

Modulation de la toxicité des métaux vis-à-vis du développement des biofilms de cours d'eau (bassin versant de Decazeville, France)

Soizic MORIN^{a*}, Thi Thuy DUONG^b, Sébastien BOUTRY^a & Michel COSTE^a

^a Cemagref, UR REBX, 50 avenue de Verdun, F-33612 Cestas cedex

^b Equipe GEMA – UMR 5805 EPOC, Université Bordeaux I,
Place du Docteur Bertrand Peyneau, F-33120 Arcachon

(Received 10 July 2007; in revised version 7 March 2008; accepted 11 April 2008)

Résumé – Des études de terrain sur des biofilms matures nous ont permis de souligner une modulation de la toxicité des métaux lourds (cadmium, zinc) en fonction de la disponibilité nutritive. Ainsi, le long d'un gradient de contamination organique et métallique (bassin versant de Decazeville, France), le biofilm se développe plus abondamment (en épaisseur, en densité) dans des conditions nutritives élevées, et de façon comparable en conditions de contamination organique importante et de contaminations combinées nutriments / métaux. L'épaisseur du biofilm exerce un effet protecteur des métaux par : (i) l'existence de gradients de diffusion limitant leur pénétration vers les couches internes du biofilm, (ii) une mortalité élevée des cellules superficielles de la matrice, agissant comme une barrière supplémentaire, (iii) la production par les organismes de polypeptides complexant le métal sous forme moins biodisponible.

Écotoxicologie aquatique / biofilms / Bacillariophycées / cadmium / zinc / nutriments / biovolume diatomique

Abstract – Mitigation of metal toxicity to freshwater biofilms development (Decazeville watershed, SW France). We investigated the changes undergone by natural photosynthetic biofilms under metal exposure through field studies conducted on mature biofilms collected along gradients of organic and metal (cadmium, zinc) contaminations in the Decazeville watershed, South-West France. Biofilms grown under high nutrient conditions were as thick and dense with or without metal contamination. It suggested that the organic matrix acts like a barrier against deleterious effects of metals on diatom assemblages through various mechanisms: (i) gradients limiting metal diffusion in the inner parts of the biofilms, (ii) increased mortality of superficial cells creating a thin protective layer, and (iii) production of high amounts of metal-complexing exopolysaccharides by the constitutive microflora of the biofilms.

Freshwater ecotoxicology / Biofilms / Bacillariophyceae / Cadmium / Zinc / Nutrients / Diatom biovolume

* Correspondence and reprints : soizic.morin@bordeaux.cemagref.fr
Communicating editor : Pierre Compère

INTRODUCTION

Le biofilm des rivières, assemblage de micro-organismes (bactéries, algues, champignons, protozoaires...) enchâssés dans une matrice organique, colonise les substrats solides (galets, bois, plantes) comme les surfaces meubles (sable, vase) des cours d'eau. Son cycle de développement (décrit par Biggs, 1996 ; Eulin & Le Cohu, 1998) suit un modèle de croissance de type logistique correspondant à la succession (i) d'une phase d'acquisition de biomasse : colonisation et adaptation, croissance proprement dite, et (ii) d'une phase de perte : sénescence, mortalité, broutage, abrasion...

Le biofilm mature est une entité physiologique complexe et cohérente ; au sein de la matrice organique, l'organisation des micro-organismes lui confère des propriétés particulières de résistance mécanique et de tolérance aux agents toxiques supérieures à celles des individus sous forme libre (Barranguet *et al.*, 2000 ; Stewart & Costerton, 2001). Le biofilm est également le cadre d'interactions entre micro-organismes : relations de compétition envers les ressources nutritives (Dunne, 2002 ; Sabater *et al.*, 2002), phénomènes d'inhibition de certaines algues sur le développement bactérien (Hellio *et al.*, 2001 ; Watanabe *et al.*, 1988) ou l'inverse (Bauer & Robinson, 2002), régulation réciproque : les algues utilisent les composés minéraux issus de la dégradation bactérienne (Moriarty, 1997), en retour les exsudats algaux assurent la nutrition des bactéries (Goto *et al.*, 2001 ; Romaní & Sabater, 1999 ; Sekar *et al.*, 2004). Les facteurs de contrôle du développement sont, outre les paramètres physiques (hydrodynamique, température, éclaircissement, nature du substrat) et biologiques (broutage par des oligochètes), liés à la qualité de l'eau : disponibilité de la ressource nutritive (e.g. Lawrence *et al.*, 2004 ; Sabater *et al.*, 2002), stress toxique (e.g. Biggs, 1990 ; Guasch *et al.*, 2003 ; Peterson, 1996), etc. Ces facteurs sont susceptibles d'influer sur les vitesses de croissance du biofilm et/ou la quantité maximale de biomasse (pic de biomasse) atteinte au terme de la phase de croissance.

Les biofilms sont aujourd'hui peu utilisés pour l'évaluation de la qualité des eaux (Burns & Ryder, 2001 ; Lowe & Pan, 1996) ; cependant leur ubiquité dans les milieux aquatiques, leur sensibilité aux modifications environnementales, même peu marquées, leur temps de génération faible et la facilité de quantification de manière fiable et reproductible en font des bio-indicateurs potentiels de la qualité globale des cours d'eau (Sabater *et al.*, 2007). De plus, ils présentent une capacité importante d'accumulation des éléments toxiques, notamment des métaux lourds (Chang & Reinfelder, 2000 ; Hill *et al.*, 2000 ; Morin *et al.*, 2007), et la pertinence de leur utilisation comme bio-indicateurs de pollution métallique a été soulignée par Fuchs *et al.* (1996).

Cependant, la disponibilité nutritive est susceptible d'interagir avec la présence de toxiques (Barranguet *et al.*, 2002 ; Guasch *et al.*, 2004 ; Lozano & Pratt, 1994) et ainsi de moduler leur toxicité vis-à-vis des biofilms. Dans cette étude, nous avons tenté de décrire le développement des biofilms de cours d'eau soumis à une contamination polymétallique (cadmium, zinc), dans des conditions de disponibilité nutritive contrastées, afin de mettre en évidence les effets éventuels d'interactions nutriments/métaux (des phases dissoute et particulaire) sur les paramètres structurels du biofilm. Nous nous sommes ainsi attachés à caractériser les effets de la contamination métallique, en présence ou non de contamination organique, sur la biomasse périphytique établie ainsi que sur la distribution des tailles moyennes des individus appartenant au compartiment des

diatomées, algues brunes unicellulaires fortement représentées dans le biofilm (Stevenson, 1996) et utilisées en routine pour la bioindication de la qualité générale des cours d'eau (Indice de Polluosensibilité Spécifique (Coste *in Cemagref* (1982); Indice Biologique Diatomées (Lenoir & Coste, 1996), normalisé par l'AFNOR en 2000).

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Localisation des sites d'étude

Les expérimentations ont été menées dans le bassin versant du Riou Mort (Aveyron, Sud-Ouest de la France), localisé en amont de la Zone Atelier Adour-Garonne labellisée par le CNRS/PEVS en 2002. Quatre stations ont été sélectionnées le long de deux cours d'eau : le Riou Mort et son affluent le Riou Viou, de manière à présenter un gradient de contamination organique et métallique (Fig. 1). Le bassin versant du Riou Mort, d'une superficie de 150 km² environ, est caractérisé par un régime torrentiel (<http://hydro.rnde.tm.fr/>). Il draine des terrains houillers et traverse l'agglomération de Decazeville ; la station « Decazeville » est située à l'aval immédiat de cette zone urbaine. La station « Joanis » est localisée à quelques kilomètres, à l'aval de la confluence du Riou Mort avec le Riou Viou dont elle reçoit des concentrations élevées d'éléments-traces métalliques (cadmium et zinc). Le Riou Viou, peu anthropisé, prend sa source sur des terrains géologiques cristallins. La station « Moulin », située à l'amont de l'origine des rejets métalliques (*i.e.* de la station « Usine ») implantée sur l'ancien site métallurgique de Vieille Montagne, présente des concentrations en métaux dans la colonne d'eau relativement faibles.

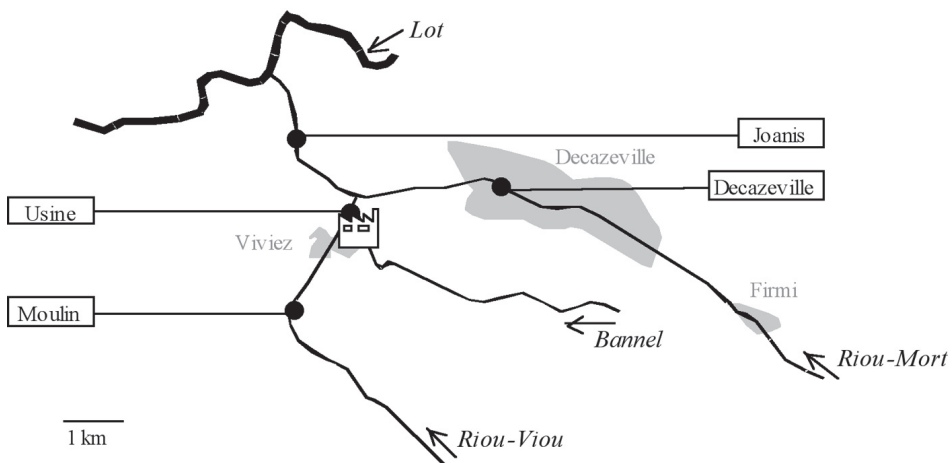


Fig. 1. Localisation des sites d'étude. Location of the study sites.

Caractérisation de l'ambiance physicochimique des stations

Les campagnes de prélèvements ont été réalisées à une fréquence de 24 jours pendant deux ans (2004-2005). Elles ont donné lieu à des mesures *in situ* de pH, de température, de conductivité électrique, de concentration et saturation en oxygène (WTW, Weilheim, Allemagne) et à des prélèvements d'échantillons d'eau destinés à l'analyse chimique en laboratoire. Les dosages de nutriments : azote (nitrates, nitrites, ammoniac, azote total), phosphore (orthophosphates, phosphore total) et de silice ont été réalisés suivant les normes NF EN ISO 13395, NF EN ISO 11732, NF EN 25663, NF T 90-023 et NF T 90-007, respectivement. Par ailleurs, les stations « Moulin », « Usine » et « Joanis », susceptibles de présenter des concentrations métalliques détectables, ont été instrumentalisées par l'équipe GEMA de l'Université Bordeaux 1. Des préleveurs automatiques ont été installés, et les concentrations métalliques dans les phases dissoute et particulaire, intégrées sur 24 jours, ont été analysées par spectrométrie de masse à plasma couplé (ICP-MS) suivant les méthodes décrites par Audry *et al.* (2004), avec des limites de détection de 0,01 µg/L et 0,04 mg/kg pour le cadmium, et de 0,41 µg/L et 0,91 mg/kg pour le zinc (Audry, 2003).

Prélèvements et analyses sur biofilms

Le périphyton a été échantillonné simultanément sur des substrats artificiels immergés à chaque station pendant les 24 jours, de manière à obtenir des biofilms matures (Barranguet *et al.*, 2005 ; Peterson & Stevenson, 1990). Des lames de verre (300 cm² par face) ont ainsi été insérées par six dans des caisses en plastique ajourées, équipées de flotteurs en polystyrène permettant de les maintenir dans la zone photique, et rattachées à la berge (Fig. 2). Un raclage minutieux des substrats à l'aide d'une lame de cutter, puis une mise en suspension du biofilm dans un volume standard d'eau minérale, permettent ensuite la séparation de la solution-mère en différents aliquotes destinés à la caractérisation quantitative de la biomasse et à l'étude plus spécifique des diatomées. L'analyse

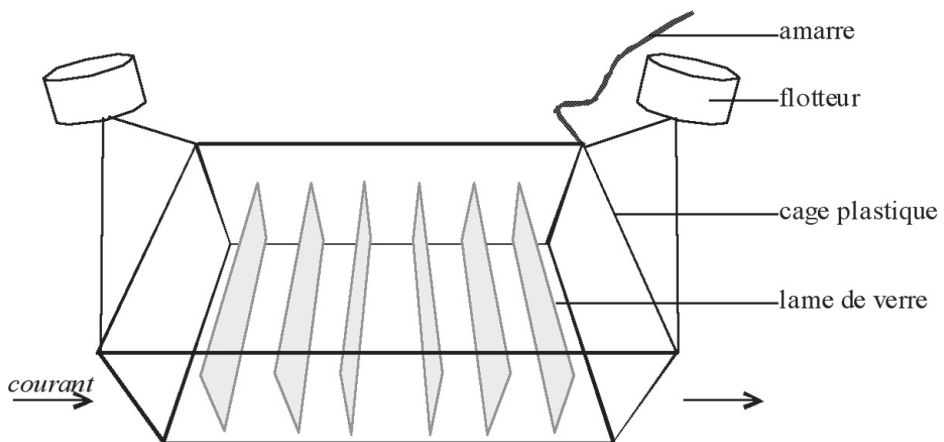


Fig. 2. Représentation schématique d'un dispositif utilisé pour la collecte du périphyton. Schematic representation of one rack of artificial substrates used for algal attachment.

quantitative du biofilm est réalisée conformément à la norme NF EN 872. Après filtration sur filtres en fibre de verre, chaque échantillon a été séché à 105 °C afin de déterminer le poids sec (PS) du biofilm. Les résidus sont ensuite passés au four à 500 °C pour calculer la fraction organique du biofilm, ou matière sèche sans cendre (MSSC). Les valeurs de PS et de MSSC ont ensuite été exprimées par unité de surface de substrat colonisé (mg/cm^2). L'identification en microscopie photonique des diatomées présentes, réalisée d'après l'examen de leur squelette siliceux après destruction de la matière organique des échantillons (NF EN 13946), permet le calcul d'un biovolume cellulaire moyen. Cet indicateur, déterminé à partir des abondances relatives des différentes espèces inventoriées et de leur biovolume individuel (Hillebrand *et al.*, 1999 ; Wetzel & Likens, 1991), peut alors être extrait par le programme Omnidia (Lecoite *et al.*, 1993) à chaque date d'échantillonnage et pour chaque site.

Traitement statistique des données

Les résultats obtenus pour chacun des paramètres quantitatifs ont été comparés par analyse de variance (ANOVA) à l'aide du logiciel Statistica (v5.1, StatSoft France, 1997), après vérification de la distribution normale des données et en fixant le risque α à 5 %.

L'importance relative de chacun des paramètres du milieu sur le développement quantitatif et qualitatif du biofilm a été estimée à l'aide de régressions Partial Least Square (PLS, Tenenhaus *et al.*, 1995). Cette méthode permet notamment de réaliser des régressions avec un grand nombre de variables explicatives, ici au nombre de 14, et de renseigner de façon synthétique sur les corrélations entre les différents descripteurs du biofilm étudiés (PS, MSSC, biovolume) et les variables environnementales. Les traitements statistiques ont été réalisés sous R (Ihaka & Gentleman, 1996) puis représentés graphiquement sous MS-Excel.

RÉSULTATS

Caractéristiques physicochimiques des cours d'eau (Tableau 1)

Sur la durée de l'étude, les eaux des quatre sites présentent des pH proches de la neutralité ($7,7 \pm 0,3$). Leurs températures suivent un cycle saisonnier, avec des valeurs minimales prises en mars ($3,9 \pm 2,0$ °C) et maximales atteintes en août ($21,6 \pm 1,4$ °C). Les températures mesurées sur le Riou Viou sont quasiment toujours inférieures de 2 °C à celles du Riou Mort. Les concentrations en oxygène dissous dans les eaux, fluctuant autour de $7,6 \pm 2,2$ mgO_2/L sur les deux années du suivi, assurent une oxygénation satisfaisante et favorable au développement algal, *i.e.* comprise entre 50 et 100 % d'oxygène dissous. Ajoutons que les apports en silice (concentrations comprises entre 4,5 et 14 mgSi/L , avec une moyenne bisannuelle de $7,8 \pm 2,3$ mgSi/L) sont largement suffisants au développement des diatomées (Paasche, 1980).

Les stations du Riou Viou sont caractérisées par des eaux de conductivité faible (240 ± 10 $\mu\text{S}/\text{cm}$ à « Moulin ») à relativement importante (980 ± 75 $\mu\text{S}/\text{cm}$ à « Usine », $p < 0,01$). Les valeurs mesurées sur le Riou Mort sont bien plus élevées

Tableau 1. Valeurs moyennes \pm erreurs standard des paramètres physicochimiques mesurés dans les eaux des 4 stations sur la durée de l'étude (n.m. : non mesuré). Aval statistiquement différent de l'amont : * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$.

Values (mean \pm standard error) corresponding to physical and chemical characteristics of stream water determined at the 4 sites during the experimental period (n.m.: not measured). Downstream values statistically different from upstream: * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$.

	<i>Riou Mort</i>		<i>Riou Viou</i>	
	« Decazeville »	« Joanis »	« Moulin »	« Usine »
PH	7,64 \pm 0,07	7,65 \pm 0,06	7,95 \pm 0,06	7,73 \pm 0,06
Oxygène dissous (mg/L)	5,72 \pm 0,49	7,72 \pm 0,37*	8,89 \pm 0,36	8,22 \pm 0,37
Conductivité électrique (μ S/cm)	1 590 \pm 245	1 220 \pm 90*	240 \pm 10	980 \pm 75**
Azote Kjeldahl (mgN/L)	3,3 \pm 0,6	3,4 \pm 0,4	0,6 \pm 0,2	1,2 \pm 0,1
Phosphore (mg/L)	0,34 \pm 0,05	0,7 \pm 0,11**	0,07 \pm 0,02	0,10 \pm 0,01**
Cadmium dissous (μ g/L)	n.m.	25,9 \pm 4,7	0,3 \pm 0,1	34,5 \pm 6,6**
Cadmium particulaire (mg/kg)	n.m.	639 \pm 97	31 \pm 4	393 \pm 56**
Zinc dissous (μ g/L)	n.m.	1 515 \pm 315	20 \pm 3	1 315 \pm 256**
Zinc particulaire (mg/kg)	n.m.	14 800 \pm 1 800	1 580 \pm 135	16 300 \pm 2 500**

(1 400 \pm 900 μ S/cm, $p < 0,01$), avec des pics pouvant atteindre 4500 μ S/cm (à Decazeville en octobre 2005).

Les formes biodisponibles de l'azote et du phosphore sont très peu présentes à « Moulin » et un peu plus importantes à « Usine », à l'aval de l'agglomération de Viviez. Ces concentrations sont très inférieures ($p < 0,01$) à celles mesurées dans les eaux des sites du Riou Mort : 3,4 \pm 2,2 mgN_{Kjeldahl}/L ; 0,56 \pm 0,44 mgP/L.

Les concentrations en cadmium et en zinc dans les phases dissoute et particulaire sont relativement faibles à « Moulin » (correspondant à une altération moyenne) et très au-delà des seuils de « très mauvaise qualité » selon les qualifications du SEQ-Eaux superficielles (Agences de l'Eau 1999) au niveau des stations « Usine » et « Joanis ». Les eaux du Riou Mort, en amont de sa confluence avec le Riou Viou, présentent un niveau de contamination métallique proche du fond géochimique de cette zone du Sud-Ouest du Massif Central (Andres, 1997) ; ainsi, l'équipe GEMA (Université Bordeaux 1) a mesuré des concentrations en cadmium dissous de l'ordre de 20 à 160 ngCd/L et de 2 à 9 μ gZn/L à Decazeville en 2003 (Schäfer, comm pers).

Biomasse périphtyque

La production de biomasse algale, estimée par le poids sec et la matière sèche sans cendre, prend des valeurs très variables sur la durée de l'étude. La Fig. 3 met en évidence que les poids secs déterminés sur le Riou Viou (0,16 \pm 0,02 mg/cm² à « Moulin » ; 0,99 \pm 0,12 mg/cm² à « Usine ») sont nettement inférieurs ($p < 0,01$) à ceux des stations du Riou Mort (2,05 \pm 0,18 mg/cm² à « Decazeville » ; 1,48 \pm 0,19 mg/cm² à « Joanis »). Les mêmes tendances sont observables dans les mesures de matière sèche sans cendre ($p < 0,05$) : la fraction organique des biofilms du Riou Mort représente des masses de 2 à 10 fois plus

importantes que celle du périphyton prélevé sur le Riou Viou ($0,72 \pm 0,10 \text{ mg/cm}^2$ à « Decazeville » et $0,54 \pm 0,09 \text{ mg/cm}^2$ à « Joanis », contre $0,03 \pm 0,00 \text{ mg/cm}^2$ à « Moulin » et $0,30 \pm 0,03 \text{ mg/cm}^2$ à « Usine »).

Les différences de PS et de MSSC entre les deux cours d'eau et leurs fluctuations intra-sites ne s'expliquant ni par les cycles saisonniers, ni par les variations de régime hydrologique, ni même par du broutage, très réduit en conditions de stress métallique (Morin, 2006 ; Niyogi *et al.*, 2002), les variations de ces estimateurs ont été analysées en fonction des paramètres environnementaux. La Fig. 4

présente les valeurs normalisées des coefficients de corrélation déterminés par PLS sur les descripteurs poids secs et matière sèche sans cendre. La régression réalisée sur les PS (coefficient de détermination $R^2 = 0,50$) met en évidence des contributions importantes du pH et de la concentration en nitrites dans les variations de la quantité de biomasse totale. Les principales variables explicatives de l'accumulation de matière organique ($R^2 = 0,37$), les corrélations négatives avec la température, puis avec la concentration en cadmium dissous, sont les plus élevées.

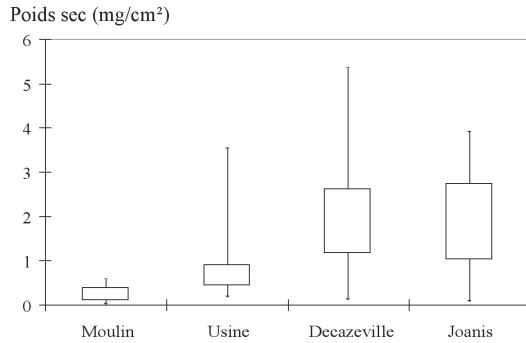


Fig. 3. Diagrammes de répartition des poids secs (mg/cm^2) des biofilms collectés sur la durée de l'étude. Les barres d'erreur déterminent l'étendue des données mesurées, la longueur du rectangle représente l'espace inter-quartile. *Distribution of dry weight (mg/cm^2) values of the biofilms of the different sites during the experiment. The error bars display the full range of variation and the central rectangle spans the interquartile range.*

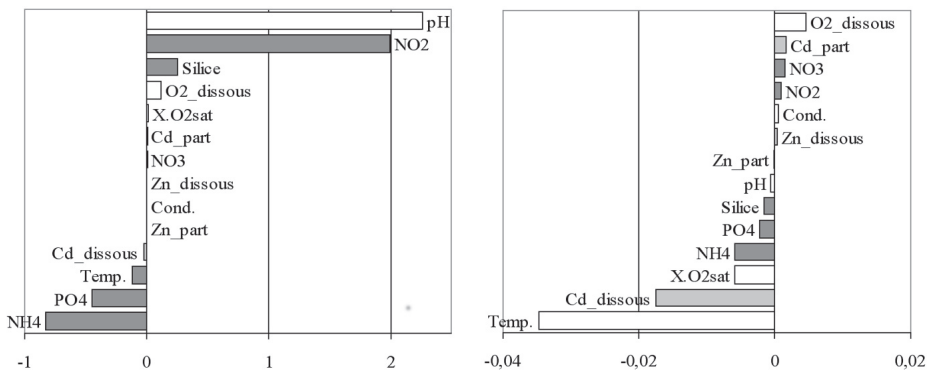


Fig. 4. Coefficients normés de régression PLS : PS (à gauche) et MSSC (à droite) en fonction des paramètres environnementaux (■ : paramètres liés à la disponibilité nutritive, ■ : paramètres liés à la contamination métallique, □ : autres paramètres environnementaux). *PLS regression coefficients of the descriptors DW (left) and AFDM (right) derived from the environmental parameters (■ : nutrient bioavailability, ■ : metal contamination, □ : other environmental parameters).*

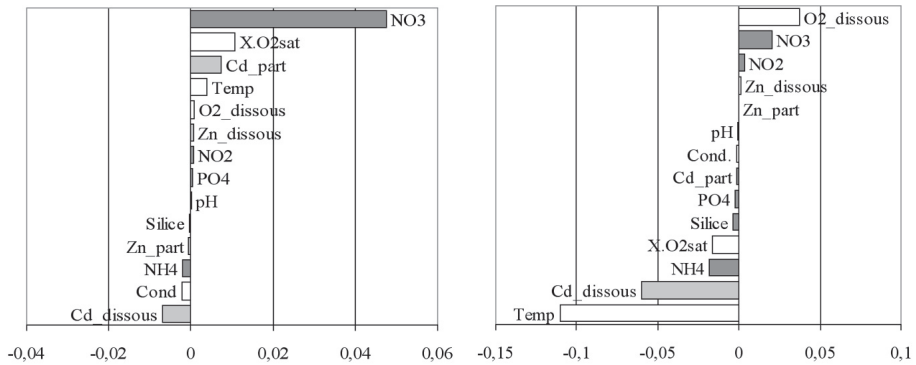


Fig. 5. Coefficients normés de régression PLS pour les échantillons provenant du Riou Mort : PS (à gauche) et MSSC (à droite) en fonction des paramètres environnementaux (■ : paramètres liés à la disponibilité nutritive, ■ : paramètres liés à la contamination métallique, □ : autres paramètres environnementaux). *PLS regression coefficients of the descriptors DW (left) and AFDM (right) of biofilms sampled from the Riou Mort river, derived from the environmental parameters (■ : nutrient bioavailability, ■ : metal contamination, □ : other environmental parameters).*

Des régressions PLS supplémentaires ont été réalisées sur les mêmes estimateurs en considérant uniquement les sites du Riou Mort (Fig. 5). Ces analyses soulignent une forte corrélation positive entre le poids sec du biofilm et la concentration en nitrates ($R^2 = 0,52$) ; la matière sèche sans cendre est en revanche réduite par une élévation de la température, ainsi que par l'augmentation de la concentration en cadmium dissous ($R^2 = 0,47$).

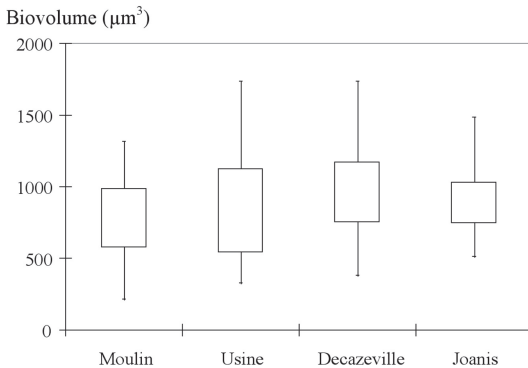


Fig. 6. Diagrammes de répartition des biovolumes cellulaires moyens (μm^3) des diatomées échantillonnées sur la durée de l'étude. Les barres d'erreur déterminent l'étendue des volumes calculés, la longueur du rectangle représente l'espace inter-quartile. *Distribution of mean biovolumes (μm^3) of the diatom cells identified during the experiment. The error bars display the full range of variation and the central rectangle spans the interquartile range.*

Biovolumes cellulaires des diatomées

La Fig. 6 indique, malgré des différences significatives entre les biovolumes cellulaires moyens des communautés du Riou Mort et du Riou Viou ($p = 0,026$), une dispersion importante des tailles : il existe une forte variabilité temporelle, avec des individus de plus petite taille à la saison chaude (jusqu'à $213 \mu\text{m}^3$ de volume cellulaire moyen à « Moulin » en juin 2006) et des formes plus grandes en hiver (environ $1700 \mu\text{m}^3$ à « Decazeville » et « Usine » en février/mars 2005).

Afin d'évaluer l'effet combiné des apports organiques et métalliques sur la taille

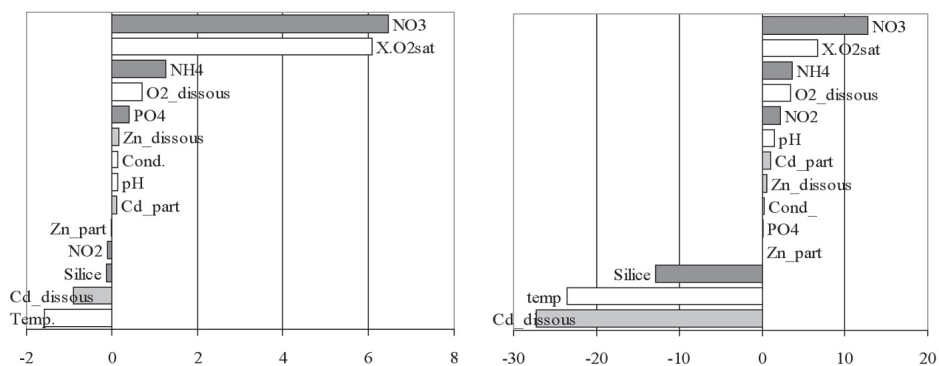


Fig. 7. Coefficients normés de régression PLS : biovolume cellulaire moyen calculé pour « Joanis » (à gauche) et pour « Usine » (à droite) en fonction des paramètres environnementaux (■ : paramètres liés à la disponibilité nutritive, ■ : paramètres liés à la contamination métallique, □ : autres paramètres environnementaux). *PLS regression coefficients of mean diatom cell biovolumes calculated for the sites "Joaanis" (left) and "Usine" (right), derived from the environmental parameters (■ : nutrient bioavailability, ■ : metal contamination, □ : other environmental parameters).*

moyenne des diatomées, des régressions PLS ont été réalisées pour chacun des sites localisés à l'aval de la contamination métallique (Fig. 7), de façon à déterminer les importances relatives des différents paramètres environnementaux sur les variations de biovolume. Au site « Joanis », les facteurs principaux conditionnant l'établissement de grandes formes sont la concentration en nitrates et la saturation en oxygène des eaux ($R^2 = 0,45$). En revanche, à « Usine », les corrélations les plus significatives sont négatives, et liées à la concentration en cadmium dissous, suivies par la température et, dans une moindre mesure, à la concentration en silice ($R^2 = 0,80$).

DISCUSSION

Gradients de contamination organique et métallique

Les deux cours d'eau présentent des différences manifestes de physicochimie en termes de conductivité électrique et de disponibilité en nutriments. Les valeurs considérables de conductivité mesurées sur le Rieu Mort sont attribuables à l'origine géologique du cours d'eau (le cours d'eau prend sa source sur des terrains permien et draine des sols sédimentaires du Carbonifère), mais plus vraisemblablement à la localisation des sites à l'aval de l'agglomération de Decazeville. En effet, quelques centaines de mètres en amont de la station « Decazeville » se trouve une laverie, suspectée de jouer un rôle dans le relargage de solutions fortement minéralisées dans le cours d'eau ; les fluctuations des valeurs de conductivité peuvent également être attribuées aux activités (par exemple, ajustements de pH) de la station d'épuration des eaux de la zone urbaine (Audry *et al.*, 2005), localisée à l'amont de la station « Joanis ».

La disponibilité nutritive discrimine également les deux cours d'eau. Elle traduit une anthropisation faible du Riou Viou, alors que les stations du Riou Mort, situées à l'aval de l'agglomération de Decazeville, reçoivent une pollution organique relativement élevée. Entre « Decazeville » et « Joanis », la dilution par les apports du Riou Viou ne suffit pas à compenser ce niveau de contamination, auquel s'ajoutent les rejets de la station d'épuration (Audry *et al.*, 2005).

Les concentrations en cadmium et en zinc mesurées dans les phases dissoute et particulaire mettent en évidence un gradient amont – aval de contamination polymétallique sur les deux cours d'eau. Les concentrations en cadmium (notamment) mesurées à « Joanis » et à « Usine » sont ainsi très largement supérieures aux niveaux acceptables dans les cours d'eau européens (Ministère de l'Écologie et du Développement Durable – Direction de l'Eau, 2005) et aux concentrations sans effet (NOEC) déterminées pour des organismes aquatiques modèles (voir INERIS, 2005). Notons que les concentrations en cadmium mesurées dans la phase particulaire des eaux du Riou Mort à « Joanis », à l'aval de sa confluence avec le Riou Viou, sont nettement plus élevées qu'à « Usine ». En effet, des apports sporadiques de métal provenant de sources additionnelles (résurgence d'eaux souterraines contaminées, apports d'un ruisseau drainant des terrains houillers à l'amont immédiat de la station) causent une élévation importante du niveau de contamination métallique à « Joanis » (Coynel *et al.*, 2007).

Établissement du biofilm en conditions de contamination métallique

La production de biomasse est très variable selon l'âge des biofilms (Barranguet *et al.*, 2005 ; Sekar *et al.*, 2002), elle dépend également de la disponibilité nutritive du milieu (Burns & Ryder, 2001 ; Ivorra *et al.*, 2002). Les différences marquées dans les concentrations en nutriments des deux cours d'eau étudiés se traduisent par des développements périphytiques très contrastés : des biofilms peu volumineux sur le Riou Viou et des biofilms très épais et denses sur le Riou Mort. Les régressions PLS (Figs 4-5) soulignent l'importance du facteur azote (concentrations en nitrites, en nitrates) dans la mise en place d'un biofilm important en termes de poids sec. Le niveau de contamination métallique n'est ici qu'un facteur d'importance très secondaire. Cependant le PS du biofilm est susceptible de varier fortement au gré d'accumulations de matières en suspension inorganiques (voir par exemple pour le site « Joanis » : Morin *et al.*, 2008), les valeurs de biomasse peuvent également être sur-estimées dans le cas d'une mortalité accrue des cellules constitutives du biofilm. En revanche, si l'on considère plus spécifiquement la fraction organique du biofilm (*i.e.* la MSSC), les corrélations les plus élevées sont observées avec la température et les concentrations en cadmium dissous. En effet, la production de biomasse périphytique est dépendante de la température ambiante et stagne, voire diminue, lorsque des valeurs trop élevées sont atteintes (DeNicola, 1996). La capacité de croissance des diatomées, elle, est maximale pour une température optimale généralement inférieure à 20 °C, et décroît rapidement au-delà (Patrick, 1977). De plus, les températures les plus élevées sont corrélées avec des concentrations en métaux dissous importantes (Morin *et al.*, 2008) ; les altérations de la production de biomasse correspondent donc vraisemblablement à une combinaison des effets négatifs de ces deux facteurs. En effet, l'exposition des organismes périphytiques défavorise également leur croissance (Guanzon *et al.*, 1994 ; Payne & Price, 1999) d'une part, et modifie d'autre part la structure elle-même du biofilm. Ainsi, les

couches superficielles du biofilm sont préférentiellement constituées de cellules mortes (Teitzel & Parsek, 2003) qui forment une couche protectrice pour les organismes plus proches du substrat.

La disponibilité nutritive réduite sur le Riou Viou semble limiter la croissance en épaisseur du biofilm, alors que les concentrations en nutriments élevées mesurées le long du Riou Mort favoriseraient un développement en trois dimensions de la matrice organique (e.g. Stevenson *et al.*, 1991). Les études de Ivorra *et al.* (2000) ont montré qu'il existe une relation inverse entre sensibilité du périphyton aux métaux et augmentation de biomasse. En effet, des gradients de diffusion physiques, chimiques et physiologiques s'établissent depuis la surface vers les couches internes des biofilms épais et denses (Dodds *et al.*, 1999 ; Teissier & Torre, 2002). Ces gradients peuvent ainsi limiter la pénétration des métaux vers l'intérieur de la matrice (Decho, 2000 ; Lawrence *et al.*, 2004 ; Teitzel & Parsek, 2003) et par conséquent réduire l'exposition des cellules plus proches du substrat. Les facteurs de concentration du métal (Foster, 1976) calculés pour les biofilms des sites contaminés (*i.e.* le rapport entre concentration dans le biofilm et concentration dans l'eau, données non présentées) confirment en partie cette hypothèse, la capacité d'accumulation métallique des biofilms épais de la station « Joanis » n'étant pas statistiquement différente de celle mesurée pour des biomasses plus faibles, à « Usine » (Cd : $p = 0,41$; Zn : $p = 0,75$).

D'autres facteurs non évalués dans cette étude peuvent également expliquer les différences observées entre « Joanis » et « Usine ». Ainsi, Revsbech *et al.* (1988) ou Teissier & Torre (2002) ont décrit des gradients de pH et d'oxygène disponible, susceptibles de modifier les conditions locales d'oxydoréduction et d'entraîner le passage du métal sous forme moins toxique et/ou de réduire la perméabilité membranaire (Vigneault & Campbell, 2005). D'autres auteurs (Hudson, 2005 ; Vigneault *et al.*, 2000) évoquent également une réduction de la biodisponibilité du métal par la matière organique. De plus, les composés polymériques excrétés par les cellules (Extracellular Polymeric Substances, EPS) leur permettent de subvenir en partie à leurs besoins trophiques (Decho, 2000) dans une matrice épaisse où le recyclage des gaz et des nutriments est limité, ces substances mucilagineuses adsorbant, fixant et concentrant les molécules organiques et les ions à proximité des cellules. Ces EPS possèdent également des propriétés de chélation des éléments traces métalliques permettant leur piégeage dans le milieu extracellulaire (Decho, 2000 ; Pistocchi *et al.*, 1997). Muller *et al.* (2005) ont par ailleurs mis en évidence des interactions entre les communautés algales et bactériennes, certaines espèces produisant dans le milieu des ligands susceptibles de complexer les métaux et de réduire ainsi leur biodisponibilité. Il est également probable que d'autres facteurs non estimés dans cette étude, non liés à la structure du biofilm elle-même, interviennent dans la réduction de la toxicité observée : induction de tolérances (notamment à « Joanis », pour les espèces provenant du pool amont de « Usine »), présence de nutriments inorganiques...

Des architectures de biofilm différentes selon la disponibilité nutritive

Les variations saisonnières observées pour l'indicateur biovolume cellulaire moyen soulignent l'importance des cycles annuels dans les successions d'espèces. En hiver, où les températures des eaux sont faibles, les espèces dominantes sont sténoèces des eaux froides ; les plus représentées (*Navicula gregaria* Donkin, *N. lanceolata* (Agardh) Ehrenberg) sont des taxons plutôt

communs, dont le biovolume est relativement important (respectivement 485 et 1 227 $\mu\text{m}^3/\text{cellule}$). Les taxons dominants plus typiques de saison chaude diffèrent selon les cours d'eau et les sites, et sont de taille moyenne plus petite.

Par ailleurs, la différence de biovolume cellulaire moyen entre « Usine » et « Joanis » traduit des modifications de la composition spécifique des communautés de diatomées liées à des stratégies de colonisation en conditions de stress métallique variables selon la ressource nutritive. À « Usine », où la disponibilité en nutriments est limitée, les cellules de petite taille (*Eolimna minima* (Grunow) Lange-Bertalot : 88 $\mu\text{m}^3/\text{cellule}$, *Achnantheidium minutissimum* (Kützing) Czarnecki : 76 $\mu\text{m}^3/\text{cellule}$) dominent, ce qui traduit une proportion importante de cellules fortement rattachées au substrat. Ces petites espèces, généralement colonisatrices primaires, immigrent rapidement et, de plus, leur cycle de reproduction est court (Sekar *et al.*, 2004 ; Stevenson & Peterson, 1989), ce qui permet une installation rapide de communautés adhérentes au substrat et peu développées en épaisseur. Ainsi, l'on observe une production de biomasse périphytique moindre à « Usine » qu'à « Joanis », le biofilm fin et relativement dense étant principalement composé de ces espèces de petite taille. À « Joanis », le biovolume augmente significativement avec des concentrations en nitrates élevées : les colonisateurs plus tardifs, généralement de plus grande taille, immigrent lentement mais sont en revanche de bons compétiteurs pour les nutriments biodisponibles (Burkholder *et al.*, 1990 ; Sommer, 1981). La présence accrue de ces espèces de grande taille (telles que *Pinnularia parvulissima* Krammer : 2 654 $\mu\text{m}^3/\text{cellule}$) ou pédonculées (comme *Gomphonema parvulum* (Kützing) Kützing : 326 $\mu\text{m}^3/\text{cellule}$) sur le Riou Mort favorise le développement du biofilm en épaisseur, et par la suite la fixation de nouveaux individus et/ou le piégeage de formes libres (comme *Cyclotella meneghiniana* Kützing : 1 244 $\mu\text{m}^3/\text{cellule}$) en plus grande quantité.

Khoshmanesh *et al.* (1997) ont mis en évidence une relation directe entre la quantité de cadmium prélevée par les individus et la surface cellulaire en contact avec le milieu, laissant supposer une sensibilité moindre des cellules de petite taille, susceptibles d'accumuler moins de métal. La réduction de la taille moyenne des diatomées entre amont et aval de contamination métallique, liée à une dominance des petites espèces, a été proposée comme indicateur présumé de ce type de pollution (Cattaneo *et al.*, 2004 ; Medley & Clements, 1998 ; Morin *et al.*, 2007). De même, des différences de taille moyenne (mesurée) ont été observées pour certains taxons entre sites contaminés par les métaux ou non (Cattaneo *et al.*, 1998 ; Cattaneo *et al.*, 2004 ; Morin & Coste, 2006). Cependant, notre étude met ici en évidence que la réduction de taille des cellules en conditions de stress métallique peut être modulée par une disponibilité nutritive élevée. L'utilisation du biovolume cellulaire moyen peut donc se révéler efficace pour la diagnose de pollutions métalliques, cependant l'interprétation des résultats obtenus pour ce descripteur devra prendre en compte le contexte de contamination organique.

Bien que les différences entre sites soient trop importantes pour pouvoir les considérer comme des « unités expérimentales », cette étude réalisée sur des descripteurs quantitatifs et qualitatifs du biofilm révèle une tendance à l'atténuation des effets délétères des métaux sur ces paramètres liée à une disponibilité nutritive importante. Les communautés périphytiques, dont le développement est favorisé par des concentrations en nutriments élevées, se composent alors d'espèces tolérantes aux métaux et d'espèces très compétitrices pour la ressource nutritive. Le rôle des interactions entre communautés algales et bactériennes en conditions de stress métallique est mal connu, cependant ces

résultats semblent confirmer l'existence de phénomènes de compétition entre espèces pour la matière organique, mais également de facilitation, notamment par la production d'exopolysaccharides par les micro-organismes, permettant d'assurer un environnement moins défavorable aux cellules enchâssées dans cette matrice organique. Ces interactions métal/nutriments sont à prendre en considération pour un diagnostic plus efficace des pollutions en cours d'eau : les méthodes de bio-indication actuelles permettent une évaluation satisfaisante du degré de contamination organique, mais peuvent conduire à des interprétations erronées dans le cadre de pollutions combinées. Il s'agit ainsi de développer des indicateurs spécifiques du niveau de contamination métallique, qui permettront d'affiner le diagnostic de l'état écologique des cours d'eau à partir des biofilms. Cette étude de terrain préliminaire, dont les résultats sont parfois difficilement exploitables en raison de la multiplicité des facteurs confondants malgré le nombre d'échantillons utilisés, fournit des pistes pour une meilleure évaluation des effets combinés des pollutions organiques et toxiques. Des études ultérieures séparant les différents facteurs concernés sont à envisager, soit en sélectionnant des stations plus homogènes de façon à éliminer au maximum les interférences entre facteurs, soit en séparant et en testant les différents paramètres indépendamment et en combinaison en conditions contrôlées.

RÉFÉRENCES

- AGENCES DE L'EAU, 1999 — *Système d'évaluation de la qualité de l'eau des cours d'eau, rapport de présentation SEQ-Eau (version 1)*. Les études de l'Agence de l'Eau n° 64, 59 p.
- ANDRES S., 1997 — *Étude écotoxicologique des transferts de cadmium et zinc entre la colonne d'eau et les sédiments du Lot (France) et les organismes aquatiques – Approches in situ et expérimentale*. PhD thesis, Toulouse, Univ. Paul Sabatier, 135 p.
- AUDRY S., 2003 — *Bilan géochimique du transport des éléments traces métalliques dans le système fluvial anthropisé Lot-Garonne-Gironde*. PhD thesis, Bordeaux, Univ. Bordeaux 1, 343 p.
- AUDRY S., SCHÄFER J., BLANC G., BOSSY C. & LAVAUX G., 2004 — Anthropogenic components of heavy metal (Cd, Zn, Cu, Pb) budgets in the Lot-Garonne fluvial system (France). *Applied geochemistry* 19(5) : 769-786.
- AUDRY S., BLANC G. & SCHÄFER J., 2005 — The impact of sulphide oxidation on dissolved metal (Cd, Zn, Cu, Cr, Co, Ni, U) inputs into the Lot-Garonne fluvial system (France). *Applied geochemistry* 20(5) : 919-931.
- BARRANGUET C., CHARANTONI E., PLANS M. & ADMIRAAL W., 2000 — Short-term response of monospecific and natural algal biofilms to copper exposure. *European journal of phycology* 35(4) : 397-406.
- BARRANGUET C., PLANS M., VAN DER GRINTEN E., SINKE J.J. & ADMIRAAL W., 2002 — Development of photosynthetic biofilms affected by dissolved and sorbed copper in a eutrophic river. *Environmental toxicology and chemistry* 21(9) : 1955-1965.
- BARRANGUET C., VEUGER B., VAN BEUSEKOM S.A.M., MARVAN P., SINKE J.J. & ADMIRAAL W., 2005 — Divergent composition of algal-bacterial biofilms developing under various external factors. *European journal of phycology* 40(1) : 1-8.
- BAUER W.D. & ROBINSON J.B., 2002 — Disruption of bacterial quorum sensing by other organisms. *Current opinion in biotechnology* 13(3) : 234-237.
- 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 : 9-18.
- BIGGS B.J.F., 1996 — Patterns in benthic algae of streams. In: Stevenson R.J., Bothwell M.L., Lowe R.L. (eds), *Algal Ecology: Freshwater Benthic Ecosystems*. San Diego, CA, Academic Press, pp. 31-51.
- BURKHOLDER J.M., WETZEL R.G. & KLOMPARENS K.L., 1990 — Direct comparison of phosphate uptake by adnate and loosely attached microalgae within an intact biofilm matrix. *Applied and environmental microbiology* 56(9) : 2882-2890.
- BURNS A. & RYDER D.S., 2001 — Potential for biofilms as biological indicators in Australian riverine systems. *Ecological management and restoration* 2(1) : 53-64.

- CATTANEO A., ASIOLI A., COMOLI P. & MANCA M., 1998 — Organisms' response in a chronically polluted lake supports hypothesized link between stress and size. *limnology and oceanography* 43(8) : 1938-1943.
- CATTANEO A., COUILLARD Y., WUNSAM S. & COURCELLES M., 2004 — Diatom taxonomic and morphological changes as indicators of metal pollution and recovery in Lac Dufault (Québec, Canada). *Journal of paleolimnology* 32 : 163-175.
- CEMAGREF, 1982 — *Étude des méthodes biologiques d'appréciation quantitative de la qualité des eaux*. Rapport Q.E. Lyon A.F. — Bassin Rhône-Méditerranée-Corse, 218 p.
- CHANG S.I. & REINFELDER J.R., 2000 — Bioaccumulation, subcellular distribution and trophic transfer of copper in a coastal marine diatom. *Environmental science and technology* 34(23) : 4931-4935.
- COYNEL A., SCHAFFER J., DABRIN A., GIRARDOT N. & BLANC G., 2007 — Groundwater contributions to metal transport in a small river affected by mining and smelting waste. *Water research* 41 : 3420-3428.
- DECHO A.W., 2000 — Microbial biofilms in intertidal systems: an overview. *Continental shelf research* 20(10-11) : 1257-1273.
- DENICOLA D.M., 1996 — Periphyton responses to temperature at different ecological levels. In: Stevenson R.J., Bothwell M.L., Lowe R.L. (eds), *Algal Ecology: Freshwater Benthic Ecosystems*. San Diego, CA, Academic Press, pp. 149-181.
- DODDS W.K., BIGGS B.J.F. & LOWE R.L., 1999 — Photosynthesis-irradiance patterns in benthic microalgae variations as a function of assemblage thickness and community structure. *Journal of phycology* 35(1) : 42-53.
- DUNNE W.J., 2002 — Bacterial adhesion: Seen any good biofilms lately? *Clinical Microbiology reviews* 15(2) : 155-166.
- EULIN A. & LE COHU R., 1998 — Epilithic diatom communities during the colonization of artificial substrates in the River Garonne (France). Comparison with the natural communities. *Archiv für Hydrobiologie* 143(1) : 79-106.
- FOSTER P., 1976 — Concentrations and concentration factors of heavy metals in brown algae. *Environmental pollution* 10 : 45-53.
- FUCHS S., HARITOPULOU T. & WILHELMI M., 1996 — Biofilms in freshwater ecosystems and their use as a pollutant monitor. *Water science and technology* 34(7-8) : 137-140.
- GOTO N., MITAMURA O. & TERAI H., 2001 — Biodegradation of photosynthetically produced extracellular organic carbon from intertidal benthic algae. *Journal of experimental marine biology and ecology* 257(1) : 73-86.
- GUANZON N.G., NAKAHARA H. & YOSHIDA Y., 1994 — Inhibitory effects of heavy-metals on growth and photosynthesis of 3 freshwater microalgae. *Fisheries science* 60(4) : 379-384.
- GUASCH H., ADMIRAAL W. & SABATER S., 2003 — Contrasting effects of organic and inorganic toxicants on freshwater periphyton. *Aquatic toxicology* 64(2) : 165-175.
- GUASCH H., NAVARRO E., SERRA A. & SABATER S., 2004 — Phosphate limitation influences the sensitivity to copper in periphytic algae. *Freshwater biology* 49 : 463-473.
- HELLIO C., DE LA BROISE D., DUFOSSÉ L., LE GAL Y. & BOURGOUGNON N., 2001 — Inhibition of marine bacteria by extracts of macroalgae: potential use for environmentally friendly antifouling paints. *Marine environmental research* 52(3) : 231-247.
- HILL B.H., WILLINGHAM W.T., PARRISH L.P. & MCFARLAND B.H., 2000 — Periphyton community responses to elevated metal concentrations in a Rocky Mountain stream. *Hydrobiologia* 428(1-3) : 161-169.
- HILLEBRAND H., DÜRSELEN C.D., KIRSCHTEL D., POLLINGHER U. & ZOHARY T., 1999 — Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. *Journal of phycology* 35(2) : 403-424.
- HUDSON R.J.M., 2005 — Trace metal uptake, natural organic matter, and the free-ion model. *Journal of phycology* 41 : 1-4.
- IHAKA R. & GENTLEMAN R., 1996 — R: A language for data analysis and graphics. *Journal of computational and graphical statistics* 52 : 99-314.
- INERIS, 2005 — *Cadmium et ses dérivés*. Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques, 60 p.
- IVORRA N., BREMER S., GUASCH H., KRAAK M.H.S. & ADMIRAAL W., 2000 — Differences in the sensitivity of benthic microalgae to Zn and Cd regarding biofilm development and exposure history. *Environmental toxicology and chemistry* 19 : 1332-1339.
- IVORRA N., HETTELÄAR J., KRAAK M.H.S., SABATER S. & ADMIRAAL W., 2002 — Responses of biofilms to combined nutrient and metal exposure. *Environmental toxicology and chemistry* 21(3) : 626-632.
- KHOSHMANESH A., LAWSON F. & PRINCE I.G., 1997 — Cell surface area as a major parameter in the uptake of cadmium by unicellular green microalgae. *Chemical engineering journal* 65(1) : 13-19.

- LAWRENCE J.R., CHENIER M.R., ROY R., BEAUMIER D., FORTIN N., SWERHON G.D.W., NEU T.R. & GREER C.W., 2004 — Microscale and molecular assessment of impacts of nickel, nutrients, and oxygen level on structure and function of river biofilm communities. *Applied and environmental microbiology* 70(7) : 4326-4339.
- LECOINTE C., COSTE M. & PRYGIEL J., 1993 — Omnidia – Software for taxonomy, calculation of diatom indices and inventories management. *Hydrobiologia* 269/270 : 509-513.
- LENOIR A. & COSTE M., 1996 — Development of a practical diatom index of overall water quality applicable to the French national water Board network. In: Whitton B.A., Rott E. (eds), *Use of Algae for monitoring rivers II*. Innsbruck (Austria), Studia Student. GmbH, pp. 29-43.
- LOWE R.L. & PAN Y., 1996 — Benthic algal communities as biological monitors. In: Stevenson R.J., Bothwell M.L., Lowe R.L. (eds), *Algal Ecology: Freshwater Benthic Ecosystems*. San Diego, CA, Academic Press, pp. 705-739.
- LOZANO R.B. & PRATT J.R., 1994 — Interaction of toxicants and communities – the role of nutrients. *Environmental toxicology and chemistry* 13(3) : 361-368.
- MEDLEY C.N. & CLEMENTS W.H., 1998 — Responses of diatom communities to heavy metals in streams: The influence of longitudinal variation. *Ecological applications* 8(3) : 631-644.
- MINISTÈRE DE L'ÉCOLOGIE ET DU DÉVELOPPEMENT DURABLE – DIRECTION DE L'EAU, 2005 — Circulaire DCE 2005/12 relative à la définition du « bon état » et à la constitution des référentiels pour les eaux douces de surface (cours d'eau, plans d'eau), en application de la directive européenne 2000/60/DCE du 23 octobre 2000, ainsi qu'à la démarche à adopter pendant la phase transitoire (2005-2007). DE / MAGE / BEMA 05 / n° 14, 17 p.
- MORIARTY D.J.W., 1997 — The role of microorganisms in aquaculture ponds. *Aquaculture* 151(1-4) : 333-349.
- MORIN S., 2006 — *Bio-indication des effets des pollutions métalliques sur les communautés de diatomées benthiques. Approches in situ et expérimentales*. PhD thesis, Bordeaux, Univ. Bordeaux 1, 301 p.
- MORIN S. & COSTE M., 2006 — Metal-induced shifts in the morphology of diatoms from the Riou Mort and Riou Viou streams (South West France). In: Ács É., Kiss K.T., Padišák J., Szabó K. (eds), *Use of algae for monitoring rivers VI*. Göd (Hungary), Hungarian Algological Society, pp. 91-106
- MORIN S., VIVAS-NOGUES M., DUONG T.T., BOUDOU A., COSTE M. & DELMAS F., 2007 — Dynamics of benthic diatom colonization in a cadmium/zinc-polluted river (Riou-Mort, France). *Fundamental and applied limnology* 168(2) : 179-187.
- MORIN S., DUONG T.T., DABRIN A., COYNEL A., HERLORY O., BAUDRIMONT M., DELMAS F., DURRIEU G., SCHÄFER J., WINTERTON P., BLANC G., BOUDOU A. & COSTE M., 2008 — Long term survey of heavy metal pollution, biofilm contamination and diatom community structure in the Riou-Mort watershed, South West France. *Environmental pollution* 151(3) : 532-542.
- MULLER F.L.L., LARSEN A., STEDMON C.A. & SONDERGAARD M., 2005 — Interactions between algal-bacterial populations and trace metals in fjord surface waters during a nutrient-stimulated summer bloom. *Limnology and oceanography* 50(6) : 1855-1871.
- NIYOGI D.K., LEWIS W.M. & MCKNIGHT D.M., 2002 — Effects of stress from mine drainage on diversity, biomass, and function of primary producers in mountain streams. *Ecosystems* 5(6) : 554-567.
- PAASCHE E., 1980 — Silicon. In: Morris I. (ed.), *The Physiological Ecology of Phytoplankton*. Oxford, Blackwell, pp. 259-284.
- PATRICK R., 1977 — Ecology of freshwater diatoms and diatom communities. In: Werner D. (ed.), *The Biology of Diatoms. Bot Monogr 13*. Oxford, Blackwell Publishing, pp. 284-332.
- PAYNE C.D. & PRICE N.M., 1999 — Effects of cadmium toxicity on growth and elemental composition of marine phytoplankton. *Journal of phycology* 35(2) : 293-302.
- PETERSON C.G. & STEVENSON R.J., 1990 — Post-spate development of epilithic algal communities in different current environments. *Canadian journal of botany* 68 : 2092-2105.
- PETERSON C.G., 1996 — Mechanisms of lotic microalgal colonization following space-clearing disturbances acting at different spatial scales. *Oikos* 77(3) : 417-435.
- PISTOCCHI R., GUERRINI F., BALBONI V. & BONI L., 1997 — Copper toxicity and carbohydrate production in the microalgae *Cylindrotheca fusiformis* and *Gymnodinium* sp. *European journal of phycology* 32(2) : 125-132.
- REVSBECH N.P., NIELSEN L.P., CHRISTENSEN P.B. & SØRENSEN J., 1988 — Combined oxygen and nitrous oxide microsensors for denitrification studies. *Applied and environmental microbiology* 54(9) : 2245-2249.
- ROMANI A.M. & SABATER S., 1999 — Effect of primary producers on the heterotrophic metabolism of a stream biofilm. *Freshwater biology* 41(4) : 729-736.

- SABATER S., GUASCH H., RICART M., ROMANÍ A., VIDAL G., KLÜNDER C. & SCHMITT-JANSEN M., 2007 — Monitoring the effect of chemicals on biological communities. The biofilm as an interface. *Analytical and bioanalytical chemistry* 387(4) : 1425-1434.
- SABATER S., GUASCH H., ROMANÍ A. & MUÑOZ I., 2002 — The effect of biological factors on the efficiency of river biofilms in improving water quality. *Hydrobiologia* 469(1) : 149-156.
- SEKAR R., NAIR K.V.K., RAO V.N.R. & VENUGOPALAN V.P., 2002 — Nutrient dynamics and successional changes in a lentic freshwater biofilm. *Freshwater biology* 47(10) : 1893-1907.
- SEKAR R., VENUGOPALAN V.P., NANDAKUMAR K., NAIR K.V.K. & RAO V.N.R., 2004 — Early stages of biofilm succession in a lentic freshwater environment. *Hydrobiologia* 512(1) : 97-108.
- SOMMER U., 1981 — The role of r- and K-selection in the succession of phytoplankton in Lake Constance. *Acta oecologica. Oecologia generalis* 2(4) : 327-342.
- STEVENSON R.J. & PETERSON C.G., 1989 — Variation in benthic diatom (Bacillariophyceae) immigration with habitat characteristics and cell morphology. *Journal of phycology* 25(1) : 120-129.
- STEVENSON R.J., PETERSON C.G., KIRSCHTEL D.B., KING C.C. & TUCHMAN N.C., 1991 — Density-dependent growth, ecological strategies and effects of nutrients and shading on benthic diatom succession in streams. *Journal of phycology* 27(1) : 59-69.
- STEVENSON R.J., 1996 — An introduction to algal ecology in freshwater benthic habitats. In: Stevenson R.J., Bothwell M.L., Lowe R.L. (eds), *Algal Ecology: Freshwater Benthic Ecosystems*. San Diego, CA, Academic Press, pp. 3-30.
- STEWART P.S. & COSTERTON J.W., 2001 — Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 358(9276) : 135-138.
- TEISSIER S. & TORRE M., 2002 — Simultaneous assessment of nitrification and denitrification on freshwater epilithic biofilms by acetylene block method. *Water research* 36(15) : 3803-3811.
- TEITZEL G.M. & PARSEK M.R., 2003 — Heavy metal resistance of biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and environmental microbiology* 69(4) : 2313-2320.
- TENENHAUS M., GAUCHI J.P. & MENARDO C., 1995 — Régression PLS et applications. *Revue de statistique appliquée* 43(1) : 7-63.
- VIGNEAULT B., PERCOT A., LAFLEUR M. & CAMPBELL P.G.C., 2000 — Permeability changes in model and phytoplankton membranes in the presence of aquatic humic substances. *Environmental Science and Technology* 34(18) : 3907-3913.
- VIGNEAULT B. & CAMPBELL P.G.C., 2005 — Uptake of cadmium by freshwater green algae: Effects of pH and aquatic humic substances. *Journal of phycology* 41(1) : 55-61.
- WATANABE T., CAPBLANCO 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 - International journal of limnology* 24(2) : 111-125.
- WETZEL R.G. & LIKENS G.E., 1991 — *Limnological Analyses*, 2nd ed., New York, Springer Verlag.