

# SOMMAIRE

<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>I</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>V</b>
<b>GLOSSAIRE .....</b>	<b>VI</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS.....</b>	<b>VII</b>
<b>CADRE SCIENTIFIQUE ET OBJECTIFS.....</b>	<b>1</b>
I. Cadre scientifique et son application.....	3
II. Objectifs.....	5
<b>CHAPITRE I : INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>9</b>
I. Notions de bioindication.....	11
1. Définition de la bioindication.....	11
2. Bref historique de la bioindication.....	11
3. La bioindication dans la Directive Cadre sur l'Eau 2000/60/CE .....	13
II. La bioindication par les diatomées .....	15
1. Classification et diversité des diatomées .....	15
2. Biologie des diatomées .....	17
3. Ecologie des diatomées .....	17
4. L'utilisation des diatomées comme bioindicateur.....	20
a. <i>Echantillonnage, préparation des lames et détermination des diatomées .....</i>	<i>20</i>
b. <i>Les indices utilisés en France : IBD et IPS.....</i>	<i>22</i>
5. Limites des indices basés sur les diatomées.....	23
III. L'assèchement, les stress associés et les microalgues benthiques.....	25
1. Résumé de la synthèse bibliographique .....	25
2. Article I, en préparation. ....	28
<i>"Desiccation, Associated Stresses and Benthic Microalgae: a Review" .....</i>	<i>28</i>
<b>CHAPITRE II : IMPACT DE L'ASSECHEMENT DE BIOFILMS PHOTOTROPHES SUR LES COMMUNAUTES MICROBIENNES A L'ECHELLE DE MICROCOSME ET DE MESOCOSME - CAPACITE DE RECROISSANCE ET RESILIENCE ECOLOGIQUE .....</b>	<b>61</b>

---

I. Présentation de l'étude et synthèse des principaux résultats. ....	63
II. Article II, paru dans la revue <i>Microbial Ecology</i> (DOI 10.1007/s00248-014-0532-0).....	69
"Resilience of Aggregated Microbial Communities Subjected to Drought – Small-Scale Studies".....	69
<b>CHAPITRE III : IMPACT DE L'ASSECHEMENT DE BIOFILMS PHOTOTROPHES SUR LES COMMUNAUTES DE DIATOMÉES EN MILIEU NATUREL - ÉTUDE EXPERIMENTALE EN COURS D'EAU NON PERMANENTS.....</b>	<b>95</b>
I. Présentation de l'étude et synthèse des principaux résultats. ....	97
II. Article III, paru dans la revue <i>River Research and Applications</i> (DOI : 10.1002/rra.2793). ....	102
"Impact of Drought on Diatom Communities and the Consequences for the Use of Diatom Index Values in the River Maureillas (Pyrénées-Orientales, France)".....	102
<b>CHAPITRE IV : ÉTUDE DE LA BIOINDICATION PAR LES DIATOMÉES DANS LE MONDE ET SON IMPLICATION DANS LES COURS D'EAU ASSECHES.....</b>	<b>127</b>
I. Les concepts de la bioindication .....	131
1. Le concept de « Qualité Environnementale » .....	131
2. Le concept d'« état de référence » .....	133
3. Le concept de « régionalisation » .....	135
II. La mise en œuvre de la bioindication.....	137
1. Les différents types d'indices.....	137
2. Les indices basés sur les diatomées dans le monde .....	139
3. Analyse critique des différents protocoles utilisés dans le monde.....	141
a. Échantillonnage .....	141
b. Fabrication de lames permanentes et comptage.....	143
c. Détermination des diatomées.....	144
III. Evaluation des cours d'eau asséchés .....	146
1. Contexte général.....	146
2. Expérimentation en milieu naturel.....	146
a. Descriptif des expériences.....	147

<i>b. Résultats et implications pour la bioindication</i> .....	149
• Le protocole de prélèvement et d'analyse IBD est-il applicable en cas d'assèchement ? .....	149
• Quelles conséquences l'assèchement a-t-il sur les méthodes de comptage et sur les notes indicielles calculées ? .....	151
3. Adaptation des indices utilisés en France sur les cours d'eau asséchés .....	152
IV. Conclusion.....	154
<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>157</b>
I. Synthèse des résultats.....	159
1. L'assèchement et ses conséquences sur les biofilms phototrophes .....	159
<i>a. Stress rencontrés et stratégies de survie</i> .....	159
<i>b. Effets de l'assèchement et conséquences pour la recroissance</i> .....	160
• Impact de la contrainte d'assèchement.....	160
• Impact de la durée d'assèchement .....	161
• Notion de refuge .....	161
• Notion de résilience .....	162
2. L'assèchement et la bioindication .....	163
<i>a. Généralités</i> .....	163
<i>b. L'évaluation des cours d'eau asséchés</i> .....	163
II. Perspectives .....	164
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>167</b>
<b>ANNEXE 1 : PROTOCOLE DE PRELEVEMENT ET D'ANALYSE DES ECHANTILLONS UTILISE LORS DE L'EXPERIENCE EN MESOCOSME.....</b>	<b>205</b>
<b>ANNEXE 2 : ARTICLE DE DESCRIPTION D'UNE NOUVELLE ESPECE DE DIATOMEE</b>	
<b><i>ACHNANTHIDIUM DELMONTII</i> .....</b>	<b>209</b>



# LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Schéma général des différents compartiments et interactions associées présentés dans ce manuscrit. ....	6
Figure 2 : Notion de "bon état écologique" des eaux de surface selon la Directive Cadre sur l'Eau. ....	12
Figure 3 : Carte des Hydro-écorégions de niveau 1 en France. ....	12
Figure 4 : Organisation d'un frustule de diatomée. ....	14
Figure 5 : Classification simplifiée des Diatomées. ....	14
Figure 6 : Schéma synthétique de la reproduction chez les diatomées. ....	16
Figure 7 : Valve initiale et valves après reproduction végétative de <i>Gomphonema calcifugum</i> . Barres d'échelles : 10 µm. ....	16
Figure 8 : Valve tétratologique de <i>Germainiella</i> sp. (MEB). ....	18
Figure 9 : Difficultés d'identification typiquement rencontrées en microscope optique. ....	24
Figure 10: Gradients of effects of emersion stress in freshwater and marine environments, at temporal (from hours to years) and spatial scales (drying of riverbeds or extent of intertidal zones). ....	30
Figure 11: The different strategies used by benthic microalgae to survive desiccation, from cellular-scale to biofilm-scale. ....	32
Figure 12: Effects and consequences from environment to desiccation of benthic microalgae and associated stresses. They are due to a combination of nonrandom stress factors that induced specific responses or cumulative effects of benthic microalgae. ....	36
Figure 13 : Emission de fluorescence mesurée par le PhytoPAM en fonction des conditions du milieu et de la quantité de lumière reçue par le photosystème II des cellules chlorophylliennes. ....	62
Figure 14 : Schéma des microplaques utilisées lors de l'expérience. La plaque grisée était couverte d'une feuille blanche, les puits barrés étaient inutilisés. ....	62
Figure 15 : Schéma du mésocosme "Canal artificiel". ....	62
Figure 16 : Schéma récapitulatif de l'expérience réalisée à partir des coupons colonisés du canal artificiel. Avant T0, les substrats artificiels ont été installés durant un mois dans le canal afin d'être colonisés par le biofilm en place. ....	64
Figure 17 : Principe de la méthode ARISA (Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis) ....	66
Figure 18: Maximal efficiency of photosystem II (ΦPSII) and microbial proportion inferred from minimal fluorescence values for mixed diatoms and cyanobacteria in low light conditions (mean ± standard error, n = 12). ....	76

Figure 19: A. Cellular densities in biofilms after drought and after the 13-days rewetting in aquaria for each drought duration. B. Diatom proportions in biofilms. Controls correspond to biofilms sampled in the channel at the beginning of the experiment (T0) and to biofilms sampled after transfer and incubation in an aquarium (mean of 3 counts  $\pm$  standard deviation). Letters indicate statistically homogeneous groups: uppercase letters for total cyanobacteria and lowercase letters for live diatoms.....78

Figure 20: Evolution of live diatoms proportion in the biofilm: at the end of drought phase (A.; control: initial state of biofilms) and at the end of rewetting phase (B.; control: direct transfer and incubation in an aquarium), (n = 3, mean  $\pm$  standard deviation). Letters indicate statistically homogeneous groups.....80

Figure 21: Microbial proportion (%) inferred from minimal fluorescence values measured with a PhytoPAM after the end of rewetting (Rw)(n = 40, mean  $\pm$  standard deviation). Letters indicate statistically homogeneous groups.....82

Figure 22: Maximal efficiency of photosystem II ( $\Phi$ PSII) of diatoms and cyanobacteria throughout the drought and rewetting phases, measured with a PhytoPAM (n = 4, mean  $\pm$  standard deviation). Line = drought duration; shaded bars = rewetting duration. Letters indicate statistically homogeneous groups.....82

Figure 23: A. PCA based on the Biolog data. Plots are grouped to the phase biofilms were sampled: end of drought or end of rewetting. B. Factorial map of the chemical guilds of substrates (AA = amine acids; AM = amines; CA = carboxylic acids; CH = carbohydrates; PC = phenolic compounds; PM = polymers).....84

Figure 24: A. PCA based on ARISA data. B. Factorial map of the OTUs designed by the length of PCR fragment in base pairs. Only those that are more correlated to the axes are represented. ....84

Figure 25 : Station d'étude à Maureillas-las-Illas (Pyrénées-Orientales, France). ....98

Figure 26 : Pierres déposées sur les rives, subissant l'assèchement. ....98

Figure 27 : Evolution des débits au cours de l'expérience. ....98

Figure 28: Experimental design in the river Maureillas, located in the south of France. ....106

Figure 29: PCA based on specific proportions of diatoms in samples from control pebbles. The points are regrouped according to the sampling date. Arrows: evolution of control communities during the two-month experiment. ....108

Figure 30: PCA based on diatom specific proportions for 1 week of drought (A), 2 weeks of drought (C) and 4 weeks of drought (E) with the biplot respectively associated in the inserts (B, D and F). The points have been regrouped by treatment: C: control pebbles; D: dry pebbles; Cu: cleaned-up pebbles. ....110

Figure 31: Mortality rate of diatom communities, from dried pebbles after rewetting, for each dry period tested.....112

---

Figure 32: Evolution of the number of taxa of cleaned-up pebbles communities for each drought duration. ....	114
Figure 33: BDI and SPI average differences (absolute value) between dried and control communities for each dry period tested, with standard errors associated. ....	114
Figure 34 : Concept de l' « Ecological Quality Ratio » dans l'élaboration des indices biologiques. ....	130
Figure 35 : Illustration des différents types d' "états de référence" décrits par Stoddard <i>et al.</i> (2006). ....	132
Figure 36 : Carte des 133 Hydro-écorégions définies en Europe. ....	136
Figure 37 : Ensemble des notes indicielles IPS et IBD obtenues au cours de l'expérience en mésocosme (Chapitre II). ....	150





# LISTE DES TABLEAUX

Table 1: Maximal efficiency of photosystem II for mixed or single diatoms and cyanobacteria at initial state, after drought and after rewetting. In the last column, the average values of control are presented. ND: non detectable signal. ....	76
Table 2: Shannon index based on ARISA data, linked to the disturbances applied to biofilms. ....	80
Table 3: Mean values of physicochemical data collected throughout the experiment, with standard errors (n=14). ....	108
Table 4: NP-MANOVA based on diatom specific proportions for the different drought durations. *significant difference between 2 groups of pebbles. 1WD: after 1 week of drought. 2WD: after 2 weeks of drought. 4WD: after 4 weeks of drought. ....	112
Tableau 5 : Liste des différents outils développés à travers le monde pour la bioévaluation de la qualité des cours d'eau et basés sur les diatomées benthiques. <sup>1</sup> La liste des pays où les indices ont été appliqués n'est pas exhaustive. ....	138
Tableau 6 : Résumé des techniques d'échantillonnage, de laboratoire et d'analyse des échantillons de diatomées en routine dans différents pays. ....	140
Tableau 7 : Récapitulatif des stations suivies dans le Bassin Adour-Garonne. En barré : les stations qui n'ont pas subi d'assèchement ; en jaune : prélèvements réalisés sur substrats asséchés. ....	148
Tableau 8 : Notes indiciaires calculées pour les rivières ayant subi un assèchement (Adour-Garonne) et classes de qualité associées en fonction des HER (9 et 14), voir figure 2. Notes en rouge : prélèvement sur substrats asséchés. ....	150

# GLOSSAIRE

<b>Assèchement</b>	Portion partielle ou totale d'une rivière qui s'assèche durant quelques semaines à quelques mois au cours d'une année.
<b>Bioindicateur</b>	Indicateur constitué par une espèce végétale, fongique ou animale ou par un groupe d'espèces (groupe éco-sociologique) ou groupement végétal dont la présence (ou l'état) renseigne sur certaines caractéristiques écologiques (c'est-à-dire physico-chimiques, microclimatique, biologiques et fonctionnelle) de l'environnement, ou sur l'incidence de certaines pratiques.
<b>Espèce cryptique</b>	Qualifie une espèce qui, sur le plan de la morphologie, ne présente aucune différence permettant d'isoler une nouvelle espèce, mais qui d'un point de vue génétique révèle des différences notables.
<b>Mésocosme</b>	Dispositif expérimental clos, de taille moyenne, destiné aux études écologiques, dont les conditions peuvent être partiellement ou totalement contrôlées.
<b>Métrique</b>	Grandeur calculée décrivant certains aspects structurels, fonctionnels ou autres des assemblages biologiques et dont la valeur est modifiée en réponse à un changement de l'environnement suite à un impact d'origine anthropique (ex : abondance spécifique, indice, etc.).
<b>Microcosme</b>	Dispositif expérimental clos, de petite taille, destiné aux études écologiques, dont les conditions peuvent être partiellement ou totalement contrôlées.
<b>Photosystème II</b>	Complexe enzymatique, composé de pigments et de protéines, intervenant en premier (avant le Photosystème I) dans les réactions de la photosynthèse dépendantes de la lumière.

# LISTE DES ABRÉVIATIONS

<b>ACP / PCA</b>	Analyses en Composantes Principales <i>Principal Component Analysis</i>
<b>ADN / DNA</b>	Acide DésoxyriboNucléique <i>Desoxyribonucleic Acid</i>
<b>ARISA</b>	Analyse Automatisée de l'Espace Intergénique Ribosomal <i>Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis</i>
<b>ARNr / rRNA</b>	Acide Ribonucléique ribosomal <i>Ribosomal Ribonucleic Acid</i>
<b>DAPI</b>	Di Aminido Phenyl Indol
<b>DCE / WFD</b>	Directive Cadre sur l'Eau <i>Water Framework Directive</i>
<b>EH / PE</b>	Equivalent Habitant <i>Population Equivalent</i>
<b>EQR</b>	Ratio de Qualité Ecologique <i>Ecological Quality Ratio</i>
<b>EPS</b>	<i>Exo-polysaccharides</i>
<b>DREAL</b>	Direction Régionale de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement
<b>HER</b>	Hydro-écorégion
<b>IBD / BDI</b>	Indice Biologique Diatomées <i>Biological Diatom Index</i>
<b>IPS / SPI</b>	Indice de Polluosensibilité Spécifique <i>Specific Polluosensitivity Index</i>
<b>MEB / SEM</b>	Microscopie Electronique à Balayage <i>Scanning Electron Microscopy</i>
<b>MET / TEM</b>	Microscopie Electronique à Transmission <i>Transmission Electron Microscopy</i>
<b>NPMANOVA (= PERMANOVA)</b>	Analyse multivariée non paramétrique <i>Non Parametric Multivariate Analysis of Variances</i>
<b>NQE</b>	Norme de Qualité Environnementale <i>Standard of Environmental Quality</i>
<b>UTO / OTU</b>	Unité Taxonomique Opérationnelle <i>Operational Taxonomic Unit</i>

<b>PCR</b>	Réaction de Polymérisation en Chaîne <i>Polymerase Chain Reaction</i>
<b><math>\Phi</math>PSII</b>	Efficacité photosynthétique du photosystème II <i>Efficiency of Photosystem II</i>

# CADRE SCIENTIFIQUE ET OBJECTIFS



## I. Cadre scientifique et son application

Les ressources en eau sont au cœur des préoccupations environnementales du fait de pressions anthropiques grandissantes, développées à des fins domestiques, industrielles ou destinées à l'agriculture (forte pression d'irrigation). Ces besoins, associés à un contexte de réchauffement climatique (précipitations moins importantes, température globale qui augmente), ont un impact notable sur les ressources en eau douce, provoquant ou renforçant la « non-permanence » de nombreux cours d'eau (Sabater, 2008). La « non-permanence » d'un cours d'eau se caractérise par un assèchement du lit dont la durée peut varier de quelques jours à quelques mois, plus particulièrement au cours de la période estivale. Les cours d'eau concernés constituent une importante part du réseau hydrographique dans le monde puisqu'ils représentent par exemple, 60 % du linéaire de cours d'eau des Etats-Unis (Nadeau and Rains, 2007), 43 % du linéaire en Grèce (Tzoraki and Nikolaidis, 2007), la moitié du linéaire des plaines australiennes (Williams, 1983) et 25 à 40 % du réseau hydrographique français (Snelder *et al.*, 2013). Malgré l'importance de ce réseau, ces cours d'eau n'ont fait l'objet d'un intérêt que très récemment de la part des collectivités et des organismes de recherche, notamment lors de cette dernière décennie, et doivent être inclus à part entière dans les politiques de protection mises en place.

Aujourd'hui, de nombreux pays tentent de mettre en place des politiques de gestion des cours d'eau afin de surveiller et protéger les écosystèmes aquatiques globaux, mais les méthodes utilisées sont très variables d'un pays à l'autre d'un point de vue législatif. L'Union Européenne a engagé une réflexion politique majeure depuis le début des années 2000, faisant d'elle un précurseur en termes de surveillance et de protection des masses d'eau. Ainsi, la Directive européenne Cadre sur l'Eau (DCE ; Parlement européen (2000)) a abouti, imposant aux états européens la mise en place d'un suivi et d'une amélioration des écosystèmes aquatiques de surface, souterrains et côtiers. Cette directive cible la surveillance, la prévention et l'amélioration de l'état chimique et de l'état écologique des masses d'eau par le développement d'indicateurs biologiques. Blandin (1986) définit un indicateur biologique (ou bioindicateur) comme « 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 ou d'un écosystème et de mettre en évidence aussi précocement que possible leurs modifications, naturelles ou provoquées. ». Pour être de bons bioindicateurs, les organismes concernés doivent être largement représentés dans les écosystèmes, facilement prélevables et analysables à moindre coût et témoigner des

conditions du milieu étudié, les modifications du milieu entraînant une modification structurelle des communautés en fonction de leur sensibilité spécifique.

Dans le cadre de la DCE, les bioindicateurs retenus sont le phytobenthos, le phytoplancton, les macrophytes, les algues macroscopiques et angiospermes, la faune benthique invertébrée et l'ichtyofaune. Les diatomées, appartenant au phytobenthos, sont aujourd'hui largement utilisées en routine en Europe afin d'évaluer la qualité biologique des cours d'eau et plusieurs indices ont été développés du fait de leur grande sensibilité aux nutriments (e.g. Kelly and Whitton, 1995; Coring, 1999; Coste *et al.*, 2009).

Malgré la fiabilité des outils mis en place, la méconnaissance des dynamiques des biofilms algaux rend difficile la prise de décision concernant la protection de la biodiversité dans les milieux non permanents. En effet, la réponse à un stress tel que l'assèchement induit inévitablement des adaptations à l'échelle des individus, des populations et des écosystèmes. L'état des connaissances actuelles permet d'émettre certaines hypothèses concernant les stratégies de survie des populations : la possibilité d'une recolonisation par la dérive lors de la remise en eau ou la capacité de recroissance des diatomées à partir d'un biofilm sec. Ces changements peuvent se traduire par des modifications structurelles favorisant certaines espèces plus tolérantes à ce stress. Ils peuvent donc potentiellement impacter les indices diatomiques utilisés en France (Indice Biologique Diatomées : IBD / Indice de Polluosensibilité Spécifique : IPS, AFNOR (2007a)) lors des suivis de routine imposés dans le cadre de la DCE. De plus, ces indices standardisés nécessitent un protocole de prélèvement strict afin d'obtenir des données fiables (Besse-Lototskaya *et al.*, 2011), qui ne peuvent être appliqués dans les cours d'eau au lit asséché. Un travail de recherche est donc nécessaire pour mieux comprendre les phénomènes biologiques liés à l'assèchement et pouvoir, à terme, adapter les indices actuels et ainsi estimer la qualité biologique antérieure à l'assèchement.



## II. Objectifs

L'un des objectifs de ce travail est de comprendre les dynamiques saisonnières des communautés benthiques microbiennes du biofilm, incluant les diatomées mais aussi les cyanobactéries ou les bactéries hétérotrophes. L'assèchement peut induire une pression de sélection, que l'on peut mettre en évidence en mesurant la mortalité et la résilience structurelle et/ou fonctionnelle des différentes communautés.

Le second objectif est de définir de quelle manière les diatomées sont affectées par le stress d'assèchement. L'histoire du biofilm avant l'assèchement mais également la durée de l'assèchement subi sont-ils des paramètres influençant la survie des communautés ? Nous nous efforcerons de comprendre les vecteurs de recolonisation des substrats lors de la remise en eau, par les apports cellulaires de la dérive ou par la recroissance des cellules du biofilm sec.

Enfin, dans une logique d'évaluation de la qualité de l'eau, il est primordial de tester la rémanence des communautés de diatomées au cours d'un assèchement et la pertinence du calcul des indices diatomiques mais également de discuter du protocole normé utilisé en France (IBD ; AFNOR, 2007a).

Ce manuscrit de thèse présente les différents travaux réalisés afin de répondre aux objectifs énumérés précédemment (Figure 1) :

Le Chapitre I introduit des notions sur les outils basés sur les diatomées dans le cadre de la bioindication en Europe et en France. Cette partie se poursuit par une synthèse bibliographique (Article I) faisant le point sur la résistance des microalgues benthiques au stress d'émersion induit par l'assèchement ou le balancement des marées. Après avoir défini les différentes stratégies mises en place face à ce stress (adaptations physiologiques, formes de résistance, etc.) et aux stress associés (stress osmotique, pression de broutage, etc.), la dernière partie de l'article synthétise les différents processus de recroissance du biofilm, une fois la contrainte d'émersion levée.

Le Chapitre II est composé de deux études réalisées en laboratoire (Article II), l'une en microcosme, l'autre en mésocosme. La première est réalisée par des cultures d'espèces seules ou en mélange, la seconde sur un biofilm complexe mature installé dans un canal artificiel. Dans les deux cas, une période d'assèchement est provoquée, suivie d'une période de remise en eau dans un environnement isolé, afin de concentrer nos observations sur le biofilm asséché comme seule source microbienne. Différents paramètres sont suivis afin de tester les concepts de résilience structurelle et/ou fonctionnelle des communautés.

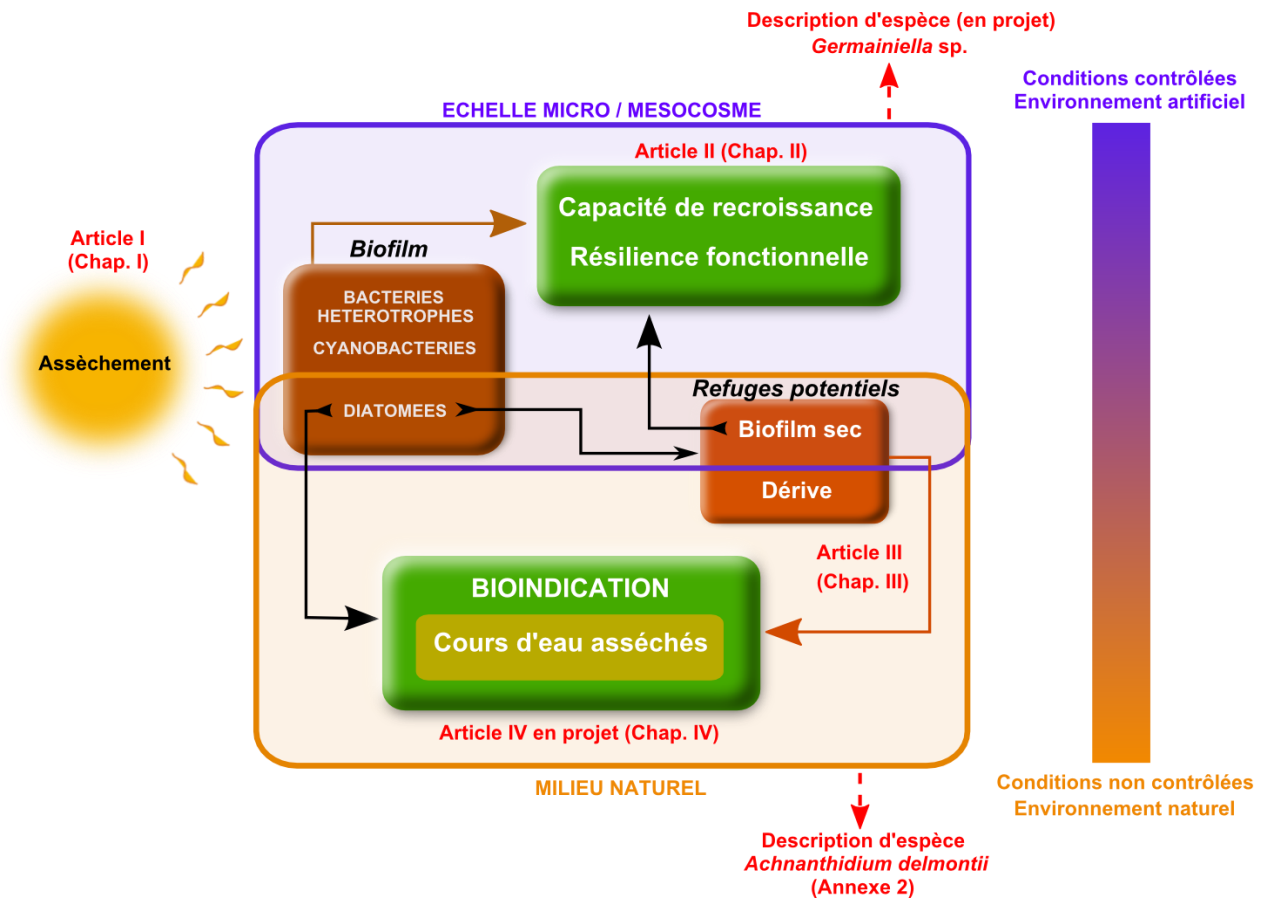


Figure 1 : Schéma général des différents compartiments et interactions associées présentés dans ce manuscrit.

Le Chapitre III présente une étude *in situ* réalisée sur des biofilms naturels où seul le peuplement diatomique est analysé (Article III), selon le même protocole que celui utilisé lors des suivis de routine. Les substrats utilisés sont des galets colonisés dans le milieu naturel et soumis à différentes conditions d'assèchement. La structure des communautés est ensuite analysée au cours des 28 jours suivant la remise en eau.

Le Chapitre IV est une synthèse bibliographique (projet d'article) présentant les concepts généraux de la bioindication, suivie d'une analyse bibliographique des techniques de bioindication utilisant les diatomées. La dernière partie s'appuie sur les différentes étapes nécessaires à l'application de la bioindication et discute de leurs potentielles adaptations aux cours d'eau asséchés, en se basant sur des données bibliographiques et sur les données recueillies lors de nos campagnes expérimentales de terrain.

Enfin, la conclusion de ce travail reprendra la synthèse des principaux résultats et les perspectives qui en découlent, d'un point de vue de la structure des communautés mais aussi dans le cadre de l'évaluation de la qualité biologique de l'eau en France.



# CHAPITRE I : INTRODUCTION GÉNÉRALE

La bioindication et les stress d'assèchement liés à l'émersion sont au cœur de ce chapitre d'introduction. En première partie, des notions de base sur la bioindication sont présentées (et seront développées dans le Chapitre IV) avant de s'intéresser plus particulièrement aux diatomées et leur utilisation au niveau européen et dans les protocoles utilisés en France. La seconde partie est présentée sous la forme d'un article de synthèse s'appuyant sur les différents stress liés à l'émersion (Dessiccation, lumière, température, broutage, pollution) que subissent les microalgues benthiques en eau douce et en milieu marin. Les processus de réinstallation des algues lors de la suppression du stress sont ensuite décrits.



Ce chapitre introduit des notions de bioindication, plus largement développées dans le chapitre 4, suivies d'un état de l'art des stress subis par les microalgues benthiques et liés à l'assèchement dans les milieux dulçaquicoles et marins. La première partie comprend donc une présentation de la bioindication avant puis un développement sur la place des diatomées dans le cadre de la Directive européenne Cadre sur l'Eau (Parlement européen, 2000) et sur les indices couramment utilisés dans le cadre des suivis de qualité d'eau en France : l'IBD (Prygiel and Coste, 2000; Coste *et al.*, 2009) et l'IPS (CEMAGREF, 1982). La seconde partie de ce chapitre est un état de l'art présenté sous la forme d'un article de synthèse, en préparation pour une soumission dans la revue *Aquatic Sciences*. Elle reprend les stratégies mises en place par les microalgues benthiques pour survivre aux différents stress induits par l'émersion, de l'échelle de la cellule à celle de la communauté. Puis, les processus de recolonisation faisant suite à la disparition du stress d'assèchement sont décrits.

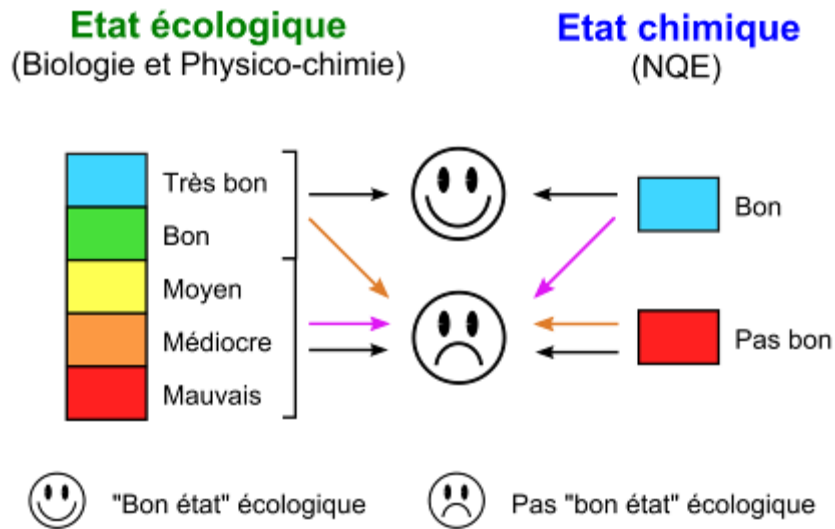
## **I. Notions de bioindication**

### **1. Définition de la bioindication**

Dans sa définition d'un bioindicateur, Blandin (1986) explique que les caractéristiques biologiques des communautés vivant dans un milieu donné sont le reflet de l'état de santé de ce milieu. Les organismes potentiellement indicateurs de la qualité de leur milieu doivent cependant respecter certaines règles afin d'être définis en tant que tel : être abondants et présents dans tous les types de milieux étudiés, facilement prélevables, analysables à des coûts raisonnables, utilisables à grande échelle et, bien sûr, ils doivent être sensibles aux différentes conditions du milieu. Cette dernière règle implique un cycle de vie des organismes assez court pour pouvoir intégrer les changements du milieu dans des délais relativement brefs. Ceci explique également que des bioindicateurs puissent être intégrateurs sur des pas de temps différents en fonction de leur cycle de vie.

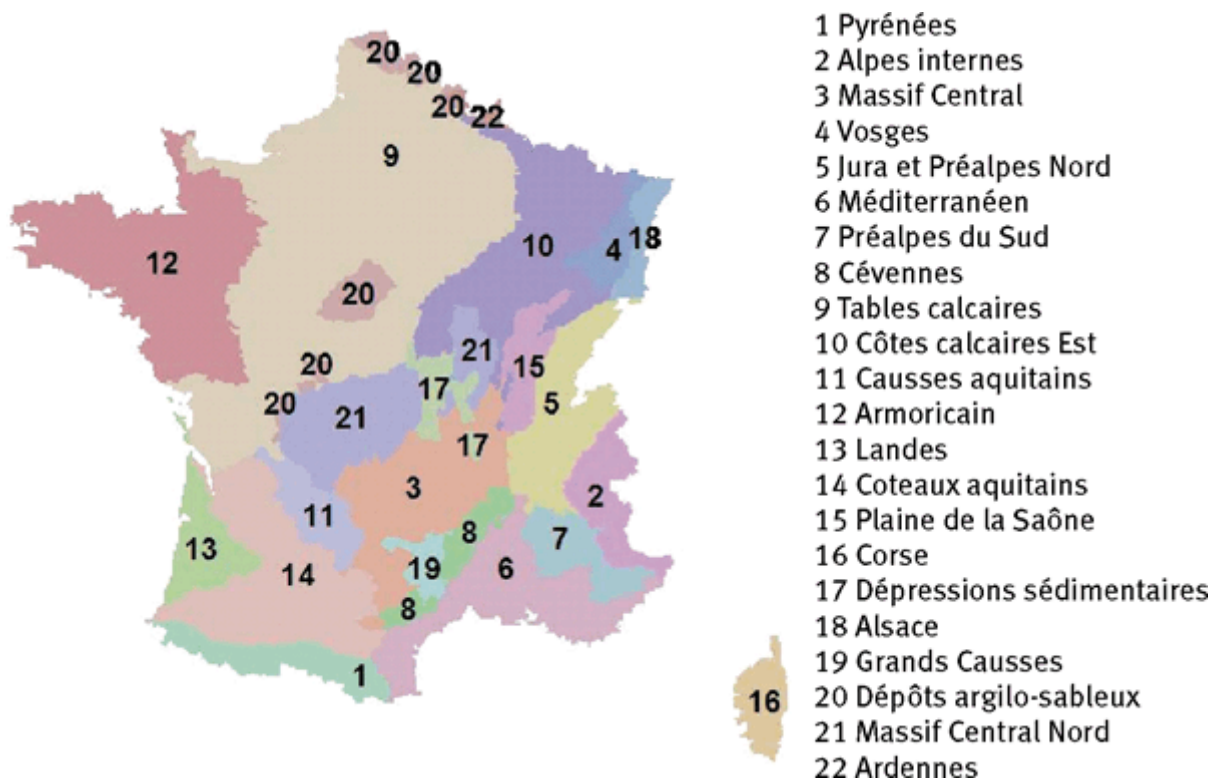
### **2. Bref historique de la bioindication**

Le fort développement industriel au XIX<sup>e</sup> siècle et l'intensification de l'agriculture au XX<sup>e</sup> siècle ont entraîné une importante dégradation des milieux aquatiques par le rejet de molécules toxiques ou par la modification de l'abondance et de la répartition des substances naturelles. Ces phénomènes ont été associés à une forte anthropisation responsable de perturbations de l'hydromorphologie des cours d'eau, par la modification du lit des cours d'eau ou la construction de barrages empêchant, entre autres, la migration des poissons (McCully, 1996).



**Figure 2 : Notion de "bon état écologique" des eaux de surface selon la Directive Cadre sur l'Eau.**

d'après l'Agence de l'Eau Loire Bretagne (2014)



**Figure 3 : Carte des Hydro-écorégions de niveau 1 en France.**

Source : Gauroy *et al.* (2012)



En Europe, l'intérêt pour la bioindication a débuté il y a un siècle en Allemagne par la description des exigences écologiques d'espèces pour la matière organique, autrement appelée « saprobie » (Kolkwitz and Marsson, 1909). Une liste d'espèces de microalgues, dont quelques espèces de diatomées, y est même publiée.

En France, l'essor de la bioindication a lieu au cours des années 1970 où elle est tout d'abord basée sur l'étude des macroinvertébrés, donnant le jour à une succession d'outils avant d'aboutir à un indice normalisé en 1985 : l'IBGN (Indice Biologique Global Normalisé) aujourd'hui encore utilisé malgré le développement d'un nouvel indice multimétrique I<sub>2</sub>M<sub>2</sub> (Indice Invertébrés Multimétrique ; Mondy *et al.* (2012)). Dans les années 1980, la bioindication se développe à partir des communautés algales, reposant en particulier sur les diatomées à partir desquelles sont créés l'IPS puis l'IBD qui fera l'objet d'une normalisation en 2000, mise à jour en 2007 (AFNOR, 2007a). D'autres indices sont ensuite créés sur les autres compartiments végétaux tels que l'IBMR (Indice Biologique Macrophytique en Rivière, Haury *et al.* (2006)) basé sur les macroalgues et plantes aquatiques.

### **3. La bioindication dans la Directive Cadre sur l'Eau 2000/60/CE**

L'Europe a placé la bioindication au centre de ses préoccupations écologiques en imposant aux Etats Membres depuis l'année 2000, un « cadre pour une politique communautaire dans le domaine de l'eau » avec la mise en place de la Directive européenne Cadre sur l'Eau (DCE 2000/60/CE ; Parlement européen (2000)). Cette dernière impose aux Etats membres d'atteindre un « bon état chimique » et un « bon état écologique » pour leurs masses d'eau (eaux superficielles, eaux souterraines, eaux de transition et eaux côtières) d'ici 2015 (Figure 2). Des exemptions sont néanmoins possibles selon certains critères prédéfinis (coûts, impossibilité technique d'atteindre les objectifs dans le temps imparti, inertie du milieu malgré les actions engagées) et l'obligation d'atteinte du « bon état » peut alors être reportée à 2021, voire 2027.

Le « bon état chimique » est atteint lorsque les concentrations en 41 substances prioritaires définies au niveau européen sont inférieures aux normes de qualité environnementale (NQE), elles-mêmes définies par des tests écotoxicologiques. Seules les masses d'eau ayant un « bon état chimique » et un « bon » ou un « très bon état écologique » sont jugées de « bon état » au niveau global (Figure 2). Les masses d'eau en bon état depuis le début du programme de surveillance ont, quant à elles, un objectif de « non dégradation ».

Concernant l'état « écologique », différents organismes sont pris en compte et dépendent des masses d'eau considérées : le phytoplancton, les macrophytes et phytobenthos (dont les diatomées), les macroalgues et angiospermes (seulement dans les eaux littorales), les invertébrés benthiques et les poissons.

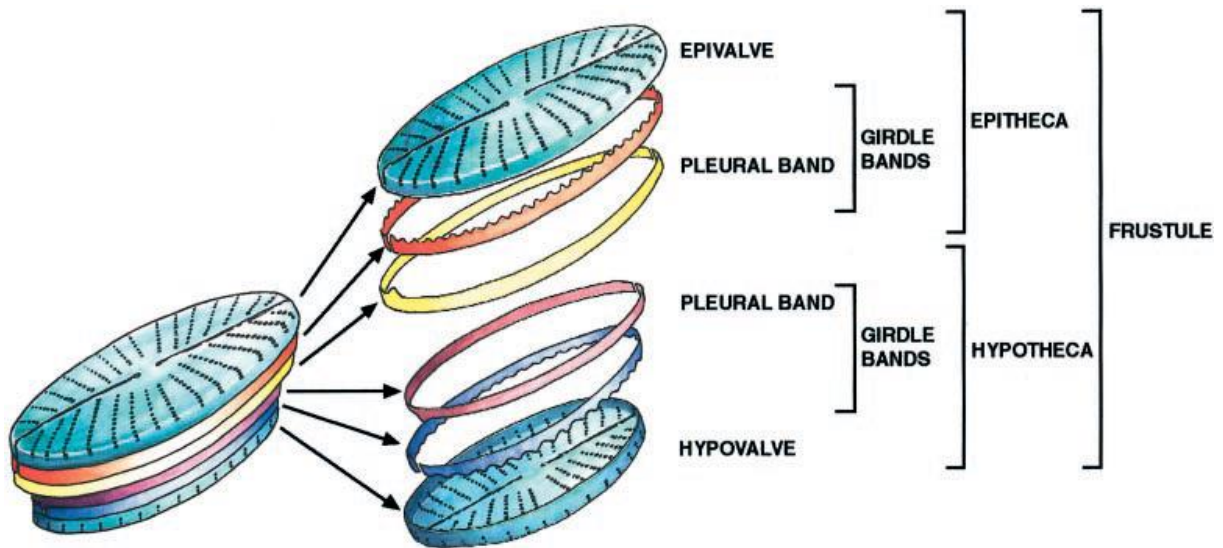


Figure 4 : Organisation d'un frustule de diatomée.

Source : Zurzolo and Bowler (2001)

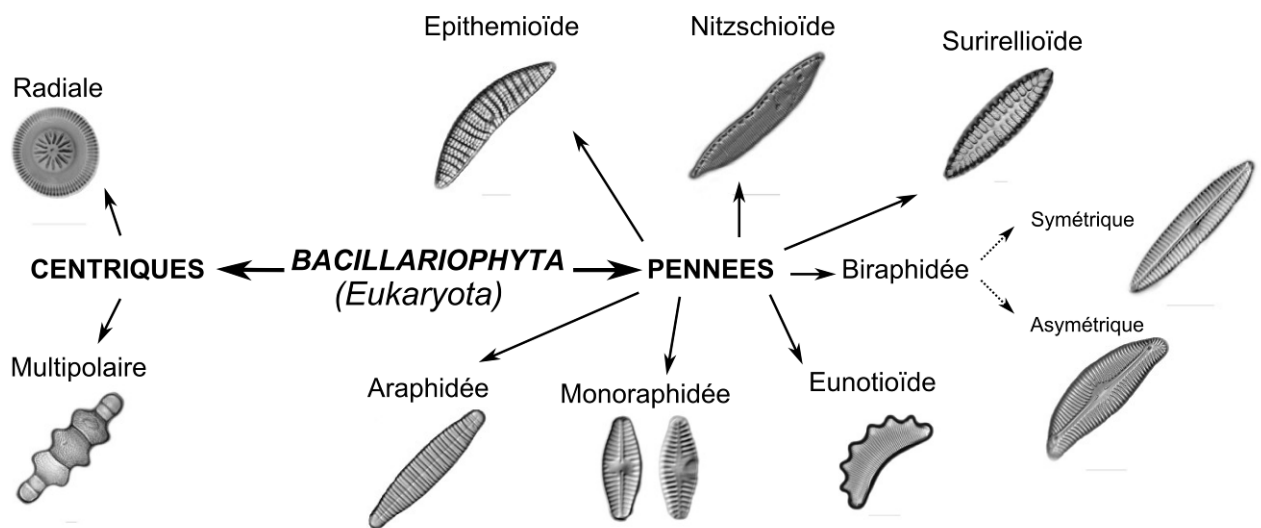


Figure 5 : Classification simplifiée des Diatomées.

d'après Spaulding *et al.* (2010)

Le principe est ensuite de définir un état de « référence », correspondant à un milieu naturel non impacté, auquel on comparera un milieu impacté par différentes activités humaines, par l'intermédiaire d'indices biologiques. C'est cet écart entre les deux situations qui donne alors l'état « écologique », classé en 5 catégories : « très bon », « bon », « moyen », « médiocre » et « mauvais » (développé dans le Chapitre IV).

Les seuils de ces différentes catégories dépendent de la « typologie » des masses d'eau. Les typologies de masses d'eau font référence au contexte géographique naturel et doivent représenter les conditions de « référence » biologiques, physico-chimiques et hydromorphologiques selon le type de milieu (relief, géologie, climat) (développé dans le Chapitre IV). Vingt-deux HERs de niveau 1 (Figure 3) et 117 HERs de niveau 2, représentant un découpage plus précis (Wasson *et al.*, 2004), ont été décrites en France.

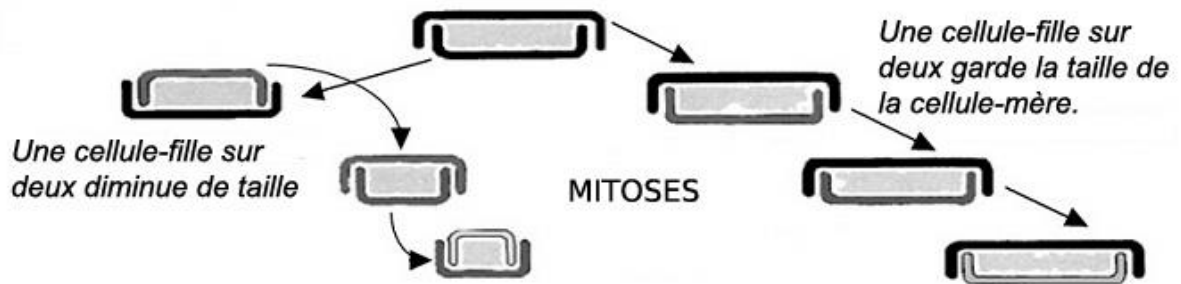
## **II. La bioindication par les diatomées**

Les diatomées réagissent à différents paramètres tels que l'eutrophisation (concentrations en nutriments), l'acidification, la saprobie, la salinité et le courant (*e.g.* Van Dam *et al.*, 1994; Kelly *et al.*, 1998; Coring, 1999; Wu, 1999; Lobo *et al.*, 2004; Andren and Jarlman, 2008; Rimet, 2012). Les diatomées ont également la capacité d'accumuler des métaux lourds (Morin *et al.*, 2007; Duong *et al.*, 2012) et différentes substances toxiques présentes dans leur environnement qu'elles soient d'origines agricole (Roubeix *et al.*, 2012), pharmaceutique (Hagenbuch and Pinckney, 2012) ou industrielle (Ali and Abd El-Salam, 1999). Toutes ces qualités en font des intégrateurs privilégiés pour l'évaluation de la qualité de l'eau, ce que ne permettent pas les mesures physico-chimiques effectuées à un instant donné.

### **1. Classification et diversité des diatomées**

Les diatomées (*Eukaryota*, *Stramenopiles*, *Bacillariophyta*; Adl *et al.*, 2005), sont des microorganismes eucaryotes unicellulaires majoritairement photosynthétiques, que l'on rencontre dans tous les types de milieux aquatiques ou humides. Le nombre total de taxons de diatomées restant à décrire dans le monde est estimé entre 30 000 et 100 000 (Mann and Vanormelingen, 2013).

Leur principale caractéristique réside dans l'existence d'une structure péricellulaire externe à base de silice que l'on appelle « frustule ». Ce frustule est composé de 2 valves (épivalve et hypovalve) maintenues par des bandes cingulaires ou « ceintures » dont l'organisation est présentée dans la Figure 4 (Stoermer and Julius, 2003). L'ultrastructure du frustule révèle la présence de différents éléments comme le raphé ou des pores organisés de manière variable (Figure 5). Ces éléments permettent les échanges entre l'intérieur de la cellule et son environnement. Ils sont impliqués également dans la mobilité ou la fixation de certaines



DIVISION MITOTIQUE

REPRODUCTION Cellules de taille minimale

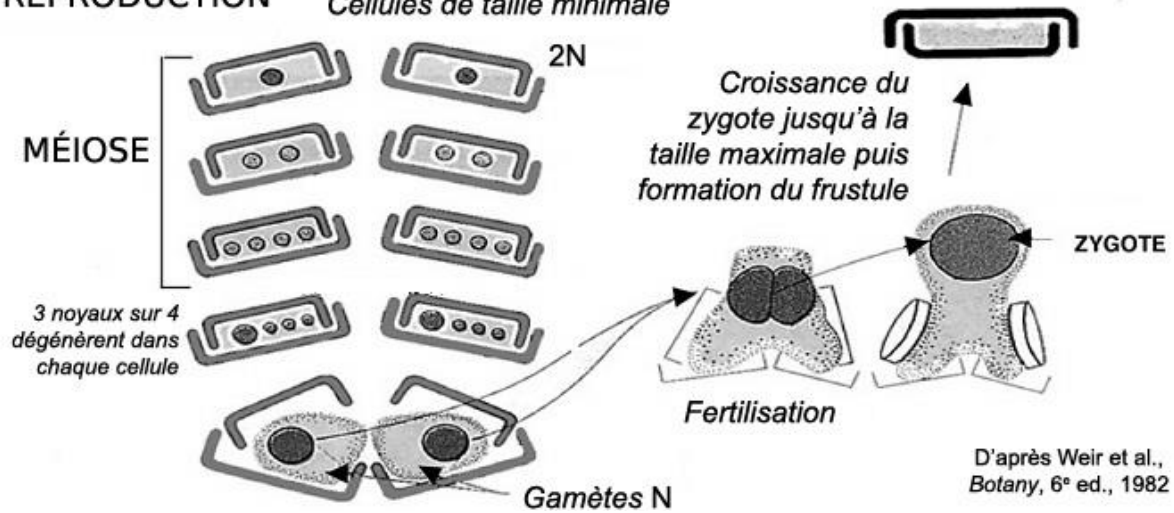


Figure 6 : Schéma synthétique de la reproduction chez les diatomées.

Source : Langlois (2006)

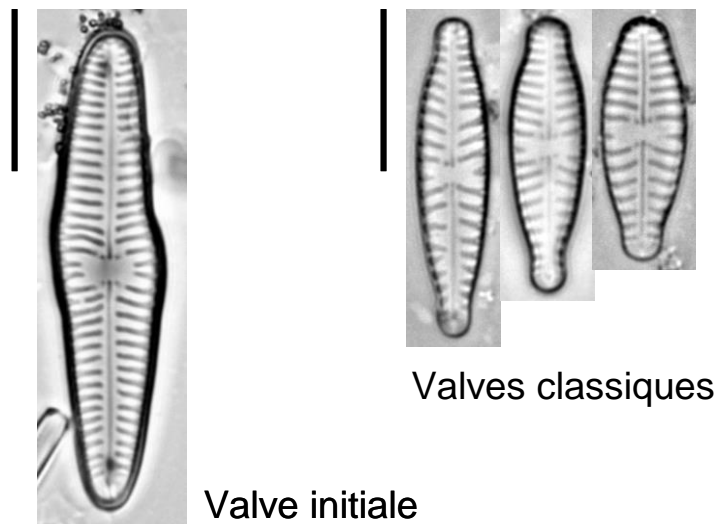


Figure 7 : Valve initiale et valves après reproduction végétative de *Gomphonema calcifugum*.

Barres d'échelles : 10 µm.

Source : C. Cejudo Figueiras

espèces. Ces éléments d'ultrastructure sont, en outre, à la base de l'identification des taxons, et donc primordiales pour la bioindication (Cox, 1996). L'axe de symétrie du frustule est un élément essentiel de classification des diatomées : on distingue principalement les diatomées pennées, à symétrie bilatérale, et centrales, à symétrie centrale (Figure 5) (Round *et al.*, 1990). La classification est basée sur des critères morphologiques tels que la présence ou la forme du raphé pour les pennées. Cependant, ces critères morphologiques ne suffisent pas à définir certaines espèces puisqu'il existe une forte variabilité morphologique. Cette variabilité est influencée par le développement (dont la reproduction), le polymorphisme génétique et les facteurs environnementaux (Kociolek and Stoermer, 2010). De ce fait, les techniques basées sur l'ADN pour différencier les espèces connaissent un important développement (Kermarrec *et al.*, 2014).

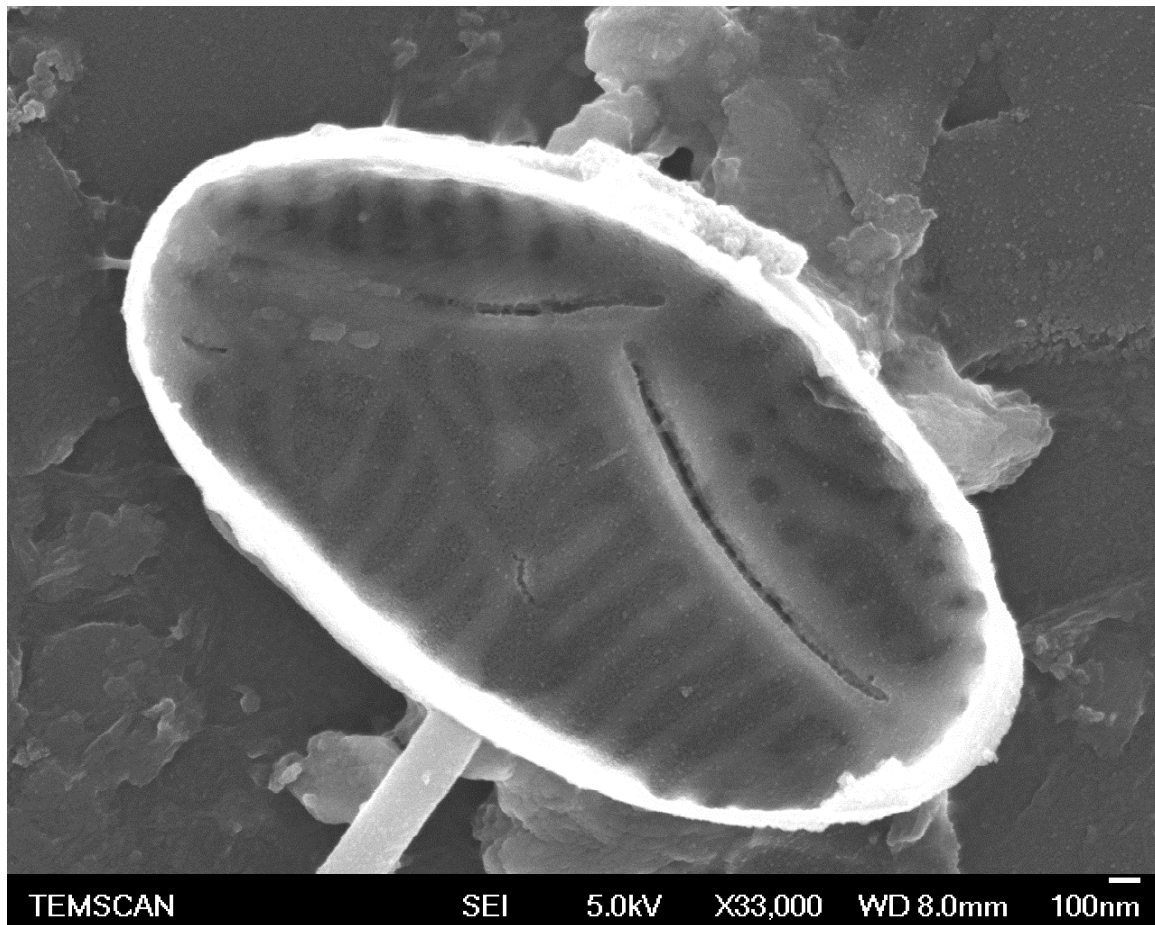
## **2. Biologie des diatomées**

La taille des diatomées est généralement comprise entre 2 et 500  $\mu\text{m}$ . Elles sont pourvues de pigments caroténoïdiens ( $\beta$ -carotènes, diatoxanthine, diadinoxanthine et fucoxanthine) et peuvent vivre en colonies ou de manière solitaire. Elles présentent des formes très variables selon leur caractère pélagique ou benthique.

La reproduction des diatomées fait intervenir la multiplication végétative et la reproduction sexuée. La multiplication végétative se fait par une division de la cellule (mitose). Du fait de la différence de taille entre l'épivalve et l'hypovalve, la reproduction végétative entraîne une diminution de la taille du frustule. Après plusieurs cycles, la diatomée parvient à une taille critique ou devient trop âgée, déclenchant alors une reproduction sexuée (méiose) qui permet le rétablissement de la taille initiale (Figure 6) (Langlois, 2006). Ces « valves initiales » sont rares, ont une forme très particulière et des ornements très détaillés qui les différencient des valves issues de la multiplication végétative que l'on observe plus communément (Figure 7). La reproduction sexuée est favorisée dans des conditions de stress, ce qui est largement utilisé pour la culture algale en laboratoire (Agrawal, 2012). Les conditions de stress favorisent également le passage en situation de dormance ou encore la formation de spores de résistance (plus fréquent chez les diatomées marines).

## **3. Ecologie des diatomées**

L'intérêt des diatomées réside dans le fait qu'on les trouve dans toutes les eaux, qu'elles soient marines ou dulçaquicoles et quelle que soit la latitude. Elles peuvent y être planctoniques ou benthiques. De plus, du fait de leur bonne tolérance à la lumière, elles peuvent coloniser des milieux tels que l'air ou les sols dès que l'hygrométrie le permet (Brown *et al.*, 1964; Broady, 1996). Elles assurent 20 % des processus de photosynthèse dans le monde d'où leur importance en tant que producteur primaire dans les réseaux trophi-



**Figure 8 : Valve tétratologique de *Germainiella* sp. (MEB).**

Source : R. Le Cohu

ques (Amin *et al.*, 2012). L'une des contraintes notable pour une croissance optimale des diatomées est toutefois la disponibilité en silice soluble dans le milieu étant donné qu'il s'agit du composé essentiel à la formation du frustule (Round *et al.*, 1990). A cela s'ajoute les nutriments tels que les formes assimilables d'azote ou de phosphore qui sont des éléments majeurs nécessaires au bon développement des organismes (Sarhou *et al.*, 2005; Gudmundsdottir *et al.*, 2013). Ainsi, les préférences des espèces vis-à-vis des nutriments (saprobie), du pH, de la salinité ou encore de la matière organique (trophie) sont à l'origine de classifications des diatomées dans la littérature (Van Dam *et al.*, 1994; Soininen, 2007).

L'hydrologie est également un facteur contrôlant la répartition des diatomées. Ainsi, de faibles courants favoriseront le développement de diatomées pélagiques de type *Fragilaria* et les zones de forts courants celui de diatomées benthiques adhérant fortement aux substrats telles que les espèces du genre *Cocconeis*. De la même manière, certaines espèces sont favorisées dans des milieux non perturbés, saumâtres ou acides en fonction de leurs préférences écologiques. Dans certains milieux soumis à des pollutions métalliques ou faiblement chargés en éléments nutritifs, les frustules de diatomées peuvent également présenter des formes altérées qu'on appelle « tératologiques » (Figure 8).

Une classification par guildes écologiques a vu le jour, basée sur les caractéristiques morphologiques des diatomées et leur tolérance à la limitation en nutriments et leur capacité d'évitement face aux contraintes physiques (Passy, 2007). Trois guildes principales ont alors été définies : « Low profile », « High profile » et « Motile ». La première est sensible aux ressources du milieu mais résistante aux perturbations physiques, elle comprend des espèces de petite taille, incluant les formes prostrées, adnées, érigées, centriques solitaires et se déplaçant lentement appartenant par exemple aux genres *Achnanthisdium*, *Amphora* ou *Cyclotella*. La seconde est au contraire sensible aux perturbations physiques mais supporte les limitations en nutriments, elle inclut les formes de grande taille, érigées, filamenteuses, formant des chaînes, pédonculées, les formes centriques en colonies appartenant entre autres aux genres *Diatoma*, *Fragilaria* ou *Gomphonema*. Enfin, la guildes « Motile » comprend des espèces mobiles capables d'éviter physiquement les stress liés aux concentrations en nutriments ou aux perturbations physiques. Les espèces appartenant à cette guildes sont majoritairement eutrophes et tolérantes à la pollution, elles se déplacent rapidement et font partie, par exemple, des genres *Navicula*, *Nitzschia* ou *Sellaphora*. On peut cependant trouver des espèces d'un même genre dans des guildes différentes. Elles se distinguent par des caractéristiques propres telles que la mobilité ou la production de mucilage. La composition et l'abondance relative des espèces au sein des communautés dépendent de nombreux paramètres environnementaux, ce qui fait des diatomées des indicateurs pertinents pour l'évaluation de la qualité de l'eau.

#### 4. L'utilisation des diatomées comme bioindicateur

Il existe différentes méthodes d'évaluation des écosystèmes aquatiques basées sur l'analyse des paramètres physico-chimiques tels que la salinité, la turbidité, la conductivité électrique, la concentration en oxygène dissous, le pH, etc. Ces méthodes sont simples à mettre en œuvre, efficaces et largement utilisées depuis de nombreuses années dans le cadre des réseaux de surveillance. Cependant, elles permettent de faire un état des lieux à un moment donné sans prendre en compte les modifications qui peuvent avoir lieu entre deux relevés, comme les variations de débit ou des rejets intermittents d'origine anthropique. Au contraire, les diatomées sont intégratrices de ces variations temporelles. De plus, leur localisation à la base de la chaîne alimentaire en fait des intégrateurs directs de la qualité physico-chimique globale de l'eau (Steinberg and Schiefele, 1988; Mc Cormick and Cairns, 1994).

Divers indices ont été créés dans toute l'Europe à partir des diatomées benthiques pour l'évaluation de la qualité des eaux de surface (Ács *et al.*, 2004). Aujourd'hui, les pays membres montrent une grande volonté d'harmoniser les pratiques, par l'intermédiaire d'exercices d'intercalibration européens (Besse-Lototskaya *et al.*, 2011; Kelly *et al.*, 2014).

Ils dépendent des préférences écologiques des taxons et sont, pour la plupart, basés sur la formule de Zelinka and Marvan (1961) :

$$ID = \frac{\sum_{j=1}^n A_j \times I_j \times V_j}{\sum_{j=1}^n A_j \times V_j}$$

$A_j$  : abondance de l'espèce  $j$  dans la communauté ;  $I_j$  : indice de sensibilité à la pollution de l'espèce  $j$  (variant entre 1 et 5) ;  $V_j$  : valeur indicatrice de l'espèce  $j$ , liée à l'amplitude écologique de l'espèce par rapport à la pollution.

##### a. Echantillonnage, préparation des lames et détermination des diatomées

Suite à la mise en place de la DCE, des normes européennes ont vu le jour : EN 13946 (CEN, 2004) concernant le prélèvement et la préparation de lames d'observation et EN 14407 (CEN, 2007) pour l'identification, l'énumération et l'interprétation des échantillons de diatomées benthiques en rivière. En France, le protocole IBD fait l'objet d'une norme homologuée NF T 90-354 (AFNOR, 2007a), décrivant les différentes étapes de l'analyse, du prélèvement à l'interprétation.

Le prélèvement est effectué à l'aide d'une brosse à dents sur des substrats durs naturels, non naturels ou par un « essorage » délicat des végétaux, à défaut des précédents. Les



faciès privilégiés sont les faciès lotiques, dans des radiers afin d'éviter les zones de dépôt (débris ou diatomées mortes). Les substrats doivent être facilement prélevables à la main (faible profondeur) et préférentiellement dans des milieux bien éclairés. Une surface de 100 cm<sup>2</sup> est broyée idéalement sur un minimum de 5 pierres (entre 64 et 256 mm) différentes ou 10 cailloux (entre 16 et 64 mm) afin de limiter les risques d'hétérogénéité. Avant chaque prélèvement, les pierres sont délicatement remuées dans l'eau afin d'éliminer les éléments non accrochés. Dans les cas où les conditions ne permettent pas ce type de prélèvement, un racloir peut être utilisé pour prélever les diatomées sur des substrats durs immergés (3 passages). Le prélèvement est ensuite collecté dans un récipient hermétiquement fermé et généralement fixé à l'aide d'un agent de conservation (éthanol 70 % ou formaldéhyde 10 %). Il est ensuite étiqueté avec les informations importantes permettant de l'identifier et transporté au laboratoire. Une fiche de description de la station accompagne le prélèvement.

L'échantillon subit ensuite différents traitements destinés à ne recueillir que les frustules de diatomées. Sous hotte aspirante, l'échantillon est additionné de peroxyde d'hydrogène afin de détruire la matière organique présente dans les frustules. Cette opération peut être réalisée à chaud afin de catalyser la réaction. Après une seconde phase de refroidissement et décantation, quelques gouttes d'acide chlorhydrique sont ajoutées afin de dissoudre le carbonate de calcium. S'en suivent 4 cycles de rinçages / décantation à l'aide d'eau déminéralisée afin de retirer la majorité des produits utilisés pour le traitement tout en préservant le culot de diatomées traitées. Le culot est remis en suspension avant de déposer quelques gouttes à sécher sur une lamelle, dont la concentration sera contrôlée. Si les valves sont trop peu nombreuses, l'échantillon sera concentré et si elles sont trop nombreuses et se superposent, l'échantillon sera dilué. Lorsque la concentration est optimale pour le comptage, les diatomées sont montées entre lame et lamelle à l'aide d'une résine à fort indice de réfraction, comme le Naphrax<sup>®</sup>. Une fois la lame montée, sa qualité est contrôlée, l'énumération et la détermination des valves peuvent alors débuter.

Le comptage est réalisé sous microscope optique muni d'un objectif x 100 à immersion. La lame est balayée par transect afin de ne pas recompter les mêmes champs et la totalité des valves sont énumérées et inventoriées jusqu'à atteindre un nombre minimum de 400 unités taxonomiques (valves ou frustules). La bibliographie utilisée est également répertoriée dans la norme et elle peut être étendue à de nombreuses autres références et articles scientifiques. Les différents taxons répertoriés sont codifiés par des codes à 4 lettres. Les inventaires ainsi obtenus sont saisis dans le logiciel OMNIDIA<sup>®</sup> où les différents indices sont calculés.

## **b. Les indices utilisés en France : IBD et IPS**

Les deux principaux indices basés sur les diatomées benthiques utilisés en France sont l'IPS (Indice de Polluosensibilité Spécifique ; CEMAGREF (1982)) et l'IBD (Indice Biologique Diatomées ; Lenoir and Coste (1996)). Ce sont des indices de qualité biologique globale de l'eau, notée de 1 (eaux fortement impactées) à 20 (eaux non impactées).

L'IPS a été mis au point sur le bassin Rhône-Méditerranée-Corse en 1982 par le CEMAGREF à partir de 2800 relevés et 3143 taxons. Il prend en compte la totalité des espèces d'un inventaire auxquelles sont affectées des valeurs de sensibilité et des valeurs indicatrices. Les valeurs de sensibilité sont comprises entre 1 (espèce polluo-résistante, indicatrice de mauvaise qualité d'eau) et 5 (espèce polluo-sensible, indicatrice de bonne qualité d'eau). Cet indice a une bonne corrélation avec la qualité physicochimique de l'eau. Les valeurs indicatrices sont, quant à elles, estimées par un nombre compris entre 1 et 3 qui reflète l'amplitude écologique des espèces (1 : faible valeur indicatrice, ubiquiste ; 3 : forte valeur indicatrice). En effet, une valeur indicatrice faible indique une large amplitude de tolérance à la qualité de l'eau alors qu'une valeur forte indique une amplitude restreinte. Cet indice est plus sensible aux valeurs extrêmes de qualité que l'IBD.

L'IBD a été développé en 1996 par Lenoir and Coste (1996) et normalisé en 2000 (AFNOR, 2000) à partir de 1372 relevés. Il a ensuite été mis à jour en 2007 (AFNOR, 2007a; Coste *et al.*, 2009) sur la base de 3000 relevés et plus de 800 taxons vrais contre 209 pour l'ancienne version. De plus, parmi ces taxons, 120 sont sujets à des déformations tératologiques et peuvent se voir affectés un profil spécifique « altéré » lorsque les formes anormales sont effectivement inventoriées. Aujourd'hui, la base de données est régulièrement mise à jour du fait de l'évolution rapide de la taxonomie (environ 400 nouvelles espèces décrites chaque année dans le monde). Cependant, toutes les espèces d'un inventaire ne sont pas prises en compte dans le calcul de l'indice. L'IBD a été conçu de la façon suivante : 7 classes de qualité de l'eau ont tout d'abord été définies à partir des données abiotiques mesurées pour chaque relevé. Ensuite, pour chaque taxon, le calcul des probabilités d'abondance relative dans chaque classe de qualité a été réalisé. La note IBD d'un échantillon est alors calculée selon la formule de Zelinka and Marvan (1961) à partir de l'abondance relative de chaque taxon de l'inventaire et sa probabilité d'abondance relative dans les classes de qualité définies. Ces indices sont généralement calculés conjointement lors des suivis de routine à l'aide d'un logiciel spécialement conçu dans ce but : OMNIDIA<sup>®</sup> (Lecoite *et al.*, 1993). Il regroupe des informations concernant les taxons et les références qui leur sont associées, leurs synonymies ou appariements, des informations sur les différents indices qu'il calcule, et une interface permettant la gestion d'un grand nombre d'inventaires qu'il est facile d'exporter.

## 5. Limites des indices basés sur les diatomées

La qualité des données recueillies pour la bioindication repose tout d'abord sur de bonnes pratiques d'échantillonnage et une bonne analyse de la composition spécifique des échantillons (Besse-Lototskaya *et al.*, 2011). En France, la mise en place d'une norme (IBD) permet de limiter ces erreurs par la description d'un protocole précis pour l'échantillonnage, la préparation des lames de détermination et l'analyse taxonomique des lames (AFNOR, 2007a). Cependant, il existe une grande variabilité dans l'analyse selon les opérateurs, due à des incertitudes taxonomiques (Besse-Lototskaya *et al.*, 2011). En effet, certaines espèces présentent des variabilités morphologiques dues à des conditions environnementales différentes (Kociolek and Stoermer, 2010) ou encore des morphologies proches alors que les préférences écologiques sont très différentes (Vanelslander *et al.*, 2009).

De plus, l'évolution rapide de la taxonomie est un problème majeur, puisque les nouvelles espèces décrites chaque année doivent être intégrées régulièrement dans les outils de bioindication (routine de calcul des indices et logiciel OMNIDIA<sup>®</sup>). La détermination nécessite donc une mise à jour constante de la bibliographie et de nombreux ouvrages sont nécessaires d'autant plus que des divergences peuvent exister selon les auteurs.

Un autre inconvénient résiderait dans la non distinction des valves mortes et vivantes lors du comptage, ce qui rend ces indices incapables de révéler des pollutions toxiques aiguës. Gillett *et al.* (2009) ont démontré la robustesse taxonomique des comptages prenant en compte toutes les valves sans distinction, même s'ils ont noté une perte de fiabilité écologique dans des petites rivières de montagne. Enfin, certaines espèces ne pouvant être différenciées que par une observation en microscopie électronique à balayage (MEB), coûteuse et chronophage, l'usage de la microscopie optique en routine sous-estime la diversité spécifique de certaines communautés (Figure 9).

*Reimeria uniseriata* vs. *Reimeria sinuata*

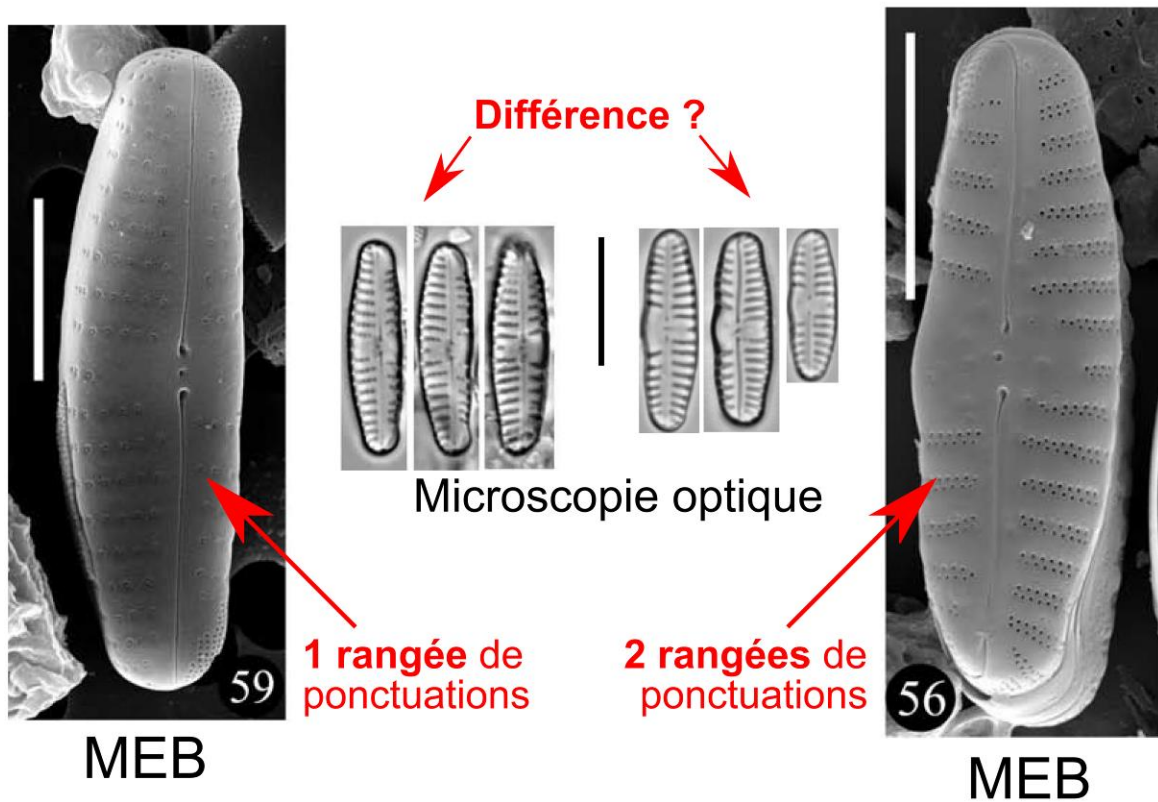


Figure 9 : Difficultés d'identification typiquement rencontrées en microscope optique.

Source : C. Cejudo Figueiras, S. Coulon et Levkov and Ector (2010).

### III. L'assèchement, les stress associés et les microalgues benthiques

#### 1. Résumé de la synthèse bibliographique

L'assèchement est un phénomène naturel d'intensité variable (Larned *et al.*, 2010). Il peut être considéré comme une perturbation, arrivant de façon brutale ou progressive (Lake, 2000) et soumettre les organismes à un stress de dessiccation suite à leur émergence. Les organismes non fixés peuvent éviter physiquement ce stress en se déplaçant (poissons, macroinvertébrés) mais les organismes fixés (microalgues) sont contraints de développer d'autres stratégies pour survivre. Les régions à climat méditerranéens, présentes dans différentes parties du monde, voient leurs écosystèmes aquatiques particulièrement exposés à ce stress (Bonada and Resh, 2013). Dans un contexte de pressions anthropiques toujours plus importantes, la non-permanence des cours d'eau est au centre des préoccupations environnementales puisqu'elle devrait s'amplifier avec le changement climatique global annoncé (Sabater, 2008; Sabater and Tockner, 2010; Datry *et al.*, 2014).

La rythmicité de l'exposition au stress d'émergence entraîne une variabilité spatiale et temporelle très importante, que ce soit dans les cours d'eau ou dans les zones de balancement des marées. Malgré ces rythmes, les stratégies développées par les microorganismes photosynthétiques peuvent être similaires (*i.e.* production de mucilage) ou spécifiques d'un milieu donné (*i.e.* migration des individus dans le sable).

Ce projet d'article présente successivement (i) les différentes stratégies développées par les microalgues pour survivre à la dessiccation, (ii) les stress fréquemment associés en milieux dulçaquicoles et marins, et (iii) les processus de recolonisation algale du substrat après la disparition du stress sont synthétisés.

Les microalgues sont capables de survivre au stress de dessiccation grâce à 5 stratégies majeures, de l'échelle de la cellule à celle de l'agrégat : des ajustements physiologiques cellulaires réversibles (épaississement des parois cellulaires, baisse de leur activité de croissance, augmentation de leurs réserves lipidiques, etc.) (Davis, 1972; Morison and Sheath, 1985); la production de formes de résistance (« *resting spores* » ou dormance des cellules) (Coleman, 1983; McQuoid and Hobson, 1996; Agrawal, 2009) ; la migration verticale (dans les substrats meubles et au sein des biofilms) (Hay and Paterson, 1993; Consalvey *et al.*, 2004); la production de mucilage (matrice d'exopolysaccharides) (Shephard, 1987; Du *et al.*, 2010b) et la présence de couches cellulaires protectrices superficielles (Hawes *et al.*, 1992a; Decho, 2000).

Différents stress sont souvent associés au stress d'assèchement tels que le stress osmotique dû à la salinité, le stress lié aux radiations UV, la pression de broutage par les

consommateurs de microalgues benthiques, le stress lié à des températures extrêmes et différents autres types de stress tels qu'une faible concentration en nutriments ou de fortes concentrations en polluants (métaux lourds). Tous ces stress ont un effet cumulatif par rapport au stress d'assèchement et peuvent en être soit la cause, soit la conséquence. Ainsi, le majeur problème des organismes face au stress de salinité est de maintenir la turgescence cellulaire par des modifications physiologiques (synthèse d'osmolytes, synthèse d'une matrice d'exopolysaccharides, baisse de l'activité métabolique) (Sudhir and Murthy, 2004; Eggert *et al.*, 2007; Touchette, 2007). Le rôle des pigments caroténoïdiens est important pour la protection contre les radiations des UV et permet la protection des cellules par le phénomène de photoinhibition (Davis, 1972; Holzinger and Lutz, 2006; Rastogi *et al.*, 2010). Le contrôle « top-down » par les brouteurs est un important facteur de contrôle des communautés algales benthiques pouvant être influencé par la fragmentation des cours d'eau, en concentrant par exemple les brouteurs dans un volume d'eau réduit, ce qui augmente les densités et donc perturbe les interactions (Peterson and Boulton, 1999; Bergey *et al.*, 2010; Ledger *et al.*, 2013). La survie au stress de température passe par des ajustements métaboliques et des adaptations morpho-fonctionnelles (Rousch *et al.*, 2004; Hunt and Denny, 2008; Agrawal and Gupta, 2012).

Enfin, lorsque le stress d'assèchement disparaît, les communautés algales en place peuvent recoloniser le milieu avec une efficacité (aux sens cinétique et amplitude) variable. La durée de l'assèchement, la morphologie du lit des cours d'eau, la disponibilité en nutriments ou les sources algales pour la recolonisation sont autant de facteurs qui influencent cette efficacité (Blinn *et al.*, 1995; Romaní *et al.*, 2012). Les sources algales sont généralement issues de différents refuges tels que les flaques, le biofilm sec et / ou la dérive dans la colonne d'eau (Robson, 2000; Robson and Matthews, 2004; Robson *et al.*, 2008). Les vitesses de dessiccation ou de réhydratation peuvent également jouer un rôle dans l'efficacité de recroissance des biofilms (Benenati *et al.*, 1998; Dahm *et al.*, 2003). L'efficacité de recroissance algale décrite dans diverses études, peut être totale ou partielle et influencée par la durée de l'assèchement. Elle peut prendre de quelques minutes en milieu marin à plusieurs jours en milieu dulçaquicole (Dodds *et al.*, 1996; Schreiber *et al.*, 2002; Holzinger and Karsten, 2013).

Cette synthèse bibliographique montre une grande plasticité des microalgues face aux différents stress que les communautés peuvent subir. En effet, une résilience fonctionnelle est observée malgré une résilience structurelle qui n'est pas toujours avérée. En effet, les écosystèmes peuvent supporter des perturbations avec une grande plasticité jusqu'à l'atteinte d'un seuil irréversible. Il est donc nécessaire de poursuivre les études dans ces

milieux afin de mieux comprendre les réponses des communautés durant et après ces stress et les intégrer dans les politiques de gestion mises en place.

**2. Article I, en préparation.**

**“Desiccation, Associated Stresses and Benthic Microalgae: a Review”**

Amélie BARTHÈS<sup>1,2,3</sup>, Joséphine LEFLAIVE<sup>1,2</sup>, Jean-Luc ROLS<sup>1,2</sup> and Loïc TEN-HAGE<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Université de Toulouse ; INP, UPS ; EcoLab (Laboratoire Ecologie Fonctionnelle et Environnement) ; 118 Route de Narbonne, FR-31062 Toulouse, France

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

<sup>3</sup>ASCONIT Consultants, Site Naturopôle, 3 Boulevard de Clairfont, FR-66350 Toulouges, France

Correspondence: Joséphine Leflaive, Université de Toulouse, INP, UPS, EcoLab (Laboratoire Ecologie Fonctionnelle et Environnement), 118 Route de Narbonne, 31062 Toulouse, France, e-mail : [josephine.leflaive@univ-tlse3.fr](mailto:josephine.leflaive@univ-tlse3.fr). Phone: +33 (0) 5 61 55 85 49; fax: +33 (0) 5 61 55 89 01.

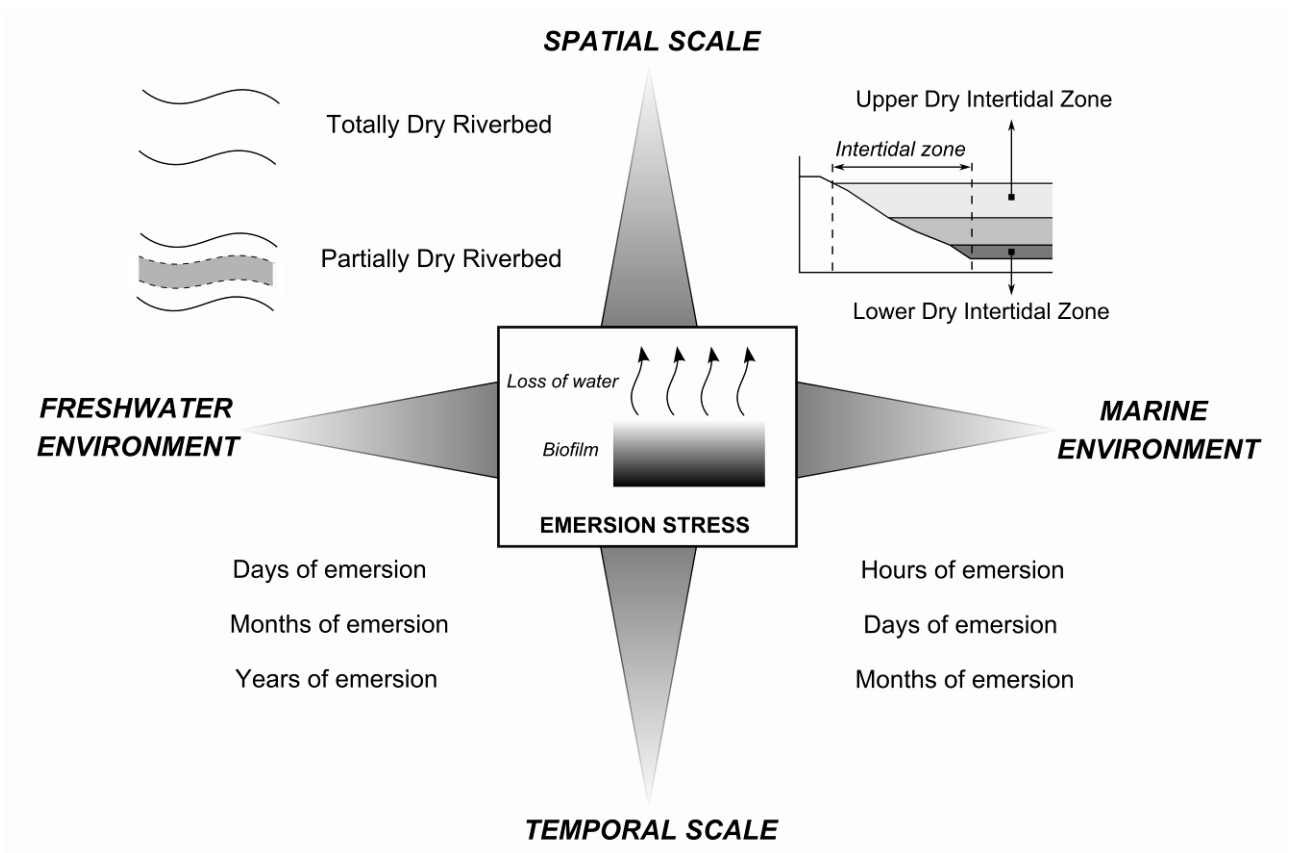


### **Abstract**

We tackle several aspects of desiccation on benthic microalgae (forming biofilms) from freshwater and marine environments. After highlighting the different contexts leading to such a stress (intertidal area with high periodicity and short dry periods; benthic microalgae in non permanent streams with low periodicity and long dry periods), we present the different strategies employed by cells, individuals and biofilms in order to resist to the direct effects of emersion stress. Secondly, we discuss the other stresses frequently associated with desiccation stresses (increase of salinity, increase in UV-B radiation, high and low temperatures, increase of grazer pressure and pollution) and their consequences from cells to communities. The last part of the manuscript presents the different aspects of algal recovery when the stress is released, in the different contexts.

### **Keywords**

Photosynthetic Microalgae; Benthic Microalgae; Emersion Stress; Desiccation Tolerance; Associated Stresses.



**Figure 10: Gradients of effects of emersion stress in freshwater and marine environments, at temporal (from hours to years) and spatial scales (drying of riverbeds or extent of intertidal zones).**

## Introduction

Drought is a natural event that occurred worldwide with different intensities (Larned *et al.*, 2010). It is considered as a disturbance that can be progressive or brutal (Lake, 2000) and conduct to the emersion of aquatic organisms inducing a desiccation stress. Motile organisms such as fishes or macroinvertebrates can be physically avoiding it but fixed organisms such as microalgae are constrained to find others strategies to survive. In the context of Global Change associated with changes of temperature and precipitations, emersion-stress becomes a central concern (Sabater, 2008; Sabater and Tockner, 2010; Barange *et al.*, 2011). One consequence is the increase of non-permanency that concerns a large amount of streams around the world, most likely more than 50 % of the global river network (Datry *et al.*, 2014) mostly localized in headwaters (Lowe and Likens, 2005). Mediterranean regions, in different parts of the world, are particularly exposed to drought and thus microorganisms to emersion stress (Bonada and Resh, 2013). Consequently, the effects of emersion have become a major concern and many studies recently focused on this topic despite the fact that desiccation in intertidal zones (Dring and Brown, 1982; Brown, 1987) and algal resistance forms (Davis, 1972) have been studied for a long time.

Aquatic communities, from bacteria to fishes, including aquatic plants, are subjected to variable emersion duration. Emersion of riverbeds can be partial or total and associated with low frequency and with annual periodicity (Figure 10). In this case, riverbeds can be fragmented and water concentration in pools can lead to an increase in organism densities and to an intensification of biological interactions (competition, predation). In marine environments, organisms are also concerned by emersion stress but they are subjected to a wide range of emersion rhythms. Indeed, emersion constraint is mainly concentrated in intertidal zone where tidal rhythms of shores can vary enormously, from hours or days (Kim *et al.*, 2011) to months or years (Gottlieb *et al.*, 2005), inducing a gradient of emersion pressure from lower to upper zones (Shafer *et al.*, 2007).

Despite these variable emersion rhythms, it might be interesting to compare the responses of freshwater and marine organisms subjected to air exposure owing to the development of similar strategies to survive such a stress, such as mucilage production or strategies specific to particular context such as vertical migration in sand substrata in intertidal areas. It should be noted that it is hard to isolate desiccation stress from others associated stresses of which they are either the effect (*i.e.* temperature increase) or the consequence (*i.e.* salinity). The physiological or behavioral responses of organisms to emersion stress are thus rather the response to a combination of several stresses. For these reasons, we have devoted a part of this review to the description of those stresses which can be specific or not to a given environment. In addition, consider the entire photosynthetic microorganisms in marine and

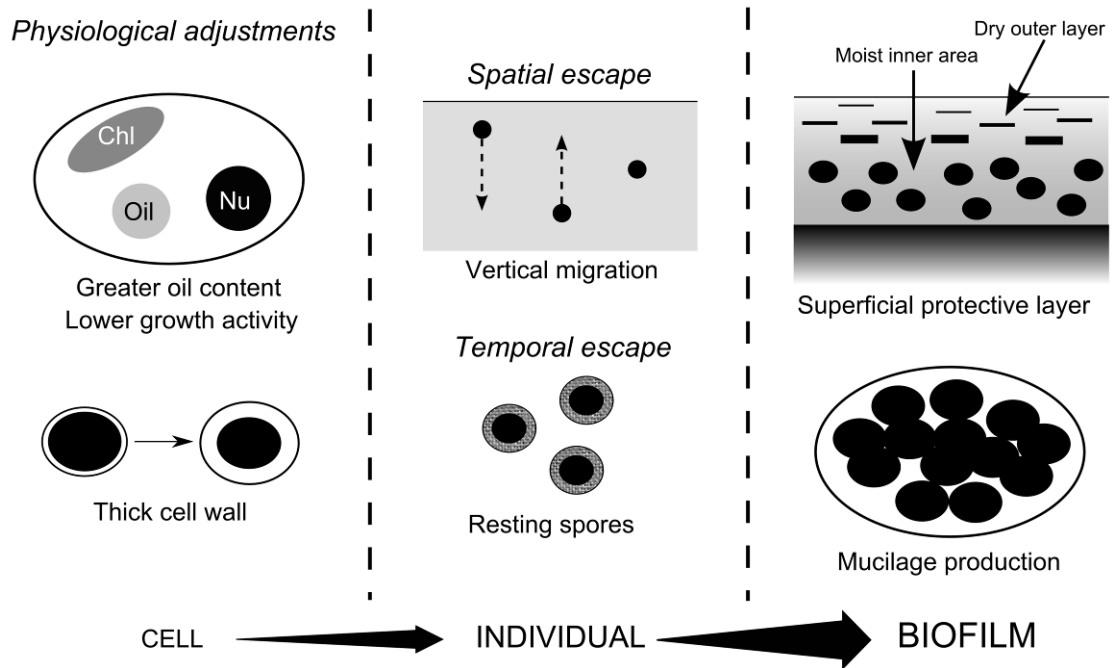


Figure 11: The different strategies used by benthic microalgae to survive desiccation, from cellular-scale to biofilm-scale.

freshwater environments allow a global view of developing strategies to survive and communities recovery after the stress removal.

The objectives of our review are to bring an overview of the effects of emersion stress on photosynthetic microorganisms in both freshwater and marine environments. In this purpose, several aspects will be tackled: (i) the different resistance strategies developed by microalgae to survive emersion stress, (ii) the stresses frequently associated with emersion and (iii) the algal abilities during post-emersion recovery, including the influence of desiccation velocities and structural and functional resilience.

### **Direct effects of emersion stress on benthic microalgae**

Plants and animals living in arid or periodically arid environments may face the challenge of desiccation and physiological or behavioral adaptations to withstand these periods are therefore necessary to ensure survival. For these reasons, different strategies are used by benthic algae (Figure 10).

Terrestrial algae, particularly in a frigid environment, freshwater algae in shallow waters and littoral marine algae are the most subjected to desiccation (Davey, 1989; Trainor and Gladych, 1995; Abe *et al.*, 2001; Rautio *et al.*, 2011). The presence of resistance against desiccation seems to be widespread among microalgae. Indeed, Davis (1972) has described desiccation resistance for more than 138 species of green algae, 60 species of Cyanobacteria, 36 species of diatoms and 23 taxa of algae from other groups. Later, Bewley (1979) has developed general aspects of desiccation resistance in various biological compartments (algae, lichens, fungi, plants). Recent molecular and biochemical studies suggest that there are multiple physiological mechanisms of tolerance (Charrier *et al.*, 2012) but that nevertheless, growth rates can be severely slowed down by physiological constraints (Alpert, 2000; Alpert, 2005). Indeed, desiccation always induces, at a given time, a cessation of growth and photosynthesis (Fogg, 2001). Here, we present five key strategies, from cellular-scale to biofilm-scale that can occur separately or combined (Figure 11).

On a cellular-scale, the main strategy described in literature is the possibility of intracellular physiological adjustments such as the thickening of cell walls, lower growth activity or a greater oil content, adaptations that are reversible when constraints disappear (Lund, 1954; McCandless, 1981; Morison and Sheath, 1985; Jacob *et al.*, 1992). McQuoid and Hobson (1996) described resting stages of diatoms and referred to the individuals presenting these physiological adjustments without notable morphological modification as “resting cells”, as opposed to “resting spores” (see below). Coleman (1983) has described a similar strategy in green algae, where he observed “dormant cells”. The thickening of the cell wall is a structural maintenance allowing algae to survive desiccation by mechanical strengthening. This helps

the cells to avoid collapsing when water is removed during emersion periods (Levitt, 1980; Chang *et al.*, 2007). The accumulation of intracellular solutes allows the cell turgor pressure to be maintained and balances the increase of environmental osmotic pressure (Welsh, 2000). With regard to oil content, Rajendran *et al.* (2007) have demonstrated that the quality of fatty acids contained in the cells of the terrestrial *Tolypothrix scytonemoides* significantly differed between cells subjected and cells not subjected to desiccation. Holzinger and Karsten (2013) reviewed the desiccation stress and tolerance in terrestrial green algae. They observed the existence of strongly undulating cross-walls on desiccated samples of *Klebsormidium* suggesting a high degree of mechanical flexibility facilitating the maintenance of the structural state in dry conditions and pointed out the need of further knowledge on the ability to molecular mechanisms to withstand desiccation. Also, Lewis and Trainor (2012) demonstrated that the survival of green algae *Protosiphon botryoides* in dried soil for 43 years was associated with the presence of large cells with tubular extensions, small aplanospores and warty cells interpreted as zygotes.

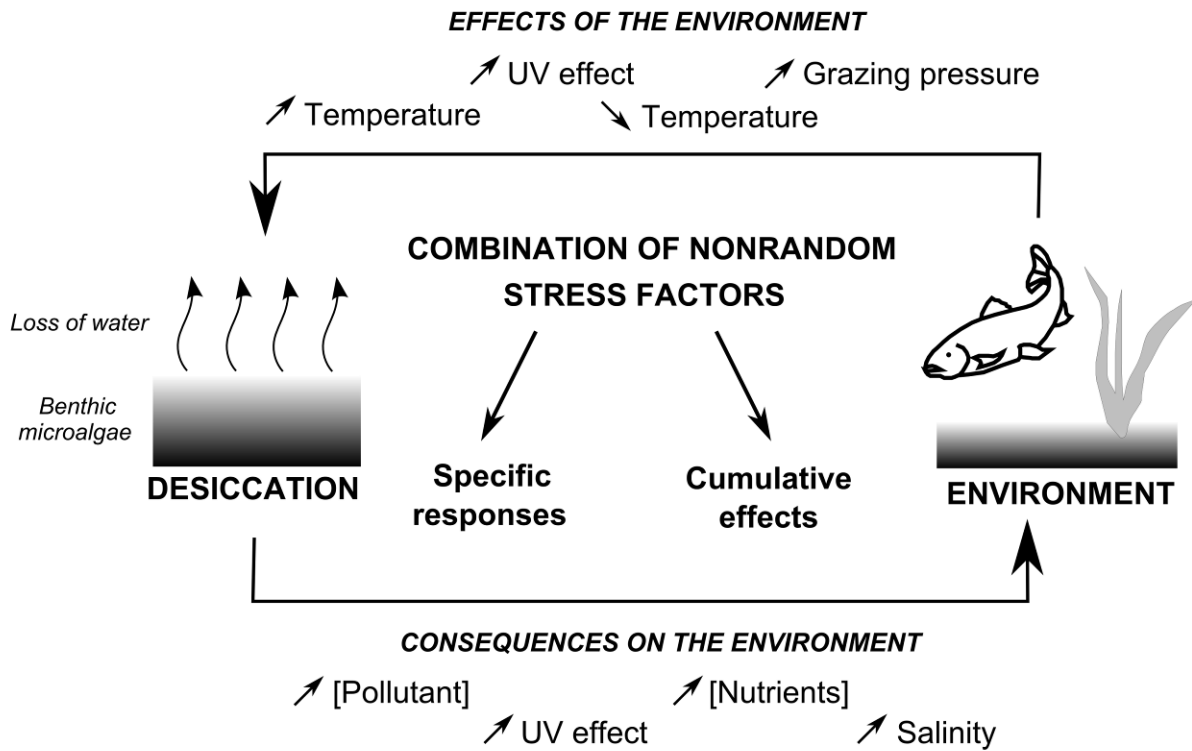
On an individual-scale, 2 others strategies were developed: the production of resting spores as temporal escape and the migration of individuals as spatial escape.

The formation of resting spores occurs when environmental conditions are not propitious to growth. Agrawal (2009) and Evans (1958) described the different algal forms resistant to water stress (akinetes, zygospores, oospores or cysts) and the incidence on spore germination. Resting spores in freshwater algae are uncommon compared with marine algae thus freshwater algae are subjected to higher mortality when exposed to desiccation (Hargraves and French, 1983; Round *et al.*, 1990). They have been described in a few freshwater diatom species *Melosira italica* in lakes (Lund, 1954), *Diatoma anceps*, *Lemnicola hungarica*, *Meridion circulare* (Hargraves and French, 1983) and four benthic species of the genera *Eunotia* (Von Stosch and Fecher, 1979). In contrast to vegetative cells, the spores in dormancy are able to survive for numerous years, in conditions of darkness, extreme temperature and desiccation (Von Stosch and Fecher, 1979). Most of the diatom forming resting spores are distributed in temperate latitudes (Hargraves and French, 1983) and particularly those that can survive desiccation for a long time on rocky substrates or soil (Round *et al.*, 1990). These algal spores can also be transported and disseminated in various ways such as water, air, animals (Brown *et al.*, 1964; Coste and Ector, 2000). Recently, Souffreau *et al.* (2013) tested the desiccation tolerance of resting cells and vegetative cells in 17 benthic diatoms from a wide range of habitats subjected to contrasting water permanency. They concluded that resting cells were tolerant to desiccation as opposed to vegetative cells which were highly sensitive. This study focused on the important role of resting spores for algal survival in unfavorable conditions. Klochkova and Kim (2005)

observed particular dormant spores of the green algae *Chlorella* sp., with ornamentations, in emersion conditions.

The second strategy developed to survive to desiccation at individual-scale may be vertical migration, which has been mainly observed in the case of marine diatoms growing on soft substrates (sand, mud). Hay and Paterson (1993) studied the diatom migration through substrates in intertidal mudflats and have shown that physical disturbance can induce downward migration. This may be linked to two opposed gradients of light and water content. Moreover, Jesus *et al.* (2006) have shown, with PAM fluorescence, a stronger tendency for downward migration of diatom cells towards the end of the emersion period in sand substrates, in intertidal areas. Also, Cartaxana *et al.* (2006) have shown that the vertical distribution of microphytobenthos was different in muddy and sandy sediment due to invertebrate activity, current and/or light penetration. The effects of sediment grain size and light on diatom migration have been highlighted by Du *et al.* (2010a). They have also shown that the migration is species-specific and depends on the cell morphological characteristics: narrow frustules can move more quickly than hemispherical frustules. Similarly, Du *et al.* (2010b) showed an evident migration rhythm in microphytobenthos with a migration into the surface sediment during emersion and to the deeper sediment during high tide submersion. This rhythm was modified when the microphytobenthos formed biofilms, with mucilage production that enhance the protection of cells against disturbances. Also, Consalvey *et al.* (2004) reviewed the marine diatom cells migration and suggested a cycling migration within the biofilm to maximize their overall fitness. Along with diatoms, cyanobacteria are an important part of biofilm in tropics and temperate latitudes wetlands. Häder *et al.* (1998) have also shown their ability to migrate within the biofilm to optimize their position in the community in function of UV-B radiation. The same type of strategies may be used to avoid desiccation despite of a lack of evidence in this research area.

Though mostly unicellular organisms, benthic microalgae organize themselves in complex systems, the biofilms. Beyond the strategies of resistance to desiccation centered on the cell, some involve this higher level of organization. It consists of the production of mucilage and the presence of superficial protective layers. Peterson (1987b) has shown the importance of mucilage production (EPS) in the resistance of algae to emersion periods. In stress situation, this production can promote algal immigration on rocks to refuge zones, and it favors the retention of moisture in the biofilm. Shephard (1987) and Hoagland *et al.* (1993) have shown that mucilage production acts as a reservoir for water even if mucilage have also other important role for microalgae as motility (Edgar, 1983; Pickett-Heaps *et al.*, 2001) or adhesion to substrates (Higgins *et al.*, 2003; Molino and Wetherbee, 2008). Tamaru *et al.* (2005) have also shown the role of EPS in heat tolerance in desiccated state of the



**Figure 12: Effects and consequences from environment to desiccation of benthic microalgae and associated stresses. They are due to a combination of nonrandom stress factors that induced specific responses or cumulative effects of benthic microalgae.**



cyanobacteria *Nostoc commune* and Jacob *et al.* (1992) in the water loss avoidance for the green algae *Prasiola*. In the same way, Knowles and Castenholz (2008) clearly demonstrated the role of EPS in desiccation tolerance released by phototrophic cyanobacteria *Nostoc* sp. on similar and neighboring microbial communities composed of the green algae *Chlorella* sp. and the cyanobacteria and *Chroococcidiopsis* sp. As seen above, Du *et al.* (2010b) showed that mucilage production can protect marine algal cells against disturbances by biofilm formation and different authors described the ability of EPS to retain moisture in intertidal biofilms during emersion periods (Potts, 1994; Potts, 1999; Decho, 2000).

This biofilm formation is linked to the second strategy demonstrated by Hawes *et al.* (1992a) with the cyanobacteria *Nostoc* and *Phormidium*. The latter avoid osmotic stress by taking refuge inside the biofilm, the surface layer acting as a protection for deep layers. This strategy is relevant only when biofilms are thick enough, *i.e.* in an undisturbed mature population (climax), a rare situation in the natural environment. The same mechanism has been observed for the marine intertidal turf algae *Endocladia*. During emersion periods, the clump center of this algae remains hydrated longer than the clump edge, which acts as a protection (Hunt and Denny, 2008). Also, Decho (2000) reviewed the role of EPS in microbial biofilms in intertidal areas and demonstrated their importance to tolerate physical stress such as desiccation.

These two strategies can be combined and allow a protected mode of growth for microorganisms *via* the production of adhesive extracellular polymeric substances and the adhesive three-dimensional structure of biofilm (Prakash *et al.*, 2003).

The strategies developed by microalgae induced by direct emersion stress are presented on three levels: cellular, individual and biofilm. In most cases, desiccation was not the only disturbance applied to marine and freshwater algae as it was often coupled with others stresses such as UV-light, salinity or temperature.

### **Emersion and frequently associated stresses**

As seen above, emersion stress is very often associated with others stresses, being either an effect or a consequence of these phenomena (Figure 12). For instance, on a small spatial scale, emersion may induce osmotic stress due to solute concentration, increase of UV radiation and pollutant concentration and on a higher scale it may cause ecosystem fragmentation and higher grazer pressure. On the other hand, temperature increase favors emersion periods so that both phenomena frequently co-occur. Low temperatures also induce desiccation stress, as frozen water is not available for the microorganisms.

### *Salinity stress*

Salinity is one of the main environmental factor that defines the structural and functional characteristics of aquatic habitats (Hart *et al.*, 1991; Telesh *et al.*, 2013) and can alter photosynthesis processes (Sudhir and Murthy, 2004). This osmotic stress was reviewed in animals (tardigrades, Mobjerg *et al.* (2011); fish, Schulte (2014)) and plants (Feng *et al.*, 2013; Kumar *et al.*, 2013) where inorganic and organic osmolytes seem to play a key role in osmotic adjustments (Chen and Jiang, 2010). Recently, several studies focused on the joint effects of salinity and emersion in plants (Lokhande *et al.*, 2013; Gollmack *et al.*, 2014; Zhu and Gong, 2014), and seaweeds (Karsten, 2012), mainly in marine environments. For instance on macroalgae, Kirst (1990) reviewed the salinity stress and compared it to an emersion stress as their effects are cumulative. Also, emersion stress and salt induce similar responses in plants, increasing their ability to take up water and to reduce growth rate (Munns, 2002). On seagrasses, salt conditions inhibit photosynthesis and resistance occurs by physiological mechanisms such as vacuolar ion sequestering and cytosolic osmolytes accumulation and rigidity of cell walls (Touchette, 2007).

Microbial communities showed structural and functional resilience depending on the salinity regimes or disturbances, as shown for bacteria (Baho *et al.*, 2012) and for cyanobacterial mats and bacteria in intertidal zone (Abed *et al.*, 2007). Indeed, the latter showed an inverted gradient in the dominance of cyanobacterial mats (lower zone) and bacterial mats (upper and middle zone) in the intertidal area. The EPS also play an important role in withstanding the salinity pressure by forming an adhesive protective layer on detrital surfaces and on individual sediment particles acting as an stabilization anchor for cells (Decho, 2000).

The osmolytes production is a widespread mechanism used by organisms to withstand salinity stress that was present in some algal groups. For instance, this stress was also documented on the red microalgae *Bangiopsis subsimplex* in contrast to sorbitol levels that rose with increasing environmental salinities and demonstrated an osmolyte function (Eggert *et al.*, 2007). Gustavs *et al.* (2010) described the synthesis and accumulation of C5 polyol-ribitol in response to osmotic stress in the aeroterrestrial green algae studied. The study of the green algae *Scenedesmus quadricauda* showed diverse physiological and biochemical responses to salinity stress (Kirrolia *et al.*, 2011). Indeed, the authors subjected algal cells to NaCl concentration from 0.2 to 1.0 mM over a period of 15 days and they showed that biomass and chlorophyll contents decreased as the salinity increased whereas the lipid accumulation showed a decrease before increasing with salinity concentration. They concluded that adaptation of this green algae to salinity was characterized by a variability in the accumulation of chlorophyll, carbohydrates and proteins. Also, various responses to salt

stress were found as an increase in carotenoids content in response to high salinity in *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Schubert *et al.*, 1993).

Salinity stress was better documented on diatoms. Apoya-Horton *et al.* (2006) described a negative impact of salt stress on the motility of diatom *Cylindrotheca closterium* in hypo- and hypersaline conditions, due to structural modification in EPS. Later on the same species, Araujo *et al.* (2013) showed that the diatom developed two types of response according to the level of stress: the avoidance of stress by drift (strong stress, spatial escape) and the growth inhibition (low stress, temporal escape). In addition, diatoms from marine hypersaline environments showed strong evolutionary adaptations to salt stress since they tolerate a 3-times increase of their optimal salinity. Salinity is also a useful parameter in routine sampling to evaluate the biological water quality with diatoms which emphasizes its structural role on communities (Van Dam *et al.*, 1994).

Marine cyanobacteria *Anabaena aphanizomenoides* and *Cylindrospermopsis raciborskii* have shown rapid acclimation to salinity stress after various duration of exposure which pointed to the necessity of developing studies on cyanobacteria (Moisander *et al.*, 2002).

#### *UV stress*

The effects of UV radiation on the different compartments of aquatic were well-reviewed by (Häder, 2001). Recently, Holzinger and Lutz (2006) overviewed the UV effects on the ultrastructure and the related metabolic functions of benthic algae and Maria Fernanda (2012) published a full review on the harmful effects of UV-A and UV-B on microalgae, macroalgae, macrophytes and plants in freshwater, coastal and marine environments. This stress shapes benthic algal communities, particularly UV-B owing to their toxicity for cells, which affects zonation, composition and diversity (Zaneveld, 1969; Zacher *et al.*, 2007; Guenther and Martone, 2014). Davis (1972) described the production of special pigments to protect chloroplasts from UV radiation upon emersion. He reviewed the existence of carotenoid pigments dissolved in cytoplasm fat droplets which act as a protection from the strong radiation. This mechanism is called photoinhibition since the light excess induces an inhibition of photosystem II to protect the cell from photosynthesis saturation. The main role of carotenoids is to act as chemical buffers against photooxydation but they also allow the dissipation of the excess energy induced by the saturation of light *via* heat or fluorescence, as reviewed by Choudhury and Behera (2001). The photoprotective role of carotenoids has been largely described in literature from Siström *et al.* (1956) to Juvany *et al.* (2014). Recently, Rastogi *et al.* (2010) reviewed the photoprotective compounds of marine organisms such as mycosporine-like amino acids (the most widespread in marine areas), scytonemin, carotenoids and other unknown compounds.

Experimental studies on the green alga *Micrasterias denticulata* revealed a strong resistance to UV irradiance, notably through physical avoidance of cells by motility, production of thick mucilage or slime layer (Lutz *et al.*, 1997). Another study focused on the Antarctic filamentous algae *Zygnema* which is exposed to a strong UV light due to ozone depletion (Pichrtova *et al.*, 2013). The authors demonstrated that phenolic compounds were involved in UV protection, probably associated with other protective mechanisms such as cell wall compounds modification or mucilage production. In some cyanobacteria and green algae, Agrawal and Pal (2003) showed that cell-wall characteristics or cell-sap osmotic properties were dependent of UV light tolerance. Sundback *et al.* (1997) studied diatom mats and described an impact on diatom motility by enhanced UV-B radiation and vertical migration which seemed to be a key mechanism in UV-B exposure (see paragraph above). Microalgae are highly dependent to light conditions in Antarctic, and then directly exposed to seasonal fluctuation as desiccation which induced structure modification in the context of climate change (WynnWilliams, 1996).

#### *Temperature stress*

Most steps of the algal life cycle (germination, growth, spore production) require an optimal range of temperature that is a significant environmental factor regulating survival (Agrawal, 2009). Nevertheless, as reviewed by Davis (1972), some algae are tolerant to extreme temperatures. The survival record of extreme temperatures found in literature varied from -296°C during 7.5 hrs for green, yellow-green, diatoms, and flagellate protists *Euglena* to 130°C during 1 hr for algae belonging to *Chlorella* and *Chlorococcum* genera, in laboratory experiments. However, these conditions are not frequent in the environment and the temperature optimum to ensure cell division and photosynthesis varied from 0° C for *Skeletonema costatum* to 36 °C for cyanobacteria or diatoms (Renaud *et al.*, 2002; Ras *et al.*, 2013).

Cruces *et al.* (2012) reviewed the intertidal macroalgal resistance to heat stress with climate change and outlined the potential role of stress proteins in ecophysiological responses after this stress. These responses were associated with other important aspects such as rapid metabolic adjustments (high thermotolerance of photosynthesis) and morphofunctional adaptations (high area / volume ratio). As a consequence of these adaptations, the temperature-size rule for which warmer conditions promote smaller body sizes is not respected by diatoms (Adams *et al.*, 2013). Baker and Bellifemine (2000) showed high tolerance to desiccation and temperature for the process of germination of the cyanobacteria *Anabaena circinalis*. For benthic marine diatoms, Du *et al.* (2012) showed migratory responses to temperature and demonstrated that they were different depending on the species and on photosynthetic capabilities. At low temperatures, in addition to the lack of

water due to freezing, survival depends on the maintenance of adequate levels of metabolic activity for essential life processes, and the avoidance of damage caused by ice formation in living tissues, as reviewed by Block *et al.* (2009) in Antarctic ecosystems. Also, Nelson *et al.* (2013) have found important concentrations of lipid contents for low temperatures close to 0 °C in the yellow green microalgae *Heterococcus* sp. (*Xanthophyceae*). In a freshwater environment, the filamentous algae *Klebsormidium* showed a good resistance to emersion associated with severe cold in the Antarctic, the Arctic and Slovakia (Elster *et al.*, 2008). At high temperatures, fire associated with heat temperature can strongly damage biofilms and recolonization processes (Cowell *et al.*, 2006). Aquatic green algae had a lower survival and higher mortality rate when exposed to a heat shock of 36°C for 5-15 min, 45°C for 5-10 min, and 50°C for 5 min compared to conditions without stress. In the species studied, heat shock induced inhibition of cell division and heterocyst formation, interruption of the zoosporangium formation and disintegration of vegetative filaments (Agrawal and Gupta, 2012). Heat-associated to desiccation showed the cumulative effect on photosynthetic efficiency of intertidal macroalgae (Hunt and Denny, 2008). This stress was evaluated by experimental studies on terrestrial diatom strains which demonstrated that terrestrial diatoms better tolerated abrupt shifts in temperature than freshwater diatom because they were acclimatized to stressful environmental conditions. In aquatic diatoms, the results of Hunt and Denny (2008) were consistent with previous studies where vegetative cells were shown to have no intrinsic protection against freezing, contrary to terrestrial diatoms (Souffreau *et al.*, 2013). In addition to this, species of freshwater diatoms were highly sensitive to abrupt heating (40 % of viable cells dead) and heating with pre-treatment had an effect on tolerance to gradual heating (Souffreau *et al.*, 2010). This kind of algal responses was also observed in the green colonial microalgae *Botryococcus braunii* living in freshwater and brackish environments. Indeed, the desiccation-treated cells shown better tolerance to extreme temperature shifts, from - 20 °C to 40 °C (Demura *et al.*, 2014). In addition, temperature conditions after emersion period can have an influence on the algal recovery. For example, for the drought tolerant cyanobacteria were more rapid and complete at 25 and 35 °C than at 5 and 15 °C, after a dry period of 2 years (Zhao *et al.*, 2008).

At the cellular and membrane levels, heat-shock responses of photosynthetic organisms to the denaturing of proteins by heat were the production of heat-shock proteins. The association of these proteins to membranes induced the modification of membrane structure (Horvath *et al.*, 2012). Rousch *et al.* (2004) studied these proteins in marine diatoms and underlined that constitutive heat-shock proteins induced rapid response to heat whereas in non heat tolerant species, small heat-shock proteins were synthesized and needed a lag to be enrolled. They also showed the modification of membrane properties by these proteins. In

the same way, Rakleova *et al.* (2013) described that UV-B light and heat stress induced differential protein secretion in Antarctic and mesophilic strains of the cyanobacteria *Synechocystis salina* and the green algae *Chlorella vulgaris*. These proteins are specific to a given temperature stress and they reorganized the EPS matrix to tolerate temperature stress. Terrestrial algae were also sensitive to water stress and heat (Agrawal and Pal, 2003) and heat-shock of any level induced similar effects to water stress, depending on cell wall characteristics, morphology and habitats in the cyanobacteria algae (*Aphanothece nidulans*, *Chroococcus minor*, *Gloeocapsa aeruginosa*, *Phormidium foveolarum* and *Scytonema hofmanni*) and green algae (*Hydrodictyon reticulatum*, *Oedogonium sp.*) studied.

The effects of temperature and desiccation stresses induced similar algal responses but they are amplified by the combined effect of both (Agrawal and Pal, 2003).

#### *Grazing pressure*

Emersion stress may indirectly modulate the interactions between photosynthetic microorganisms and their consumers, which are among the main factors controlling microalgae growth and diversity (Power *et al.*, 2008; Power *et al.*, 2013). Impacts of grazers on primary producers have been largely reviewed in recent years. They are important drivers of marine and freshwater food webs and they induce a top-down regulation on primary producers (Borchardt and Bott, 1995; Herman *et al.*, 2001; Van Dam *et al.*, 2002; Thompson *et al.*, 2004; Agrawal, 2009). The relationship between microalgae and their consumers were driven by their nature and their morphological traits. Some studies showed that “high profile” diatoms (resource-unlimited and disturbance-stressed species) were favored by consumers (Peterson, 1987a; Passy, 2007) like species from genera of *Gomphonema* (Rimet *et al.*, 2009) or *Synedra* (Peterson and Boulton, 1999). Also, smaller algae grow faster than larger ones and grazers seems to promote consumption of smaller rather than larger algae (Pouličková *et al.*, 2008). The influence of grazers can be greatly enhanced in low flow conditions because of the habitat fragmentation that concentrate them. They can also modify the periphyton composition owing to their feeding preference (Bergey *et al.*, 2010). Ludlam and Magoulick (2010) underlined this when they obtained unexpected results in a biotic interaction experiment on tiles in a drying stream. In addition, desiccation stress can induce changes in grazing pressure. Indeed, Peterson and Boulton (1999) suggested a peak of primary production after emersion due to cells that resisted desiccation, providing resources which were instantly available for grazers, as well as Dodds *et al.* (1996). Grazers then selected periphyton depending on their food quality and the mats structure and periphyton survived more or less to the grazers gut passage. This induced another selective pressure on algal communities in addition of emersion pressure. They also showed that diatoms in temporary streams were less digestible than those in permanent streams, due to the

degradation of cells by emersion constraint. Similarly, a percentage of diatoms survived after the digestion of grazers but the survival rate also differed among species that suggest an additive effect of emersion for the community structure. Emersion reconfigures stream food webs at all trophic levels (Ledger *et al.*, 2013).

### *Pollution*

The body of literature is largely reviewed on pollution effect on microalgae (e.g. Strandberg and Scott-Fordsmand, 2002; Rimet, 2012; Kumar *et al.*, 2014) whereas it is very limited and recently tackled about the combined effect of emersion stress and pollution. For example, Garcia-Prieto *et al.* (2012) have found higher concentration of arsenic and impact on water quality after drought period. But most interesting results have been found on the cumulative effect of triclosan after an emersion period of 2 days and shown that algae were highly sensitive to triclosan after emersion than those without emersion treatment (Proia *et al.*, 2013). It is crucial for regions concerned by frequent emersions and shown the need to conduct others experiments such as underlined by López-Doval *et al.* (2013) in Mediterranean areas.

### **Recovery during rewetting**

As seen above, emersion, associated with other stresses, drives the structure of algal communities during recovery which could be critical for other levels of food webs (Ledger *et al.*, 2013). Recovery after emersion stress was well studied on the different aquatic compartments among freshwater and marine environments: in bacteria (Marxsen *et al.*, 2010; Shade *et al.*, 2012), in zooplankton and aquatic plants (Brock *et al.*, 2003) and in bryophytes (de Carvalho *et al.*, 2011). The response of algae to rewetting following emersion conditions depends on various factors including whether the emersion broke with a flood, the emersion duration, the nutrient availability, the algal source for recolonization and the streambed morphology as substrates (Blinn *et al.*, 1980; Acuña *et al.*, 2005; Romaní *et al.*, 2012). Discharge is also an important factor controlling benthic communities and can have negative or positive impact on communities (Angradi and Kubly, 1993; Benenati *et al.*, 1998). The spatial-scale is also critical when recovery is studied. Indeed, emersion creates habitat patches by fragmentation of the streambed and Stanley *et al.* (2004) emphasized that large scale approaches could be more relevant to understand the impact of emersion on an ecosystem rather than small-scale studies conducted on only a part of these patches.

Among the factors influencing recovery, refuges act as algal sources for recolonization after emersion stress. These sources of recolonization can be pools (Robson and Matthews, 2004), dry biofilms (Robson, 2000; Barthès *et al.*, submitted) and/or drift (Robson *et al.*, 2008; Barthès *et al.*, 2014). The relative importance of refuges depends on both stream hydromorphology allowing or not allowing connectivity between refuges (Larned *et al.*, 2010;

Mc Donough *et al.*, 2011) and algal species since competitive interactions can modify the community structure (Van der Grinten *et al.*, 2005).

Desiccation velocities also determine the recovery and then the possible adaptation of microbial communities. Considering community structure, Barthès *et al.* (submitted) have shown algal transition from cyanobacteria to diatoms dominance after an emersion episode. They observed the same algal composition transition which not occurred at the same time: during emersion in case of progressive emersion and during rewetting in case of brutal emersion. The latter showed strong effects on benthic algal survival (Benenati *et al.*, 1998; Mosisch, 2001; Ledger *et al.*, 2008) whereas progressive emersion can promote nutrient concentration and thus algal growth after rewetting (Dahm *et al.*, 2003; Romaní *et al.*, 2012). In contrast, Bambakidis (2009) showed that progressive emersion severely and equally affected cellular densities of diatoms, cyanobacteria and green algal communities, but that cyanobacteria and green algae dominated biofilms after 24 h rewetting. Various algal responses are observed about the influence of desiccation velocity on the algal survival. They seem to depend on different factors such as the community composition and the interspecific competition.

Romaní *et al.* (2012) and Barthès *et al.* (submitted) showed that though the impact of emersion on benthic communities was high, it was followed by a rapid recovery of heterotrophic and phototrophic microbial communities. In natural conditions, biofilms can partially maintain their survival rate during emersion thanks to alternative water resources as precipitations (Romaní and Sabater, 1997). This is consistent with the studies of Steinman and Mc Intire (1990) and Biggs (1996) which described diatoms as pioneer species capable of rapid colonization in cleared space after disturbances. Terrestrial green algae showed the same mechanisms which explained that they demonstrated a better recovery rate than aquatic green algae (Holzinger and Karsten, 2013). In marine environments, migration mechanism in sediment or biofilm described above can facilitate or enhance recovery after emersion, by allowing as a refuge for photosynthetic microorganisms such as benthic diatoms (Consalvey *et al.*, 2004) and benthic microalgae (Jesus *et al.* (2006).

The efficiency of biomass recovery was described in several studies in terms of cellular densities, chlorophyll *a* contents and enzymatic activities. Indeed, recovery can be total or partial and is influenced by emersion duration; it can necessitate a range of several minutes in marine environments to several days in freshwater environments. For instance, the return to initial chlorophyll levels after 25 days of emersion was observed within 8 days after rewetting in a prairie stream (Dodds *et al.*, 1996). The algal net growth, measured *via* chlorophyll *a* quantities between the end of rewetting and the end of emersion, was negative in benthic biofilms after 1, 2, or 4 wks of emersion and 13 days of rewetting whereas it was



positive for 8 weeks (about 200 %) which showed a great physiological rebound in response to the emersion constraint . This suggested a selection of tolerant individuals to emersion during the long emersion duration. Another example of the efficiency of biomass recovery was presented by the study of Dodds *et al.* (1996) where algal epilithic production was resilient to emersion and chlorophyll levels reached the same level than before drying after 8 days. Also, recovery was better on rocks than on sediments after 51 days of rewetting (Dodds *et al.*, 1996). In a subtropical lentic ecosystem, Algarte and Rodrigues (2013) described the desiccation and recovery of periphyton biomass and density, *via* dry weight and chlorophyll a contents, and showed that stressed biofilms reached the same state than controls after 10 days of rewetting following 15 hours of desiccation.

From the standpoint of enzymatic activities, in marine environments, Schreiber *et al.* (2002) studied the photosynthetic efficiency of major marine microalgae (diatoms / dinoflagellates, cyanobacteria, green algae) after long durations of desiccation and showed that beachrocks biofilms recovered very rapidly ( $t_{1/2} = 15$  min) under light conditions. In freshwater environments, Romaní and Sabater (1997) described a physiological rebound of biofilm after emersion. They showed that the structure of biofilm allowed it to act as a reservoir of organic matter and to promote cyanobacterial regrowth. Cyanobacteria showed a great recovery capability since *Rivularia* sp. and *Schizothrix* spp. recovered after only 2 hours of rewetting in a Mediterranean stream (Romaní and Sabater, 1997). Cyanobacterial Antarctic mats of *Nostoc* species showed that recovery was quick, at a duration of 10 min following 5 h of emersion, in terms of the respiration and the photosynthesis rate and showed that emersion affected the recovery of enzyme activity that was slower than the chlorophyll rate recovery (Hawes *et al.*, 1992a). *Phormidium* mats were less resistant and did not reach the same photosynthetic activity after 10 days of rewetting but viable propagules were found after prolonged air exposure of 3 years (Hawes *et al.*, 1992a).

Community response to any stress is either resistance or resilience (Bond *et al.*, 2008; Baho *et al.*, 2012). Resistance is the ability of organisms to survive to stress by using adaptive strategies that can be physiological, behavioral or morphological and resilience is characterized by the ability of organisms to recover their functions after the removal of the stress. Resilience of ecosystems is possible by reaching a new steady state or by returning to initial conditions (Holling, 1973; Bond *et al.*, 2008) and can affect aquatic ecosystems where both resistance and resilience can be combined to face a disturbance such as emersion stress. The resistance strategies of several compartments were reviewed in literature: angiosperms (Gaff and Oliver, 2013), aquatic plants (Combroux and Bornette, 2004), bryophytes (Proctor *et al.*, 2007), or intertidal macroalgae (Delgado *et al.*, 1995; Contreras-Porcía *et al.*, 2012; Flores-Molina *et al.*, 2014). From the standpoint of

photosynthetic microorganisms, they are subjected to emersion stress and mostly organized as biofilms which regroup cells enclosed in matrix adherent to each other, to substrates and/or to interfaces. They also regroup association of diverse phylogenetic groups such as fungi, algae, cyanobacteria and heterotrophic bacteria which are in closed relationships and subjected to same stresses (Costerton *et al.*, 1995; Gorbushina, 2007; Nikolaev and Plakunov, 2007). Photosynthetic microorganisms have shown amazing resilience and resistance abilities to emersion and associated stresses. For example, cells of the green alga *Prorosiphon botryoides* were successfully cultivated after 43 years in dry soils (Lewis and Trainor, 2012). Similarly, the cyanobacteria *Nostoc* that is adapted to terrestrial environments, thanks to its extracellular polymeric substance (EPS) is able to remain desiccated during months and years (Dodds *et al.*, 1995; Tamaru *et al.*, 2005).

All these studies highlighted a functional resilience on biofilm after rewetting following emersion episodes, but structural resilience was not as clearly evident. Indeed, Barthès *et al.* (submitted) showed no structural resilience of freshwater benthic algal communities in the mesocosm study and McKew *et al.* (2011) described the same results on microbial communities of saltmarsh environment after 14 days of desiccation. Thus, biofilms demonstrated ecological resilience as defined by Holling (1973) where emersion constraint conducted biofilms to a new steady state.

### **Concluding remarks**

Our review focused on emersion effects on photosynthetic microorganisms of marine and freshwater environments, an essential compartment impacting the entire ecosystem processes owing to their “primary producers” status. Emersion stress is included in a context of global change that recently became a major concern in the world, for both marine and freshwater ecosystems (Sabater and Tockner, 2010; Doney *et al.*, 2012). We underlined the notion of temporal and spatial rhythmicity across temporal variability (minutes to years) and spatial variability (riverbed partially or totally dried or tidal extension) in both environments. This rhythmicity seems to have an influence on the structure and function of biofilms and thereafter on the recovery processes. Effectively, others stresses often associated to emersion induced cumulative effects can be dramatically affect communities. For these reasons, the study of emersion and associated stresses and the subsequent environmental pressures they put on ecosystems is essential in order to arrive at a clearer understanding of processes affecting the productivity of ecosystems and biodiversity. Indeed, ecosystems seem to support disturbance until an irreversible threshold is reached that is focused on the necessity to pursuing the effort of understanding, protection and restoration of ecosystems subjected to emersion and associated stresses in management policies around the world such as in bioindication programmes.

### **Acknowledgements**

We are grateful to the Adour-Garonne Water Agency and ASCONIT Consultants for the project funding and to ANRT for the CIFRE fellowship to A. Barthès.

## References

- Abe S, Kurashima A, Yokohama Y, Tanaka J. (2001). The cellular ability of desiccation tolerance in Japanese intertidal seaweeds. *Botanica Marina* **44**: 125-131.
- Abed RMM, Kohls K, de Beer D. (2007). Effect of salinity changes on the bacterial diversity, photosynthesis and oxygen consumption of cyanobacterial mats from an intertidal flat of the Arabian Gulf. *Environmental Microbiology* **9**: 1384-1392.
- Acuña V, Muñoz I, Giorgi A, Omella M, Sabater F, Sabater S. (2005). Drought and postdrought recovery cycles in an intermittent Mediterranean stream: structural and functional aspects. *Journal of North American Benthological Society* **24**: 919-933.
- Adams GL, Pichler DE, Cox EJ, O'Gorman EJ, Seeney A, Woodward G, Reuman DC. (2013). Diatoms can be an important exception to temperature-size rules at species and community levels of organization. *Global Change Biology* **19**: 3540-3552.
- Agrawal SC. (2009). Factors affecting spore germination in algae - review. *Folia Microbiologica* **54**: 273-302.
- Agrawal SC, Gupta S. (2012). Survival and reproduction of some aquatic green algae facing various stress conditions. *Journal of Algal Biomass Utilization* **3**: 20-26.
- Agrawal SC, Pal U. (2003). Viability of dried vegetative cells or filaments, survivability and/or reproduction under water and light stress, and following heat and UV exposure in some blue-green and green algae. *Folia Microbiologica* **48**: 501-509.
- Algarte VM, Rodrigues L. (2013). How periphytic algae respond to short-term emersion in a subtropical floodplain in Brazil. *Phycologia* **52**: 557-564.
- Alpert P. (2000). The discovery, scope, and puzzle of desiccation tolerance in plants. *Plant Ecology* **151**: 5-17.
- Alpert P. (2005). The limits and frontiers of desiccation-tolerant life. *Integrative and Comparative Biology* **45**: 685-695.
- Angradi TR, Kubly DM. (1993). Effects of atmospheric exposure on chlorophyll a, biomass and productivity of the epilithon of a tailwater river. *Regulated Rivers-Research & Management* **8**: 345-358.
- Apoya-Horton MD, Yin L, Underwood GJC, Gretz MR. (2006). Movement modalities and responses to environmental changes of the mudflat diatom *Cylindrotheca closterium* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology* **42**: 379-390.
- Araujo CVM, Romero-Romero S, Lourencato LF, Moreno-Garrido I, Blasco J, Gretz MR, Moreira-Santos M, Ribeiro R. (2013). Going with the Flow: Detection of Drift in Response to Hypo-Saline Stress by the Estuarine Benthic Diatom *Cylindrotheca closterium*. *Plos One* **8**.

- Baho DL, Peter H, Tranvik LJ. (2012). Resistance and resilience of microbial communities - temporal and spatial insurance against perturbations. *Environmental Microbiology* **14**: 2283-2292.
- Baker PD, Bellifemine D. (2000). Environmental influences on akinete germination of *Anabaena circinalis* and implications for management of cyanobacterial blooms. *Hydrobiologia* **427**: 65-73.
- Bambakidis T. (2009). Changes in benthic algal community structure following an unpredictable stream-wide desiccation event. Bowling Green State University, Bowling Green, OH.
- Barange M, Field JG, Harris RP, Hofmann EE, Perry RI, Werner F. (2011). *Marine Ecosystems and Global Change*. Oxford University Press: New York, United-States.
- Barthès A, Leflaive J, Coulon S, Peres F, Rols JL, Ten-Hage L. 2014. Impact of Drought on Diatom Communities and the Consequences for the Use of Diatom Index Values in the River Maureillas (Pyrénées-Orientales, France). *River Research and Applications*: n/a-n/a. 10.1002/rra.2793.
- Benenati PL, Shannon JP, Blinn DW. (1998). Desiccation and recolonization of phytobenthos in a regulated desert river: Colorado River at Lees Ferry, Arizona, USA. *Regulated Rivers-Research & Management* **14**: 519-532.
- Bergey EA, Bunlue P, Silalom S, Thapanya D, Chantaramongkol P. (2010). Environmental and biological factors affect desiccation tolerance of algae from two rivers (Thailand and New Zealand) with fluctuating flow. *Journal of North American Benthological Society* **29**: 725-736.
- Bewley JD. (1979). Physiological-aspects of desiccation tolerance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **30**: 195-238.
- Biggs B.J.F. (1996). Patterns in periphyton of streams in *Algal Ecology: Freshwater Benthic Ecosystems* (eds. Stevenson RJ, Bothwell ML, Lowe RL), pp. 31-56. Academic Press.
- Blinn DW, Fredericksen A, Korte V. (1980). Colonization rates and community structure of diatoms on three different rock substrata in a lotic system. *Brit Phycol J* **15**: 303-310.
- Block W, Smith RIL, Kennedy AD. (2009). Strategies of survival and resource exploitation in the Antarctic fellfield ecosystem. *Biological Reviews* **84**: 449-484.
- Bonada N, Resh VH. (2013). Mediterranean-climate streams and rivers: geographically separated but ecologically comparable freshwater systems. *Hydrobiologia* **719**: 1-29.
- Bond NR, Lake PS, Arthington AH. (2008). The impacts of drought on freshwater ecosystems: an Australian perspective. *Hydrobiologia* **600**: 3-16.
- Borchardt MA, Bott TL. (1995). Meiofaunal grazing of bacteria and algae in a piedmont stream. *J N Am Benthol Soc* **14**: 278-298.

- Brock MA, Nielsen DL, Shiel RJ, Green JD, Langley JD. (2003). Drought and aquatic community resilience: the role of eggs and seeds in sediments of temporary wetlands. *Freshwater Biol* **48**: 1207-1218.
- Brown MT. (1987). Effects of Desiccation on Photosynthesis of Intertidal Algae From a Southern New-Zealand Shore. *Botanica Marina* **30**: 121-127.
- Brown RM, Larson DA, Bold HC. (1964). Airborne Algae: Their Abundance and Heterogeneity. *Science* **143**: 583-585.
- Cartaxana P, Mendes CR, van Leeuwe MA, Brotas V. (2006). Comparative study on microphytobenthic pigments of muddy and sandy intertidal sediments of the Tagus estuary. *Estuar Coast Shelf S* **66**: 225-230.
- Chang WS, van de Mortel M, Nielsen L, de Guzman GN, Li XH, Halverson LJ. (2007). Alginate production by *Pseudomonas putida* creates a hydrated microenvironment and contributes to biofilm architecture and stress tolerance under water-limiting conditions. *J Bacteriol* **189**: 8290-8299.
- Charrier B, Le Bail A, de Reviere B. (2012). Plant Proteus: brown algal morphological plasticity and underlying developmental mechanisms. *Trends in Plant Science* **17**: 468-477.
- Chen H, Jiang JG. (2010). Osmotic adjustment and plant adaptation to environmental changes related to drought and salinity. *Environ Rev* **18**: 309-319.
- Choudhury NK, Behera RK. (2001). Photoinhibition of photosynthesis: Role of carotenoids in photoprotection of chloroplast constituents. *Photosynthetica* **39**: 481-488.
- Coleman AW. (1983). The roles of resting spores and akinetes in chlorophyte survival. in *Survival strategies of the algae* (ed. Fryxell GA), pp. 1-21. Cambridge University Press, Cambridge.
- Combroux ICS, Bornette G. (2004). Propagule banks and regenerative strategies of aquatic plants. *J Veg Sci* **15**: 13-20.
- Consalvey M, Paterson DM, Underwood GJC. (2004). The ups and downs of life in a benthic biofilm: Migration of benthic diatoms. *Diatom Res* **19**: 181-202.
- Contreras-Porcia L, Callejas S, Thomas D, Sordet C, Pohnert G, Contreras A, Lafuente A, Flores-Molina MR, Correa JA. (2012). Seaweeds early development: detrimental effects of desiccation and attenuation by algal extracts. *Planta* **235**: 337-348.
- Coste M, Ector L. (2000). Diatomées invasives exotiques ou rares en France: Principales Observations effectuées au cours des dernières décennies. *Syst Geogr PI* **70**: 373-400.
- Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-scott HM. (1995). Microbial Biofilms. *Annual Review of Microbiology* **49**: 711-745.

- Cowell AL, Matthews TG, Lind PR. (2006). Effect of fire on benthic algal assemblage structure and recolonization in intermittent streams. *Austral Ecology* **31**: 696-707.
- Cruces E, Huovinen P, Gomez I. (2012). Stress proteins and auxiliary anti-stress compounds in intertidal macroalgae. *Lat Am J Aquat Res* **40**: 822-834.
- Dahm CN, Baker MA, Moore DI, Thibault JR. (2003). Coupled biogeochemical and hydrological responses of streams and rivers to drought. *Freshwater Biol* **48**: 1219-1231.
- Datry T, Larned ST, Tockner K. (2014). Intermittent Rivers: A Challenge for Freshwater Ecology. *BioScience* **64**: 229-235.
- Davey MC. (1989). The Effects of Freezing and Desiccation on Photosynthesis and Survival of Terrestrial Antarctic Algae and Cyanobacteria. *Polar Biol* **10**: 29-36.
- Davis JS. (1972). Survival records in the algae, and the survival role of certain algae pigments, fat, and mucilaginous substances. *Biologist* **54**: 52-93.
- de Carvalho RC, Branquinho C, da Silva JM. (2011). Physiological consequences of desiccation in the aquatic bryophyte *Fontinalis antipyretica*. *Planta* **234**: 195-205.
- Decho AW. (2000). Microbial biofilms in intertidal systems: an overview. *Cont Shelf Res* **20**: 1257-1273.
- Delgado O, Rodriguezprietio C, Frigolagirones L, Ballesteros E. (1995). Drought tolerance and light requirements of high and low sublittoral species of Mediterranean macroalgae of the genus *Cystoseira* C-Agardh (Fucales, Phaephyceae). *Botanica Marina* **38**: 127-132.
- Demura M, Ioki M, Kawachi M, Nakajima N, Watanabe MM. (2014). Desiccation tolerance of *Botryococcus braunii* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) and extreme temperature tolerance of dehydrated cells. *Journal of Applied Phycology* **26**: 49-53.
- Dodds WK, Gudder DA, Mollenhauer D. (1995). The Ecology of *Nostoc*. *J Phycol* **31**: 2-18.
- Dodds WK, Hutson RE, Eichen AC, Evans MA, Gudder DA, Fritz KM, Gray L. (1996). The relationship of floods, drying, how and light to primary production and producer biomass in a prairie stream. *Hydrobiologia* **333**: 151-159.
- Doney SC, Ruckelshaus M, Emmett Duffy J, Barry JP, Chan F, English CA, Galindo HM, Grebmeier JM, Hollowed AB, Knowlton N, Polovina J, Rabalais NN, Sydeman WJ, Talley LD. (2012). Climate Change Impacts on Marine Ecosystems. *Annual Review of Marine Science* **4**: 11-37.
- Dring MJ, Brown A. (1982). Photosynthesis of intertidal brown algae during and after periods of emersion: a renewed search for physiological causes of zonation. *MEPS* **8**: 301-308.

- Du GY, Li WT, Li HB, Chung IK. (2012). Migratory Responses of Benthic Diatoms to Light and Temperature Monitored by Chlorophyll Fluorescence. *Journal of Plant Biology* **55**: 159-164.
- Du GY, Oak JH, Li H, Chung IK. (2010a). Effect of light and sediment grain size on the vertical migration of benthic diatoms. *Algae* **25**: 133-140.
- Du GY, Son M, An S, Chung IK. (2010b). Temporal variation in the vertical distribution of microphytobenthos in intertidal flats of the Nakdong River estuary, Korea. *Estuar Coast Shelf S* **86**: 62-70.
- Edgar LA. (1983). Mucilage Secretions of Moving Diatoms. *Protoplasma* **118**: 44-48.
- Eggert A, Nitschke U, West JA, Michalik D, Karsten U. (2007). Acclimation of the intertidal red alga *Bangiopsis subsimplex* (Stylonematophyceae) to salinity changes. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **343**: 176-186.
- Elster J, Degma P, Kovacik L, Valentova L, Sramkova K, Pereira AB. (2008). Freezing and desiccation injury resistance in the filamentous green alga *Klebsormidium* from the Antarctic, Arctic and Slovakia. *Biologia* **63**: 843-851.
- Evans JH. (1958). The survival of freshwater algae during dry periods. Part I: an investigation of the algae of five small ponds. *J Ecol* **46**: 149-168.
- Feng RW, Wei CY, Tu SX. (2013). The roles of selenium in protecting plants against abiotic stresses. *Environ Exp Bot* **87**: 58-68.
- Flores-Molina MR, Thomas D, Lovazzano C, Nunez A, Zapata J, Kumar M, Correa JA, Contreras-Porcia L. (2014). Desiccation stress in intertidal seaweeds: Effects on morphology, antioxidant responses and photosynthetic performance. *Aquatic Botany* **113**: 90-99.
- Fogg GE. (2001). Algal Adaptation to Stress — Some General Remarks. in *Algal Adaptation to Environmental Stresses* (eds. Rai L, Gaur J), pp. 1-19. Springer Berlin Heidelberg.
- Gaff DF, Oliver M. (2013). The evolution of desiccation tolerance in angiosperm plants: a rare yet common phenomenon. *Funct Plant Biol* **40**: 315-328.
- Garcia-Prieto JC, Cachaza JM, Perez-Galende P, Roig MG. (2012). Impact of drought on the ecological and chemical status of surface water and on the content of arsenic and fluoride pollutants of groundwater in the province of Salamanca (Western Spain). *Chemistry and Ecology* **28**: 545-560.
- Golldack D, Li C, Mohan H, Probst N. (2014). Tolerance to drought and salt stress in plants: unraveling the signaling networks. *Front Plant Sci* **5**.
- Gorbushina AA. (2007). Life on the rocks. *Environ Microbiol* **9**: 1613-1631.
- Gottlieb A, Richards J, Gaiser E. (2005). Effects of desiccation duration on the community structure and nutrient retention of short and long-hydroperiod Everglades periphyton mats. *Aquatic Botany* **82**: 99-112.



- Guenther RJ, Martone PT. (2014). Physiological performance of intertidal coralline algae during a simulated tidal cycle. *J Phycol* **50**: 310-321.
- Gustavs L, Eggert A, Michalik D, Karsten U. (2010). Physiological and biochemical responses of green microalgae from different habitats to osmotic and matric stress. *Protoplasma* **243**: 3-14.
- Häder DP. (2001). Adaptation to UV Stress in Algae. in *Algal Adaptation to Environmental Stresses* (eds. Rai L, Gaur J), pp. 173-202. Springer Berlin Heidelberg, Erlangen, Germany.
- Häder DP, Kumar HD, Smith RC, Worrest RC. (1998). Effects on aquatic ecosystems. *J Photochem Photobiol, B* **46**: 53-68.
- Hargraves PE, French FW. (1983). Diatom resting spores: significance and strategies. in *Survival strategies of the algae* (ed. Fryxell GA), pp. 49-68. Cambridge University Press, Cambridge.
- Hart BT, Bailey P, Edwards R, Hortle K, James K, McMahon A, Meredith C, Swadling K. (1991). A Review of the Salt Sensitivity of the Australian Freshwater Biota. *Hydrobiologia* **210**: 105-144.
- Hawes I, Howard-Williams C, Vincent WF. (1992). Desiccation and recovery of antarctic cyanobacterial mats. *Polar Biol* **12**: 587-594.
- Hay SIM, T. C., Paterson DM. (1993). The speed of diatom migration through natural and artificial substrata. *Diatom Res* **8**: 371-384.
- Herman PMJ, Middelburg JJ, Heip CHR. (2001). Benthic community structure and sediment processes on an intertidal flat: results from the ECOFLAT project. *Cont Shelf Res* **21**: 2055-2071.
- Higgins MJ, Molino P, Mulvaney P, Wetherbee R. (2003). The structure and nanomechanical properties of the adhesive mucilage that mediates diatom-substratum adhesion and motility. *J Phycol* **39**: 1181-1193.
- Hoagland KD, Rosowski JR, Gretz MR, Roemer SC. (1993). Diatom extracellular polymeric substances - function, fine-structure, chemistry, and physiology. *J Phycol* **29**: 537-566.
- Holling CS. (1973). Resilience and stability of ecological systems. *Annual Review of Ecology and Systematics* **4**: 1-24.
- Holzinger A, Karsten U. (2013). Desiccation stress and tolerance in green algae: consequences for ultrastructure, physiological, and molecular mechanisms. *Front Plant Sci* **4**.
- Holzinger A, Lutz C. (2006). Algae and UV irradiation: Effects on ultrastructure and related metabolic functions. *Micron* **37**: 190-207.

- Horvath I, Glatz A, Nakamoto H, Mishkind ML, Munnik T, Saidi Y, Goloubinoff P, Harwood JL, Vigh L. (2012). Heat shock response in photosynthetic organisms: Membrane and lipid connections. *Progr Lipid Res* **51**: 208-220.
- Hunt LJH, Denny MW. (2008). Desiccation protection and disruption: A trade-off for an intertidal marine alga. *J Phycol* **44**: 1164-1170.
- Jacob A, Wiencke C, Lehmann H, Kirst GO. (1992). Physiology and ultrastructure of desiccation in the green-alga *Prasiola-crispa* from Antarctica. *Botanica Marina* **35**: 297-303.
- Jesus B, Perkins RG, Consalvey M, Brotas V, Paterson DM. (2006). Effects of vertical migrations by benthic microalgae on fluorescence measurements of photophysiology. *MEPS* **315**: 55-66.
- Juvany M, Muller M, Pinto-Marijuan M, Munne-Bosch S. (2014). Sex-related differences in lipid peroxidation and photoprotection in *Pistacia lentiscus*. *J Exp Bot* **65**: 1039-1049.
- Karsten U. (2012). Seaweed Acclimation to Salinity and Desiccation Stress. in *Seaweed Biology* (eds. Wiencke C, Bischof K), pp. 87-107. Springer Berlin Heidelberg, Rostock, Germany.
- Kim BY, Park SK, Norton TA, Choi HG. (2011). Effects of temporary and periodic emersion on the growth of *Fucus spiralis* and *Pelvetia canaliculata* germlings. *Algae* **26**: 193-200.
- Kirrolia A, Bishnoi NR, Singh N. (2011). Salinity as a factor affecting the physiological and biochemical traits of *Scenedesmus quadricauda*. *J Algal Biomass Utiln* **2**: 28-34.
- Kirst GO. (1990). Salinity Tolerance of Eukaryotic Marine-Algae. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **41**: 21-53.
- Klochkova TA, Kim GH. (2005). Ornamented Resting Spores of a Green Alga, *Chlorella* sp., Collected from the Stone Standing Buddha Statue at Jungwon Miruksazi in Korea. *Algae* **20**: 295-298.
- Knowles EJ, Castenholz RW. (2008). Effect of exogenous extracellular polysaccharides on the desiccation and freezing tolerance of rock-inhabiting phototrophic microorganisms. *Fems Microbiol Ecol* **66**: 261-270.
- Kumar K, Kumar M, Kim S-R, Ryu H, Cho Y-G. (2013). Insights into genomics of salt stress response in rice. *Rice* **6**.
- Kumar KS, Dahms H-U, Lee J-S, Kim HC, Lee WC, Shin K-H. (2014). Algal photosynthetic responses to toxic metals and herbicides assessed by chlorophyll a fluorescence. *Ecotox Environ Safe* **104**: 51-71.
- Lake PS. (2000). Disturbance, patchiness, and diversity in streams. *J N Am Benthol Soc* **19**: 573-592.

- Larned ST, Detry T, Arscott DB, Tockner K. (2010). Emerging concepts in temporary-river ecology. *Freshwater Biol* **55**: 717-738.
- Ledger ME, Brown LE, Edwards FK, Milner AM, Woodward G. (2013). Drought alters the structure and functioning of complex food webs. *Nat Clim Chang* **3**: 223-227.
- Ledger ME, Harris RML, Armitage PD, Milner AM. (2008). Disturbance frequency influences patch dynamics in stream benthic algal communities. *Oecologia* **155**: 809-819.
- Levitt J. (1980). *Responses of plants to environmental stresses*. Academic Press: New York.
- Lewis LA, Trainor FR. (2012). Survival of *Protosiphon botryoides* (Chlorophyceae, Chlorophyta) from a Connecticut soil dried for 43 years. *Phycologia* **51**: 662-665.
- Lokhande VH, Gor BK, Desai NS, Nikam TD, Suprasanna P. (2013). Sesuvium portulacastrum, a plant for drought, salt stress, sand fixation, food and phytoremediation. A review. *Agronomy for Sustainable Development* **33**: 329-348.
- López-Doval J, Ginebreda A, Caquet T, Dahm C, Petrovic M, Barceló D, Muñoz I. (2013). Pollution in mediterranean-climate rivers. *Hydrobiologia* **719**: 427-450.
- Lowe WH, Likens GE. (2005). Moving headwater streams to the head of the class. *BioScience* **55**: 196-197.
- Ludlam JP, Magoulick DD. (2010). Environmental conditions and biotic interactions influence ecosystem structure and function in a drying stream. *Hydrobiologia* **644**: 127-137.
- Lund JWG. (1954). The seasonal cycle of the plankton diatom, *Melosira italica* (Ehr.) Ktitz, subsp. *subarctica*. *J Ecol* **38**: 15-35.
- Lutz C, Seidlitz HK, Meindl U. (1997). Physiological and structural changes in the chloroplast of the green alga *Micrasterias denticulata* induced by UV-B simulation. *Plant Ecol* **128**: 54-64.
- Maria Fernanda P. (2012). Harmful effects of UV radiation in Algae and aquatic macrophytes – A review. *Emir J Food Agric* **24**: 510-526.
- Marxsen J, Zoppini A, Wilczek S. (2010). Microbial communities in streambed sediments recovering from desiccation. *Fems Microbiol Ecol* **71**: 374-386.
- Mc Donough OT, Hosen JD, Palmer MA. (2011). Temporary Streams: The Hydrology, Geography, and Ecology of Non-Perennially Flowing Waters in *Rivers Ecosystems: Dynamics, Management and Conservation* (eds. Elliot SE, Martin LE), pp. 259-290. Nova Science Publishers, Hauppauge, NY.
- McCandless EL. (1981). Polysaccharides of the seaweeds. in *The Biology of Seaweeds* (eds. Lobban CS, Wynne MJ), pp. 559-588. University of California Press, Berkeley.
- McKew BA, Taylor JD, McGenity TJ, Underwood GJC. (2011). Resistance and resilience of benthic biofilm communities from a temperate saltmarsh to desiccation and rewetting. *Isme J* **5**: 30-41.

- McQuoid MR, Hobson LA. (1996). Diatom resting stages. *J Phycol* **32**: 889-902.
- Moberg N, Halberg KA, Jorgensen A, Persson D, Bjorn M, Ramlov H, Kristensen RM. (2011). Survival in extreme environments - on the current knowledge of adaptations in tardigrades. *Acta Physiologica* **202**: 409-420.
- Moisander PH, McClinton E, Paerl HW. (2002). Salinity effects on growth, photosynthetic parameters, and nitrogenase activity in estuarine planktonic cyanobacteria. *Microbial Ecol* **43**: 432-442.
- Molino PJ, Wetherbee R. (2008). The biology of biofouling diatoms and their role in the development of microbial slimes. *Biofouling* **24**: 365-379.
- Morison MO, Sheath RG. (1985). Responses to desiccation stress by *Klebsormidium rivulare* (Ultrichales, Chlorophyta) from a Rhode-Island stream. *Phycologia* **24**: 129-145.
- Mosisch TD. (2001). Effects of desiccation on stream epilithic algae. *New Zeal J Mar Fresh* **35**: 173-179.
- Munns R. (2002). Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environ* **25**: 239-250.
- Nelson DR, Mengistu S, Ranum P, Celio G, Mashek M, Mashek D, Lefebvre PA. (2013). New lipid-producing, cold-tolerant yellow-green alga isolated from the rocky mountains of colorado. *Biotechnology Progress* **29**: 853-861.
- Nikolaev YA, Plakunov VK. (2007). Biofilm - "City of microbes" or an analogue of multicellular organisms? *Microbiology* **76**: 125-138.
- Passy SI. (2007). Diatom ecological guilds display distinct and predictable behavior along nutrient and disturbance gradients in running waters. *Aquatic Botany* **86**: 171-178.
- Peterson CG. (1987a). Gut passage and insect grazer selectivity of lotic diatoms. *Freshwater Biol* **18**: 455-460.
- Peterson CG. (1987b). Influences of Flow Regime on Development and Desiccation Response of Lotic Diatom Communities. *Ecology* **68**: 946-954.
- Peterson CG, Boulton AJ. (1999). Stream permanence influences microalgal food availability to grazing tadpoles in arid-zone springs. *Oecologia* **118**: 340-352.
- Pichrtova M, Remias D, Lewis LA, Holzinger A. (2013). Changes in Phenolic Compounds and Cellular Ultrastructure of Arctic and Antarctic Strains of *Zygnema* (Zygnematophyceae, Streptophyta) after Exposure to Experimentally Enhanced UV to PAR Ratio. *Microbial Ecol* **65**: 68-83.
- Pickett-Heaps JD, West JA, Wilson SM, McBride DL. (2001). Time-lapse videomicroscopy of cell (spore) movement in red algae. *Eur J Phycol* **36**: 9-22.
- Potts M. (1994). Desiccation Tolerance of Prokaryotes. *Microbiol Rev* **58**: 755-805.

- Potts M. (1999). Mechanisms of desiccation tolerance in cyanobacteria. *Eur J Phycol* **34**: 319-328.
- Pouličková A, Hašler P, Lysáková M, Spears B. (2008). The ecology of freshwater epipellic algae: an update. *Phycologia* **47**: 437-450.
- Power ME, Holomuzki JR, Lowe RL. (2013). Food webs in Mediterranean rivers. *Hydrobiologia* **719**: 119-136.
- Power ME, Parker MS, Dietrich WE. (2008). Seasonal reassembly of a river food web: Floods, droughts, and impacts of fish. *Ecological Monographs* **78**: 263-282.
- Prakash B, Veeregowda BM, Krishnappa G. (2003). Biofilms: A survival strategy of bacteria. *Curr Sci India* **85**: 1299-1307.
- Proctor MCF, Oliver MJ, Wood AJ, Alpert P, Stark LR, Cleavitt NL, Mishler BD. (2007). Desiccation-tolerance in bryophytes: a review. *Bryologist* **110**: 595-621.
- Proia L, Vilches C, Boninneau C, Kantiani L, Farre M, Romani AM, Sabater S, Guasch H. (2013). Drought episode modulates the response of river biofilms to triclosan. *Aquatic Toxicology* **127**: 36-45.
- Rajendran UM, Kathirvel E, Anand N. (2007). Desiccation-induced changes in antioxidant enzymes, fatty acids, and amino acids in the cyanobacterium *Tolypothrix scytonemoides*. *World J Microb Biot* **23**: 251-257.
- Rakleova G, Pouneva I, Dobrev N, Tchorbadjieva M. (2013). Differentially Secreted Proteins of Antarctic and Mesophilic Strains of *Synechocystis salina* and *Chlorella vulgaris* after UV-B and Temperature Stress Treatment. *Biotechnol Biotech Eq* **27**: 3669-3680.
- Ras M, Steyer J-P, Bernard O. (2013). Temperature effect on microalgae: a crucial factor for outdoor production. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* **12**: 153-164.
- Rastogi RP, Richa, Sinha RP, Singh SP, Hader DP. (2010). Photoprotective compounds from marine organisms. *J Ind Microbiol Biotechnol* **37**: 537-558.
- Rautio M, Dufresne F, Laurion I, Bonilla S, Vincent WF, Christoffersen KS. (2011). Shallow freshwater ecosystems of the circumpolar Arctic. *Ecoscience* **18**: 204-222.
- Renaud SM, Thinh LV, Lambrinidis G, Parry DL. (2002). Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures. *Aquaculture* **211**: 195-214.
- Rimet F. (2012). Recent views on river pollution and diatoms. *Hydrobiologia* **683**: 1-24.
- Rimet F, Ector L, Cauchie HM, Hoffmann L. (2009). Changes in diatom-dominated biofilms during simulated improvements in water quality: implications for diatom-based monitoring in rivers. *Eur J Phycol* **44**: 567-577.
- Robson BJ. (2000). Role of residual biofilm in the recolonization of rocky intermittent streams by benthic algae. *Mar Freshwater Res* **51**: 724-732.

- Robson BJ, Matthews TG. (2004). Drought refuges affect algal recolonization in intermittent streams. *Riv Res Applic* **20**: 753-763.
- Robson BJ, Matthews TG, Lind PR, Thomas NA. (2008). Pathways for algal recolonization in seasonally-flowing streams. *Freshwater Biol* **53**: 2385-2401.
- Romaní AM, Amalfitano S, Artigas J, Fazi S, Sabater S, Timoner X, Ylla I, Zoppini A. (2012). Microbial biofilm structure and organic matter use in mediterranean streams. *Hydrobiologia* **719**: 43-58.
- Romaní AM, Sabater S. (1997). Metabolism recovery of a stromatolitic biofilm after drought in a Mediterranean stream. *Archiv fur Hydrobiologie* **140**: 261-271.
- Round FE, Crawford R, Mann D. (1990). *The diatoms: Biology and morphology of the genera*. Cambridge University Press: New York.
- Rousch JM, Bingham SE, Sommerfeld MR. (2004). Protein expression during heat stress in thermo-intolerant and thermo-tolerant diatoms. *J Exp Mar Biol Ecol* **306**: 231-243.
- Sabater S. (2008). Alterations of the global water cycle and their effects on river structure, function and services. *Freshwater Reviews* **1**: 75-88.
- Sabater S, Tockner K. (2010). Effects of Hydrologic Alterations on the Ecological Quality of River Ecosystems in *Water Scarcity in the Mediterranean: Perspectives under Global Change* (eds. Sabater S, Barcelo D), pp. 15-39.
- Schreiber U, Gademann R, Bird P, Ralph PJ, Larkum AWD, Kuhl M. (2002). Apparent light requirement for activation of photosynthesis upon rehydration of desiccated beachrock microbial mats. *J Phycol* **38**: 125-134.
- Schubert H, Fulda S, Hagemann M. (1993). Effects of Adaptation to Different Salt Concentrations on Photosynthesis and pigmentation of the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J Plant Physiol* **142**: 291-295.
- Schulte PM. (2014). What is environmental stress? Insights from fish living in a variable environment. *J Exp Biol* **217**: 23-34.
- Shade A, Peter H, Allison SD, Baho D, Berga M, Buergermann H, Huber DH, Langenheder S, Lennon JT, Martiny JB, Matulich KL, Schmidt TM, Handelsman J. (2012). Fundamentals of microbial community resistance and resilience. *Front Microbiol* **3**.
- Shafer DJ, Sherman TD, Wyllie-Echeverria S. (2007). Do desiccation tolerances control the vertical distribution of intertidal seagrasses? *Aquatic Botany* **87**: 161-166.
- Shephard KL. (1987). Evaporation of Water from the Mucilage of a Gelatinous Algal Community. *Brit Phycol J* **22**: 181-185.
- Sistrom WR, Griffiths M, Stanier RY. (1956). The Biology of a Photosynthetic Bacterium Which Lacks Colored Carotenoids. *J Cell Comp Physiol* **48**: 473-515.

- Souffreau C, Vanormelingen P, Sabbe K, Vyverman W. (2013). Tolerance of resting cells of freshwater and terrestrial benthic diatoms to experimental desiccation and freezing is habitat-dependent. *Phycologia* **52**: 246-255.
- Souffreau C, Vanormelingen P, Verleyen E, Sabbe K, Vyverman W. (2010). Tolerance of benthic diatoms from temperate aquatic and terrestrial habitats to experimental desiccation and temperature stress. *Phycologia* **49**: 309-324.
- Stanley EH, Fisher SG, Jones JB. (2004). Effects of water loss on primary production: A landscape-scale model. *Aquatic Sciences* **66**: 130-138.
- Steinman AD, McIntire CD. (1990). Recovery of lotic periphyton communities after disturbance. *Environ Manage* **14**: 589-604.
- Strandberg MT, Scott-Fordsmand JJ. (2002). Field effects of simazine at lower trophic levels - a review. *Sci Total Environ* **296**: 117-137.
- Sudhir P, Murthy SDS. (2004). Effects of salt stress on basic processes of photosynthesis. *Photosynthetica* **42**: 481-486.
- Sundback K, Odmark S, Wulff A, Nilsson C, Wangberg SA. (1997). Effects of enhanced UVB radiation on a marine benthic diatom mat. *Mar Biol* **128**: 171-179.
- Tamaru Y, Takani Y, Yoshida T, Sakamoto T. (2005). Crucial role of extracellular polysaccharides in desiccation and freezing tolerance in the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 7327-7333.
- Telesh I, Schubert H, Skarlato S. (2013). Life in the salinity gradient: Discovering mechanisms behind a new biodiversity pattern. *Estuar Coast Shelf S* **135**: 317-327.
- Thompson RC, Norton TA, Hawkins SJ. (2004). Physical stress and biological control regulate the producer-consumer balance in intertidal biofilms. *Ecology* **85**: 1372-1382.
- Touchette BW. (2007). Seagrass-salinity interactions: Physiological mechanisms used by submersed marine angiosperms for a life at sea. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **350**: 194-215.
- Trainor FR, Gladych R. (1995). Survival of Algae in a Desiccated Soil - A 35-Year Study. *Phycologia* **34**: 191-192.
- Van Dam AA, Beveridge MCM, Azim ME, Verdegem MCJ. (2002). The potential of fish production based on periphyton. *Rev Fish Biol Fisher* **12**: 1-31.
- Van Dam H, Mertens A, Sinkeldam J. (1994). A coded checklist and ecological indicator values of freshwater diatoms from The Netherlands. *Neth J Aquat Ecol* **28**: 117-133.
- Van der Grinten E, Janssen A, de Mutsert K, Barranguet C, Admiraal W. (2005). Temperature- and light-dependent performance of the cyanobacterium *Leptolyngbya*

- foveolarum* and the diatom *Nitzschia perminuta* in mixed biofilms. *Hydrobiologia* **548**: 267-278.
- Von Stosch HA, Fecher K. (1979). "Internal thecae" of *Eunotia soleirolii* (Bacillariophyceae): development, structure and function as resting spores. *J Phycol* **15**: 233-243.
- Welsh DT. (2000). Ecological significance of compatible solute accumulation by microorganisms: from single cells to global climate. *Fems Microbiol Rev* **24**: 263-290.
- WynnWilliams DD. (1996). Response of pioneer soil microalgal colonists to environmental change in Antarctica. *Microbial Ecology* **31**: 177-188.
- Zacher K, Wulff A, Molis M, Hanelt D, Wiencke C. (2007). Ultraviolet radiation and consumer effects on a field-grown intertidal macroalgal assemblage in Antarctica. *Glob Chang Biol* **13**: 1201-1215.
- Zaneveld JS. (1969). Factors Controlling the Delimitation of Littoral Benthic Marine Algal Zonation. *American Zoologist* **9**: 367-391.
- Zhao XM, Bi YH, Chen L, Hu S, Hu ZY. (2008). Responses of photosynthetic activity in the drought-tolerant cyanobacterium, *Nostoc flagelliforme* to rehydration at different temperature. *Journal of Arid Environments* **72**: 370-377.
- Zhu Y, Gong H. (2014). Beneficial effects of silicon on salt and drought tolerance in plants. *Agronomy for Sustainable Development* **34**: 455-472.



# CHAPITRE II : IMPACT DE L'ASSECHEMENT DE BIOFILMS PHOTOTROPHES SUR LES COMMUNAUTES MICROBIENNES A L'ECHELLE DE MICROCOSME ET DE MESOCOSME - CAPACITE DE RECROISSANCE ET RESILIENCE ECOLOGIQUE

A travers une expérience de laboratoire où de nombreux paramètres ont été suivis, nous avons testé l'effet d'un assèchement provoqué de durée variable (1 à 8 semaines) suivi d'une remise en eau (près de deux semaines), sur la structure des communautés phototrophes et hétérotrophes d'un biofilm. Nos résultats mettent en avant (i) pour des assèchements de courtes durées, la notion de résilience des communautés phototrophes associé à un retour à l'état d'équilibre initial (« engineering resilience »), (ii) pour des assèchements de longues durées la notion de « résilience écologique » (atteinte d'un nouvel état d'équilibre différent des conditions initiales) pour les communautés hétérotrophes. De plus, la persistance de fonctions (production primaire, hétérotrophie) des communautés malgré une structure différente introduit la notion de « redondance fonctionnelle ».

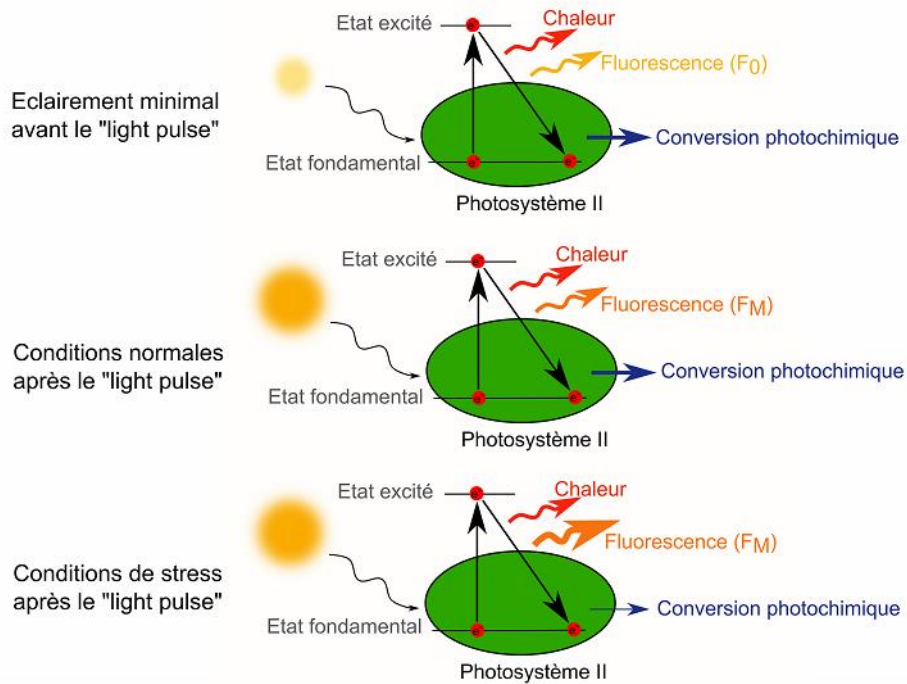


Figure 13 : Emission de fluorescence mesurée par le PhytoPAM en fonction des conditions du milieu et de la quantité de lumière reçue par le photosystème II des cellules chlorophylliennes.

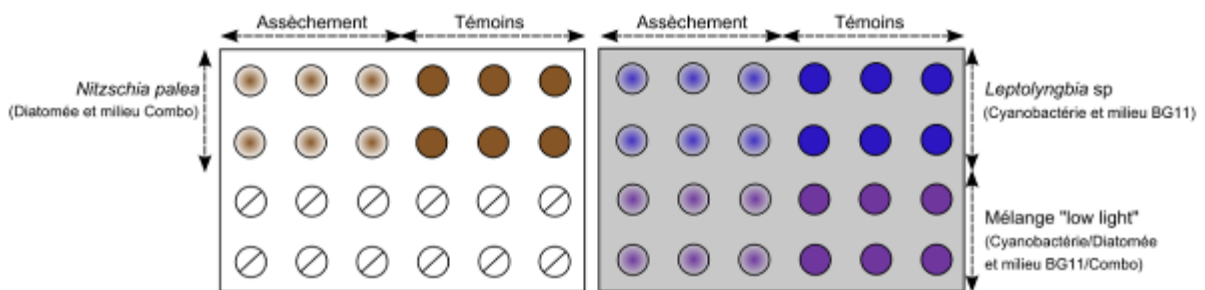


Figure 14 : Schéma des microplaques utilisées lors de l'expérience. La plaque grisée était couverte d'une feuille blanche, les puits barrés étaient inutilisés.

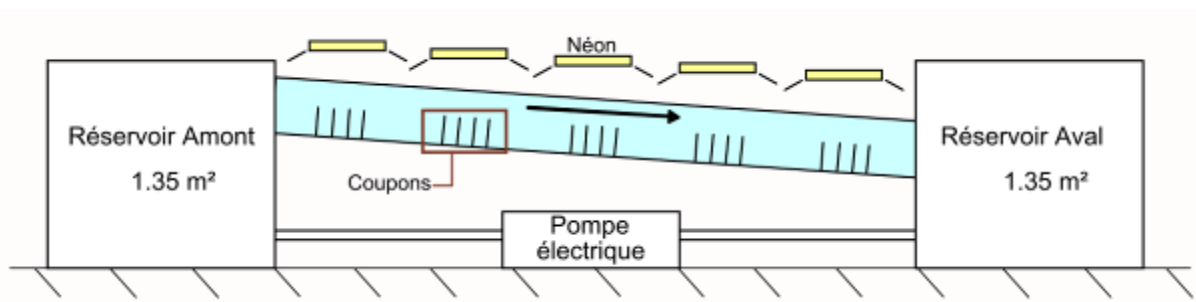


Figure 15 : Schéma du mésocosme "Canal artificiel".

## I. Présentation de l'étude et synthèse des principaux résultats.

Les communautés microbiennes sont à la base du fonctionnement des écosystèmes aquatiques et jouent un rôle clé dans de nombreux processus tels que la transformation des matières organiques ou minérales ou la production primaire. Ces communautés sont soumises à des contraintes physiques, chimiques ou biologiques qui peuvent être de grande amplitude et vraisemblablement accrues par le changement climatique global (IPCC, 2007). Parmi ces contraintes, l'assèchement tient une place importante, particulièrement dans les régions au climat Méditerranéen où les épisodes de précipitations sont rares et violents (Bonada and Resh, 2013).

L'objectif de cette étude est de définir de quelle manière les communautés microbiennes (phototrophes et hétérotrophes procaryotes) réagissent face à une contrainte d'assèchement de magnitude variable. Nous étudions plus spécifiquement les processus de résiliences structurelle et fonctionnelle.

Dans ce but, nous procédons à une étude complète, qui se décompose en une étude préliminaire en microcosme sur des cultures d'algues, suivie d'une étude en mésocosme sur un biofilm complexe.

L'étude préliminaire s'intéresse au compartiment phototrophe, par l'utilisation de cultures isolées et mélangées de diatomées (*Nitzschia palea*) et de cyanobactéries (*Leptolyngbya* sp.). Les cultures subissent 34 jours d'assèchement et 14 jours de remise en eau.

Le paramètre étudié est l'efficacité photosynthétique. Celle-ci est appréciée par la mesure de fluorescence effectuée par l'intermédiaire d'un PhytoPAM (Phytoplankton Analyzer, Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Germany) en conditions DAS (Dark-Adapted State). Le principe de mesure de l'efficacité photosynthétique par la fluorescence est détaillé dans la Figure 13. Les données de fluorescence de référence utilisées ont été créées au laboratoire à partir de cultures pures de *Leptolyngbya* sp (cyanobactérie benthique) et de *Fistulifera saprophila* (diatomée benthique). Les cultures ont été réalisées dans des microplaques de 24 puits avec les milieux de culture appropriés, tel que décrit dans la Figure 14. Les cyanobactéries étant plus sensibles à la lumière, elles ont été couvertes d'une feuille de papier blanc, de même pour le mélange d'algues (testé antérieurement). La microplaque a été fermée hermétiquement avec du parafilm pour éviter l'évaporation des milieux de culture.

L'étude en mésocosme a été réalisée sur un biofilm complexe ayant colonisé des coupons en polyéthylène (substrats artificiels) dans un canal artificiel (Figure 15). Ces coupons ont subi des assèchements de 1, 2, 4 et 8 semaines avant d'être remis en eau pour une durée de 13 jours, dans des aquariums individuels, afin d'éviter tout apport exogène de biomasse algale (Figure 16). Des témoins ne subissant pas d'assèchement ont également été suivis.

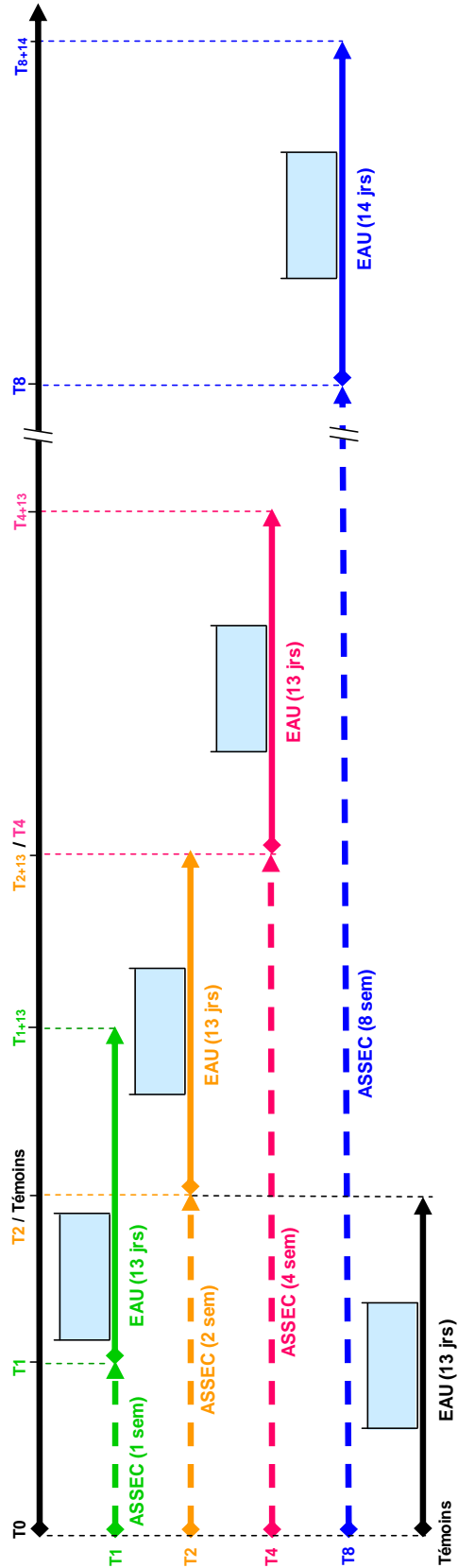


Figure 16 : Schéma récapitulatif de l'expérience réalisée à partir des coupons colonisés du canal artificiel. Avant T0, les substrats artificiels ont été installés durant un mois dans le canal afin d'être colonisés par le biofilm en place.

Les compartiments phototrophes du biofilm ont été étudiés à travers divers paramètres :

- la composition du biofilm, plus particulièrement la proportion des cyanobactéries et des diatomées, par l'intermédiaire du PhytoPAM associé à des comptages cellulaires ;
- l'activité photosynthétique, également suivie par le PhytoPAM ;
- la croissance du biofilm, grâce à des dosages de chlorophylle *a* et de phéophytine.

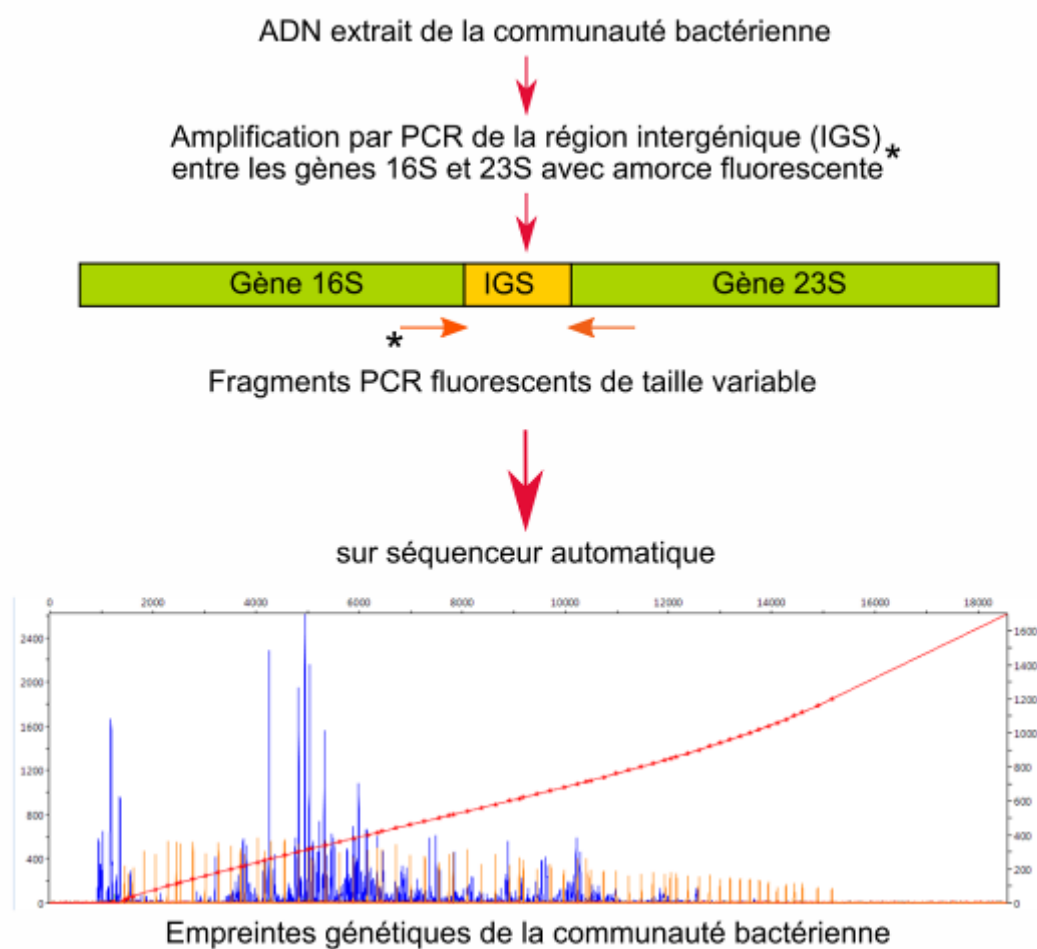
Concernant le compartiment hétérotrophe et procaryote, les paramètres suivis étaient :

- la diversité fonctionnelle, par l'utilisation de microplaques Biolog ;
- la diversité génétique procaryote, par l'intermédiaire d'une ARISA (principe détaillé en Figure 17).

Les prélèvements ont été effectués à l'état initial, à la fin des phases d'assèchement et à la fin des phases de remises en eau selon le protocole détaillé en Annexe 1.

L'analyse du compartiment phototrophe a montré les résultats suivants :

- L'assèchement a eu un fort impact sur la structure des communautés algales puisque les deux expériences (microcosme et mésocosme) ont montré une transition algale des cyanobactéries vers les diatomées. La seule différence résidait dans le fait que cette transition ait eu lieu au cours de l'assèchement pour l'expérience en microcosme alors qu'elle a lieu au cours de la remise en eau pour l'expérience en mésocosme. L'hypothèse proposée repose sur la différence entre les conditions d'assèchement, lente dans le cas des cultures isolées dans une boîte maintenant une humidité relative et rapide dans le cas des biofilms exposés directement à l'air libre. Cette hypothèse est appuyée par la vitesse d'extinction du signal d'activité photosynthétique mesurée lors des expériences (quelques jours *versus* quelques heures). De même, la reprise du biofilm (biomasse et activité photosynthétique) a été plus rapide en microcosme du fait de possibles ajustements physiologiques dans les cellules microbiennes.
- L'application d'une contrainte d'assèchement a eu un effet différentiel sur les cyanobactéries et les diatomées. Il semblerait que les cyanobactéries agissent par un effet inhibiteur de la croissance sur les diatomées (allélopathie ; Keating, 1978; Takano *et al.*, 2003), ce qui les rendrait plus compétitives en conditions normales. Le stress d'assèchement a alors permis de lever l'effet négatif des cyanobactéries sur les diatomées leur permettant de s'exprimer pleinement au moment de la remise en eau.



**Figure 17 : Principe de la méthode ARISA (Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis)**

d'après Richaume *et al.* (2006)

Concernant les durées d'assèchement longues (4 et 8 semaines), la biomasse et l'activité photosynthétique des diatomées, après 13 jours de remise en eau, étaient plus élevées que lors des conditions initiales. A l'inverse, les cyanobactéries ont montré une biomasse et une activité photosynthétique très faibles par rapport aux conditions initiales où elles dominaient. Ce rebond peut s'expliquer par la sélection d'individus résistants chez les diatomées ou par une rétroaction positive de la baisse de l'inhibition des cyanobactéries accompagnant la diminution de la biomasse par l'assèchement. Les dynamiques de la richesse spécifique semblaient dépendre de l'intensité et de la périodicité de la perturbation ainsi que de l'adaptation antérieure des communautés microbiennes à celle-ci. Dans le cas de notre expérience, la richesse spécifique était initialement faible et l'effet de l'assèchement sur la structure des communautés algales modéré.

L'analyse du compartiment hétérotrophe a, quant à lui, montré les résultats suivants :

- Concernant la structure des communautés procaryotes (ARISA), l'assèchement a eu un impact fort quelle que soit sa durée. Après la remise en eau, la communauté a montré une structure similaire mais une composition différente. Les communautés bactériennes n'ont pas été cultivées dans des conditions axéniques mais il semblerait que leur recroissance après remise en eau ait été liée aux propriétés du biofilm sec.
- La potentielle diversité fonctionnelle du compartiment hétérotrophe (Biolog) a persisté quelle que soit la durée de l'assèchement et a différé entre les conditions initiales / après la remise en eau (similaires) et celles de la fin de l'assèchement. Ainsi, les communautés bactériennes ont développé un fort potentiel de dégradation des polymères à la fin de l'assèchement, bien que ces molécules soient plus difficiles à métaboliser que les autres sources de carbone. Ceci s'explique probablement par la faible disponibilité du carbone organique dissous lié à l'activité photosynthétique qui a diminué avec le stress d'assèchement.
- Ces deux fonctions (structure et diversité fonctionnelle) étaient découplées et ont montré une redondance fonctionnelle. En effet, les communautés ont montré une résilience en termes de diversité fonctionnelle qui n'était pas associée à une redondance structurelle, ce qui suggère que la résilience fonctionnelle est assurée par des espèces différentes.
- Pour les fortes contraintes d'assèchement (4 et 8 semaines), les compartiments phototrophes ont montré que les fonctions ont été conservées malgré des structures de communautés microbiennes différentes. C'est ce que Holling (1996) a appelé la « résilience écologique » où un nouvel état d'équilibre est atteint suite à la contrainte d'assèchement, à défaut d'un retour à la situation initiale. C'est le cas des communautés soumises à de faibles contraintes d'assèchement (1 semaine), qui ont témoigné d'une résilience fonctionnelle

beaucoup plus faible après 2 semaines de remise en eau (« engineering resilience » = retour à l'état d'équilibre initial). Les communautés hétérotrophes ont également montré une « résilience écologique » bien que l'intensité de l'assèchement n'ait eu aucun impact sur leur structure ou leur fonction.



**II. Article II, paru dans la revue *Microbial Ecology* (DOI 10.1007/s00248-014-0532-0)**

**“Resilience of Aggregated Microbial Communities Subjected to Drought – Small-Scale Studies”**

Amélie BARTHÈS<sup>1,2,3</sup>, Loïc TEN-HAGE<sup>1,2</sup>, Alexandre LAMY<sup>1,2</sup>, Jean-Luc ROLS<sup>1,2</sup> and Joséphine LEFLAIVE<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Université de Toulouse; INP, UPS; EcoLab (Laboratoire d'Ecologie Fonctionnelle et Environnement); 118 Route de Narbonne, F-31062 Toulouse, France

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

<sup>3</sup>ASCONIT Consultants; Site Naturopôle, 3 Boulevard de Clairfont, F-66350 Toulouges, France

\*Correspondence: Joséphine LEFLAIVE, [josephine.leflaive@univ-tlse3.fr](mailto:josephine.leflaive@univ-tlse3.fr); phone: +33 (0) 5 61 55 85 49; fax: +33 (0) 5 61 55 89 01.

### **Abstract**

The response of microbial communities to disturbance is a major concern for microbial ecologists since potential modifications in their composition and functioning may affect ecosystems to a larger extent. Microbial ecosystems may be resistant (not affected) or may present *engineering* (return to initial state) or *ecological resilience*. In the latter case, when the disturbance is released the ecosystem evolves towards a new equilibrium state. The aim of this study was to determine if variations in the magnitude of a disturbance could induce either *engineering* or *ecological resilience*. We used phototrophic biofilms grown in mesocosms as a model of microbial ecosystem and increasing drought duration (1-8 weeks) as a range of disturbances. Biofilm composition (algal and prokaryotic), photosynthetic activity (PhytoPAM) and potential functional diversity (Biolog) were determined at the end of dry phase and after a 2-weeks rewetting phase in individual aquaria. We only observed an *ecological resilience* of the biofilm, with a resistance of phototrophic component for the weakest disturbance. After rewetting, the biofilm could fulfill the same functions, but its species composition was highly modified. We observed a shift from cyanobacteria dominance towards diatom dominance. The disturbance caused a transition towards a new steady state of the biofilm. We also observed a positive effect of stress duration on biofilm productivity after resilience.

### **Keywords**

Biofilms; Disturbance; Resilience; Genetic Diversity; Functional Diversity; Drought.

## Introduction

Microbial communities play a key role in the functioning of ecosystems through various processes and ecological services such as the transformation of the organic or mineral matter in the biogeochemical cycles of C, N, P and sulfur, water purification or primary production in aquatic environments. These communities are subjected to disturbances whose frequency and amplitudes will likely increase with climate change (IPCC, 2007). Understanding and predicting how communities respond to disturbances in terms of composition or function are current concerns for microbial ecologists (Costello *et al.*, 2012; Gonzalez *et al.*, 2012). Disturbance is defined as a causal event inducing a perturbation in a community (Rykiel, 1985). According to Pimm (1984), resistance is the degree to which a community remains unchanged when it is subjected to a disturbance. He defined resilience as the rate at which community composition returns to its initial state after a disturbance and occurred around the initial steady state. This corresponds to the *engineering resilience*, defined by Holling (1996) and expressed a simple deviation from the initial state (resistance). Another way to tackle community dynamic after a disturbance is to measure *ecological resilience*, which represents the magnitude of disturbance that is necessary to induce a shift from a steady state to another stability domain with a different set of processes (without return to initial state) (Holling, 1973). This presumes the existence of several equilibrium states for the same ecosystem. The aim of this study was to determine if variations in the magnitude of a natural disturbance applied to a complex microbial ecosystem could induce either *engineering resilience* or *ecological resilience*.

Among the different models of microbial communities, biofilms occupy a prominent place since they are considered the dominant mode of microbial life in many aquatic ecosystems (Battin *et al.*, 2007). Phototrophic biofilms are complex assemblages of phototrophic and heterotrophic, eukaryotic and prokaryotic organisms that develop in the euphotic zone of aquatic habitats (Lock, 1993). Microorganisms are linked by a protective matrix of extracellular polymeric substances, which maintains moisture around cells in drought conditions (Peterson, 1987b). Phototrophic microorganisms represent the basis of food webs in many lotic aquatic systems (Lear *et al.*, 2012). Biofilms significantly contribute to the hydrological, physical and biogeochemical processes in running waters (Battin *et al.*, 2003), where they provide habitats for many small invertebrates (Dodds and Gudder, 1992) and participate in the transformation of dissolved organic matter (Pusch *et al.*, 1998). Besides their importance within aquatic ecosystems, phototrophic biofilms form small ecosystems themselves, as assemblages of several communities of interacting organisms stabilized by a set of processes and having their own dynamics.

Biofilms are subjected to various disturbances covering a wide range of intensities and origin. Drought represents a major constraint for biofilms in an increasing number of aquatic ecosystems. It became a central concern for ecosystems in the world in a context of Climate Change (Bonada and Resh, 2013). Drought induces non-permanence of streams that Mc Donough *et al.* (2011) defined as channels that lack surface flow during some portion of the year and are positioned at the interface of fully terrestrial and fully aquatic ecosystems. It is a global phenomenon since they represent for example 60% of total river length in United States (Nadeau and Rains, 2007) and concern the majority of Mediterranean streams (Tzoraki and Nikolaidis, 2007). Consequently, intensification of drought may alter the underlying structure of freshwater food webs (Ledger *et al.*, 2013).

To study the response of microbial communities to a realistic disturbance with variable magnitude, we have exposed phototrophic biofilms from a mesocosm to increasing durations of drought (1 to 8 weeks). Different parameters, such as algal composition or prokaryote genetic diversity, have been monitored during the dry period, and after a two-weeks rewetting period in aquaria in order to follow the composition and the basic functions fulfilled by the microbial communities.

### **Material and methods**

Two experiments have been performed, the first one on algal cultures in microplates (preliminary experiment, microcosm) and the second one on a complex biofilm established in an artificial channel since one month (mesocosm). In this manuscript, we consider algae as photosynthetic microorganisms including cyanobacteria that fulfil the same functions in biofilms than eukaryotic algae.

#### *Experimental setups*

##### **Preliminary experiment**

The aim of the preliminary experiment was to study the response of specific phototrophic microorganisms to a drought episode. This experiment was conducted over 7 weeks with two non-axenic algal strains isolated from natural biofilms established for several years in an artificial channel: a pennate diatom (*Nitzschia palea*) and a filamentous cyanobacteria (*Leptolyngbya* sp.). These strains were chosen because these genera were found in the complex biofilm in the artificial channel. They were grown alone or in a mixture in 24-wells plates with Combo medium (diatom (Kilham *et al.*, 1998)), BG11 medium (cyanobacteria (Stanier *et al.*, 1971)) or a 1:1 mixture of both media (for the mixture of algae). The microplates were incubated in an incubation chamber at 18°C with light / dark cycle of 16 / 8 hours and the lid was sealed with parafilm to limit water evaporation from media. *Nitzschia palea* and *Leptolyngbya* sp. were grown in different light conditions according to their growth preferenda, respectively  $64 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (high light, HL) and  $22 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (low light, LL).

The mixtures were incubated under LL condition. For each microorganism or mixture, twelve replicates (wells containing 2 mL of dense culture) were inoculated and allowed to grow during one week. Half of the wells (6) served as controls throughout the experiment. After this first week, the media were gently removed from treated wells with a micropipette. After 5 weeks of dry phase (incubation in the same conditions than before), the cultures were rewetted during 2 weeks with fresh culture media. For controls, the media were renewed every 3 weeks in wells, when a decrease of the photosynthetic activity was noted. Each week, the phototrophic organisms were monitored with a PhytoPAM Phytoplankton Analyzer (Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Germany) equipped with Emitter-Detector-Fiberoptics Version PHYTO-EDF for periphyton / microphytobenthos measurements (Schreiber, 1998), with two measurements per well (12 measures per condition).

### **Complex biofilms experiment**

Microbial communities grown in an artificial channel were exposed to various drought durations (dry phases of 1, 2, 4 or 8 weeks) followed by a 13-days rewetting phase in individual aquaria (a total of 6 aquaria with control and negative control). The latter were filled with filtered water (0.22 µm) from the channel and equipped with immersed pump for continuous internal water circulation (Paule *et al.*, 2014). Rewetting was performed in these separated systems to avoid inputs of exogenous organisms from the circulating water in the channel and to only observe potential regrowth and resilience from the community subjected to drought disturbance.

The biofilm used in this experiment had been established since several years in an artificial channel (Plexiglas™, 400 \* 25 \* 20 cm) with upstream and downstream reservoirs (volume 1.35 m<sup>3</sup>), provided with an electric pump (Novacem compax) allowing a discharge of 3 L.s<sup>-1</sup>. Temperature varied from 18 to 25°C, following the natural temperatures. Lights (18 W, ~ 40 µmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>) were placed above the channel with light / dark cycle (16 h / 8 h). The channel was inoculated with biofilms from several streams of Southwest of France and regular intakes of biomass have been performed to maintain a maximal diversity. In the channel, biofilms had a natural dynamic with cycles of accrual and loss phases. They were mainly dominated by cyanobacteria, with diatoms (Paule *et al.*, 2011). The channel has been subjected to evaporation and water from the water distribution network has been used regularly to compensate it.

Nutrient availability was controlled before the beginning of the study in the channel by measuring fluorides, chlorides, nitrites, nitrates, phosphates and silica with colorimetric methods (Secoman, Uvi Light, XT5) according to standard methods (Eaton *et al.*, 2005). Forty artificial substrates (polyethylene; 5 \* 10 \* 0.5 cm) were placed vertically on the bottom

of the channel, parallel to the flow, and incubated during one month, time necessary to obtain a mature community (Kelly *et al.*, 1998). After this growth period, the substrates submitted to drought (32) were removed from the channel and kept dry for 1, 2, 4 or 8 weeks in the same light and temperature conditions. Control biofilms not submitted to drought (4 substrates) were directly transferred from the channel to an aquarium for a 13-days incubation. A negative control (4 substrates without biofilm) was monitored with a PhytoPAM fluorometer during a similar incubation to verify that there was no *de novo* development of phototrophic biofilm during the incubation in aquaria.

#### *Sampling of complex biofilms*

Samples were collected at the end of growth period (T0) in the channel, at the end of each dry period (TxD for x weeks of Drought) and at the end of each rewetting phase (TxRw for x weeks of drought and 13-days of Rewetting) for the determination of algal composition, molecular fingerprint and Biolog analyses. At each sampling date, 2 replicates of 2 substrates (a total of 4 substrates) were scraped, collected in 40 mL of filtration-sterilized channel water, homogenized with Ultrathurax homogenizer and divided as follows: 1 mL was stored at - 80°C after centrifugation for ARISA, 3 mL were immediately used for Biolog and 6 mL of each replicate were pooled, fixed with 1 mL of formaldehyde 36 % and stored at ambient temperature before algal identification (see details below).

#### *PhytoPAM measurements*

PhytoPAM measurements were performed in the same conditions for both experiments by measuring fluorescence response to a saturating light flash in DAS (Dark-Adapted State) conditions (20 minutes of adaptation) (Baker, 2008). Standard profiles generated with pure cultures of *Leptolyngbya* sp. for cyanobacteria and *Fistulifera saprophila* for diatom were used as references. Green algae were not detected in complex biofilms so no green algae reference was used. The physiological state of algae was estimated from the maximal efficiency of the photosystem II (yield), corresponding to the transfer rate of electrons, thanks to the formula defined by Roháček and Barták (1999):

$$\Phi_{PSII}(\text{DAS conditions}) = \frac{(F_M - F_0)}{F_M} = 1 - \left( \frac{F_0}{F_M} \right); 0 < \Phi_{PSII} < 1$$

$F_M$  represents the maximal fluorescence and  $F_0$  corresponds to the minimal fluorescence of the photosystem II, in DAS conditions. The PhytoPAM gives global values of  $F_M$  and yield, but also individual  $F_M$ ,  $F_0$  and yield values for diatoms and cyanobacteria. With  $F_0$  as a proxy of algal biomass (Jakob *et al.*, 2005), the PhytoPAM brings thus information on relative algal composition.

In the complex biofilm experiment, non-invasive PhytoPAM measurements were performed throughout the rewetting phase at 0, 1, 6 and 13 days on 10 points of each of the 4 substrates. At day 13, the substrates were next sampled as described above. The extinction of the photosynthetic signal was also measured during 24 hours after the beginning of drought for a set of 4 substrates (corresponding to T1 treatment substrates).

#### *Counts and determinations of photosynthetic microorganisms*

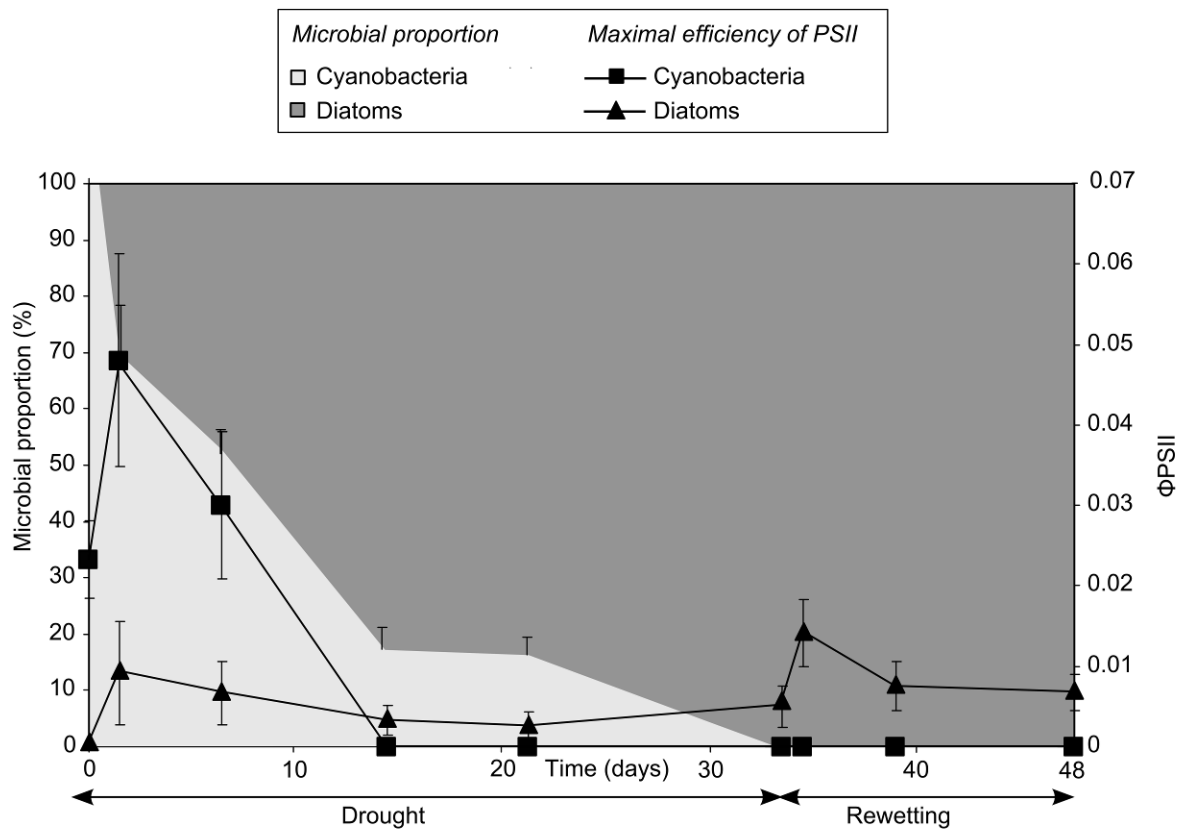
Three subsamples of the 2 replicates mix were counted with inverted microscopy (Zeiss Axiovert 10, Carl ZEISS Microscopy, Marly le Roy, France). Algal composition of biofilms was first determined without distinguishing diatom species and the presence of dead diatoms (persistence of empty frustules in environment despite the cellular death) was quantified. Counts were performed on permanent slides with light microscopy (Nikon Eclipse 80i, Nikon France S.A., Champigny sur Marne, France) at x 1000 magnification. They were performed with Malassez counting chamber (x 400) after dilution from 2 to 10. At least 400 individuals (cells, colonies, coenobium or filaments) were counted in each subsample. Counts were exploited with Phytobs v2.0 (Hadoux *et al.*, 2010) and expressed as cell abundances and biovolumes. Number of cells was estimated for each individual. Biovolumes of missing taxa were obtained by geometric approximations according to Hillebrand method (1999) from measurements of at least 30 individuals. Phytoplankton was identified under light microscope using the works of Komarek and Anagnostidis (Komárek and Anagnostidis, 2000) and Huber-Pestalozzi (Huber-Pestalozzi, 1938). For diatom identifications, only dominant species were determined after treatment of frustules and mounting on permanent slides were performed according to European standards (CEN, 2004; CEN, 2007).

#### *Potential functional diversity (Biolog analyses)*

Community-level physiological profiles were assessed using the Biolog EcoPlate™ (Biolog Inc., Hayward, CA) as specified by the manufacturer (<http://www.biolog.com>). The wells of the plates were inoculated with 150 µL from 9 mL of biofilm suspension (3 mL of initial biofilm sample plus 6 ml of sterile water) filtered through a polycarbonate filter (1.2 µm pore size) in order to mostly eliminate algae and other particulate organic matter. The plates were incubated at 18°C in the dark. The OD<sub>590nm</sub> was measured after 6 days, using a multiwell plate reader (Oasys UVM 340 Biochrom, Cambridge). Values of the respective control well were subtracted. Negative values that occasionally resulted were set to zero. The carbon sources were assigned to chemical guilds: polymers, carbohydrates, carboxylic acids, amino acids, amines and phenolic compounds (Choi and Dobbs, 1999). Analyses were conducted on the carbon sources and on the guilds (Leflaive *et al.*, 2005). The sample richness of metabolic functions was determined by the number of carbon sources whose OD was > 0.25 (Garland, 1996).

**Table 1: Maximal efficiency of photosystem II for mixed or single diatoms and cyanobacteria at initial state, after drought and after rewetting. In the last column, the average values of control are presented. ND: non detectable signal.**

	$\Phi$ PSII	Initial state	After drought	After rewetting	Average values for controls
Single cyanobacterium		0.016	0.004	0.012	0.128
Single diatom		0.260	0.003	0.576	0.365
Mixed cyanobacteria		0.023	ND	ND	0.159
Mixed diatom		ND	0.005	0.007	0.005



**Figure 18: Maximal efficiency of photosystem II ( $\Phi$ PSII) and microbial proportion inferred from minimal fluorescence values for mixed diatoms and cyanobacteria in low light conditions (mean  $\pm$  standard error, n = 12).**



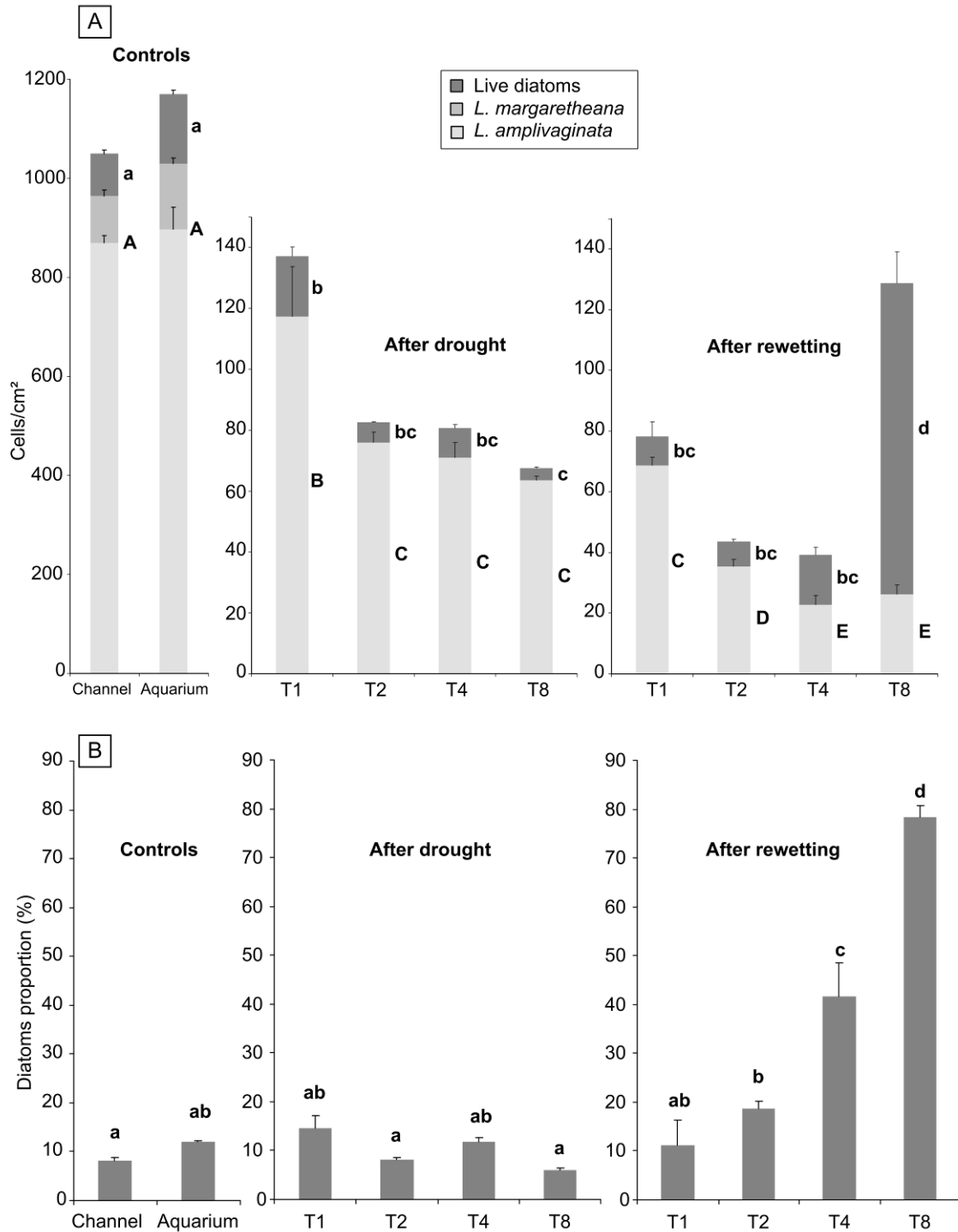
### *Genetic diversity of prokaryotes (ARISA)*

Genetic prokaryote diversity was monitored *via* ARISA (Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (Fisher and Triplett, 1999)). This method is based on the size polymorphism between genes coding for 16S rRNA.

Metagenomes of biofilm communities were extracted with the DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen), the lysis buffer of the first step being directly applied on the pellet. The targeted region of bacterial rDNA was amplified by PCR (94°C for 5 min; 35 cycles of 94°C for 1 min, 56°C for 1 min, 72°C for 2 min, and then 72°C for 10 min) using the primer FAM-labelled ITSReub and the primer ITSF (Cardinale *et al.*, 2004). After denaturation (3 min at 96°C in presence of formamide), the PCR products were run on 3130 xl Capillary Genetic Analyzer (Applied Biosystems) together with a DNA size standard ladder LIZ1200 (Applied Biosystems) and were analyzed with the Peak Scanner 1.0 software (Applied Biosystems). The size of DNA fragments was rounded to the nearest whole number. Peaks that differed from less than 2 bp were considered to correspond to the same Operational Taxonomic Unit (OTU). Fragments of less than 200 bp were excluded from the analysis. The area under the peaks was normalized to the total area of the sample and peaks corresponding to less than 1 % of total area were excluded from the analysis. Peaks on the chromatogram, corresponding to OTUs, were scored as present or absent from the chromatogram analysis and gathered in taxa (OTU)-presence matrix.

### *Statistical analyses*

Statistical analyses were performed using the free PAST software (Paleontological Statistics, version 2.17, <http://folk.uio.no/ohammer/past/>) for multivariate analyses and the Statistica software version 7 for analyses of variance (ANOVA). PCA (Principal Components Analysis) was performed to reveal patterns in the data set of Biolog and ARISA. The hypothesis that functional or genetic diversity would differ because of treatment was tested using non parametric multivariate analysis of variance (PERMANOVA) followed by pairwise comparisons. PCA was chosen because it appeared that the samples covered short gradients and because most of the variance was explained by the two first components (Ramette, 2007). Algal densities and live diatom proportions were compared statistically using repeated measures ANOVA, the PhytoPAM data (algal proportions and yields) were compared with one-way ANOVA. When necessary, logarithmic transformation of the data was carried out in order to normalize the residuals. *Post hoc* tests used Fisher's procedure. For all statistical analyses, significance was inferred at  $p < 0.05$ .



**Figure 19: A. Cellular densities in biofilms after drought and after the 13-days rewetting in aquaria for each drought duration. B. Diatom proportions in biofilms. Controls correspond to biofilms sampled in the channel at the beginning of the experiment (T0) and to biofilms sampled after transfer and incubation in an aquarium (mean of 3 counts ± standard deviation). Letters indicate statistically homogeneous groups: uppercase letters for total cyanobacteria and lowercase letters for live diatoms.**

## Results

### Preliminary experiment

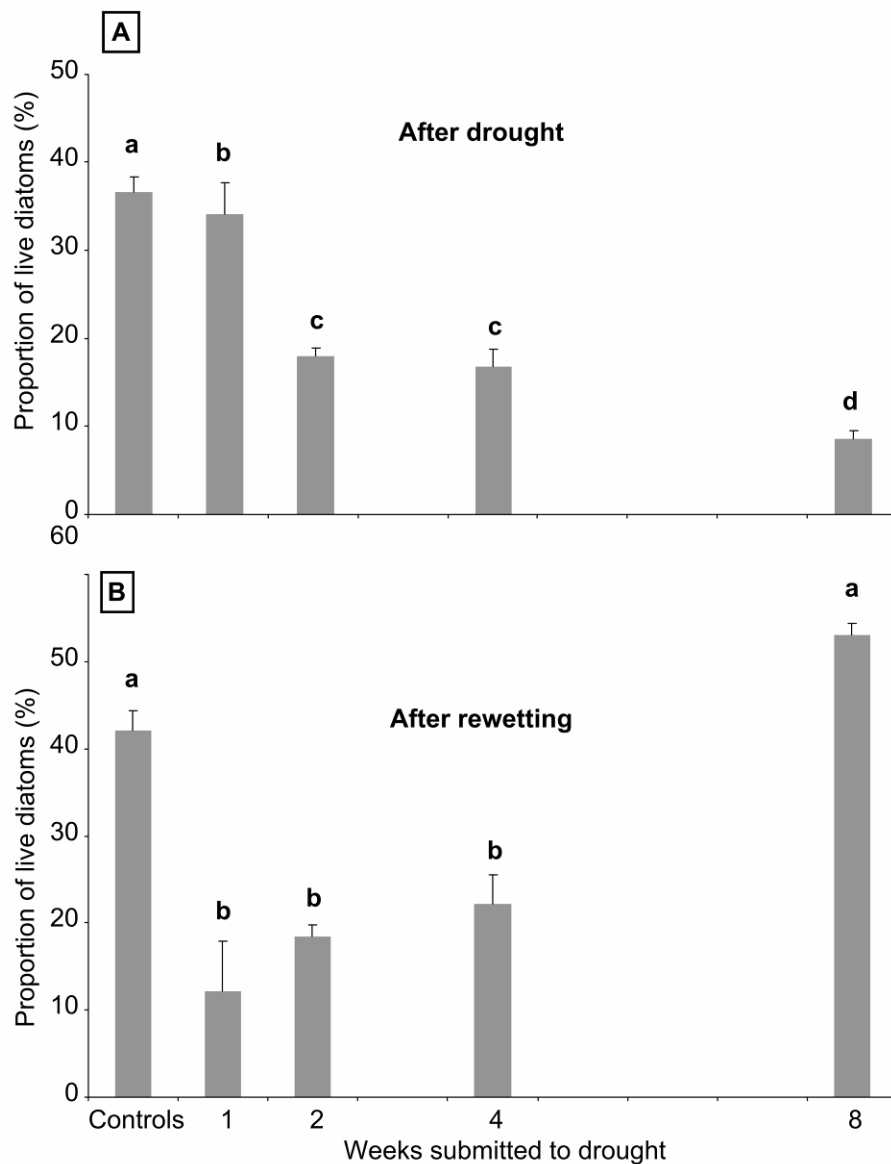
The monitoring of the two microorganisms, alone or in mixture, with a PhytoPAM fluorimeter brought information on the physiological state of cells *via* the maximal efficiency of photosystem II values (yield) (Table 1, Figure 18) and on the proportion of both algae in the mixture *via* the minimal fluorescence (Figure 18). Controls were stable throughout the experiment for both measures, except for the first yield values which were lower than those encountered later (0.32 for diatoms alone and 0.024 for cyanobacteria alone). In the mixture, diatoms fluorescence signal was barely detectable and the proportion of cyanobacteria was thus set to 100 % (initial state in Figure 18). Diatoms and cyanobacteria grown alone showed similar profiles when subjected to drought, with a progressive decrease of yield before a recovery after rewetting. This recovery was partial for cyanobacteria, while diatoms yield was higher after the disturbance than before (Table 1). In the mixture, drought had different impacts on diatoms and cyanobacteria so that only diatoms fluorescence signal was detectable at the end of drought and during rewetting (Figure 18, Table 1).

### Complex biofilms experiment

#### *Phototrophic compartment*

The results of algal counts are shown in Figure 19. The global composition of controls was widely dominated by cyanobacteria, particularly *Leptolyngbya amplivaginata* and *Leptolyngbya margaretheana*, while the main diatom species were *Achnantheidium cf minutissimum sensu lato*, *Achnantheidium exiguum*, *Eolimna minima* and *Germainiella* sp. (data not shown). Biofilm composition in controls remained stable despite the change of environment (transition from the artificial channel towards an aquarium). Drought induced a decrease of both diatoms and cyanobacteria cellular densities. This decrease was only slightly linked to the duration of the disturbance (Figure 19A): diatom densities were significantly lower after 8 weeks of drought compared to 1 week, while cyanobacteria were less affected by 1 week of drought compared to the other durations. One of the dominating cyanobacteria, *Leptolyngbya margaretheana*, was no more found in samples after drought application. Rewetting had no effect on diatoms growth, except in the 8-weeks duration treatment where growth was significant. In contrast, cyanobacteria densities continued to decrease, whatever the growth duration was. The algal density increased during aquarium incubation only for controls and 8-weeks drought duration.

The total composition of biofilms, revealed by diatom proportion (Figure 19B), remained almost stable during the duration of disturbance. This proportion slightly increased after



**Figure 20: Evolution of live diatoms proportion in the biofilm: at the end of drought phase (A.; control: initial state of biofilms) and at the end of rewetting phase (B.; control: direct transfer and incubation in an aquarium), (n = 3, mean ± standard deviation). Letters indicate statistically homogeneous groups**

**Table 2: Shannon index based on ARISA data, linked to the disturbances applied to biofilms.**

Numbers of weeks submitted to drought		0	1	2	4	8
Initial state in channel		0.93	0.93	0.93	0.93	0.93
Disturbances	Drought	-	3.55	3.41	3.38	2.82
	Environmental change	3.18	-	-	-	-
	Environmental change after drought	-	2.34	2.65	2.48	2.69

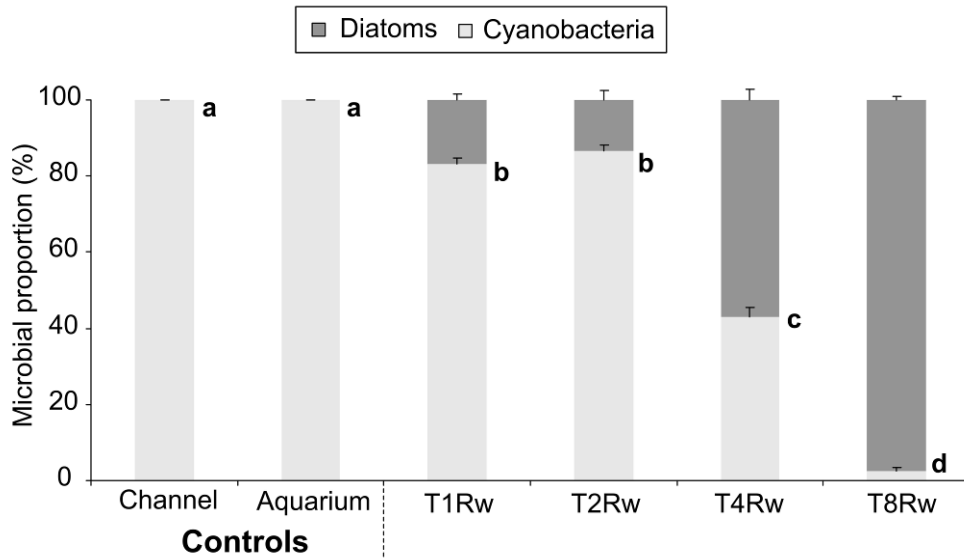
rewetting for the low drought durations (1 and 2 weeks) and notably increased for biofilms exposed to 4 and 8 weeks of drought. The decrease of diatoms densities at the end of drought was linked to a decrease in the proportion of live diatoms, which was significantly correlated to drought duration (Figure 20A). Surprisingly, after the 13-days rewetting phase, this proportion was higher for the longest drought duration than for the others (Figure 20B). For most treatments, the proportion of live diatoms either decreased or remained stable during the incubation in aquaria, except for the 8-weeks drought duration where it became 6 times higher ( $p < 0.05$ ) (Figure 20). We also observed that the increase of viability percentage at the end of rewetting was related to the drought duration. Similar observations on global composition were made from the proportion of diatoms and cyanobacteria inferred from PhytoPAM measurements (Figure 21). The transfer from channel to aquarium for controls had no impact on the global algal structure of biofilms, in which only a cyanobacterial signal was detected. The drought disturbance induced a strong modification with a transition from cyanobacteria-dominated biofilms to diatom-dominated biofilms, which was more pronounced as drought duration increased ( $p < 0.001$ ).

The observation of the maximal efficiency of photosystem II of algae in the biofilms was also consistent with the previous data (Figure 22). The extinction of the yield in cyanobacteria-dominated biofilms was very fast after the beginning of drought (- 92.3 % in 8 hours). After 13 days, the recovery of cyanobacteria was either low (less than 20 % of initial value) or null (for the 8-weeks drought). In contrast, a yield signal for the diatoms appeared during the rewetting phase. The diatoms yield of biofilms exposed to 4 and 8 weeks of drought was significantly higher than those of biofilms exposed to only 1 or 2 weeks of drought ( $p < 0.001$ , Figure 22).

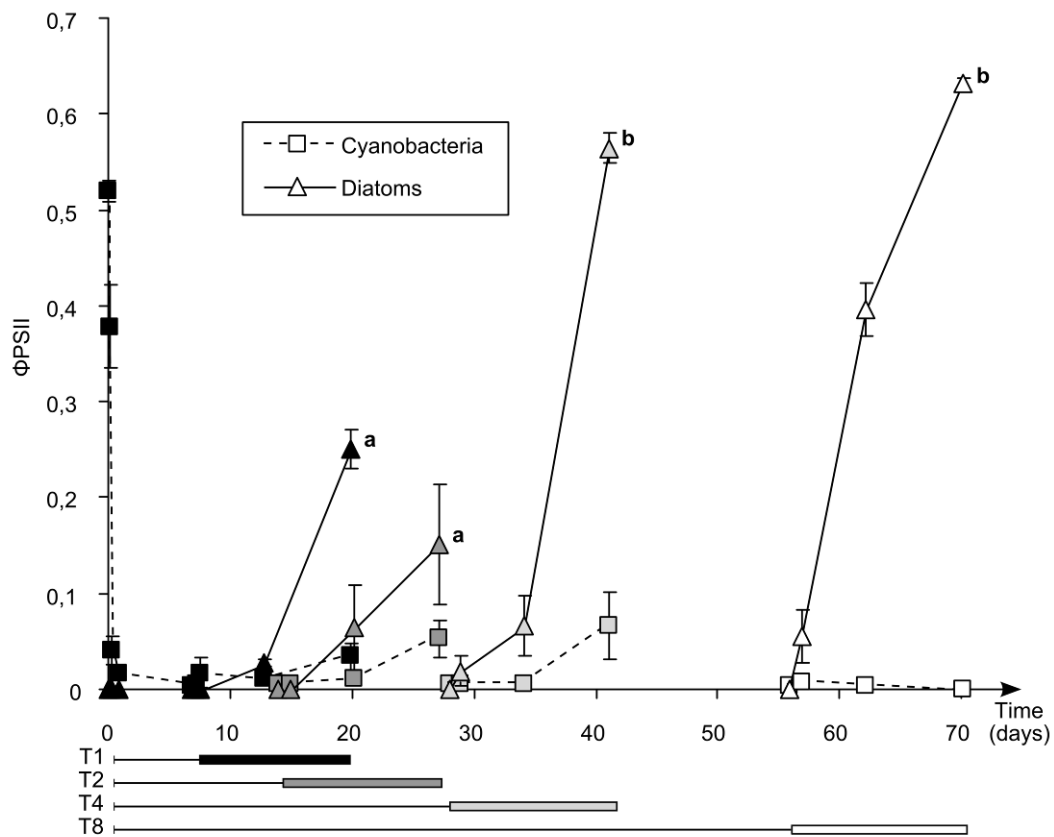
#### *Heterotrophic and prokaryote compartments*

The data generated with Biolog microplates have been analyzed with PCA (Figure 23). One replicate of 8-weeks drought duration tested was removed from the analysis because it was an outlier. Control communities (before and after incubation in aquaria) and rewetted communities showed similar patterns of substrates utilization (PERMANOVA,  $p = 0.190$ ) whereas functional communities at the end of drought phase were significantly different (PERMANOVA,  $p = 0.012$ ). Bacterial communities were able to degrade mainly polymers, carbohydrates and carboxylic acids after drought while controls and rewetted communities preferred amines, amino acids, polymers and phenolic compounds.

We performed a PCA on prokaryote genetic diversity data obtained with ARISA (Figure 24). This analysis highlighted a strong effect of drought and subsequent rewetting on the structure of communities, which was confirmed in a PERMANOVA analysis ( $p = 0.0001$ ). The



**Figure 21: Microbial proportion (%) inferred from minimal fluorescence values measured with a PhytoPAM after the end of rewetting (Rw)(n = 40, mean ± standard deviation). Letters indicate statistically homogeneous groups.**



**Figure 22: Maximal efficiency of photosystem II (ΦPSII) of diatoms and cyanobacteria throughout the drought and rewetting phases, measured with a PhytoPAM (n = 4, mean ± standard deviation). Line = drought duration; shaded bars = rewetting duration. Letters indicate statistically homogeneous groups.**

transfer from channel to aquarium had a visible effect on the structure of control biofilms (dotted arrow). It was notably linked to a decrease in a particular OTU (271 base pairs) which was strongly dominant in these communities (Figure 24B). Drought effect was important on OTU 271 but drought still significantly impacted community structure when this OTU was removed from the analysis (data not shown). Diversity was also measured by the calculation of the Shannon index on ARISA data (Table 2). In addition to modifying the dominant species of the communities, disturbances (transfer in different conditions for controls or drought), induced a modification in the community structures by increasing evenness. Species richness, expressed by the number of detected OTUs, increased when drought was applied (from  $40.8 \pm 14.4$  to  $70.4 \pm 4.7$ ) and returned to initial values after rewetting ( $42.7 \pm 1.8$ ).

## Discussion

In natural environments, the recovery of biofilms after a drought disturbance is the result of two simultaneous mechanisms: regrowth and accretion of cells coming from refuges (drift) (Robson *et al.*, 2008). In our mesocosm experiment, we used individual aquaria for rewetting to study only regrowth from dry biofilm. Biofilms were composed of two compartments, a phototrophic one and a heterotrophic one (essentially bacteria). Those two components have shown different responses when and after the disturbance was applied.

### *Effect of drought on phototrophic compartment*

The response of the phototrophic microorganisms to the drought disturbance has been studied through two approaches (microscope counts and fluorescence measurements) which brought consistent results. The use of fluorescence methods is a very effective non-invasive method to study the photosynthetic component in biofilms (Barranguet and Kromkamp, 2000). In natural biofilms, the yield has been shown to be negatively correlated to the water content (Timoner *et al.*, 2012), proving its efficacy to follow the effects of drought.

After rewetting, the cyanobacteria, formerly dominant, were progressively replaced by diatoms as the intensity of disturbance increased. For the longest drought durations (4 and/or 8 weeks), both biomass and photosynthetic activity of diatoms were higher after rewetting than before drought while cyanobacteria density was lower (see Figure 2A). Two aspects of the results were unexpected: the replacement of cyanobacteria by diatoms and the higher recovery of biofilms for the longest drought durations. Cyanobacteria are considered as better adapted to desiccation than diatoms notably thanks to the production of mucilage (Romaní *et al.*, 2012). Nevertheless, the tolerance to desiccation strongly depends on the species considered (Hawes *et al.*, 1992b). The results of drying experiments or in situ observations are often contrasted and linked to the specific composition of biofilms (Mc Donough *et al.*, 2011). Here, the replacement of cyanobacteria may be explained by a low resistance to drought of the cyanobacterial strains that were present in the biofilms. The

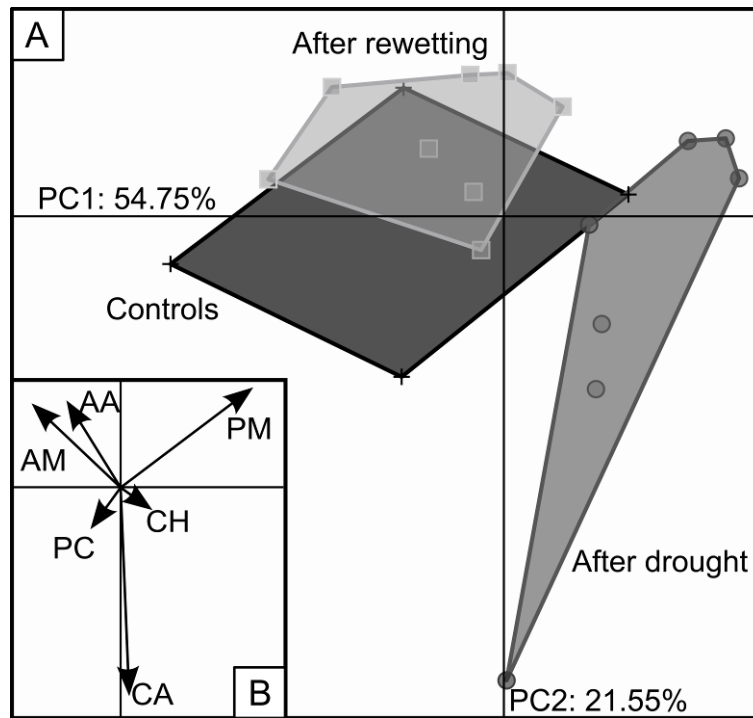


Figure 23: A. PCA based on the Biolog data. Plots are grouped to the phase biofilms were sampled: end of drought or end of rewetting. B. Factorial map of the chemical guilds of substrates (AA = amine acids; AM = amines; CA = carboxylic acids; CH = carbohydrates; PC = phenolic compounds; PM = polymers).

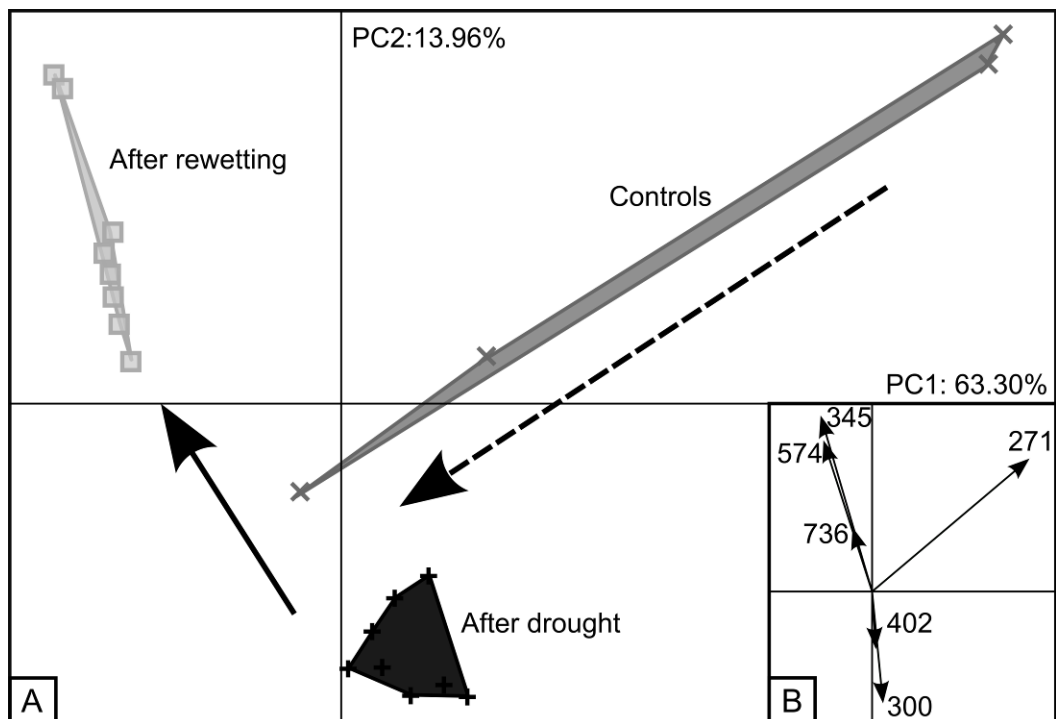


Figure 24: A. PCA based on ARISA data. B. Factorial map of the OTUs designed by the length of PCR fragment in base pairs. Only those that are more correlated to the axes are represented.



relative increase in diatom densities is certainly explained by the decrease of their competitors, the cyanobacteria. This competition was direct competition for resources but may also have been interference competition like allelopathy. The application of a disturbance (drought) may contribute to the release of the negative constraint of cyanobacteria on diatoms. The existence of negative interactions between diatoms and cyanobacteria mediated by inhibiting compounds is suggested by the low photosynthetic activity of diatoms in biofilms before disturbance. Similar results have been obtained by Van der Grinten et al. (2005) in co-cultures of *Nitzschia perminuta* and *Leptolyngbya foveolarum*. Such an interaction may also occur in our complex biofilms, but additional experiments are needed to prove it. It may participate in the establishment and preservation of cyanobacteria dominance in biofilms as known for planktonic communities (Leflaive and Ten-Hage, 2007).

The higher recovery of diatoms for stronger disturbances may be explained by the selection of diatom individual that are more resistant to drought and / or more efficient to resume growth when biofilms are rewetted. The other drought durations may have been too short to allow this selection. Such a rebound of diatoms when a strong disturbance is released has also been observed by measuring photosynthetic activity in natural biofilms subjected to several months of drought (Timoner et al., 2012).

The two experiments, isolated algal strains and the associated bacterial consortia and with complex biofilms, brought similar results (see Figures 1 and 4). The main difference between those two experiments lies in the time at which the changes occurred: during the drought period for the preliminary experiment and after rewetting for the complex biofilm. This was associated with a difference in the speed of yield signal extinction after the beginning of drought: several days *versus* a few hours, respectively. These two observations are certainly explained by the presence of residual humidity in the plates of the preliminary experiment (closed with a lid) which could have allowed a progressive desiccation, associated here with the structural modification. The recovery of photosynthetic activity was also faster in this case. It may be explained by the fact that progressive drying has been shown to induce physiological adjustments in cells (Fernandez-Valiente *et al.*, 2007), which allows cells to allocate resources to other processes and helps to better withstand desiccation stress (Fleming and Castenholz, 2007). These results indicate that the way the disturbance was applied (suddenly or progressively) had no influence on the final response of the phototrophic community.

In the present experiment, algal diversity was low and we observed only a slight effect of disturbance, whatever the duration was, on specific richness or on the structure of assemblages (disappearance of one species of cyanobacteria). In this regard, contrasted results can be found in the literature (e.g. no effect on richness (Zanon *et al.*, 2013), or

decrease of richness in some cases (Gottlieb *et al.*, 2005)). The dynamics of species richness seems to depend on the intensity / periodicity of the disturbance and on the degree of prior adaptation of the microbial communities. This confirms that it is extremely difficult to anticipate the effect of a temporary disturbance on microbial biodiversity.

#### *Effect of drought on bacterial compartment*

We studied the bacterial component of biofilms through two approaches, the structure of the community *via* genetic diversity and the potential functional diversity with Biolog. We did not measure the effective enzymatic activity of bacteria in dry or wet biofilms. Due to their metabolic flexibility and their physiological tolerance to stresses, bacteria are expected to be very resilient.

The structure of prokaryotic communities, as revealed by ARISA, was strongly modified by drought disturbance. The species richness (number of OTUs) and the Shannon index significantly increased (see Table 2) independently of drought duration. This may be explained by the selective removal of dominant OTUs which created potential spaces for species that were previously too rare to be detected. After a 2-weeks rewetting, the Shannon index decreased but did not reach its initial value. The new dominant OTUs were not the same than before disturbance (see Figure 24). The recovering community had thus a rather similar structure but a different composition than before disturbance. Since otherwise we observed a decrease in cyanobacteria proportion in biofilms, we verified if the OTU 271, which was dominant in undisturbed biofilms, could have been a cyanobacteria species by isolating and extracting DNA from several cyanobacteria strains of the mesocosm. The lengths of the amplicons obtained were very different from 271 bp (data not shown), we thus rejected this hypothesis. The response of bacterial communities to drought has been well studied in soil or in river sediments, in microcosm experiments. Microbial diversity and community structure may be modified in response to water stress (Amalfitano *et al.*, 2008) and rewetting (Fierer *et al.*, 2003). We did not observe structural resilience within 2 weeks but it could have been shown by a longer monitoring. Nevertheless, Rees *et al.* (2006) followed the microbial structure of river sediments in Australia during a month after rewetting and have shown no return to initial structure.

Unlike phototrophic microorganisms, it is difficult for bacteria to exclude external inputs during rewetting experiments, which were not performed in axenic conditions. Nevertheless, the recovery of heterotrophic communities was more likely linked to the dry biofilm itself. Indeed, it has been shown that live bacterial cells can persist in dry sediments (Amalfitano *et al.*, 2008; Marxsen *et al.*, 2010).

To study the potential functional diversity of the heterotrophic component of biofilms, we used Biolog Ecoplates. Though Biolog have been criticized as a culturing method (Preston-Mafham *et al.*, 2002), they have proved to be very useful to compare microbial communities in various conditions or stress, since the biases are the same for all the samples (e.g. Leflaive *et al.*, 2008; Paule *et al.*, 2013). Even after 8 weeks of drought, biofilm samples have induced a response in Biolog Ecoplates which indicates the persistence of a potential activity. This is consistent with field results obtained by Timoner *et al.* (2012) who observed heterotrophic activity during a several month streambed desiccation. We obtained similar patterns in the type (chemical guild) of substrates potentially metabolized by biofilms before disturbance and after rewetting (see Figure 6), with most of the activity concentrated on N compounds. At the end of drought, biofilms were characterized by higher capabilities in polymers and carbohydrates degradation. Such a decrease in N compounds degradation has also been shown by Timoner *et al.* (2012) by measuring leucine-aminopeptidase activity in desiccated biofilms and sediments. During drought phase, where no growth occurs, bacteria preferentially use C and P maybe for energy generation (Schimel *et al.*, 2007). The higher potential for polymers degradation (glycogen,  $\alpha$ -cyclidextrin) in dry biofilms may be linked to an adaptation of bacteria to the use of compounds more difficult to metabolize than other carbon sources. Indeed, the dissolved organic carbon from photosynthetic microorganisms, which is an important source of carbon for algae-associated bacteria (Murray *et al.*, 1986), should decrease in dry biofilms as photosynthetic activity is impaired by dryness. At the end of drought period, the remaining organic matter may be more difficult to metabolize.

Our results suggested a decoupling between genetic and functional diversity responses to the disturbance which may be reinforced with assessing other key functional processes such as respiration or nitrogen fixation. Data obtained with various types of stress exhibited similar (exposure to herbicides (de Liphay *et al.*, 2004)) or contrasting results (phytoplankton bloom (Sala *et al.*, 2005)) regarding coupling diversity and function. In our experiment with drought as a disturbance, the community structure showed no resilience unlike the potential functional diversity. The fact that communities fully recovered in terms of potential functional diversity while they did not in terms of genetic structure is explained by functional redundancy, *i.e.* the ability of two microbial communities to carry out a functional process at a similar rate, regardless of differences in composition (Allison and Martiny, 2008). Arguments supporting functional redundancy are the extremely high abundance and diversity of microorganisms. It is supported by the experimental results of Wertz *et al.* (2007) who showed no effect of microbial composition (manipulated by serial dilutions) on the functioning in microcosms.

### *Conclusions on engineering versus ecological resilience*

As explained above, phototrophic and heterotrophic components responded differently to a range of disturbances. The structure of phototrophic component showed resistance when the disturbance was weak (1 week) as it was stable (in terms of diatoms proportions, see Figure 19B) during and after drought. For stronger disturbances, resistance lasted during the drought but we observed modifications of taxonomic composition as soon as optimal growth conditions resumed. In this case, the disturbance led to a new state of the microbial system, we can thus use the term *ecological resilience* (Holling, 1996). To verify the stability of the new state, it would have been necessary to follow rewetted biofilms during a longer time. From a functional view point, there was no resilience within the 2-weeks rewetting for the short durations of drought since photosynthetic yields remained very low (see Figure 22). In contrast, for the long durations of drought, biofilms fully recovered photosynthetic activity.

Regarding the bacterial component, there was an effect of drought duration neither on community structure nor on functional diversity. When the disturbance was applied, the structure and composition of community, the species richness and the potential functional diversity were modified. After the disturbance, species richness and functional diversity returned to initial values while community structure and composition remained very different. In this case, *ecological resilience* also applies whatever the intensity of disturbance was.

Taking the biofilm system as a whole, the range of disturbance applied did not allow observing a transition from *engineering resilience* to *ecological resilience*. *Engineering resilience* is thought to be more fitted to describe the response of communities to small disturbances, while *ecological resilience* is more probable when large disturbances are applied (Peterson *et al.*, 1998). Even for the lowest disturbance the composition of the microbial system was significantly modified, while in most cases it's functioning fully recovered. Resistance was observed only for the phototrophic component. In the case of longer observations after the disturbance, it would have been difficult to distinguish *engineering resilience* from natural successions in biofilms, which are highly dynamic microbial ecosystems. In the field, *engineering resilience* may be faster thanks to the drift which favors the accretion of cells from biofilms that were not subjected to drought and whom composition did not change. In *ex situ* experiments, the fast functional resilience is notably allowed by functional redundancy.

### **Acknowledgements**

We are grateful to the Adour-Garonne Water Agency and ASCONIT Consultants for the project funding and to ANRT for the CIFRE fellowship to A. Barthès. We are grateful to the anonymous referees who helped improving this manuscript.

## References

- Allison SD, Martiny JBH. 2008. Resistance, resilience, and redundancy in microbial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 11512-11519. 10.1073/pnas.0801925105.
- Amalfitano S, Fazi S, Zoppini A, Caracciolo AB, Grenni P, Puddu A. 2008. Responses of benthic bacteria to experimental drying in sediments from Mediterranean temporary rivers. *Microbial Ecology* **55**: 270-279. 10.1007/s00248-007-9274-6.
- Baker NR. 2008. Chlorophyll fluorescence: A probe of photosynthesis in vivo in *Annual Review of Plant Biology*, pp. 89-113.
- Barranguet C, Kromkamp J. 2000. Estimating primary production rates from photosynthetic electron transport in estuarine microphytobenthos. *Marine Ecology Progress Series* **204**: 39-52. 10.3354/meps204039.
- Battin TJ, Kaplan LA, Newbold JD, Hansen CME. 2003. Contributions of microbial biofilms to ecosystem processes in stream mesocosms. *Nature* **426**: 439-442. 10.1038/nature02152.
- Battin TJ, Sloan WT, Kjelleberg S, Daims H, Head IM, Curtis TP, Eberl L. 2007. Microbial landscapes: new paths to biofilm research. *Nature Reviews Microbiology* **5**: 76-81. 10.1038/nrmicro1556.
- Bonada N, Resh VH. 2013. Mediterranean-climate streams and rivers: geographically separated but ecologically comparable freshwater systems. *Hydrobiologia* **719**: 1-29. 10.1007/s10750-013-1634-2.
- Cardinale M, Brusetti L, Quatrini P, Borin S, Puglia AM, Rizzi A, Zanardini E, Sorlini C, Corselli C, Daffonchio D. 2004. Comparison of different primer sets for use in automated ribosomal intergenic spacer analysis of complex bacterial communities. *Applied and Environmental Microbiology* **70**: 6147-6156. 10.1128/aem.70.10.6147-6156.2004.
- CEN. 2004. EN 13946: Water quality - Guidance standard for the routine sampling and pre-treatment of benthic diatoms from rivers. European Standard, Geneva.
- CEN. 2007. EN 14407: Water quality - Guidance standard for the identification, enumeration and interpretation of benthic diatom samples from running waters. pp. 1-13. European Standard, Geneva.
- Choi KH, Dobbs FC. 1999. Comparison of two kinds of Biolog microplates (GN and ECO) in their ability to distinguish among aquatic microbial communities. *Journal of Microbiological Methods* **36**: 203-213. 10.1016/s0167-7012(99)00034-2.

- Costello EK, Stagaman K, Dethlefsen L, Bohannan BJM, Relman DA. 2012. The Application of Ecological Theory Toward an Understanding of the Human Microbiome. *Science* **336**: 1255-1262. 10.1126/science.1224203.
- de Liphay JR, Johnsen K, Albrechtsen HJ, Rosenberg P, Aamand J. 2004. Bacterial diversity and community structure of a sub-surface aquifer exposed to realistic low herbicide concentrations. *Fems Microbiology Ecology* **49**: 59-69. 10.1016/j.femsec.2004.02.007.
- Dodds WK, Gudder DA. 1992. The Ecology of Cladophora. *Journal of Phycology* **28**: 415-427. 10.1111/j.0022-3646.1992.00415.x.
- Eaton AD, Franson MAH, Association APH, Association AWW, Federation WE. 2005. *Standard Methods for the Examination of Water & Wastewater*. American Public Health Association: Washington, DC.
- Fernandez-Valiente E, Camacho A, Rochera C, Rico E, Vincent WF, Quesada A. 2007. Community structure and physiological characterization of microbial mats in Byers Peninsula, Livingston Island (South Shetland Islands, Antarctica). *Fems Microbiology Ecology* **59**: 377-385. 10.1111/j.1574-6941.2006.00221.x.
- Fierer N, Schimel JP, Holden PA. 2003. Influence of drying-rewetting frequency on soil bacterial community structure. *Microbial Ecology* **45**: 63-71. 10.1007/s00248-002-1007-2.
- Fisher MM, Triplett EW. 1999. Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 4630-4636.
- Fleming ED, Castenholz RW. 2007. Effects of periodic desiccation on the synthesis of the UV-screening compound, scytonemin, in cyanobacteria. *Environmental Microbiology* **9**: 1448-1455. 10.1111/j.1462-2920.2007.01261.x.
- Garland JL. 1996. Patterns of potential C source utilization by rhizosphere communities. *Soil Biology & Biochemistry* **28**: 223-230. 10.1016/0038-0717(95)00113-1.
- Gonzalez A, King A, Robeson MS, Song SJ, Shade A, Metcalf JL, Knight R. 2012. Characterizing microbial communities through space and time. *Current Opinion in Biotechnology* **23**: 431-436. 10.1016/j.copbio.2011.11.017.
- Gottlieb A, Richards J, Gaiser E. 2005. Effects of desiccation duration on the community structure and nutrient retention of short and long-hydroperiod Everglades periphyton mats. *Aquatic Botany* **82**: 99-112. 10.1016/j.aquabot.2005.02.012.
- Hadoux E, Plaire M, Laplace-Treyture C. 2010. PHYTOBS v2.0 : Outil de comptage du phytoplancton et de calcul de biovolumes en laboratoire. Version 2.0. Application JAVA.

- Hawes I, Howard-Williams C, Vincent WF. 1992. Desiccation and recovery of Antarctic cyanobacteria mats. *Polar Biology* **12**: 587-594.
- Hillebrand H, Durselen CD, Kirschtel D, Pollinger U, Zohary T. 1999. Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. *Journal of Phycology* **35**: 403-424. 10.1046/j.1529-8817.1999.3520403.x.
- Holling CS. 1973. Resilience and stability of ecological systems. *Annual Review of Ecology and Systematics* **4**: 1-24. 10.1146/annurev.es.04.110173.000245.
- Holling CS. 1996. Engineering resilience versus ecological resilience. in *Engineering within ecological constraints* (ed. Schulze P), pp. 31-44. National Academy, Washington (DC).
- Huber-Pestalozzi G. 1938. *Das Phytoplankton des Süßwassers : Systematik und Biologie*. E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung: Stuttgart.
- IPCC. 2007. Contribution of Working Group II to the Fourth Assessment. Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. in *Climate Change 2007: Impacts, Adaptation and Vulnerability* (eds. Parry ML, Canziani OF, Palutikof JP, van der Linden PJ, Hanson CE), p. 976, Cambridge, UK.
- Jakob T, Schreiber U, Kirchesch V, Langner U, Wilhelm C. 2005. Estimation of chlorophyll content and daily primary production of the major algal groups by means of multiwavelength-excitation PAM chlorophyll fluorometry: performance and methodological limits. *Photosynthesis Research* **83**: 343-361. 10.1007/s11120-005-1329-2.
- Kelly MG, Cazaubon A, Coring E, Dell' Uomo A, Ector L, Goldsmith B, Guasch H, Hurlimann J, Jarlman A, Kawecka B, Kwadrans J, Laugaste R, Lindstrom EA, Leitao M *et al.* 1998. Recommendations for the routine sampling of diatoms for water quality assessments in Europe. *Journal of Applied Phycology* **10**: 215-224. DOI: 10.1023/a:1008033201227.
- Kilham SS, Kreeger DA, Lynn SG, Goulden CE, Herrera L. 1998. COMBO: a defined freshwater culture medium for algae and zooplankton. *Hydrobiologia* **377**: 147-159. 10.1023/a:1003231628456.
- Komárek J, Anagnostidis K. 2000. *Cyanoprokaryota 1. Teil: Chroococcales*. Fischer, G.: Stuttgart.
- Lear G, Dopheide A, Ancion P-Y, Roberts K, Washington V, Smith J, Lewis GD. 2012. Biofilms in Freshwater: Their Importance for the Maintenance and Monitoring of Freshwater Health. in *Microbial Biofilms: Current Research and Applications* (eds. Lear G, Lewis GD), pp. 129-151. Caister Academic Press, Caister.

- Ledger ME, Brown LE, Edwards FK, Milner AM, Woodward G. 2013. Drought alters the structure and functioning of complex food webs. *Nat Clim Chang* **3**: 223-227. 10.1038/nclimate1684.
- Leflaive J, Céréghino R, Danger M, Lacroix G, Ten-Hage L. 2005. Assessment of Self-Organizing Maps to analyze sole-carbon source utilization profiles. *Journal of Microbiological Methods* **62**: 89-102.
- Leflaive J, Danger M, Lacroix G, Lyautey E, Oumarou C, Ten-Hage L. 2008. Nutrient effects on the genetic and functional diversity of aquatic bacterial communities. *FEMS Microbiology Ecology* **66**: 379-390. 10.1111/j.1574-6941.2008.00593.x.
- Leflaive J, Ten-Hage L. 2007. Algal and cyanobacterial secondary metabolites in freshwaters: a comparison of allelopathic compounds and toxins. *Freshwater Biology* **52**: 199-214. 10.1111/j.1365-2427.2006.01689.x.
- Lock MA. 1993. Attached microbial communities in rivers. in *Aquatic microbiology - an ecological approach* (ed. Ford TE), pp. 113-138. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK.
- Marxsen J, Zoppini A, Wilczek S. 2010. Microbial communities in streambed sediments recovering from desiccation. *Fems Microbiol Ecol* **71**: 374-386. 10.1111/j.1574-6941.2009.00819.x.
- Mc Donough OT, Hosen JD, Palmer MA. 2011. Temporary Streams: The Hydrology, Geography, and Ecology of Non-Perennially Flowing Waters in *Rivers Ecosystems: Dynamics, Management and Conservation* (eds. Elliot SE, Martin LE), pp. 259-290. Nova Science Publishers, Hauppauge, NY.
- Murray RE, Cooksey KE, Priscu JC. 1986. Stimulation of Bacterial-DNA Synthesis by Algal Exudates in Attached Algal-Bacterial Consortia. *Applied and Environmental Microbiology* **52**: 1177-1182.
- Nadeau TL, Rains MC. 2007. Hydrological connectivity between headwater streams and downstream waters: How science can inform policy. *Journal of the American Water Resources Association* **43**: 118-133. 10.1111/j.1752-1688.2007.00010.x.
- Paule A, Lamy A, Roubex V, Delmas F, Rols J-L. 2014. Influence of the natural growth environment on the sensitivity of phototrophic biofilm to herbicide. *Environmental Science and Pollution Research*. 10.1007/s11356-014-3429-z.
- Paule A, Lauga B, Ten-Hage L, Morchain J, Duran R, Paul E, Rols JL. 2011. A photosynthetic rotating annular bioreactor (Taylor-Couette type flow) for phototrophic biofilm cultures. *Water Research* **45**: 6107-6118. 10.1016/j.watres.2011.09.007.
- Paule A, Roubex V, Lauga B, Duran R, Delmas F, Paul E, Rols JL. 2013. Changes in tolerance to herbicide toxicity throughout development stages of phototrophic biofilms. *Aquatic Toxicology* **144-145**: 310-321. 10.1016/j.aquatox.2013.09.024.



- Peterson CG. 1987. Influences of Flow Regime on Development and Desiccation Response of Lotic Diatom Communities. *Ecology* **68**: 946-954. 10.2307/1938366.
- Peterson G, Allen CR, Holling CS. 1998. Ecological resilience, biodiversity, and scale. *Ecosystems* **1**: 6-18. 10.1007/s100219900002.
- Pimm SL. 1984. The complexity and stability of ecosystems. *Nature* **307**: 321-326. 10.1038/307321a0.
- Preston-Mafham J, Boddy L, Randerson PF. 2002. Analysis of microbial community functional diversity using sole-carbon-source utilisation profiles - a critique. *Fems Microbiology Ecology* **42**: 1-14. 10.1111/j.1574-6941.2002.tb00990.x.
- Pusch M, Fiebig D, Brettar I, Eisenmann H, Ellis BK, Kaplan LA, Lock MA, Naegeli MW, Traunspurger W. 1998. The role of micro-organisms in the ecological connectivity of running waters. *Freshwater Biology* **40**: 453-495. 10.1046/j.1365-2427.1998.00372.x.
- Ramette A. 2007. Multivariate analyses in microbial ecology. *Fems Microbiology Ecology* **62**: 142-160. 10.1111/j.1574-6941.2007.00375.x.
- Rees GN, Watson GO, Baldwin DS, Mitchell AM. 2006. Variability in sediment microbial communities in a semipermanent stream: impact of drought. *Journal of the North American Benthological Society* **25**: 370-378. 10.1899/0887-3593(2006)25[370:vismci]2.0.co;2.
- Robson BJ, Matthews TG, Lind PR, Thomas NA. 2008. Pathways for algal recolonization in seasonally-flowing streams. *Freshwater Biol* **53**: 2385-2401. 10.1111/j.1365-2427.2008.02061.x.
- Roháček K, Barták M. 1999. Technique of the Modulated Chlorophyll Fluorescence: Basic Concepts, Useful Parameters, and Some Applications. *Photosynthetica* **37**: 339-363. 10.1023/A:1007172424619.
- Romaní AM, Amalfitano S, Artigas J, Fazi S, Sabater S, Timoner X, Ylla I, Zoppini A. 2012. Microbial biofilm structure and organic matter use in mediterranean streams. *Hydrobiologia* **719**: 43-58. 10.1007/s10750-012-1302-y.
- Rykiel EJ. 1985. Towards a definition of ecological disturbance. *Australian Journal of Ecology* **10**: 361-365. 10.1111/j.1442-9993.1985.tb00897.x.
- Sala MM, Balague V, Pedros-Alio C, Massana R, Felipe J, Arin L, Illoul H, Estrada M. 2005. Phylogenetic and functional diversity of bacterioplankton during *Alexandrium* spp. blooms. *Fems Microbiology Ecology* **54**: 257-267. 10.1016/j.femsec.2005.04.005.
- Schimel J, Balsler TC, Wallenstein M. 2007. Microbial stress-response physiology and its implications for ecosystem function. *Ecology* **88**: 1386-1394. 10.1890/06-0219.

- Schreiber U. 1998. Chlorophyll fluorescence: New instruments for special applications. in *Photosynthesis: Mechanisms and Effects* (ed. Garab G), pp. 4253-4258. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Stanier RY, Kunisawa R, Mandel M, Cohenbaz G. 1971. Purification and properties of unicellular blue-green algae (Order Chroococcales). *Bacteriological Reviews* **35**: 171-205.
- Timoner X, Acuna V, Von Schiller D, Sabater S. 2012. Functional responses of stream biofilms to flow cessation, desiccation and rewetting. *Freshwater Biology* **57**: 1565-1578. 10.1111/j.1365-2427.2012.02818.x.
- Tzoraki O, Nikolaidis NP. 2007. A generalized framework for modeling the hydrologic and biogeochemical response of a Mediterranean temporary river basin. *Journal of Hydrology* **346**: 112-121. 10.1016/j.jhydrol.2007.08.025.
- Van der Grinten E, Janssen A, de Mutsert K, Barranguet C, Admiraal W. 2005. Temperature- and light-dependent performance of the cyanobacterium *Leptolyngbya foveolarum* and the diatom *Nitzschia perminuta* in mixed biofilms. *Hydrobiologia* **548**: 267-278. 10.1007/s10750-005-5324-6.
- Wertz S, Degrange V, Prosser JI, Poly F, Commeaux C, Guillaumaud N, Le Roux X. 2007. Decline of soil microbial diversity does not influence the resistance and resilience of key soil microbial functional groups following a model disturbance. *Environmental Microbiology* **9**: 2211-2219. 10.1111/j.1462-2920.2007.01335.x.
- Zanon JE, Simoes NR, Rodrigues L. 2013. Effects of recurrent disturbances on the periphyton community downstream of a dammed watercourse. *Brazilian Journal of Biology* **73**: 253-258. 10.1590/S1519-69842013000200005.

# CHAPITRE III : IMPACT DE L'ASSECHEMENT DE BIOFILMS PHOTOTROPHES SUR LES COMMUNAUTES DE DIATOMEES EN MILIEU NATUREL - ETUDE EXPERIMENTALE EN COURS D'EAU NON PERMANENTS

A travers une expérience de terrain, nous testons l'effet d'un assèchement provoqué de durée variable (1 à 4 semaines) et en conditions naturelles, sur la structure des communautés de diatomées et ses conséquences sur les notes indicielles utilisées en routine. Nos résultats montrent qu'un assèchement, même de courte durée, a un impact fort et durable sur la structure des communautés, mettant ainsi en valeur l'importance de perturbations physiques sur le contrôle de la trajectoire évolutive des communautés. Ces modifications peuvent avoir un effet non négligeable sur les pratiques d'échantillonnage utilisées en routine, qui font l'objet d'une discussion.



## I. Présentation de l'étude et synthèse des principaux résultats.

Dans un contexte de réchauffement climatique global, associé à des pressions anthropiques croissantes afin de pallier aux besoins humains et industriels, les rivières subissent des assèchements saisonniers dont l'importance s'accroît de façon notable. Le pourtour Méditerranéen français étant une région caractérisée par des étés chauds et secs et de crues ponctuelles mais violentes, elle est particulièrement indiquée pour l'étude de l'assèchement sur les communautés de diatomées en milieu naturel.

Le principal objectif de ce chapitre était d'étudier l'impact d'un épisode d'assèchement et d'une durée variable sur la structure des communautés de diatomées. L'application d'une telle contrainte peut potentiellement avoir une incidence sur les indices biologiques (IBD / IPS) utilisés en routine, elle est donc importante à prendre en considération. Les conséquences sur la bioindication en milieu asséché sera donc développé dans le Chapitre IV.

La rivière du Maureillas à Maureillas-Las-Illas (Pyrénées-Orientales, France) a été choisie comme site d'étude du fait de l'assèchement partiel qu'elle subit chaque année, et de la présence d'un grand nombre de substrats de type pierres, essentiels à cette étude (Figure 25). Elle est située à 600 mètres en aval de la station d'épuration de la ville de Maureillas-Las-Illas. Nous avons étudié ici l'effet de 3 durées d'assèchement provoqué de 1, 2 et 4 semaines sur les communautés de diatomées benthiques lors de la remise en eau. Des pierres ont été prélevées dans la rivière et déposées sur la rive pour une durée d'assèchement donnée (pierres sèches, D : Dried ; Figure 26). Parallèlement, d'autres pierres (Cu : Cleaned-up) ont été prélevées pour être nettoyées à l'aide d'une brosse métallique et d'éthanol afin de les rendre vierges de toute diatomée. Enfin, les pierres restant dans le cours d'eau ont servi de contrôles (C : Control). Pour chaque prélèvement, les biomasses de 3 pierres ont été regroupées.

A la fin de chaque période d'assèchement, les pierres D et Cu ont été replacées dans le cours d'eau et des prélèvements ont été effectués au cours des 28 jours suivants, temps théorique permettant aux communautés pour revenir à un état d'équilibre (Kelly *et al.*, 1998; Paule *et al.*, 2013). En parallèle, des prélèvements sur des pierres C n'ayant pas subi d'assèchement ont été réalisés. Pour chaque durée d'assèchement, 6 prélèvements ont été réalisés à 0, 1, 4, 8, 18 et 28 jours, sauf pour les pierres Cu qui n'ont pas été prélevées au moment de la remise en eau (J0). Les échantillons ont été fixés à l'aide de glutaraldéhyde 1 % et stockés à l'obscurité et à 4°C.

Trois paramètres ont été étudiés : la composition des communautés de diatomées, leur taux de mortalité et les notes indiciaires (IBD/IPS, développé dans le chapitre IV).



Figure 25 : Station d'étude à Maureillas-las-Illas (Pyrénées-Orientales, France).

Photo : S. Coulon, ASCONIT Consultants

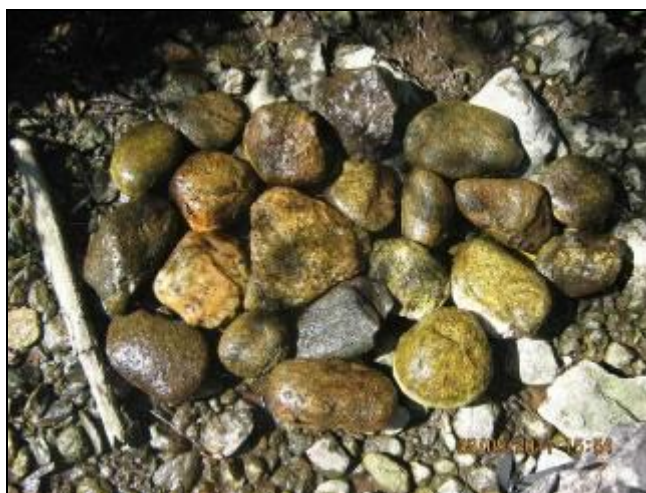


Figure 26 : Pierres déposées sur les rives, subissant l'assèchement.

Photo : S. Coulon, ASCONIT Consultants

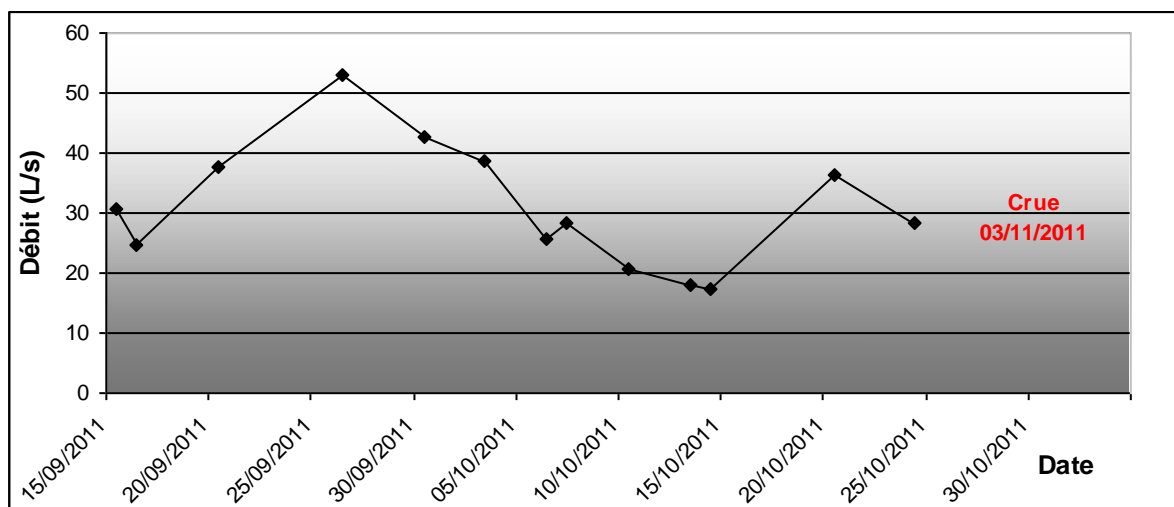


Figure 27 : Evolution des débits au cours de l'expérience.

Des mesures physicochimiques *in situ* ont été effectuées à chaque prélèvement (Température de l'eau, pH, Conductivité, Concentration en oxygène dissous, Pourcentage de saturation en oxygène), ainsi que des mesures de débits suivant les recommandations françaises (Agence de l'Eau Loire-Bretagne, 2006).

L'étude de la composition des communautés de diatomées a été réalisée par traitement et montage de lames de détermination, comme indiqué dans le chapitre I, II. 4. a. Les échantillons ont été déterminés de façon classique en microscopie optique, jusqu'à atteindre au moins 400 unités diatomiques. Les inventaires ont ensuite été intégrés dans le logiciel OMNIDIA<sup>®</sup>, contrôlés et les noms des taxons utilisés ont été homogénéisés.

Les données concernant les abondances taxonomiques ont été extraites du logiciel et une matrice a été créée. Dans cette matrice, les taxons dont l'abondance est inférieure à 5 % ont été supprimés, de façon à ne pas donner d'importance aux valeurs extrêmes. Il en a résulté une matrice, regroupant 22 taxons sur 48 inventaires, sur laquelle des analyses statistiques ont été effectuées : analyses en composantes principales (ACP) et analyses multivariées non paramétriques (NP-MANOVA) basées sur la variance des proportions spécifiques de diatomées.

Dans le but de tester les méthodes indicielles, des comptages sur les échantillons non traités ont été effectués en différenciant les cellules avec chloroplastes des cellules vides. Les résultats seront exploités dans le chapitre suivant. Les notes indicielles (IBD / IPS), calculées par le logiciel OMNIDIA<sup>®</sup>, feront également l'objet d'une analyse dans le chapitre IV.

Le taux de mortalité a été, quant à lui, évalué par l'intermédiaire de densités cellulaires. Lors de chaque prélèvement composé de la biomasse collectée sur 3 pierres, les surfaces brossées ont été mouleées avec une feuille d'aluminium, identifiées et stockées. A partir de feuilles d'aluminium de surface et de poids connus, une courbe étalon a alors été créée et nous a permis de connaître la surface brossée pour chaque pierre, et donc pour chaque échantillon prélevé. Lors des comptages, au moins 1500 valves ont été comptées et les différentes mesures de l'aire de comptage sous microscope, du nombre de cellules par lames et des surfaces brossées ont permis le calcul des densités cellulaires, en distinguant les diatomées mortes (vides) des diatomées potentiellement vivantes (avec chloroplastes).

Nos résultats ont montré des données physicochimiques stables au cours des 2 mois d'expérimentation et des mesures de débits qui variaient mais dont l'influence sur les communautés semblait limitée (Figure 27). Les taxons dominants identifiés étaient *Cocconeis* spp. (regroupant majoritairement *Cocconeis placentula* var. *euglypta* et *Cocconeis placentula* var. *lineata*), *Navicula cryptotenella*, *Nitzschia amphibia*, *Nitzschia*

*inconspicua* et *Planothidium lanceolatum*. Ces taxons représentaient en moyenne 63,2% des communautés.

L'analyse des données a mis en évidence plusieurs résultats intéressants :

- L'assèchement, même court, a eu un impact fort et durable sur les communautés puisque les communautés D et Cu étaient à chaque fois significativement différentes des communautés C. De plus, cette différence s'est maintenue même après 4 semaines de remise en eau, malgré une stabilisation de la cinétique d'évolution du nombre de taxons des communautés Cu après seulement quelques jours. Concernant la composition des communautés, les espèces présentes étaient essentiellement des espèces pionnières, avec une disparition de la dominance des deux genres *Cocconeis* et *Planothidium*. Il a été intéressant de constater que l'espèce *Planothidium lanceolatum* concernée ici a été décrite par Van Dam *et al.* (1994) comme une espèce tolérante à l'exposition à l'air.

- La différence observée entre les différentes communautés et la persistance de ces modifications dans le temps ont mis en évidence l'importance de l'histoire des communautés. En effet, les communautés D et Cu étaient proches l'une de l'autre mais significativement différentes des communautés C après 1 et 2 semaines d'assèchement. Pour une durée d'assèchement plus longue, toutes les communautés différaient, ce qui a pu s'expliquer par l'évolution naturelle des communautés, notamment lors des 2-3 premières semaines de l'expérience. Ainsi, les communautés C ont poursuivi leur dynamique dans le milieu alors que les communautés D l'avaient « interrompue » lors de l'assèchement sur la rive.

- La dérive et la repousse à partir du biofilm sec semblent être des mécanismes importants de recolonisation lors de la remise en eau (Robson *et al.*, 2008). En effet, les principales sources de recolonisation pour les pierres D étaient la dérive et les algues viables du biofilm sec alors que celles des pierres Cu reposaient uniquement sur la dérive. La similarité entre les communautés Cu et D montre que la dérive est un mécanisme essentiel de reformation du biofilm, cependant, l'étude que nous avons conduite en mésocosme démontre que la repousse à partir du biofilm sec peut être autosuffisante lors de la remise en eau (voir chapitre II).

- Le taux de mortalité était le même quelle que soit la durée de l'assèchement, ce qui est surprenant puisqu'on attendrait davantage un taux de mortalité croissant avec la durée de l'assèchement. C'est d'ailleurs ce qu'ont montré les résultats obtenus lors de l'étude en mésocosme, où les biofilms asséchés (conditions contrôlées et pas de facteurs d'érosion identifiés) montraient une augmentation de la mortalité avec la durée croissante de l'assèchement (Chapitre II). Nous avons alors testé l'hypothèse selon laquelle le



changement de milieu induit un certain taux de mortalité sur des cultures d'algues. Nous avons asséché des cultures de *Nitzschia palea* dans des microplaques et nous avons comparé le taux de mortalité après la remise en eau sur des cultures fraîches et fixées au glutaraldéhyde 1 % (données non présentées). Nos résultats ont montré qu'il n'y avait pas d'influence du fixateur. Le taux de mortalité semblait augmenter rapidement au cours des 7 premiers jours, il aurait donc été intéressant de réaliser davantage de prélèvements à ce moment-là. Plusieurs hypothèses ont alors été émises : l'érosion des biofilms par le vent ou le passage d'animaux qui aurait retiré une partie des valves mortes adhérant faiblement au substrat ou encore l'humidité relative moyenne (environ 60 %) au niveau de la station favorisant la survie des cellules. D'autres stratégies comme la sécrétion de mucilage ou la formation de formes de résistance ont également pu être adoptées.

En conclusion, cette étude a montré qu'un assèchement, même de courte durée, impacte notablement et durablement les communautés de diatomées, puisque les communautés asséchées étaient différentes des communautés n'ayant pas subi d'assèchement même après 28 jours. De ce fait, l'assèchement fait partie intégrante de l'histoire du biofilm et cette histoire influence la composition des communautés. La recolonisation des substrats a été réalisée par l'intermédiaire du biofilm sec et de la dérive algale, qu'il est difficile de quantifier. Tous ces paramètres ont pu avoir un effet sur les pratiques de bioindication utilisées en routine, ce dont nous discuterons dans le chapitre IV.

**II. Article III, paru dans la revue *River Research and Applications* (DOI : 10.1002/rra.2793).**

**“Impact of Drought on Diatom Communities and the Consequences for the Use of Diatom Index Values in the River Maureillas (Pyrénées-Orientales, France)”**

Amélie BARTHÈS<sup>a,b,c</sup>, Joséphine LEFLAIVE<sup>a,b\*</sup>, Sylvain COULON<sup>c</sup>, Florence PERES<sup>c</sup>, Jean-Luc ROLS<sup>a,b</sup> and Loïc TEN-HAGE<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>Université de Toulouse, INP, UPS, EcoLab (Laboratoire d'Ecologie Fonctionnelle et Environnement), Toulouse, France

<sup>b</sup>CNRS, EcoLab, Toulouse, France

<sup>c</sup>ASCONIT Consultants, Toulouges, France

Running title: Diatoms Drought Stress and Bioindication

\*Correspondence: J. Leflaive, Université de Toulouse, INP, UPS, EcoLab (Laboratoire d'Ecologie Fonctionnelle et Environnement); 118 Route de Narbonne, F-31062 Toulouse, France. E-mail: [josephine.leflaive@univ-tlse3.fr](mailto:josephine.leflaive@univ-tlse3.fr)

### **Abstract**

In the context of climate change, with an increase in the incidence of seasonally dry streambeds, we examined the impact of drought, and its duration, on the structure of diatom communities and the consequences of this on diatom index values (BDI: Biological Diatom Index; SPI: Specific Polluosensitivity Index) in the Mediterranean Maureillas River. The effects of several durations of droughts or low flow events (1, 2 and 4 weeks), on diatom dominated biofilms were studied by removing pebbles from the river and comparing the growing communities after rewetting to those of control biofilms (pebbles left in the streambed) and to those of newly formed biofilms (cleaned-up pebbles). Sampling was performed 6 times during the 28 day-rewetting phase. We determined the specific composition of diatom communities, the mortality rate after rewetting and the BDI and SPI scores for each sample, distinguishing between potentially living diatoms (full frustules with chloroplasts) and dead diatoms (empty frustules). Our results showed a notable and durable impact of even short drought on diatom communities. The different trajectories of biofilm communities observed between the types of pebbles showed the importance of the biofilm history for the community structure. This should be taken into account to improve the sampling practices used for monitoring. We also observed a stable mortality rate whatever the drought duration was. Diatom index values were stable despite the observed impact of treatment on diatom communities. These results emphasize the reliability of the diatom index to evaluate biological quality according to European requirements. In addition, the distinction of empty and full frustules did not induce significant differences but it may reduce biases in interpretation.

### **Keywords**

Non Permanent Streams, Phototrophic Biofilms, Diatom Communities, Bioindication, Drought.

## Introduction

Biological communities in river ecosystems are exposed to abiotic stresses linked to climate or geography. They are also submitted to human disturbances that arise from water withdrawals for agriculture, industrial needs or domestic consumption or to physical disturbances such as hydroelectric dams that modify hydrologic continuity (Sabater, 2008; Sabater and Tockner, 2010). All these factors, in addition to climate change, accentuate the presence of non permanent streams (Humphries and Baldwin, 2003; Brooks, 2009). Non permanent streams are defined as channels that lack surface flow during some portion of the year; they are positioned at the interface of fully terrestrial and fully aquatic ecosystems and they are narrowly linked to their watershed and connected to nearer perennial streams (Mc Donough *et al.*, 2011). Humphries and Baldwin (2003) have defined drought, which induces non permanence, as a natural end of the flow continuum, with flooding the opposing end extreme. Intensification of drought may alter the underlying structure of freshwater food webs (Ledger *et al.*, 2013). The importance of non permanent streams, mainly concentrated in headwaters (Lowe and Likens, 2005), is significant since they represent, for example, 60% of total river length in the United States (Nadeau and Rains, 2007), 43% in Greece (Tzoraki and Nikolaidis, 2007), the half of Australian mainland (Williams, 1983) and they are dominant in Southern Europe (Tockner *et al.*, 2009). However, despite their widespread distribution, they received only recent interest from the scientific community (Larned *et al.*, 2010; Datry *et al.*, 2011; Datry *et al.*, 2014) since Australian limnologists first focused on understanding these streams (Boulton and Suter, 1986). Mediterranean climate streams are ecologically comparable but geographically separated as they are found in five med-regions worldwide: Mediterranean basin, coastal California, central Chile, Cape region of South Africa and South and South West Australia (Bonada and Resh, 2013). In Mediterranean areas, drought was intensified during the last century with 10 of the 12 driest winters concentrated in the two last decades (Hoerling *et al.*, 2012). Thus, these areas were used for the study of drought impact and the consequences of drought-stress on the communities such as behavioral or physiological adaptations (Filipe *et al.*, 2013). Last years in Mediterranean streams, studies have focused on benthic communities including algae and macroinvertebrates (Acuña *et al.*, 2005; Hershkovitz and Gasith, 2013), food webs (Power *et al.*, 2013), hydrology (Sabater *et al.*, 2006; Tzoraki and Nikolaidis, 2007; Sabater and Tockner, 2010), nutrient and organic matter (Von Schiller *et al.*, 2011; Romani *et al.*, 2012; Bernal *et al.*, 2013) and biofilm responses to drought (Boix *et al.*, 2010; Timoner *et al.*, 2012; Timoner *et al.*, 2014).

A substantial strategy studied for withstand to drought is the use of "refuge" as defined by Robson *et al.* (2013) such protection mechanism for plant and animals from disturbances. Webb *et al.* (2012) defined refuges as important features of riverine landscape providing

habitat for biota during extreme conditions and facilitating the recovery of biota from disturbance. They underlined the requirement to conserve refuges and refuge connectivity to protect biodiversity of these constraining ecosystems (Lake, 2003; Robson *et al.*, 2013). For benthic algae, researchers have studied the pathways of algal recolonization after drought disturbances and determined the possible refuges as drift and dry biofilms (Robson *et al.*, 2008). Bertrand *et al.* (2001) defined algal drift as suspended algae present in the river. The relative importance of the two refuges depended on the composition of the algal assemblage. The presence of permanent pools seems to be an important factor influencing algal density during a 6-week recolonization after rewetting (Robson and Matthews, 2004). In addition, drought disturbance seems to favor the establishment of taxa that produce a gelatinous matrix or structure in an intermittent pond (Williams, 1996). This is supported by Artigas *et al.* (2012) who compared biomass, nutrient content and extracellular polymeric substances between a Mediterranean stream and a Central European stream. They showed that colonization sequences were faster, and diversity, presence of early colonizers and polysaccharide substances were higher on Mediterranean streams certainly due to higher amplitude disturbances.

It is necessary to increase knowledge of the numerous non permanent streams to improve their management and conservation. Around the world, bioindication tools have been developed to monitor the ecological and chemical health of aquatic ecosystems (*e.g.* Empain, 1978; Hauray *et al.*, 2006; Coste *et al.*, 2009; Demars *et al.*, 2012; Ector *et al.*, 2012; Matono *et al.*, 2012) but none has been specifically designed for non permanent streams. For instance in France, the BDI (Biological Diatom Index), based on ecological profiles of diatoms (Coste *et al.*, 2009), is used in combination with others indices based on macro-invertebrates, fishes or macrophytes. The BDI is based on about 840 taxa and is often associated with the diatom index SPI (Specific Polluosensitivity Index ; CEMAGREF (1982)). The SPI is based on the sensitivity of all species, contrary to the BDI, which does not take into account rare species; the indices are thus complementary. However, monitoring of non permanent streams is problematic because they are outside French and European standards sampling protocol (CEN, 2004; AFNOR, 2007b). Yet, monitored streams are sampled in summer with low flow which corresponds to the maximal extent of dry streambeds, preventing monitoring.

The objectives of this study are: (i) to understand how a dry episode impacts diatom communities with a view to their use in bioindication and (ii) to better define the relative role of drift and dry biofilms on diatom recolonization.

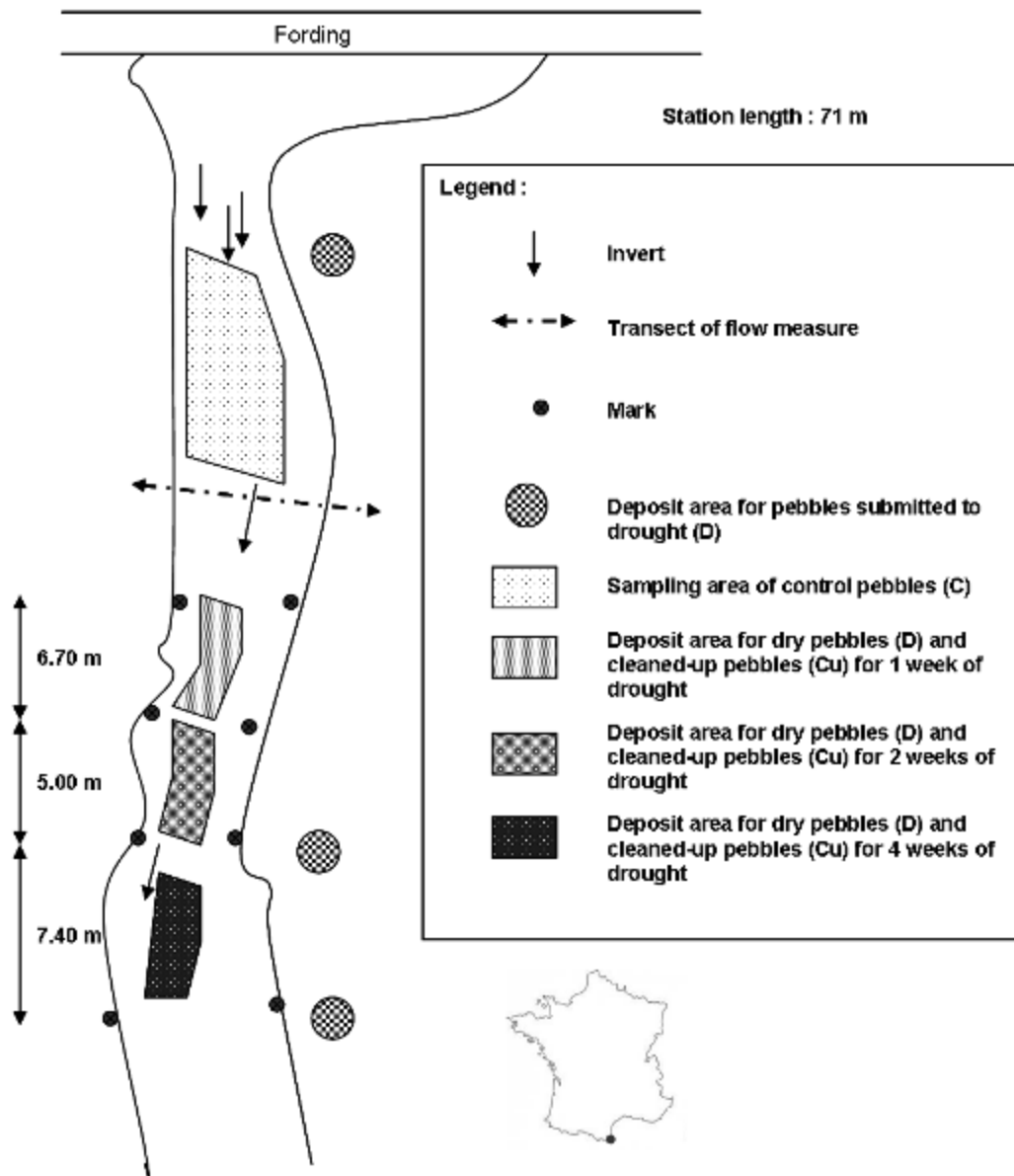


Figure 28: Experimental design in the river Maureillas, located in the south of France.

For this purpose, we tested different artificial drought durations and monitored the rewetting phase for one month, in the River Maureillas, a Mediterranean stream in the extreme south of France (Pyrénées-Orientales, France).

## **Material and methods**

### *Experimental site*

The study site was in the Tech valley (extreme south of France) on the River Maureillas, located downstream of the town Maureillas-las-Illas and 600 meters downstream of a waste water treatment plant (E 2°49.378, N 42°30.184). The River Maureillas is a Mediterranean river of 16 kilometers length, subject to a Mediterranean rainfall regime with high variability: precipitation is mostly in winter and streambeds are partially or totally dry in summer. At the experimental site, the river is 6-7 meters wide and the length of the studied reach is 71 meters.

### *Sampling protocol*

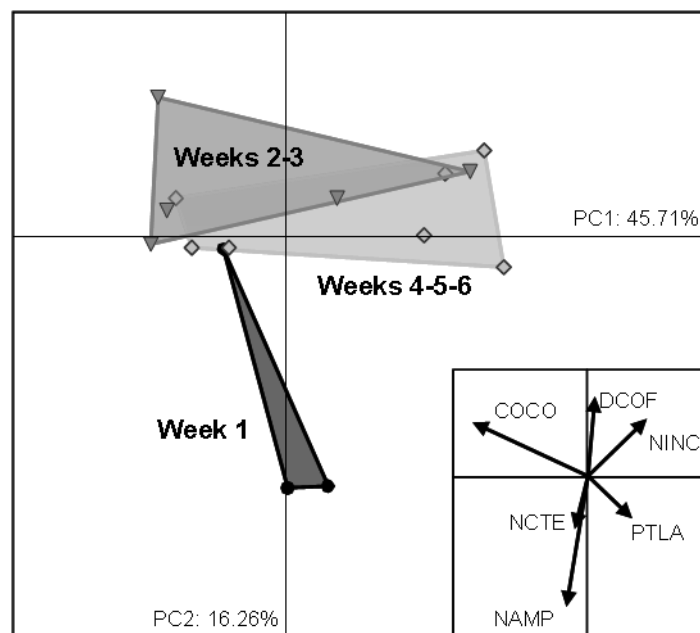
The experiment was performed *in situ* in natural conditions during low flows, from September to November 2011, a period with stable meteorological conditions. Some pebbles covered with biofilm were removed from the river and placed on the riverside during 1, 2 or 4 weeks. Half of the pebbles, here after called 'dry pebbles' (D), kept an intact dry biofilm while the others were cleaned with ethanol and a metallic brush before being rinsed with demineralized water ('cleaned-up pebbles', Cu). After the appropriate time, both types of pebbles were replaced in the river and sampled after 0 (except for Cu pebbles), 1, 4, 8, 18 and 28 days. 'Control pebbles' (C), left in the river for the entire experiment, were sampled at the same times. The locations of pebbles during the experiment are detailed in Figure 28.

For each sample, 3 pebbles were scraped with a toothbrush in a basin, and the biofilm was collected in a flask and fixed with 1 % glutaraldehyde. The different samples were stored at 4°C in the dark until the end of the experiment.

In order to determine the scraped surface, the scraped areas were covered by aluminum foil, molded on the top of the pebbles. Aluminum foils were then weighed, to the nearest mg, and compared to a standard curve realized with foils of known weight and size to obtain a surface area. Stream flow was monitored with a current electromagnetic meter (see transect in Figure 28) following French recommendations (Agence de l'Eau Loire-Bretagne, 2006). Physicochemical analysis of water (conductivity, pH, water temperature, percentage of dissolved oxygen saturation and dissolved oxygen concentration) were performed throughout the experiment with a HANNA HI 9828 (HANNA Instruments, Tanneries, France) multi parameters probe for each sampling date.

**Table 3: Mean values of physicochemical data collected throughout the experiment, with standard errors (n=14).**

Monitored parameters	Mean values	Standard Error
Temperature (°C)	15.9	± 0.6
Dissolved O <sub>2</sub> (mg.L <sup>-1</sup> )	8.85	± 0.12
Dissolved O <sub>2</sub> (%)	90.39	± 1.22
pH	7.50	± 0.12
Conductivity (mS.cm <sup>-1</sup> )	251.9	± 9.0
Flow measure (m.s <sup>-1</sup> )	31.0	± 2.9



**Figure 29: PCA based on specific proportions of diatoms in samples from control pebbles. The points are regrouped according to the sampling date. Arrows: evolution of control communities during the two-month experiment.**

COCO: *Cocconeis* species; DCOF: *Diadесmis confervacea*; NCTE: *Navicula cryptotenella*; NAMP: *Nitzschia amphibia*; NINC: *N. inconspicua*; PTLA: *Planothidium lanceolatum*.



### *Laboratory analysis*

Only diatoms were counted and determined in the samples, with discrimination made between empty (dead diatoms) and full frustules (with chloroplast, potentially alive). Previously, diatoms have been carefully observed with light microscopy (Leica DM2500, LEICA Microsystems, Wetzlar, Germany) at 1000x magnification by examining permanent slides of cleaned diatom frustules. The samples were digested in warm hydrogen peroxide (30 %) and in hydrochloric acid 30%, then rinsed and mounted in a high refractive index medium (Naphrax, Northern Biological Supplies, Ltd., UK, RI=1.74) (CEN, 2004). Owing to this technique, taxonomic determination was precise, according to the European standard protocol (CEN, 2007), and helpful for later counting of non-treated samples.

At least 400 valves per sample were then counted, as is routine (CEN, 2004), with an inverted microscope (Zeiss Axiovert 10, Carl ZEISS Microscopy, Marly le Roy, France) using the Utermöhl method (Utermöhl, 1958). The inventories were registered in OMNIDIA software (<http://omnidia.free.fr/>) (Lecoite *et al.*, 1993). OMNIDIA software allows for calculation of indices, particularly the BDI (Lenoir and Coste, 1996; Coste *et al.*, 2009). For each sample, two inventories were created: one for only full frustules and one for all frustules (empty and full frustules, as is routine).

In addition, we obtained cellular densities of diatoms for each sample by counting at least 1500 valves (without species determination). The different measures of counting area, the number of cells on the permanent slide and the scraped area of the pebbles allowed for the calculation of cellular density, distinguishing between full and empty frustules.

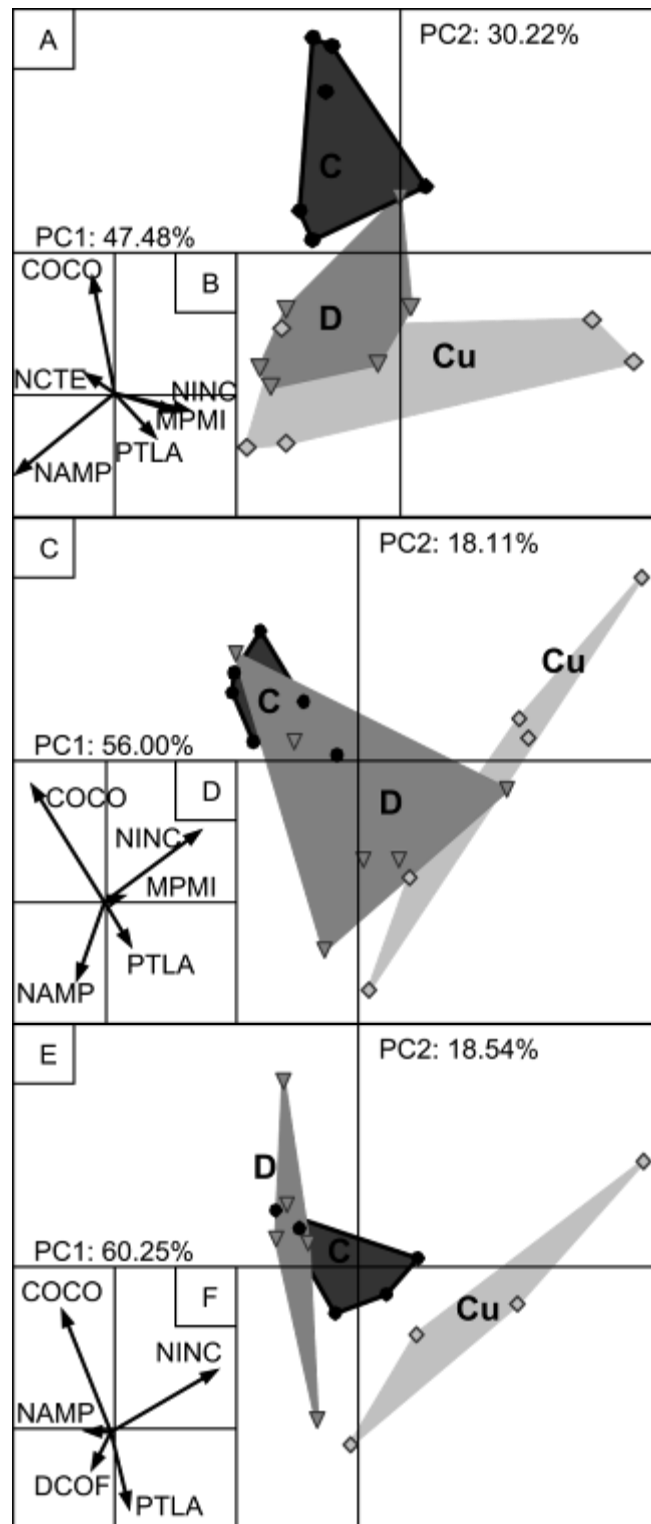
### *Statistical analysis*

The different BDI scores obtained were compared according to the type of pebbles (C, D or Cu), the duration of drought (1, 2 or 4 weeks) and the state of the frustules (empty or full).

The species proportions were statistically analyzed with the free software PAST (Paleontological Statistics, <http://folk.uio.no/ohammer/past/>) with PCA (Principal Components Analysis) and one-way NP-MANOVA (Non-Parametric Multivariate Analysis of Variance). We created a unique matrix with all the inventories and removed occurrences of less than 5% abundance in order to omit the influence of rare species.

## **Results**

Physicochemical data were relatively stable throughout the experiment; with average values presented in Table 3 (n= 14). Data (day 28 for 4 weeks of drought) could not be collected on the last sampling event because of substantive flood which occurred just before sampling.



**Figure 30: PCA based on diatom specific proportions for 1 week of drought (A), 2 weeks of drought (C) and 4 weeks of drought (E) with the biplot respectively associated in the inserts (B, D and F). The points have been regrouped by treatment: C: control pebbles; D: dry pebbles; Cu: cleaned-up pebbles.**

COCO: *Cocconeis* species; DCOF: *Diadesmis confervacea*; MPMI: *Mayamaea permitis*; NCTE: *Navicula cryptotenella*; NAMP: *Nitzschia amphibia*; NINC: *N. inconspicua*; PTLA: *Planothidium lanceolatum*.

*Dynamics of diatom communities*

To examine the dynamics of diatom communities in the river during the experiment, we performed a PCA on the specific composition data obtained by counting all valves, for the 17 control pebbles collected during 6 weeks (Figure 29). We observed that, after the first week of the experiment, control diatom communities evolved slightly. We obtained 22 taxa, dominated by five taxa representing on average 63.2 % of the communities on average. The dominant taxa were *Cocconeis* sp., *Navicula cryptotenella*, *Nitzschia amphibia*, *Nitzschia inconspicua* and *Planothidium lanceolatum*. Then, we performed PCA (Figure 30) and NP-MANOVA (Table 4) analyses on the diatom specific composition of samples from D, Cu and C pebbles for each drought duration. The 3 matrices regrouped 22 species (rare species being excluded).

The results based on data based on all frustules as used in routine analyses, were similar for 1 and 2 weeks of drought (Figure 30). NP-MANOVA indicated that dry pebble communities were significantly different from controls but similar to cleaned-up pebble communities. The three communities studied were all significantly different after 4 weeks of drought (Table 4). The communities from rewetted pebbles were thus always different from control communities regardless of the duration of the dry period. *Cocconeis* spp. (mainly regrouping *C. placentula* var. *euglypta* and *C. placentula* var. *lineata*) was mainly correlated to control communities and *Nitzschia amphibia*, *N. inconspicua* and *Planothidium lanceolatum* were linked to communities from dried and cleaned-up pebbles. *Cocconeis* and *Planothidium* belong to the same guild, as defined by Passy (2007). The ratios between those two genera were  $2.49 \pm 0.89$  after 1 week of drought,  $3.48 \pm 0.73$  for 2 weeks of drought and  $1.75 \pm 0.45$  after 4 weeks of drought in control pebbles. For cleaned-up pebbles, they were  $0.54 \pm 0.09$ ,  $0.19 \pm 0.02$  and  $0.44 \pm 0.09$  respectively.

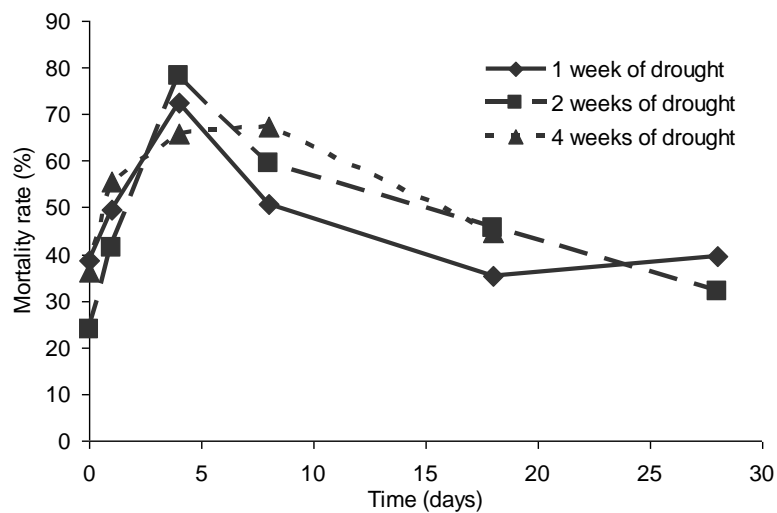
In our study, the communities submitted to dry periods did not return to the initial state even after 28 days of rewetting.

Similar results were obtained with data from the counts of only full frustules (cells with chloroplasts), except for the longer drought duration where no significant difference was observed between diatom communities from C, D and Cu pebbles (data not shown).

The mortality rate of diatom communities was calculated for each tested drought duration. We observed an increase of mortality rate in the first days (day 4) after rewetting which did not depend on the drought duration (Figure 31). The mortality rate was 44.9% ( $\pm 3.8\%$ ) for controls and, respectively, 38.7%, 23.9% and 36.2% at the end of the each dry period. In order to visualize the establishment of diatom communities, the dynamics of number of taxa from dry pebbles during the rewetting phase was represented in Figure 32 for each dry

**Table 4: NP-MANOVA based on diatom specific proportions for the different drought durations. \*significant difference between 2 groups of pebbles. 1WD: after 1 week of drought. 2WD: after 2 weeks of drought. 4WD: after 4 weeks of drought.**

		Controls	Cleaned-up pebbles
1WD	Cleaned-up pebbles	0.0043*	-
	Dry pebbles	0.0126*	0.3289
2WD	Cleaned-up pebbles	0.0019*	-
	Dry pebbles	0.0122*	0.0959
4WD	Cleaned-up pebbles	0.0394*	-
	Dry pebbles	0.0456*	0.0076*



**Figure 31: Mortality rate of diatom communities, from dried pebbles after rewetting, for each dry period tested.**

period. The greatest increase in the number of taxa occurred during the first week after rewetting.

#### *BDI and SPI calculation*

Using OMNIDIA software, we obtained BDI and SPI scores for each drought duration, and each type of pebbles, generating 96 scores, 48 for inventories with only full frustules and 48 for inventories with all frustules. The maximum deviation observed on controls was 2 points for BDI and 1.9 points on SPI during the two months of the experiment. BDI and SPI scores calculated for empty and full frustules were similar ( $p$  (BDI) =  $p$  (SPI) = 0.8124). BDI scores for control communities were stable throughout the experiment with an average of 11.01/20 (SE  $\pm$  0.33) that corresponds to a “medium biological quality” with respect to the WFD requirements (Water Framework Directive; European Parliament and Council (2000)). The average deviation of the control (pebbles not submitted to dry period) and dry biofilm scores for BDI and SPI, in absolute value, increased slightly with the duration of the dry period without significant consequences on the estimation of biological quality (Figure 33). The difference increased with the duration of drought until reaching 0.9 point to BDI, and 0.6 point to SPI, after 4 weeks of drought.

### **Discussion**

In recent years, non permanent streams, particularly small-order streams, became a central concern because of their wide distribution around the world and their role in the functioning of permanent streams (Benda *et al.*, 2005; Sabater and Tockner, 2010). They must be considered for management and conservation at the watershed scale. In this regard, they should be integrated into monitoring programs such as the WFD in Europe. In addition, it is necessary to understand the impact of drought on phototrophic biofilms and on their components such as diatoms. Indeed, benthic diatoms are the basis of numerous bioassessment methods in freshwater streams owing to their direct relationship to physicochemical water quality (Stevenson and Pan, 1999; Ector *et al.*, 2004).

#### *Impact of drought on diatom community dynamics*

Our field experiment emphasized the fact that, even brief dry phases have a significant and long-term impact on diatom communities. Indeed, one week of drought was sufficient to induce strong modifications on diatom communities, before and after rewetting (Figure 30). These modifications were still observable even after 4 weeks of rewetting, corresponding to the time used for stabilization of the biofilm (Kelly *et al.*, 1998; CEN, 2004; Paule *et al.*, 2013). One hypothesis explaining this would be that the new communities developing on clean pebbles, or on pebbles with dry biofilm, did not reach equilibrium during the sampling period. Nevertheless, the number of taxa showed rapid stabilization after a few days of

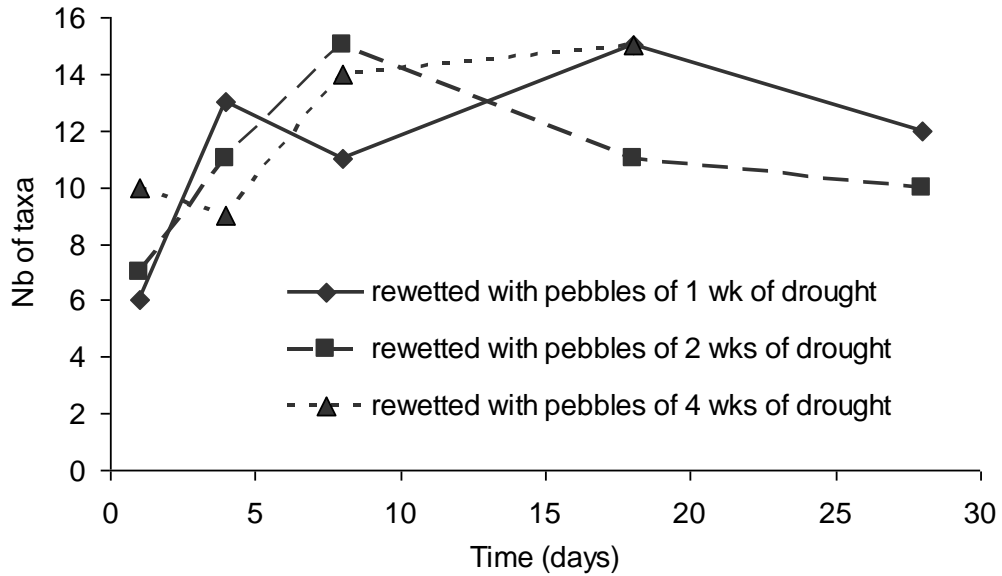


Figure 32: Evolution of the number of taxa of cleaned-up pebbles communities for each drought duration.

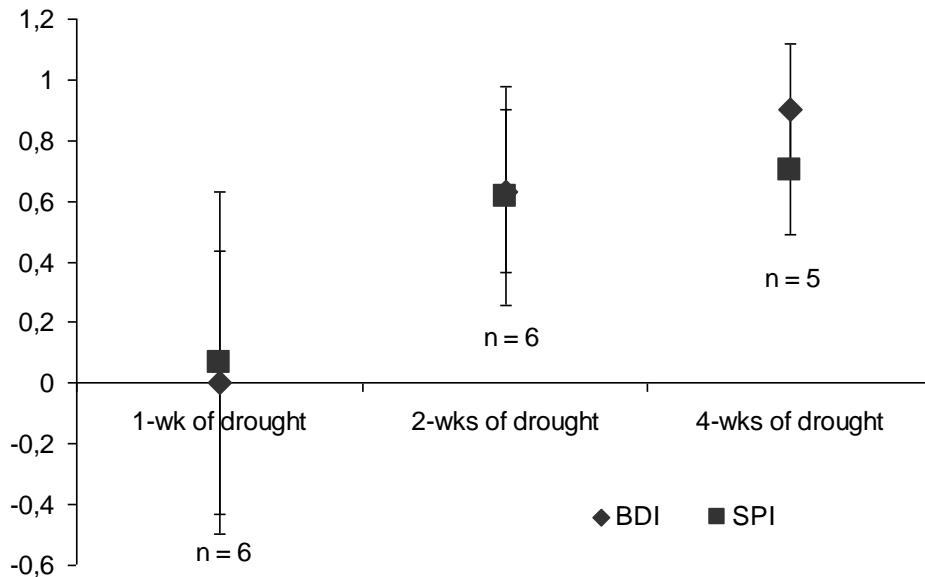


Figure 33: BDI and SPI average differences (absolute value) between dried and control communities for each dry period tested, with standard errors associated.

rewetting (Figure 32). Moreover, the PCA analysis indicated that the diatom communities from C and D pebbles have completely different trajectories (Figure 30), which suggests that the observed differences may persist longer than 28 days in the environment. The separations observed between the dried and cleaned-up communities on the one hand, and the control communities on the other hand, emphasized the importance of biofilm history. Indeed, control communities are established, stable and weakly subject to the drift effect, whereas dried communities are in active regrowing phase and subject to environmental factors. This showed that allogenuous and autogenous factors influenced the communities and their successional trajectory. This observation may have some crucial consequences in routine sampling for bioassessment purposes, notably when the operator has limited information about the sampling site and the previous hydrologic situation. Diatom communities on dried pebbles were influenced by two sources of cells: regrowth from dried biofilm and drift. In contrast, the only source for communities on cleaned-up pebbles was drift. The fact that those communities were quite close, after a short drought, may be explained by the fact that drift was a prominent influence or by a similar composition of drift and dry biofilm. After the long drought, communities on D and Cu pebbles were more distinct, which may be linked to a greater difference between drift and regrowth, as the time interval between removing pebbles from the river and rewetting increased. In the meantime, diatom communities in the river slightly evolved (see Figure 29).

In a field experiment in Australian, non permanent streams, Robson *et al.* (2008) noted that drift from permanent pools, and dry biofilms, was most important in unregulated streams. Also, diatom cells released from biofilms can easily fix on a new substrate, which is not the case for broken filaments from green algae. Cyanobacteria seem subjected to passive drifting and seem to be more dependent on dry biofilms for recolonization (Robson *et al.*, 2008). Eulin (1997) studied biofilms in the Garonne River and showed that drift was mainly composed of benthic diatoms.

The species that mostly differentiated the C, Cu and D pebble communities were *Cocconeis* spp., *Nitzschia amphibia*, *N. inconspicua* and *Planothidium lanceolatum*. These dominant species are tolerant and frequent in streams, particularly in impacted environments. Species of the genus *Cocconeis* and *Planothidium* correspond to a "low profile guild" (LPG) whereas species of the genus *Nitzschia* correspond to a "motile guild" (MG), according to the guilds defined by Passy (2007). Genera from the LPG are nutrient-stressed, non sensitive to physical disturbance and correspond to R-selected taxa (Biggs *et al.*, 1998); genera from the MG are able to avoid nutrient stress due to their capability to select their habitat and they seem to have the ability to cover the whole gradient of disturbance if nutrients are sufficient. Another guild was defined by Passy (2007), the "high profile guild" (HPG) and this

corresponds to species competitive for nutrients in undisturbed environments. This guild was poorly represented in our experiment. Our results showed that rewetting induced a modification in the dominance of LPG species, with a shift from *Cocconeis* to *Planothidium*. Van Dam *et al.* (1994) have described the ecological indicator values of freshwater diatoms from the Netherlands and showed that the two dominant species of the *Cocconeis* genus (*C. placentula* var. *euglypta* and *C. placentula* var. *lineata*) were, in our study, less frequent in aerophilic environments than *P. lanceolatum*, which can explain the better establishment of the latter on dry substrates.

Drought induced a certain mortality rate (from 70 to 80%), estimated from the numbers of full and empty valves. This stable mortality rate did not seem to depend on the duration of a dry episode which is surprising because we expected an increased mortality due to a stronger constraint (longer drought). The proportion of dead cells was determined immediately after rewetting. We checked in laboratory experiments with pure diatom cultures that the transition from dry to wet state did not induce a modification in the visible mortality rate (data not shown). It seems that most mortality occurred rather fast during the first days of drought (1-7 days) after which the proportion of dead cells became stable. A more frequent sampling just after emersion would help to verify this. Lacking these data, we can hypothesize that these observations may be due to a relative enduring humidity according to weather data and the exposition conditions of dried pebbles. Indeed, the average relative humidity collected during the different drought periods were 62.0 % ( $\pm$  3.8), 63.1 % ( $\pm$  2.8) and 59.3 % ( $\pm$  2.7) respectively for 1, 2 and 4 weeks of drought (Météo France data). Also, dried pebbles were exposed to aerial environment at riverside and they may have been subjected to various phenomena such as wind erosion. Migration of diatoms *via* wind was described in literature (Peterson, 1996; Coste and Ector, 2000) and wind erosion should increase with the exposition duration, particularly for dead cell which not adhering to substrates. Others parameters such as trampling by animals, birds or insects might be implied. To limit mortality rate during drought other strategies might be used by benthic algae such as the excretion of extracellular polysaccharides (Potts, 1999; Tamaru *et al.*, 2005), the formation of resting spores (Lund, 1954; Von Stosch and Fecher, 1979; Hargraves and French, 1983; McQuoid and Hobson, 1996) that can survive to desiccation for a long time (Round *et al.*, 1990). Souffreau *et al.* (2010) have tested experimentally the desiccation-tolerance of 34 benthic diatom species. They have shown that diatom vegetative cells are highly sensitive to desiccation pressure and high mortality was observed for short desiccation on cultures. The same authors also tested the desiccation-tolerance of vegetative cells and found that resting spores of 17 benthic diatom morphospecies and resting spores had a greater resistance to heat treatment (> 25% for *Hantzschia amphioxys*) (Souffreau *et al.*, 2013).



*Impact of drought on diatom index values*

The impact of drought on diatom index BDI scores, calculated using data on empty and full frustules data, showed no significant difference between methods. The index revealed “medium biological quality” with the presence of cosmopolitan species, such as *N. amphibia* or *P. lanceolatum*, being important. The average deviation of the control (pebbles not subjected to a dry period) and dry biofilm scores, in absolute value, increased with the duration of the dry period. Thus, drought has a slight effect on BDI scores even if it had no significant influence on the estimation of biological quality. However, this absence of consequence may be linked to the particular context of the study. The medium biological quality value was probably due to the presence of a treatment plant in upstream since there was the noteworthy presence of *Escherichia coli* (2190 CFU / 100 mL) and high total phosphorus (0.58 mg.L<sup>-1</sup>) and orthophosphates values (1.59 mg.L<sup>-1</sup>) in September 2011 (Rouquet and Barthès, 2012). Consequently, the taxa present at the study site were tolerant to organic enrichment and had ecological profiles with a low index values. The important presence of tolerant taxa explains the strong stability of the BDI. It may be interesting to test this experiment in a stream of better biological quality with numerous sensitive taxa with high index values. For instance, Rimet *et al.* (2009) have simulated an improvement in water quality on diatom-communities, by monitoring sensitive taxa, and have shown that modifications of diatom communities were visible using another diatom index (SPI: Specific Polluosensitivity Index; CEMAGREF (1982)). In their study, 60 days were necessary to turnover and stabilize the communities but constraints were more important than in our experiment. Indeed, the modifications induced were more important in their study because the entire structure of the biofilm was impacted by the translocation experiment. In contrast, our study was performed on the same stream, without strong structural modification and thus we hypothesized that the time used to reach equilibrium was shorter. In addition, we examined the effect of drought on biofilms in a laboratory experiment and we obtained relevant results on biofilm structure after only 13 days of rewetting (Barthès *et al.*, submitted).

*Impact of drought on sampling practices*

The results obtained with all frustule counts were slightly different from those obtained with counts of full frustules and specifically for the longest drought. This indicates that the methods used routinely may induce biases in the interpretation if diatom communities were subjected to previous drought, as Gillett *et al.* (2009) also observed. Indeed, they compared the reliability of counts on dead and empty frustules (without drought) and they found overall similar results on Non-metric multidimensional scaling (NMDS) analyses. Also, they exposed the hypothesis underlined in literature that the species distribution was the same in dead cells than in live diatoms even if it is difficult to extrapolate a general trend (Wilson and

Holmes, 1981; Sawai, 2001). Gillett *et al.* (2011) had shown, on streams of Western US, that classical methods used for bioassessment are valuable for the taxonomic precision obtained. They showed that counting performed only on live diatoms offers better ecological reliability however they emphasized that the percentage of empty frustules may be used in bioassessment methods as a metric for monitoring human disturbance. The implications of our experiment for monitoring were various; our results associated to data of literature ensure the relevance of routine practices for counting since no difference was noted between dead/live diatom counts. It was an essential observation because of the difficulty to applied live counts on routine due to the cost time of this method (double count, less precisely).

Sampling of dry substrates is currently outside protocols whereas it seems valuable for monitoring. Diatoms were easily collected, even after 4 weeks of drought and indices created were consistent to those obtained on controls. These results were highly encouraging for monitoring of non permanent streams when riverbeds are dried. However, it is necessary to conduct a study at larger scale to validate these preliminary results with streams of more sensitive assemblages and then precise the sampling methods (number of pebbles sampled, their localization on riverbed, etc..) in order to integrate dry riverbeds to monitoring programs such as BDI protocol in France (AFNOR, 2007b).

For BDI applications, a standard protocol is applied in Europe (CEN, 2004). It recommends the sampling of 5 pebbles to limit reasonably problems of heterogeneity. In our experiment, for logistic reasons, we made the choice to use only 3 pebbles acknowledging the risk that this uncertainty maybe increased. This could have impacted the proportion of full or empty frustules and the associated determinations, but our results seem reliable since the index values for controls were stable throughout the experiment and statistical analysis showed that data obtained on species proportions were grouped for each type of pebbles tested.

## **Conclusions**

This study illustrates the notable and durable impact of even short term drought, even short, on diatom community structure. In no instance was return to initial situation observed after drought, irrespective of duration. Despite the treatment applied to the biofilms (emersion, cleaning-up) or the chosen counting method (full or all frustules), BDI scores were stable enough to allow the assessment of biological quality. This shows the reliability of the use of diatom indices in routine monitoring, even it is necessary to take into account the particular conditions of the experiment, *i.e.* a polluted environment (treatment plant upstream) with cosmopolitan and tolerant taxa. The method of counting used in routine analysis seems also to be reliable even if they may induce some biases in the interpretation of diatom inventories.

This study attempted to compare the relative contribution of drift and regrowth by dry biofilm on recolonization dynamics. The experimental data did not allow for the precise distinction of the role of the two contributors; thus it would be necessary to perform complementary experimentation for this purpose. Indeed, it would be interesting to test the recovery of dry biofilms without the influence of drift, using an experimental design whereby biofilms subjected to drought would be rewetted in individual containers (Barthès *et al.*, submitted).

The increased incidence of streambeds impacted by seasonal drought in the context of climate change is important for management and conservation of watersheds especially. Drought impacts diatom communities strongly. As they are important part of the food web, it also has a strong effect on the other players of primary production, such as cyanobacteria and green algae, and also the others levels of the food web.

### **Acknowledgements**

We are grateful to the Adour-Garonne Water Agency for project funding and to ANRT and ASCONIT Consultants for the CIFRE fellowship to A. Barthès.

## References

- Acuña V, Muñoz I, Giorgi A, Omella M, Sabater F, Sabater S. (2005). Drought and postdrought recovery cycles in an intermittent Mediterranean stream: structural and functional aspects. *J N Am Benthol Soc* **24**: 919-933.
- AFNOR. (2007). NF T90-354: Water quality — Determination of the Diatom Biological Index (DBI). AFNOR.
- Agence de l'Eau Loire-Bretagne. (2006). Le prélèvement d'échantillons en rivière - Techniques d'échantillonnage en vue d'analyses physico-chimiques. in *La mesure de débit*, p. 132. Agence de l'Eau Loire-Bretagne, Orléans.
- Artigas J, Fund K, Kirchen S, Morin S, Obst U, Romani AM, Sabater S, Schwartz T. (2012). Patterns of biofilm formation in two streams from different bioclimatic regions: analysis of microbial community structure and metabolism. *Hydrobiologia* **695**: 83-96.
- Barthès A, Leflaive J, Lamy A, Rols JL, Ten-Hage L. submitted. Resilience of Aggregated Microbial Communities Subjected to Drought – Small-Scale Studies. *Microbial Ecology*.
- Benda L, Hassan MA, Church M, May CL. (2005). Geomorphology of steepland headwaters: The transition from hillslopes to channels. *Journal of the American Water Resources Association* **41**: 835-851.
- Bernal S, von Schiller D, Sabater F, Marti E. (2013). Hydrological extremes modulate nutrient dynamics in mediterranean climate streams across different spatial scales. *Hydrobiologia* **719**: 31-42.
- Bertrand C, Siauve V, Fayolle S, Cazaubon A. (2001). Effects of hydrological regime on the drift algae in a regulated Mediterranean river (River Verdon, southeastern France). *Regulated Rivers-Research & Management* **17**: 407-416.
- Biggs BJF, Stevenson RJ, Lowe RL. (1998). A habitat matrix conceptual model for stream periphyton. *Archiv fur Hydrobiologie* **143**: 21-56.
- Boix D, Garcia-Berthou E, Gascon S, Benejam L, Tornes E, Sala J, Benito J, Munne A, Sola C, Sabater S. (2010). Response of community structure to sustained drought in Mediterranean rivers. *Journal of Hydrology* **383**: 135-146.
- Bonada N, Resh VH. (2013). Mediterranean-climate streams and rivers: geographically separated but ecologically comparable freshwater systems. *Hydrobiologia* **719**: 1-29.
- Boulton AJ, Suter PJ. (1986). Ecology of Temporary Streams—an Australian Perspective in *Limnology in Australia* (eds. Deckker PD, Williams WD), pp. 313-327. Springer Netherlands.
- Brooks RT. (2009). Potential impacts of global climate change on the hydrology and ecology of ephemeral freshwater systems of the forests of the northeastern United States. *Climatic Change* **95**: 469-483.

- CEMAGREF. (1982). Étude des Méthodes Biologiques d'appréciation Quantitative de la Qualité des Eaux. p. 218. Agence de l'Eau Rhône-Méditerranée-Corse, Lyon.
- CEN. (2004). EN 13946: Water quality - Guidance standard for the routine sampling and pre-treatment of benthic diatoms from rivers. European Standard, Geneva.
- CEN. (2007). EN 14407: Water quality - Guidance standard for the identification, enumeration and interpretation of benthic diatom samples from running waters. pp. 1-13. European Standard, Geneva.
- Coste M, Boutry S, Tison-Rosebery J, Delmas F. (2009). Improvements of the Biological Diatom Index (BDI): Description and efficiency of the new version (BDI-2006). *Ecological Indicators* **9**: 621-650.
- Coste M, Ector L. (2000). Diatomées invasives exotiques ou rares en France: Principales Observations effectuées au cours des dernières décennies. *Syst Geogr Pl* **70**: 373-400.
- Datry T, Arscott DB, Sabater S. (2011). Recent perspectives on temporary river ecology *Aquatic Sciences* **73**: 453-457.
- Datry T, Larned ST, Tockner K. (2014). Intermittent Rivers: A Challenge for Freshwater Ecology. *BioScience* **64**: 229-235.
- Demars BOL, Kemp JL, Friberg N, Usseglio-Polatera P, Harper DM. (2012). Linking biotopes to invertebrates in rivers: Biological traits, taxonomic composition and diversity. *Ecological Indicators* **23**: 301-311.
- Ector L, Hlúbiková D, Hoffmann L. (2012). Preface: Use of algae for monitoring rivers. *Hydrobiologia* **695**: 1-5.
- Ector L, Kingston JC, Charles DF, Denys L, Douglas MSV, Manoylov K, Michelutti N, Rimet F, Smol JP, Stevenson RJ, Winter JG. (2004). Freshwater diatoms and their role as ecological indicators. in *Proceedings of the 17th International Diatom Symposium 2002* (ed. Poulin M), pp. 469-480. Biopress Limited, Ottawa, Canada.
- Empain A. (1978). Relations quantitatives entre les populations de bryophytes aquatiques et la pollution des eaux courantes. Définition d'un indice de la qualité des eaux. *Hydrobiologia* **60**: 49-74.
- Eulin A. (1997). Les communautés de diatomées épilithiques de la Garonne - Répartition naturelle et étude *in situ* de la dynamique de colonisation sur substrats artificiels., p. 248. Paul Sabatier, Toulouse.
- European Parliament and Council. (2000). Water Framework Directive 2000/60/EC establishing a framework for community action in the field of water policy., pp. 1-73. Official Journal of the European Communities.

- Filipe AF, Lawrence JE, Bonada N. (2013). Vulnerability of stream biota to climate change in mediterranean climate regions: a synthesis of ecological responses and conservation challenges. *Hydrobiologia* **719**: 331-351.
- Gillett N, Pan YD, Parker C. (2009). Should only live diatoms be used in the bioassessment of small mountain streams? *Hydrobiologia* **620**: 135-147.
- Gillett ND, Pan YD, Manoylov KM, Stevenson RJ. (2011). The role of live diatoms in bioassessment: a large-scale study of Western US streams. *Hydrobiologia* **665**: 79-92.
- Hargraves PE, French FW. (1983). Diatom resting spores: significance and strategies. in *Survival strategies of the algae* (ed. Fryxell GA), pp. 49-68. Cambridge University Press, Cambridge.
- Haury J, Peltre MC, Tremolieres M, Barbe J, Thiebaut G, Bernez I, Daniel H, Chatenet P, Haan-Archipof G, Muller S, Dutartreg A, Laplace-Treyture C, Cazaubon A, Lambert-Servien E. (2006). A new method to assess water trophy and organic pollution - the Macrophyte Biological Index for Rivers (IBMR): its application to different types of river and pollution. *Hydrobiologia* **570**: 153-158.
- HersHKovitz Y, Gasith A. (2013). Resistance, resilience, and community dynamics in mediterranean-climate streams. *Hydrobiologia* **719**: 59-75.
- Hoerling M, Eischeid J, Perlwitz J, Quan XW, Zhang T, Pegion P. (2012). On the Increased Frequency of Mediterranean Drought. *Journal of Climate* **25**: 2146-2161.
- Humphries P, Baldwin DS. (2003). Drought and aquatic ecosystems: an introduction. *Freshwater Biol* **48**: 1141-1146.
- Kelly MG, Cazaubon A, Coring E, Dell' Uomo A, Ector L, Goldsmith B, Guasch H, Hurlimann J, Jarlman A, Kawecka B, Kwandrans J, Laugaste R, Lindstrom EA, Leitao M *et al.* (1998). Recommendations for the routine sampling of diatoms for water quality assessments in Europe. *Journal of Applied Phycology* **10**: 215-224.
- Lake PS. (2003). Ecological effects of perturbation by drought in flowing waters. *Freshwater Biol* **48**: 1161-1172.
- Larned ST, Datry T, Arscott DB, Tockner K. (2010). Emerging concepts in temporary-river ecology. *Freshwater Biol* **55**: 717-738.
- Lecoïnte C, Coste M, Prygiel J. (1993). OMNIDIA - Software for taxonomy, calculation of diatom indexes and inventories management. *Hydrobiologia* **269**: 509-513.
- Ledger ME, Brown LE, Edwards FK, Milner AM, Woodward G. (2013). Drought alters the structure and functioning of complex food webs. *Nat Clim Chang* **3**: 223-227.
- Lenoir A, Coste M. (1996). Development of a practical diatom index of overall water quality applicable to the French national water board network in *Use of Algae for Monitoring*

- Rivers II* (eds. Whitton BA, Rott E), pp. 29-43. Institut für Botanik - Universität Innsbruck Innsbruck.
- Lowe WH, Likens GE. (2005). Moving headwater streams to the head of the class. *BioScience* **55**: 196-197.
- Lund JWG. (1954). The seasonal cycle of the plankton diatom, *Melosira italica* (Ehr.) Ktitz, subsp. *subarctica*. *J Ecol* **38**: 15-35.
- Matono P, Bernardo JM, Oberdorff T, Ilheu M. (2012). Effects of natural hydrological variability on fish assemblages in small Mediterranean streams: Implications for ecological assessment. *Ecological Indicators* **23**: 467-481.
- Mc Donough OT, Hosen JD, Palmer MA. (2011). Temporary Streams: The Hydrology, Geography, and Ecology of Non-Perennially Flowing Waters in *Rivers Ecosystems: Dynamics, Management and Conservation* (eds. Elliot SE, Martin LE), pp. 259-290. Nova Science Publishers, Hauppauge, NY.
- McQuoid MR, Hobson LA. (1996). Diatom resting stages. *J Phycol* **32**: 889-902.
- Nadeau TL, Rains MC. (2007). Hydrological connectivity between headwater streams and downstream waters: How science can inform policy. *Journal of the American Water Resources Association* **43**: 118-133.
- Passy SI. (2007). Diatom ecological guilds display distinct and predictable behavior along nutrient and disturbance gradients in running waters. *Aquat Bot* **86**: 171-178.
- Paule A, Roubex V, Lauga B, Duran R, Delmas F, Paul E, Rols JL. (2013). Changes in tolerance to herbicide toxicity throughout development stages of phototrophic biofilms. *Aquatic Toxicology* **144**: 310-321.
- Peterson CG. (1996). Response of Benthic Algal Communities to Natural Physical Disturbance. in *Algal Ecology: Freshwater Benthic Ecosystems* (ed. R. J. Stevenson MLB, & R. L. Lowe). Academic Press, San Diego, CA.
- Potts M. (1999). Mechanisms of desiccation tolerance in cyanobacteria. *Eur J Phycol* **34**: 319-328.
- Power ME, Holomuzki JR, Lowe RL. (2013). Food webs in Mediterranean rivers. *Hydrobiologia* **719**: 119-136.
- Rimet F, Ector L, Cauchie HM, Hoffmann L. (2009). Changes in diatom-dominated biofilms during simulated improvements in water quality: implications for diatom-based monitoring in rivers. *Eur J Phycol* **44**: 567-577.
- Robson BJ, Chester ET, Mitchell BD, Matthews TG. (2013). Disturbance and the role of refuges in mediterranean climate streams. *Hydrobiologia* **719**: 77-91.
- Robson BJ, Matthews TG. (2004). Drought refuges affect algal recolonization in intermittent streams. *Riv Res Applic* **20**: 753-763.

- Robson BJ, Matthews TG, Lind PR, Thomas NA. (2008). Pathways for algal recolonization in seasonally-flowing streams. *Freshwater Biol* **53**: 2385-2401.
- Romaní AM, Amalfitano S, Artigas J, Fazi S, Sabater S, Timoner X, Ylla I, Zoppini A. (2012). Microbial biofilm structure and organic matter use in mediterranean streams. *Hydrobiologia* **719**: 43-58.
- Round FE, Crawford R, Mann D. (1990). *The diatoms: Biology and morphology of the genera*. Cambridge University Press: New York.
- Rouquet P, Barthès J. (2012). Suivi de la qualité des cours d'eau du bassin versant du Tech et des petits fleuves côtiers. ASCONIT Consultants, Toulouges, France.
- Sabater S. (2008). Alterations of the global water cycle and their effects on river structure, function and services. *Freshwater Reviews* **1**: 75-88.
- Sabater S, Guasch H, Muñoz I, Romaní A. (2006). Hydrology, light and the use of organic and inorganic materials as structuring factors of biological communities in Mediterranean streams. *Limnetica* **25**: 335-348.
- Sabater S, Tockner K. (2010). Effects of Hydrologic Alterations on the Ecological Quality of River Ecosystems in *Water Scarcity in the Mediterranean: Perspectives under Global Change* (eds. Sabater S, Barcelo D), pp. 15-39.
- Sawai Y. (2001). Distribution of living and dead diatoms in tidal wetlands of northern Japan: relations to taphonomy. *Palaeogeography Palaeoclimatology Palaeoecology* **173**: 125-141.
- Souffreau C, Vanormelingen P, Sabbe K, Vyverman W. (2013). Tolerance of resting cells of freshwater and terrestrial benthic diatoms to experimental desiccation and freezing is habitat-dependent. *Phycologia* **52**: 246-255.
- Souffreau C, Vanormelingen P, Verleyen E, Sabbe K, Vyverman W. (2010). Tolerance of benthic diatoms from temperate aquatic and terrestrial habitats to experimental desiccation and temperature stress. *Phycologia* **49**: 309-324.
- Stevenson RJ, Pan Y. (1999). Assessing environmental conditions in rivers and streams with diatoms. in *The diatoms: Application for the environmental and earth sciences* (eds. Stoermer EF, Smol JP), pp. 11-40. Cambridge University Press, Cambridge.
- Tamaru Y, Takani Y, Yoshida T, Sakamoto T. (2005). Crucial role of extracellular polysaccharides in desiccation and freezing tolerance in the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*. *Appl Environ Microb* **71**: 7327-7333.
- Timoner X, Acuña V, Frampton L, Pollard P, Sabater S, Bunn SE. (2014). Biofilm functional responses to the rehydration of a dry intermittent stream. *Hydrobiologia*: 1-11.
- Timoner X, Acuna V, Von Schiller D, Sabater S. (2012). Functional responses of stream biofilms to flow cessation, desiccation and rewetting. *Freshwater Biology* **57**: 1565-1578.



- Tockner K, Uehlinger U, Robinson CT, Tonolla D, Siber R, Peter FD. (2009). Introduction of European Rivers in *Rivers of Europe* (eds. Tockner K, Uehlinger U, Robinson CT), pp. 1-23. Elsevier Science, London.
- Tzoraki O, Nikolaidis NP. (2007). A generalized framework for modeling the hydrologic and biogeochemical response of a Mediterranean temporary river basin. *Journal of Hydrology* **346**: 112-121.
- Utermöhl H. (1958). Zur vervollkommung der quantitativen Phytoplankton-Methodik. *Mitteilungen der Internationalen Vereinigung für Theoretische and Angewandte Limnologie* **9**: 1-38.
- Van Dam H, Mertens A, Sinkeldam J. (1994). A coded checklist and ecological indicator values of freshwater diatoms from The Netherlands. *Neth J Aquat Ecol* **28**: 117-133.
- von Schiller D, Acuna V, Graeber D, Marti E, Ribot M, Sabater S, Timoner X, Tockner K. (2011). Contraction, fragmentation and expansion dynamics determine nutrient availability in a Mediterranean forest stream. *Aquatic Sciences* **73**: 485-497.
- Von Stosch HA, Fecher K. (1979). "Internal thecae" of *Eunotia soleirolii* (Bacillariophyceae): development, structure and function as resting spores. *J Phycol* **15**: 233-243.
- Webb M, Thoms M, Reid M. (2012). Determining the ecohydrological character of aquatic refugia in a dryland river system: the importance of temporal scale. *Ecohydrology & Hydrobiology* **12**: 21-33.
- Williams DD. (1983). The natural-history of a nearctic temporary pond in Ontario with remarks on continental variation in such habitats. *Internationale Revue Der Gesamten Hydrobiologie* **68**: 239-253.
- Williams DD. (1996). Environmental constraints in temporary fresh waters and their consequences for the insect fauna. *Journal of the North American Benthological Society* **15**: 634-650.
- Wilson CJ, Holmes RW. (1981). The Ecological Importance of Distinguishing Between Living and Dead Diatoms in Estuarine Sediments. *British Phycological Journal* **16**: 345-349.



# CHAPITRE IV : ETUDE DE LA BIOINDICATION PAR LES DIATOMÉES DANS LE MONDE ET SON IMPLICATION DANS LES COURS D'EAU ASSECHES

La bioindication est un outil essentiel pour évaluer la qualité biologique des cours d'eau dans le monde depuis plusieurs années. Les diatomées font partie des bioindicateurs les plus utilisés dans ce but et font l'objet de nombreux travaux de recherche. Cependant, leur utilisation pour la bioindication des cours d'eau non permanents en est à peine à ses prémices. Pour ces raisons, ce chapitre dresse un état de lieux des concepts généraux utilisés dans la bioindication ainsi que des différents types d'indices développés dans le monde et basés sur les diatomées. La dernière partie détaille les protocoles mis en place pour les suivis de routine en mettant en avant leur potentiel pour une application dans les cours d'eau asséchés, en s'appuyant plus particulièrement sur les indices IBD et IPS utilisés en France. Notre discussion se base sur les données bibliographiques et les résultats des différentes expériences que nous avons conduites au cours de ce travail de thèse et propose des bonnes perspectives pour l'adaptation du protocole normé IBD, même si une étude à plus grande échelle serait nécessaire pour confirmer ces premiers résultats.

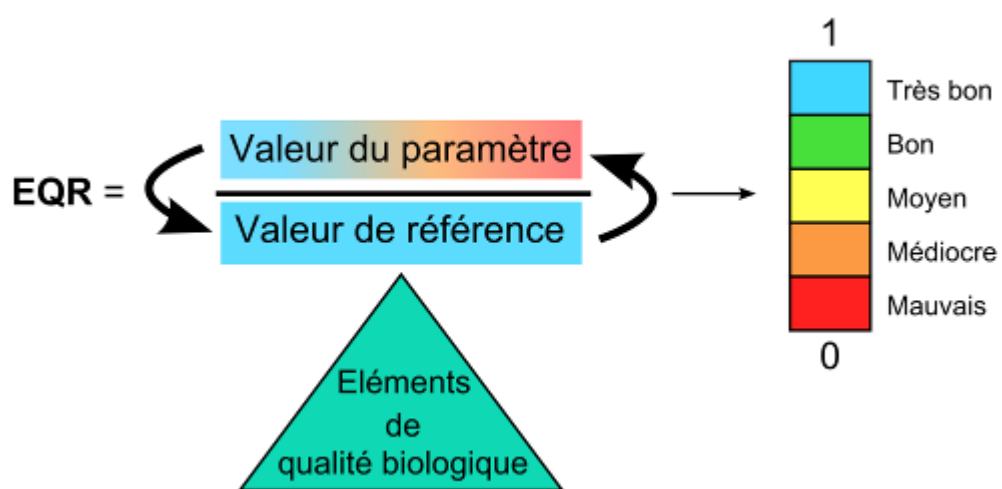


La bioindication est désormais couramment utilisée dans le monde entier et se base sur divers organismes, dont les diatomées, afin d'évaluer la qualité des masses d'eau superficielles. Les diatomées ont largement fait leurs preuves en tant que bioindicateur efficace pour la bioévaluation des masses d'eau (Birk *et al.*, 2012; Ruaro and Gubiani, 2013; Lavoie *et al.*, 2014), que ce soit pour les écosystèmes lotiques (Kelly *et al.*, 1998; Ector *et al.*, 2004; Kelly *et al.*, 2009a; Besse-Lototskaya *et al.*, 2011; Stevenson, 2014), lenticques (King *et al.*, 2006; Thomas and Hall, 2009) ou dans les zones côtières (Desrosiers *et al.*, 2013b; Desrosiers *et al.*, 2013a). Malgré ce consensus, des incertitudes concernant les outils sont révélées lorsque l'on tente d'harmoniser les résultats selon diverses méthodes d'évaluation (Kelly *et al.*, 2009b; Demars, 2013; Kelly, 2013). Par exemple, en Europe, les protocoles diffèrent selon les Etats membres, ce qui met en évidence une variabilité très importante (dans la définition des états de référence par exemple) malgré le cadre fixé par la DCE. La bioindication est actuellement confrontée à la création de nouveaux indices basés sur les diatomées chaque année (Gassiole, 2014) et le développement de nouvelles techniques notamment moléculaires (Kermarrec *et al.*, 2014), mais ce challenge est d'autant plus difficile à relever dans un contexte de changement climatique où la part des cours d'eau non permanents doit faire partie intégrante des politiques de gestion (Sabater and Tockner, 2010; Steward *et al.*, 2012).

La première partie de ce dernier chapitre reprend les concepts généraux sur lesquels se base la bioévaluation de la qualité des cours d'eau dans le monde : le concept de Qualité Environnementale, la définition d'un Etat de référence permettant de mesurer l'écart avec les cours d'eau évalués, et le concept de régionalisation, permettant de définir avec davantage de précision les caractéristiques d'une région donnée et donc son Etat de référence.

La seconde partie de ce chapitre concerne plus particulièrement les différents types d'indices développés dans le monde et rend compte d'approches parallèles basée sur les mêmes concepts et ayant les mêmes objectifs.

Enfin, en dernière partie, les données bibliographiques et les données de terrain recueillies au cours de ce travail de thèse, notamment les indices testés sur des cours d'eau au lit asséché, sont analysés. Ainsi, les différentes étapes qui composent l'évaluation d'un cours d'eau sont discutées, depuis l'échantillonnage jusqu'à l'analyse taxonomique, en intégrant les éventuelles implications pour leur application aux cours d'eau asséchés.



**Figure 34 : Concept de l' « Ecological Quality Ratio » dans l'élaboration des indices biologiques.**

d'après Van de Bund and Solimini (2007)

## I. Les concepts de la bioindication

### 1. Le concept de « Qualité Environnementale »

Les Etats-Unis et l'Europe sont à ce jour les plus avancés en termes de législation pour la protection des masses d'eau. Ainsi, le critère de « Qualité d'eau » a été défini dans les années 1970 par l'U.S. Environmental Protection Agency aux Etats-Unis (USEPA, 1974) et l'European Inland Fisheries Advisory Commission (EIFAC) en Europe (Alabaster and Lloyd, 1978) afin de protéger les ressources en eau exploitées pour les usages humains. Dans les années 1990, la Commission Européenne souligne l'importance de protéger la structure et la fonction des communautés biologiques (principe de protection d'une ressource exploitable) en se basant sur des approches chimiques. C'est avec l'apparition de la Directive Cadre sur l'Eau (DCE) que l'enjeu prend une dimension environnementale. Les approches biologiques et écologiques deviennent alors majoritaires avec le développement de la bioindication (Vighi *et al.*, 2006). L'approche de la DCE repose sur une logique compensatrice entre des pressions jugées « inévitables » (dues à des activités bénéfiques et rentables ne pouvant être assurées autrement à moins d'engager des coûts disproportionnés) et des programmes de restauration efficaces mis en œuvre à moindre coût (Bouleau and Pont, 2014).

En Europe, un Décalogue, basé sur 30 années d'expérience dans la bioindication des macroinvertébrés en Espagne, résume les points à prendre en compte afin de créer un indice conforme aux normes imposées par la Directive Cadre sur l'Eau (Prat and Munne, 2014) :

- l'établissement d'un réseau de prélèvements (en général un bassin versant), avec une densité de stations adaptée aux pressions anthropiques présentes ;
- le recensement des besoins humains et matériels afin d'assurer l'échantillonnage, avec un champ d'application adapté aux ressources humaines et matérielles et une formation qualifiante afin d'assurer la fiabilité et la qualité des résultats ;
- la définition des typologies de masses d'eau, afin de comparer des sections de rivières similaires ;
- l'établissement de conditions de référence, pour comparer les communautés impactées avec des communautés non impactées ;
- la définition des protocoles d'échantillonnage utilisés, dont la méthode d'échantillonnage, de traitement au laboratoire, de conservation et d'analyse ;

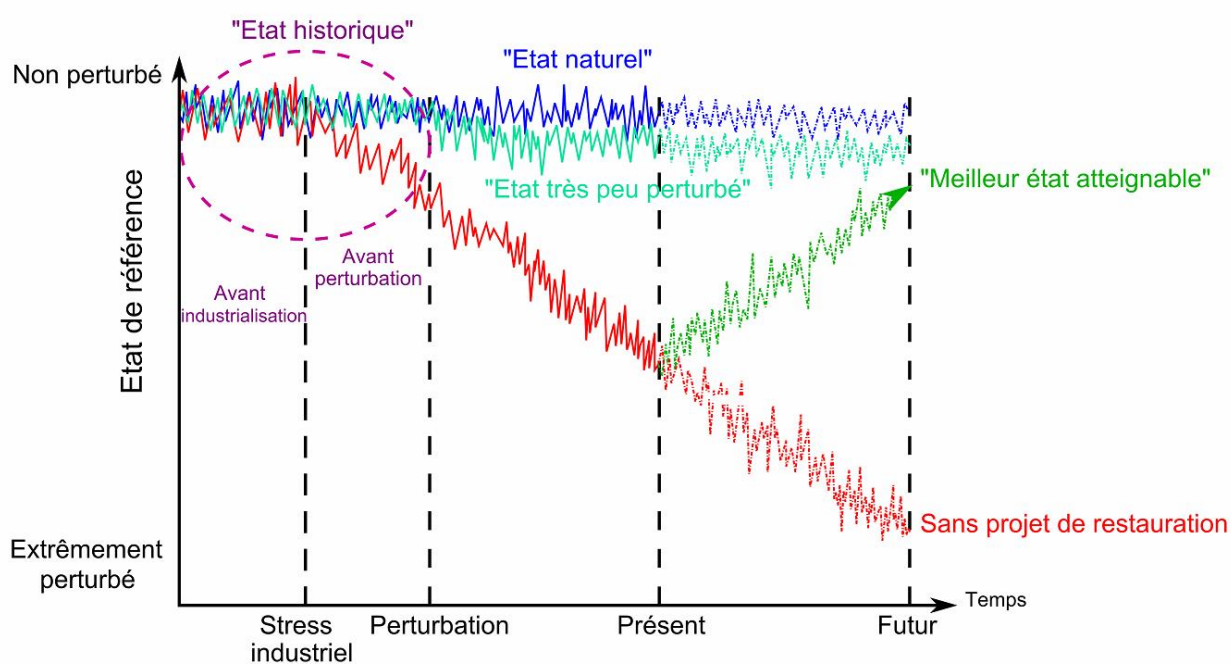


Figure 35 : Illustration des différents types d' "états de référence" décrits par Stoddard *et al.* (2006).

d'après Pruitt *et al.* (2012)



- la définition des métriques biologiques à appliquer, synthétisées chacune dans une condition biologique elle-même basée sur des données de présence et d'abondance des espèces ;
- la fixation de 5 seuils de qualité et leurs relations en fonction des stress impliqués (spécifiques ou globaux) ;
- l'établissement de la cartographie des qualités écologiques et du système d'évaluation en utilisant les EQR (Ecological Quality Ratio ; Figure 34) ;
- la normalisation et le contrôle de la qualité où toutes les étapes doivent faire l'objet de contrôles pour s'assurer de la fiabilité des données obtenues ;
- la définition des objectifs de qualité et des mesures appropriés pour maintenir ou améliorer la qualité de l'eau.

L'EQR correspond au ratio entre la valeur du paramètre biologique observé pour une masse d'eau donnée et la valeur attendue dans des conditions de référence (Figure 34). Il peut être exprimé par une valeur numérique allant de 0 (mauvais état écologique) à 1 (bon état écologique) (Van de Bund and Solimini, 2007).

Cette notion de comparaison à une valeur de référence est à la base des systèmes d'évaluation de la qualité de l'eau, quel que soit le pays.

## 2. Le concept d'« état de référence »

Afin d'évaluer les impacts directs et indirects des perturbations et des activités humaines sur les communautés biologiques, il est nécessaire de poser un « état de référence » auquel les communautés évaluées peuvent être comparées. Ce terme correspond à un état « naturel », tant au niveau de la structure que de la fonction du biotope, et implique l'absence de perturbations humaines significatives ou d'altérations en faveur de l'« intégrité biologique » (en bleu dans la Figure 35), telle que définie par l'U.S. Clean Water Act, la DCE en Europe ou la Water Reform Framework en Australie. Pour chaque indice ou métrique étudiés, cet état de référence est caractérisé par une gamme de valeurs indicielles de référence, plutôt qu'une seule valeur absolue, prenant ainsi en compte les erreurs d'échantillonnage et la variabilité naturelle spatiale et temporelle (due à l'influence du climat et des perturbations naturelles). Pour cette raison, il est primordial de définir l'état de référence et la méthode utilisée pour le qualifier (Stoddard *et al.*, 2006).

Ainsi, Stoddard *et al.* (2006) ont décrit différentes déclinaisons possibles d'un état de référence (Figure 35) :

- l'« état très peu perturbé », acceptant un minimum de perturbations anthropiques ;

- l' « état historique », où la référence est un état antérieur à une modification humaine importante telle que l'industrialisation ou l'agriculture intensive (Dufour and Piegay, 2009) ;
- l' « état le moins perturbé », défini par l'état démontrant le moins de signes de perturbations malgré des pressions anthropiques fortes ;
- et le « meilleur état atteignable », représentant le meilleur état que l'on puisse atteindre à partir d'un état dégradé, suite à l'application de toutes les mesures possible de gestion et de restauration écologique (Stoddard *et al.*, 2006).

En découle les différentes méthodes d'évaluation de cet état de référence (Stoddard *et al.*, 2006) :

- l'approche par sites de référence (sites peu ou les moins perturbés) ;
- le jugement par des professionnels expérimentés ;
- l'interprétation de l'état historique (en référence à des documents historiques ou traces biologiques persistantes) ;
- l'extrapolation de modèles empiriques ;
- et l'évaluation des distributions environnantes.

En Europe, la Directive Cadre sur l'Eau requiert un « bon état écologique » pour tous les états membres d'ici 2015. Un exercice d'intercalibration entre les Etats membres a été conduit afin d'harmoniser les objectifs en fonction des pays, en particulier dans le but de définir l'écart par rapport à un état très peu perturbé, basé sur les propriétés biotiques des masses d'eau (Pardo *et al.*, 2012). Cet exercice a permis de mettre en évidence le fait que de nombreux Etats membres n'avaient pas développé d'outils d'évaluation au niveau national et qu'il était difficile de comparer les données entre les Etats en raison de l'hétérogénéité des milieux (diversité naturelle) et de leur définition des conditions de référence (diversité culturelle) (Birk *et al.*, 2013).

Cet état de référence a d'ailleurs fait l'objet de nombreuses publications ces dernières années dans le cadre de la mise en place de l'évaluation de la qualité de l'eau dans le monde (*e.g.* Reynoldson *et al.*, 1997; Bowman and Somers, 2005; Stoddard *et al.*, 2006; Hawkins *et al.*, 2010).

Ce concept peut être adapté à différentes échelles. Il peut être spécifique d'un site lors d'une comparaison amont-aval ou régional pour des habitats et régions homogènes (Barbour *et al.*, 1996; Potapova and Charles, 2007).

### 3. Le concept de « régionalisation »

Les différences régionales peuvent être très importantes, elles doivent donc être prises en compte pour une meilleure signification des indices (Hughes *et al.*, 1986; Rott *et al.*, 2003; Potapova and Charles, 2007).

En Europe, la géologie, le relief et le climat sont les paramètres principaux définissant le fonctionnement des écosystèmes lotiques et sur lesquels reposent la définition des « hydro-écorégions » (HER ; Figure 36) (Wasson *et al.*, 2004). On en dénombre 133 au total et 2 niveaux de précision sont définis en France (22 HERs de niveau 1 et 112 HERs de niveau 2). En France, les limites des 5 classes de qualités sont différentes selon les hydro-écorégions concernées. Les seuils des valeurs d'IBD pour les différentes classes de qualité sont donnés dans l'Annexe 2 du « Guide technique -- Evaluation de l'état des eaux douces de surface de métropole », publié par le Ministère de l'Ecologie, de l'Energie, du Développement Durable et de l'Aménagement du Territoire en 2009.

Aux Etats-Unis, la définition d'écorégions permet de faciliter la gestion des masses d'eau au niveau local, régional et national (Omernik, 2004). Elles sont définies à plusieurs échelles en Amérique du Nord (15 de niveau I, 52 de niveau II et environ 200 de niveau III) en fonction de différents facteurs : la géologie, l'hydrologie, la végétation, le climat, la faune et l'influence humaine.

De la même manière en Australie, des biorégions ont été définies, basées sur des données similaires de climat, géologie, relief, végétation et espèces. Au total, 89 biorégions ont été décrites regroupant 419 sous-régions (IBRA, 2012).

D'autres continents ont adopté ce concept pour définir des zones homogènes, qu'il est ainsi plus facile d'étudier par des limites de qualité plus précises et plus adaptées en fonction des caractéristiques fonctionnelles du milieu.



Figure 36 : Carte des 133 Hydro-écorégions définies en Europe.

Source : Wasson *et al.* (2007)

## II. La mise en œuvre de la bioindication

Différentes méthodes sont utilisées pour évaluer la santé d'un écosystème comme par exemple les analyses chimiques, ne fournissant que des informations en temps réel. Avant le développement majeur de la bioindication, les communautés étaient évaluées principalement par le biais d'indicateurs plus généraux tels que la richesse spécifique, l'abondance ou les indices de diversité et d'équitabilité (Indice de Simpson (Simpson, 1949) et Indice de Shannon-Weaver (Shannon and Weaver, 1963) pour les plus utilisés). Ces indices sont encore largement utilisés aujourd'hui.

### 1. Les différents types d'indices

Les indices développés dans le cadre de l'évaluation de la qualité de l'eau à partir d'éléments biologiques sont de 3 types : les indices biotiques, les indices multimétriques et les indices basés sur des modèles prédictifs (Schowe and Harding, 2014).

Les indices biotiques sont les plus simples et les plus communément utilisés et reposent sur une unique métrique. En général, il s'agit de la structure de la communauté (richesse taxonomique) ou de valeurs de tolérance pour différents taxons.

Les indices multimétriques sont plus complexes et très utilisés en Amérique du Nord. Ils sont basés sur différents traits qualitatifs de la communauté en place, appelés « métriques », répondant de façon prévisible aux modifications de l'environnement (fréquence de certains taxons ou groupe de taxons, richesse spécifique...). Les métriques prises en compte peuvent être aussi des indices biotiques (Delgado *et al.*, 2010). L'idée est donc de synthétiser ces métriques dans une note indicielle, reflétant l'intégrité biologique décrite comme « la capacité d'une communauté aquatique à supporter et maintenir des performances structurelles et fonctionnelles comparables à l'habitat naturel de la région » (Karr and Dudley, 1981).

Enfin, les modèles prédictifs reposent sur des données multivariées. Leur principe repose sur la comparaison des communautés de sites de référence avec celles des sites à évaluer et ayant des caractéristiques environnementales (chimiques et physiques) similaires (« Concept de l'Etat de Référence »). La différence entre les deux états, observé (O) et attendu (A), s'exprime par un ratio (O/A) et varie de 1 (pas de différence entre les taxons) à 0 (taxons totalement différents). En pratique, une marge d'erreur est à prendre en compte, inhérente à l'établissement de la liste des taxons attendus (Norris and Hawkins, 2000). Cette méthode requiert un grand nombre de sites de références afin d'identifier un nombre suffisant de taxons représentatifs et donc d'assurer la robustesse des résultats (Feio *et al.*, 2007a).

**Tableau 5 : Liste des différents outils développés à travers le monde pour la bioévaluation de la qualité des cours d'eau et basés sur les diatomées benthiques.**

<sup>1</sup>La liste des pays où les indices ont été appliqués n'est pas exhaustive.

Indice	Publication(s) de référence	Lieu de développement / utilisation <sup>1</sup>	Nombre de taxons / métriques utilisées et remarques	Type d'indice
Indice de Polluosensibilité Spécifique (IPS)*	CEMAGREF (1982)	Europe, Vietnam, Chine	263 (1982), 3143 (1999) et toutes les espèces connues	Biotique
Indice de Sládeček (SLA)*	Sládeček (1986)	République Tchèque (Europe centrale)	323	Biotique
Indice des Assemblages de Diatomées pour la pollution organique (DAIpo)	Watanabe <i>et al.</i> (1988)	Japon, Vietnam	548	Biotique
Indice de Leclercq and Maquet (ILM)*	Leclercq and Maquet (1987)	Belgique	270	Biotique
Indice Diatomique Générique (IDG)	Rumeau and Coste (1988); Coste and Ayphassorho (1991)	France	88 (1988), 174 (1991) et tous les genres d'eau douce connus	Biotique
Indice de Steinberg & Schiefele (SHE)	Steinberg and Schiefele (1988); Schiefele and Schreiner (1991)	Allemagne / Autriche	386 espèces	Biotique
Indice diatomée de la Communauté Economique Européenne (CEE)	Descy and Coste (1991)	Europe	208	Biotique
Indice Trophique Diatomées (TDI)*	Kelly and Whitton (1995)	Angleterre, Ecosse ...	86	Biotique
Indice Diatomique Artois-Picardie (IDAP)*	Prygiel and Coste (1996)	France, Chine	91 espèces et 45 genres	Biotique
Indice Biologique Diatomées (IBD)*	Lenoir and Coste (1996); Coste <i>et al.</i> (2009)	France, Portugal, Pologne, Chine, ...	209 (1996) et 812 (2009)	Biotique
Indice Saprobique (SI)	Rott <i>et al.</i> (1997)	Autriche, Turquie	650 espèces	Biotique
Indice Trophique (TI)	Rott <i>et al.</i> (1999)	Autriche	650 espèces	Biotique
Indice Générique (GI)	Wu (1999)	Taiwan	161	Biotique
Indice Trophique Diatomées (TDI)	Coring <i>et al.</i> (1999)	Allemagne	Pas de données	Biotique
Indice Diatomique Pampéen (IDP)*	Gómez and Licursi (2001)	Argentine	210	Biotique
Indice Biologique de la Qualité de l'Eau (BWQI)*	Lobo <i>et al.</i> (2004)	Brésil	239 espèces	Biotique
Indice d'Eutrophisation/Pollution base sur les Diatomées (EPI-D)	Dell' Uomo (1996); Dell' Uomo (1999); Dell' Uomo (2004)	Italie, Chine	493 incluant 3 indices partiels (133 taxons): TI-D (nutriments), SI-D (matière organique) et HI-D (matière minérale) Dell' Uomo and Torrisi (2011)	Biotique
Indice Diatomique Suisse (DI-CH)*	Hurlimann and Niederhauser (2006)	Suisse	188	Biotique
Indice Diatomique de l'Est du Canada (IDEC)	Lavoie <i>et al.</i> (2006); Lavoie <i>et al.</i> (2010)	Canada	325 (2006) et 271 (2010)	Biotique
Indice des espèces de Diatomées pour les Rivières Australiennes (DSIAR)	Chessman <i>et al.</i> (2007)	Australie	55 genres, 501 espèces (initialement DIAR au niveau du genre)	Biotique
Indice de Distance Ecologique (IDE)	Tison <i>et al.</i> (2008)	France	305 espèces	Biotique
Indice Diatomique de Duero (IDD)	Alvarez-Blanco <i>et al.</i> (2013)	Nord-Ouest de l'Espagne	137	Biotique
Indice Diatomique de la Réunion (IDR)	Gassiole (2014)	Île de la Réunion	95	Biotique
Indice Biotique (pHBI)	Schowe and Harding (2014)	Nouvelle Zélande	43	Biotique
Indice Diatomées Antilles (IDA)	Gueguen <i>et al.</i> (2013)	Antilles françaises	181	Biotique
Indice d'Intégrité Biotique (IBI)	Karr (1981)	USA, Chine, Allemagne, ...	Pour les diatomées : Hill <i>et al.</i> (2000); Wang <i>et al.</i> (2005); Hering <i>et al.</i> (2006a); Wu <i>et al.</i> (2012b), ...	Multimétrique
Indice Diatomique Multimétrique (MDIAT)	Delgado <i>et al.</i> (2010)	Galice (Nord-Ouest de l'Espagne)	8 métriques	Multimétrique
Indice Diatomique Multimétrique (DIATMIB)	Delgado <i>et al.</i> (2012)	Iles Baléares (Espagne)	307, 3 métriques	Multimétrique
Indice Diatomique de Pollution Minière (DMPS)	Schowe and Harding (2014)	Nouvelle Zélande (Mine)	4 métriques	Multimétrique
Modèle Diatomique d'Affinité (DMA)	Passy and Bode (2004)	Etat de New York (USA)	134	Modèle Prédictif
Modèle prédictif pour les Diatomées (MoDi)	Feio <i>et al.</i> (2007b); Feio <i>et al.</i> (2009)	Centre du Portugal, USA	9 métriques	Modèle Prédictif
Modèle prédictif pour les Diatomées (DIATMOD)	Almeida and Feio (2012)	Portugal	254	Modèle Prédictif
AQUAFLORE	Feio <i>et al.</i> (2012)	Portugal	Diatomées et macrophytes	Modèle Prédictif
Prédiction des Invertébrés de Rivière et Système de Classification (RIVPACS)	Wright (1995)	UK, Portugal, USA, ...	Pour les diatomées : Chessman <i>et al.</i> (1999b); Philibert <i>et al.</i> (2006); Ritz (2010); DeNicola and Kelly (2014), ...	Modèle Prédictif
Evaluation Benthique des Sédiments (BEAST)	Reynoldson <i>et al.</i> (1995)	Canada, Portugal	Pour les diatomées : Mendes <i>et al.</i> (2014)	Modèle Prédictif
Evaluation des Rivières Australiennes (AUSRIVAS)	Simpson and Norris (2000)	Australie	Pour les diatomées : Chessman <i>et al.</i> (2007)	Modèle Prédictif

\*Basé sur la formule de Zelinka and Marvan (1961)

## 2. Les indices basés sur les diatomées dans le monde

Comme évoqué précédemment, les diatomées sont de bons intégrateurs de la modification de leur milieu. Elles peuvent rendre compte de pollutions passagères ou de l'impact de l'occupation des sols, ce qui est moins vrai concernant les macrophytes ou les poissons, du fait de leurs cycles de vie plus longs ou de leurs mobilités (Mc Cormick and Cairns, 1994; Barbour *et al.*, 1999; Hering *et al.*, 2006b).

Le compartiment diatomique est largement utilisé en Europe, contrairement aux Etats-Unis où les macroinvertébrés et les indices multimétriques se sont davantage développés (Ruaro and Gubiani, 2013). Le Tableau 5 présente une liste la plus complète possible des méthodes utilisées pour l'évaluation de la qualité des cours d'eau par les diatomées benthiques, tout en précisant la nature de l'indice concerné.

L'Europe est une référence pour la mise en œuvre des indices biotiques s'appuyant sur les diatomées (IPS/IBD (voir Chapitre I), DI-CH, TDI,...), dont la plupart sont basés sur la formule de Zelinka and Marvan (1961). Certains de ces indices biotiques sont aujourd'hui testés dans d'autres pays, en particulier en Asie (Duong *et al.*, 2007; Pignata *et al.*, 2013; Tan *et al.*, 2014) alors que de nouveaux indices sont créés dans des territoires géographiquement limités tels que les Antilles Françaises (Gueguen *et al.*, 2013) ou l'île de la Réunion (Gassiole, 2014).

Aux Etats-Unis, les indices multimétriques découlent pour la grande majorité de l'Indice d'Intégrité Biotique (IBI ; Karr, 1981). Ce dernier a initialement été créé sur les communautés de poissons et il est aujourd'hui adapté aux diatomées *via* le développement de différents indices partout dans le monde tels que le D-IBI en Chine (Wu *et al.*, 2012a), le P-IBI en Allemagne (Wu *et al.*, 2012b) ou encore le KY-IBI dans le Kentucky (Wang *et al.*, 2005).

L'approche de l'évaluation des cours d'eau par les modèles prédictifs est en phase avec les législations européennes et américaines, puisque ceux-ci reposent sur le concept de « l'état de référence » décrit précédemment. Certains modèles prédictifs ont été créés à partir des diatomées, tels que le MoDi (Feio *et al.*, 2007b; Feio *et al.*, 2009) qui soutient la comparaison avec les indices biotiques couramment utilisés en Europe. Ce modèle dérive de la méthode BEAST développée au Canada, qui consiste à évaluer la qualité des sédiments au moyen d'une technique d'analyses multivariées de la structure des communautés d'invertébrés benthiques, de leurs réponses fonctionnelles à des tests de toxicité en laboratoire et enfin des caractéristiques chimiques et physiques des sédiments et de l'eau sus-jacente (Reynoldson *et al.*, 1995; Mendes *et al.*, 2014). Un autre modèle prédictif récemment développé sur les diatomées est le DIATMOD (Almeida and Feio, 2012) qui découle

**Tableau 6 : Résumé des techniques d'échantillonnage, de laboratoire et d'analyse des échantillons de diatomées en routine dans différents pays.**

**\*En Australie, le prélèvement regroupe un prélèvement sur substrat dur et un prélèvement sur substrat meuble.**

		Europe	Etats-Unis		Australie		Afrique du Sud	
Phase de prélèvement	Références	Kelly <i>et al.</i> (1998)	Barbour <i>et al.</i> (1999): diatomées and autres algues		Chessman <i>et al.</i> (1999a)		Taylor <i>et al.</i> (2007b)	
	Temps minimum requis avant échantillonnage	4 semaines	3 semaines ou 7 jours pour des changements mineurs		Quelques semaines		4 semaines	
	Substrats préférentiels	Pierres	Echantillonnage multi-habitats	Echantillonnage mono-habitat		½ échantillon*	½ échantillon*	Pierres et petits blocs
			Non	Pierres (radiers)		Substrat dur : pierres (~ 10-30 cm)	Substrat meuble : Bord de flaques ou zones abritées	
	Autres substrats	Substrat artificiel > macrophytes immergés > macrophytes émergents	Substrat déplaçable ( <i>i.e.</i> pierres, sable) ; substrat végétal déplaçable ( <i>i.e.</i> macrophytes, bryophytes) ; substrat dur non déplaçable ( <i>i.e.</i> blocs, roche mère) ; sédiments fins ( <i>i.e.</i> sable, limons)	Non		Bûches > morceaux de bois > macrophytes	Non	Objets humains ( <i>i.e.</i> pile de pont) > macrophytes émergents > macrophytes immergés > substrat meuble > substrat artificiel
	Substrat non recommandés	Substrat meuble (sable), bois	Non	Sable		Non	Flaques isolées ou rupture d'écoulement	Non
Matériel de prélèvement	Brosse à dents ou couteau, racloir	Brosse à dents, brosse à ongles ou grattoir (substrat dur) ; tamis ou forceps (substrat meuble)		Lame ou bâtonnet de glace aiguisé	Pipette	Brosse à dents ou couteau		
Phase de laboratoire	Pré-observation de matériel frais	Recommandée	Non spécifié mais observation de diatomées vivantes et autres algues sans traitement		Recommandée avec précision des pourcentages de taxons les plus communs en distinguant ceux avec ou sans organites		Oui, si nb de cellules mortes > nb de cellules vivantes, l'échantillon est détruit	
	Fixateur	Lugol ou réfrigérateur (court terme) ; alcool ou formaldéhyde (long terme)	Compartiment diatomique : Lugol, fixateur "M3", formaldéhyde 4 %, glutaraldéhyde 2 % ou autre fixateur (APHA, 2012)		Lugol ou éthanol 70 %		Lugol ou éthanol (24h et plus) ou réfrigérateur (moins de 24h)	
	Traitement recommandé	Méthode de l'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> à chaud (recommandé) + HCl (avant ou après) ; autres méthodes autorisées sauf brûlage	Compartiment diatomique : HCl à chaud et KMnO <sub>4</sub> ; méthode de HNO <sub>3</sub> /H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> à chaud ; méthode de l'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> à chaud		Méthode de l'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> à chaud		HCl à chaud et KMnO <sub>4</sub> (recommandé) ; méthode de l'HNO <sub>3</sub> /H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> à chaud ; méthode de l'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> à chaud ; méthode de l'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> à froid ; brûlage	
	Montage de lames permanentes	Résine de montage pour diatomées à indice de réfraction > 1.6 ; ~ 10-20 valves par champ d'observation	Compartiment diatomique : Résine de montage pour diatomées à fort indice de réfraction ( <i>i.e.</i> Naphrax) ; ~ 10-20 valves par champ d'observation		Naphrax et vernis à ongle		Naphrax, ZRAX, Pleurax ou Hyrax ; (1) 5-15 (25) valves par champ d'observation	
Phase d'analyse	Nombre de valves comptées et grossissement	400 valves au grossissement x 1000 (immersion)	Compartiment diatomique : 600 valves (300 cellules) au grossissement x 1000 (immersion) – ajouter 100 valves ou 3 minutes d'observation pour estimer la richesse taxonomique (optionnel)		~ 300 valves au grossissement x 1000 (immersion)		400 valves au grossissement x 1000 (immersion)	



des modèles AUSRIVAS/RIVPACS, développés respectivement en Australie et en Grande-Bretagne. Ces programmes permettent de générer des prédictions dans la composition des communautés d'invertébrés en l'absence de stress importants (Wright, 1995; Simpson and Norris, 2000).

D'autres pays, tels que l'Afrique du Sud, commencent à développer des indices basés sur les diatomées dans des programmes de surveillance nationaux où seuls les macroinvertébrés et les poissons avaient leur place, en s'inspirant des outils utilisés en Europe (Taylor, 2006; Taylor *et al.*, 2007a; Taylor *et al.*, 2007c).

Les diatomées benthiques sont donc des bioindicateurs très utilisés dans le monde, qu'elles soient seules ou associées à d'autres compartiments. De ce fait, les contributions scientifiques se multiplient, de même que les collaborations entre les pays pour développer des outils d'évaluation. Ainsi, les pays précurseurs dans ce domaine améliorent leurs méthodes et développent de nouveaux outils, mais ils exportent également leur savoir-faire dans les pays émergents où des problématiques différentes se présentent (différences notables dans les typologies de cours d'eau, les aménagements et les niveaux d'anthropisation, etc.).

Cependant, des critiques sont également émises sur la fiabilité de ces indices, étant donné les taux d'incertitude qu'ils génèrent et qui ne sont pas toujours suffisamment mis en évidence (voir Chapitre IV, II., 3.). Ces incertitudes entraînent une diminution de la précision de ces indices, il est donc important de les identifier et de les expliquer. Elles peuvent par exemple être générées par la non répétabilité de l'échantillonnage ou encore les erreurs d'identification taxonomique (Demars, 2013).

### **3. Analyse critique des différents protocoles utilisés dans le monde**

Afin d'homogénéiser les techniques de bioindication par les diatomées, différents protocoles ont été décrits. Différentes étapes d'échantillonnage, de traitement et d'analyse des échantillons sont synthétisées dans le Tableau 6, selon les protocoles utilisés à l'heure actuelle en Europe (Kelly *et al.*, 1998), aux Etats-Unis (Barbour *et al.*, 1999), en Australie (Chessman *et al.*, 1999a) et en Afrique du Sud (Taylor *et al.*, 2007b). D'autres protocoles sont mis en place dans d'autres pays et s'inspirent en général de ces méthodes, comme par exemple au Canada où les normes de prélèvement européennes sont mis en application (Lavoie *et al.*, 2010).

#### **a. Échantillonnage**

On note des pratiques assez similaires selon les méthodes, sauf pour les Etats-Unis qui proposent 2 types d'échantillonnage (multi-habitats et mono-habitat) et prennent en compte

des algues différentes des diatomées. Cette approche donne moins de poids aux diatomées en faveur des autres types d'algues et entraîne obligatoirement une observation et une détermination des principaux taxons de diatomées à partir de l'échantillon non traité. Ce protocole rejoint le protocole standardisé pour l'étude du phytoplancton des grands cours d'eau et des lacs en France (Laplace-Treytore *et al.*, 2010). Les autres méthodes se contentent d'une observation globale des proportions de valves vides et avec organites (en particulier les chloroplastes).

En Europe, une étude a été conduite afin de définir les incertitudes liées au prélèvement des diatomées, pouvant alors entraîner des biais dans les résultats. Ainsi, dans le cadre d'un projet de recherche européen (STAR : Standardisation of River Classifications), ayant pour but d'uniformiser les données de bioindication produites par les différents Etats membres, des analyses multimétriques ont révélé que c'est le choix des sites et des substrats pour le prélèvement qui génère le plus d'incertitudes. En effet, les échantillons de sites différents favorisent une certaine hétérogénéité, de même que le prélèvement de substrats différents qui peuvent être difficilement comparables (Besse-Lototskaya *et al.*, 2006). Par exemple, les assemblages prélevés sur les macrophytes peuvent être très hétérogènes du fait de l'envasement auquel ils sont soumis et d'une pression de broutage importante (Townsend and Gell, 2005).

Une autre étude réalisée au Canada a montré des résultats similaires avec une variabilité notable entre différents sites d'une même rivière (16,6 %) et très importante entre différents cours d'eau (59,6 %), en toute logique. Cependant, la variabilité des échantillons collectés dans un même site était très faible (1,8 %) (Lavoie *et al.*, 2005).

Un autre aspect concernant la contamination croisée des échantillons par l'utilisation d'une même brosse à dents a également été testée. Il semblerait qu'un rinçage avant et après chaque prélèvement dans le cours d'eau limite fortement la contamination (moins de 1 % des taxons) (Kelly and Zgrundo, 2013). Toutefois, étant donné le faible coût de ce matériel, il est aisé d'utiliser une brosse unique pour chaque cours d'eau. Le prélèvement de substrats durs non déplaçables à l'aide d'un racloir muni d'un filet pose potentiellement problème et nécessiterait une réflexion ou une étude du même type. Aux Etats-Unis, un système différent est utilisé. Il s'agit d'un tube en PVC munie d'une pipette permettant un rinçage aisé du matériel (Barbour *et al.*, 1999). En Ontario, un prototype d'outil de prélèvement avec seringue et brosse a été créé. Ce matériel est très astucieux car les seringues peuvent être facilement rincées ou renouvelées (Thomas and Hall, 2009).

### **b. Fabrication de lames permanentes et comptage**

Le processus de fabrication de lames permanentes peut se faire à l'aide de différentes méthodes (Tableau 6, « Phase de laboratoire »). L'échantillon (ou sous-échantillon selon les protocoles) est traité de différentes manières, par l'intermédiaire d'eau oxygénée à chaud ou à froid ou d'acide nitrique ou sulfurique. S'en suit généralement une phase de plusieurs rinçages afin de retirer les produits chimiques. L'échantillon traité est alors déposé sur une lamelle jusqu'à séchage complet avant d'être monté entre lame et lamelle sous hotte aspirante, à l'aide d'une résine à fort indice de réfraction de type Naphrax. La concentration de l'échantillon traité est alors contrôlée et il peut ensuite être conservé avec de l'éthanol afin d'éviter le développement de bactéries ou de champignons et limiter la dégradation des frustules.

La préparation des lames ne semble pas être mise en cause dans les incertitudes liées au processus de la bioévaluation (Lavoie *et al.*, 2005; Besse-Lototskaya *et al.*, 2006). Cependant, il semblerait que la morphologie des diatomées ait un impact sur leur distribution sur la lame, qui ne serait pas aléatoire pour certains taxons. Ainsi, il semblerait que les valves ayant de longues épines, des parois fines ou épaisses se déposent de façon hétérogène sur la lamelle lors du séchage. Des facteurs environnementaux tels que la présence et la taille de sédiments pourraient aussi avoir une influence (Haberyan and Haddock, 2013). Ces observations tendent à prouver qu'une sélection de champs aléatoires devrait être privilégiée. De plus, la densité de diatomées est différente au niveau des bords de la lamelle en raison de la forme de la goutte déposée, ce qui aurait une influence lors du comptage de biovolume, même si ce phénomène n'affecte pas la composition du biofilm. En effet, un comptage par transect, comme préconisé lors des suivis de routine augmente de l'ordre de 42 à 52 % la densité moyenne des diatomées par rapport à un comptage aléatoire (Alverson *et al.*, 2003). Aux Etats-Unis, les algues « non diatomées » sont également prises en compte dans les comptages et peuvent être déterminées *via* des cellules de Palmer-Maloney. Cette variabilité de densité due à l'effet de bord n'est alors pas constatée (Alverson *et al.*, 2003).

Le nombre de valves à compter varie de 300 à 600 valves selon les protocoles décrits dans le Tableau 6. Le comptage est réalisé par l'intermédiaire d'unités taxonomiques, correspondant à 1 ou 2 valves en fonction de l'état du frustule et des protocoles appliqués, les valves étant encore liées ou isolées (Kahlert *et al.*, 2012). Dans la littérature, le nombre de valves comptées dans le cadre de la bioévaluation de la qualité des cours d'eau varie entre 100 et 1000. Il semblerait qu'au moins 200 valves soient nécessaires pour assurer une efficacité de comptage de l'ordre de 80 % en termes de nombre d'espèces détectées (Bate and Newall, 1998). De plus, des différences marquées ont été observées dans les

proportions de taxons lorsque 100 et 200 valves sont comptées alors qu'une différence très faible a été constatée pour 400 et 500 valves comptées (Battarbee, 1986). Lors d'un exercice d'intercalibration européen mené en 2002 pour la détermination de l'IBD, un nombre d'au moins 300 valves a été défini comme suffisant (Prygiel *et al.*, 2002), auquel on peut ajouter des taxons supplémentaires suite au balayage de la lame après avoir atteint ce nombre (Besse-Lototskaya *et al.*, 2006).

Cette intercalibration a également été conduite sur les différents protocoles de comptage nationaux appliqués en Europe et les incertitudes qui ont été soulignées étaient principalement liées à la prise en compte des petites valves, des valves cassées et des ceintures. Par exemple, les valves cassées sont exclues des comptages en Suède, elles sont acceptées en France si au moins les  $\frac{3}{4}$  de la valve sont préservés, de même au Portugal si les zones centrales et apicales sont préservées (Kahlert *et al.*, 2012). Cette observation très simple sur les méthodes de comptage met en évidence la variabilité d'interprétation de la DCE par les différents Etats membres et donc les difficultés d'harmonisation des données qui peuvent en découler, et cela à tous les niveaux.

### **c. Détermination des diatomées**

La détermination des diatomées est probablement la partie la plus sensible des protocoles de bioévaluation de la qualité de l'eau. Récemment, elle a été remise en question en raison des limites de la taxonomie actuelle basée essentiellement sur des critères morphologiques.

Depuis les années 1700, la taxonomie des diatomées a évolué avec l'amélioration des techniques mais également une meilleure connaissance des cycles de vie et leur importante plasticité phénotypique. Même si les critères morphologiques ont encore toute leur place dans la description de nouvelles espèces, le développement de nouveaux outils basés sur une approche biomoléculaire prend une place de plus en plus importante dans la taxonomie actuelle (Mann, 2010). Il a d'ailleurs été proposé de joindre à chaque nouvelle publication d'espèce, une séquence ADN de référence, facilement stockable par cryogénie, en complément du matériel type qu'il n'est pas toujours évident de se procurer (De Clerck *et al.*, 2013). Cette approche semble incontournable pour appréhender la diversité d'espèces cryptiques que comptent les diatomées (Mann, 2010). Cependant, il est nécessaire de cadrer davantage la taxonomie actuelle étant donné la quantité de taxons qu'il reste à décrire, en évitant la publication de taxons invalides (De Clerck *et al.*, 2013). Ce travail est déjà en partie réalisé puisqu'il existe différents sites de référence pour les taxons tels que le site du *Catalogue of Diatom Names* (Fourtanier and Kociolek, 2014), l'*AlgaeBase* (Guiry and Guiry, 2014) ou le site *Diatoms of the United States* (Spaulding *et al.*, 2010). Récemment, Manoylov (2014) a écrit une synthèse bibliographique complète sur les problèmes de

taxonomie rencontrés dans la pratique de la bioindication en routine et la nécessité de s'appuyer aujourd'hui sur les techniques biomoléculaires (Kermarrec *et al.*, 2013; Kermarrec *et al.*, 2014).

D'un point de vue plus pratique, les plus grandes sources d'incertitudes, décelées lors d'une étude d'intercalibration en Europe (Projet STAR), sont les différences inter-opérateurs dans la taxonomie des diatomées. La variabilité réside dans le soin apporté au comptage (dont le temps passé sur chaque échantillon) ou l'expérience des opérateurs, ainsi que la différence de compétences dans l'identification des diatomées. La mise en place d'une liste standardisée de taxons semblerait être un excellent moyen de réduire les incertitudes, cependant elle implique une coopération active des taxonomistes (Besse-Lototskaya *et al.*, 2006). La variabilité des taxons concerne également leurs caractéristiques écologiques. Dans le cadre du projet STAR, 159 taxons ont été considérés comme « fiables », c'est-à-dire que les définitions écologiques (notamment la trophie) étaient similaires entre les pays. Or, ces 159 taxons représentaient 12 % seulement du total des taxons, ce qui pose la question de la fiabilité des indices pour une évaluation globale de la qualité de l'eau en Europe, notamment pour des échantillons où les taxons dominants ne sont pas « fiables » (Besse-Lototskaya *et al.*, 2011). Une autre difficulté est la combinaison de plusieurs écotypes génétiquement différents en un seul morphotype (espèces « cryptiques »). Ainsi, certaines espèces morphologiquement proches auront des préférences écologiques très différentes, comme par exemple *Gomphonema pumilum* var. *rigidum* témoin de milieux de mauvaise qualité et *Gomphonema pumilum* var. *elegans* de milieux de bonne qualité (Reichardt, 1997; Hofmann *et al.*, 2011). Ceci renvoie à la nécessité de l'approche biomoléculaire décrite précédemment.

La rapide évolution de la taxonomie impose une mise à jour très régulière des opérateurs et des bases de données et l'accès à une bibliographie fournie. Malgré quelques ouvrages de référence tels que la *Sußwasserflora* (Krammer and Lange-Bertalot, 1986; Krammer and Lange-Bertalot, 1988; Krammer and Lange-Bertalot, 1991), il est souvent nécessaire de se procurer de nombreux autres ouvrages spécialisés et de tenir une bibliographie à jour concernant les nouvelles espèces décrites. Depuis peu en France, des inventaires régionaux publics de diatomées voient le jour, comme en région Languedoc-Roussillon (<http://diatomee.dreal-languedoc-roussillon.fr/>) ou en région Rhones-Alpes (<http://www.rhone-alpes.developpement-durable.gouv.fr/atlas-des-diatomees-de-la-region-a3480.html>). Ce genre de publications permettra certainement de limiter les biais entre opérateurs, par une uniformisation de la taxonomie.

Ces incertitudes liées à la taxonomie touchent également les cours d'eau non permanents. La principale interrogation est de savoir si les communautés présentes dans les cours d'eau

non permanents sont les mêmes que dans les milieux permanents et si les communautés trouvées dans les lits asséchés de cours d'eau sont également similaires à celles que l'on trouve dans les cours d'eau en eau. Malheureusement, à ce jour, peu d'études ont été axées sur les diatomées, alors que la différence entre les communautés de macroinvertébrés a été déjà confirmée dans plusieurs études (Larned *et al.*, 2007; Argyroudi *et al.*, 2009). Récemment, Novais *et al.* (2014) ont conduit une expérience au Portugal sur les diatomées et ont démontré une différence significative entre les communautés des milieux temporaires et celles des milieux permanents.

### **III. Evaluation des cours d'eau asséchés**

#### **1. Contexte général**

Au cours des années 1990, Mc Cormick and Cairns (1994) soulignaient l'intérêt de développer des outils de bioindication basés sur les diatomées pour évaluer les changements environnementaux. Depuis, la récente problématique du Changement Climatique a orienté les recherches dans les régions soumises à des assèchements importants telles que les régions à climat méditerranéen. Ces régions ne sont pas seulement restreintes au bassin méditerranéen, on les retrouve partout dans le monde, en particulier sur les côtes californiennes, au centre du Chili, la région du Cap en Afrique du Sud et au sud de l'Australie (Bonada and Resh, 2013). Ces régions présentent des communautés aquatiques très particulières en partie liées à une variabilité temporelle importante des communautés, qui peut être saisonnière ou annuelle (Linke *et al.*, 1999; Mykra *et al.*, 2012). Les cours d'eau non permanents dans ces régions particulières représentent une part importante des réseaux hydrographiques, particulièrement en tête de bassin (Lowe and Likens, 2005). Cette non-permanence peut être fortement accentuée par des pressions anthropiques telles que l'irrigation agricole (Sabater, 2008) et impacter les communautés en raison d'une compétition plus sévère pour les ressources en eau (Dallas, 2013; Datry *et al.*, 2014).

#### **2. Expérimentation en milieu naturel**

A l'heure actuelle, l'échantillonnage de cours d'eau non permanents n'est pas proscrit dans les protocoles, puisqu'ils sont prélevés de la même manière que les cours d'eau pérennes dès lors qu'ils sont en eau depuis au moins quelques semaines.

Les difficultés surviennent lorsque les cours d'eau sont asséchés, ils ne sont alors plus prélevables et sortent du champ d'application des pratiques définies. Or, les diatomées sont encore présentes sur les substrats du fait de leur frustule persistant et elles peuvent être prélevées sans difficulté même après 4 semaines d'émersion, comme nous avons pu le

constater lors de l'expérimentation de terrain sur la rivière Maureillas présentées dans le chapitre III (Barthès *et al.*, 2014). Cette constatation a été confirmée lors de l'expérience en mésocosme après 8 semaines d'assèchement (chapitre II). Dans le but de tester une application du protocole IBD utilisé en routine en France, nous avons fait un suivi de 12 cours d'eau de Charente et Charente-Maritime (Bassin Adour-Garonne) subissant des assèchements de durées variables (1 à 4 mois) chaque année (Tableau 7).

### **a. Descriptif des expériences**

Quatre campagnes ont été réalisées, composées de prélèvements avant, pendant et après un assèchement du lit. Lors de notre expérience, seules 6 stations ont été confrontées à un réel assèchement, les autres ayant seulement été en rupture d'écoulement (couleur orange). Pour les cours d'eau non asséchés, le protocole IBD (AFNOR, 2007a) utilisé en routine a été appliqué avec pour seule différence l'utilisation de glutaraldéhyde 1% comme fixateur (Tableau 6, ligne « Fixateur »). L'éthanol entraînant l'éclatement des cellules, le glutaraldéhyde nous a permis une observation aisée des cellules préservées (voir II. paragraphe c.).

Concernant les cours d'eau en situation d'assèchement, le manque d'eau au niveau de la rivière a entraîné quelques ajustements du protocole de prélèvement. Une brosse à dents a été utilisée avec de l'eau déminéralisée afin de broser les pierres et récupérer le biofilm. Au moins 5 à 10 pierres ont été collectées pour chaque prélèvement et la roche mère a aussi pu être échantillonnée directement. En général, les endroits les plus profonds du lit ont été favorisés afin de s'assurer de la présence d'eau auparavant (particulièrement dans le cas de stations inconnues pour l'opérateur). De même, on a pu s'appuyer sur différents indices visuels attestant de la présence antérieure d'eau tels que des algues séchées accrochées aux pierres ou des traces de niveau d'eau sur les blocs. Les échantillons ont également été fixés au glutaraldéhyde 1 %.

En ce qui concerne le traitement des échantillons prélevés dans un lit asséché, le protocole classique peut être utilisé. Cependant, 2 protocoles ont été suivis en Adour-Garonne et sur la rivière du Maureillas :

- un traitement classique menant à la fabrication de lames permanentes, observables en microscopie optique à objectif x 100 à immersion ;
- un comptage *via* la méthode Utermöhl (Utermöhl, 1958) sur les diatomées fixées et non traitées, généralement appliqué au phytoplancton, observables en microscopie inversée à objectif x 63 à immersion.

**Tableau 7 : Récapitulatif des stations suivies dans le Bassin Adour-Garonne. En barré : les stations qui n'ont pas subi d'assèchement ; en jaune : prélèvements réalisés sur substrats asséchés.**

Cours d'eau	Station	Commune	Coordonnées (Lambert II étendu)		Campagne 1	Campagne 2	Campagne 3	Campagne 4
			X	Y				
SEUDRE	Saujon	SAUJON	395515	6514867	25/05/2011	08/08/2011	27/10/2011	01/02/2012
NE	Ars	ARS	436799	6510151	25/05/2011	05/08/2011	27/10/2011	01/02/2012
ANQUEVILLE	Natrie	GRAVES ST AMANT	457728	6509754	25/05/2011	08/08/2011	27/10/2011	01/02/2012
AUGE	Marcillac-Lanville	MARCILLAC LANVILLE	468015	6531422	25/05/2011	08/08/2011	28/10/2011	01/02/2012
BIEF	Luxé	LUXE	476077	6537033	25/05/2011	08/08/2011	28/10/2011	01/02/2012
TARDOIRE	Cotes de la Boissière	ST CIERS SUR BONNIEURE	486094	6531667	26/05/2011	08/08/2011	28/10/2011	02/02/2012
TARDOIRE	Fonclaireau	PUYREAUX	483408	6534295	26/05/2011	f	f	f
ARGENT	Vieux-Cérier	ST LAURENT DE CERIS	503875	6543273	26/05/2011	09/08/2011	28/10/2011	02/02/2012
ARGENCE	La Grange	BALZAC	478384	6516882	26/05/2011	09/08/2011	27/10/2011	02/02/2012
NOUERE	Cheneuzac	LINARS	472786	6509330	26/05/2011	09/08/2011	27/10/2011	02/02/2012
NE	Pont Brac	VIGNOLLES	458351	6496290	26/05/2011	09/08/2011	27/10/2011	02/02/2012
SEUGNE	La Vallade	CHAMPAGNAC	434746	6485825	26/05/2011	09/08/2011	27/10/2011	02/02/2012
Préleveur :					A. Barthès	S. Coulon	S. Coulon	J. Barthès



Pour chaque échantillon, un comptage d'au moins 400 valves a été réalisé pour les 2 protocoles, les valves vides et avec chloroplastes ayant été distinguées en microscopie inversée.

Le comptage sur matériel non traité est habituellement utilisé aux Etats-Unis car les protocoles incluent les algues « non diatomées ». Les déterminations sont beaucoup plus complexes, du fait de la faible bibliographie disponible concernant le matériel vivant des diatomées (Cox, 1998). De plus, cette méthode de comptage induit une baisse de précision en raison de la difficulté à discerner les ornements des valves, l'inclinaison de nombreuses valves ou la présence de matériel non digéré tel que des colonies d'algues filamenteuses. Pour pallier à ces incertitudes dans les études conduites dans le cadre de cette thèse, un premier comptage sur matériel traité a été réalisé afin de déterminer les espèces de façon précise avant de les réaliser sur les échantillons non traités. Malgré cela, des doutes ont persisté concernant certains taxons, comme par exemple la non différenciation des valves de *Cocconeis placentula* var. *lineata* et *Cocconeis placentula* var. *euglypta*. Il est évident que cette méthode chronophage est difficilement applicable pour des suivis de routine basés uniquement sur les diatomées. Cependant, d'autres techniques se développent en termes d'imagerie pour assister les comptages (Kloster *et al.*, 2014), notamment en facilitant la différenciation rapide des diatomées mortes et vivantes (Jeong *et al.*, 2014). Des outils mathématiques pour l'identification automatique des taxons de diatomées ont également été testés (Jalba *et al.*, 2005) mais cette technique est discutable du fait de la grande plasticité phénotypique des diatomées.

## **b. Résultats et implications pour la bioindication**

### **• Le protocole de prélèvement et d'analyse IBD est-il applicable en cas d'assèchement ?**

Les études conduites lors de ce travail de thèse ont déjà donné quelques pistes. En effet, lors de l'expérience sur la rivière Maureillas, les taux de mortalité (définis par la proportion de frustules vides par rapport au nombre total de frustules observés) au moment du prélèvement précédant la remise en eau des pierres étaient inférieurs à 50 % quelle que soit la durée de l'assèchement testée (Figure 31), ce qui, selon les protocoles de routine décrits dans le Tableau 6, autoriserait l'analyse des échantillons.

La structure des communautés de diatomées était similaire quel que soit le protocole utilisé (prise en compte uniquement des valves vivantes vs. toutes les valves comme dans le protocole IBD). En effet, l'étude conduite en mésocosme a montré une  $p$ -value égale à 0,9575, l'étude conduite sur le Maureillas une  $p$ -value égale à 0,3749 et l'étude menée dans le bassin Adour-Garonne a montré une  $p$ -value égale à 0,7137. Ces observations sont

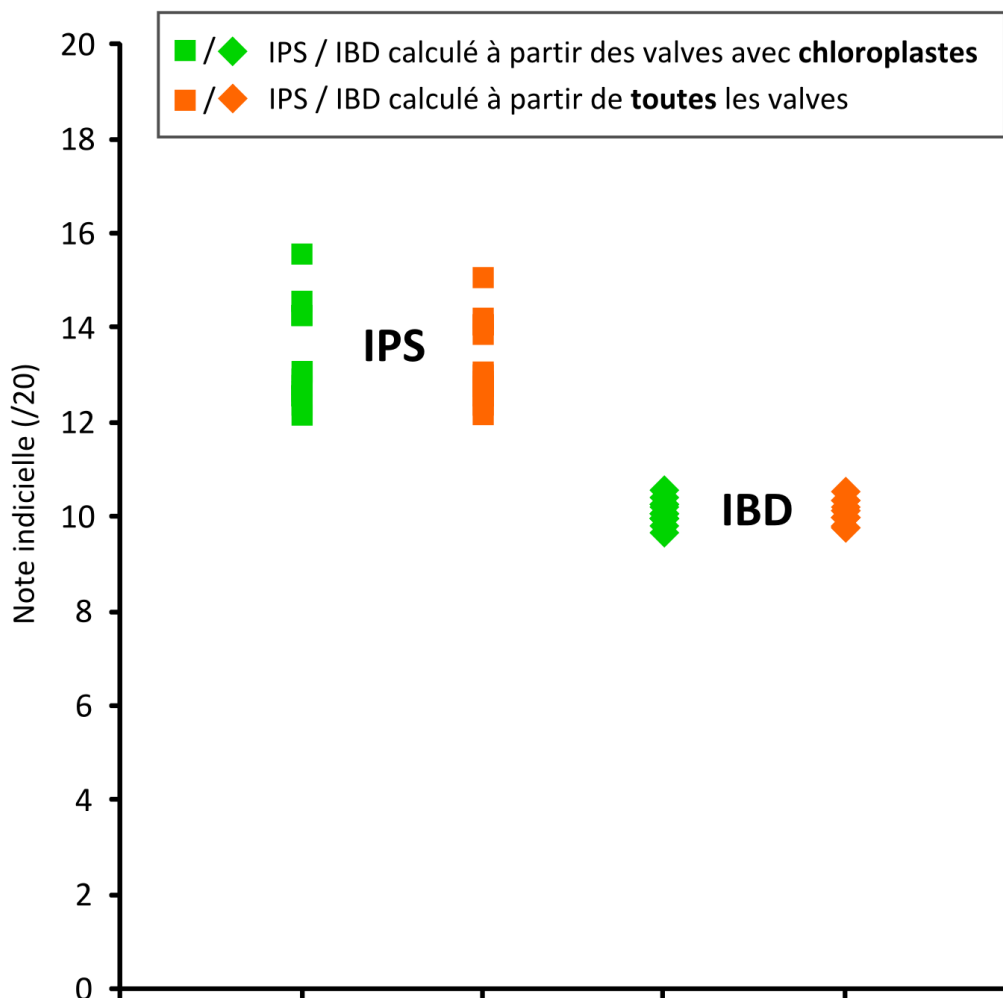


Figure 37 : Ensemble des notes indicielles IPS et IBD obtenues au cours de l'expérience en mésocosme (Chapitre II).

Tableau 8 : Notes indicielles calculées pour les rivières ayant subi un assèchement (Adour-Garonne) et classes de qualité associées en fonction des HER (9 et 14), voir figure 2. Notes en rouge : prélèvement sur substrats asséchés.

Cours d'eau	Station	Camp1	Camp2	Camp3	Camp4
NE	Ars	19,3	18	20	17,9
NE	Pont Brac	18,3	20	18,6	13,7
ANQUEVILLE	Natrie	19,2	18,4	12,5	17,3
ARGENT	Vieux-Cérier	20	20	19	18
SEUGNE	La Vallade	14,3	14,8	15,2	13,8
TARDOIRE	Côtes de la Boissière	18,7	17,3	17,6	14,5

confirmées par d'autres études qui démontrent que le comptage sur valves traitées, sans distinction des valves pourvues de chloroplastes, donne des données fiables et exploitables pour la bioévaluation des cours d'eau (Stevenson and Pan, 1999; Gillett *et al.*, 2009; Gillett *et al.*, 2011). En effet, les prélèvements sont effectués préférentiellement sur des pierres en zones de radiers pour la plupart des protocoles, évitant ainsi le dépôt important de valves mortes conduisant à une surestimation de certains taxons dans les comptages. De plus, les diatomées mortes présentes dans les échantillons sont principalement des diatomées résidentes (Peterson, 1987b) et les potentiels apports de diatomées par la dérive sont *a priori* similaires aux communautés en place sur les pierres (Eulin, 1997). Malheureusement, le peu de cours d'eau échantillonnés n'a pas permis d'obtenir davantage de données statistiquement exploitables sur cette étude, à cause de nombreux paramètres influençant les communautés tels que la saisonnalité (Stevenson *et al.*, 1991). Malgré cela, elle confirme que les diatomées pouvaient être présentes et prélevables même après plusieurs semaines d'assèchement.

**• Quelles conséquences l'assèchement a-t-il sur les méthodes de comptage et sur les notes indicielles calculées ?**

La pertinence des notes indicielles de biofilms asséchés a été testée lors de l'expérience en mésocosme (Figure 37) à titre informatif étant donné les conditions particulières de l'expérience (biofilm isolé, faible diversité, faibles perturbations extérieures, environnement artificiel). La similarité entre les deux inventaires a également été testée dans cette expérience et s'est révélée positive ( $p$  (IBD) = 0,5061 ;  $p$  (IPS) = 0,7606), ce qui confirme les observations déjà faites auparavant. On remarque une forte stabilité des notes au cours de l'expérience quel que soit le traitement subi par les biofilms (IBD : 10,07 ( $\pm$  0,03) / 20 et IPS : 13,23 ( $\pm$  0,15) / 20). Néanmoins, une importante différence entre l'IPS et l'IBD est observée. Celle-ci s'explique par la composition du biofilm. Vingt taxons ont été dénombrés au total mais quatre espèces ont dominé les autres espèces du biofilm au cours des deux mois et demi d'expérience : *Achnanthydium exiguum*, *Achnanthydium minutissimum sensu lato*, *Germainiella* sp. et *Eolimna minima*. *Germainiella* sp. étant une nouvelle espèce (elle fera l'objet d'une description prochainement), elle n'est pas incluse dans le calcul de la note IBD.

Lors de l'expérience conduite sur le terrain (Maureillas), les deux inventaires créés pour chaque échantillon (regroupant toutes les valves ou seulement les valves avec chloroplastes) ont permis de simuler des notes indicielles pour l'IBD et l'IPS. La moyenne des notes IBD, d'une part, et IPS, d'autre part, calculées sur la totalité de l'expérience se sont révélées similaires quelle que soit la méthode de comptage utilisée ( $p$  (IBD) = 0,7956 ;  $p$  (IPS) = 0,8056). La différence de notes (valeurs absolues), entre les communautés contrôles (pas d'assèchement) et les communautés asséchées, n'a pas montré de différence

significative puisqu'elle a atteint un maximum de 0,6 point pour l'IPS et 0,9 point pour l'IBD, après 4 semaines d'assèchement (Figure 33). Ces observations sont encourageantes pour l'adaptation de l'indice, puisqu'elles montrent que les différences observées dans la structure des communautés n'ont pas d'impact significatif sur les notes indicielles obtenues (voir Chapitre III, Figure 30). De plus, aucun taxon n'a posé de problème particulier d'identification, ce qui appuie le fait que les communautés rencontrées sur des galets asséchés sont similaires à celles rencontrées habituellement en rivière. Cependant, cette expérience a été conduite dans une rivière de qualité biologique « moyenne » (note IBD =  $11,01/20 \pm 0,33$ ) dont les taxons dominants se sont révélés être très tolérants, ce qui pourrait expliquer la robustesse de nos résultats. Le choix de la station avait été guidé par les nombreux galets présents sur la station et nécessaires pour le protocole expérimental lourd que nous avons appliqué. Il serait donc intéressant de conduire une expérience de terrain similaire sur une rivière de « bonne » à « très bonne » qualité, avec des taxons sensibles et à valeur indicatrice forte.

Les notes indicielles (IBD) ont également été calculées dans le cadre des expériences menées en Adour-Garonne, où les deux méthodes de comptage étaient significativement similaires (exemple : Seugne,  $p$  (IBD) = 0,7976 et Anqueville,  $p$  (IBD) = 0,6615). Etant donné le faible nombre de stations prospectées lors de l'étude menée en Adour-Garonne, il est difficile de généraliser nos résultats. Cependant, au regard des notes obtenues sur les expérimentations (Tableau 8), on observe des écarts inférieurs à 2 points pour la majorité des stations (excepté pour l'Anqueville), qui n'entraîne pas de changement de classe de qualité dans la majorité des cas. La quatrième campagne a été réalisée en février lors de la remise en eau, dans des conditions environnementales très différentes, notamment en termes de débits et de température du fait de la saisonnalité, d'où l'obtention de notes indicielles très différentes. Dans l'ensemble, les notes restent cohérentes sur les 3 campagnes entourant les périodes d'assèchement. Les faibles changements de notes pouvant modifier la classe de qualité, comme sur la Seugne, il convient de nuancer ces changements par des variations de notes très faibles. La différence de notes observée sur la campagne 3 au niveau de l'Anqueville s'explique par une différence liée à la faible proportion d'*Achnanthydium minutissimum sensu lato* comparé aux 2 campagnes précédentes où cette espèce dominait (profil de l'espèce *sensu stricto* prise en compte pour le calcul de l'IBD, témoignant d'une sensibilité à la qualité de l'eau).

### **3. Adaptation des indices utilisés en France sur les cours d'eau asséchés**

Comme évoqué précédemment, les indices standardisés permettent le prélèvement de diatomées dans les cours d'eau non permanents sous certaines conditions. Dans le bassin méditerranéen, les cours d'eau non permanents sont suivis dès lors qu'ils sont en eau au

moins 3 mois dans l'année, en respectant un délai d'un mois de stabilité hydrologique avant le prélèvement. En Californie, des recherches sont en cours afin d'intégrer les cours d'eau non permanents, particulièrement ceux ayant de très courtes périodes d'écoulement (Dallas, 2013).

En France, les périodes d'échantillonnage en routine sont réalisés en été, et chaque année les gestionnaires sont confrontés à des données manquantes pour cause d'assèchements des lits des cours d'eau, eux-mêmes liés aux conditions climatiques de l'année et aux pressions anthropiques. Ces problèmes peuvent être contournés par des ajustements des protocoles, tels que des prélèvements précoces dans la saison. A l'heure actuelle en France, deux indices sont couramment utilisés, l'IBD (Coste et al., 2009) et l'IPS (CEMAGREF, 1982) pour évaluer la qualité biologique de l'eau par les diatomées. Le logiciel OMNIDIA® (Lecoite et al., 1993) est un outil largement privilégié pour la gestion des inventaires et le calcul des indices, dont la base de données regroupant les différents taxons est mise à jour régulièrement. Néanmoins, savoir si la réalisation de prélèvements dans un lit asséché est possible et donne des résultats fiables est une réelle nécessité.

Les expériences réalisées dans le cadre de cette thèse ont montré que le prélèvement sur des pierres asséchées depuis plusieurs semaines (jusqu'à 4 en milieu naturel et 8 en laboratoire) était tout à fait analysable. Ces résultats laissent aisément entrevoir la possibilité de suivre des cours d'eau soumis à des assèchements d'une durée supérieure. D'autre part, nous avons vu que la prise en compte des valves vivantes (ayant des chloroplastes) ou de la totalité des valves (comme dans les protocoles actuels) donnait des résultats similaires. Ainsi, un comptage classique tel que réalisé dans le protocole IBD (AFNOR, 2007a) est tout à fait concevable à partir d'un prélèvement réalisé sur des pierres asséchées et n'inclut pas davantage de biais que les méthodes utilisées actuellement.

De même pour *Achnanthydium minutissimum* qui n'est pas la forme *sensu stricto* (ADMI), elle a donc été encodée dans le logiciel par son genre *Achnanthydium* (ACHD). En raison de la dominance de ces taxons non pris en compte dans le calcul de la note, l'IBD est parfois calculé sur un nombre très restreint de valves. Par exemple, sur un échantillon « contrôle » de l'inventaire où la totalité des valves était pris en compte, seules 77 sur 415 rentraient dans le calcul de l'IBD. L'IPS est connu pour prendre en compte la totalité des taxons en leur attribuant une note de sensibilité (ADMI : 5 ; ACHD : 4,5) et une valeur indicatrice (ADMI : 1 ; ACHD : 2,1), ce qui peut alors expliquer cette différence de plus de 3 points entre les 2 indices. En effet, ADMI est encodé en tant que taxon indicateur et très sensible. Les communautés de diatomées sont généralement plus diversifiées dans le milieu naturel, cependant ces problèmes de taxonomie sont également rencontrés. De nombreuses espèces font partie de « complexes d'espèces » correspondant au *sensu lato* et il est parfois

difficile de les associer au profil de l'espèce *sensu stricto*, sans accès au microscope électronique à balayage et/ou à de la bibliographie très spécialisée. Ces morphotypes étendus sont difficiles à discernés en microscopie optique et la base de données d'OMNIDIA n'offre pas de possibilité d'encoder ces taxons dans des « complexes » aux préférences écologiques plus larges que celles décrites pour les taxons *sensu stricto*. Une fois de plus, les outils biomoléculaires devraient prouver leur utilité en définissant les limites entre les espèces de diatomées (e.g. Evans *et al.*, 2008; Trobajo *et al.*, 2009).

## IV. Conclusion

La bioévaluation de la qualité des cours d'eau est en plein essor dans le monde entier, où les pays les plus avancés améliorent leurs techniques et cherchent à harmoniser leur système d'évaluation (Europe et Etats-Unis) alors que d'autres pays commencent tout juste à développer leur propre système d'évaluation, en s'inspirant des techniques déjà développées. Les diatomées sont des éléments de qualité biologique qui ont déjà largement fait leurs preuves, même si les techniques qui en découlent ne sont pas parfaites, du fait de nombreuses incertitudes (Hering *et al.*, 2010). Cependant, il y a une réelle volonté d'améliorer les défauts des outils ou de trouver des solutions différentes pour les corriger, d'où un fort intérêt pour les approches biomoléculaires.

Les cours d'eau des régions à climat méditerranéen sont les premiers concernés par la non-permanence des cours d'eau. Le contexte du changement climatique associé à d'importantes pressions anthropiques les place au centre des préoccupations car ils sont les premiers à en subir les conséquences (Sabater, 2008; Dallas, 2013). De plus, l'assèchement de cours d'eau de plus en plus importants dans le temps et l'espace posent de sérieuses questions quant à l'impact sur la biodiversité et l'évaluation de la qualité de ces écosystèmes (Steward *et al.*, 2012). Ainsi, de plus en plus de chercheurs s'intéressent à ces thématiques avec l'apparition de travaux de synthèse sur la bioévaluation des régions méditerranéennes (Dallas, 2013) ou le développement d'indices pour évaluer spécifiquement ces écosystèmes (Delgado *et al.*, 2012). La nécessité de prendre en compte ce type de cours dans les politiques de gestion, notamment en Europe, a récemment été clairement énoncée (Nikolaidis *et al.*, 2013). Le projet européen MIRAGE (Mediterranean Intermittent River ManAGEment) propose l'addition de 4 nouveaux articles dans la DCE, permettant de définir et d'intégrer les cours d'eau non permanents de façon spécifique (Prat *et al.*, 2014). Ces articles précisent le degré de permanence des cours d'eau (Article 2 point 4), les objectifs environnementaux et les dérogations associées (Article 4), le caractère des bassins versants (Article 5) et les programmes de mesures associés (Article 11). Ce travail se poursuit en Espagne à travers la mise en place d'un programme européen LIFE TRIVERS (2014-2019)

visant à développer des outils permettant l'évaluation du statut écologique des cours d'eau non permanents, notamment par la création d'un logiciel nommé « TREHS » (<http://www.ub.edu/fem/docs/TRIVERS/LIFE%20TRIVERS%20summary.pdf>).

A travers nos études, nous avons pu identifier certaines difficultés dans l'application du protocole IBD en France. En effet, les cours d'eau non permanents sont suivis dès lors que leur lit est en eau depuis au moins un mois, cependant, les cours d'eau dont le lit est asséché ne peuvent être prélevés, ce qui bouleverse fréquemment les campagnes d'échantillonnage. Les résultats de nos études mettent cependant en avant de bonnes perspectives pour l'application du protocole IBD dans ces situations. Il serait néanmoins nécessaire de conduire une étude à une plus grande échelle, comme par exemple dans la région Languedoc-Roussillon où un Atlas des diatomées de la région (<http://diatomee.dreal-languedoc-roussillon.fr/index.php>) est déjà constitué et serait très utile pour établir les inventaires des cours d'eau au lit asséché. Ainsi, nous aurions des données statistiquement robustes pour établir des conclusions et nous pourrions les comparer aux données en eau accumulées par les Agences de l'Eau ou les DREAL depuis plusieurs années. L'application du protocole dans les rivières asséchées devra également faire l'objet d'une standardisation.





# CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES



Dans un contexte de changement climatique global associé à des pressions anthropiques toujours plus fortes, les cours d'eau non permanents, très nombreux et longtemps négligés, deviennent une thématique centrale pour l'évaluation et la protection de la biodiversité. Malheureusement, la méconnaissance de ces milieux rend difficile leur intégration dans les politiques en place, il est donc primordial d'accroître nos connaissances dans ce domaine afin de prendre des mesures de gestion adaptées. C'est dans cette optique que s'inscrit ce travail de thèse, où nous avons tenté de comprendre les dynamiques des biofilms phototrophes et plus particulièrement des communautés de diatomées à travers des expérimentations en laboratoire et dans le milieu naturel, pendant et après un épisode d'assèchement. En parallèle de ce travail, nous avons testé le protocole IBD utilisé en routine en France sur des cours d'eau au lit asséché afin de réfléchir à son adaptation éventuelle aux situations d'assèchement.

## **I. Synthèse des résultats**

### **1. L'assèchement et ses conséquences sur les biofilms phototrophes**

#### **a. Stress rencontrés et stratégies de survie**

La bibliographie étant très éparse à ce sujet, notre premier travail a été de réaliser un état de l'art sur les différentes stratégies mises en place par les microalgues pour survivre au stress de dessiccation, dans les milieux dulçaquicoles comme dans les zones intertidales. L'assèchement induit différents stress pour les biofilms phototrophes, en particulier des stress de dessiccation, souvent associés à d'autres stress tels que des modifications de la température et de la lumière, une augmentation de la salinité (stress osmotique), une pression de broutage plus forte ou encore une concentration des polluants dans les zones lenticules. Les biofilms phototrophes sont soumis à une forte rythmicité spatiale (zone de balancement des marées, fragmentation des cours d'eau) et temporelle (quelques heures à quelques années) dans leur environnement. De plus, les données recueillies dans la littérature ont montré que l'association de ces différents stress, pouvant avoir des effets ou des conséquences sur l'environnement, avait un effet cumulatif sur les biofilms phototrophes (Chapitre I).

Dans les cours d'eau, l'assèchement se traduit par une baisse du niveau d'eau conduisant à une émergence des rives et un courant plus faible. S'il se poursuit, il conduit à une rupture d'écoulement (processus de « lentification » décrit par Sabater (2008)) et une fragmentation du milieu jusqu'à atteindre un assèchement total du lit. Les biofilms, fixés, n'ont alors aucun moyen d'éviter ce stress d'émergence et ont dû développer des stratégies pour survivre.

Les stratégies de résistance mises en place par les microorganismes phototrophes peuvent être communes malgré des situations d'assèchement différentes. En effet, les microorganismes phototrophes montrent des ajustements physiologiques tels qu'une activité métabolique réduite, la constitution de réserves lipidiques plus importantes ou encore l'épaississement des parois cellulaires auxquels s'ajoute la formation de formes de résistance. Cependant, ces stratégies peuvent également être plus spécifiques d'un milieu donné comme par exemple dans les zones de balancement des marées où les microalgues migrent verticalement dans les premiers millimètres des substrats sableux durant la période d'émersion afin de maximiser la photosynthèse tout en minimisant les dommages causés par la lumière (Chapitre I).

### **b. Effets de l'assèchement et conséquences pour la recroissance**

Pour mieux comprendre les effets d'un épisode d'assèchement sur les communautés benthiques, nous avons conduit différentes expérimentations : en conditions contrôlées en laboratoire sur le biofilm (Chapitre II) et en conditions naturelles *in situ* sur les communautés de diatomées (Chapitre III). L'expérience de laboratoire (microcosme et mésocosme) a permis une étude des compartiments phototrophe et hétérotrophe du biofilm.

#### **• Impact de la contrainte d'assèchement**

Nos expériences ont montré que l'assèchement avait un effet fort et durable sur les communautés phototrophes, même pour des assèchements courts. En laboratoire, la structure du compartiment algal a été complètement modifiée, avec une transition de dominance des cyanobactéries vers les diatomées, que l'assèchement soit progressif (microcosme) ou brutal (mésocosme). L'expérience menée sur le terrain (rivière Maureillas) a montré des modifications dans la structure des communautés de diatomées : les communautés qui ont été asséchées étaient similaires à celles qui ont recolonisé des substrats vierges mais différentes des communautés contrôles. Ces modifications de structure se sont maintenues dans le temps malgré la stabilisation de la cinétique d'évolution du nombre de taxons des communautés nouvellement installées.

L'assèchement a également eu un impact fort sur le compartiment hétérotrophe :

- La structure des communautés procaryotes (ARISA) était similaire entre les conditions initiales et les conditions de remise en eau après assèchement, malgré une composition différente.
- La potentielle diversité fonctionnelle (Biolog) entre les conditions initiales et celles de la fin de la remise en eau étaient similaires alors qu'elles différaient de celles de la fin de l'assèchement. Les communautés bactériennes ont démontré leur importante plasticité face

aux changements des conditions du milieu en dégradant des molécules plus complexes (polymères) lors de la phase d'assèchement.

#### • **Impact de la durée d'assèchement**

Lors de l'expérience de laboratoire, la durée de l'assèchement a eu une importance notable puisque la recroissance des biofilms principalement due aux diatomées, était supérieure pour des assèchements de longue durée (biomasse et activité photosynthétique). Les hypothèses pouvant expliquer ce phénomène reposent :

- sur des effets d'inhibition de croissance des cyanobactéries sur les diatomées (notion d'allélopathie) qui ont cessé lors de la phase d'assèchement, défavorable aux cyanobactéries ;
- sur une sélection d'individus résistants, une pression de sélection plus forte permettant une recroissance plus efficace du fait de la diminution de la compétition pour les ressources.

Lors de l'expérience de terrain, les résultats étaient similaires selon la durée de l'assèchement sur les communautés de diatomées, sauf pour l'assèchement de 4 semaines où toutes les communautés différaient. Cette différence peut facilement s'expliquer par l'évolution naturelle des communautés contrôles qui ont recolonisé les substrats vierges tandis que l'évolution des communautés asséchées a été « interrompue ».

La durée de l'assèchement n'a cependant pas eu d'impact sur les taux de mortalité de diatomées puisqu'ils étaient constants quelle que soit la durée de l'assèchement, contrairement à ce qui a été observé lors de l'expérience en laboratoire (augmentation croissante avec la durée de l'assèchement). Après avoir écarté un éventuel impact du fixateur sur le taux de mortalité, nous avons émis différentes hypothèses : l'érosion des biofilms par le vent ou le passage d'animaux, retirant les valves mortes adhérant faiblement aux substrats, l'humidité relative moyenne favorisant la survie des diatomées et d'autres stratégies, décrites dans le chapitre I, telles que la sécrétion de mucilage maintenant une certaine humidité au sein du biofilm.

#### • **Notion de refuge**

Nous avons évoqué dans le chapitre I la possibilité pour les microalgues benthiques des zones de balancement des marées de migrer au sein du substrat au cours des périodes d'émersion afin d'optimiser leur survie. Elles trouvent ainsi « refuge » dans le substrat au cours des périodes d'émersion. Cette notion a été étudiée par Robson *et al.* (2008) dans les cours d'eau où les principaux refuges identifiés étaient l'eau résiduelle des flaques et le biofilm sec dont les mécanismes de recolonisation associés étaient la dérive algale et la recroissance à partir du biofilm sec. L'expérience de terrain (rivière Maureillas) a permis

d'étudier ces deux mécanismes par l'intermédiaire de communautés asséchées (dérive et recroissance) et de communautés nouvellement installées (dérive uniquement). La similarité observée entre ces deux communautés laisse penser que la dérive est un mécanisme essentiel pour la recolonisation des substrats après l'assèchement. Cependant, l'expérience menée en laboratoire sur la recolonisation basée uniquement sur la recroissance à partir du biofilm sec a montré que les processus de recolonisation pouvaient s'opérer à partir des communautés asséchées uniquement.

• **Notion de résilience**

Les différentes expériences que nous avons menées ont démontré la résilience fonctionnelle des communautés, puisqu'à chaque fois qu'elles ont été asséchées, les communautés ont retrouvé leurs fonctions (activité photosynthétique, croissance) dès lors que la contrainte était levée. De plus, cette résilience fonctionnelle a eu lieu quelle que soit la durée de l'assèchement testée, tant sur le compartiment phototrophe qu'hétérotrophe.

Cependant, comme nous venons de le voir, la structure des communautés a été affectée par l'assèchement pour les deux expérimentations conduites. Cette modification de structure s'est opérée même après de très courtes durées d'assèchement, et a été très, profonde lors de l'expérimentation en laboratoire sur le compartiment phototrophe (transition algale). Nous n'avons donc pas observé de résilience structurelle alors que la résilience fonctionnelle a été démontrée.

Ces résultats ont donc mise en évidence l'existence d'une redondance fonctionnelle pour les assèchements de longue durée, où les fonctions similaires retrouvées par les communautés lors de la disparition de la contrainte d'assèchement ont été assurées par des espèces différentes à celles composant la communauté initiale (compartiment phototrophe et hétérotrophe confondus).

Au sens de Holling (1996), les fortes pressions d'assèchement (longue durée) ont contraint les communautés à trouver un nouvel état d'équilibre, différent des conditions initiales (« résilience écologique »). A l'opposé, les faibles contraintes d'assèchement (courte durée) ont mis en évidence la plasticité des individus et leur capacité à résister à la contrainte pour revenir à l'état initial une fois que celle-ci était levée (« engineering resilience »). Ainsi, nous avons montré que les communautés sont capables de supporter une contrainte dans une certaine limite qui, une fois franchie, entraîne une réorganisation profonde des communautés. Ce sont donc les propriétés des espèces composant les biofilms benthiques qui conduisent leurs réponses face aux contraintes (résistance, compétition intra et interspécifique, capacité de recroissance).

## **2. L'assèchement et la bioindication**

### **a. Généralités**

La bioindication est aujourd'hui un élément fondamental pour l'évaluation de la qualité des cours d'eau dans le monde. Les diatomées ont largement fait leurs preuves en tant que bioindicateurs du fait de leur sensibilité à l'eutrophisation, l'acidification, la saprobie, la salinité et le courant. En témoignent les nombreux indices développés en fonction des impacts étudiés.

L'étude des concepts généraux développés à travers le monde a montré une certaine homogénéité. En effet, l'objectif est l'évaluation de la « Qualité environnementale » des milieux, par une comparaison des sites testés par rapport à un « état de référence » dont la définition peut être très variable selon les régions étudiées, d'où la définition de « régions » spécifiques, basées sur des critères abiotiques. Malgré cette généralisation des concepts et une volonté de poser un cadre pour la bioévaluation des cours d'eau, l'interprétation des textes par les différents acteurs a entraîné le développement de méthodes variées dont les résultats sont parfois difficilement comparables. Aujourd'hui, une réelle volonté d'harmonisation des méthodes se dessine, mettant à jour les différents problèmes induits par les systèmes de bioévaluation en place.

A travers la synthèse des principaux protocoles utilisés dans le monde, nous avons pu discuter des différentes phases des protocoles, de l'échantillonnage à l'analyse des échantillons en passant par la préparation des lames permanentes. Ainsi, toute la difficulté est de trouver le meilleur compromis entre la fiabilité des données obtenues et leur coût. Les retours d'expérience disponibles dans la littérature sont très utiles pour le définir. Par exemple, un nombre de valves comptées compris entre 200 et 400 valves serait suffisant et un comptage aléatoire plutôt que par transect éviterait une surestimation de la densité des taxons liés à l'« effet de bord ». De même, la complexité de la taxonomie basée essentiellement sur des critères morphologiques, ainsi que son évolution rapide sont au cœur des débats actuels où l'approche moléculaire semble devenir le socle de la taxonomie future (Chapitre IV).

### **b. L'évaluation des cours d'eau asséchés**

Les cours d'eau non permanents sont aujourd'hui pris en compte dans les protocoles d'échantillonnage, dès lors qu'ils sont en eau depuis quelques semaines. Malheureusement, dès que leur lit est asséché, les protocoles ne sont plus applicables, ce qui pose de réels problèmes aux gestionnaires qui ne peuvent plus assurer les suivis, et sont très dépendants des conditions climatiques. Or, les frustules de diatomées persistent dans le milieu même

après plusieurs semaines et leur prélèvement n'a posé aucun problème, comme nous l'avons montré dans nos différentes expériences. L'expérience menée en Adour-Garonne a démontré que le protocole IBD était valable pour l'échantillonnage et la fabrication de lames permanentes, moyennant quelques adaptations mineures. L'expérience menée sur la rivière Maureillas a montré qu'un assèchement pouvait avoir un impact sur l'histoire du biofilm. Or, un opérateur arrivant sur une station est dans l'incapacité de savoir quelle partie du cours d'eau était, ou non, en eau dans les jours précédant sa venue. La nécessité de sélectionner des substrats dans différents secteurs du cours d'eau prend donc toute son importance étant donné l'hétérogénéité que ce phénomène peut induire.

Les méthodes de comptage ont également été testées. En effet, l'assèchement induit théoriquement une mortalité des individus pouvant entraîner une surestimation des taxons de diatomées mortes. En testant un comptage différentiel (méthode classique *versus* comptage sur échantillons non traités) et en nous basant sur des données issues de la littérature, nous avons mis en évidence la similarité des données obtenues entre les deux méthodes. Il semble donc tout à fait possible d'appliquer les méthodes de comptages classiques, ce qui est très positif étant donné la baisse de précision induite par les comptages sur échantillons non traités.

Nous avons également testé l'obtention des notes indicielles par ce comptage différentiel et nous avons montré que les espèces inventoriées étaient déjà identifiées dans les bases de données et n'induisaient pas davantage de biais que celles couramment observées. Ainsi, les milieux acides sont en général caractérisés par une plus forte proportion d'espèces acidophiles du genre *Eunotia*, les milieux lenticules sont généralement riches en espèces du genre *Fragilaria* et les milieux asséchés sont *a priori* riches en espèces plus aérophiles telles que *Planothidium lanceolatum* ou *Nitzschia amphibia*, rencontrées en abondance dans nos échantillons. Nous avons également montré que les notes indicielles obtenues sur les communautés non asséchées et les communautés asséchées n'étaient pas significativement différentes dans des milieux impactés.

## II. Perspectives

Malgré les nombreuses études menées concernant les stratégies de résistance face au stress d'assèchement chez les poissons ou les macroinvertébrés, le biofilm phototrophe a été souvent négligé, malgré son importante utilisation dans l'évaluation de la qualité des cours d'eau.

Ce travail de thèse, en plus de faire un point sur les données bibliographiques liées à la survie des biofilms face au stress d'assèchement et sur son implication dans la bioindication, a apporté des données très intéressantes sur la survie du biofilm face à des contraintes



d'assèchement d'amplitude variable. Les communautés des écosystèmes étant très variables, il est nécessaire de poursuivre ce travail sur d'autres communautés, en intégrant notamment d'autres éléments du réseau trophique. En effet, comme vu précédemment, les organismes sont concentrés dans des espaces réduits lors de la fragmentation du milieu, entraînant de ce fait une intensification des interactions (pression de broutage plus forte par exemple). Il serait donc intéressant de conduire des expériences basées sur ces interactions, tout en mesurant l'impact qu'elles pourraient avoir sur la bioindication.

Notre expérience conduite sur la rivière Maureillas a été réalisée sur des communautés tolérantes aux milieux impactés, conduisant à des indices subissant de faibles variations. L'histoire des biofilms semble importante pour les communautés, il serait donc intéressant de conduire une expérience similaire sur l'effet de l'assèchement en incluant une translocation des pierres vers une rivière hébergeant des taxons plus sensibles. Ce type d'expérimentation de translocation a déjà été conduit sur les diatomées (e.g. Rimet *et al.*, 2009; Lacoursiere *et al.*, 2011). Ainsi, on pourrait tester une phase d'assèchement sur des biofilms tolérants, suivie d'une remise en eau dans un milieu impacté et dans un milieu de bonne qualité, et inversement avec des biofilms sensibles. Cette expérience permettrait de définir l'impact de l'assèchement sur des communautés aux profils écologiques plus larges, de mieux comprendre les processus de recolonisation et de mesurer les impacts de l'assèchement sur les notes indicielles.

Au-delà de cet aspect expérimental, le travail que nous avons conduit ici ouvre de vraies perspectives sur l'application du protocole IBD sur le lit de rivières asséchées. Ainsi, une étude de terrain plus large permettrait de valider le protocole que nous avons testé et éventuellement de mettre en évidence des problèmes particuliers que nous n'avons pas eus l'occasion de rencontrer, tels que la présence de valves trop dégradées ou leur absence des échantillons. Dans cet esprit, nous avons déjà effectué le prélèvement de quelques dizaines d'échantillons en région Languedoc-Roussillon (Pyrénées-Orientales, Aude et Hérault) où les phases de prélèvements n'ont pas posé de problèmes particuliers. Le traitement et l'analyse de ces échantillons seraient la prochaine étape. De plus, l'existence d'un inventaire taxonomique disponible dans cette région, ainsi que de nombreuses données disponibles sur les cours d'eau prélevés en eau sera un plus pour l'analyse des échantillons. Ce travail pourra donc conduire, avec l'appui des gestionnaires, à l'adaptation prochaine du protocole IBD normé (AFNOR, 2007a), après avoir été validé sur des données à plus grande échelle. De plus, cette étude ouvre des perspectives pour les régions méditerranéennes soumises à de fortes pressions d'assèchement (Espagne, Grèce, etc.) où cette nouvelle version de l'indice pourrait être testée.

Ce travail s'inscrit dans un cadre plus général concernant l'amélioration de la bioindication par les diatomées. La phylogénie, basée actuellement principalement sur des critères morphologiques a montré ses limites du fait de la grande plasticité phénotypique des diatomées en fonction de leur milieu. Ainsi, les techniques de biologie moléculaire risquent de modifier profondément cette phylogénie, où chaque nouvelle espèce devra avoir sa propre « identité moléculaire » (séquence ADN de référence) pour être définie comme telle (De Clerck *et al.*, 2013). A l'heure actuelle, on évoque même la possibilité de ne plus définir les espèces par leur nom latin mais par des références à des séquences moléculaires qui pourront être à la base de la bioindication dans les années à venir, même si le travail restant à faire est encore considérable (Kermarrec, 2012). L'idée de l'utilisation exclusive des approches moléculaires fait également l'objet de critiques (chantier lourd et coûteux et informations pas nécessairement plus pertinentes) (Gassiole, 2014). La solution pourrait alors être de combiner l'approche morphologique en cadrant la description de nouvelles espèces et en validant les espèces déjà décrites par l'intermédiaire d'un séquençage ADN. Cependant, la question de l'évaluation des cours d'eau asséchés par les approches biomoléculaires se pose. En effet, la qualité de l'ADN de diatomées prélevées sur substrats asséchés peut être fortement altérée par des conditions environnementales très variables, ce qui pourrait fortement biaiser l'analyse des échantillons et donc leur pertinence pour la bioévaluation. Ces questions ouvrent des perspectives d'études intéressantes combinant les biofilms asséchés et l'évaluation des cours par des approches biomoléculaires.

# REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abe S, Kurashima A, Yokohama Y, Tanaka J. 2001. The cellular ability of desiccation tolerance in Japanese intertidal seaweeds. *Botanica Marina* **44**: 125-131. 10.1515/bot.2001.017.
- Abed RMM, Kohls K, de Beer D. 2007. Effect of salinity changes on the bacterial diversity, photosynthesis and oxygen consumption of cyanobacterial mats from an intertidal flat of the Arabian Gulf. *Environmental Microbiology* **9**: 1384-1392. 10.1111/j.1462-2920.2007.01254.x.
- Ács É, Szabó K, Tóth B, Kiss KT. 2004. Investigation of benthic algal communities, especially diatoms of some Hungarian streams in connection with reference conditions of the water framework directives. *Acta Botanica Hungarica* **46**: 255-278. 10.1556/ABot.46.2004.3-4.1.
- Acuña V, Muñoz I, Giorgi A, Omella M, Sabater F, Sabater S. 2005. Drought and postdrought recovery cycles in an intermittent Mediterranean stream: structural and functional aspects. *Journal of North American Benthological Society* **24**: 919-933. 10.1899/04-078.1.
- Adams GL, Pichler DE, Cox EJ, O'Gorman EJ, Seeney A, Woodward G, Reuman DC. 2013. Diatoms can be an important exception to temperature-size rules at species and community levels of organization. *Global Change Biology* **19**: 3540-3552. 10.1111/gcb.12285.
- Adl SM, Simpson AGB, Farmer MA, Andersen RA, Anderson OR, Barta JR, Bowser SS, Brugerolle G, Fensome RA, Fredericq S, James TY, Karpov S, Kugrens P, Krug J *et al.* 2005. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **52**: 399-451. 10.1111/j.1550-7408.2005.00053.x.
- AFNOR. 2000. NF T90-354: Qualité de l'eau — Détermination de l'Indice Biologique Diatomées (IBD). AFNOR.
- AFNOR. 2007a. NF T90-354: Qualité de l'eau — Détermination de l'Indice Biologique Diatomées (IBD). AFNOR.
- AFNOR. 2007b. NF T90-354: Water quality — Determination of the Diatom Biological Index (DBI). AFNOR.
- Agence de l'Eau Loire-Bretagne. 2006. Le prélèvement d'échantillons en rivière - Techniques d'échantillonnage en vue d'analyses physico-chimiques. in *La mesure de débit*, p. 132. Agence de l'Eau Loire-Bretagne, Orléans.

- Agrawal SC. 2009. Factors affecting spore germination in algae - review. *Folia Microbiologica* **54**: 273-302. 10.1007/s12223-009-0047-0.
- Agrawal SC. 2012. Factors controlling induction of reproduction in algae—review: the text. *Folia Microbiologica* **57**: 387-407. 10.1007/s12223-012-0147-0.
- Agrawal SC, Gupta S. 2012. Survival and reproduction of some aquatic green algae facing various stress conditions. *Journal of Algal Biomass Utilization* **3**: 20-26.
- Agrawal SC, Pal U. 2003. Viability of dried vegetative cells or filaments, survivability and/or reproduction under water and light stress, and following heat and UV exposure in some blue-green and green algae. *Folia Microbiologica* **48**: 501-509. 10.1007/bf02931332.
- Alabaster J, Lloyd R. 1978. Water Quality Criteria for Freshwater Fish. Butterworths Scientific, London.
- Algarte VM, Rodrigues L. 2013. How periphytic algae respond to short-term emersion in a subtropical floodplain in Brazil. *Phycologia* **52**: 557-564. 10.2116/12-112.1.
- Ali GH, Abd El-Salam NF. 1999. Factors controlling bioindicators for industrial pollution detection. *Biomedical and Environmental Sciences* **12**: 194-200.
- Allison SD, Martiny JBH. 2008. Resistance, resilience, and redundancy in microbial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 11512-11519. 10.1073/pnas.0801925105.
- Almeida SFP, Feio MJ. 2012. DIATMOD: diatom predictive model for quality assessment of Portuguese running waters. *Hydrobiologia* **695**: 185-197. 10.1007/s10750-012-1110-4.
- Alpert P. 2000. The discovery, scope, and puzzle of desiccation tolerance in plants. *Plant Ecology* **151**: 5-17. 10.1023/a:1026513800380.
- Alpert P. 2005. The limits and frontiers of desiccation-tolerant life. *Integrative and Comparative Biology* **45**: 685-695. 10.1093/icb/45.5.685.
- Alvarez-Blanco I, Blanco S, Cejudo-Figueiras C, Becares E. 2013. The Duero Diatom Index (DDI) for river water quality assessment in NW Spain: design and validation. *Environmental Monitoring and Assessment* **185**: 969-981. 10.1007/s10661-012-2607-z.
- Alverson AJ, Manoylov KM, Stevenson RJ. 2003. Laboratory sources of error for algal community attributes during sample preparation and counting. *Journal of Applied Phycology* **15**: 357-369. 10.1023/a:1026009724797.
- Amalfitano S, Fazi S, Zoppini A, Caracciolo AB, Grenni P, Puddu A. 2008. Responses of benthic bacteria to experimental drying in sediments from Mediterranean temporary rivers. *Microbial Ecology* **55**: 270-279. 10.1007/s00248-007-9274-6.

- Amin SA, Parker MS, Armbrust EV. 2012. Interactions between Diatoms and Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **76**: 667-684. 10.1128/membr.00007-12.
- Andren C, Jarlman A. 2008. Benthic diatoms as indicators of acidity in streams. *Fundamental and Applied Limnology* **173**: 237-253. 10.1127/1863-9135/2008/0173-0237.
- Angradi TR, Kubly DM. 1993. Effects of atmospheric exposure on chlorophyll a, biomass and productivity of the epilithon of a tailwater river. *Regulated Rivers-Research & Management* **8**: 345-358. 10.1002/rrr.3450080405.
- APHA. 2012. Standard methods for the examination of water and wastewater. American Public Health Association, American Water Works Association, and Water Pollution Control Federation, Washington, D.C.
- Apoya-Horton MD, Yin L, Underwood GJC, Gretz MR. 2006. Movement modalities and responses to environmental changes of the mudflat diatom *Cylindrotheca closterium* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology* **42**: 379-390. 10.1111/j.1529-8817.2006.00194.x.
- Araujo CVM, Romero-Romero S, Lourencato LF, Moreno-Garrido I, Blasco J, Gretz MR, Moreira-Santos M, Ribeiro R. 2013. Going with the Flow: Detection of Drift in Response to Hypo-Saline Stress by the Estuarine Benthic Diatom *Cylindrotheca closterium*. *Plos One* **8**. 10.1371/journal.pone.0081073.
- Argyroudi A, Chatzinikolaou Y, Poirazidis K, Lazaridou M. 2009. Do intermittent and ephemeral Mediterranean rivers belong to the same river type? *Aquatic Ecology* **43**: 465-476. 10.1007/s10452-008-9176-9.
- Artigas J, Fund K, Kirchen S, Morin S, Obst U, Romani AM, Sabater S, Schwartz T. 2012. Patterns of biofilm formation in two streams from different bioclimatic regions: analysis of microbial community structure and metabolism. *Hydrobiologia* **695**: 83-96. 10.1007/s10750-012-1111-3.
- Baho DL, Peter H, Tranvik LJ. 2012. Resistance and resilience of microbial communities - temporal and spatial insurance against perturbations. *Environmental Microbiology* **14**: 2283-2292. 10.1111/j.1462-2920.2012.02754.x.
- Baker NR. 2008. Chlorophyll fluorescence: A probe of photosynthesis in vivo in *Annual Review of Plant Biology*, pp. 89-113.
- Baker PD, Bellifemine D. 2000. Environmental influences on akinete germination of *Anabaena circinalis* and implications for management of cyanobacterial blooms. *Hydrobiologia* **427**: 65-73. 10.1023/a:1003988426561.
- Bambakidis T. 2009. Changes in benthic algal community structure following an unpredictable stream-wide desiccation event. Bowling Green State University, Bowling Green, OH.

- Barange M, Field JG, Harris RP, Hofmann EE, Perry RI, Werner F. 2011. *Marine Ecosystems and Global Change*. Oxford University Press: New York, United-States.
- Barbour MT, Diamond JM, Yoder CO. 1996. Biological assessment strategies: Applications and Limitations in *Whole effluent toxicity testing: An evaluation of methods and prediction of receiving system impacts* (eds. Grothe DR, Dickson KL, Reed-Judkins DK), pp. 245-270. SETAC Press, Pensacola, Florida.
- Barbour MT, Gerritsen J, Snyder BD, Stribling JB. 1999. *Rapid Bioassessment Protocols For Use in Streams and Wadeable Rivers: Periphyton, Benthic Macroinvertebrates, and Fish*: Washington, D.C.
- Barranguet C, Kromkamp J. 2000. Estimating primary production rates from photosynthetic electron transport in estuarine microphytobenthos. *Marine Ecology Progress Series* **204**: 39-52. 10.3354/meps204039.
- Barthès A, Leflaive J, Coulon S, Peres F, Rols JL, Ten-Hage L. 2014. Impact of Drought on Diatom Communities and the Consequences for the Use of Diatom Index Values in the River Maureillas (Pyrénées-Orientales, France). *River Research and Applications*: n/a-n/a. 10.1002/rra.2793.
- Barthès A, Leflaive J, Lamy A, Rols JL, Ten-Hage L. submitted. Resilience of Aggregated Microbial Communities Subjected to Drought – Small-Scale Studies. *Microbial Ecology*.
- Bate N, Newall P. 1998. Techniques for the Use of Diatoms in Water Quality Assessment: How Many Valves? in *Proceedings of the 15th International Diatom Symposium* (ed. Gantner RA), pp. 153-160, Perth, Australia.
- Battarbee RW. 1986. Diatom Analysis in *Handbook of Holocene Paleoecology and Paleohydrology* (ed. Berglund BE), pp. 527-570. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, Great Britain.
- Battin TJ, Kaplan LA, Newbold JD, Hansen CME. 2003. Contributions of microbial biofilms to ecosystem processes in stream mesocosms. *Nature* **426**: 439-442. 10.1038/nature02152.
- Battin TJ, Sloan WT, Kjelleberg S, Daims H, Head IM, Curtis TP, Eberl L. 2007. Microbial landscapes: new paths to biofilm research. *Nature Reviews Microbiology* **5**: 76-81. 10.1038/nrmicro1556.
- Benda L, Hassan MA, Church M, May CL. 2005. Geomorphology of steepland headwaters: The transition from hillslopes to channels. *Journal of the American Water Resources Association* **41**: 835-851. 10.1111/j.1752-1688.2005.tb03773.x.
- Benenati PL, Shannon JP, Blinn DW. 1998. Desiccation and recolonization of phytobenthos in a regulated desert river: Colorado River at Lees Ferry, Arizona, USA. *Regulated*

- Rivers-Research & Management* **14**: 519-532. 10.1002/(sici)1099-1646(1998110)14:6<519::aid-rrr518>3.0.co;2-h.
- Bergey EA, Bunlue P, Silalom S, Thapanya D, Chantaramongkol P. 2010. Environmental and biological factors affect desiccation tolerance of algae from two rivers (Thailand and New Zealand) with fluctuating flow. *Journal of North American Benthological Society* **29**: 725-736. 10.1899/09-068.1.
- Bernal S, von Schiller D, Sabater F, Marti E. 2013. Hydrological extremes modulate nutrient dynamics in mediterranean climate streams across different spatial scales. *Hydrobiologia* **719**: 31-42. 10.1007/s10750-012-1246-2.
- Bertrand C, Siauve V, Fayolle S, Cazaubon A. 2001. Effects of hydrological regime on the drift algae in a regulated Mediterranean river (River Verdon, southeastern France). *Regulated Rivers-Research & Management* **17**: 407-416. 10.1002/rrr.654.abs.
- Besse-Lototskaya A, Verdonschot PFM, Coste M, Van de Vijver B. 2011. Evaluation of European diatom trophic indices. *Ecological Indicators* **11**: 456-467. 10.1016/j.ecolind.2010.06.017.
- Besse-Lototskaya A, Verdonschot PFM, Sinkeldam JA. 2006. Uncertainty in diatom assessment: Sampling, identification and counting variation. *Hydrobiologia* **566**: 247-260. 10.1007/s10750-006-0092-5.
- Bewley JD. 1979. Physiological-aspects of desiccation tolerance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **30**: 195-238. 10.1146/annurev.pp.30.060179.001211.
- Biggs BJJ. 1996. Patterns in periphyton of streams in *Algal Ecology: Freshwater Benthic Ecosystems* (eds. Stevenson RJ, Bothwell ML, Lowe RL), pp. 31-56. Academic Press.
- Biggs BJJ, Stevenson RJ, Lowe RL. 1998. A habitat matrix conceptual model for stream periphyton. *Archiv fur Hydrobiologie* **143**: 21-56.
- Birk S, Bonne W, Borja A, Brucet S, Courrat A, Poikane S, Solimini A, van de Bund WV, Zampoukas N, Hering D. 2012. Three hundred ways to assess Europe's surface waters: An almost complete overview of biological methods to implement the Water Framework Directive. *Ecological Indicators* **18**: 31-41. 10.1016/j.ecolind.2011.10.009.
- Birk S, Willby NJ, Kelly MG, Bonne W, Borja A, Poikane S, van de Bund W. 2013. Intercalibrating classifications of ecological status: Europe's quest for common management objectives for aquatic ecosystems. *Science of the Total Environment* **454**: 490-499. 10.1016/j.scitotenv.2013.03.037.
- Blandin P. 1986. Bio-indicateurs et diagnostics des systèmes écologiques. *Bulletin d'Ecologie* **17**: 215-306.

- Blinn DW, Fredericksen A, Korte V. 1980. Colonization rates and community structure of diatoms on three different rock substrata in a lotic system. *Brit Phycol J* **15**: 303-310.
- Blinn DW, Shannon JP, Stevens LE, Carder JP. 1995. Consequences of fluctuating discharge for lotic communities. *Journal of the North American Benthological Society* **14**: 233-248.
- Block W, Smith RIL, Kennedy AD. 2009. Strategies of survival and resource exploitation in the Antarctic fellfield ecosystem. *Biological Reviews* **84**: 449-484. 10.1111/j.1469-185X.2009.00084.x.
- Boix D, Garcia-Berthou E, Gascon S, Benejam L, Tornes E, Sala J, Benito J, Munne A, Sola C, Sabater S. 2010. Response of community structure to sustained drought in Mediterranean rivers. *Journal of Hydrology* **383**: 135-146. 10.1016/j.jhydrol.2010.01.014.
- Bonada N, Resh VH. 2013. Mediterranean-climate streams and rivers: geographically separated but ecologically comparable freshwater systems. *Hydrobiologia* **719**: 1-29. 10.1007/s10750-013-1634-2.
- Bond NR, Lake PS, Arthington AH. 2008. The impacts of drought on freshwater ecosystems: an Australian perspective. *Hydrobiologia* **600**: 3-16. 10.1007/s10750-008-9326-z.
- Borchardt MA, Bott TL. 1995. Meiofaunal grazing of bacteria and algae in a piedmont stream. *J N Am Benthol Soc* **14**: 278-298. 10.2307/1467780.
- Bouleau G, Pont D. 2014. Les conditions de référence de la directive cadre européenne sur l'eau face à la dynamique des hydrosystèmes et des usages. *Natures, sciences, sociétés* **22**: 3-14. 10.1051/nss/2014016.
- Boulton AJ, Suter PJ. 1986. Ecology of Temporary Streams—an Australian Perspective in *Limnology in Australia* (eds. Deckker PD, Williams WD), pp. 313-327. Springer Netherlands.
- Bowman MF, Somers KM. 2005. Considerations when using the reference condition approach for bioassessment of freshwater ecosystems. *Water Quality Research Journal of Canada* **40**: 347-360.
- Broady PA. 1996. Diversity, distribution and dispersal of Antarctic terrestrial algae. *Biodiversity and Conservation* **5**: 1307-1335. 10.1007/bf00051981.
- Brock MA, Nielsen DL, Shiel RJ, Green JD, Langley JD. 2003. Drought and aquatic community resilience: the role of eggs and seeds in sediments of temporary wetlands. *Freshwater Biol* **48**: 1207-1218. 10.1046/j.1365-2427.2003.01083.x.
- Brooks RT. 2009. Potential impacts of global climate change on the hydrology and ecology of ephemeral freshwater systems of the forests of the northeastern United States. *Climatic Change* **95**: 469-483. 10.1007/s10584-008-9531-9.



- Brown MT. 1987. Effects of Desiccation on Photosynthesis of Intertidal Algae From a Southern New-Zealand Shore. *Botanica Marina* **30**: 121-127. 10.1515/botm.1987.30.2.121.
- Brown RM, Larson DA, Bold HC. 1964. Airborne Algae: Their Abundance and Heterogeneity. *Science* **143**: 583-585. 10.1126/science.143.3606.583.
- Cardinale M, Brusetti L, Quatrini P, Borin S, Puglia AM, Rizzi A, Zanardini E, Sorlini C, Corselli C, Daffonchio D. 2004. Comparison of different primer sets for use in automated ribosomal intergenic spacer analysis of complex bacterial communities. *Applied and Environmental Microbiology* **70**: 6147-6156. 10.1128/aem.70.10.6147-6156.2004.
- Cartaxana P, Mendes CR, van Leeuwe MA, Brotas V. 2006. Comparative study on microphytobenthic pigments of muddy and sandy intertidal sediments of the Tagus estuary. *Estuar Coast Shelf S* **66**: 225-230. 10.1016/j.ecss.2005.08.011.
- CEMAGREF. 1982. Étude des Méthodes Biologiques d'appréciation Quantitative de la Qualité des Eaux. p. 218. Agence de l'Eau Rhône-Méditerranée-Corse, Lyon.
- CEN. 2004. EN 13946: Water quality - Guidance standard for the routine sampling and pre-treatment of benthic diatoms from rivers. European Standard, Geneva.
- CEN. 2007. EN 14407: Water quality - Guidance standard for the identification, enumeration and interpretation of benthic diatom samples from running waters. pp. 1-13. European Standard, Geneva.
- Chang WS, van de Mortel M, Nielsen L, de Guzman GN, Li XH, Halverson LJ. 2007. Alginate production by *Pseudomonas putida* creates a hydrated microenvironment and contributes to biofilm architecture and stress tolerance under water-limiting conditions. *J Bacteriol* **189**: 8290-8299. 10.1128/jb.00727-07.
- Charrier B, Le Bail A, de Reviers B. 2012. Plant Proteus: brown algal morphological plasticity and underlying developmental mechanisms. *Trends in Plant Science* **17**: 468-477. 10.1016/j.tplants.2012.03.003.
- Chen H, Jiang JG. 2010. Osmotic adjustment and plant adaptation to environmental changes related to drought and salinity. *Environ Rev* **18**: 309-319. 10.1139/a10-014.
- Chessman B, Gell P, Newall P, Sonneman J. 1999a. Draft protocol for sampling and laboratory processing of diatoms for the monitoring and assessment of streams. in *An Illustrated Key to Common Diatom Genera from Southern Australia Identification Guide No 26* (eds. Gell P, Sonneman J, Reid M, Illman M, Sincock A), pp. 58-61. Murray-Darling Freshwater Research Centre, Albury.
- Chessman B, Grows I, Currey J, Plunkett-Cole N. 1999b. Predicting diatom communities at the genus level for the rapid biological assessment of rivers. *Freshwater Biology* **41**: 317-331. 10.1046/j.1365-2427.1999.00433.x.

- Chessman BC, Bate N, Gell PA, Newall P. 2007. A diatom species index for bioassessment of Australian rivers. *Marine and Freshwater Research* **58**: 542-557. 10.1071/mf06220.
- Choi KH, Dobbs FC. 1999. Comparison of two kinds of Biolog microplates (GN and ECO) in their ability to distinguish among aquatic microbial communities. *Journal of Microbiological Methods* **36**: 203-213. 10.1016/s0167-7012(99)00034-2.
- Choudhury NK, Behera RK. 2001. Photoinhibition of photosynthesis: Role of carotenoids in photoprotection of chloroplast constituents. *Photosynthetica* **39**: 481-488. 10.1023/a:1015647708360.
- Coleman AW. 1983. The roles of resting spores and akinetes in chlorophyte survival. *Survival strategies of the algae* (ed. Fryxell GA), pp. 1-21. Cambridge University Press, Cambridge.
- Combroux ICS, Bornette G. 2004. Propagule banks and regenerative strategies of aquatic plants. *J Veg Sci* **15**: 13-20. 10.1111/j.1654-1103.2004.tb02232.x.
- Consalvey M, Paterson DM, Underwood GJC. 2004. The ups and downs of life in a benthic biofilm: Migration of benthic diatoms. *Diatom Res* **19**: 181-202. 10.1080/0269249X.2004.9705870.
- Contreras-Porcía L, Callejas S, Thomas D, Sordet C, Pohnert G, Contreras A, Lafuente A, Flores-Molina MR, Correa JA. 2012. Seaweeds early development: detrimental effects of desiccation and attenuation by algal extracts. *Planta* **235**: 337-348. 10.1007/s00425-011-1512-y.
- Coring E. 1999. Situation and developments of algal, diatom-based techniques for monitoring rivers in Germany. in *Use of Algae for Monitoring Rivers III* (ed. Prygiel J, Whitton, B.A., Bukowska, J.), pp. 122-127. Agence de l'Eau Artois-Picardie, Douai.
- Coring E, Schneider S, Hamm A, Hofmann G. 1999. *Durchgehendes Trophiesystem auf der Grundlage der Trophieindikation mit Kieselalgen*. Deutscher Verband für Wasserwirtschaft und Kulturbau: Koblenz.
- Coste M, Ayphassorho H. 1991. *Etude de la qualité des eaux du bassin Artois-Picardie à l'aide des communautés de diatomées benthiques : application des indices diatomiques*. CEMAGREF: Bordeaux.
- Coste M, Boutry S, Tison-Rosebery J, Delmas F. 2009. Improvements of the Biological Diatom Index (BDI): Description and efficiency of the new version (BDI-2006). *Ecological Indicators* **9**: 621-650. 10.1016/j.ecolind.2008.06.003.
- Coste M, Ector L. 2000. Diatomées invasives exotiques ou rares en France: Principales Observations effectuées au cours des dernières décennies. *Syst Geogr PI* **70**: 373-400.

- Costello EK, Stagaman K, Dethlefsen L, Bohannan BJM, Relman DA. 2012. The Application of Ecological Theory Toward an Understanding of the Human Microbiome. *Science* **336**: 1255-1262. 10.1126/science.1224203.
- Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappinscott HM. 1995. Microbial Biofilms. *Annual Review of Microbiology* **49**: 711-745. 10.1146/annurev.micro.49.1.711.
- Cowell AL, Matthews TG, Lind PR. 2006. Effect of fire on benthic algal assemblage structure and recolonization in intermittent streams. *Austral Ecology* **31**: 696-707. 10.1111/j.1442-9993.2006.01595.x.
- Cox EJ. 1996. *Identification of freshwater diatoms from live material*. Chapman & Hall.
- Cox EJ. 1998. A rationale and some suggestions for developing rapid biomonitoring techniques using identification of live diatoms. in *Proceedings of the 15th international diatom symposium* (ed. John J), pp. 43-50, Perth, Australia
- Cruces E, Huovinen P, Gomez I. 2012. Stress proteins and auxiliary anti-stress compounds in intertidal macroalgae. *Lat Am J Aquat Res* **40**: 822-834. 10.3856/vol40-issue4-fulltext-1.
- Dahm CN, Baker MA, Moore DI, Thibault JR. 2003. Coupled biogeochemical and hydrological responses of streams and rivers to drought. *Freshwater Biol* **48**: 1219-1231. 10.1046/j.1365-2427.2003.01082.x.
- Dallas HF. 2013. Ecological status assessment in mediterranean rivers: complexities and challenges in developing tools for assessing ecological status and defining reference conditions. *Hydrobiologia* **719**: 483-507. 10.1007/s10750-012-1305-8.
- Datry T, Arscott DB, Sabater S. 2011. Recent perspectives on temporary river ecology *Aquatic Sciences* **73**: 453-457. 10.1007/s00027-011-0236-1.
- Datry T, Larned ST, Tockner K. 2014. Intermittent Rivers: A Challenge for Freshwater Ecology. *BioScience* **64**: 229-235. 10.1093/biosci/bit027.
- Davey MC. 1989. The Effects of Freezing and Desiccation on Photosynthesis and Survival of Terrestrial Antarctic Algae and Cyanobacteria. *Polar Biol* **10**: 29-36. 10.1007/BF00238287.
- Davis JS. 1972. Survival records in the algae, and the survival role of certain algae pigments, fat, and mucilaginous substances. *Biologist* **54**: 52-93.
- de Carvalho RC, Branquinho C, da Silva JM. 2011. Physiological consequences of desiccation in the aquatic bryophyte *Fontinalis antipyretica*. *Planta* **234**: 195-205. 10.1007/s00425-011-1388-x.
- De Clerck O, Guiry MD, Leliaert F, Samyn Y, Verbruggen H. 2013. Algal taxonomy: a road to nowhere? *Journal of Phycology* **49**: 215-225. 10.1111/jpy.12020.

- de Liphay JR, Johnsen K, Albrechtsen HJ, Rosenberg P, Aamand J. 2004. Bacterial diversity and community structure of a sub-surface aquifer exposed to realistic low herbicide concentrations. *Fems Microbiology Ecology* **49**: 59-69. 10.1016/j.femsec.2004.02.007.
- Decho AW. 2000. Microbial biofilms in intertidal systems: an overview. *Cont Shelf Res* **20**: 1257-1273. 10.1016/s0278-4343(00)00022-4.
- Delgado C, Pardo I, Garcia L. 2010. A multimetric diatom index to assess the ecological status of coastal Galician rivers (NW Spain). *Hydrobiologia* **644**: 371-384. 10.1007/s10750-010-0206-y.
- Delgado C, Pardo I, Garcia L. 2012. Diatom communities as indicators of ecological status in Mediterranean temporary streams (Balearic Islands, Spain). *Ecological Indicators* **15**: 131-139. 10.1016/j.ecolind.2011.09.037.
- Delgado O, Rodriguezprieto C, Frigolagirones L, Ballesteros E. 1995. Drought tolerance and light requirements of high and low sublittoral species of Mediterranean macroalgae of the genus *Cystoseira* C-Agardh (Fucales, Phaephyceae). *Botanica Marina* **38**: 127-132. 10.1515/botm.1995.38.1-6.127.
- Dell' Uomo A. 1996. Assessment of water quality of an Apennine river as a pilot study for diatom-based monitoring of Italian watercourses. in *Use of algae for monitoring rivers II* (eds. Whitton BA, Rott E), pp. 65-72. Institut für Botanik, Universität Innsbruck.
- Dell' Uomo A. 1999. Use of algae for monitoring rivers in Italy: current situation and perspectives. in *Use of algae for monitoring rivers III* (eds. Prygiel J, Whitton BA, Bukowska J), pp. 17-25. Agence de l'Eau Artois-Picardie, Douai.
- Dell' Uomo A. 2004. L'Indice Diatomico di Eutrofizzazione/Polluzione, EPI-D nel monitoraggio delle acque correnti. Linee guida. APAT, Roma.
- Dell' Uomo A, Torrisi M. 2011. The Eutrophication/Pollution Index-Diatom based (EPI-D) and three new related indices for monitoring rivers: The case study of the river Potenza (the Marches, Italy). *Plant Biosystems* **145**: 331-341. 10.1080/11263504.2011.569347.
- Demars BOL. 2013. Uncertainties in biotic indicators and a corrigendum to Ponader et al. (2007): Implications for biomonitoring. *Ecological Indicators* **27**: 44-47. 10.1016/j.ecolind.2012.11.003.
- Demars BOL, Kemp JL, Friberg N, Usseglio-Polatera P, Harper DM. 2012. Linking biotopes to invertebrates in rivers: Biological traits, taxonomic composition and diversity. *Ecological Indicators* **23**: 301-311. DOI: 10.1016/j.ecolind.2012.04.011.
- Demura M, Ioki M, Kawachi M, Nakajima N, Watanabe MM. 2014. Desiccation tolerance of *Botryococcus braunii* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) and extreme temperature

- tolerance of dehydrated cells. *Journal of Applied Phycology* **26**: 49-53. 10.1007/s10811-013-0059-7.
- DeNicola DM, Kelly M. 2014. Role of periphyton in ecological assessment of lakes. *Freshwater Science* **33**: 619-638. 10.1086/676117.
- Descy JP, Coste M. 1991. A Test of methods for assessing water quality based on diatoms. *Verhandlungen des Internationalen Verein Limnologie* **24**: 2112-2116.
- Desrosiers C, Leflaive J, Eulin A, Ten-Hage L. 2013a. Bioindicators in marine waters: Benthic diatoms as a tool to assess water quality from eutrophic to oligotrophic coastal ecosystems. *Ecological Indicators* **32**: 25-34. 10.1016/j.ecolind.2013.02.021.
- Desrosiers C, Leflaive J, Eulin A, Ten-Hage L. 2013b. Optimal colonization and growth of marine benthic diatoms on artificial substrata: protocol for a routine use in bioindication. *Journal of Applied Phycology*: 1-13. 10.1007/s10811-013-0204-3.
- Dodds WK, Gudder DA. 1992. The Ecology of Cladophora. *Journal of Phycology* **28**: 415-427. 10.1111/j.0022-3646.1992.00415.x.
- Dodds WK, Gudder DA, Mollenhauer D. 1995. The Ecology of *Nostoc*. *J Phycol* **31**: 2-18. 10.1111/j.0022-3646.1995.00002.x.
- Dodds WK, Hutson RE, Eichen AC, Evans MA, Gudder DA, Fritz KM, Gray L. 1996. The relationship of floods, drying, how and light to primary production and producer biomass in a prairie stream. *Hydrobiologia* **333**: 151-159. 10.1007/bf00013429.
- Doney SC, Ruckelshaus M, Emmett Duffy J, Barry JP, Chan F, English CA, Galindo HM, Grebmeier JM, Hollowed AB, Knowlton N, Polovina J, Rabalais NN, Sydeman WJ, Talley LD. 2012. Climate Change Impacts on Marine Ecosystems. *Annual Review of Marine Science* **4**: 11-37. doi:10.1146/annurev-marine-041911-111611.
- Dring MJ, Brown A. 1982. Photosynthesis of intertidal brown algae during and after periods of emersion: a renewed search for physiological causes of zonation. *MEPS* **8**: 301-308.
- Du GY, Li WT, Li HB, Chung IK. 2012. Migratory Responses of Benthic Diatoms to Light and Temperature Monitored by Chlorophyll Fluorescence. *Journal of Plant Biology* **55**: 159-164. 10.1007/s12374-011-9200-9.
- Du GY, Oak JH, Li H, Chung IK. 2010a. Effect of light and sediment grain size on the vertical migration of benthic diatoms. *Algae* **25**: 133-140. 10.4490/ALGAE.2010.25.3.133.
- Du GY, Son M, An S, Chung IK. 2010b. Temporal variation in the vertical distribution of microphytobenthos in intertidal flats of the Nakdong River estuary, Korea. *Estuar Coast Shelf S* **86**: 62-70. 10.1016/j.ecss.2009.10.008.

- Dufour S, Piegay H. 2009. From the myth of a lost paradise to targeted river restoration: Forget natural references and focus on human benefits. *River Research and Applications* **25**: 568-581. 10.1002/rra.1239.
- Duong TT, Coste M, Feurtet-Mazel A, Dang DK, Ho CT, Thi PQL. 2012. Responses and structural recovery of periphytic diatom communities after short-term disturbance in some rivers (Hanoi, Vietnam). *Journal of Applied Phycology* **24**: 1053-1065. 10.1007/s10811-011-9733-9.
- Duong TT, Feurtet-Mazel A, Coste M, Dang DK, Boudou A. 2007. Dynamics of diatom colonization process in some rivers influenced by urban pollution (Hanoi, Vietnam). *Ecological Indicators* **7**: 839-851. 10.1016/j.ecolind.2006.10.003.
- Eaton AD, Franson MAH, Association APH, Association AWW, Federation WE. 2005. *Standard Methods for the Examination of Water & Wastewater*. American Public Health Association: Washington, DC.
- Ector L, Hlúbíková D, Hoffmann L. 2012. Preface: Use of algae for monitoring rivers. *Hydrobiologia* **695**: 1-5. 10.1007/s10750-012-1204-z
- Ector L, Kingston JC, Charles DF, Denys L, Douglas MSV, Manoylov K, Michelutti N, Rimet F, Smol JP, Stevenson RJ, Winter JG. 2004. Freshwater diatoms and their role as ecological indicators. in *Proceedings of the 17th International Diatom Symposium 2002* (ed. Poulin M), pp. 469-480. Biopress Limited, Ottawa, Canada.
- Edgar LA. 1983. Mucilage Secretions of Moving Diatoms. *Protoplasma* **118**: 44-48. 10.1007/bf01284745.
- Eggert A, Nitschke U, West JA, Michalik D, Karsten U. 2007. Acclimation of the intertidal red alga *Bangiopsis subsimplex* (Stylonematophyceae) to salinity changes. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **343**: 176-186. 10.1016/j.jembe.2006.11.015.
- Elster J, Degma P, Kovacik L, Valentova L, Sramkova K, Pereira AB. 2008. Freezing and desiccation injury resistance in the filamentous green alga *Klebsormidium* from the Antarctic, Arctic and Slovakia. *Biologia* **63**: 843-851. 10.2478/s11756-008-0111-2.
- Empain A. 1978. Relations quantitatives entre les populations de bryophytes aquatiques et la pollution des eaux courantes. Définition d'un indice de la qualité des eaux. *Hydrobiologia* **60**: 49-74. 10.1007/BF00018686.
- Eulin A. 1997. Les communautés de diatomées épilithiques de la Garonne - Répartition naturelle et étude *in situ* de la dynamique de colonisation sur substrats artificiels., p. 248. Paul Sabatier, Toulouse.
- European Parliament and Council. 2000. Water Framework Directive 2000/60/EC establishing a framework for community action in the field of water policy., pp. 1-73. Official Journal of the European Communities.

- Evans JH. 1958. The survival of freshwater algae during dry periods. Part I: an investigation of the algae of five small ponds. *J Ecol* **46**: 149-168. 10.2307/2256910.
- Evans KM, Wortley AH, Simpson GE, Chepurnov VA, Mann DG. 2008. A molecular systematic approach to explore diversity within the sellaphora pupula species complex (bacillariophyta). *Journal of Phycology* **44**: 215-231. 10.1111/j.1529-8817.2007.00454.x.
- Feio MJ, Aguiar FC, Almeida SFP, Ferreira MT. 2012. AQUAFLOA: A predictive model based on diatoms and macrophytes for streams water quality assessment. *Ecological Indicators* **18**: 586-598. 10.1016/j.ecolind.2012.01.016.
- Feio MJ, Almeida SFP, Craveiro SC, Calado AJ. 2007a. Diatoms and macroinvertebrates provide consistent and complementary information on environmental quality. *Fundamental and Applied Limnology* **169**: 247-258. 10.1127/1863-9135/2007/0169-0247.
- Feio MJ, Almeida SFP, Craveiro SC, Calado AJ. 2009. A comparison between biotic indices and predictive models in stream water quality assessment based on benthic diatom communities. *Ecological Indicators* **9**: 497-507. 10.1016/j.ecolind.2008.07.001.
- Feio MJ, Reynoldson TB, Ferreira V, Graca MAS. 2007b. A predictive model for freshwater bioassessment (Mondego River, Portugal). *Hydrobiologia* **589**: 55-68. 10.1007/s10750-006-0720-0.
- Feng RW, Wei CY, Tu SX. 2013. The roles of selenium in protecting plants against abiotic stresses. *Environ Exp Bot* **87**: 58-68. 10.1016/j.envexpbot.2012.09.002.
- Fernandez-Valiente E, Camacho A, Rochera C, Rico E, Vincent WF, Quesada A. 2007. Community structure and physiological characterization of microbial mats in Byers Peninsula, Livingston Island (South Shetland Islands, Antarctica). *Fems Microbiology Ecology* **59**: 377-385. 10.1111/j.1574-6941.2006.00221.x.
- Fierer N, Schimel JP, Holden PA. 2003. Influence of drying-rewetting frequency on soil bacterial community structure. *Microbial Ecology* **45**: 63-71. 10.1007/s00248-002-1007-2.
- Filipe AF, Lawrence JE, Bonada N. 2013. Vulnerability of stream biota to climate change in mediterranean climate regions: a synthesis of ecological responses and conservation challenges. *Hydrobiologia* **719**: 331-351. 10.1007/s10750-012-1244-4.
- Fisher MM, Triplett EW. 1999. Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 4630-4636.
- Fleming ED, Castenholz RW. 2007. Effects of periodic desiccation on the synthesis of the UV-screening compound, scytonemin, in cyanobacteria. *Environmental Microbiology* **9**: 1448-1455. 10.1111/j.1462-2920.2007.01261.x.

- Flores-Molina MR, Thomas D, Lovazzano C, Nunez A, Zapata J, Kumar M, Correa JA, Contreras-Porcia L. 2014. Desiccation stress in intertidal seaweeds: Effects on morphology, antioxidant responses and photosynthetic performance. *Aquatic Botany* **113**: 90-99. 10.1016/j.aquabot.2013.11.004.
- Fogg GE. 2001. Algal Adaptation to Stress — Some General Remarks. in *Algal Adaptation to Environmental Stresses* (eds. Rai L, Gaur J), pp. 1-19. Springer Berlin Heidelberg.
- Fourtanier E, Kociolek P. 2014. Catalogue of Diatom Names. California Academy of Sciences.
- Gaff DF, Oliver M. 2013. The evolution of desiccation tolerance in angiosperm plants: a rare yet common phenomenon. *Funct Plant Biol* **40**: 315-328. 10.1071/fp12321.
- Garcia-Prieto JC, Cachaza JM, Perez-Galende P, Roig MG. 2012. Impact of drought on the ecological and chemical status of surface water and on the content of arsenic and fluoride pollutants of groundwater in the province of Salamanca (Western Spain). *Chemistry and Ecology* **28**: 545-560. 10.1080/02757540.2012.686608.
- Garland JL. 1996. Patterns of potential C source utilization by rhizosphere communities. *Soil Biology & Biochemistry* **28**: 223-230. 10.1016/0038-0717(95)00113-1.
- Gassiole G. 2014. Diatomées épilithiques des cours d'eau pérennes de l'île de la Réunion. in *Ecologie Evolutive, Fonctionnelle et des Communautés*, p. 512. Université Bordeaux 1, Bordeaux.
- Gauroy C, Gouy V, Carluer N. 2012. Interprétation des données de surveillance de la contamination des eaux de surface par les pesticides par hydro-écorégion. *Revue SET Hors-série numéro 8*: 11.
- Gillett N, Pan YD, Parker C. 2009. Should only live diatoms be used in the bioassessment of small mountain streams? *Hydrobiologia* **620**: 135-147. 10.1007/s10750-008-9624-5.
- Gillett ND, Pan YD, Manoylov KM, Stevenson RJ. 2011. The role of live diatoms in bioassessment: a large-scale study of Western US streams. *Hydrobiologia* **665**: 79-92. 10.1007/s10750-011-0606-7.
- Golldack D, Li C, Mohan H, Probst N. 2014. Tolerance to drought and salt stress in plants: unraveling the signaling networks. *Front Plant Sci* **5**. 10.3389/fpls.2014.00151.
- Gómez N, Licursi M. 2001. The Pampean Diatom Index (IDP) for assessment of rivers and streams in Argentina. *Aquatic Ecology* **35**: 173-181. 10.1023/a:1011415209445.
- Gonzalez A, King A, Robeson MS, Song SJ, Shade A, Metcalf JL, Knight R. 2012. Characterizing microbial communities through space and time. *Current Opinion in Biotechnology* **23**: 431-436. 10.1016/j.copbio.2011.11.017.
- Gorbushina AA. 2007. Life on the rocks. *Environ Microbiol* **9**: 1613-1631. 10.1111/j.1462-2920.2007.01301.x.



- Gottlieb A, Richards J, Gaiser E. 2005. Effects of desiccation duration on the community structure and nutrient retention of short and long-hydroperiod Everglades periphyton mats. *Aquatic Botany* **82**: 99-112. 10.1016/j.aquabot.2005.02.012.
- Gudmundsdottir R, Palsson S, Hannesdottir ER, Olafsson JS, Gislason GM, Moss B. 2013. Diatoms as indicators: The influences of experimental nitrogen enrichment on diatom assemblages in sub-Arctic streams. *Ecological Indicators* **32**: 74-81. 10.1016/j.ecolind.2013.03.015.
- Gueguen J, Eulin A, Lefrançois E, Boutry S, Rosebery J, Coste M, Delmas F. 2013. Mise au point d'un indice de bioindication de la qualité de l'eau des cours d'eau antillais à partir des diatomées : l'IDA. ODE Martinique et Guadeloupe, DEAL Martinique et Guadeloupe, IRSTEA
- Guenther RJ, Martone PT. 2014. Physiological performance of intertidal coralline algae during a simulated tidal cycle. *J Phycol* **50**: 310-321. 10.1111/jpy.12161.
- Guiry MD, Guiry GM. 2014. AlgaeBase.
- Gustavs L, Eggert A, Michalik D, Karsten U. 2010. Physiological and biochemical responses of green microalgae from different habitats to osmotic and matric stress. *Protoplasma* **243**: 3-14. 10.1007/s00709-009-0060-9.
- Haberyan KA, Haddock GD. 2013. On the distribution of diatoms on cover slips: cause for concern. *Journal of Paleolimnology* **50**: 151-158. 10.1007/s10933-013-9689-7.
- Häder DP. 2001. Adaptation to UV Stress in Algae. in *Algal Adaptation to Environmental Stresses* (eds. Rai L, Gaur J), pp. 173-202. Springer Berlin Heidelberg, Erlangen, Germany.
- Häder DP, Kumar HD, Smith RC, Worrest RC. 1998. Effects on aquatic ecosystems. *J Photochem Photobiol, B* **46**: 53-68. 10.1016/s1011-1344(98)00185-7.
- Hadoux E, Plaire M, Laplace-Treyture C. 2010. PHYTOBS v2.0 : Outil de comptage du phytoplancton et de calcul de biovolumes en laboratoire. Version 2.0. Application JAVA.
- Hagenbuch IM, Pinckney JL. 2012. Toxic effect of the combined antibiotics ciprofloxacin, lincomycin, and tylosin on two species of marine diatoms. *Water Research* **46**: 5028-5036. 10.1016/j.watres.2012.06.040.
- Hargraves PE, French FW. 1983. Diatom resting spores: significance and strategies. in *Survival strategies of the algae* (ed. Fryxell GA), pp. 49-68. Cambridge University Press, Cambridge.
- Hart BT, Bailey P, Edwards R, Hortle K, James K, McMahon A, Meredith C, Swadling K. 1991. A Review of the Salt Sensitivity of the Australian Freshwater Biota. *Hydrobiologia* **210**: 105-144. 10.1007/bf00014327.

- Haury J, Peltre MC, Tremolieres M, Barbe J, Thiebaut G, Bernez I, Daniel H, Chatenet P, Haan-Archipof G, Muller S, Dutartreg A, Laplace-Treyture C, Cazaubon A, Lambert-Servien E. 2006. A new method to assess water trophy and organic pollution - the Macrophyte Biological Index for Rivers (IBMR): its application to different types of river and pollution. *Hydrobiologia* **570**: 153-158. 10.1007/s10750-006-0175-3.
- Hawes I, Howard-Williams C, Vincent WF. 1992b. Desiccation and recovery of Antarctic cyanobacteria mats. *Polar Biology* **12**: 587-594.
- Hawkins CP, Olson JR, Hill RA. 2010. The reference condition: predicting benchmarks for ecological and water-quality assessments. *Journal of the North American Benthological Society* **29**: 312-343. 10.1899/09-092.1.
- Hay SIM, T. C., Paterson DM. 1993. The speed of diatom migration through natural and artificial substrata. *Diatom Res* **8**: 371-384. 10.1080/0269249X.1993.9705268.
- Hering D, Borja A, Carstensen J, Carvalho L, Elliott M, Feld CK, Heiskanen A-S, Johnson RK, Moe J, Pont D, Solheim AL, de Bund Wv. 2010. The European Water Framework Directive at the age of 10: A critical review of the achievements with recommendations for the future. *Science of the Total Environment* **408**: 4007-4019. 10.1016/j.scitotenv.2010.05.031.
- Hering D, Feld CK, Moog O, Ofenbock T. 2006a. Cook book for the development of a Multimetric Index for biological condition of aquatic ecosystems: Experiences from the European AQEM and STAR projects and related initiatives. *Hydrobiologia* **566**: 311-324. 10.1007/s10750-006-0087-2.
- Hering D, Johnson RK, Kramm S, Schmutz S, Szoszkiewicz K, Verdonschot PFM. 2006b. Assessment of European streams with diatoms, macrophytes, macroinvertebrates and fish: a comparative metric-based analysis of organism response to stress. *Freshwater Biology* **51**: 1757-1785. 10.1111/j.1365-2427.2006.01610.x.
- Herman PMJ, Middelburg JJ, Heip CHR. 2001. Benthic community structure and sediment processes on an intertidal flat: results from the ECOFLAT project. *Cont Shelf Res* **21**: 2055-2071. 10.1016/s0278-4343(01)00042-5.
- Hershkovitz Y, Gasith A. 2013. Resistance, resilience, and community dynamics in mediterranean-climate streams. *Hydrobiologia* **719**: 59-75. 10.1007/s10750-012-1387-3.
- Higgins MJ, Molino P, Mulvaney P, Wetherbee R. 2003. The structure and nanomechanical properties of the adhesive mucilage that mediates diatom-substratum adhesion and motility. *J Phycol* **39**: 1181-1193. 10.1111/j.0022-3646.2003.03-027.x.
- Hill BH, Herlihy AT, Kaufmann PR, Stevenson RJ, McCormick FH, Johnson CB. 2000. Use of periphyton assemblage data as an index of biotic integrity. *Journal of the North American Benthological Society* **19**: 50-67. 10.2307/1468281.

- Hillebrand H, Durselen CD, Kirschtel D, Pollinger U, Zohary T. 1999. Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. *Journal of Phycology* **35**: 403-424. 10.1046/j.1529-8817.1999.3520403.x.
- Hoagland KD, Rosowski JR, Gretz MR, Roemer SC. 1993. Diatom extracellular polymeric substances - function, fine-structure, chemistry, and physiology. *J Phycol* **29**: 537-566. 10.1111/j.0022-3646.1993.00537.x.
- Hoerling M, Eischeid J, Perlwitz J, Quan XW, Zhang T, Pegion P. 2012. On the Increased Frequency of Mediterranean Drought. *Journal of Climate* **25**: 2146-2161. 10.1175/jcli-d-11-00296.1.
- Hofmann G, Werum M, Lange-Bertalot H. 2011. *Diatomeen im Süßwasser-Benthos von Mitteleuropa*. A.R.G. Gantner Verlag K.G., Ruggell.
- Holling CS. 1973. Resilience and stability of ecological systems. *Annual Review of Ecology and Systematics* **4**: 1-24. 10.1146/annurev.es.04.110173.000245.
- Holling CS. 1996. Engineering resilience versus ecological resilience. in *Engineering within ecological constraints* (ed. Schulze P), pp. 31-44. National Academy, Washington (DC).
- Holzinger A, Karsten U. 2013. Desiccation stress and tolerance in green algae: consequences for ultrastructure, physiological, and molecular mechanisms. *Front Plant Sci* **4**. 10.3389/fpls.2013.00327.
- Holzinger A, Lutz C. 2006. Algae and UV irradiation: Effects on ultrastructure and related metabolic functions. *Micron* **37**: 190-207. 10.1016/j.micron.2005.10.015.
- Horvath I, Glatz A, Nakamoto H, Mishkind ML, Munnik T, Saidi Y, Goloubinoff P, Harwood JL, Vigh L. 2012. Heat shock response in photosynthetic organisms: Membrane and lipid connections. *Progr Lipid Res* **51**: 208-220. 10.1016/j.plipres.2012.02.002.
- Huber-Pestalozzi G. 1938. *Das Phytoplankton des Süßwassers : Systematik und Biologie*. E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung: Stuttgart.
- Hughes RM, Larsen DP, Omernik JM. 1986. REGIONAL REFERENCE SITES - A METHOD FOR ASSESSING STREAM POTENTIALS. *Environmental Management* **10**: 629-635. 10.1007/bf01866767.
- Humphries P, Baldwin DS. 2003. Drought and aquatic ecosystems: an introduction. *Freshwater Biol* **48**: 1141-1146. 10.1046/j.1365-2427.2003.01092.x.
- Hunt LJH, Denny MW. 2008. Desiccation protection and disruption: A trade-off for an intertidal marine alga. *J Phycol* **44**: 1164-1170. 10.1111/j.1529-8817.2008.00578.x.
- Hurlimann J, Niederhauser P. 2006. Methoden zur Untersuchung und Beurteilung der Fließgewässer: Kieselalgen Stufe F (flächendeckend) Bundesamt für Umwelt, BAFU, Bern.

- IBRA. 2012. An interim biogeographic regionalisation for Australia, version 7. (ed. Australian Government Department of Sustainability E, Water, Population and Communities). Metadata Publisher, Canberra, Australia.
- IPCC. 2007. Contribution of Working Group II to the Fourth Assessment. Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. in *Climate Change 2007: Impacts, Adaptation and Vulnerability* (eds. Parry ML, Canziani OF, Palutikof JP, van der Linden PJ, Hanson CE), p. 976, Cambridge, UK.
- Jacob A, Wiencke C, Lehmann H, Kirst GO. 1992. Physiology and ultrastructure of desiccation in the green-alga *Prasiola-crispa* from Antarctica. *Botanica Marina* **35**: 297-303. 10.1515/botm.1992.35.4.297.
- Jakob T, Schreiber U, Kirchesch V, Langner U, Wilhelm C. 2005. Estimation of chlorophyll content and daily primary production of the major algal groups by means of multiwavelength-excitation PAM chlorophyll fluorometry: performance and methodological limits. *Photosynthesis Research* **83**: 343-361. 10.1007/s11120-005-1329-2.
- Jalba AC, Wilkinson MHF, Roerdink J, Bayer MM, Juggins S. 2005. Automatic diatom identification using contour analysis by morphological curvature scale spaces. *Machine Vision and Applications* **16**: 217-228. 10.1007/s00138-005-0175-8.
- Jeong HS, Jang EK, Jin GS, Seo S, Pack SP. 2014. High-throughput diatom counting method based on lens-free shadow image analysis. *Sensors and Actuators B-Chemical* **193**: 864-868. 10.1016/j.snb.2013.12.054.
- Jesus B, Perkins RG, Consalvey M, Brotas V, Paterson DM. 2006. Effects of vertical migrations by benthic microalgae on fluorescence measurements of photophysiology. *MEPS* **315**: 55-66. 10.3354/meps315055.
- Juvany M, Muller M, Pinto-Marijuan M, Munne-Bosch S. 2014. Sex-related differences in lipid peroxidation and photoprotection in *Pistacia lentiscus*. *J Exp Bot* **65**: 1039-1049. 10.1093/jxb/ert446.
- Kahlert M, Kelly M, Albert RL, Almeida SFP, Besta T, Blanco S, Coste M, Denys L, Ector L, Frankova M, Hlubikova D, Ivanov P, Kennedy B, Marvan P *et al.* 2012. Identification versus counting protocols as sources of uncertainty in diatom-based ecological status assessments. *Hydrobiologia* **695**: 109-124. 10.1007/s10750-012-1115-z.
- Karr J, Dudley D. 1981. Ecological perspective on water quality goals. *Environmental Management* **5**: 55-68. 10.1007/bf01866609.
- Karr JR. 1981. Assessment of Biotic Integrity Using Fish Communities. *Fisheries* **6**: 21-27. 10.1577/1548-8446(1981)006<0021:aobiuf>2.0.co;2.

- Karsten U. 2012. Seaweed Acclimation to Salinity and Desiccation Stress. in *Seaweed Biology* (eds. Wiencke C, Bischof K), pp. 87-107. Springer Berlin Heidelberg, Rostock, Germany.
- Keating Kl. 1978. Blue-green-algal Inhibition of Diatom Growth - Transition From Mesotrophic to Eutrophic Community Structure. *Science* **199**: 971-973. 10.1126/science.199.4332.971.
- Kelly M. 2013. Data rich, information poor? Phytobenthos assessment and the Water Framework Directive. *European Journal of Phycology* **48**: 437-450. 10.1080/09670262.2013.852694.
- Kelly M, Bennett C, Coste M, Delgado C, Delmas F, Denys L, Ector L, Fauville C, Ferreol M, Golub M, Jarlman A, Kahlert M, Lucey J, Ni Chathain B *et al.* 2009a. A comparison of national approaches to setting ecological status boundaries in phytobenthos assessment for the European Water Framework Directive: results of an intercalibration exercise. *Hydrobiologia* **621**: 169-182. 10.1007/s10750-008-9641-4.
- Kelly M, Bennion H, Burgess A, Ellis J, Juggins S, Guthrie R, Jamieson J, Adriaenssens V, Yallop M. 2009b. Uncertainty in ecological status assessments of lakes and rivers using diatoms. *Hydrobiologia* **633**: 5-15. 10.1007/s10750-009-9872-z.
- Kelly M, Urbanic G, Acs E, Bennion H, Bertrin V, Burgess A, Denys L, Gottschalk S, Kahlert M, Karjalainen SM, Kennedy B, Kosi G, Marchetto A, Morin S *et al.* 2014. Comparing aspirations: intercalibration of ecological status concepts across European lakes for littoral diatoms. *Hydrobiologia* **734**: 125-141. 10.1007/s10750-014-1874-9.
- Kelly MG, Cazaubon A, Coring E, Dell' Uomo A, Ector L, Goldsmith B, Guasch H, Hurlimann J, Jarlman A, Kawecka B, Kwadrans J, Laugaste R, Lindstrom EA, Leitao M *et al.* 1998. Recommendations for the routine sampling of diatoms for water quality assessments in Europe. *Journal of Applied Phycology* **10**: 215-224. DOI: 10.1023/a:1008033201227.
- Kelly MG, Whitton BA. 1995. The Trophic Diatom Index: a new index for monitoring eutrophication in rivers. *Journal of Applied Phycology* **7**: 433-444.
- Kelly MG, Zgrundo A. 2013. Potential for cross-contamination of benthic diatom samples when using toothbrushes. *Diatom Research* **28**: 359-363. 10.1080/0269249x.2013.806959.
- Kermarrec L. 2012. Apport des outils de la biologie moléculaire pour l'utilisation des diatomées comme bioindicateurs de la qualité des écosystèmes aquatiques lotiques et pour l'étude de leur taxonomie. in *Biodiversité, écologie, environnement*, p. 321. Université de Grenoble, Grenoble.

- Kermarrec L, Franc A, Rimet F, Chaumeil P, Frigerio JM, Humbert JF, Bouchez A. 2014. A next-generation sequencing approach to river biomonitoring using benthic diatoms. *Freshwater Science* **33**: 349-363. 10.1086/675079.
- Kermarrec L, Franc A, Rimet F, Chaumeil P, Humbert JF, Bouchez A. 2013. Next-generation sequencing to inventory taxonomic diversity in eukaryotic communities: a test for freshwater diatoms. *Molecular Ecology Resources* **13**: 607-619. 10.1111/1755-0998.12105.
- Kilham SS, Kreeger DA, Lynn SG, Goulden CE, Herrera L. 1998. COMBO: a defined freshwater culture medium for algae and zooplankton. *Hydrobiologia* **377**: 147-159. 10.1023/a:1003231628456.
- Kim BY, Park SK, Norton TA, Choi HG. 2011. Effects of temporary and periodic emersion on the growth of *Fucus spiralis* and *Pelvetia canaliculata* germlings. *Algae* **26**: 193-200. 10.4490/algae.2011.26.2.193.
- King L, Clarke G, Bennion H, Kelly M, Yallop M. 2006. Recommendations for sampling littoral diatoms in lakes for ecological status assessments. *Journal of Applied Phycology* **18**: 15-25. 10.1007/s10811-005-9009-3.
- Kirrolia A, Bishnoi NR, Singh N. 2011. Salinity as a factor affecting the physiological and biochemical traits of *Scenedesmus quadricauda*. *J Algal Biomass Utln* **2**: 28-34.
- Kirst GO. 1990. Salinity Tolerance of Eukaryotic Marine-Algae. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **41**: 21-53. 10.1146/annurev.pp.41.060190.000321.
- Klochkova TA, Kim GH. 2005. Ornamented Resting Spores of a Green Alga, *Chlorella* sp., Collected from the Stone Standing Buddha Statue at Jungwon Miruksazi in Korea. *Algae* **20**: 295-298. 10.4490/algae.2005.20.4.295.
- Kloster M, Kauer G, Beszteri B. 2014. SHERPA: an image segmentation and outline feature extraction tool for diatoms and other objects. *Bmc Bioinformatics* **15**: 17. 10.1186/1471-2105-15-218.
- Knowles EJ, Castenholz RW. 2008. Effect of exogenous extracellular polysaccharides on the desiccation and freezing tolerance of rock-inhabiting phototrophic microorganisms. *Fems Microbiol Ecol* **66**: 261-270. 10.1111/j.1574-6941.2008.00568.x.
- Kociolek JP, Stoermer EF. 2010. Variation and Polymorphisme in Diatoms: the Triple Helix of Development, Genetics and Environment. A review of the Literature. *Vie Et Milieu-Life and Environment* **60**: 75-87.
- Kolkwitz R, Marsson M. 1909. Ökologie der tierischen Saprobien. Beiträge zur Lehre von der biologischen Gewässerbeurteilung. *Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie und Hydrographie* **2**: 126-152. 10.1002/iroh.19090020108.

- Komárek J, Anagnostidis K. 2000. *Cyanoprokaryota 1. Teil: Chroococcales*. Fischer, G.: Stuttgart.
- Krammer K, Lange-Bertalot H. 1986. *Bacillariophyceae. 2/1. Naviculaceae*. Gustav Fischer Verlag: Stuttgart.
- Krammer K, Lange-Bertalot H. 1988. *Bacillariophyceae. 2/2. Bacillariaceae, Epithemiaceae, Surirellaceae*. Gustav Fischer Verlag: Stuttgart.
- Krammer K, Lange-Bertalot H. 1991. *Bacillariophyceae. 2/4. Achnantheaceae, kritische Ergänzungen zu Navicula (Lineolatae) und Gomphonema*. Gustav Fischer Verlag: Stuttgart.
- Kumar K, Kumar M, Kim S-R, Ryu H, Cho Y-G. 2013. Insights into genomics of salt stress response in rice. *Rice* **6**. 10.1186/1939-8433-6-27.
- Kumar KS, Dahms H-U, Lee J-S, Kim HC, Lee WC, Shin K-H. 2014. Algal photosynthetic responses to toxic metals and herbicides assessed by chlorophyll a fluorescence. *Ecotox Environ Safe* **104**: 51-71. 10.1016/j.ecoenv.2014.01.042.
- Lacoursiere S, Lavoie I, Rodriguez MA, Campeau S. 2011. Modeling the response time of diatom assemblages to simulated water quality improvement and degradation in running waters. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **68**: 487-497. 10.1139/f10-162.
- Lake PS. 2000. Disturbance, patchiness, and diversity in streams. *J N Am Benthol Soc* **19**: 573-592. 10.2307/1468118.
- Lake PS. 2003. Ecological effects of perturbation by drought in flowing waters. *Freshwater Biol* **48**: 1161-1172. 10.1046/j.1365-2427.2003.01086.x.
- Langlois C. 2006. Fiche Diatomées. Université Paris Diderot, Paris.
- Laplace-Treytore C, Chauvin C, Menay M, Dutartre A, Moreau L. 2010. Standard protocol for sampling and conservation of phytoplankton in large river for application of the WFD: Document of the working group DCE-ESC Version 2. p. 19. CEMAGREF, Antony, France.
- Larned ST, Datry T, Arscott DB, Tockner K. 2010. Emerging concepts in temporary-river ecology. *Freshwater Biol* **55**: 717-738. 10.1111/j.1365-2427.2009.02322.x.
- Larned ST, Datry T, Robinson CT. 2007. Invertebrate and microbial responses to inundation in an ephemeral river reach in New Zealand: effects of preceding dry periods. *Aquatic Sciences* **69**: 554-567. 10.1007/s00027-007-0930-1.
- Lavoie I, Campeau S, Grenier M, Dillon PJ. 2006. A diatom-based index for the biological assessment of eastern Canadian rivers: an application of correspondence analysis (CA). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **63**: 1793-1811. 10.1139/f06-084.

- Lavoie I, Campeau S, Zugic-Drakulic N, Winter JG, Fortin C. 2014. Using diatoms to monitor stream biological integrity in Eastern Canada: An overview of 10 years of index development and ongoing challenges. *Science of the Total Environment* **475**: 187-200. 10.1016/j.scitotenv.2013.04.092.
- Lavoie I, Grenier M, Campeau S, Dillon PJ. 2010. The Eastern Canadian Diatom Index (IDEC) Version 2.0: Including Meaningful Ecological Classes and an Expanded Coverage Area that Encompasses Additional Geological Characteristics. *Water Quality Research Journal of Canada* **45**: 463-477.
- Lavoie I, Somers KM, Paterson AM, Dillon PJ. 2005. Assessing scales of variability in benthic diatom community structure. *Journal of Applied Phycology* **17**: 509-513. 10.1007/s10811-005-9001-y.
- Lear G, Dopheide A, Ancion P-Y, Roberts K, Washington V, Smith J, Lewis GD. 2012. Biofilms in Freshwater: Their Importance for the Maintenance and Monitoring of Freshwater Health. in *Microbial Biofilms: Current Research and Applications* (eds. Lear G, Lewis GD), pp. 129-151. Caister Academic Press, Caister.
- Leclercq L, Maquet B. 1987. Deux nouveaux indices chimiques et diatomiques de qualité d'eau courante. application au samson et ses affluents (Bassin de la Meuse Belge). Comparaison avec d'autres indices chimiques biocénotiques et diatomiques. *Document de travail* **38**: 1-113.
- Lecoite C, Coste M, Prygiel J. 1993. OMNIDIA - Software for taxonomy, calculation of diatom indexes and inventories management. *Hydrobiologia* **269**: 509-513. DOI: 10.1007/bf00028048.
- Ledger ME, Brown LE, Edwards FK, Milner AM, Woodward G. 2013. Drought alters the structure and functioning of complex food webs. *Nat Clim Chang* **3**: 223-227. 10.1038/nclimate1684.
- Ledger ME, Harris RML, Armitage PD, Milner AM. 2008. Disturbance frequency influences patch dynamics in stream benthic algal communities. *Oecologia* **155**: 809-819. 10.1007/s00442-007-0950-5.
- Leflaive J, Céréghino R, Danger M, Lacroix G, Ten-Hage L. 2005. Assessment of Self-Organizing Maps to analyze sole-carbon source utilization profiles. *Journal of Microbiological Methods* **62**: 89-102.
- Leflaive J, Danger M, Lacroix G, Lyautey E, Oumarou C, Ten-Hage L. 2008. Nutrient effects on the genetic and functional diversity of aquatic bacterial communities. *FEMS Microbiology Ecology* **66**: 379-390. 10.1111/j.1574-6941.2008.00593.x.
- Leflaive J, Ten-Hage L. 2007. Algal and cyanobacterial secondary metabolites in freshwaters: a comparison of allelopathic compounds and toxins. *Freshwater Biology* **52**: 199-214. 10.1111/j.1365-2427.2006.01689.x.



- Lenoir A, Coste M. 1996. Development of a practical diatom index of overall water quality applicable to the French national water board network in *Use of Algae for Monitoring Rivers II* (eds. Whitton BA, Rott E), pp. 29-43. Institut für Botanik - Universität Innsbruck Innsbruck.
- Levitt J. 1980. *Responses of plants to environmental stresses*. Academic Press: New York.
- Levkov Z, Ector L. 2010. A comparative study of Reimeria species (Bacillariophyceae). *Nova Hedwigia* **90**: 469-489. 10.1127/0029-5035/2010/0090-0469.
- Lewis LA, Trainor FR. 2012. Survival of *Protosiphon botryoides* (Chlorophyceae, Chlorophyta) from a Connecticut soil dried for 43 years. *Phycologia* **51**: 662-665. 10.2216/11-108.1.
- Linke S, Bailey RC, Schwindt J. 1999. Temporal variability of stream bioassessments using benthic macroinvertebrates. *Freshwater Biology* **42**: 575-584. 10.1046/j.1365-2427.1999.00492.x.
- Lobo EA, Callegaro VLM, Hermany G, Bes D, Wetzel CA, Oliveira MA. 2004. Use of epilithic diatoms as bioindicators from lotic systems in southern Brazil, with special emphasis on eutrophication. *Acta Botânica Brasílica* **16**: 25-40.
- Lock MA. 1993. Attached microbial communities in rivers. in *Aquatic microbiology - an ecological approach* (ed. Ford TE), pp. 113-138. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK.
- Lokhande VH, Gor BK, Desai NS, Nikam TD, Suprasanna P. 2013. Sesuvium portulacastrum, a plant for drought, salt stress, sand fixation, food and phytoremediation. A review. *Agronomy for Sustainable Development* **33**: 329-348. 10.1007/s13593-012-0113-x.
- López-Doval J, Ginebreda A, Caquet T, Dahm C, Petrovic M, Barceló D, Muñoz I. 2013. Pollution in mediterranean-climate rivers. *Hydrobiologia* **719**: 427-450. 10.1007/s10750-012-1369-5.
- Lowe WH, Likens GE. 2005. Moving headwater streams to the head of the class. *BioScience* **55**: 196-197. 10.1641/0006-3568(2005)055[0196:mhstth]2.0.co;2.
- Ludlam JP, Magoulick DD. 2010. Environmental conditions and biotic interactions influence ecosystem structure and function in a drying stream. *Hydrobiologia* **644**: 127-137. 10.1007/s10750-010-0102-5.
- Lund JWG. 1954. The seasonal cycle of the plankton diatom, *Melosira italica* (Ehr.) Kütz, subsp. *subarctica*. *J Ecol* **38**: 15-35.
- Lutz C, Seidnitz HK, Meindl U. 1997. Physiological and structural changes in the chloroplast of the green alga *Micrasterias denticulata* induced by UV-B simulation. *Plant Ecol* **128**: 54-64. 10.1023/A:1009754722357.

- Mann DG. 2010. Discovering diatom species: is a long history of disagreements about species-level taxonomy now at an end? *Plant Ecology and Evolution* **143**: 251-264. 10.5091/plecevo.2010.405.
- Mann DG, Vanormelingen P. 2013. An Inordinate Fondness? The Number, Distributions, and Origins of Diatom Species. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **60**: 414-420. 10.1111/jeu.12047.
- Manoylov KM. 2014. Taxonomic identification of algae (morphological and molecular): species concepts, methodologies, and their implications for ecological bioassessment. *Journal of Phycology* **50**: 409-424. 10.1111/jpy.12183.
- Maria Fernanda P. 2012. Harmful effects of UV radiation in Algae and aquatic macrophytes – A review. *Emir J Food Agric* **24**: 510-526. 10.9755/ejfa.v24i6.14671.
- Marxsen J, Zoppini A, Wilczek S. 2010. Microbial communities in streambed sediments recovering from desiccation. *Fems Microbiol Ecol* **71**: 374-386. 10.1111/j.1574-6941.2009.00819.x.
- Matono P, Bernardo JM, Oberdorff T, Ilheu M. 2012. Effects of natural hydrological variability on fish assemblages in small Mediterranean streams: Implications for ecological assessment. *Ecological Indicators* **23**: 467-481. DOI: 10.1016/j.ecolind.2012.04.024.
- Mc Cormick PV, Cairns J. 1994. Algae as indicators of environmental-change. *Journal of Applied Phycology* **6**: 509-526. 10.1007/bf02182405.
- Mc Donough OT, Hosen JD, Palmer MA. 2011. Temporary Streams: The Hydrology, Geography, and Ecology of Non-Perennially Flowing Waters in *Rivers Ecosystems: Dynamics, Management and Conservation* (eds. Elliot SE, Martin LE), pp. 259-290. Nova Science Publishers, Hauppauge, NY.
- McCandless EL. 1981. Polysaccharides of the seaweeds. in *The Biology of Seaweeds* (eds. Lobban CS, Wynne MJ), pp. 559-588. University of California Press, Berkeley.
- McCully P. 1996. Rivers no more: the environmental effects of dams. in *Silenced rivers: the ecology and politics of large dams* (ed. McCully P), pp. 29-64. Zed Book, London, UK.
- McKew BA, Taylor JD, McGenity TJ, Underwood GJC. 2011. Resistance and resilience of benthic biofilm communities from a temperate saltmarsh to desiccation and rewetting. *Isme J* **5**: 30-41. 10.1038/ismej.2010.91.
- McQuoid MR, Hobson LA. 1996. Diatom resting stages. *J Phycol* **32**: 889-902. 10.1111/j.0022-3646.1996.00889.x.
- Mendes T, Calapez AR, Elias CL, Almeida SFP, Feio MJ. 2014. Comparing alternatives for combining invertebrate and diatom assessment in stream quality classification. *Marine and Freshwater Research* **65**: 612-623. 10.1071/mf13135.

- Mobjerg N, Halberg KA, Jorgensen A, Persson D, Bjorn M, Ramlov H, Kristensen RM. 2011. Survival in extreme environments - on the current knowledge of adaptations in tardigrades. *Acta Physiologica* **202**: 409-420. 10.1111/j.1748-1716.2011.02252.x.
- Moisander PH, McClinton E, Paerl HW. 2002. Salinity effects on growth, photosynthetic parameters, and nitrogenase activity in estuarine planktonic cyanobacteria. *Microbial Ecol* **43**: 432-442. 10.1007/s00248-001-1044-2.
- Molino PJ, Wetherbee R. 2008. The biology of biofouling diatoms and their role in the development of microbial slimes. *Biofouling* **24**: 365-379. 10.1080/08927010802254583.
- Mondy CP, Villeneuve B, Archaimbault V, Usseglio-Polatera P. 2012. A new macroinvertebrate-based multimetric index (I2M2) to evaluate ecological quality of French wadeable streams fulfilling the WFD demands: A taxonomical and trait approach. *Ecological Indicators* **18**: 452-467. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecolind.2011.12.013>.
- Morin S, Vivas-Nogues M, Duong TT, 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**: 179-187. 10.1127/1863-9135/2007/0168-0179.
- Morison MO, Sheath RG. 1985. Responses to desiccation stress by *Klebsormidium rivulare* (Ulotrichales, Chlorophyta) from a Rhode-Island stream. *Phycologia* **24**: 129-145. 10.2216/i0031-8884-24-2-129.1.
- Mosisch TD. 2001. Effects of desiccation on stream epilithic algae. *New Zeal J Mar Fresh* **35**: 173-179. 10.1080/00288330.2001.9516987.
- Munns R. 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environ* **25**: 239-250. 10.1046/j.0016-8025.2001.00808.x.
- Murray RE, Cooksey KE, Priscu JC. 1986. Stimulation of Bacterial-DNA Synthesis by Algal Exudates in Attached Algal-Bacterial Consortia. *Applied and Environmental Microbiology* **52**: 1177-1182.
- Mykra H, Saarinen T, Tolkkinen M, McFarland B, Hamalainen H, Martinmaki K, Klove B. 2012. Spatial and temporal variability of diatom and macroinvertebrate communities: How representative are ecological classifications within a river system? *Ecological Indicators* **18**: 208-216. 10.1016/j.ecolind.2011.11.007.
- Nadeau TL, Rains MC. 2007. Hydrological connectivity between headwater streams and downstream waters: How science can inform policy. *Journal of the American Water Resources Association* **43**: 118-133. 10.1111/j.1752-1688.2007.00010.x.

- Nelson DR, Mengistu S, Ranum P, Celio G, Mashek M, Mashek D, Lefebvre PA. 2013. New lipid-producing, cold-tolerant yellow-green alga isolated from the rocky mountains of colorado. *Biotechnology Progress* **29**: 853-861. 10.1002/btpr.1755.
- Nikolaev YA, Plakunov VK. 2007. Biofilm - "City of microbes" or an analogue of multicellular organisms? *Microbiology* **76**: 125-138. 10.1134/s0026261707020014.
- Nikolaidis NP, Demetropoulou L, Froebrich J, Jacobs C, Gallart F, Prat N, Lo Porto A, Campana C, Papadoulakis V, Skoulikidis N, Davy T, Bidoglio G, Bouraoui F, Kirkby M *et al.* 2013. Towards sustainable management of Mediterranean river basins: policy recommendations on management aspects of temporary streams. *Water Policy* **15**: 830-849. 10.2166/wp.2013.158.
- Norris RH, Hawkins CP. 2000. Monitoring river health. *Hydrobiologia* **435**: 5-17. 10.1023/a:1004176507184.
- Novais MH, Morais MM, Rosado J, Dias LS, Hoffmann L, Ector L. 2014. Diatoms of Temporary and Permanent Watercourses in Southern Europe (Portugal). *River Research and Applications*: n/a-n/a. 10.1002/rra.2818.
- Omernik JM. 2004. Perspectives on the nature and definition of ecological regions. *Environmental Management* **34**: S27-S38. 10.1007/s00267-003-5197-2.
- Pardo I, Gomez-Rodriguez C, Wasson JG, Owen R, van de Bund W, Kelly M, Bennett C, Birk S, Buffagni A, Erba S, Mengin N, Murray-Bligh J, Ofenboeck G. 2012. The European reference condition concept: A scientific and technical approach to identify minimally-impacted river ecosystems. *Science of the Total Environment* **420**: 33-42. 10.1016/j.scitotenv.2012.01.026.
- Parlement européen C. 2000. Directive 2000/60/EC établissant un cadre pour une politique communautaire dans le domaine de l'eau., pp. 1-73. Journal Officiel des Communautés Européennes.
- Passy SI. 2007. Diatom ecological guilds display distinct and predictable behavior along nutrient and disturbance gradients in running waters. *Aquatic Botany* **86**: 171-178. 10.1016/j.aquabot.2006.09.018.
- Passy SI, Bode RW. 2004. Diatom model affinity (DMA), a new index for water quality assessment. *Hydrobiologia* **524**: 241-251. 10.1023/B:HYDR.0000036143.60578.e0.
- Paule A, Lamy A, Roubex V, Delmas F, Rols J-L. 2014. Influence of the natural growth environment on the sensitivity of phototrophic biofilm to herbicide. *Environmental Science and Pollution Research*. 10.1007/s11356-014-3429-z.
- Paule A, Lauga B, Ten-Hage L, Morchain J, Duran R, Paul E, Rols JL. 2011. A photosynthetic rotating annular bioreactor (Taylor-Couette type flow) for phototrophic biofilm cultures. *Water Research* **45**: 6107-6118. 10.1016/j.watres.2011.09.007.

- Paule A, Roubex V, Lauga B, Duran R, Delmas F, Paul E, Rols JL. 2013. Changes in tolerance to herbicide toxicity throughout development stages of phototrophic biofilms. *Aquatic Toxicology* **144-145**: 310-321. 10.1016/j.aquatox.2013.09.024.
- Peterson CG. 1987a. Gut passage and insect grazer selectivity of lotic diatoms. *Freshwater Biol* **18**: 455-460. 10.1111/j.1365-2427.1987.tb01330.x
- Peterson CG. 1987b. Influences of Flow Regime on Development and Desiccation Response of Lotic Diatom Communities. *Ecology* **68**: 946-954. 10.2307/1938366.
- Peterson CG. 1996. Response of Benthic Algal Communities to Natural Physical Disturbance. in *Algal Ecology: Freshwater Benthic Ecosystems* (ed. R. J. Stevenson MLB, & R. L. Lowe). Academic Press, San Diego, CA.
- Peterson CG, Boulton AJ. 1999. Stream permanence influences microalgal food availability to grazing tadpoles in arid-zone springs. *Oecologia* **118**: 340-352. 10.1007/s004420050735.
- Peterson G, Allen CR, Holling CS. 1998. Ecological resilience, biodiversity, and scale. *Ecosystems* **1**: 6-18. 10.1007/s100219900002.
- Philibert A, Gell P, Newall P, Chessman B, Bate N. 2006. Development of diatom-based tools for assessing stream water quality in south-eastern Australia: assessment of environmental transfer functions. *Hydrobiologia* **572**: 103-114. 10.1007/s10750-006-0371-1.
- Pichrtova M, Remias D, Lewis LA, Holzinger A. 2013. Changes in Phenolic Compounds and Cellular Ultrastructure of Arctic and Antarctic Strains of *Zygnema* (Zygnematophyceae, Streptophyta) after Exposure to Experimentally Enhanced UV to PAR Ratio. *Microbial Ecol* **65**: 68-83. 10.1007/s00248-012-0096-9.
- Pickett-Heaps JD, West JA, Wilson SM, McBride DL. 2001. Time-lapse videomicroscopy of cell (spore) movement in red algae. *Eur J Phycol* **36**: 9-22. 10.1080/09670260110001735148.
- Pignata C, Morin S, Scharl A, Traversi D, Schiliro T, Degan R, Bartley P, Tu M, Liu H, Peres F, Coste M, Liu W, Gilli G. 2013. Application of European biomonitoring techniques in China: Are they a useful tool? *Ecological Indicators* **29**: 489-500. 10.1016/j.ecolind.2013.01.024.
- Pimm SL. 1984. The complexity and stability of ecosystems. *Nature* **307**: 321-326. 10.1038/307321a0.
- Potapova M, Charles DF. 2007. Diatom metrics for monitoring eutrophication in rivers of the United States. *Ecological Indicators* **7**: 48-70. 10.1016/j.ecolind.2005.10.001.
- Potts M. 1994. Desiccation Tolerance of Prokaryotes. *Microbiol Rev* **58**: 755-805.
- Potts M. 1999. Mechanisms of desiccation tolerance in cyanobacteria. *Eur J Phycol* **34**: 319-328. 10.1017/s0967026299002267.

- Pouličková A, Hašler P, Lysáková M, Spears B. 2008. The ecology of freshwater epipelagic algae: an update. *Phycologia* **47**: 437-450. 10.2216/07-59.1.
- Power ME, Holomuzki JR, Lowe RL. 2013. Food webs in Mediterranean rivers. *Hydrobiologia* **719**: 119-136. 10.1007/s10750-013-1510-0.
- Power ME, Parker MS, Dietrich WE. 2008. Seasonal reassembly of a river food web: Floods, droughts, and impacts of fish. *Ecological Monographs* **78**: 263-282. 10.1890/06-0902.1.
- Prakash B, Veeregowda BM, Krishnappa G. 2003. Biofilms: A survival strategy of bacteria. *Curr Sci India* **85**: 1299-1307.
- Prat N, Gallart F, Von Schiller D, Polesello S, García-Roger EM, Latron J, Rieradevall M, Llorens P, Barberá GG, Brito D, De Girolamo AM, Dieter D, Lo Porto A, Buffagni A *et al.* 2014. THE MIRAGE TOOLBOX: AN INTEGRATED ASSESSMENT TOOL FOR TEMPORARY STREAMS. *River Research and Applications*: n/a-n/a. 10.1002/rra.2757.
- Prat N, Munne A. 2014. Biomonitoring of water quality in Iberian rivers: Learned lessons. *Limnetica* **33**: 47-64.
- Preston-Mafham J, Boddy L, Randerson PF. 2002. Analysis of microbial community functional diversity using sole-carbon-source utilisation profiles - a critique. *Fems Microbiology Ecology* **42**: 1-14. 10.1111/j.1574-6941.2002.tb00990.x.
- Proctor MCF, Oliver MJ, Wood AJ, Alpert P, Stark LR, Cleavitt NL, Mishler BD. 2007. Desiccation-tolerance in bryophytes: a review. *Bryologist* **110**: 595-621. 10.1639/0007-2745(2007)110[595:dibar]2.0.co;2.
- Proia L, Vilches C, Boninneau C, Kantiani L, Farre M, Romani AM, Sabater S, Guasch H. 2013. Drought episode modulates the response of river biofilms to triclosan. *Aquatic Toxicology* **127**: 36-45. 10.1016/j.aquatox.2012.01.006.
- Pruitt BA, Miller SJ, Theiling CH, Fischenich JC. 2012. The Use of Reference Ecosystems as a Basis for Assessing Restoration Benefits. in *EBA Technical Notes Collection*, p. 24. U.S. Army Engineer Research and Development Center. <http://cw-environment.usace.army.mil/eba/>, Vicksburg, MS.
- Prygiel J, Carpentier P, Almeida S, Coste M, Druart JC, Ector L, Guillard D, Honore MA, Iserentant R, Ledeganck P, Lalanne-Cassou C, Lesniak C, Mercier I, Moncaut P *et al.* 2002. Determination of the biological diatom index (IBD NF T 90-354): results of an intercomparison exercise. *Journal of Applied Phycology* **14**: 27-39. 10.1023/a:1015277207328.
- Prygiel J, Coste M. 1996. Les diatomées et les indices diatomiques dans les réseaux de mesure de la qualité des cours d'eau français : Historique et Avenir. *Bulletin Français de la Pêche Piscicole* **341/342**: 65-79.

- Prygiel M, Coste M. 2000. *Guide méthodologique pour la mise en oeuvre de l'indice biologique diatomées NF T90-354*.
- Pusch M, Fiebig D, Brettar I, Eisenmann H, Ellis BK, Kaplan LA, Lock MA, Naegeli MW, Traunspurger W. 1998. The role of micro-organisms in the ecological connectivity of running waters. *Freshwater Biology* **40**: 453-495. 10.1046/j.1365-2427.1998.00372.x.
- Rajendran UM, Kathirvel E, Anand N. 2007. Desiccation-induced changes in antioxidant enzymes, fatty acids, and amino acids in the cyanobacterium *Tolypothrix scytonemoides*. *World J Microb Biot* **23**: 251-257. 10.1007/s11274-006-9221-6.
- Rakleova G, Pouneva I, Dobrev N, Tchorbadjieva M. 2013. Differentially Secreted Proteins of Antarctic and Mesophilic Strains of *Synechocystis salina* and *Chlorella vulgaris* after UV-B and Temperature Stress Treatment. *Biotechnol Biotec Eq* **27**: 3669-3680. 10.5504/bbeq.2013.0002.
- Ramette A. 2007. Multivariate analyses in microbial ecology. *Fems Microbiology Ecology* **62**: 142-160. 10.1111/j.1574-6941.2007.00375.x.
- Ras M, Steyer J-P, Bernard O. 2013. Temperature effect on microalgae: a crucial factor for outdoor production. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* **12**: 153-164. 10.1007/s11157-013-9310-6.
- Rastogi RP, Richa, Sinha RP, Singh SP, Hader DP. 2010. Photoprotective compounds from marine organisms. *J Ind Microbiol Biotechnol* **37**: 537-558. 10.1007/s10295-010-0718-5.
- Rautio M, Dufresne F, Laurion I, Bonilla S, Vincent WF, Christoffersen KS. 2011. Shallow freshwater ecosystems of the circumpolar Arctic. *Ecoscience* **18**: 204-222. 10.2980/18-3-3463.
- Rees GN, Watson GO, Baldwin DS, Mitchell AM. 2006. Variability in sediment microbial communities in a semipermanent stream: impact of drought. *Journal of the North American Benthological Society* **25**: 370-378. 10.1899/0887-3593(2006)25[370:vismci]2.0.co;2.
- Reichardt E. 1997. Taxonomic revision of the species complex involving *Gomphonema pumilum* (Bacillariophyceae). *Nova Hedwigia* **65**: 99-129.
- Renaud SM, Thinh LV, Lambrinidis G, Parry DL. 2002. Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures. *Aquaculture* **211**: 195-214. 10.1016/s0044-8486(01)00875-4.
- Reynoldson TB, Bailey RC, Day KE, Norris RH. 1995. Biological Guidelines for Fresh-water Sediment Based on Benthic Assessment of Sediment (the BEAST) Using a

- Multivariate Approach for Predicting Biological State. *Australian Journal of Ecology* **20**: 198-219. 10.1111/j.1442-9993.1995.tb00532.x.
- Reynoldson TB, Norris RH, Resh VH, Day KE, Rosenberg DM. 1997. The reference condition: a comparison of multimetric and multivariate approaches to assess water-quality impairment using benthic macroinvertebrates. *Journal of the North American Benthological Society* **16**: 833-852. 10.2307/1468175.
- Richaume A, Pourcelot A, Rama R, Nazaret S. 2006. Évaluation des modifications quantitatives, qualitatives et fonctionnelles induites par la conservation de consortiums bactériens extraits de sols. *Les Actes du BRG* **6**: 371-389.
- Rimet F. 2012. Recent views on river pollution and diatoms. *Hydrobiologia* **683**: 1-24. 10.1007/s10750-011-0949-0.
- Rimet F, Ector L, Cauchie HM, Hoffmann L. 2009. Changes in diatom-dominated biofilms during simulated improvements in water quality: implications for diatom-based monitoring in rivers. *Eur J Phycol* **44**: 567-577. 10.1080/09670260903198521.
- Ritz C. 2010. Effectiveness of RIVPACS Predictive Models to Evaluate Diatom Response to Nutrient Stress in Coastal California Streams. in *Coastal and Watershed Science and Policy*, p. 82. California State University Monterey Bay, California.
- Robson BJ. 2000. Role of residual biofilm in the recolonization of rocky intermittent streams by benthic algae. *Mar Freshwater Res* **51**: 724-732. 10.1071/MF00012.
- Robson BJ, Chester ET, Mitchell BD, Matthews TG. 2013. Disturbance and the role of refuges in mediterranean climate streams. *Hydrobiologia* **719**: 77-91. 10.1007/s10750-012-1371-y.
- Robson BJ, Matthews TG. 2004. Drought refuges affect algal recolonization in intermittent streams. *Riv Res Applic* **20**: 753-763. 10.1002/rra.789.
- Robson BJ, Matthews TG, Lind PR, Thomas NA. 2008. Pathways for algal recolonization in seasonally-flowing streams. *Freshwater Biol* **53**: 2385-2401. 10.1111/j.1365-2427.2008.02061.x.
- Roháček K, Barták M. 1999. Technique of the Modulated Chlorophyll Fluorescence: Basic Concepts, Useful Parameters, and Some Applications. *Photosynthetica* **37**: 339-363. 10.1023/A:1007172424619.
- Romaní AM, Amalfitano S, Artigas J, Fazi S, Sabater S, Timoner X, Ylla I, Zoppini A. 2012. Microbial biofilm structure and organic matter use in mediterranean streams. *Hydrobiologia* **719**: 43-58. 10.1007/s10750-012-1302-y.
- Romaní AM, Sabater S. 1997. Metabolism recovery of a stromatolitic biofilm after drought in a Mediterranean stream. *Archiv fur Hydrobiologie* **140**: 261-271.



- Rott E, Hofmann G, Pall K, Pfister P, Pipp E. 1997. *Indikationslisten für Aufwuchsalgen in österreichischen Fließgewässern*. Bundesministerium für Land- u. Forstwirtschaft, Wasserwirtschaftskataster: Wien.
- Rott E, Pipp E, Pfister P. 2003. Diatom methods developed for river quality assessment in Austria and a cross-check against numerical trophic indication methods used in Europe. *Algological Studies/Archiv für Hydrobiologie, Supplement Volumes* **110**: 91-115.
- Rott E, Pipp E, Pfister P, Van Dam H, Ortler K, Binder N, Pall K. 1999. *Indikationslisten für Aufwuchsalgen in österreichischen Fließgewässern*. Bundesministerium für Land- u. Forstwirtschaft, Wasserwirtschaftskataster: Wien.
- Roubeix V, Pesce S, Mazzella N, Coste M, Delmas F. 2012. Variations in Periphytic Diatom Tolerance to Agricultural Pesticides in a Contaminated River: an Analysis at Different Diversity Levels. *Fresenius Environmental Bulletin* **21**: 2090-2094.
- Round FE, Crawford R, Mann D. 1990. *The diatoms: Biology and morphology of the genera*. Cambridge University Press: New York.
- Rouquet P, Barthès J. 2012. Suivi de la qualité des cours d'eau du bassin versant du Tech et des petits fleuves côtiers. ASCONIT Consultants, Toulouges, France.
- Rousch JM, Bingham SE, Sommerfeld MR. 2004. Protein expression during heat stress in thermo-intolerant and thermo-tolerant diatoms. *J Exp Mar Biol Ecol* **306**: 231-243. 10.1016/j.jembe.2004.01.009.
- Ruaro R, Gubiani EA. 2013. A scientometric assessment of 30 years of the Index of Biotic Integrity in aquatic ecosystems: Applications and main flaws. *Ecological Indicators* **29**: 105-110. 10.1016/j.ecolind.2012.12.016.
- Rumeau A, Coste M. 1988. Introduction into the systematic of freshwater diatoms for a useful generic diatomic index. *Bulletin Français de la Pêche Piscicole* **309**: 1-69.
- Rykiel EJ. 1985. Towards a definition of ecological disturbance. *Australian Journal of Ecology* **10**: 361-365. 10.1111/j.1442-9993.1985.tb00897.x.
- Sabater S. 2008. Alterations of the global water cycle and their effects on river structure, function and services. *Freshwater Reviews* **1**: 75-88. 10.1608/FRJ-1.1.5.
- Sabater S, Guasch H, Muñoz I, Romaní A. 2006. Hydrology, light and the use of organic and inorganic materials as structuring factors of biological communities in Mediterranean streams. *Limnetica* **25**: 335-348.
- Sabater S, Tockner K. 2010. Effects of Hydrologic Alterations on the Ecological Quality of River Ecosystems in *Water Scarcity in the Mediterranean: Perspectives under Global Change* (eds. Sabater S, Barcelo D), pp. 15-39.

- Sala MM, Balague V, Pedros-Alio C, Massana R, Felipe J, Arin L, Illoul H, Estrada M. 2005. Phylogenetic and functional diversity of bacterioplankton during *Alexandrium* spp. blooms. *Fems Microbiology Ecology* **54**: 257-267. 10.1016/j.femsec.2005.04.005.
- Sarthou G, Timmermans KR, Blain S, Treguer P. 2005. Growth physiology and fate of diatoms in the ocean: a review. *Journal of Sea Research* **53**: 25-42. 10.1016/j.seares.2004.01.007.
- Sawai Y. 2001. Distribution of living and dead diatoms in tidal wetlands of northern Japan: relations to taphonomy. *Palaeogeography Palaeoclimatology Palaeoecology* **173**: 125-141. 10.1016/s0031-0182(01)00313-3.
- Schiefele S, Schreiner S. 1991. Use of diatoms for monitoring nutrient enrichment, acidification and impact of salt in rivers in Germany and Austria. in *Use of Algae for Monitoring Rivers* (eds. Whitton BA, Rott E, Friedrich G), pp. 103-110. Studia Student G.m.b.H, Innsbruck.
- Schimel J, Balsler TC, Wallenstein M. 2007. Microbial stress-response physiology and its implications for ecosystem function. *Ecology* **88**: 1386-1394. 10.1890/06-0219.
- Schowe KA, Harding JS. 2014. Development of two diatom-based indices: a biotic and a multimetric index for assessing mine impacts in New Zealand streams. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* **48**: 163-176. 10.1080/00288330.2013.852113.
- Schreiber U. 1998. Chlorophyll fluorescence: New instruments for special applications. in *Photosynthesis: Mechanisms and Effects* (ed. Garab G), pp. 4253-4258. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Schreiber U, Gademann R, Bird P, Ralph PJ, Larkum AWD, Kuhl M. 2002. Apparent light requirement for activation of photosynthesis upon rehydration of desiccated beachrock microbial mats. *J Phycol* **38**: 125-134. 10.1046/j.1529-8817.2002.01103.x.
- Schubert H, Fulda S, Hagemann M. 1993. Effects of Adaptation to Different Salt Concentrations on Photosynthesis and pigmentation of the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J Plant Physiol* **142**: 291-295. 10.1016/S0176-1617(11)80425-6.
- Schulte PM. 2014. What is environmental stress? Insights from fish living in a variable environment. *J Exp Biol* **217**: 23-34. 10.1242/jeb.089722.
- Shade A, Peter H, Allison SD, Baho D, Berga M, Buergermann H, Huber DH, Langenheder S, Lennon JT, Martiny JB, Matulich KL, Schmidt TM, Handelsman J. 2012. Fundamentals of microbial community resistance and resilience. *Front Microbiol* **3**. 10.3389/fmicb.2012.00417.

- Shafer DJ, Sherman TD, Wyllie-Echeverria S. 2007. Do desiccation tolerances control the vertical distribution of intertidal seagrasses? *Aquatic Botany* **87**: 161-166. 10.1016/j.aquabot.2007.04.003.
- Shannon CE, Weaver W. 1963. *The mathematical theory of communication*. University of Illinois Press: Urbana.
- Shephard KL. 1987. Evaporation of Water from the Mucilage of a Gelatinous Algal Community. *Brit Phycol J* **22**: 181-185. 10.1080/00071618700650221.
- Simpson EH. 1949. Measurement of Diversity. *Nature* **163**: 688-688. 10.1038/163688a0.
- Simpson JC, Norris RH. 2000. Biological assessment of water quality: development of AUSRIVAS models and outputs in *Assessing the biological quality of freshwaters: RIVPACS and similar techniques* (eds. Wright JF, Sutcliffe DW, Furse MT). Freshwater Biological Association, Ambleside.
- Sistrom WR, Griffiths M, Stanier RY. 1956. The Biology of a Photosynthetic Bacterium Which Lacks Colored Carotenoids. *J Cell Comp Physiol* **48**: 473-515. 10.1002/jcp.1030480309.
- Sládeček V. 1986. Diatoms as indicators of organic pollution. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica* **14**: 555-566.
- Snelder TH, Detry T, Lamouroux N, Larned ST, Sauquet E, Pella H, Catalogne C. 2013. Regionalization of patterns of flow intermittence from gauging station records. *Hydrology and Earth System Sciences* **17**: 2685-2699. 10.5194/hess-17-2685-2013.
- Soininen J. 2007. Environmental and spatial control of freshwater diatoms - A review. *Diatom Research* **22**: 473-490.
- Souffreau C, Vanormelingen P, Sabbe K, Vyverman W. 2013. Tolerance of resting cells of freshwater and terrestrial benthic diatoms to experimental desiccation and freezing is habitat-dependent. *Phycologia* **52**: 246-255. 10.2216/12-087.1.
- Souffreau C, Vanormelingen P, Verleyen E, Sabbe K, Vyverman W. 2010. Tolerance of benthic diatoms from temperate aquatic and terrestrial habitats to experimental desiccation and temperature stress. *Phycologia* **49**: 309-324. 10.2216/09-30.1.
- Spaulding SA, Lubinski DJ, Potapova M. 2010. Diatoms of the United States.
- Stanier RY, Kunisawa R, Mandel M, Cohenbaz G. 1971. Purification and properties of unicellular blue-green algae (Order Chroococcales). *Bacteriological Reviews* **35**: 171-205.
- Stanley EH, Fisher SG, Jones JB. 2004. Effects of water loss on primary production: A landscape-scale model. *Aquatic Sciences* **66**: 130-138. 10.1007/s00027-003-0646-9.
- Steinberg C, Schiefele S. 1988. Biological Indication of Trophic and Pollution of Running Waters. *Zeitschrift Fur Wasser Und Abwasser Forschung-Journal for Water and Wastewater Research* **21**: 227-234.

- Steinman AD, Mc Intire CD. 1990. Recovery of lotic periphyton communities after disturbance. *Environ Manage* **14**: 589-604. 10.1007/bf02394711.
- Stevenson J. 2014. Ecological assessments with algae: a review and synthesis. *Journal of Phycology* **50**: 437-461. 10.1111/jpy.12189.
- Stevenson RJ, Pan Y. 1999. Assessing environmental conditions in rivers and streams with diatoms. in *The diatoms: Application for the environmental and earth sciences* (eds. Stoermer EF, Smol JP), pp. 11-40. Cambridge University Press, Cambridge.
- Stevenson RJ, Peterson CG, Kirschtel DB, King CC, Tuchman NC. 1991. Density-Dependent Growth, Ecological Strategies, and Effects of Nutrients and Shading on Benthic Diatom Succession in Streams. *Journal of Phycology* **27**: 59-69. 10.1111/j.0022-3646.1991.00059.x.
- Steward AL, von Schiller D, Tockner K, Marshall JC, Bunn SE. 2012. When the river runs dry: human and ecological values of dry riverbeds. *Frontiers in Ecology and the Environment* **10**: 202-209. 10.1890/110136.
- Stoddard JL, Larsen DP, Hawkins CP, Johnson RK, Norris RH. 2006. Setting expectations for the ecological condition of streams: The concept of reference condition. *Ecological Applications* **16**: 1267-1276. 10.1890/1051-0761(2006)016[1267:seftec]2.0.co;2.
- Stoermer EF, Julius ML. 2003. Freshwater Algae of North America: Ecology and Classification in *Centric Diatoms* (eds. Wehr JD, Sheath RG), pp. 559-594. Academic Press, USA.
- Strandberg MT, Scott-Fordsmand JJ. 2002. Field effects of simazine at lower trophic levels - a review. *Sci Total Environ* **296**: 117-137. 10.1016/s0048-9697(02)00065-7.
- Sudhir P, Murthy SDS. 2004. Effects of salt stress on basic processes of photosynthesis. *Photosynthetica* **42**: 481-486. 10.1007/s11099-005-0001-6.
- Sundback K, Odmark S, Wulff A, Nilsson C, Wangberg SA. 1997. Effects of enhanced UVB radiation on a marine benthic diatom mat. *Mar Biol* **128**: 171-179. 10.1007/s002270050080.
- Takano K, Igarashi S, Mikami H, Hino S. 2003. Causation of reversal simultaneity for diatom biomass and density of *Phormidium tenue* during the warm season in eutrophic Lake Barato, Japan. *Limnology* **4**: 73-78. 10.1007/s10201-003-0094-1.
- Tamaru Y, Takani Y, Yoshida T, Sakamoto T. 2005. Crucial role of extracellular polysaccharides in desiccation and freezing tolerance in the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 7327-7333. 10.1128/aem.71.11.7327-7333.2005.

- Tan X, Ma PM, Xia XL, Zhang QF. 2014. Spatial Pattern of Benthic Diatoms and Water Quality Assessment Using Diatom Indices in a Subtropical River, China. *Clean-Soil Air Water* **42**: 20-28.
- Taylor J, Prygiel J, Vosloo A, de la Rey P, van Rensburg L. 2007a. Can diatom-based pollution indices be used for biomonitoring in South Africa? A case study of the Crocodile West and Marico water management area. *Hydrobiologia* **592**: 455-464. 10.1007/s10750-007-0788-1.
- Taylor JC. 2006. Towards the successful application of diatom-based biomonitoring in South Africa. North-West University, Potchestefstroom.
- Taylor JC, Harding WR, Archibald CGM. 2007b. A Methods Manual for the Collection, Preparation and Analysis of Diatom Samples. p. 49. Water Research Commission Pretoria, Republic of South Africa.
- Taylor JC, van Vuuren MSJ, Pieterse AJH. 2007c. The application and testing of diatom-based indices in the Vaal and Wilge Rivers, South Africa. *Water Sa* **33**: 51-60.
- Telesh I, Schubert H, Skarlato S. 2013. Life in the salinity gradient: Discovering mechanisms behind a new biodiversity pattern. *Estuar Coast Shelf S* **135**: 317-327. 10.1016/j.ecss.2013.10.013.
- Thomas K, Hall R. 2009. Evaluating Benthic Algal Bioassessment Protocols for use in Ontario Lakes. (ed. Biology Do). Ontario Ministry of the Environment, University of Waterloo.
- Thompson RC, Norton TA, Hawkins SJ. 2004. Physical stress and biological control regulate the producer-consumer balance in intertidal biofilms. *Ecology* **85**: 1372-1382. 10.1890/03-0279.
- Timoner X, Acuña V, Frampton L, Pollard P, Sabater S, Bunn SE. 2014. Biofilm functional responses to the rehydration of a dry intermittent stream. *Hydrobiologia*: 1-11. 10.1007/s10750-013-1802-4.
- Timoner X, Acuna V, Von Schiller D, Sabater S. 2012. Functional responses of stream biofilms to flow cessation, desiccation and rewetting. *Freshwater Biology* **57**: 1565-1578. 10.1111/j.1365-2427.2012.02818.x.
- Tison J, Giraudel JL, Coste M. 2008. Evaluating the ecological status of rivers using an index of ecological distance: An application to diatom communities. *Ecological Indicators* **8**: 285-291. 10.1016/j.ecolind.2007.02.006.
- Tockner K, Uehlinger U, Robinson CT, Tonolla D, Siber R, Peter FD. 2009. Introduction of European Rivers in *Rivers of Europe* (eds. Tockner K, Uehlinger U, Robinson CT), pp. 1-23. Elsevier Science, London.

- Touchette BW. 2007. Seagrass-salinity interactions: Physiological mechanisms used by submersed marine angiosperms for a life at sea. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **350**: 194-215. 10.1016/j.jembe.2007.05.037.
- Townsend SA, Gell PA. 2005. The role of substrate type on benthic diatom assemblages in the Daly and Roper Rivers of the Australian wet/dry tropics. *Hydrobiologia* **548**: 101-115. 10.1007/s10750-005-0828-7.
- Trainor FR, Gladych R. 1995. Survival of Algae in a Desiccated Soil - A 35-Year Study. *Phycologia* **34**: 191-192. 10.2216/i0031-8884-34-3-191.1.
- Trobajo R, Clavero E, Chepurinov VA, Sabbe K, Mann DG, Ishihara S, Cox EJ. 2009. Morphological, genetic and mating diversity within the widespread bioindicator *Nitzschia palea* (Bacillariophyceae). *Phycologia* **48**: 443-459. 10.2216/08-69.1.
- Tzoraki O, Nikolaidis NP. 2007. A generalized framework for modeling the hydrologic and biogeochemical response of a Mediterranean temporary river basin. *Journal of Hydrology* **346**: 112-121. 10.1016/j.jhydrol.2007.08.025.
- USEPA. 1974. Quality criteria for water. (ed. materials Oowah). US EPA, Washington DC.
- Utermöhl H. 1958. Zur vervollkommung der quantitativen Phytoplankton-Methodik. *Mitteilungen der Internationalen Vereinigung für Theoretische and Angewandte Limnologie* **9**: 1-38.
- Van Dam AA, Beveridge MCM, Azim ME, Verdegem MCJ. 2002. The potential of fish production based on periphyton. *Rev Fish Biol Fisher* **12**: 1-31. 10.1023/a:1022639805031.
- Van Dam H, Mertens A, Sinkeldam J. 1994. A coded checklist and ecological indicator values of freshwater diatoms from The Netherlands. *Neth J Aquat Ecol* **28**: 117-133. 10.1007/BF02334251.
- Van de Bund W, Solimini AG. 2007. Ecological Quality Ratios for Ecological Quality - Assessment in Inland and Marine Waters. (ed. Sustainability IfEa). European Commission, Luxembourg.
- Van der Grinten E, Janssen A, de Mutsert K, Barranguet C, Admiraal W. 2005. Temperature- and light-dependent performance of the cyanobacterium *Leptolyngbya foveolarum* and the diatom *Nitzschia perminuta* in mixed biofilms. *Hydrobiologia* **548**: 267-278. 10.1007/s10750-005-5324-6.
- Vanellander B, Creach V, Vanormelingen P, Ernst A, Chepurinov VA, Sahan E, Muyzer G, Stal LJ, Vyverman W, Sabbe K. 2009. Ecological Differentiation Between Sympatric Pseudocryptic Species in the Estuarine Benthic Diatom *Navicula phyllepta* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology* **45**: 1278-1289. 10.1111/j.1529-8817.2009.00762.x.

- Vighi M, Finizio A, Villa S. 2006. The evolution of the environmental quality concept: From the US EPA red book to the European Water Framework Directive. *Environmental Science and Pollution Research* **13**: 9-14. 10.1065/espr2006.01.003.
- Von Schiller D, Acuna V, Graeber D, Marti E, Ribot M, Sabater S, Timoner X, Tockner K. 2011. Contraction, fragmentation and expansion dynamics determine nutrient availability in a Mediterranean forest stream. *Aquatic Sciences* **73**: 485-497. 10.1007/s00027-011-0195-6.
- Von Stosch HA, Fecher K. 1979. "Internal thecae" of *Eunotia soleirolii* (Bacillariophyceae): development, structure and function as resting spores. *J Phycol* **15**: 233-243. 10.1111/j.1529-8817.1979.tb02631.x.
- Wang YK, Stevenson RJ, Metzmeier L. 2005. Development and evaluation of a diatom-based index of Biotic Integrity for the Interior Plateau Ecoregion, USA. *Journal of the North American Benthological Society* **24**: 990-1008. 10.1899/03-028.1.
- Wasson J-G, Chandesris A, Pella H, Blanc L. 2004. Les hydro-écorégions : une approche fonctionnelle de la typologie des rivières pour la Directive Cadre européenne sur l'Eau. *Ingénieries* **40**: 3-10.
- Wasson JG, Chandesris A, Garcia A, Pella H, Villeneuve B. 2007. Relationships between ecological and chemical status of surface waters. in *European Hydro-Ecoregions*, p. 43. Cemagref Lyon UR BEA/LHQ, Lyon.
- Watanabe T, Asai K, Houki A. 1988. Numerical water quality monitoring of organic pollution using diatom assemblage. in *Proceedings of the Ninth International Diatom Symposium 1986* (ed. Round FE), pp. 123-141. Koeltz Scientific Books, Koenigstein.
- Webb M, Thoms M, Reid M. 2012. Determining the ecohydrological character of aquatic refugia in a dryland river system: the importance of temporal scale. *Ecohydrology & Hydrobiology* **12**: 21-33. 10.2478/v10104-011-0005-8.
- Welsh DT. 2000. Ecological significance of compatible solute accumulation by microorganisms: from single cells to global climate. *Fems Microbiol Rev* **24**: 263-290. 10.1111/j.1574-6976.2000.tb00542.x.
- Wertz S, Degrange V, Prosser JI, Poly F, Commeaux C, Guillaumaud N, Le Roux X. 2007. Decline of soil microbial diversity does not influence the resistance and resilience of key soil microbial functional groups following a model disturbance. *Environmental Microbiology* **9**: 2211-2219. 10.1111/j.1462-2920.2007.01335.x.
- Williams DD. 1983. The natural-history of a nearctic temporary pond in Ontario with remarks on continental variation in such habitats. *Internationale Revue Der Gesamten Hydrobiologie* **68**: 239-253. 10.1002/iroh.19830680210.

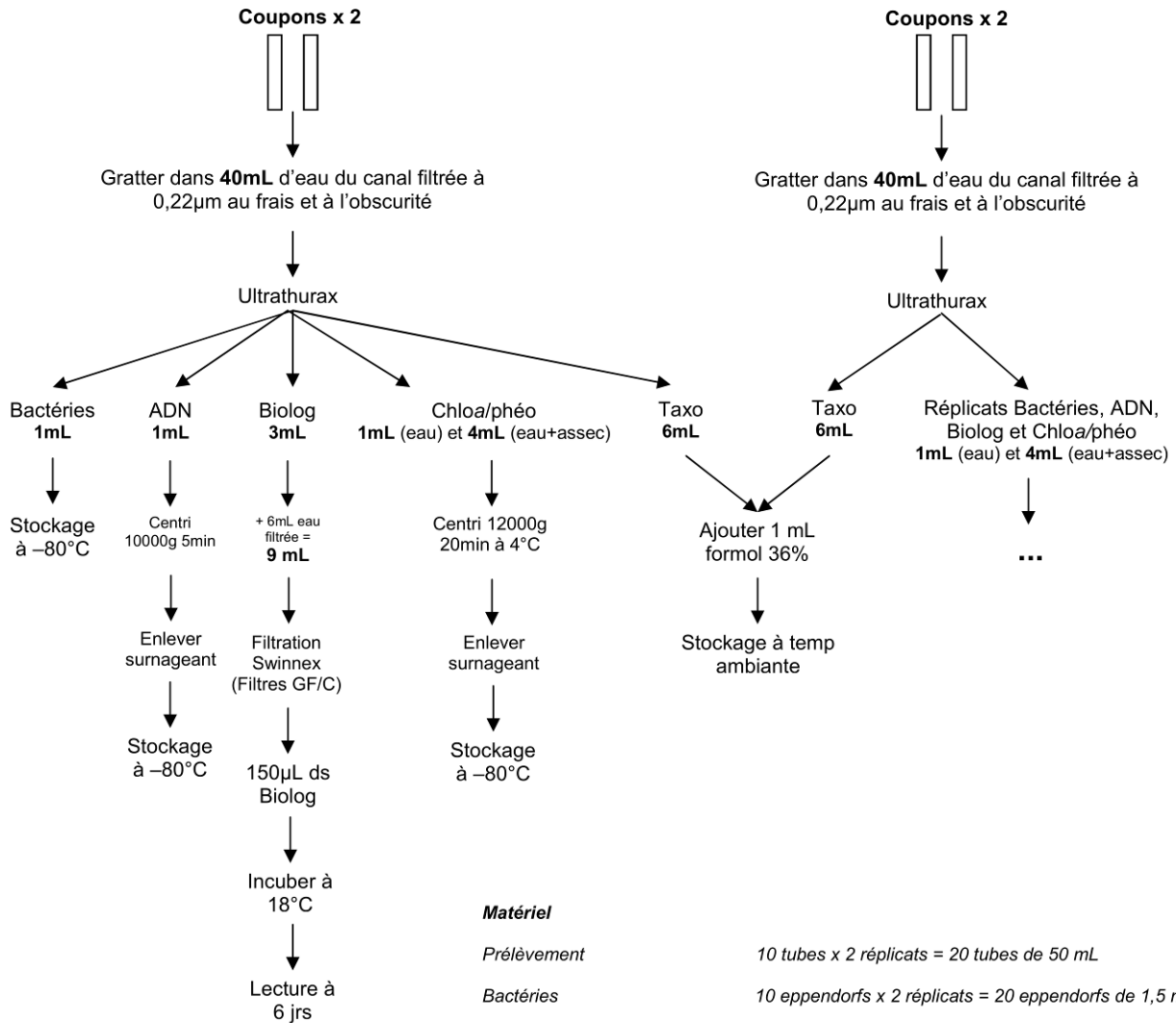
- Williams DD. 1996. Environmental constraints in temporary fresh waters and their consequences for the insect fauna. *Journal of the North American Benthological Society* **15**: 634-650. DOI: 10.2307/1467813.
- Wilson CJ, Holmes RW. 1981. The Ecological Importance of Distinguishing Between Living and Dead Diatoms in Estuarine Sediments. *British Phycological Journal* **16**: 345-349.
- Wright JF. 1995. Development and Use of a System for Predicting the Macroinvertebrate Fauna in Flowing Waters. *Australian Journal of Ecology* **20**: 181-197. 10.1111/j.1442-9993.1995.tb00531.x.
- Wu JT. 1999. A generic index of diatom assemblages as bioindicator of pollution in the Keelung River of Taiwan. *Hydrobiologia* **397**: 79-87. 10.1023/a:1003694414751.
- Wu NC, Cai QH, Fohrer N. 2012a. Development and evaluation of a diatom-based index of biotic integrity (D-IBI) for rivers impacted by run-of-river dams. *Ecological Indicators* **18**: 108-117. 10.1016/j.ecolind.2011.10.013.
- Wu NC, Schmalz B, Fohrer N. 2012b. Development and testing of a phytoplankton index of biotic integrity (P-IBI) for a German lowland river. *Ecological Indicators* **13**: 158-167. 10.1016/j.ecolind.2011.05.022.
- WynnWilliams DD. 1996. Response of pioneer soil microalgal colonists to environmental change in Antarctica. *Microbial Ecology* **31**: 177-188.
- Zacher K, Wulff A, Molis M, Hanelt D, Wiencke C. 2007. Ultraviolet radiation and consumer effects on a field-grown intertidal macroalgal assemblage in Antarctica. *Glob Chang Biol* **13**: 1201-1215. 10.1111/j.1365-2486.2007.01349.x.
- Zaneveld JS. 1969. Factors Controlling the Delimitation of Littoral Benthic Marine Algal Zonation. *American Zoologist* **9**: 367-391. 10.1093/icb/9.2.367.
- Zanon JE, Simoes NR, Rodrigues L. 2013. Effects of recurrent disturbances on the periphyton community downstream of a dammed watercourse. *Brazilian Journal of Biology* **73**: 253-258. 10.1590/S1519-69842013000200005.
- Zelinka M, Marvan P. 1961. Zur Prazisierung der biologischen Klassifikation des Reinheit fliessender Gewasser. *Archiv fur Hydrobiologie* **57**: 389-407.
- Zhao XM, Bi YH, Chen L, Hu S, Hu ZY. 2008. Responses of photosynthetic activity in the drought-tolerant cyanobacterium, *Nostoc flagelliforme* to rehydration at different temperature. *Journal of Arid Environments* **72**: 370-377. 10.1016/j.jaridenv.2007.07.002.
- Zhu Y, Gong H. 2014. Beneficial effects of silicon on salt and drought tolerance in plants. *Agronomy for Sustainable Development* **34**: 455-472. 10.1007/s13593-013-0194-1.
- Zurzolo C, Bowler C. 2001. Exploring Bioinorganic Pattern Formation in Diatoms. A Story of Polarized Trafficking. *Plant Physiology* **127**: 1339-1345. 10.1104/pp.010709.



ANNEXE 1 : PROTOCOLE DE PRELEVEMENT ET  
D'ANALYSE DES ECHANTILLONS UTILISE LORS DE  
L'EXPERIENCE EN MESOCOSME



**Expérience Canal artificiel**  
**Préparation des échantillons avant analyse**



**Matériel**

<i>Prélèvement</i>	10 tubes x 2 réplicats = 20 tubes de 50 mL
<i>Bactéries</i>	10 eppendorfs x 2 réplicats = 20 eppendorfs de 1,5 mL
<i>ADN</i>	10 eppendorfs x 2 réplicats = 20 eppendorfs de 1,5 mL
<i>Biolog</i>	10 tubes x 2 réplicats = 20 tubes de 15 mL
<i>Chlorophylle a / Phéophytine</i>	10 tubes x 2 réplicats = 20 tubes de 15 mL
<i>Taxonomie</i>	10 tubes de 15 mL



ANNEXE 2 : ARTICLE DE DESCRIPTION D'UNE  
NOUVELLE ESPECE DE DIATOMEE *ACHNANTHIDIUM*  
*DELMONTII*



## *Achnantheidium delmontii* sp. nov., a new species from French rivers

Florence PÉRÈS<sup>1\*</sup>, A. BARTHÈS<sup>1,2</sup>, Etienne PONTON<sup>1</sup>, Michel COSTE<sup>3</sup>, Loïc TEN-HAGE<sup>2</sup>  
& René LE-COHU<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Asconit Consultants, Site Naturopole – 3, Boulevard de Clairfont, 66350 Toulouges – France; \*Corresponding author e-mail: florence.peres@asconit.com

<sup>2</sup>Université de Toulouse, INP, UPS, EcoLab (Laboratoire Ecologie Fonctionnelle et Environnement), 118 Route de Narbonne, 31062 Toulouse, France

<sup>3</sup>Cemagref U.R. REQE (Réseaux, Epuration et Qualité) – Groupement Cemagref de Bordeaux  
50, Avenue de Verdun, 33612 Cestas cedex – France

**Abstract:** A new freshwater diatom species belonging to the genus *Achnantheidium* KÜTZ. has been found in several French rivers namely those of the Languedoc–Roussillon and Rhin–Meuse regions. *Achnantheidium delmontii* sp. nov. is described based on light and scanning electron microscopy observations. This species belongs to the group of *Achnantheidium* taxa with terminal raphe fissures curved to the same side of the valve and it is compared to the most related species: *Achnantheidium pfisteri* LANGE–BERTALOT, *Achnantheidium pyrenaicum* (HUSDEDT) KOBAYASI, *Achnantheidium temniskovae* IVANOV et ECTOR and *Achnantheidium zhakovschikovii* POTAPOVA. The assessment of its ecology was made through physicochemical analysis carried out on sites which are part of water quality monitoring networks. Some comments are made on the rapid expansion of *Achnantheidium delmontii* sp. nov.

**Key words:** Diatoms, *Achnantheidium*, *Achnantheidium delmontii* sp. nov., Languedoc–Roussillon region, France

### Introduction

ROUND et al. (1990) provided a renewed interest in diatom systematic with the creation of many new genera and also the reappraisal of older genera such as *Achnantheidium* KÜTZING (1844), later more precisely defined by ROUND & BUKHTIYAROVA (1996). Presently, the *Achnantheidium* genus includes two groups: a first group with straight terminal raphe endings and a second group with the terminal fissures deflected to the same side of the valve. Following the survey of samples taken from rivers of the Languedoc–Roussillon region in the framework of water quality monitoring, five species with curved raphe fissures were found. One of them, *Achnantheidium delmontii*, is proposed as a new species. The four others species, *Achnantheidium druartii* RIMET et COUTÉ, *Achnantheidium latecephalum* KOBAYASI, *Achnantheidium pyrenaicum* (HUSDEDT) KOBAYASI and *Achnantheidium rivulare* POTAPOVA et PONADER, present a high percentage of relative abundance in some rivers of this region. *A. delmontii* sp. nov. was recorded in several rivers of the river water monitoring networks in France. Till now,

in routine inventories which aim to monitor biological quality of rivers, *A. delmontii* sp. nov. was misidentified under the name *A. pyrenaicum*, *A. pfisteri* LANGE–BERTALOT or non identified to the species level.

This paper presents the morphology, the ecology and the distribution in French rivers of *A. delmontii* sp. nov., compares it to the most closely related species and give information on its rapid expansion.

### Material and Methods

The samples were collected using the French standard NF T 90–354 (AFNOR 2000) in many different rivers of the Languedoc–Roussillon and Rhin–Meuse regions by different public and private organisations in charge of monitoring water quality control networks (ASCONIT Consultants, AQUASCOP, DREAL Languedoc–Roussillon). The diatoms were sampled on natural substrates such as pebbles and stones. The samples were treated by oxidation with hot 40% hydrogen peroxide and hydrochloric acid and rinsed three times with deionised water. For LM observations, cleaned diatoms were mounted in Naphrax. LM and morphometric measurements were performed with

a LEICA DM5000B microscope using a 100x oil immersion objective and a LEICA DFC 420 camera. Measurements on *Achnantheidium delmontii* sp. nov. were taken from 127 individuals. Relative abundance data were based on LM counts of at least 400 valves. For SEM examinations, cleaned diatoms were dried onto glass coverslips attached to aluminium stubs using nail varnish and sputter-coated with a thin layer of platinum. The observations were performed using a JEOL-JSM 6700F and a JEOL JMS 6490. The temporal changes in abundance of *A. delmontii* sp. nov. was analysed using existing collection slides (from consultancy firm F. PERES, ASCONIT Consultants, AQUASCOP and DREAL Languedoc-Roussillon) dating back to 2005 for some of the stations. Physico-chemical data were provided by DREAL Languedoc-Roussillon and by the water agency Rhin-Meuse (Table 1).

## Results

### *Achnantheidium delmontii* PÉRÈS, LE COHU et BARTHÈS sp. nov.

#### Diagnosis

*In microscopio photonico: valvae lineari-ellipticae apicibus non protractis late rotundatis, lineares quoad specimina maxima sed ellipticae quoad specimina minima. Longitudo: 7.3–21.4 µm. Latitudo: 3.3–5.1 µm. Longitudo/Latitudo ratio: 2.0–4.7. Raphovalva: area axialis angusta lanceolata; area centralis circiter rectangulata margines valvae attingens, interdum una curta stria ab altero latere. Raphe filiformis recta cum poris centralibus distinctis. Striae subparallelae ad parallelas, 20–26 in 10 µm usque ad 35 in 10 µm ad apices. Araphovalva: valvae plerumque ellipticae. Area axialis acicularis. Striae subparallelae ad parallelas, 18–22 in 10 µm usque ad 25 in 10 µm ad apices; plerumque duae striae remotiores in media parte.*

*In microscopio electronico: raphovalva leviter concava. Rami raphis cum centralibus extremis forma guttulae in externo visu et curvatis ad opposita latera in interno visu. Fissurae terminales raphis curvatae ad idem latus valvae. Area centralis formans fasciam sed interdum una stria composita una ad tres areolas ad alteram marginem frontis valvae. Striae compositae 5–7 quadrangularibus areolis (45–57 in 10 µm) in valvae fronte et una elongata areola in valvae limbo. Araphovalva: area axialis cum angusto sterno leviter dilatata in media parte. Striae compositae 6–7 areolis (55–61 in 10 µm) in fronte valvae et una elongata areola in valvae limbo.*

*In duabus valvis: in interno visu, areolarum hymenes ex parte perforati poris tenuiter elongatis; striae interruptae sunt duabus polis in limbo et hyalina aream circum frontem valvae adest.*

**Holotype:** PC0142667, Laboratoire de Cryptogamie, Muséum d'Histoire Naturelle, Paris, France.

**Isotype:** BR-4247, Département de Bryophyta, Thallophtya, Jardin Botanique National de Belgique, Meise, Belgique.

**Type locality:** Chusclan – Rivière Cèze – France (alt : 34 m ; longitude : 1 907 854; latitude: 787811,198 – Lambert II)

**Etymology:** the specific epithet refers to Dominique Delmont, diatomist at DREAL Languedoc-Roussillon.

#### Description

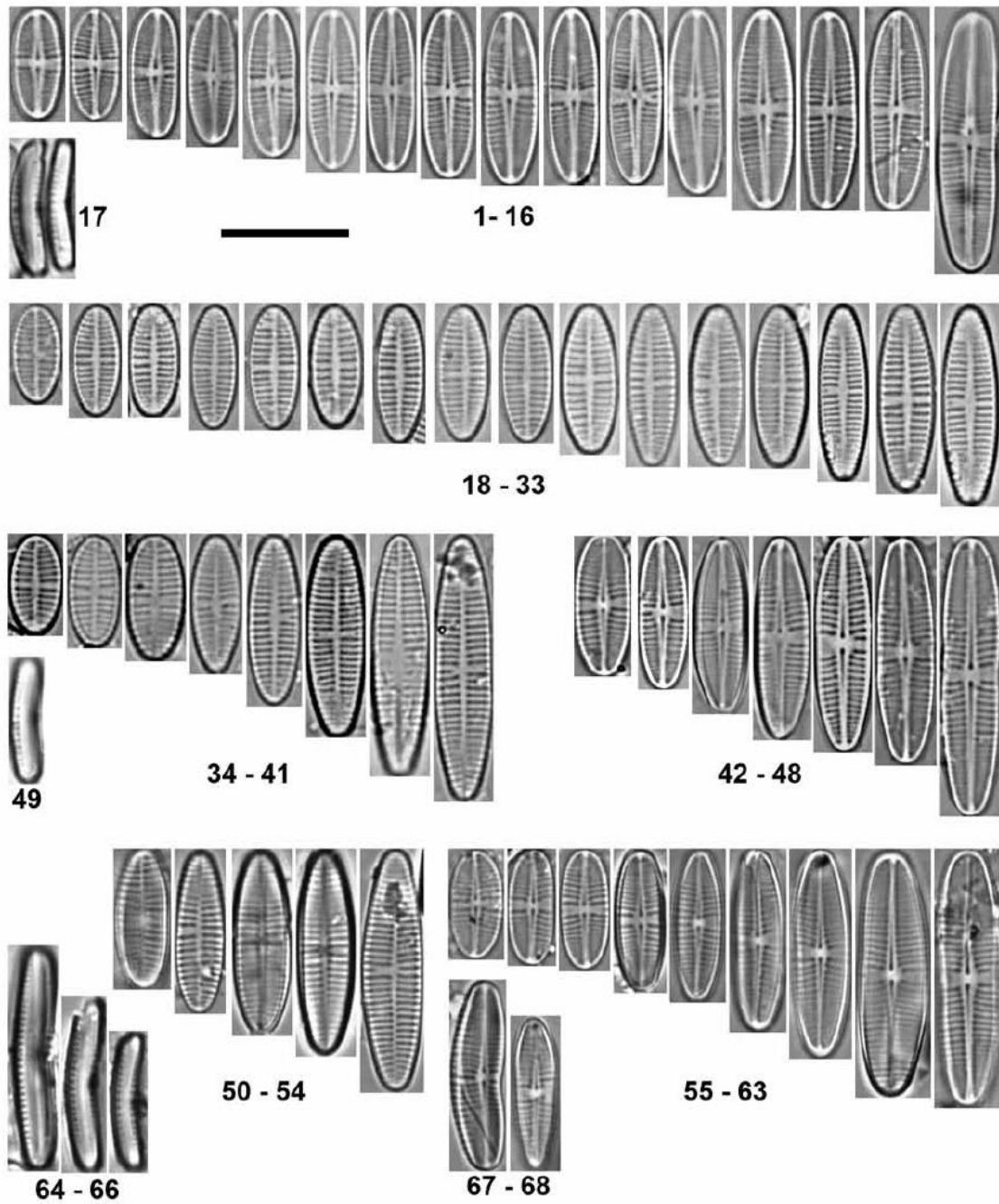
**LM:** valves are linear with rounded apices becoming elliptical in small individuals (Figs 1–68). On the raphe valve, the axial area is narrow. The central area is irregular forming generally a rectangular fascia but a shortened stria can be present on one of the margin side. The raphe is filiform, straight, with distinct central pores. Striae are slightly radial.

On the rapheless valve the axial area is acicular. Striae are parallel to slightly radiate at the apices; in most cases, two striae are slightly more spaced apart in the middle part of the valve.

**SEM:** externally, the raphe is straight with droplet-like proximal endings spaced about 0.8 µm apart (Figs 69, 70, 74). The terminal fissures are deflected to the same side and terminate on the valve face near the valve margin (Figs 69, 70, 75). Internally, the proximal raphe endings are curved in opposite directions (Figs 71, 72, 77) and the distal raphe endings terminate in small helictoglossae (Figs 71, 72). The central area is generally irregular, forming a more or less rectangular fascia but can present on one side a shortened stria consisting of one to three areolae (Figs 74, 77). On the raphe valve, the striae are composed of 5 to 7 (45 to 57 in 10 µm) more or less rounded areolae (Figs 69, 70). Sometimes, the Voigt fault is marked by a shortened stria (Figs 70, 72). On the rapheless valve, the striae consist of 6 to 7 areolae (55 à 61 in 10 µm) and two of them are more distant in the middle part of the valve (Figs 73, 76).

On both valves, the areolae are internally occluded by hymenes perforated by delicate slits (Figs 79–82). There is a row of elongated areolae on the mantle (Figs 75, 76, 78) with a gap at the poles; the mantle elongated areolae are separated from those of the valve face by a hyaline area





Figs 1–68. *Achnantheidium delmontii* sp. nov. LM: (1–16) raphe valves; (17) girdle view; (18–33) and rapheless valves from type population (river Cèze at Chusclan); (34–41) rapheless valves; (42–48) raphe valves; (49) and girdle view (river Rhône at Roquemaure); (50–54) rapheless valves; (55–63) raphe valves; (64–66) girdle view; (67–68) and abnormal forms (67–68) (river Vieux Rhin at Kembs). Scale bar 10 μm.

Table 1. Minimum and Maximum values of physico-chemical parameters in 2009 and/or 2010 of stations (CZ = Cèze à Chusclan; RO1 = Rhône à Roquemaure; RO2 = Rhône à Arles; CH = Canal de Humingue à Kembs; CI = Canal de la Hardt à Bantzenheim; GC = Grand Canal d'Alsace à Roseneau; IL1 = Ill à Ruelisheim; RHI = Rhin à Rhinau; RH2 = Rhin à Gamsheim; RH3 = Rhin à Lautembourg-Karlsruhe; VR = Vieux Rhin à Kembs) where *A. delmontii* is found in abundance (- : no data).

	CZ	ROI	RO2	CH	CI	GC	IL1	RHI	RH2	RH3	VR
N-NH <sub>4</sub> (mg.l <sup>-1</sup> )	<0.04-0.09	<0.04-0.09	<0.04-0.10	0.064-0.115	0.064-0.15	0.064-0.42	0.064-2.57	0.06-0.206	0.064-0.23	0.059-0.12	0.064-0.23
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg.l <sup>-1</sup> )	211-234	167-189	166-195	141-217	137-206	138-206	162-198	139-199	143-195	-	155-191
Ca <sup>2+</sup> (mg.l <sup>-1</sup> )	67-84	64-75	63-75	45-69	44-64	44-63	54-69	43-67	44-67	46-61.8	47-64
CO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg.l <sup>-1</sup> )	-	-	-	2	2	2	2	2	2	-	2
DOC (mg.l <sup>-1</sup> )	0.9-2.0	1.1-2.5	1.1-2.9	1.5-2.4	1.5-2.5	1.4-4	1.8-4.4	1.3-3.6	1.4-4.7	1.3-3.4	1.3-3.1
Chl <i>a</i> (µg.l <sup>-1</sup> )	<1-4	<1-2	<1-4	0.4-2.8	0.5-5.7	0.1-5.4	0.4-11	0.1-5.3	0.1-5.9	0.336-7.11	0.1-5.3
Cl <sup>-</sup> (mg.l <sup>-1</sup> )	8.0-13.2	13-19.5	13.7-21.3	7.7-20	8.4-21	7.3-29	14-27	7.5-36	8.6-34	10.4-33.7	8.3-23
Cond (µS.cm <sup>-1</sup> )	364-481	351-491	359-535	310-460	300-440	275-465	275-520	270-470	275-480	305-463	290-430
BOD <sub>5</sub> (mg.l <sup>-1</sup> )	<0.5-1.5	<0.5-2.4	<0.5-2.9	3-5	3-5	3-5	3-10	3-4	3-5	0.8-1.8	3-5
COD (mg.l <sup>-1</sup> )	<5.0-7.5	<5-14	<5-38	5-11	5-9	5-23	5-47	5-25	5-19	5-7	5-12
Mg <sup>2+</sup> (mg.l <sup>-1</sup> )	6.3-7.3	5.7-6.9	5.4-7.5	6.3-8.4	6.2-8.7	6.1-8.7	5.9-8	5.8-9.3	6-9	6.8-9	6.1-8.4
MeS (mg.l <sup>-1</sup> )	<1-7	<2-48	<1-1122	3.2-33	2-13	2-40	2-130	2-78	2.3-100	2.6-12.5	2-56
N-NO <sub>3</sub> (mg.l <sup>-1</sup> )	0.54-1.4	0.74-2.05	0.88-2.05	0.95-2.19	0.90-2.26	0.88-2.12	0.97-3.61	0.93-2.48	0.95-2.15	0.77-2.19	0.90-2.03
N-NO <sub>2</sub> (mg.l <sup>-1</sup> )	<0.006-	<0.006-	<0.006-	0.009-0.021	0.009-0.018	0.006-0.027	0.006-0.049	0.012-0.046	0.009-0.040	0.005-0.025	0.012-0.027
DO (mg.l <sup>-1</sup> )	0.015 6.75-11.96	0.027 8.04-13.1	0.033 7.62-12.4	8.2-13.7	8.6-14.9	7-13.8	5.5-14	7.2-14.7	6.8-14.6	7.6-12.9	7-13.8
pH	7.83-8.25	7.86-8.37	7.88-8.55	7.6-8.2	7.85-8.65	7.65-8.4	7.9-8.5	7.85-8.45	7.7-8.4	7.7-8.5	7.55-8.35
Pheo (µg.l <sup>-1</sup> )	<1-3	<1-3	<1-5	0.5-3.2	0.1-2.7	0.1-6.9	0.1-10	0.1-6	0.1-6	0.001-2.25	0.1-8.3
P-PO <sub>4</sub> (mg.l <sup>-1</sup> )	<0.003-	0.029-0.077	0.026-0.068	0.032-0.042	0.032-0.039	0.032-0.039	0.032-0.202	0.033-0.075	0.033-0.042	0.014-0.034	0.033-0.039
TP (mg.l <sup>-1</sup> )	0.075 <0.02-0.08	0.04-0.1	0.04-0.25	0.03-0.2	0.03-0.58	0.03-0.15	0.04-0.53	0.03-0.19	0.03-0.25	0.029-0.055	0.03-0.13
K (mg.l <sup>-1</sup> )	1.2-2.0	1.6-1.9	1.6-2.1	1.6-2.6	1.5-2.3	1.2-2.2	1.9-2.5	1.1-3.4	1.3-3.7	1.7-2.7	1.7-2.1
SiO <sub>2</sub> (mg.l <sup>-1</sup> )	2.92-9.27	4.064-8.382	3.937-8.128	-	-	-	-	-	-	-	-

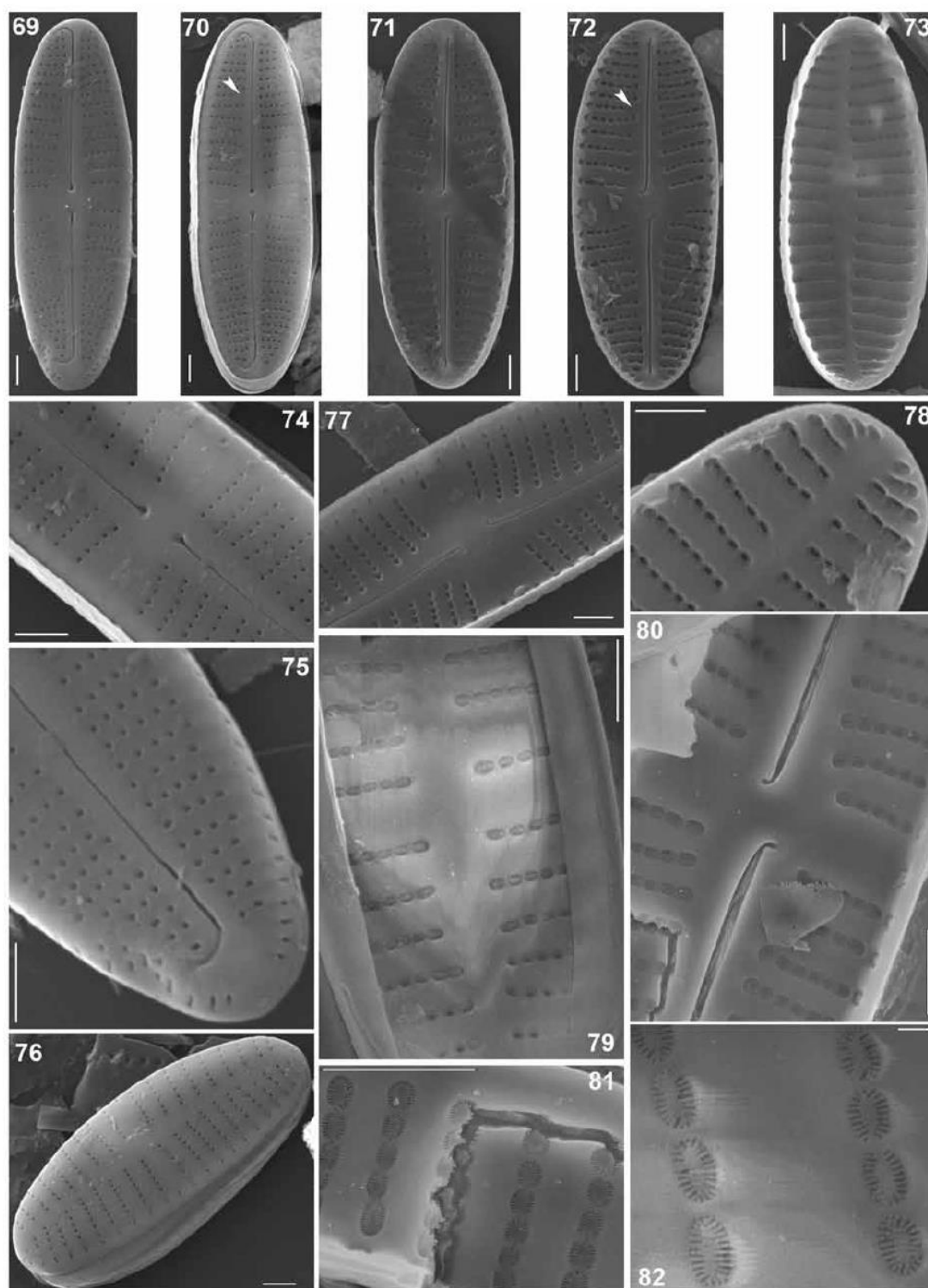
Table 1 Cont.

Na <sup>+</sup> (mg.l <sup>-1</sup> )	8.3–10.5	9.7–13.8	10.4–14.6	6–13	5.9–13	5.8–19	8.5–14	6.4–22	7.2–23	9–20	6.2–15
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (mg.l <sup>-1</sup> )	35.0–41.4	39.5–48.2	29–56.1	23–30	23–30	20–30	14–24	20–33	19–33	22–32	22–29
T (°C)	7.6–25.5	6.07–23.8	4.81–25.6	2.4–21.3	2.2–21.9	2.8–21.8	0.8–21	3.6–24.6	3.6–24.7	2.5–24	2.3–21.5
Turb (NTU)	0.7–5.7	6.8–28	3.4–280	1.7–24	1.4–13	1.3–47	1.8–86	0.31–66	0.32–120	–	1.3–49

BOD<sub>5</sub> = Biological Oxygen Demand; Chl *a* = Chlorophyll *a*; COD = Chemical Oxygen Demand; Cond = Conductivity at 25°C; DO = Dissolved Oxygen; DOC = Dissolved Organic Carbon; MeS = Suspended Matter; Pheo = Pheopigments; TP = Total Phosphorus; Turb = Turbidity.

Table 2. Comparison of morphological characteristics of 5 *Achnanthyidium* morphologically close. \* striae in the middle part of the valve; NC = Not communicated; L – length, W – width

Taxa	Valve characteristics			Raphes valve			Raphelless valve				
	L (µm)	W (µm)	Valve shape	Apex	Striae density.10 <sup>-1</sup> µm	Layout of striae	Number of areolae .10 <sup>-1</sup> µm)*	Striae density.10 <sup>-1</sup> µm	Layout of striae	Number of areolae .10 <sup>-1</sup> µm)*	
<i>Achnanthyidium delmontii</i> (PÈRES et al.)	7.3–21.4	3.3–5.1	Linear to elliptical	Rounded	20–26	35	Parallel to slightly radial at the endings and more strongly radial towards the centre	18–22	25	Parallel to slightly radial along the whole valve	6 (55)–7 (61)
<i>Achnanthyidium pyrenaicum</i> (PÈRES et al.)	8.2–16.4	2.9–4.9	linear-lanceolate to slightly elliptical	Rostral	20–28	35–45	Parallel	18–28	35–40	Parallel	3 (25)–5 (42)
<i>Achnanthyidium pfisteri</i> (WERUM & LANGE-BERTALOT 2004)	7–12	2.8–5	Linear to elliptical	Rounded	18–20	30	Slightly radial to parallel	18–25	30	Parallel	6–7 (about 60)
<i>Achnanthyidium zhakovschikovii</i> (POTAPOVA 2006)	9.1–14.8	2.9–4.0	Linear to elliptical	Rounded	23–30	>48	Slightly radial	21–28	30–40	Parallel	4–5 (about 45)
<i>Achnanthyidium temiskovae</i> (IVANOV & ECTOR 2006)	8.8–13.2	2.8–3.8	Linear to elliptical	Slightly subrostral	22–27	NC	Radial close to the centre and strongly radial at the endings	19–26	NC	Parallel to slightly radial at the endings	3–4 (about 41)



along the edge of the valve face (Figs 75, 76).

**Ecology, associated diatom flora and distribution of *Achnantheidium delmontii* sp. nov.**

The type population of *Achnantheidium delmontii* sp. nov., was found in the river Cèze at Chusclan (Gard, Languedoc–Roussillon). It is a Mediterranean river (20 to 50 m wide), which takes its source in the mountain Cévennes and emerges in the downstream part of the Rhône. The type population of *A. delmontii* has its maximum relative abundance in a location characterized by an alkaline pH, high conductivity and calcium concentration (Table 1). The  $\text{PO}_4\text{-P}^-$  level in the river Cèze at Chusclan (maximum  $\text{PO}_4\text{-P}^-$  concentration:  $75 \mu\text{g.l}^{-1}$ ) indicates an eutrophic environment (Table 1). These values are quite close to those observed for *A. latecephalum* and *A. druartii* (see also RIMET et al. 2010) in the Languedoc–Roussillon region. When *A. delmontii* was strongly dominant (75%) in the river Cèze at Chusclan, it was associated with *Amphora pediculus* (KÜTZING) GRUNOW (4%), *Achnantheidium minutissimum* (KÜTZING) CZARNECKI (4%), *Navicula cryptotenella* LANGE–BERTALOT (3%) and *Gomphonema minutum* AGARDH (2%). The associated taxa are mainly  $\beta$ -mesosaprobe and eutrophic, according to VAN DAM et al. (1994), which tend to corroborate the chemical data (Table 1).

*A. delmontii* appears for the first time in 2007 (Fig. 85) with a low percentage of relative abundance (<1%) in one sample: Vieux Rhin in Kembs (VR). In the type location (CZ), *A. delmontii* appears from 2008 and after that,

proliferates (>60%). At the same period, *A. delmontii* is observed for the first time in rivers such as Canal de Huningue (CH), Canal de Neuf–Brisach (CN), Canal de la Hardt (CH), Ehn (EH), Grand Canal d'Alsace (GC), Ill (IL1 and IL2), Lertzbach (LB), Muhlbach de la Hardt (MH), Quatelbach (QB), Rhin (RH1, RH2, RH3), Vieux Rhin (VR), Rhône (RO1 and RO2) and Cèze (CZ) (Fig. 85). The rapid expansion of *A. delmontii* seems to correspond to the criteria defined by COSTE & ECTOR (2000) which qualify invasive species (recent appearance, proliferation, rapid expansion).

**Discussion**

In LM, *Achnantheidium delmontii* sp. nov. most closely resembles *A. pfisteri* LANGE–BERTALOT (WERUM & LANGE–BERTALOT 2004). *A. delmontii* is much longer than *A. pfisteri* ( $7.3\text{--}21.4 \mu\text{m}$  vs  $7\text{--}12 \mu\text{m}$ , Table 2) and has a higher number of striae on the raphe valve ( $20\text{--}26$  vs  $18\text{--}20$  in  $10 \mu\text{m}$ , Table 2). Moreover, in *A. delmontii*, the raphe valve has a well delimited fascia in most cases whereas in *A. pfisteri*, the central area is asymmetrical (WERUM & LANGE–BERTALOT 2004, plate 20, figs 12–13). In SEM, the terminal fissures, deflected to the same side, are much shorter in *A. pfisteri* than in *A. delmontii*. On the raphe valve, the number of areolae per stria is higher in *A. delmontii* (Table 2). The mantle areolae row is interrupted at the apices on the rapheless valve in *A. delmontii* whereas it is continuous in *A. pfisteri* (WERUM & LANGE–BERTALOT 2004, plate 20, fig. 14).

In LM, the presence of a fascia on the raphe valve is a feature shared by *A. delmontii* and *A. temnikovae* IVANOV et ECTOR (IVANOV & ECTOR 2006, figs 1–11). Otherwise, both species can be distinguished by the valve morphology and the dimensions (Table 2). In SEM, the raphe valve striae are subparallel towards the apices in *A. delmontii* whereas they are strongly radiate in *A. temnikovae* (IVANOV & ECTOR 2006, figs 27, 28). The number of areolae per stria is very different in both species and, moreover, the row of mantle areolae does not stop at the apices in *A. temnikovae*, unlike *A. delmontii*.

In LM, *A. delmontii* and *A. zhakovschikovii* POTAPOVA (POTAPOVA 2006) have linear to elliptical valves with rounded apices. Both species differ in

←  
Figs 69–82. *Achnantheidium delmontii* sp. nov. SEM: (69) external view of the raphe valve; (70) external view of the raphe valve showing a voigt fault (arrowhead); (71) internal view of the raphe valve; (72) internal view of the raphe valve showing a voigt fault (arrowhead); (73) internal view of the rapheless valve; (74) external view of central area with shortened stria composed of one areola; (75) external view of raphe valve showing the terminal fissures and the interruption of the striae at the end; (76) external view of the rapheless valve showing the hyaline area; (77) internal view of central area showing the raphe proximal endings deflected in opposite side; (78) internal view of the rapheless valve showing the interruption of the striae at the end; (79) internal view of the rapheless valve showing the areolae structure; (80) internal view of the raphe valve showing the areolae structure; (81) internal view of the raphe valve areolae; (82) internal view of the rapheless valve areolae. Scale bars  $1 \mu\text{m}$  (69–81),  $100 \text{ nm}$  (82).

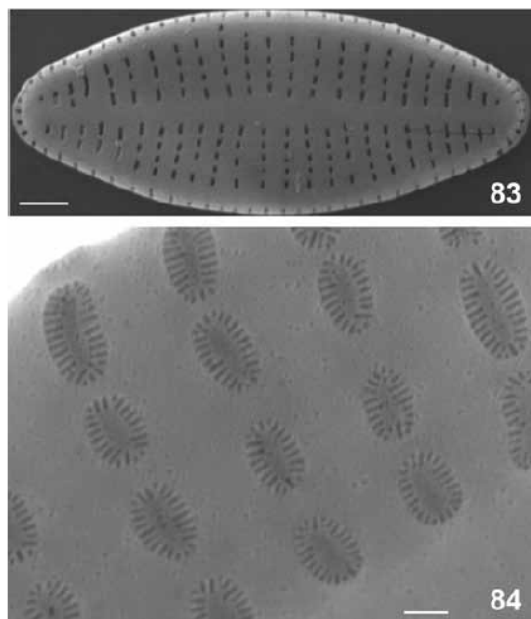


Fig. 83. External view of rapheless valve of *Achnantheidium pyrenaicum*, SEM, Rebenty river, France. Scale bar 1  $\mu$ m.

Fig. 84. Internal view of the rapheless valve areolae of *Achnantheidium latecephalum*, SEM, river Hérault, France. Scale bar 100 nm.

the dimensions (Table 2) and the number of striae on the raphe valve, ranging from 20 to 26 in *A. delmontii* and from 23 to 30 in *A. zhakovschikovii* (Table 2). Moreover, on the rapheless valve the configuration of the axial area is different (POTAPOVA 2006, figs 2, 6, 7). In SEM, the curved terminal fissures are shorter in *A. zhakovschikovii* (POTAPOVA 2006, fig. 30) than in *A. delmontii*. The number of areolae per stria is lower in *A. zhakovschikovii* on both valves (Table 2). The raphe valve areolae are more or less rounded in *A. delmontii* whereas they are transapically elongated slits in *A. zhakovschikovii* (POTAPOVA 2006, fig. 30). Moreover, *A. delmontii* differs from *A. zhakovschikovii* (POTAPOVA 2006, fig. 31) by the interruption of the mantle striae row on the rapheless valve at the apices.

In LM, *A. delmontii* can be differentiated from *A. pyrenaicum* by the valve morphology (KOBAYASI 1997, figs 3–6; POTAPOVA & PONADER 2004, fig. 105). *A. delmontii* is characterized by a fascia on the raphe valve (Figs 1–16) whereas the central area is asymmetrical with often a stria on one side in *A. pyrenaicum* (KOBAYASI 1997, fig. 11; POTAPOVA & PONADER 2004, fig. 105). Length being equal, *A. delmontii* is wider than *A. pyrenaicum* (personal

observation). In SEM, in external view, the areolae are rounded on both valves in *A. delmontii* whereas they are transapically elongated in *A. pyrenaicum* (Fig. 83, KOBAYASI 1997, fig. 15; POTAPOVA & PONADER 2004, figs 105, 106). On both valves, *A. delmontii* has 5 to 7 areolae per stria against only 3 to 4 in *A. pyrenaicum* (Table 2). On the rapheless valve, the row of mantle striae is interrupted at the apices in *A. delmontii* (Fig. 78) whereas it is continuous in *A. pyrenaicum* (Fig. 83).

To conclude, we draw attention to the detailed ultrastructure of the areolae. *A. delmontii* (Fig. 82), *A. latecephalum* (Fig. 84), *A. convergens* (KOBAYASI) KOBAYASI (KOBAYASI 1997, fig. 68) and *A. japonicum* (KOBAYASI) KOBAYASI (KOBAYASI et al. 2006, pl. 155, figs 17, 18) have areolae internally occluded by hymenes perforated by delicate slits. A few *Achnantheidium* species with straight raphe such as *A. saprophilum* (KOBAYASI et MAYAMA) ROUND et BUKHTIYAROVA (LANGE–BERTALOT & KRAMMER 1989, plate 56, fig. 8; KOBAYASI et al. 2006, pl. 161, fig. 17) and *A. pusillum* (GRUNOW) CZARNECKI (KOBAYASI et al. 2006, pl. 158, fig. 14) show areolae with a cribrum. This feature is possibly another criterion to separate both *Achnantheidium* groups. Nevertheless, further investigation is required.

#### Acknowledgements

Material examined from Languedoc–Roussillon region was obtained in the framework of the research programme « Atlas des Diatomées de Languedoc–Roussillon ». Financial support for this research programme was provided by DREAL Languedoc–Roussillon. We gratefully acknowledge C. Deshayes and S. Le Blond–Duploux for technical assistance with SEM, Agnès Pierret and Florence Barange for the illustrations, Catherine Vignon for the English translation and Aquascop for providing biological material.

#### References

- AFNOR, (2000): Norme AFNOR NF T90–354. Détermination de l'Indice Biologique Diatomées (IBD), June 2000, pp. 63.
- COSTE, M. & ECTOR, L. (2000): Diatomées invasives exotiques ou rares en France: principales observations effectuées au cours des dernières décennies. – Systematics and Geography of Plants 70: 373–400.
- IVANOV, P. & ECTOR, L. (2006): *Achnantheidium*

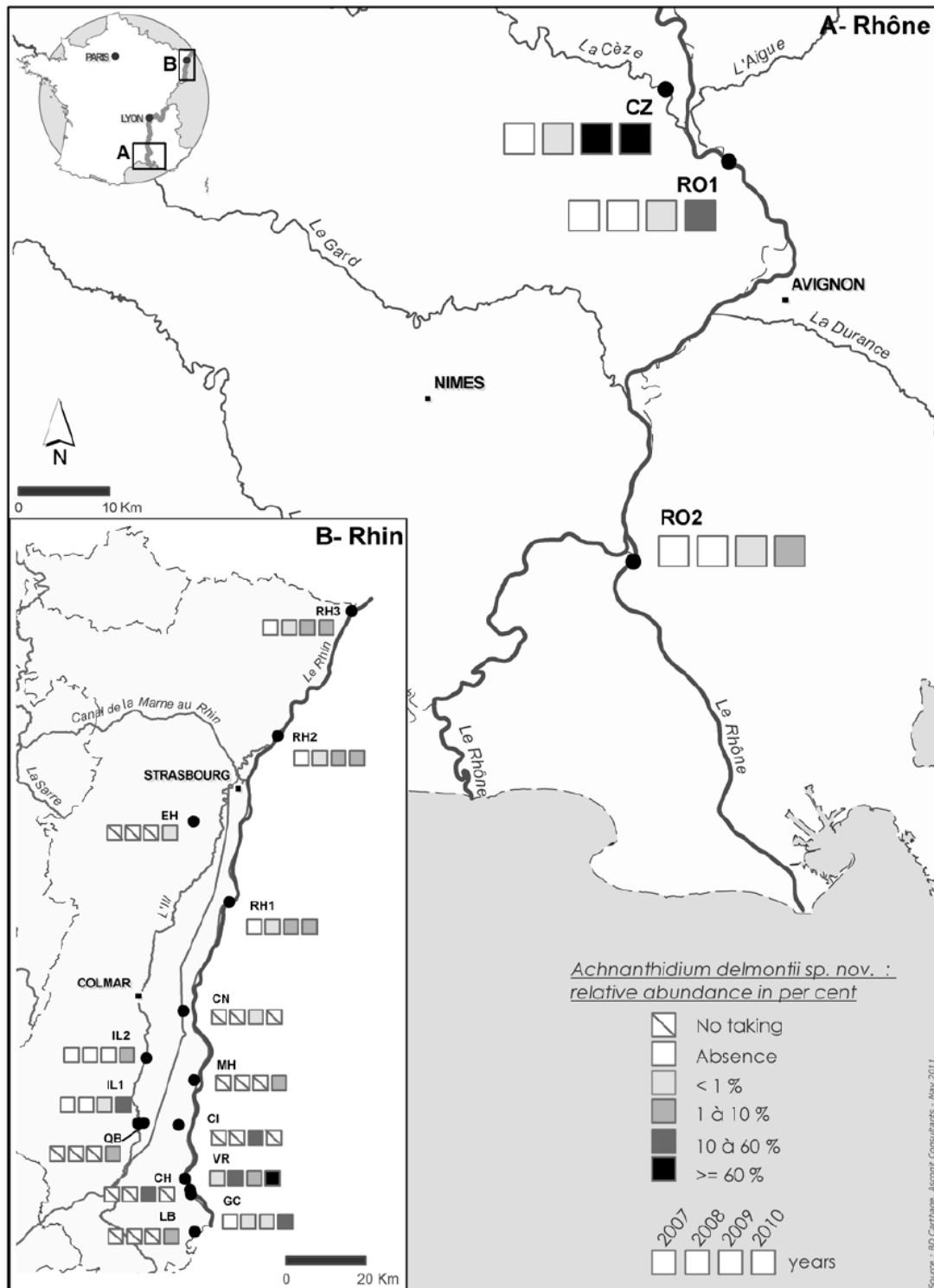


Fig. 85. Distribution and temporal changes of *Achnantheidium delmontii* sp. nov. in percentage of relative abundance from 2007 to 2010.

- temniskovae* sp. nov., a new diatom from the Mesta River, Bulgaria. – In: OGNJANOVA–RUMENOVA, N. & MANOYLOV, K. (ed.): Advances in phycological studies, Festschrift in Honour of Prof. Dobrina Temniskova–Topalova. – pp.147–154, Pensoft, Sofia–Moscou, Russie.
- KOBAYASI, H. (1997): Comparative studies among four linear–lanceolate *Achnantheidium* species (Bacillariophyceae) with curved terminal raphe endings. – *Nova Hedwigia* 65: 147–163.
- KOBAYASI, H.; IDEI, M.; MAYAMA, S.; NAGUMO, T. & OSADA, K. (2006): H. Kobayasi's Atlas of Japanese Diatoms based on electron microscopy. – 531 pp., Uchida Rokakuho Publishing Co., Ltd, Tokyo.
- KÜTZING, F.T. (1844): Die Kieselalgen. Bacillarien oder Diatomeen. Nordhausen. – 152 pp., 30 pls.
- LANGE–BERTALOT, H. & KRAMMER, K. (1987): Bacillariaceae, Epithemiaceae, Surirellaceae. Neue und wenig bekannte Taxa, neue Kombinationen und Synonyme, sowie Bemerkungen und ergänzungen zu den Naviculaceae. – *Bibliotheca Diatomologica* 15:1–289.
- POTAPOVA, M. & PONADER, K.C. (2004): Two common North American diatoms, *Achnantheidium rivulare* sp. nov. and *A. deflexum* (Reimer) Kingston: morphology, ecology and comparison with related species. – *Diatom Research* 19: 33–57.
- POTAPOVA, M. (2006): *Achnantheidium zhakovschikovii* sp. nov. (Bacillariophyta) and related species from rivers of Northwestern Russia. – *Nova Hedwigia* 82: 399–408.
- RIMET, F.; COUTÉ, A.; PIUZ, A.; BERTHON, V. & DRUART, J.C. (2010): *Achnantheidium druartii* sp. nov. (Achnanthesales, Bacillariophyta): A new species invading European rivers. – *Vie et Milieu–Life and Environment* 60: 185–195.
- ROUND, F.E.; CRAWFORD, R.M. & MANN, D.G. (1990): The Diatoms – Biology & Morphology of the genera. – 747 pp., Cambridge University Press, Cambridge, Reprinted 2000.
- ROUND, F.E. & BUKHTIYAROVA, L. (1996): Four new genera based on *Achnanthes* (*Achnantheidium*) together with a re–definition of *Achnantheidium*. – *Diatom Research* 11: 345–361.
- 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: 117–133.
- WERUM, M. & LANGE–BERTALOT, H. (2004): Diatoms in springs from Central Europe and elsewhere under the influence of hydrogeology and anthropogenic impacts. – *Iconographia Diatomologica* 13: 3–417.

---

© Czech Phycological Society (2012)

Received May 30, 2011

Accepted August 26, 2011