



DIREN Martinique
Immeuble Massal
4 Boulevard Verdun
97200 Fort-de-France

Martinique

**Etude expérimentale sur substrats artificiels :
accumulation du Chlordécone
dans les biofilms périphytiques en Martinique**

Compte rendu d'expérimentation



ASCONIT CONSULTANTS
Agence Caraïbes

Fond Brûlé
97224 DUCOS
Tél. 05.96.63 55 78
Mobile : 06.96.25.54.10

Nicolas.bargier@asconit.com

SOMMAIRE

1. Introduction.....	2
2. Contexte et objectif	4
3. Mode opératoire	4
4. Croissance du biofilm	6
4.1. Densité cellulaire.....	6
4.2. Mesures gravimétriques et pigments chlorophylliens.....	9
5. Présence de chlordécone dans le biofilm périphytique	12
6. Conclusion.....	13

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Croissance cellulaire des diatomées à Grand Rivière.....	7
Figure 2 : Courbe de tendance de la croissance du périphyton à Grand Rivière.....	7
Figure 3 : Croissance cellulaire des diatomées à Basse Pointe	8
Figure 4 : Courbe de tendance de la croissance du périphyton à Basse Pointe	8

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Résultats des mesures gravimétriques et de pigments sur les biofilms.....	11
Tableau 2 : Résultats des mesures gravimétriques, de pigments et de chlordécone sur les biofilms	12

1. Introduction

Le périphyton est un mélange complexe d'organismes autotrophes (diatomées, cyanobactéries, chlorophycées,...), d'organismes hétérotrophes (champignons, bactéries, invertébrés,...) et de matières minérales et organiques. Il est attaché à des surfaces immergées dans la plupart des écosystèmes aquatiques. C'est une importante source de nourriture et il peut également absorber et/ou adsorber les contaminants, les soustraire à la colonne d'eau et limiter leurs déplacements à travers l'environnement. Le périphyton est également un important indicateur de la qualité de l'eau.

Les algues du périphyton, en particulier les diatomées, constituent souvent la principale composante autotrophe des cours d'eau. L'évaluation de l'importance du recouvrement végétal périphytique apparaît donc comme un élément essentiel de leur fonctionnement.

L'analyse des paramètres de la biomasse périphytique (matière sèche, matière minérale, matière organique, densité cellulaire et pigments chlorophylliens), ainsi que les rapports de ces différents paramètres entre eux, donnent de précieux renseignements sur l'état physiologique du périphyton et sur le fonctionnement de la composante autotrophe des écosystèmes aquatiques.

L'estimation de la biomasse périphytique peut être effectuée à partir des communautés naturelles (estimation du recouvrement végétal) ou à partir de substrats artificiels (estimation de la croissance et de la cinétique de croissance).

L'utilisation de substrats vierges pour l'étude de la croissance et de la structure du peuplement algal au cours des phases de développement du périphyton s'est généralisée durant ces dernières années. Les échanges avec l'eau surnageante sont très importants au cours des premiers stades de colonisation ; la biomasse accumulée durant cette période, ainsi que la structure du peuplement algal reflète les conditions environnementales du passé récent du milieu dans lequel la communauté se développe (Wetzel, 1979).

2. Contexte et objectif

Cette expérimentation a été menée afin de répondre à 3 objectifs principaux :

- Pertinence de l'utilisation de substrat artificiel en Martinique pour l'étude du périphyton,
- Temps d'immersion nécessaire à l'obtention d'un biofilm en phase plateau (climax),
- Présence de chlordécone dans le biofilm périphytique.

3. Mode opératoire

Généralités

L'accumulation de matière sur un substrat vierge résulte de l'équilibre entre les gains (immigration, croissance et dépôts de sédiments) et les pertes (mortalité, érosion, émigration et broutage par les invertébrés, les poissons,...).

Dans des conditions expérimentales identiques, les valeurs obtenues constituent une bonne estimation de la croissance du périphyton, quel que soit le type de substrat utilisé (lames de verre, substrat lithique, feuille de polyéthylène, céramique,...).

Les substrats artificiels sont immergés pendant 2 semaines minimum (le temps d'immersion est variable selon les cours d'eau).

Le périphyton recouvrant la surface d'au moins deux substrats (pondération de la variabilité du matériel biologique) est mis en suspension par grattage dans un volume déterminé d'eau déminéralisée dans un flacon numéroté. Ces flacons sont stockés dans des glacières puis congelés afin d'éviter toute dégradation du matériel biologique.

L'étude de la cinétique de croissance nécessite le prélèvement de substrats à des intervalles de temps déterminé et pendant une durée d'immersion plus longue (par exemple tous les 7 jours pendant 28 jours). Le laps de temps entre les prélèvements, ainsi que la durée d'immersion totale sont fonction du cours d'eau étudié.

Méthodologie de terrain adaptée au cours d'eau martiniquais étudiés

Des substrats artificiels ont été posés le 17 novembre 2009 à Grand Rivière (site de référence non contaminé par le chlordécone) et à Basse Pointe (site très contaminé par le chlordécone).

Ils ont été posés en position horizontale, les niveaux d'eau et le faciès des cours d'eau ne permettant pas un positionnement vertical.

Ces substrats ont été relevés toutes les semaines pendant 6 semaines pour étudier la croissance cellulaire des diatomées.

Lors du dernier relevé, les substrats mis en place pour les analyses gravimétriques, de pigments et de chlordécone ont également été prélevés.

La suspension d'algues ainsi récoltée a été congelée et envoyée en container spécial pour être réceptionnée congelée par le laboratoire d'analyse (préservation de l'intégrité du matériel biologique).



Grands substrats pour analyse en laboratoire du biofilm

Petits substrats pour étude de la croissance (densité cellulaire)

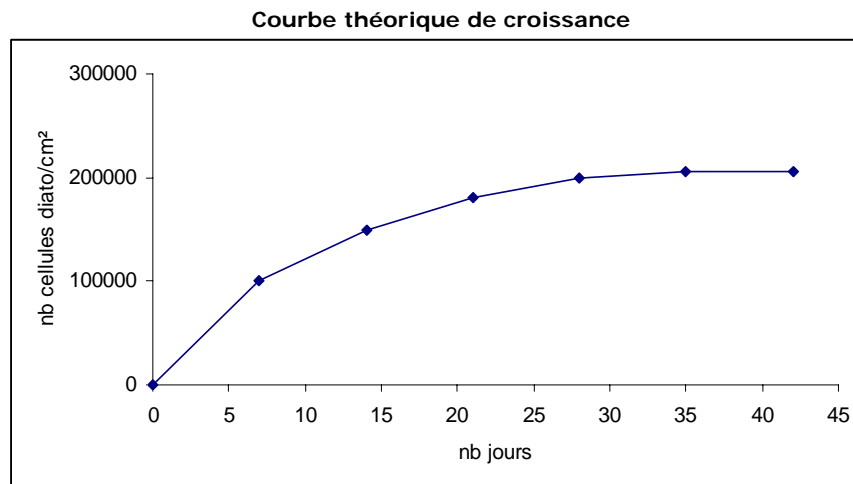
4. Croissance du biofilm

4.1. Densité cellulaire

Méthodologie

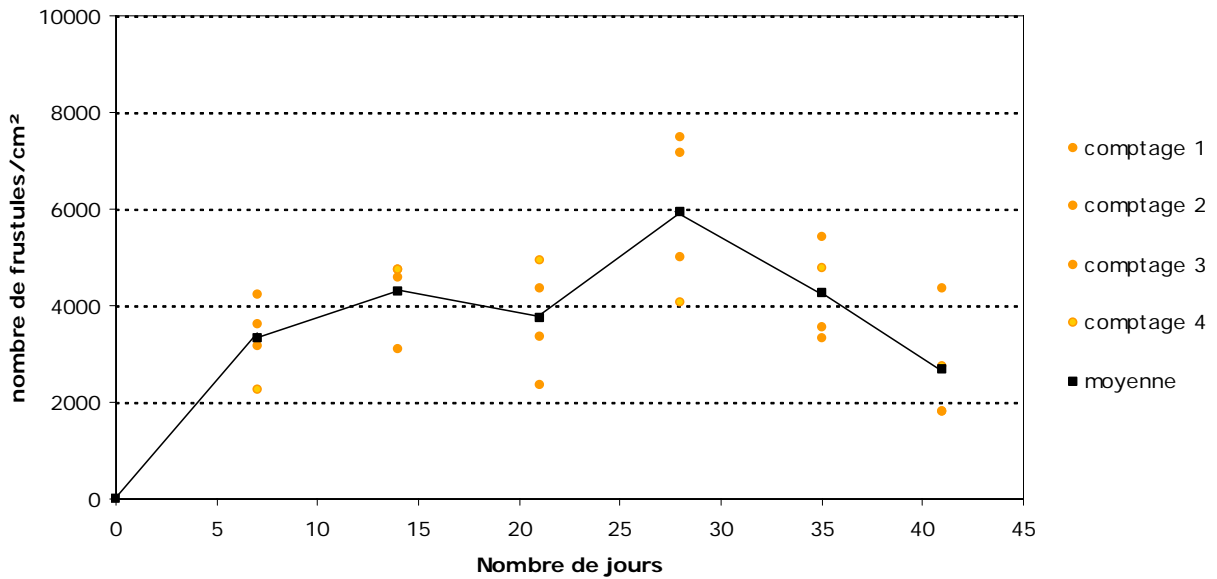
Le **dénombrement des diatomées** est effectué suivant la méthode suivante : un volume déterminé, et préalablement nettoyé à l'eau oxygénée, de suspension de diatomée est déposé sur une lamelle, séché, puis monté sur une lame avec une résine réfringente, le Naphrax. Tous les frustules rencontrés lors du balayage de 50 champs à l'immersion (objectif x100) ont été comptabilisés ; ce dénombrement est répété 4 fois afin d'intégrer la variabilité de répartition des diatomées. Cette méthode (Hoagland et al., 1982) a été retenue du fait de la présence en grand nombre d'espèces de très petite taille et fortement agglomérées dans les communautés périphytiques, leur dénombrement étant très difficile à effectuer au microscope inversé.

La courbe théorique de croissance se décompose en plusieurs phases dont une phase exponentielle de croissance, ou phase linéaire de croissance, qui abouti à un plateau, équilibre entre les gains (immigration, croissance et dépôts de sédiments) et les pertes (mortalité, érosion, émigration et broutage par les invertébrés, les poissons,...).



Les perturbations physiques telles que les lâchers de barrage, la navigation, les crues, un broutage intensif,..., ont un impact direct sur la croissance du bioderme périphytique qui peut être quantifié par l'étude de la cinétique de croissance. Les communautés périphytiques qui subissent ce type de perturbations restent perpétuellement en état de déséquilibre et ne peuvent pas atteindre leur « climax » ou phase en plateau.

Figure 1 : Croissance cellulaire des diatomées à Grand Rivière



La croissance cellulaire des diatomées et les densités obtenues à Grand Rivière sont conforme au modèle et confirme le caractère extrêmement oligotrophique du milieu. En effet, les densités cellulaires sur substrats artificielles observées dans la Garonne amont lors de ma thèse (piémont des Pyrénées donc dans des conditions de montagne peu anthropisées) étaient 125 fois plus élevées au bout de 7 jours d'immersion, et 400 fois plus importantes après 28 jours d'immersion.

Les résultats en dents de scie, ainsi que la régression observée en fin d'expérimentation est grande partie liée aux conditions hydrologiques (érosion du biofilm), et plus encore au broutage par les Sicydiums ; en effet, à chaque relevé, les substrats étaient recouvert de Sicydiums en train de brouter les algues (observations terrain).

Il est fort probable que si nous avons continué les relevés, nous obtiendrions une courbe de ce type, les gains (croissance cellulaire et colonisation par de nouvelles algues) et les pertes (mort des cellules, érosion et broutage) induisent une évolution sinusoïdale. Cette simulation indique qu'un temps d'immersion de 4 à 5 semaines permet au biofilm d'atteindre le maximum de colonisation ; cependant la pression exercée par les conditions hydrologiques et le broutage maintient ce biofilm en perpétuel déséquilibre (pas de plateau bien marqué).

Figure 2 : Courbe de tendance de la croissance du périphyton à Grand Rivière

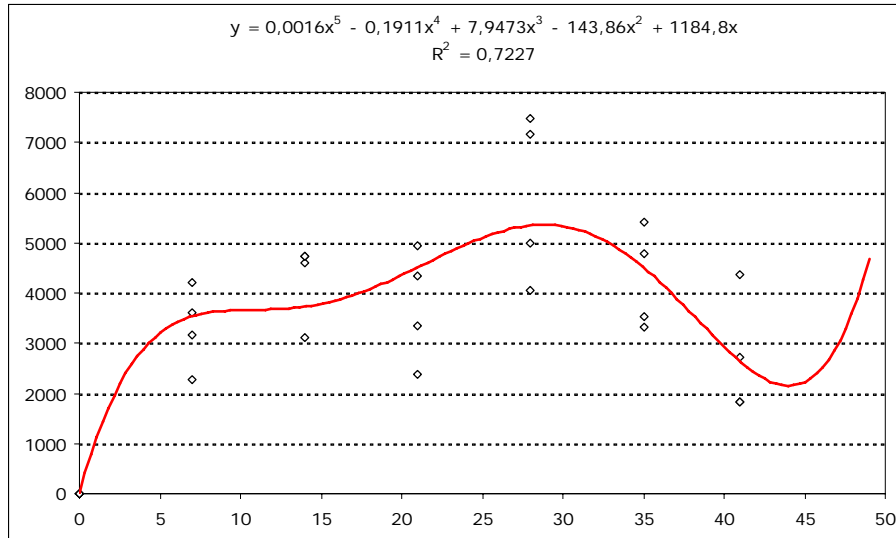
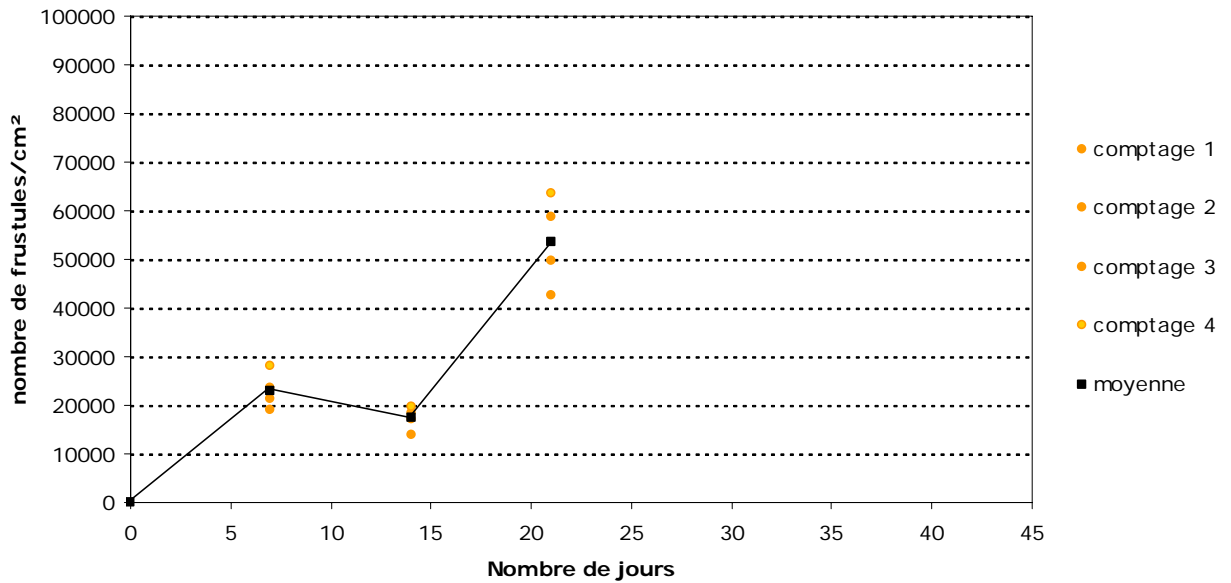
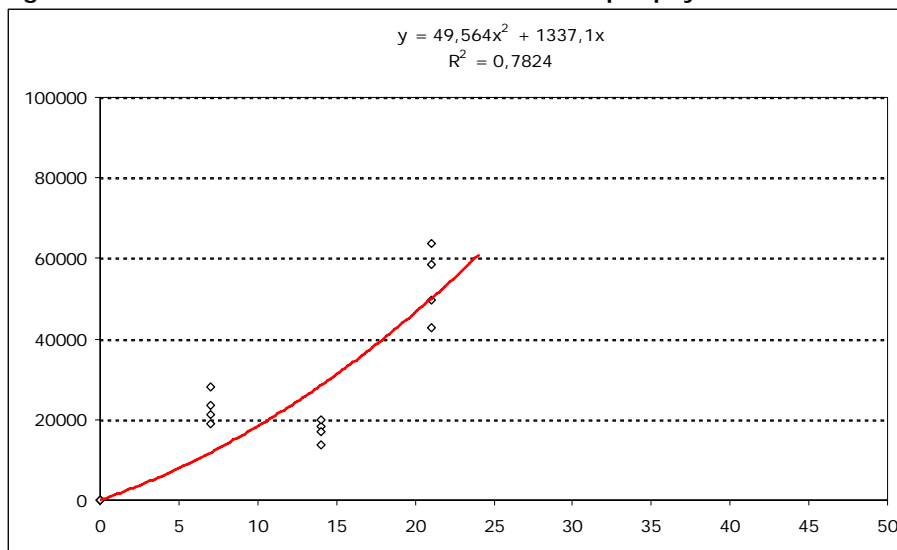


Figure 3 : Croissance cellulaire des diatomées à Basse Pointe



En ce qui concerne Basse Pointe, les substrats ayant été vandalisés lors de la 4^{ème} semaine d'expérimentation, nous ne pouvons donc conclure avec certitude. Cependant, la courbe obtenue montre que la croissance du biofilm se situe encore en phase exponentielle après 21 jours d'immersion (figure ci-dessous) et n'a pas atteint sa phase plateau (ou climax). Le temps d'immersion des substrats nécessaire serait donc similaire à celui de Grand Rivière, c'est-à-dire 4 à 5 semaines minimum.

Figure 4 : Courbe de tendance de la croissance du périphyton à Basse Pointe



Par ailleurs, les densités observées sont de 10 à 15 fois supérieures à celles obtenues à Grand Rivière, montrant ainsi un milieu beaucoup plus productif, enrichi en composé organique et minéraux favorables à la croissance des algues.

Cependant, les densités cellulaires observées à Basse Pointe demeurent 2 fois moins importantes que dans la Garonne amont au bout de 7 et 21 jours d'immersion.

De plus, la phase plateau était atteinte à l'issue des 21 jours d'immersion dans la Garonne ce qui n'est pas le cas dans les cours d'eau martiniquais, le temps nécessaire étant de 30 à 40 jours. Ceci pose un problème logistique car, plus le temps de pose est long, plus les substrats artificiels ont une forte probabilité d'être emportés par le courant ou vandalisés.

4.2. Mesures gravimétriques et pigments chlorophylliens

Méthodologie

Les **mesures gravimétriques** (matières sèches et matières organiques) ont été réalisées par le Laboratoire de Rouen.

Une prise d'essai de 5 ml a été utilisée pour ces mesures. La quantité de matière organique correspond à la perte au feu.

Les résultats sont exprimés en mg par unité de surface (mg.cm^{-2}).

Les **pigments chlorophylliens** sont dosés par spectrophotométrie (méthode SCOR – UNESCO). La chlorophylle *a* est extraite à l'acétone. Les concentrations en phéopigments et en chlorophylle *a* sont obtenues en utilisant les formules de Lorenzen (1967).

Les résultats sont ensuite exprimés en μg de chlorophylle *a* ou de phéopigments par unité de surface ($\mu\text{g.cm}^{-2}$).

Généralités

La quantité de biomasse obtenue (matière sèche, organique ou chlorophylle *a*) peut être comparée avec des données de la bibliographie scientifique et donner ainsi une mesure de la productivité du cours d'eau étudié.

A ce titre, Horner et al. (1983), Welch et al. (1988) et Welch et al. (1989) estiment que le seuil de nuisance est atteint pour des quantités de chlorophylle *a* supérieures à 10 - 15 $\mu\text{g.cm}^{-2}$.

Le colmatage des biodermes peut être estimé en analysant les proportions respectives de la matière sèche et organique.

La part des hétérotrophes et de la matière organique détritique peut être estimée par le rapport chlorophylle *a*/matière organique. Dans le cas de cours d'eau pollués comme l'Agout (Cassan, 1978), ce rapport peut être très faible (entre 0,04 et 0,5 pour mille). Selon Weber & McFarland (1969), ce rapport varie de 1 à 2 % de l'accumulation de matière organique totale dans une communauté algale en « bonne santé ». Lorsque ce rapport est inférieur à 1%, il est communément admis que les hétérotrophes (au sens large : bactéries, champignon et matière organique allochtone) dominent la communauté.

L'élévation de la turbidité favorise généralement le colmatage des biodermes et les études ont montré que les hétérotrophes sont moins sensibles aux brusques variations de courant (orages et lâchers d'eau des barrages,...).

D'une manière générale, la part de la fraction algale est très nettement supérieure sur substrats artificiels par rapport à celle observée sur galets naturels. En effet, lorsque le bioderme périphytique atteint la phase de saturation, ce qui est le cas pour les galets naturels, l'abondance d'une matière organique facilement biodégradable fournie par les algues et les bactéries des couches sous-jacentes qui sont sénescentes ou en décomposition (Geesey et al., 1978 ; Stock et Ward, 1989) et par la matière organique allochtone piégée par le bioderme, favorise le développement des organismes hétérotrophes.

Les communautés périphytiques suivent au cours de leur croissance une succession de phases. Les échanges avec l'eau sont importants au cours des premières phases de colonisation et la biomasse qui se fixe durant cette période reflète généralement les conditions environnementales du passé récent du milieu dans lequel elles se développent (Weitzel, 1979).

L'évolution des concentrations en chlorophylle *a*, ainsi que celle de la densité cellulaire des diatomées, est un bon indice de la productivité des organismes autotrophes.

L'évolution des concentrations en phéopigments (dégradation de la chlorophylle) caractérise l'état physiologique des algues (Antoine et Benson-Evans, 1983). Il est donc possible de comparer l'état physiologique des communautés algales entre deux stations situées en amont et en aval d'une perturbation physique ou chimique. Si les évolutions de chlorophylle *a* et de densité cellulaire algale sont inverses, et si la proportion de phéopigments augmente très nettement, on peut en déduire que l'état physiologique de la communauté algale est dégradé ; l'importance de cette dégradation est estimée par la variation de ces différents paramètres.

Le bioderme naturel de la plupart des cours d'eau français est colmaté par de la matière allochtone et très souvent colonisé par des invertébrés. Nos mesures d'accumulation du chlordécone ne devant concerner que les algues périphytiques, nous avons proposé une expérimentation sur substrats artificiels pour mener à bien ces analyses et ainsi éviter un biais dans nos résultats (le chlordécone s'adsorbant sur les particules de matière organique).

Nos observations de terrain nous ont montré que, du fait du faciès des cours d'eau et des conditions météorologiques et hydrauliques, les biofilms sont très peu ou pas colmatés dans la plupart des cas.

Suite à la destruction des substrats artificiels à Basse Pointe, et de part la nature du périphyton martiniquais, le prélèvement destiné aux mesures gravimétriques, de pigments et de chlordécone a été réalisé sur substrat naturel.

Pour ce faire, nous avons procédé comme suit :

Des galets sont prélevés dans le cours d'eau. De nombreux auteurs ont travaillé sur la variabilité de répartition du périphyton en milieu naturel. Cazaubon (1988) a mis l'accent sur l'importance de la microrépartition des algues sur un même galet ; il est communément admis que la distribution du bioderme périphytique est plus variable selon les différentes faces d'un même galet, qu'entre deux galets. Le nombre de galets prélevés varie en fonction de chaque étude.

Le bioderme périphytique recouvrant la face supérieure de chaque galet a été entièrement gratté afin de s'absoudre des problèmes de microrépartition inhérente à ce type de substrat et la totalité du périphyton recouvrant cette surface a été mise en suspension dans un volume déterminé d'eau déminéralisée dans un flacon numéroté. En effet, le prélèvement d'une fraction de bioderme par galet, pourrait entraîner une surestimation ou une sous-estimation sur l'ensemble de la station. De plus, la mise en suspension des galets dans un même échantillon permet de pondérer la variabilité de colonisation entre les substrats d'un même point. Ces flacons ont été stockés dans des glacières puis congelés afin d'éviter toute dégradation du matériel biologique.

Afin d'estimer la surface échantillonnée, chaque galet a été dessiné sur du papier millimétré puis décomposé en surfaces géométriques simples pour une estimation de la surface par le principe du planimètre.

Tableau 1 : Résultats des mesures gravimétriques et de pigments sur les biofilms

		Grand Rivière	Basse Pointe	Garonne amont	Garonne amont
Type de susbrat	unités	artificiel	naturel	artificiel	naturel
Matière sèche	mg/cm ²	0,04	0,41	10,41	1,77
Matière organique	mg/cm ²	0,03	0,20	1,23	0,29
Chlorophylle <u>a</u>	µg/cm ²	0,96	6,02	9,33	2,02
Phéopigments	µg/cm ²	0,18	2,57	–	0,87
proportion de matière organique (en %tage de matière sèche)		85,71	48,43	11,82	16,38
proportion de chlorophylle <u>a</u> (en %tage de matière sèche)		2,75	1,46	0,09	0,11
proportion de chlorophylle <u>a</u> (en %tage de matière organique)		3,21	3,01	0,76	0,70
proportion de phéopigments (en %tage de chlorophylle <u>a</u>)		18,64	42,71		43,07

Les mesures et les rapports, ainsi que la comparaison avec des résultats obtenus sur la Garonne amont confirment que le biofilm de Grand Rivière est presque exclusivement constitué d'algues avec des proportions de chlorophylle a par rapport à la matière sèche et organique très élevées (très peu de matière allochtone) et un rapport phéopigments/chlorophylle a faible ce qui indique une communauté algale en très bonne santé physiologique.

Les résultats obtenus sur le prélèvement naturel à Basse Pointe confirment nos observations de terrain, à savoir un bioderme similaire à celui récolté sur substrat artificiel à Grand Rivière, un peu plus riche en matière organique, mais très riche en algues et très peu colmaté. La seule différence notable est la proportion de phéopigments par rapport à la quantité de chlorophylle a ; ce taux nettement plus élevé pourrait indiquer une communauté algale plus dégradée qu'à Grand Rivière.

Ceci implique que dans la plupart des cours d'eau martiniquais, hors étude de cinétique de croissance et zone aval lentique de certaines rivières, les mesures d'estimation de biomasse (densités cellulaires, mesures gravimétriques et mesures de pigments) ainsi que celle de contaminants potentiels peuvent être facilement mises en oeuvre directement sur le biofilm naturel.

5. Présence de chlordécone dans le biofilm périphytique

Méthodologie

La prise d'essai pour le Chlordécone a été de 20 ml de suspension algale. L'analyse a été réalisée sur le particulaire par GC/ECD après extraction à l'ASE du filtre ayant servi à la filtration des 20 ml puis confirmé en GC/MS avec identification du spectre.

Tableau 2 : Résultats des mesures gravimétriques, de pigments et de chlordécone sur les biofilms

Type de substrat	unités	Grand Rivière	Basse Pointe
		artificiel	naturel
Matière sèche	mg/cm ²	0,04	0,41
Matière organique	mg/cm ²	0,03	0,20
Chlorophylle <u>a</u>	µg/cm ²	0,96	6,02
Chlordécone	ng/cm ²	traces	1,04
Chlordécone 5b-hydro	ng/cm ²		0,05
Chlordécone mg/Kg MS	mg/kg		2,52
Chlordécone mg/Kg MO	mg/kg		5,10

L'information concernant les traces de chlordécone à Grand Rivière, n'est donné qu'à titre indicatif ; un signal a été détecté, mais rien ne permet de prouver que nous ne sommes pas dans le bruit de fond de l'analyse, ni qu'il s'agisse d'un éventuel interférent.

La confirmation ou l'infirmerie de la présence de chlordécone à Grand Rivière nécessiterait de disposer d'une quantité d'échantillon plus importante de façon à pouvoir se trouver hors du bruit de fond et de pouvoir confirmer la présence par couplage GC/MS. Les traces sont estimées à environ 4ng dans les 20 ml filtrés, ce qui peut donner une idée de la masse d'échantillon à récolter nécessaire. Une teneur dans l'extrait de 50 ng minimum, voire 100 ng, serait idéale pour s'affranchir des risques d'interférences, soit 10 fois plus d'échantillon au minimum que ce qui a été prélevé lors de cette étude.

La présence de chlordécone est donc avérée et importante dans le biofilm récolté à Basse Pointe. A titre de comparaison, les quantités de chlordécone sont de l'ordre de 7 à 8 mg/Kg de matière sèche sur les organismes les plus contaminés étudiés lors du « Plan d'Action Chlordécone 2008-2010 » (Nicolas Bargier, com.pers.).

6. Conclusion

Le périphyton constitue la composante autotrophe essentielle des cours d'eau martiniquais et, de ce fait, l'une des principales sources de nourriture des consommateurs primaires et des omnivores (mollusque, poissons, crustacés). Les forts taux de contamination de ces consommateurs mis en évidence lors du « Plan d'Action Chlordécone 2008-2010 » laissent soupçonner la présence de chlordécone dans le biofilm périphytique.

Les résultats obtenus à Basse Pointe confirment que le bioderme périphytique constitue l'une des origines de la contamination de ces organismes.

L'analyse de la croissance des communautés périphytiques sur substrat artificiel a confirmé le caractère très oligotrophique des rivières martiniquaises avec un développement algal faible et très lent. De plus, les conditions météorologiques, hydrologiques et de fréquentation des cours d'eau rendent difficiles les manipulations sur substrats artificiels (arrachage par le courant, niveau d'eau très fluctuant, vandalisme,...).

Cependant, les résultats de l'analyse de la biomasse du périphyton récolté sur substrat naturel suite à la destruction des substrats artificiels à Basse Pointe ouvrent des perspectives de suivi et d'estimation des taux de contamination des communautés de diatomées benthiques dans les rivières martiniquaises par la récolte du biofilm naturel, très peu colmaté et presque exclusivement composé de diatomées (mise en œuvre facilitée et moins onéreuse) pour une estimation, une cartographie et un suivi des zones contaminées.

Par ailleurs, des études plus expérimentales en mésocosmes (canaux artificiels) peuvent également être envisagées afin de définir :

- la relation existant entre taux de chlordécone dans le milieu et bioaccumulation dans le biofilm,
- la relation entre taux de chlordécone dans le biofilm et bioaccumulation dans les organismes consommateurs de ce biofilm
- les conditions environnementales favorisant la bioaccumulation du chlordécone dans le biofilm
- ...