économiques des voies de traitement biologique et physico-chimique. Document technique FNDAE n°29. Antony, Cemagref Editions. Accessible sur http://www.eau.fndae.fr/documentation/numero_29.htm
- DESCY J.-P.**, 1980. "Utilisation des algues benthiques comme indicateurs biologiques de la qualité des eaux courantes". In *La pollution des eaux continentales. Incidence sur les biocénoses aquatiques*, P. Pesson (ed), Paris, Gauthier-Villars, pp. 169-174
- DODDS W.K., SMITH V.H. & ZANDER B.**, 1997. "Developing nutrient targets to control benthic chlorophyll levels in streams: a case study of the Clark Fork River". *Water Research*, 31 (7), pp. 1738-1750
- DODDS W.K. & WELCH E.B.**, 2000. "Establishing nutrient criteria in streams". *Journal North American Benthologic Society*, 19 (1), pp. 186-196
- DODDS W.K., SMITH V.H. & LOHMAN K.**, 2002. "Nitrogen and phosphorus relationships to benthic algal biomass in temperate streams". *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 59, pp. 865-874
- DODDS W.K.**, 2003. "Misuse of inorganic N and soluble reactive P concentrations to indicate nutrient status of surface waters". *Journal North American Benthologic Society*, 22 (2), pp. 171-181
- DODDS W.K.**, 2006. "Eutrophication and trophic state in rivers and streams". *Limnology and Oceanography*, 51 (1, part 2), pp. 671-680
- DUKAN S., PIRIOU P. & LEVI Y.**, 1995. "Modélisation du développement des biomasses bactériennes libres et fixées en réseaux de distribution d'eau potable". In *Adhésion des micro-organismes aux surfaces. Biofilms - Nettoyage - Désinfection*, M.N. Bellon-Fontaine & J. Fourniat (eds), Paris, Lavoisier Tec & Doc, pp. 149-160
- EULIN A.**, 1997. Les communautés de Diatomées épilthiques de la Garonne. Répartition naturelle et étude expérimentale *in situ* de la dynamique de colonisation sur substrat artificiel. Thèse de Doctorat en Hydrobiologie, Université Paul Sabatier - Toulouse III, 248 p.
- FAURIE C., HEMPTINNE J.L. & MEDORI P.**, 2003 (5ème). Ecologie - Approche scientifique et pratique. Paris, Lavoisier Tec & Doc
- GARNIER J. & BOËT P.**, 2000. Biodiversité des organismes et des écosystèmes. Introduction générale. Programme Interdisciplinaire de Recherche sur l'Environnement de la Seine, PIREN-Seine
- GARNIER J., DUFAYT O., BILLEN G. & ROULIER M.**, 2001. "Eutrophisation et gestion des apports de phosphore dans le bassin de la Seine". *Scientifiques et Décideurs : agir ensemble pour une gestion durable des systèmes fluviaux. 6-7-8 juin*, Lyon
- GARRY P., ANDERSEN T., VENDEUVRE J.L. & BELLON-FONTAINE M.N.**, 1995. "Influence de la rugosité de surfaces en polyuréthane sur l'adhésion de *Bacillus subtilis* et *Bacillus cereus*". In *Adhésion des micro-organismes aux surfaces. Biofilms - Nettoyage - Désinfection*, M.N. Bellon-Fontaine & J. Fourniat (eds), Paris, Lavoisier Tec & Doc, pp. 21-30
- GAUJOUS D.**, 1995. La pollution des milieux aquatiques : aide mémoire. Paris, Lavoisier Tec & Doc

- GELLE M.-P., JACQUELIN L.-F., DOUBEIKOVSKAIA Z., LE MAGREX E., BRISSET L., CARQUIN J., CHOISY C. & BOUGY F.**, 1995. "Exploration du métabolisme des bactéries au coeur d'un biofilm". In *Adhésion des micro-organismes aux surfaces. Biofilms - Nettoyage - Désinfection*, M.N. Bellon-Fontaine & J. Fourniat (eds), Paris, Lavoisier Tec & Doc, pp. 236-247
- GENERALE DES EAUX**, 2003a. Ginestous. L'usine de dépollution de Toulouse. Toulouse, Générale des Eaux
- GENERALE DES EAUX**, 2003b. Bilans techniques assainissement, Commune de Cestas. Service Assainissement, Descriptif des installations
- GENIN B., CHAUVIN C. & MENARD F.**, 1997. Cours d'eau et indices biologiques. Pollutions - Méthodes - IBGN. Dijon, ENESAD - CNERTA
- GLANTZ S.A.**, 2002. Primer of biostatistics. New York, Mc Graw-Hill, Medical Publishing Division
- 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. Thèse de Doctorat en Ecotoxicologie, Université Bordeaux 1, 175 p. + annexes
- GUASCH H. & SABATER S.**, 1995. "Seasonal variations in photosynthesis-irradiance responses by biofilms in Mediterranean streams". *Journal of Phycology*, 31, pp. 727-735
- HASLAM S.M.**, 1982. "A proposed method for monitoring river pollution using macrophytes". *Environmental Technology Letters*, 3, pp. 19-34
- HILL W.**, 1996. "Effects of light". In *Algal Ecology - Freshwater Benthic Ecosystems*, R.J. Stevenson, M.L. Bothwell & R.L. Lowe (eds), San Diego, Academic Press, pp. 121-148
- HORNER R.R., WELCH E.B. & VEENSTRA R.B.**, 1983. "Development of nuisance periphytic algae in laboratory streams in relation to enrichment and velocity". In *Periphyton of Freshwater Ecosystems*, R.G. Wetzel (ed), Boston, Dr W. Junk Publishers, pp. 122-134
- IFREMER**, 2002. Etat des connaissances internationales sur l'eutrophisation et la dynamique phytoplanktonique. Accessible sur <http://www.ifremer.fr/envlit/actualite/20020517.htm>
- JØRGENSEN B.B.**, 1994. "Diffusion processes and boundary layers in microbial mats". *NATO Advanced research Workshop on Structure, Development and Environmental Significance of Microbial Mats*, Arcachon 27 septembre - 1er octobre 1993, Séries G : Ecological Sciences, pp. 243-252
- KOLLKWITZ R. & MARSSON M.**, 1908. "Ökologie der pflanzlichen Saprobien". *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft*, 26, pp. 505-519
- KOLLKWITZ R. & MARSSON M.**, 1909. "Ökologie der tierischen Saprobien". *International Review of Hydrobiology*, 2, pp. 126-152
- LAFONT M.**, 1984. "Oligochaete communities as biological descriptors of pollution in the fine sediments of rivers". *Hydrobiologia*, 115, pp. 127-129

- LANG C. & HUTTER P.**, 1981. "Structure, diversity and stability of two Oligochaete communities according to sedimentary inputs in lake Geneva (Switzerland)". *Schweizerische Zeitschrift für Hydrologie*, 43 (2), pp. 265-276
- LAURENT M. & CALVET F.**, 1977. "Utilisation des poissons comme indicateurs de la qualité des eaux, comparaison avec la méthode des « indices biotiques ». Application sur le Laxia : rivière du pays basque français et le Gabas : rivière des Landes". *Annales d'Hydrobiologie INRA*, 8 (1), pp. 67-87
- LEVEQUE C.**, 1996. Ecosystèmes aquatiques. Paris, Hachette
- LIEBIG J.**, 1840. Organic chemistry and its application to agriculture and physiology. London, Taylor and Walton
- LIU D., LAU Y.L., CHAU Y.K. & PACEPAVICIUS G.J.**, 1993. "Characterization of biofilm development on artificial substratum in natural water". *Water Research*, 27 (3), pp. 361-367
- LOISEAU J., SICCARDI A. & TERZIAN L.**, 2003. La pollution des eaux douces : l'eutrophisation (Licence pluridisciplinaire scientifique, Université de Provence Aix-Marseille I). Accessible sur <http://www.up.univ-mrs.fr/~ufrsm/filieres/LicPlurid/pollution/pagegarde.html>
- LORENZEN C.J.**, 1967. "Determination of chlorophyll and pheopigments: spectrophotometric equations". *Limnology and Oceanography*, 12, pp. 343-346
- LOWE R.L. & PAN Y.**, 1996. "Benthic algal communities as biological monitors". In *Algal Ecology - Freshwater Benthic Ecosystems*, R.J. Stevenson, M.L. Bothwell & R.L. Lowe (eds), San Diego, Academic Press, pp. 705-739
- MATLOCK M.D., STORM D.E., SMOLEN M.D. & MATLOCK M.E.**, 1999. "Determining the lotic ecosystem nutrient and trophic status of three streams in eastern Oklahoma over two seasons". *Aquatic Ecosystem Health and Management*, 2, pp. 115-127
- MATTILA J. & RÄISÄNEN R.**, 1998. "Periphyton growth as an indicator of eutrophication: an experimental approach". *Hydrobiologia*, 377, pp. 15-23
- MERIAUX J.L. & WATTERZ J.R.**, 1980. "Les végétations aquatiques et subaquatiques. Relations avec la qualité des eaux." In *La pollution des eaux continentales. Incidence sur les biocénoses aquatiques*, P. Pesson (ed), Paris, Gauthier-Villars, pp. 225-242
- MEYER A., DEIANA J. & LECLERC H.**, 1991. Cours de microbiologie générale. Paris, Doin
- MINISTERE DE L'ÉCOLOGIE ET DU DÉVELOPPEMENT DURABLE - DIRECTION DE L'EAU**, 2001. La directive cadre européenne sur l'eau. Une nouvelle ambition pour la politique de l'eau. Accessible sur http://www1.environnement.gouv.fr/IMG/eau/plaquette_cadre.pdf
- MONFORT P., RATINAUD M.-H., GOT P. & BALEUX B.**, 1995. "Apports de la cytométrie en flux et en image en écologie bactérienne des milieux aquatiques". *Ecologie bactérienne des milieux aquatiques - Ecole thématique du CNRS 16 - 27 octobre 1995*, Banyuls-sur-Mer, Institut océanographique, pp. 97-111
- MONTUELLE B.**, 2003. Qualité et gestion des sédiments d'eau douce : Eléments physico-chimiques et biologiques. Cemagref Editions

- MOZES N.**, 1995. "The ways we study interfacial phenomena of living cells". In *Adhésion des micro-organismes aux surfaces. Biofilms - Nettoyage - Désinfection*, M.N. Bellon-Fontaine & J. Fourniat (eds), Paris, Lavoisier Tec & Doc, pp. 3-13
- NEU T.R., EITNER A. & PAJE M.L.**, 2003. "Development and architecture of complex environmental biofilms". In *Fossil and Recent Biofilms. A Natural History of Life on Earth*, W.E. Krumbein, D.M. Paterson & G.A. Zavarzin (eds), London, Kluwer Academic Publisher, pp. 29-39
- OCDE**, 1982. Eutrophisation des eaux : méthode de surveillance, d'évaluation et de lutte. Paris. Organisation pour la Coopération et le Développement Economique
- PARENT-RAOULT C.**, 2004. Etude en systèmes de laboratoire des effets de Rejets Urbains de Temps de Pluie sur les communautés périphytiques : influence de facteurs d'exposition. Thèse de Doctorat en Analyse et Modélisation des Systèmes Biologiques, Université Claude Bernard - Lyon, 240 p.
- PATRICK**, 1949. "A proposed biological measure of stream conditions based based on a survey of the Conestoga Basin, Lancaster County, Pennsylvania". *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*, 101, pp. 277-341
- PAVE A.**, 1994. Modélisation en biologie et en écologie. Lyon, Aléas Editeur
- PERRY J.J., STALEY J.T. & LORY S.**, 2004. Microbiologie. Dunod
- PETERSON B.J., HOBBIIE J.E. & CORLISS T.L.**, 1983. "A continuous-flow periphyton bioassay: Tests of nutrient limitation in a tundra stream". *Limnology and Oceanography*, 28 (3), pp. 583-591
- PICOT B.**, 2001. Evaluation d'un niveau de contamination d'un écosystème. Cours DEA Sciences de l'eau dans l'environnement continental. Université Montpellier I.
- POLE OBSERVATOIRE DE L'ENVIRONNEMENT DE L'INSTITUT DE FORMATION ET DE RECHERCHE EN EDUCATION A L'ENVIRONNEMENT & OBSERVATOIRE REGIONAL DE L'ENVIRONNEMENT**, 2005. Glossaire Eaux Continentales. Tromas, C. & Trouslot, F. Accessible sur www.observatoire-environnement.org
- POURRIOT R., CAPBLANCQ J., CHAMP P. & MEYER J.A.**, 1982. Ecologie du plancton des eaux continentales. Paris, Masson
- POURRIOT R. & MEYBECK M.** (eds), 1995. *Limnologie générale*. Paris, Masson
- RAMADE F.**, 1993. Dictionnaire encyclopédique de l'écologie et des sciences de l'environnement. Paris, Ediscience International
- RAMOUSSE R., LE BERRE M. & LE GUELTE L.** Introduction aux Statistiques, 3. Choisir le test statistique approprié. Accessible sur www.cons-dev.org/elearning/stat/St2b.html
- REDFIELD A.C., KETCHUM B.H. & F.A. R.**, 1963. "The influence of organisms on the composition of seawater". In *The Sea*, M.N. Hill (ed), New York, Wiley-Interscience, pp. 26-77
- RESEAU DE BASSIN RHONE-MEDITERRANEE**, 1999. Système d'Information sur l'Eau du Bassin Rhône Méditerranée Corse - Glossaire. Accessible sur http://www.environnement.gouv.fr/rhone-alpes/bassin_rmc/rdbbrmc/glossaire.html

- RIBER H.H. & WETZEL R.G.**, 1987. "Boundary-layer and internal diffusion effects on phosphorus fluxes in lake periphyton". *Limnology and Oceanography*, 32 (6), pp. 1181-1194
- RISKIN M.L., DEACON J.R., LIEBMAN M.L. & ROBINSON K.W.**, 2003. Nutrient chlorophyll relations in selected streams of the New England coastal basins in Massachusetts and New Hampshire, June-September 2001. Pembroke, New Hampshire, U.S. Geological survey Water-Resources Investigations Report 03-4191
- ROMANÍ A.M. & SABATER S.**, 1999. "Effect of primary producers on the heterotrophic metabolism of a stream biofilm". *Freshwater biology*, 41, pp. 729-736
- ROUX M.**, 2001. "Finalités et outils pour l'évaluation de la qualité des milieux aquatiques". *Revue de l'Agence de l'Eau*, 81, pp. 3-6
- SABATER S., GUASCH H., ROMANÍ A.M. & MUÑOZ I.**, 2002. "The effect of biological factors on the efficiency of river biofilms in improving water quality". *Hydrobiologia*, 469, pp. 149-156
- SAUVAGE S., TEISSIER S., GARABÉTIAN F. & CAUSSADE B.**, 1999. "Hydroecological modelling of the Garonne river (south-west of France)". In *Water Pollution, V - Modelling, measuring and predicting*, WITpress (ed), pp. 567 - 576
- SCHERRER B.**, 1984. Biostatistique. Paris, Gaëtan Morin Editeur
- SEKAR R., VENUGOPALAN V.P., NANDAKUMAR K., NAIR K.V.K. & RAO V.N.R.**, 2004. "Early stages of biofilm succession in a lentic freshwater environment". *Hydrobiologia*, 512, pp. 97-108
- SIEE**, 1998. Eutrophisation de la Garonne à l'aval de Toulouse. Volet I : Bilan des connaissances. Toulouse, Agence de l'eau Adour-Garonne
- SIEE**, 2000a. Eutrophisation de la Garonne à l'aval de Toulouse. Volet II : Synthèse et propositions en matière d'études complémentaires. Toulouse, Agence de l'eau Adour-Garonne
- SIEE**, 2000b. Eutrophisation de la Garonne à l'aval de Toulouse. Volet III : Synthèse des études complémentaires réalisées au cours de périodes estivales 1998-1999. Toulouse, Agence de l'eau Adour-Garonne
- SIEE**, 2000c. Eutrophisation de la Garonne à l'aval de Toulouse. Volet IV : Bilan de l'étude et modalités de traitement proposés pour la déphosphatation des rejets de la station d'épuration de Ginestous. Toulouse, Agence de l'eau Adour-Garonne
- SIMONET F.** 2001 Le nouveau système d'évaluation de la qualité de l'eau des rivières : le SEQ-Eau. *Revue de l'Agence de l'Eau*. pp. 7-9
- SOLACROUP F.** 2001 Le système d'évaluation de la qualité biologique (SEQ-Bio) des cours d'eau. *Revue de l'Agence de l'Eau*.
- STEINMAN A.D. & MCINTIRE C.D.**, 1987. "Effects of irradiance on the community structure and biomass of algal assemblages in laboratory streams". *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 44, pp. 1640-1648

- STEINMAN A.D., MULHOLLAND P.J. & BEAUCHAMP J.J.**, 1995. "Effects of biomass, light, and grazing on phosphorus cycling in stream periphyton communities." *Journal of the North American Benthological Society*, 14 (3), pp. 371-381
- STEVENSON R.J., BOTHWELL M.L. & LOWE R.L.** (eds), 1996. *Algal Ecology - Freshwater Benthic Ecosystems*. San Diego, Academic Press
- TANK J.L. & DODDS W.K.**, 2003. "Nutrient limitation of epilithic and epixylic biofilms in ten North American streams". *Freshwater Biology*, 48 (6), pp. 1031-1049
- TEISSIER S.**, 2001. Bilan des transformations d'azote en rivière. Développements méthodologiques de la mesure des flux d'interface et applications (sédiments, biofilms épilithiques de la Garonne). Thèse de Doctorat en Ecologie microbienne, Université Toulouse III - Paul Sabatier, 192 p. + annexes
- TEISSIER S., GARABÉTIAN F., TORRE M., DALGER D. & LABROUE L.**, 2002. "Impact of an urban centre on the nitrogen cycle processes of epilithic biofilms during a summer low-water period". *River Research and Applications*, 18, pp. 21-30
- TETT P.**, 2003. Eutrophication in aquatic ecosystem management. Edinburgh, School of Life Sciences, Napier University. Accessible sur <http://www.lifesciences.napier.ac.uk/teaching/Eu/index.html>
- UNESCO**, 1966. Determination of photosynthetic pigments in seawater. Monographs on oceanographic methodology, Scor-Unesco, Working papers 17
- UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY**, 2000. Nutrient Criteria. Technical Guidance Manual : Rivers and Streams. Washington, EPA. Accessible sur <http://www.epa.gov/waterscience/criteria/nutrient/guidance/rivers/index.html>
- UTHERMÖHL H.**, 1958. "Zur Vervollkommnung der quantitative phytoplankton-Methodik". *Mitteilungen Internationale Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie*, 9, pp. 1-38
- VAN DAM H., MERTENS A. & SINKELDAM J.**, 1994. "A coded checklist and ecological indicator values of freshwater diatoms from the Netherlands". *Netherlands Journal of Aquatic Ecology*, 28 (1), pp. 117-133
- VAN NIEUWENHUYSE E.E. & JONES J.R.**, 1996. "Phosphorus-chlorophyll relationship in temperate streams and its variation with stream catchment area." *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 53, pp. 99-105
- VERNEAUX J. & TUFFERY G.**, 1967. "Une méthode zoologique pratique de détermination de la qualité biologique des eaux courantes. Indices biotiques." *Annales Scientifiques de l'Université de Franche-Comté - Besançon*, 3, pp. 79-89
- VERNEAUX J.**, 1981. "Les poissons et la qualité des cours d'eau". *Annales Scientifiques de l'Université de Franche-Comté - Besançon*, 4^{ème} série (fasc. 2), pp. 33-41
- VERNEAUX J.**, 1984. "Méthodes biologiques et problèmes de la détermination des qualités des eaux courantes". *Bulletin d'Ecologie*, 15 (1), pp. 47-55

- VIDAL M.L., BASSERES A. & NARBONNE J.F.**, 2002. "Seasonal variations of pollution biomarkers in two populations of *Corbicula fluminea* (Müller)". *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 131, pp. 133-151
- VOLATIER L.**, 2004. Réponses d'une communauté périphytique à un effluent complexe : étude en bio-essais et en canaux artificiels. Thèse de Doctorat en Sciences et Techniques du Déchet, Institut National des Sciences Appliquées - Lyon, 289 p. + annexes
- VOLLENWEIDER R.A.**, 1969. A manual on methods for measuring primary production in aquatic environments. Philadelphie, International Biological Programme
- VYMAZAL J.**, 1988. "The use of periphyton communities for nutrient removal from polluted streams". *Hydrobiologia*, 166, pp. 225-237
- WATANABE T., CAPBLANCQ J. & DAUTA A.**, 1988. "Utilisation des bioessais "in situ" (substrats artificiels) pour caractériser la qualité des eaux de rivière à l'aide du périphyton". *Annales de limnologie*, 24 (2), pp. 111-125
- WETZEL R.G.**, 1983. "Opening remarks". In *Periphyton of Freshwater Ecosystems.*, R.G. Wetzel (ed), Boston, Dr W. Junk Publishers, pp. 3-4
- YANG M.D. & SYKES R.M.**, 1998. "Trophic-dynamic modeling in a shallow eutrophic river ecosystem". *Ecological Modelling*, 105, pp. 129-139

VALORISATION

VALORISATION

Participation Colloques :

Communications orales :

- GARABETIAN F., OTHONIEL C., BEUFFE H., TORRE M. & DELMAS F., 2004. "Vers un outil de caractérisation du statut trophique de la Garonne - Dynamique de la biomasse épilithique". *Séminaire de restitution finale des travaux scientifiques du GIS ECOBAG P1 "Hydroécologie de la Garonne" (29 septembre)*, Toulouse.
- OTHONIEL C., BEUFFE H., TORRE M., DELMAS F. & DE WIT R., 2004. "Détermination du statut trophique d'une rivière à biomasse fixée dominante : le biofilm peut-il servir de bioindicateur ?" *47ème Congrès de l'Association Française de Limnologie (5-8 juillet)*, Besançon.
- OTHONIEL C., 2004 "Etude de la dynamique du biofilm de Garonne sous conditions variées de charge eutrophisante". *Séminaire DiFMic "Diversité et Fonctions Microbiennes en milieu aquatique". (23-24 mars)*, Lyon.
- DELMAS F., GARABETIAN F., BEUFFE H., TORRE M. & OTHONIEL C., 2002. "Caractérisation du niveau trophique de la Garonne et impact trophique des rejets". *Séminaire de restitution des travaux scientifiques du GIS ECOBAG P1 "Hydroécologie de la Garonne" (11 septembre)*, Pau.

Posters :

- OTHONIEL C. & TORRE M., 2005. "Détermination du niveau trophique d'une rivière à régime rapide : exemple de la Garonne". *Cemagref de Bordeaux, Inauguration du Pôle Aménités et du Laboratoire Qualité des Eaux (01 juillet)*, Cestas.
- OTHONIEL C., BEUFFE H., TORRE M., DE WIT R., COSTE M. & DELMAS F., 2003. "Développement d'un indicateur de statut trophique de rivières à biofilm dominant : application à la Garonne". *Vèmes Journées de l'Ecologie Fonctionnelle (12-14 mars)*, Nancy.

Contribution à la rédaction dans des revues :

- GARABETIAN F., DELMAS F., OTHONIEL C., TEISSIER S. & LYAUTEY E., 2005. "Les biofilms épilithiques, témoins du niveau d'enrichissement de la Garonne". *Cahier Technique n°3 Agence de l'Eau Adour-Garonne - GIS ECOBAG : " La Garonne dans son bassin "*, pp. 4-6

LA CROISSANCE DU BIOFILM PHOTOSYNTHÉTIQUE : UN INDICATEUR DU STATUT TROPHIQUE DES RIVIÈRES ?

A l'heure actuelle, les outils permettant d'évaluer le statut trophique des eaux sont inappropriés pour les milieux lotiques. La bibliographie montre que les relations entre la quantité de biofilm développé par unité de surface de support et les teneurs en nutriments des eaux ne sont pas significatives et ne permettent pas l'établissement de modèles prédictifs de quantité de biomasse algale. Ce constat nous a incités à analyser les liens entre la qualité de l'eau et la dynamique de croissance des biofilms, à travers leur taux de croissance. Nous avons étudié dans quelle mesure cette relation pouvait être intégrée à un outil de diagnostic du niveau d'enrichissement des cours d'eau.

Cette étude comporte deux volets : une approche en laboratoire, avec production de biofilm en conditions maîtrisées et une approche *in situ*, avec l'immersion en rivières de supports de colonisation de biofilm.

Le travail en canaux expérimentaux montre que le taux de croissance du biofilm est une fonction linéaire des teneurs en PO_4^{3-} (facteur limitant) sur une gamme de concentrations identifiée de 0 à $0,09 \text{ mg P-PO}_4^{3-} \cdot \text{L}^{-1}$ (teneurs d'un environnement moyennement pollué). Avec des concentrations supérieures, il semble que l'on atteigne les niveaux de concentrations saturantes et le taux de croissance n'est plus influencé par les teneurs en PO_4^{3-} , ce qui implique qu'il n'est alors plus possible de discriminer deux situations trophiques distinctes. Les résultats obtenus *in situ* soulignent, d'une part, la difficulté de la mise en évidence d'une relation claire entre le compartiment biologique et la qualité du milieu, du fait de la très grande sensibilité du biofilm envers l'ensemble des conditions naturelles et, d'autre part, la nécessité d'un échantillonnage de biomasse à un pas de temps très resserré. Du point de vue qualitatif, les caractéristiques de N-hétérotrophie des communautés diatomiques ont permis de différencier des situations trophiques fortement contrastées sans être généralisables à l'ensemble des cas étudiés.

Mots clefs : *statut trophique ; biofilm ; bioindication ; canaux expérimentaux ; rivières.*

PHOTOSYNTHETIC BIOFILM GROWTH RATE: AN INDICATOR OF TROPHIC STATE IN RIVERS?

At present, tools making it possible to assess trophic state of water are inappropriate for rivers. Literature shows that methods based on the analyses of interconnections between biofilm quantities developed per unit of substratum area and water column nutrient concentrations appear not to be relevant to construct algal biomass predictive models. These facts prompted us to study methods using analyses of the links between water quality and the growth dynamics of biofilm, through their growth rate. We studied this indicator's potential for inclusion into a diagnostic tool for the enrichment levels in rivers.

Our study is in two parts: (i) a laboratory approach consisting of the production of biofilm in controlled environment, and (ii) an *in situ* approach in rivers using the immersion of biofilm colonization supports.

Work in experimental channels shows that biofilm growth rate is a linear function of PO_4^{3-} amounts (limiting factor), on an identified range of concentrations from 0 to $0.09 \text{ mg P-PO}_4^{3-} \cdot \text{L}^{-1}$ (indication of a moderately polluted environment). For higher concentrations, it seems that the saturation point is reached, growth rate is not influenced any more by PO_4^{3-} contents and two distinct trophic situations can no longer be differentiated. Results obtained in the field underline, on the one hand, the difficulty of the establishment of an unambiguous relationship between the biological compartment and water quality because of biofilm's extreme sensitivity to any variation in natural conditions and, on the other hand, the need for a biomass sampling with interval of very tightened time. From a qualitative point of view, the N-heterotrophy characteristics of diatoms communities made it possible to differentiate from strongly contrasted trophic situations without being generalized to account for all studied cases.

Keywords: *trophic state; biofilm; bioindication; experimental channels; rivers.*

Directeur de thèse : Rutger DE WIT - Unité CNRS 5119 Ecoystèmes Lagunaires, Equipe Ecologie Microbienne des Milieux Aquatiques, Université Montpellier II (case courrier 093, Place Eugène Bataillon, F-34095 Montpellier Cedex 05)