



**HAL**  
open science

# Écologie fonctionnelle dans les nappes phréatiques : liens entre flux de matière organique, activité et diversité biologiques

Arnaud Foulquier

## ► To cite this version:

Arnaud Foulquier. Écologie fonctionnelle dans les nappes phréatiques : liens entre flux de matière organique, activité et diversité biologiques. Sciences agricoles. Université Claude Bernard - Lyon I, 2009. Français. NNT : 2009LYO10142 . tel-00587833

**HAL Id: tel-00587833**

**<https://theses.hal.science/tel-00587833>**

Submitted on 21 Apr 2011

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# **THÈSE**

Présentée devant

**l'Université Claude Bernard Lyon 1**

pour obtenir le diplôme de

**DOCTORAT**

(Arrêté du 7 août 2006)

**Spécialité : ÉCOLOGIE**

**Par Arnaud FOULQUIER**

---

**Écologie fonctionnelle dans les nappes phréatiques:**

**liens entre flux de matière organique,**

**activité et diversité biologiques.**

---

Soutenue le 22 septembre 2009 devant le Jury composé de :

**M. Bernard MONTUELLE** (Président)

**M. Clifford DAHM** (Rapporteur)

**Mme Sylvie BARRAUD** (Examinatrice)

**M. Pierre MARMONIER** (Directeur de thèse)

**M. Florian MALARD** (Co-encadrant)

**M. Florian MERMILLOD-BLONDIN** (Co-encadrant)

# UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

## **Président de l'Université**

Vice-président du Conseil Scientifique  
Vice-président du Conseil d'Administration  
Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie  
Universitaire  
Secrétaire Général

## **M. le Professeur L. Collet**

M. le Professeur J.F. Mornex  
M. le Professeur G. Annat  
M. le Professeur D. Simon  
M. G. Gay

## ***UFR SANTE***

### ***Composantes***

UFR de Médecine Lyon R.T.H. Laënnec  
UFR de Médecine Lyon Grange-Blanche  
UFR de Médecine Lyon-Nord  
UFR de Médecine Lyon-Sud  
UFR d'Odontologie  
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques  
Institut Techniques de Réadaptation  
Département de Formation et Centre de Recherche en  
Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur P. Cochat  
Directeur : M. le Professeur X. Martin  
Directeur : M. le Professeur J. Etienne  
Directeur : M. le Professeur F.N. Gilly  
Directeur : M. le Professeur D. Bourgeois  
Directeur : M. le Professeur F. Locher  
Directeur : M. le Professeur Y. Matillon  
Directeur : M. le Professeur P. Farge

## ***UFR SCIENCES ET TECHNOLOGIE***

### ***Composantes***

UFR de Physique  
UFR de Biologie  
UFR de Mécanique  
UFR de Génie Electrique et des Procédés  
UFR Sciences de la Terre  
UFR de Mathématiques  
UFR d'Informatique  
UFR de Chimie Biochimie  
UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et  
Sportives  
Observatoire de Lyon  
Institut des Sciences et des Techniques de l'Ingénieur de Lyon  
Institut Universitaire de Technologie A  
Institut Universitaire de Technologie B  
Institut de Science Financière et d'Assurance

Directeur : Mme. la Professeure S. Fleck  
Directeur : M. le Professeur H. Pinon  
Directeur : M. le Professeur H. Ben Hadid  
Directeur : M. le Professeur G. Clerc  
Directeur : M. le Professeur P. Hantzpergue  
Directeur : M. le Professeur A. Goldman  
Directeur : M. le Professeur S. Akkouche  
Directeur : Mme. la Professeure H. Parrot  
Directeur : M. C. Collignon  
Directeur : M. le Professeur R. Bacon  
Directeur : M. le Professeur J. Lieto  
Directeur : M. le Professeur M. C. Coulet  
Directeur : M. le Professeur R. Lamartine  
Directeur : M. le Professeur J.C. Augros

## RÉSUMÉ

Les réseaux trophiques jouent un rôle primordial dans la régulation des flux de matière et d'énergie au sein des écosystèmes. Les grands cycles biogéochimiques, notamment celui du carbone, sont intimement liés à la structure trophique des communautés. Si les facteurs contrôlant la structure trophique des communautés terrestres et aquatiques de surface sont relativement bien connus, les connaissances acquises à ce jour pour les milieux aquatiques souterrains sont encore fragmentaires. Pourtant, les services écosystémiques associés aux biocénoses souterraines (dégradation des flux de matière organique de surface et maintien de la qualité des eaux souterraines) sont fortement sollicités par de nombreuses pratiques de recharge artificielle des aquifères. L'approche expérimentale de terrain et de laboratoire développée dans le cadre de cette thèse avait pour objectif de déterminer l'influence d'une augmentation des flux de carbone organique dissous sur l'intensité des interactions trophiques entre les communautés de micro-organismes et les assemblages d'invertébrés à la surface des nappes phréatiques rechargées artificiellement avec des eaux de ruissellement pluvial.

Les résultats montrent que la quantité de carbone organique dissous atteignant les horizons supérieurs des nappes phréatiques régule la biomasse et l'activité du compartiment microbien. La stimulation du compartiment microbien en réponse à l'augmentation des apports de carbone organique dissous n'est en revanche pas associée à un fort changement de composition des communautés. Ces travaux suggèrent également que la stimulation des communautés microbiennes est limitée par la qualité des apports dont la fraction la plus assimilable est retenue dans le sol et la zone non saturée. Les résultats obtenus tant sur le terrain qu'en conditions contrôlées font apparaître un faible transfert de matière et d'énergie du compartiment microbien vers les assemblages d'invertébrés et une absence de contrôle de ces derniers sur les communautés microbiennes et les processus de dégradation de la matière organique. L'augmentation considérable des flux d'eau infiltrés induit non seulement de faibles apports en carbone organique dissous facilement assimilable par le compartiment microbien, mais également une situation d'intenses perturbations environnementales limitant l'établissement des communautés d'invertébrés.

Les perspectives de cette thèse identifient les verrous scientifiques et les recherches à mener afin de poursuivre l'étude des relations entre productivité et interactions trophiques dans des habitats souterrains nettement plus diversifiés que les aquifères interstitiels profonds étudiés dans ce travail.

## **ABSTRACT**

Food webs play a crucial role in regulating the fluxes of matter and energy within ecosystems. The major biogeochemical cycles, including carbon, are intimately related to the trophic structure of communities. If the factors controlling the trophic structure of terrestrial and aquatic communities are relatively well known, the knowledge acquired so far for groundwater ecosystems is still fragmentary. However, ecosystem services associated with groundwater biocenoses (degradation of organic matter originating from surface ecosystems and maintenance of groundwater quality) are heavily used by various practices of artificial recharge of aquifers. The objective of the experimental field and laboratory methodology developed as part of this thesis was to determine the influence of an increase in the fluxes of dissolved organic carbon (DOC) on the strength of trophic interactions between the microbial compartment and invertebrate assemblages at the water table of aquifers artificially recharged with stormwater.

The results show that the availability of dissolved organic carbon reaching the groundwater table regulates microbial biomass and activities. However, the stimulation of the microbial compartment in response to an increase in dissolved organic carbon fluxes is not associated with a strong change in bacterial community structure. This work also suggests that the stimulation of microbial communities is limited by the quality of DOC supply, the more available fraction of the DOC being retained in the soil and unsaturated zone. The results obtained, both in the field and in controlled conditions, show a low transfer of matter and energy from the microbial compartment towards invertebrate assemblages and a lack of control of the microbial communities and organic matter processing by invertebrates. The increase in infiltrated water fluxes not only induces low inputs of biodegradable organic carbon easily assimilable by the microbial compartment, but also a context of intense environmental disturbances limiting the establishment of invertebrate communities.

This thesis work identifies scientific roadblocks and the research needed to explore the relationship between productivity and trophic interactions in groundwater habitats more diversified than the interstitial deep aquifers studied in this work.

## REMERCIEMENTS

Je souhaite tout d'abord adresser mes plus sincères pensées à Janine Gibert qui en tant que directrice de ma thèse est à l'origine des travaux présentés dans le cadre de cet ouvrage. Je souhaite ici lui exprimer ma plus profonde reconnaissance pour le soutien et l'entière confiance qu'elle m'a accordés durant ces années passées au sein de l'équipe d'Hydrobiologie et Ecologie Souterraines.

Je remercie l'ensemble des personnes ayant accepté de participer à mon jury de thèse:

- Clifford Dahm et Christian Griebler pour avoir accepté de rapporter mes travaux de thèse et m'avoir fait bénéficier de leurs commentaires et de leur expérience. Je remercie en particulier Clifford Dahm pour la grande attention accordée à la lecture de la version anglaise de ce manuscrit et les précieux conseils et corrections qui en ont résulté.

- Sylvie Barraud et Bernard Montuelle pour leur participation enthousiaste à mon jury de thèse et leurs commentaires enrichissants.

- Un grand merci à Pierre Marmonier pour ses encouragements et ses commentaires bienveillants particulièrement appréciables dans les moments de doute que peut traverser un doctorant.

- Je souhaite adresser mes remerciements les plus chaleureux à deux personnes dont l'investissement et la disponibilité sans limite ont fait que cette thèse s'est toujours déroulée dans les meilleures conditions possibles:

Merci à Florian Malard pour son soutien et ses encouragements permanents. Sa capacité à transmettre ses connaissances associée à une disponibilité à toute épreuve ont été un soutien plus que précieux durant toutes ces années passées dans l'équipe, de mes premiers pas en DEA jusqu'à la fin de cette thèse.

Merci à Florian Mermillod-Blondin pour sa disponibilité, sa bonne humeur et pour m'avoir fait bénéficier de ses conseils qui ont rendu mon apprentissage des colonnes sédimentaires et le temps passé au laboratoire des plus enrichissants.

Je souhaite exprimer toute ma reconnaissance envers les personnes qui, sans compter, m'ont apporté leur aide sur le terrain et au laboratoire :

Guillaume Bouger, Emmanuel Mallet, Yannick Negrutiu et Félix Vallier pour l'aide qu'ils ont pu fournir durant la longue phase de domptage du marteau-piqueur et d'installation des

piézomètres, mais également durant les campagnes de prélèvements réalisées sur le terrain. Je tiens à remercier tout particulièrement Guillaume Bouger pour son dévouement et l'aide qu'il a pu m'apporter aussi bien sur le terrain qu'au laboratoire.

Les membres du Cemagref : Bernadette Volat, Géraldine Nogaro pour le temps passé sur les analyses microbiennes et Thibault Datry pour son aide dans l'acquisition de données.

Christophe Lécuyer, François Fourel et François Martineau pour m'avoir permis d'accéder aux analyses isotopiques. Je remercie tout particulièrement Laurent Simon pour son aide et son investissement dans ces analyses qui ont constitué un grand atout dans les expériences réalisées en colonnes sédimentaires.

Sylvain Dolédec pour ses précieux conseils concernant les analyses multivariées.

Les membres de l'OTHU, Bernard Chocat, Cécile Delolme, Thierry Winiarski, Yvan Béranger et Laetitia Bacot pour leurs conseils et l'aide qu'ils ont pu m'apporter durant ces années de thèse.

Jean Chaggier et Stéphane Lagoutte du Grand Lyon pour avoir facilité l'accès aux bassins d'infiltration et l'installation des piézomètres.

Je souhaite également témoigner toute ma reconnaissance à l'ensemble des membres de l'équipe « Hydrobiologie et Ecologie Souterraines » pour leur accueil chaleureux, leur soutien et les discussions que nous avons pu avoir ensemble et qui ont fait de ces années au laboratoire une expérience des plus agréables. Merci à Dominique Martin, Marie-José Dole-Olivier, Christophe Douady, Michel Creuzé des Châtelliers, Fred Hervant, Christophe Piscart, Annick Papin et tous ceux qui ont partagé le bureau et ses environs : Simon Navel, Céline Colson-Proch, Chafik Maazouzi, David Ferreira, Julien Issartel.

Je voudrais également remercier les personnes qui ont permis que les enseignements réalisés dans le cadre de mon année d'ATER se déroulent dans les meilleures conditions (Nathalie Mondy, Pierre Sagnes, Damien Lemoine, Michel Creuzé des Châtelliers, Jean Claude Rostan).

Enfin, je voudrais remercier les personnes qui m'ont accompagné durant toutes ces années et qui m'ont toujours témoigné leur soutien sans (trop) me reprocher mon manque de disponibilité. Un grand merci à ma famille et mes parents qui m'ont toujours soutenu et fait confiance et qui m'ont permis d'arriver jusque là. Merci à tous ceux qui m'ont accompagné durant ces années et qui ont rendu les pauses repas, les soirées et les week-ends des plus agréables : Micheline, Etienne, Vincent, Mathieu, Cécile, Eve, Jodie, Steph, Patrice, Ben et... Nelly.



# SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION</b> .....	3
<b>ORGANISATION DU DOCUMENT</b> .....	5
<b>PROGRAMMES DE RECHERCHE SOUTENANT CE TRAVAIL</b> .....	7
<b>CHAPITRE 1 : CADRE CONCEPTUEL ET OBJECTIFS</b> .....	8
1.1. Relations trophiques et flux de matière et d'énergie dans les écosystèmes.....	9
1.1.1. Régulations ascendante et descendante dans les réseaux trophiques.....	9
1.1.2. Facteurs de contrôle des effets de la ressource et de la prédation.....	12
1.1.3. Les chaînes hétérotrophes .....	14
1.2. Les écosystèmes aquatiques souterrains.....	17
1.2.1. Sources et apports de carbone organique .....	17
1.2.2. Le réseau trophique .....	18
1.2.3. Le compartiment microbien .....	18
1.2.4. Les invertébrés souterrains.....	23
1.2.5. La connectivité hydrologique.....	25
1.3. Contrôle des réseaux trophiques souterrains : cadre conceptuel.....	29
1.4. La recharge artificielle des aquifères .....	32
1.4.1. Infiltration induite des eaux de ruissellement pluvial .....	32
1.4.2. Augmentation des flux de carbone organique dissous .....	34
1.4.3. Perturbations liées à la recharge artificielle .....	36
1.4.4. Réponse des réseaux trophiques.....	37
1.5. Objectifs de la thèse .....	39
<b>CHAPITRE 2 : MÉTHODOLOGIE</b> .....	40
2.1. Approche de terrain .....	41
2.1.1. La nappe de l'Est lyonnais .....	41
2.1.2. Réseau de sites .....	43
2.1.3. Dispositif spécifique pour l'étude des horizons supérieurs de la nappe .....	46
2.1.4. Campagnes d'échantillonnage et suivi en continu .....	48
2.2. Approche expérimentale en laboratoire .....	49
2.3. Variables mesurées et estimées.....	53

<b>CHAPITRE 3 : DYNAMIQUE DU CARBONE ORGANIQUE DISSOUS, DE L'OXYGÈNE ET DE LA TEMPÉRATURE AUX HORIZONS SUPÉRIEURS DES NAPPES PHRÉATIQUES .....</b>	<b>55</b>
3.1. Change in dissolved organic carbon and oxygen at the water table region of an aquifer recharged with stormwater : biological uptake or mixing ? (Article 1) .....	57
3.2. Thermal influence of urban groundwater recharge from stormwater infiltration basins. (Article 2).....	88
<b>CHAPITRE 4 : RÉGULATION ASCENDANTE ET DESCENDANTE DES COMMUNAUTÉS MICROBIENNES SOUTERRAINES.....</b>	<b>124</b>
4.1. Response of sediment biofilm to increased DOC supply in groundwater artificially recharged with stormwater. (Article 3) .....	126
4.2. Relative influences of DOC flux and subterranean fauna on microbial abundance and activity in aquifer sediments: new insights from <sup>13</sup> C-tracer experiments. (Article 4) .....	156
<b>CHAPITRE 5 : INTERACTIONS ENTRE LE FLUX DE COD, LES COMMUNAUTÉS MICROBIENNES ET LES INVERTÉBRÉS SOUTERRAINS.....</b>	<b>187</b>
5.1. Links between resource supply, sediment biofilm and invertebrates in groundwater. (Article 5) .....	189
<b>CHAPITRE 6 : SYNTHÈSE ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>225</b>
6.1. Synthèse et discussion.....	226
6.1.1. Hypothèses testées.....	226
6.1.2. Influence de la recharge sur les flux de carbone organique, de chaleur et les processus biogéochimiques .....	227
6.1.3. Réponse des communautés microbiennes à une augmentation des flux de carbone organique.....	230
6.1.4. Interactions entre le compartiment microbien et les invertébrés.....	233
6.2. Implications pour la gestion de l'infiltration des eaux de ruissellement pluvial ..	237
6.3. Perspectives.....	241
6.3.1. Biodégradabilité du carbone organique dissous.....	241
6.3.2. Lien entre fonctionnement biogéochimique et transfert des polluants.....	242
6.3.3. Structuration des réseaux trophiques en fonction de la quantité et de la diversité des sources de carbone organique .....	243
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>248</b>

## INTRODUCTION

Le rôle des réseaux trophiques dans la régulation des flux d'énergie et de matière au sein des écosystèmes est une thématique clef de l'écologie fonctionnelle (Petchey *et al.* 1999, Holt & Loreau 2001, Duffy 2002, Thébault & Loreau 2003). La dynamique de réponse de ces réseaux trophiques aux perturbations, notamment anthropiques, et leur capacité à maintenir un haut degré de régulation malgré l'intensification des facteurs de forçage liée aux changements globaux, conditionnent en grande partie le développement durable de nos sociétés. En effet, les grands cycles biogéochimiques, notamment celui du carbone, sont intimement liés au fonctionnement des réseaux trophiques. La majorité des concepts et des données relatifs au fonctionnement des réseaux trophiques est issue des nombreuses études menées sur les chaînes trophiques autotrophes des écosystèmes terrestres et aquatiques de surface (Hairston *et al.* 1960, Oksanen *et al.* 1981, Hunter & Price 1992, Shurin *et al.* 2006). Toutefois, nos connaissances sur les facteurs de contrôle des chaînes trophiques hétérotrophes, en particulier celles des milieux aquatiques souterrains, sont encore fragmentaires (Rosemond *et al.* 2001, Mikola & Setälä 1998). Pourtant, de nombreuses techniques d'infiltration d'eau de surface vers les nappes, regroupées sous le nom de recharge artificielle des aquifères, utilisent la capacité des chaînes trophiques souterraines à dégrader la matière organique afin d'accélérer le recyclage naturel des eaux et par conséquent d'améliorer la productivité des aquifères en eau souterraine de qualité (Miettinen 1996, Marsalek & Chocat 2002, Kolehmainen 2007). En raison de l'insuffisance des connaissances scientifiques sur le fonctionnement des chaînes trophiques souterraines, la gestion actuelle des pratiques d'infiltration est principalement fondée sur un principe qui consiste à réagir « en connaissance de conséquences » et à ajuster *a posteriori* ces pratiques à partir de la mesure des impacts sur les nappes phréatiques. L'abandon de cette gestion empirique au profit d'une approche qui consisterait à agir « en

connaissance de causes » et à ajuster *a priori* les pratiques d'infiltration à partir de la compréhension des mécanismes écologiques sous-jacents nécessite de développer des recherches sur le fonctionnement des chaînes trophiques souterraines, en particulier sur leur réponse à une augmentation des apports de carbone organique.

L'objectif de cette thèse est précisément de déterminer les effets d'une augmentation des apports de carbone organique dissous (COD) aux horizons supérieurs des nappes phréatiques, d'une part sur l'activité du compartiment microbien, et d'autre part, sur les interactions trophiques entre ce compartiment microbien et les invertébrés souterrains. Les hypothèses découlant de cet objectif sont présentées en détail à la fin du chapitre 1. Ce travail de recherche englobe des études de terrain visant à identifier les effets d'une augmentation locale des flux d'eau de ruissellement pluvial infiltrés sur les flux de COD atteignant la nappe, l'activité des communautés microbiennes et l'abondance des d'invertébrés. Il intègre également des études en conditions simplifiées (microcosmes) permettant de tester la réponse du compartiment microbien et les interactions trophiques entre ce compartiment et les invertébrés à un apport croissant de carbone organique dissous facilement biodégradable.

## **ORGANISATION DU DOCUMENT**

Le premier chapitre de cet ouvrage présente le cadre conceptuel et les objectifs de ce travail de recherche. Il s'attache à définir les concepts de régulation ascendante et descendante des réseaux trophiques et les principaux facteurs contrôlant ces deux types de régulation. L'accent est ensuite mis sur la structure et le fonctionnement des chaînes trophiques hétérotrophes, plus spécifiquement celles des écosystèmes aquatiques souterrains. Dans ces derniers, les effets de la ressource (flux de carbone organique disponible pour les micro-organismes) et de la prédation (broutage du biofilm microbien par les invertébrés) sur le fonctionnement des réseaux trophiques sont supposés varier différemment en fonction de la connectivité hydrologique avec la surface. Les hypothèses découlant de cette supposition sont présentées puis transposées au cas des aquifères dont la connectivité hydrologique avec la surface est localement amplifiée par une recharge artificielle avec des eaux de ruissellement pluvial.

Le second chapitre décrit l'instrumentation des sites de recharge et de référence sélectionnés et les expérimentations en laboratoire réalisées afin de tester les effets d'une augmentation des apports de carbone organique dissous aux horizons supérieurs des nappes phréatiques sur l'activité du compartiment microbien et sur les interactions trophiques entre ce compartiment et les invertébrés.

Le troisième chapitre de cet ouvrage analyse les effets d'une augmentation de la connectivité hydrologique avec la surface tant sur les apports de COD disponible pour le compartiment microbien que sur le niveau de perturbation (désoxygénation et variation thermique) auquel sont soumis les invertébrés. Ce chapitre établit plus précisément les effets d'une augmentation

des flux d'eau infiltrés sur les flux de COD atteignant la nappe, la dynamique de l'oxygène, et le régime thermique des nappes phréatiques. La première partie détermine l'influence relative des processus hydrologiques et biologiques sur les gradients verticaux de COD et d'oxygène dissous mesurés dans les horizons supérieurs des nappes. La seconde partie identifie les effets du transport de chaleur par advection, lié à la recharge artificielle en eau de ruissellement pluvial, sur l'amplitude thermique des eaux souterraines.

Le quatrième chapitre est consacré à l'étude des régulations ascendante et descendante dans les réseaux trophiques souterrains. La première partie analyse les réponses du compartiment microbien (activité et abondance) à une augmentation des apports de COD. La comparaison des réponses mesurées sur le terrain et de celles obtenues au laboratoire en présence d'une source facilement utilisable de carbone permet d'apprécier la biodégradabilité du COD atteignant la surface libre de la nappe à l'aplomb des sites de recharge. Dans la deuxième partie, les résultats de deux expérimentations en laboratoire sont utilisés afin d'évaluer l'influence relative d'une augmentation de COD biodégradable et de l'activité de bioturbation et de nutrition d'un invertébré souterrain sur l'activité et l'abondance des micro-organismes.

Le cinquième chapitre fournit une vision synthétique des effets de la connectivité hydrologique sur les biocénoses interstitielles à travers une analyse multi-tableaux qui permet de hiérarchiser l'intensité des relations existant entre les flux de COD, les conditions environnementales, l'activité et la diversité des communautés microbiennes et l'abondance des communautés d'invertébrés.

La synthèse de ce travail est l'objet du sixième et dernier chapitre. La première partie pointe les résultats phares de mes recherches et souligne leurs implications tant pour l'amélioration des connaissances fondamentales en écologie fonctionnelle des nappes phréatiques que pour la gestion des pratiques d'infiltration d'eau de ruissellement pluvial. La deuxième partie présente les perspectives s'inscrivant dans la continuité de ce travail de recherche et trace ensuite les grandes lignes d'un projet de recherche visant à mieux comprendre la structuration des réseaux trophiques souterrains en fonction de la quantité et de la diversité des sources de carbone organique.

## **PROGRAMMES DE RECHERCHE SOUTENANT CE TRAVAIL**

Le présent travail de recherche s'inscrit dans le programme « traitement des effluents » du cluster Environnement de la région Rhône-Alpes (<http://www.cluster-environnement.net>). Les études de terrain sont menées dans le cadre du programme « ECOPLUIES » de l'Agence Nationale de la Recherche (<http://www.graie.org/ecopluiies>). Elles s'appuient sur le réseau hors murs d'observation des rejets urbains de l'agglomération lyonnaise (Lyon, France) développé par l'Observatoire de Terrain en Hydrologie Urbaine (OTHU), fédération de recherche pluridisciplinaire dont l'objectif finalisé est de proposer de nouvelles solutions de conception et de gestion de l'assainissement (<http://www.graie.org/othu>). Les expériences en microcosmes s'insèrent dans le programme NAPCOD du Programme National « Ecosphère Continentale et Côtière » (Mermillod-Blondin, 2006).

# 1

## CADRE CONCEPTUEL ET OBJECTIFS



## **1.1. RELATIONS TROPHIQUES ET FLUX DE MATIÈRE ET D'ÉNERGIE DANS LES ÉCOSYSTÈMES**

### **1.1.1. Régulations ascendante et descendante dans les réseaux trophiques**

Au sein des écosystèmes, la structure des communautés, reflétée par les abondances, la distribution et la diversité des organismes, est un paramètre important dans la régulation des flux de matière et d'énergie. Les relations trophiques qui jouent un rôle prépondérant dans la structuration des communautés vont ainsi réguler les processus de production et de dégradation de la matière organique et les transferts d'énergie entre les organismes. L'intégration des flux de matière et d'énergie dans le cadre des relations trophiques remonte aux travaux d'Elton (1927) et Lindeman (1942) avec l'application des principes de thermodynamique au fonctionnement des écosystèmes. Dans ce cadre, les organismes sont répartis en niveaux trophiques qui définissent des groupes fonctionnels reliés entre eux au sein de chaînes ou réseaux trophiques au travers desquels la circulation d'énergie peut avoir lieu. Les producteurs primaires, organismes autotrophes en majorité photosynthétiques, constituent le groupe basal des réseaux trophiques dont dépendent les organismes hétérotrophes. Ces derniers sont regroupés en consommateurs primaires (herbivores), secondaires (carnivores primaires) et tertiaires (carnivores secondaires) et décomposeurs (bactéries et champignons). Dans ce contexte, les transferts de matière et d'énergie à travers le réseau trophique sont régulés par les apports de ressource limitante aux écosystèmes qui définissent ainsi la productivité à chaque niveau trophique de manière ascendante (bottom-up control) des producteurs primaires jusqu'aux prédateurs. Ce modèle prédit qu'une augmentation de la productivité primaire se traduit par une augmentation du nombre de niveaux trophiques et une augmentation de la biomasse au sein de chaque niveau trophique.

En 1960, Hairston *et al.* proposent le modèle HSS (du nom de ses trois auteurs) qui présente une vue diamétralement opposée à la régulation ascendante des réseaux trophiques en mettant l'accent sur l'importance de la prédation par les niveaux supérieurs. Pour ces auteurs, les végétaux dominent la plupart des écosystèmes grâce à l'action des carnivores qui limitent les populations d'herbivores. Dans ce contexte, les abondances à chaque niveau trophique sont régulées directement (entre deux niveaux trophiques adjacents) ou indirectement (cascade trophique) par l'action des niveaux supérieurs de manière descendante (top-down control). Ce modèle proposé pour les écosystèmes terrestres et limité à des chaînes trophiques comprenant trois niveaux trophiques (plantes, herbivores et carnivores) trouve un écho avec les travaux de Carpenter *et al.* (1985) présentant des exemples de cascades trophiques en milieu lacustre avec quatre niveaux trophiques. L'introduction d'une espèce piscivore (carnivore secondaire) apparaît ainsi comme un moyen efficace de lutter contre l'eutrophisation des lacs (liée à des abondances excessives de phytoplancton) en diminuant les abondances d'espèces planctonivores (carnivore primaire) et relâchant ainsi la pression de prédation sur le zooplancton (herbivore), ce dernier étant ainsi capable de limiter efficacement les abondances de phytoplancton.

Il est à présent admis qu'une dichotomie opposant un contrôle des chaînes trophiques par la ressource ou la prédation est artificielle et que ces deux forces agissent de manière simultanée dans les écosystèmes. Le modèle EEH (Exploitation Ecosystem Hypothesis) (Fretwell 1977, Oksanen *et al.* 1981) intègre cette idée et fournit un cadre conceptuel contexte-dépendant qui étend les prédictions du modèle HSS à des chaînes trophiques de longueur supérieure ou inférieure à trois niveaux tout en mettant en avant l'importance du contrôle par la ressource (nutriments, productivité) sur la structure des communautés. Les communautés sont ainsi alignées le long d'un gradient de ressource ou de productivité, la longueur des chaînes et l'intensité des interactions entre deux niveaux trophiques adjacents augmentant avec la quantité de ressource disponible (Figure 1.1). Au sein des écosystèmes présentant les plus basses valeurs de productivité, les faibles abondances du niveau trophique basal ne permettent pas l'établissement d'un niveau trophique supérieur. Lorsque la productivité augmente, les abondances au sein du niveau trophique supérieur vont également augmenter et entraînent une intensification de la consommation sur le niveau trophique basal dont les abondances sont maintenues constantes par la prédation. Une augmentation de productivité permet

l'établissement d'un troisième niveau trophique qui limite les abondances du second et relâche ainsi la pression de prédation sur le premier niveau trophique. Les prédictions du modèle implique donc que pour un nombre de niveaux trophiques fixé, deux niveaux trophiques adjacents répondent différemment à une augmentation de productivité, les abondances de l'un augmentant alors que les abondances de l'autre restent constantes. Dans ce contexte, chaque niveau trophique est alternativement contrôlé par la compétition ou la prédation.

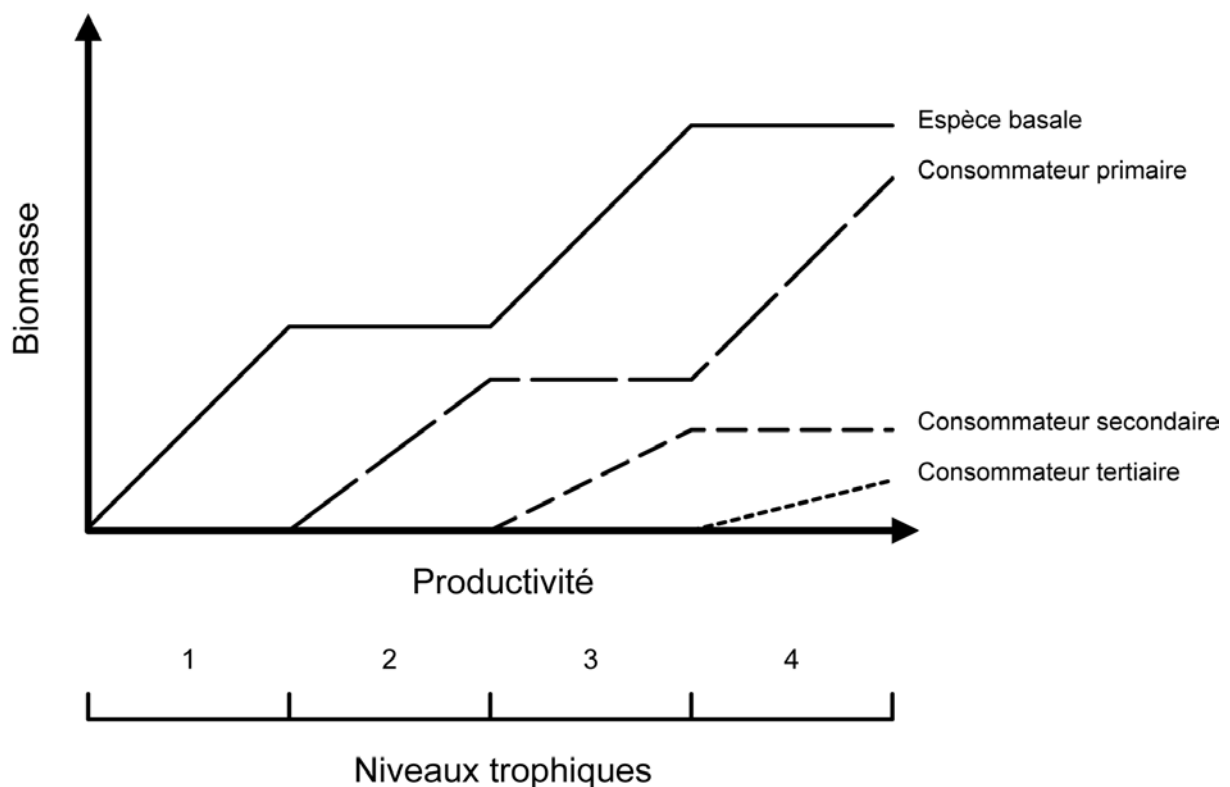


Figure 1.1: Variations de biomasse prédites par le modèle EEH (Oksanen *et al.* 1981) au sein de différents niveaux trophiques le long d'un gradient de productivité (modifié d'après Leibold *et al.* 1997).

Les opposants au modèle EEH considèrent que les cascades trophiques prédites sont rares dans la nature et principalement observées dans des milieux aquatiques présentant une faible diversité spécifique (Hunter & Price 1992, Strong 1992, Polis & Strong 1996). Sans toutefois remettre en cause l'importance de la prédation, le débat s'est progressivement déplacé vers la question de l'intensité relative du contrôle par la ressource et de la prédation sur la structure des communautés. Il s'agit désormais d'identifier plus précisément les facteurs impliqués dans

les variations d'intensité de ces contrôles selon les types d'écosystèmes considérés, la diversité spécifique au sein d'un niveau trophique et l'intensité des stress environnementaux.

### **1.1.2. Facteurs de contrôle des effets de la ressource et de la prédation**

Les récentes analyses visant à mesurer l'intensité relative de la régulation par la ressource et la prédation sur la structure des communautés soulignent les différences de structure et de fonctionnement des écosystèmes aquatiques et terrestres (Shurin *et al.* 2002, Shurin *et al.* 2006, Gruner *et al.* 2008). Ainsi, malgré la prévalence de la ressource comme facteur de régulation de la structure des communautés dans tous les écosystèmes (Hunter & Price 1992), le contrôle de la productivité primaire de manière directe par les herbivores ou indirecte par l'intermédiaire de cascades trophiques est plus intense dans les milieux aquatiques. Les interactions trophiques entre herbivores et producteurs primaires sont plus importantes en milieu aquatique avec des taux de consommation de biomasse végétale jusqu'à quatre fois plus élevés qu'en milieu terrestre. Cette différence d'intensité s'explique dans un premier temps par une forte structuration des chaînes trophiques aquatiques du point de vue de la taille. Les producteurs primaires sont généralement unicellulaires, notamment en milieu pélagique, et la taille des organismes augmente avec leur position le long de la chaîne trophique. Les taux de croissance plus élevés des producteurs primaires en milieu aquatique permettent également un remplacement plus rapide des tissus consommés par les herbivores, compensant ainsi les pertes de biomasse tout en soutenant des abondances plus élevées dans les niveaux trophiques supérieurs. Enfin, les producteurs primaires en milieu aquatique possédant des tissus plus riches en azote et en phosphore, ils constituent une ressource de meilleure qualité pour les herbivores. Cependant, si les cascades trophiques sont globalement plus intenses dans les écosystèmes aquatiques en raison d'un contrôle plus important de la productivité primaire par les herbivores, les variations d'intensité à l'intérieur d'un type d'écosystème peuvent également être élevées (Shurin *et al.* 2002).

Parmi les facteurs expliquant cette variabilité, certains auteurs avancent l'idée que la prise en compte de la diversité spécifique au sein d'un niveau trophique peut permettre d'expliquer l'absence d'un fort contrôle par la prédation dans certains écosystèmes (Leibold 1997, Hunter & Price 1992, Power 1992). Le concept même de niveau trophique - un groupe d'espèces qui partagent des ressources similaires et sont sensibles de manière équivalente à la prédation du

niveau supérieur - est difficilement applicable en raison de la complexité des écosystèmes. Les différences de vulnérabilité à la prédation au sein d'un niveau trophique modifient les prédictions concernant l'influence de la prédation sur les abondances des proies le long d'un gradient de productivité. Lorsque les différentes espèces de proies varient en vulnérabilité, l'augmentation de productivité ne se traduit pas forcément par une augmentation des effets de la prédation en raison par exemple d'une augmentation des défenses ou de la tolérance des proies (Leibold 1996). Le long d'un gradient croissant de productivité, les abondances des proies vulnérables sont effectivement contrôlées par la prédation alors que les abondances de proies plus résistantes à cette même prédation augmentent (Strong 1992, Leibold 1997). Une illustration de ces différences de vulnérabilité à la prédation au sein d'un niveau trophique et de leurs conséquences sur les effets de la prédation est fournie par les travaux de Schmitz (1994) qui, en retirant la pression de prédation d'une araignée sur une espèce de sauterelle, observe une diminution des abondances d'espèces de plantes vulnérables à l'herbivorie accompagnée d'une augmentation des espèces présentant des structures de défenses contre les herbivores (tiges et feuilles pubescentes). De plus, la vulnérabilité d'un même organisme à la prédation peut également varier en fonction des étapes de son cycle de développement: les juvéniles sont potentiellement plus vulnérables que les stades adultes, de plus grande taille, qui peuvent échapper à la prédation (Chase 2003). L'augmentation de productivité n'impliquerait donc pas nécessairement une augmentation de l'intensité de prédation.

Les variations de facteurs abiotiques peuvent également modifier l'intensité des interactions trophiques en induisant un stress sur les prédateurs dont la capacité à contrôler efficacement les abondances des proies diminue. Menge et Sutherland (1976) proposent un modèle (Environmental Stress Model, ESM) mettant en avant l'idée que l'intensité des interactions trophiques varie le long d'un gradient de stress environnemental (Figure 1.2). Pour un même niveau de stress, les effets de la prédation varient inversement avec la compétition pour la ressource et la position trophique. Les espèces constituant les niveaux trophiques les plus élevés sont principalement soumises à la compétition pour la ressource alors que les espèces situées à la base de la chaîne trophique sont régulées par la prédation. Les conditions les plus bénignes correspondent à un nombre de niveaux trophiques élevés présentant de fortes interactions. Lorsque les conditions environnementales se durcissent, les chaînes trophiques se raccourcissent et l'allocation d'énergie à la réponse au stress par les prédateurs diminue leur capacité à contrôler efficacement leur proie.

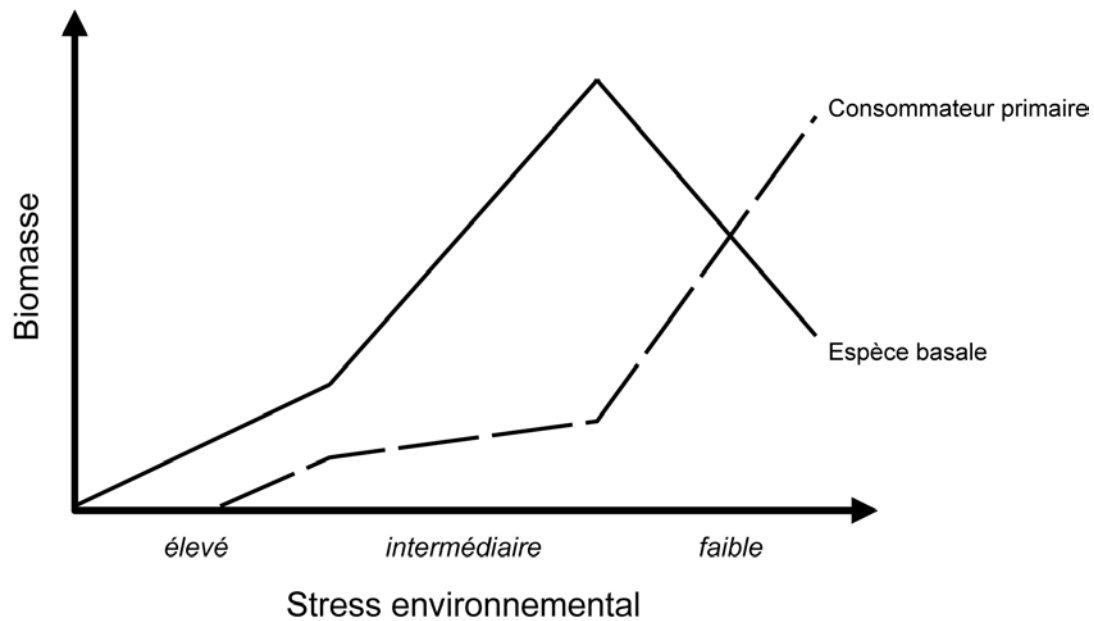


Figure 1.2 : Prédications du modèle ESM (modifié d'après Menge *et al.* 2002). La capacité du consommateur primaire à contrôler l'espèce basale augmente le long d'un gradient de stress environnemental décroissant.

### 1.1.3. Les chaînes hétérotrophes

Les différents modèles et exemples présentés dans les sections précédentes reflètent l'intérêt accordé aux réseaux trophiques présentant un couple "producteurs primaires – herbivores" à leur base et l'influence des interactions entre ces deux niveaux trophiques sur la structure des communautés. Pourtant, seule une faible partie des flux de matière et d'énergie transite par les herbivores jusqu'aux niveaux trophiques supérieurs et jusqu'à 70-90% de la production primaire passe par les réseaux détritiques (Polis & Strong 1996, Rosemond *et al.* 2001, Moore *et al.* 2004). Cette matière organique détritique, source d'énergie et de nutriments est pourtant depuis longtemps reconnue comme un facteur important dans le fonctionnement des écosystèmes. Les processus de dégradation de la matière organique et de reminéralisation des nutriments réalisés par les décomposeurs (Figure 1.3) influencent la structure des chaînes trophiques et le carbone ainsi assimilé par le compartiment microbien peut ensuite être transféré vers les détritivores jusqu'aux niveaux trophiques plus élevés (Hairston & Hairston 1993, Hall 1995, Hall & Meyer 1998). Cependant, les chaînes détritiques sont rarement intégrées dans les études de la régulation de la structure des communautés malgré leur fort degré de connexion avec les chaînes « autotrophes » (Moore *et al.* 2004). Les études comparant l'influence relative de la ressource et de la prédation sur la

structure des communautés détritiques sont rares mais les exemples existant mettent en avant une forte importance de la ressource et une absence de cascades trophiques (Mikola & Setälä 1998, Rosemond *et al.* 2001).

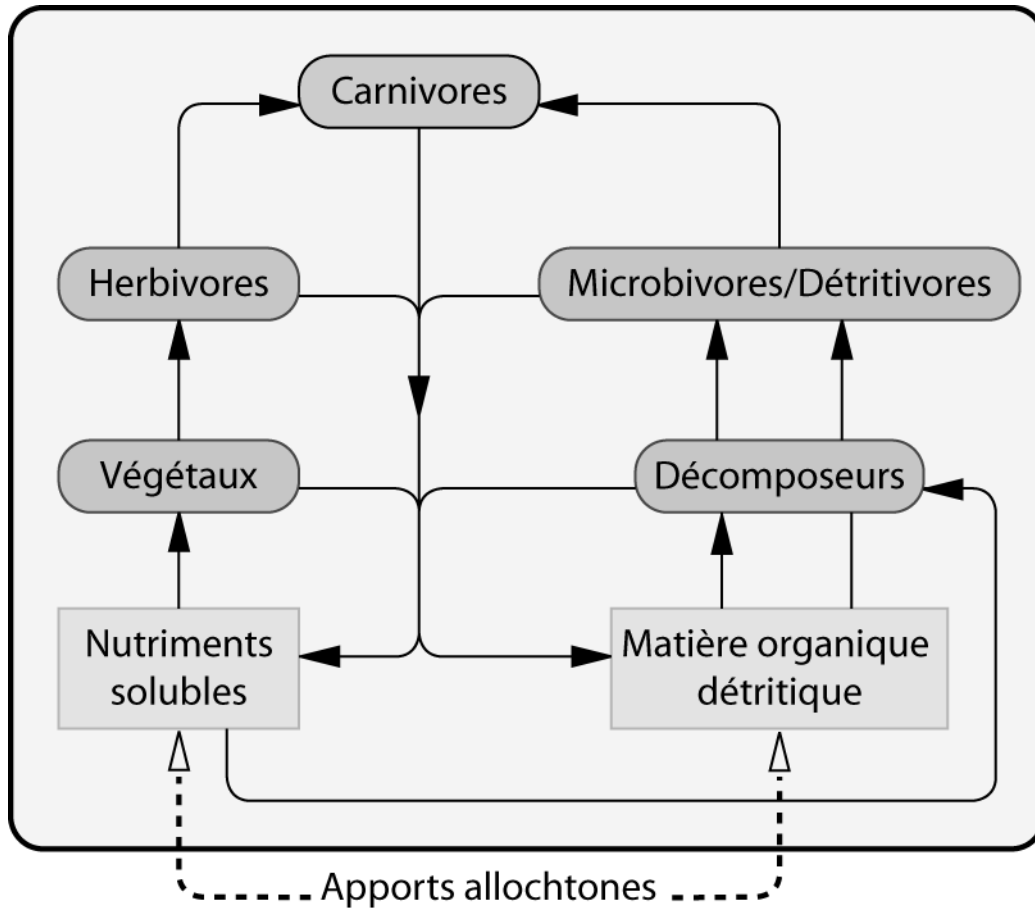


Figure 1.3 : Caractéristiques d'un réseau trophique de surface incorporant les chaînes détritiques. Les lignes en pointillé symbolisent les apports de matière et de nutriments allochtones contrairement aux traits pleins qui correspondent aux flux autochtones (modifié d'après Moore *et al.* 2004)

Les études plus principalement centrées sur les facteurs contrôlant le compartiment microbien sont en revanche plus nombreuses et rapportent un fort contrôle de la ressource sur la productivité microbienne qui se trouve en général limitée par la quantité de carbone présente dans le milieu ainsi que par les quantités d'azote et de phosphore (Pace & Cole 1994). L'influence de la prédation amène en revanche à des réponses variées qui dépendent des conditions d'apports du milieu. Lorsque les apports ne constituent pas un facteur limitant, les taux de renouvellement bactériens permettent d'atténuer les effets d'une intense prédation qui se traduit alors par une absence de variation des abondances microbiennes mais une

productivité plus élevée impliquant un taux de minéralisation du C plus élevé (Mikola & Setälä 2008). Les effets de la prédation peuvent cependant être plus élevés lorsque les apports détritiques sont trop faibles pour compenser les pertes liées à la prédation (Rosemond *et al.* 2001). Dans une étude sur l'importance de la ressource et de la prédation dans le contrôle des communautés bactériennes planctoniques, Gasol *et al.* (2002) arrivent à la conclusion selon laquelle les bactéries sont globalement régulées par la ressource mais que la prédation module son effet dans tous les milieux. Ainsi, la prédation régulerait fortement les abondances dans les milieux oligotrophes alors qu'elle influence plutôt la composition des communautés et les activités dans les milieux plus riches.

Les interactions complexes entre les chaînes autotrophes et hétérotrophes et les sources variées d'apports détritiques rendent difficile l'étude des réseaux trophiques de surface. En ce sens, les écosystèmes souterrains qui dépendent entièrement des apports détritiques provenant de la surface peuvent constituer un milieu d'étude facilitant la compréhension des réseaux détritiques (Simon *et al.* 2003).



## 1.2. LES ÉCOSYSTÈMES AQUATIQUES SOUTERRAINS

### 1.2.1. Sources et apports de carbone organique

En raison d'une absence de lumière empêchant toute activité photosynthétique, la plupart des écosystèmes souterrains sont caractérisés par une absence de production primaire et une entière dépendance aux apports de matière et d'énergie provenant de la surface. La matière organique particulaire (e.g. débris ligneux, foliaires ou algaux) peut constituer une part non négligeable des apports de surface dans les milieux karstiques ou les premiers centimètres de la zone hyporhéique. Cependant, dans les couches profondes des aquifères interstitiels, ces apports sont limités par les capacités de rétention du sol et de la zone non saturée et les apports ont principalement lieu sous forme dissoute. Les écosystèmes souterrains sont des milieux oligotrophes qui présentent de faibles teneurs en matière organique, qu'elle soit sous forme dissoute ou particulaire. Les concentrations en carbone organique dissous (COD) dans les aquifères interstitiels sont le plus souvent inférieures à 2 mg l<sup>-1</sup> et les teneurs en carbone organique sédimentaire dépassent rarement 0.5 % (Leenheer *et al.* 1974, Malard & Hervant 1999). Si les flux de COD dans l'horizon organique des sols varient de 100 à 400 kg C par hectare et par an, ceux atteignant les nappes phréatiques sont généralement inférieures à 5 kg C ha<sup>-1</sup> an<sup>-1</sup> en raison d'une forte rétention et dégradation du COD dans les horizons inférieurs du sol et la zone non saturée (Michalzik *et al.* 2001, Datry *et al.* 2005). En raison de cette forte limitation en carbone, les écosystèmes souterrains se placent en position extrême le long d'un gradient de productivité (Chelius *et al.* 2009).

### **1.2.2. Le réseau trophique**

Les chaînes trophiques souterraines sont relativement peu documentées malgré quelques études réalisées en milieu karstique (Culver 1994, Simon *et al.* 2003). Les apports de carbone organique sous forme dissoute ou particulaire constituent la ressource basale des réseaux trophiques souterrains. Les processus de rétention, d'assimilation et de dégradation de la matière organique associés au compartiment microbien jouent un rôle prépondérant dans le fonctionnement des écosystèmes souterrains et les transferts de matière et d'énergie vers les niveaux trophiques supérieurs (Simon *et al.* 2003). Le compartiment microbien constitue le niveau basal des chaînes trophiques souterraines dont dépendent la méio- et la macrofaune principalement constituée d'invertébrés (Ward *et al.* 1998, Pusch *et al.* 1998). Les bactéries peuvent être ingérées directement ou indirectement par absorption de sédiments ou de particules organiques auxquelles elles sont attachées. Les chaînes trophiques souterraines ne présentent pas de prédateurs spécialistes et la plupart des invertébrés sont considérés comme des généralistes se nourrissant sur des proies de plus petite taille (Gibert & Deharveng 2002). Les apports de matière organique particulaire peuvent également constituer une ressource trophique pour les invertébrés mais leur significativité dans les réseaux trophiques souterrains semblerait plutôt liée au fait qu'ils constituent une source potentielle de matière organique dissoute (Simon *et al.* 2003).

### **1.2.3. Le compartiment microbien**

Les écosystèmes aquatiques souterrains présentent une diversité d'habitats permettant la persistance de communautés microbiennes variées. Celles-ci font partie intégrante des biocénoses souterraines et jouent un rôle prépondérant dans le métabolisme des écosystèmes souterrains par leur activité de dégradation des flux de matière organique provenant de la surface et la production de biomasse bactérienne. Ces communautés microbiennes présentent un certain nombre de particularités les différenciant des communautés de surface et qui reflètent leur adaptation aux conditions oligotrophes des écosystèmes souterrains (Goldscheider *et al.* 2006, Griebler & Lueders 2008). La taille des cellules est généralement réduite en comparaison avec des milieux plus riches en nutriments ce qui permet de maximiser le rapport surface/volume des cellules en améliorant ainsi les échanges avec le

milieu extérieur (Wilson *et al.* 1983). Les abondances bactériennes présentent une importante variabilité mais elles sont généralement 10 à 1000 fois inférieures à celles mesurées dans les sols. Elles varient de  $10^2$  à  $10^6$  cellules par mL pour les bactéries planctoniques et  $10^4$  à  $10^8$  cellules par gramme de sédiment sec pour les bactéries attachées aux sédiments (Goldscheider *et al.* 2006). La totalité de ces cellules n'est cependant pas active et les conditions de forte limitation en carbone impliquent qu'une proportion importante de bactéries est dans un état de dormance et présente un métabolisme réduit et de faibles taux de croissance. Plusieurs auteurs ont ainsi montré que le pourcentage de bactéries actives au sein des écosystèmes souterrains était généralement inférieur à 30% (King & Parker 1988, Alfreider *et al.* 1997, Claret *et al.* 1998).

L'étude des communautés microbiennes dans de nombreux systèmes a permis de mettre en évidence que le mode de vie planctonique ne constituait qu'une étape dans le cycle de vie des bactéries dont la majorité se déroule attachée aux surfaces. Les communautés microbiennes malgré leurs caractéristiques particulières n'échappent pas à ce constat, notamment en conditions oligotrophes où la proportion de bactéries planctoniques par rapport au nombre de bactéries total est la plus faible (Alfreider *et al.* 1997, Griebler 2002). Les communautés microbiennes des eaux souterraines vivent donc principalement à l'état de biofilm qui leur confère un certain nombre d'avantages par rapport au mode de vie planctonique. Le biofilm correspond à une communauté de micro-organismes enveloppée dans une matrice de substances polymériques extracellulaires (EPS) qui facilitent leur adhésion à la surface des sédiments. La matrice d'EPS est un ensemble de macromolécules d'origine microbienne composé jusqu'à 95% de polysaccharides mais également de protéines, d'acides nucléiques ou de lipides. Cette matrice qui peut constituer entre 50 et 90% de la biomasse du biofilm (Characklis 1990, Flemming & Wingender 2001), fournit en comparaison au mode de vie planctonique un certain nombre d'avantages incluant par exemple une plus forte résistance à la dessiccation, aux antibiotiques ainsi qu'un meilleur piégeage des nutriments. Cette matrice pourrait également constituer un moyen de résistance aux variations environnementales, notamment vis à vis des fluctuations des apports de matière organique dissoute (Freeman & Lock 1995). La phase d'assimilation par les cellules bactériennes de la matière organique immobilisée au niveau de la matrice est généralement précédée d'une hydrolyse en composés de faible poids moléculaire par des enzymes extracellulaires hébergées au sein de la matrice. Lors d'un développement de biofilm important, la diffusion de substrats et de nutriments peut

se trouver limitée par l'épaisseur de la matrice d'EPS impliquant ainsi une zonation des activités cellulaires. Les bactéries se trouvant dans les couches profondes du biofilm présentent des activités réduites en comparaison aux bactéries situées à la périphérie. Dans ce cadre particulier, l'augmentation du nombre de cellules au sein du biofilm n'implique pas une corrélation directe avec une augmentation des activités (Battin & Sengschmitt 1999).

Le processus d'acquisition d'énergie par le compartiment microbien implique un ensemble de réactions d'oxydo-réduction correspondant à un transfert d'électrons d'un donneur vers un accepteur d'électrons (Figure 1.4). L'oxydation du carbone organique (donneur d'électron) présente le rendement énergétique le plus élevé lorsque l'oxygène (respiration aérobie) est utilisé comme accepteur d'électron (Chapelle 1993).

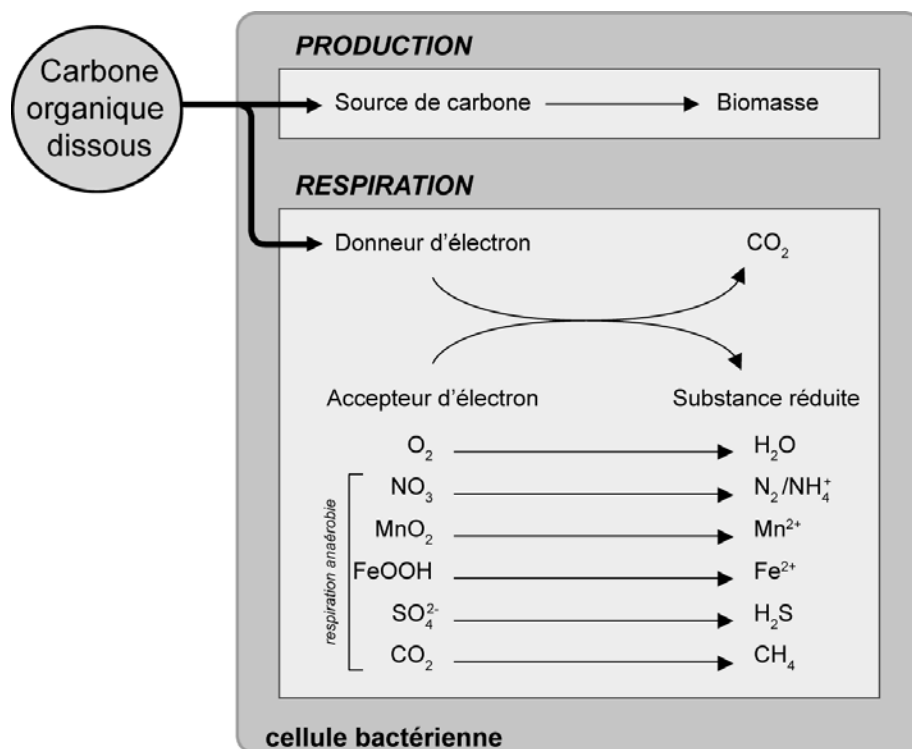


Figure 1.4 : Illustration simplifiée des voies métaboliques des micro-organismes souterrains hétérotrophes (modifié d'après Goldscheider *et al.* 2006)

Cependant, en raison de l'absence de photosynthèse, les taux de renouvellement de l'oxygène dissous (OD) dans les eaux souterraines sont faibles. Lorsque la demande en oxygène nécessaire à l'oxydation du carbone organique dépasse les taux de renouvellement, les eaux

souterraines basculent en conditions anaérobies et la dégradation du carbone se poursuit selon une séquence de réactions d'oxydo-réduction classées en fonction de leur rendement énergétique. Les accepteurs d'électrons impliqués dans ces réactions sont successivement les nitrates, oxydes/hydroxydes de manganèse, oxydes/hydroxydes de fer, sulfates et le CO<sub>2</sub> dissous. Ces différentes réactions sont assurées par des groupes fonctionnels microbiens distincts impliquant ainsi une modification de la structure des communautés microbiennes en fonction des zones rédox considérées (Röling *et al.* 2001).

D'autres facteurs tels que la quantité et la qualité des apports de matière organique peuvent également influencer la structure des communautés microbiennes. Les effets d'une augmentation des apports de matière organique sur la structure des communautés microbiennes sont supposés être plus particulièrement marqués dans les milieux oligotrophes qui présentent des groupes bactériens adaptés à de très faibles concentrations de matière organique dissoute. Eiler *et al.* (2003) observent que le long d'un gradient de concentrations croissantes en COD, les changements de structure de communautés microbiennes les plus importants ont lieu à la base du gradient lors du passage de conditions oligotrophes vers des conditions d'apports plus élevés, certains groupes tels que les alpha-protéobactéries n'étant observés que pour les concentrations les plus faibles. Des études récentes montrent également que les variations de composition des apports de matière organique peuvent exercer un fort contrôle sur les fonctions microbiennes impliquées dans la dégradation de la matière organique (activités hydrolytiques extracellulaires, productivité) à travers des changements de structure de communautés microbiennes lorsque certains composés organiques nécessitent la présence de groupes bactériens spécialisés dans leur dégradation (Findlay *et al.* 2003, Kirchman *et al.* 2004, Judd *et al.* 2006). Du point de vue des facteurs contrôlant la structure des communautés microbiennes dans les écosystèmes souterrains, les connaissances actuelles sont largement dominées par les études réalisées dans des aquifères contaminés (voir les synthèses de Haack & Bekins 2000, Griebler & Lueders 2002, Goldscheider *et al.* 2006). L'introduction de polluants organiques biodégradables au sein des écosystèmes souterrains oligotrophes fournit une source de matière et d'énergie au compartiment microbien entraînant généralement une augmentation des abondances et des activités qui peut être associée à des changements de structures de communautés lorsque les abondances de groupes bactériens spécialisés dans la dégradation d'un polluant spécifique sont stimulées (Haack & Bekins 2000, Goldscheider *et al.* 2006).



### 1.2.4. Les invertébrés souterrains

Les aquifères abritent des communautés d'invertébrés dont la richesse et la composition varient en fonction de la connectivité entre les eaux souterraines et les eaux de surface. Au sein des écotones et des aquifères en liaison hydraulique avec un cours d'eau, ces communautés comportent généralement (Figure 1.5): (1) des organismes épigés présents de manière accidentelle dans les habitats souterrains où ils peuvent jouer le rôle de proies (i.e. stygoxènes); (2) des organismes épigés capables d'exploiter les ressources des habitats souterrains et d'y réaliser une partie ou la totalité de leur cycle de vie (i.e. stygophiles); (3) et des organismes souterrains qui sont des formes spécialisées réalisant la totalité de leur cycle de vie dans les eaux souterraines (i.e. stygobies).

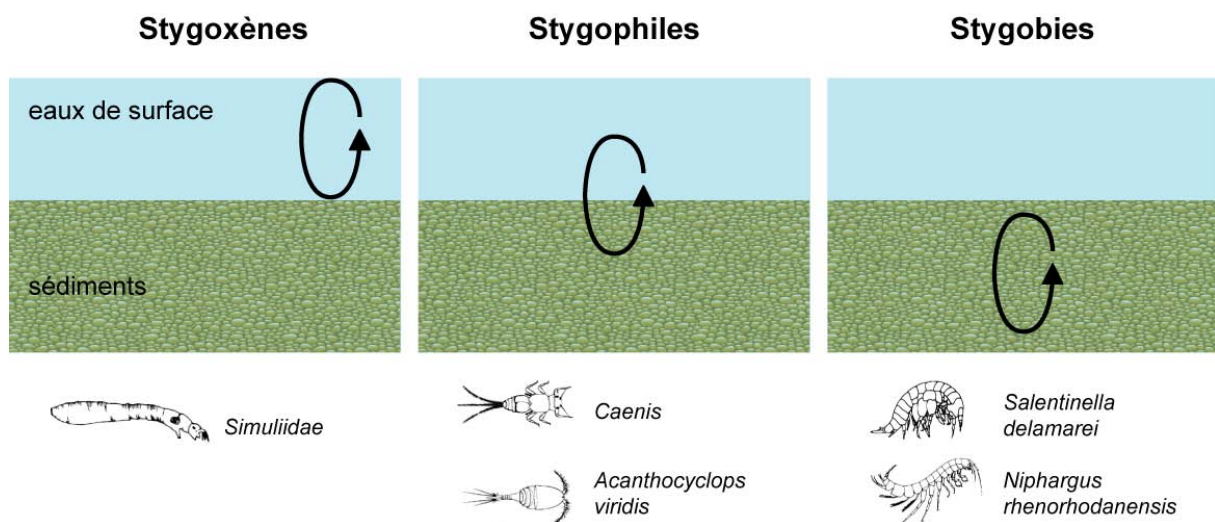
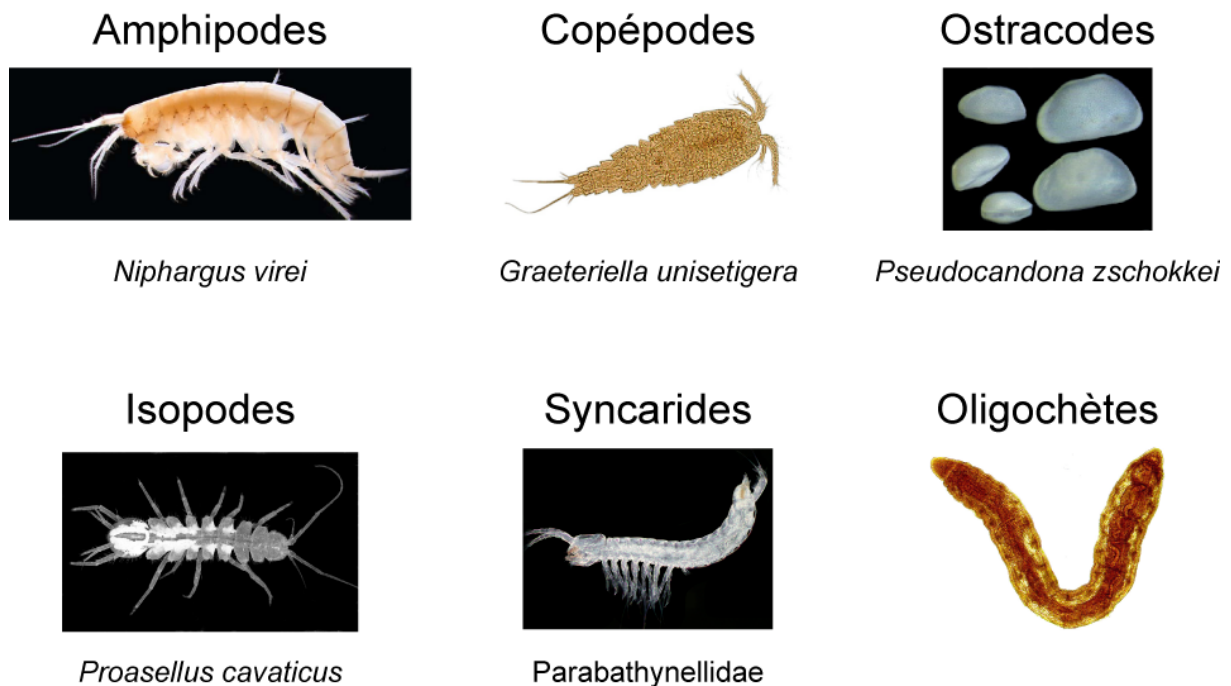


Figure 1.5: Classification écologique des invertébrés souterrains aquatiques (d'après Marmonier *et al.* 1993).

Les communautés d'invertébrés présentes dans les couches profondes des aquifères ou les aquifères alimentés essentiellement par infiltration naturelle des eaux de pluie sont principalement composées d'organismes souterrains. Ces derniers appartiennent en majorité au groupe des Crustacés et plus particulièrement aux Malacostracés et Copépodes qui représentent respectivement près de 61 et 23 % des espèces stygobies mondiales de Crustacés (Ferreira 2005, Hobbs 2000) (Figure 1.6). En comparaison aux espèces épigées, les organismes souterrains présentent un certain nombre de traits biologiques reflétant leur adaptation à une faible disponibilité des ressources trophiques et une relative stabilité des

conditions environnementales. Ces différents traits correspondent à un allongement des cycles de vie, un métabolisme et un taux de reproduction ralentis, une résistance accrue au jeûne et des capacités élevées de détection des sources de nourriture (Gibert *et al.* 1994, Hervant *et al.* 1997, Hervant & Renault 2002, Gibert & Deharveng 2002). Ces adaptations nécessitant un investissement important dans l'acquisition et la conservation d'énergie impliquent que ces organismes sont de relativement faibles compétiteurs et présentent une sensibilité importante aux perturbations environnementales (Brunke & Gonser 1999, Issartel *et al.* 2005).



**Figure 1.6:** Exemples d'invertébrés souterrains aquatiques. Crustacés Amphipodes: *Niphargus virei* (taille moyenne 20 mm), photo M.J. Dole-Olivier. Crustacés Copépodes : *Graeteriella unisetigera* (taille moyenne 0.5 mm), photo T. Datry. Crustacés Ostracodes : *Pseudocandona zschokkei* (taille moyenne 1 mm), photo P. Marmonier. Crustacés Isopodes : *Proasellus cavaticus* (taille moyenne 7-8 mm), photo J.P. Henry. Crustacés Syncarides : Parabathynellidae (taille moyenne 1.5 mm), photo T. Lefébure. Vers Oligochètes (taille moyenne 5 mm), photo M. Creuzé des Châtelliers.

Bien que la biodiversité des eaux souterraines puisse être appréhendée à différentes échelles constituant des niveaux hiérarchiques interdépendants tels que l'écosystème, l'espèce ou plus récemment le niveau génétique (Marmonier *et al.* 1993, Lefébure *et al.* 2006), peu de données sont actuellement disponibles sur la diversité fonctionnelle des invertébrés souterrains et leur



rôle potentiel dans le fonctionnement des écosystèmes (Claret *et al.* 1999, Boulton *et al.* 2008). Il n'existe actuellement pas de classification en groupes fonctionnels trophiques telle que celle proposée par Cummins & Klug (1979) pour les invertébrés des cours d'eau de surface. Cette classification est difficilement transposable aux invertébrés souterrains puisqu'il semblerait que la faible disponibilité des ressources trophiques favorise une stratégie généraliste de la part des invertébrés souterrains se traduisant par une faible spécialisation vers un type de ressource trophique donné (Gibert & Deharveng 2002). Ce comportement généraliste est d'ailleurs illustré par Simon *et al.* (2003) montrant que certaines espèces d'amphipodes considérées comme des déchiqueteurs -shredders- (utilisant la matière organique particulaire > 1mm, notamment des feuilles) ou des prédateurs de proies de plus petite taille sont également capables de se comporter comme des collecteurs -gathering collectors- (ingérant de la matière organique particulaire fine <1mm) ou des racleurs -scrapers- (raclant les biofilms microbiens attachés aux surfaces) lorsque leur ressource privilégiée n'est pas disponible. Cependant, les apports de matière organique ayant lieu principalement sous forme dissoute dans les aquifères phréatiques et les horizons hyporhéiques les plus éloignés de la surface, les biofilms microbiens sont généralement considérés comme la ressource trophique principale pour les communautés d'invertébrés souterrains (Brunke & Gonser 1997, Pusch *et al.* 1998, Ward *et al.* 1998).

### **1.2.5. La connectivité hydrologique**

La connectivité hydrologique avec les écosystèmes de surface constitue nécessairement un important facteur de contrôle des effets de la ressource et de la prédation dans les écosystèmes souterrains car elle détermine simultanément les apports de carbone organique pour le compartiment microbien mais également le niveau de perturbation auquel sont soumis les invertébrés. Le terme de connectivité hydrologique renvoie ici à la définition de Pringle (2001) et exprimée en ces termes : *a water-mediated transfer of matter, energy and/or organisms within or between elements of the hydrologic cycle*. Dans le cadre des écosystèmes souterrains, les flux d'eau provenant de la surface constituent le principal vecteur de matière et d'énergie vers les écosystèmes souterrains (Ward *et al.* 1998, Baker *et al.* 2000). Ainsi, l'accroissement des flux d'eau d'infiltration dans les écosystèmes souterrains augmente les flux de matière organique disponible pour les micro-organismes mais implique également une plus forte variabilité temporelle des conditions physico-chimiques au sein des habitats

souterrains. Les effets d'une augmentation des flux d'eau de surface sur les biocénoses se ressentiront essentiellement dans les horizons supérieurs des aquifères interstitiels proches de la surface car ils sont fortement modulés par le temps de résidence de l'eau dans les sédiments. Ces horizons supérieurs correspondent notamment à la zone hyporhéique mais également aux premiers centimètres sous la surface des nappes phréatiques surplombées d'une zone non saturée. Ces horizons supérieurs sont de véritables écotones, qui, de par leur position intermédiaire entre les eaux de surface et les horizons plus profonds, jouent un rôle particulier dans la régulation des flux de matière et d'énergie vers les écosystèmes souterrains. Ces écotones sont le lieu de processus abiotiques d'adsorption et de mélange entre eaux de surface et eaux souterraines mais abritent également des biocénoses dont la capacité à retenir et dégrader les flux de matière organique influence fortement la qualité des eaux souterraines.

L'augmentation concomitante des flux de matière organique et du niveau de perturbation le long d'un gradient de connectivité hydrologique croissante avec les eaux de surface est une particularité soulignée par de nombreux auteurs afin d'expliquer notamment la diversité et la distribution spatiale des peuplements d'invertébrés dans la zone hyporhéique et les aquifères (Malard *et al.* 1996, Brunke & Gonser 1997, Strayer *et al.* 1997, Hahn 2006, Schmidt *et al.* 2007). Trois perturbations sont couramment associées à une augmentation de la connectivité hydrologique. La première, intrinsèque au fonctionnement du milieu souterrain, correspond à une diminution de la concentration en oxygène dissous lorsque les respirations microbiennes sont stimulées par une augmentation des flux de carbone organique. Certes, les invertébrés souterrains présentent une plus forte tolérance à l'hypoxie que les invertébrés de surface mais ils ne peuvent cependant pas survivre dans des conditions d'anoxie prolongée (Malard & Hervant 1999). La seconde perturbation correspond à une augmentation considérable de la variabilité temporelle de nombreuses variables, notamment la température. Les eaux souterraines présentent généralement une grande stabilité thermique car les fortes variations de température observées dans les écosystèmes de surface, à une échelle journalière et saisonnière, sont rapidement amorties dans les premiers mètres du sol soumis essentiellement à un transfert de chaleur par conduction. L'augmentation des flux d'eau de surface intensifie les transferts de chaleur par advection et produit ainsi de fortes variations thermiques. Or, les températures extrêmes peuvent être létales pour les invertébrés ou affecter leur capacité de reproduction (Bertrand 1974, Issartel *et al.* 2005). Enfin, la troisième perturbation correspond à une augmentation de la compétition puisque les apports de matière organique induits par

une forte connectivité hydrologique peuvent favoriser la colonisation du milieu souterrain par des espèces d'invertébrés épigés. Si cette dernière perturbation aurait tendance à augmenter la diversité et la densité des peuplements d'invertébrés, elle entraîne généralement l'exclusion de nombreuses espèces souterraines qui sont de faibles compétiteurs (Malard *et al.* 1996, Brunke & Gonser 1997).

La connectivité hydrologique affectant simultanément de multiples variables, les tentatives cherchant à relier la diversité ou la densité des invertébrés souterrains à un paramètre particulier, notamment la quantité de matière organique, sont rarement concluantes (Schmidt *et al.* 2007). Dans le meilleur des cas, on peut attendre une relation non linéaire selon laquelle la densité des invertébrés souterrains augmenterait avec la quantité de matière organique, jusqu'à un seuil critique au-delà duquel les effets négatifs des perturbations, associées à l'augmentation de la connectivité hydrologique, l'emporteraient sur l'effet bénéfique d'une quantité plus importante de ressource trophique. Ainsi, de nombreux auteurs ont suggéré que les combinaisons de variables reflétant l'intensité de la connectivité hydrologique avec les eaux de surface étaient plus à même d'expliquer la distribution des invertébrés (Brunke & Gonser 1997, Hahn 2006, Schmidt *et al.* 2007). Strayer *et al.* (1997) associent la quantité de matière organique et la concentration en oxygène dissous afin d'expliquer la densité des peuplements d'invertébrés dans la zone hyporhéique. Ces auteurs observent que les densités d'invertébrés et la quantité de matière organique attachée aux sédiments sont positivement corrélées tant que les concentrations en oxygène restent supérieures à  $1 \text{ mg l}^{-1}$ . Hahn (2006) regroupe la quantité de matière organique, les concentrations en oxygène et l'amplitude thermique des eaux souterraines au sein d'un indice dont les valeurs croissantes reflètent une augmentation de la connectivité hydrologique avec la surface. Les plus faibles valeurs de cet indice sont caractérisées par de faibles densités d'invertébrés, les valeurs intermédiaires par des communautés constituées principalement d'espèces stygobies, ces espèces étant quasiment absentes pour les valeurs les plus élevées caractérisées par une dominance d'espèces épigées. Ces résultats suggèrent l'existence d'un seuil au-delà duquel les perturbations associées à l'augmentation de connectivité hydrologique entraînent une diminution drastique des abondances d'invertébrés stygobies. Des études récentes menées en milieu lacustre, océanique ou aride indiquent que les écosystèmes soumis à une modification graduelle des conditions environnementales (apports de nutriments, climat) peuvent rapidement basculer d'un état d'équilibre à un autre lorsque ces modifications atteignent un

seuil critique (Scheffer *et al.* 2001, Scheffer *et al.* 2009). Par exemple, le long d'un gradient d'apports de nutriments, les milieux lacustres présentant un état caractérisé par des eaux claires et des abondances de végétaux submergés importantes peuvent basculer soudainement, lorsque le seuil critique d'apports de nutriments est dépassé, vers un état caractérisé par des eaux turbides et une diminution drastique des abondances de végétaux submergés (Scheffer & Carpenter 2003).

### **1.3. CONTRÔLE DES RÉSEAUX TROPHIQUES SOUTERRAINS : CADRE CONCEPTUEL**

En raison des fortes limitations en carbone régnant au sein des écosystèmes souterrains, la structure des communautés souterraines est supposée être contrôlée de manière ascendante par la quantité de matière et d'énergie en provenance de la surface (Strayer 1994, Notenboom *et al.* 1994, Gibert & Deharveng 2002). Ainsi, une augmentation des apports de matière et d'énergie est supposée entraîner une production de biomasse microbienne plus élevée permettant l'établissement de populations d'invertébrés présentant des densités élevées. Le long des écoulements à travers la zone hyporhéique jusqu'aux nappes phréatiques, les caractéristiques du compartiment microbien telles que les valeurs de biomasses et d'activités reflètent ainsi les conditions d'apports décroissants de matière organique en termes de quantité et de qualité (Hendricks 1993, Craft *et al.* 2002). Par ailleurs, de nombreuses études ont montré que les processus biogéochimiques incluant la respiration aérobie (Jones *et al.* 1995a, Baker *et al.* 2000), la nitrification (Holmes *et al.* 1994, Jones *et al.* 1995b), la dénitrification (Starr & Gillham 1993) et la méthanogénèse (Jones *et al.* 1995c) répondaient positivement à une augmentation des apports de carbone organique.

Cependant les relations établissant un lien positif entre les abondances ou les estimateurs de l'activité du compartiment microbien et les abondances d'invertébrés sont rares (Brunke & Fischer 1999, Franken *et al.* 2001) ou non significatives (Mauclaire *et al.* 2000). De plus, la capacité des invertébrés souterrains à exercer un contrôle efficace sur les abondances et les activités microbiennes est pratiquement inconnue. Il est probable que les faibles abondances d'invertébrés observées dans les milieux les plus oligotrophes ne permettent pas un fort contrôle du compartiment microbien, ce contrôle pouvant potentiellement augmenter dans les

milieux plus riches en matière organique (Griebler 2002). De la même manière que dans les écosystèmes de surface, une forte consommation par les invertébrés est supposée stimuler le compartiment microbien en le maintenant en phase de croissance logarithmique (Ward *et al.* 1998, Pusch *et al.* 1998). Un fort contrôle du compartiment microbien par les communautés d'invertébrés placerait ces derniers au cœur des processus biogéochimiques se déroulant au sein des écosystèmes souterrains (Boulton 2008).

La figure 1.7 présente un modèle conceptuel visant à prédire la réponse des biocénoses souterraines interstitielles à une augmentation de la connectivité hydrologique avec la surface. L'abondance des peuplements microbiens et d'invertébrés souterrains varie le long d'un gradient croissant de connectivité hydrologique qui engendre d'une part une augmentation des flux de matière organique atteignant la surface libre des nappes et, d'autre part, un accroissement du niveau de perturbation environnementale lié à une désoxygénation des eaux ou une forte variabilité thermique. Les prédictions de ce modèle reposent en partie sur l'hypothèse selon laquelle les communautés d'invertébrés souterrains sont plus sensibles que le compartiment microbien à une intensification des perturbations environnementales. Ainsi, la productivité du compartiment microbien augmente constamment le long du gradient de connectivité hydrologique qui correspond dans ce cas principalement à un gradient de matière organique disponible.

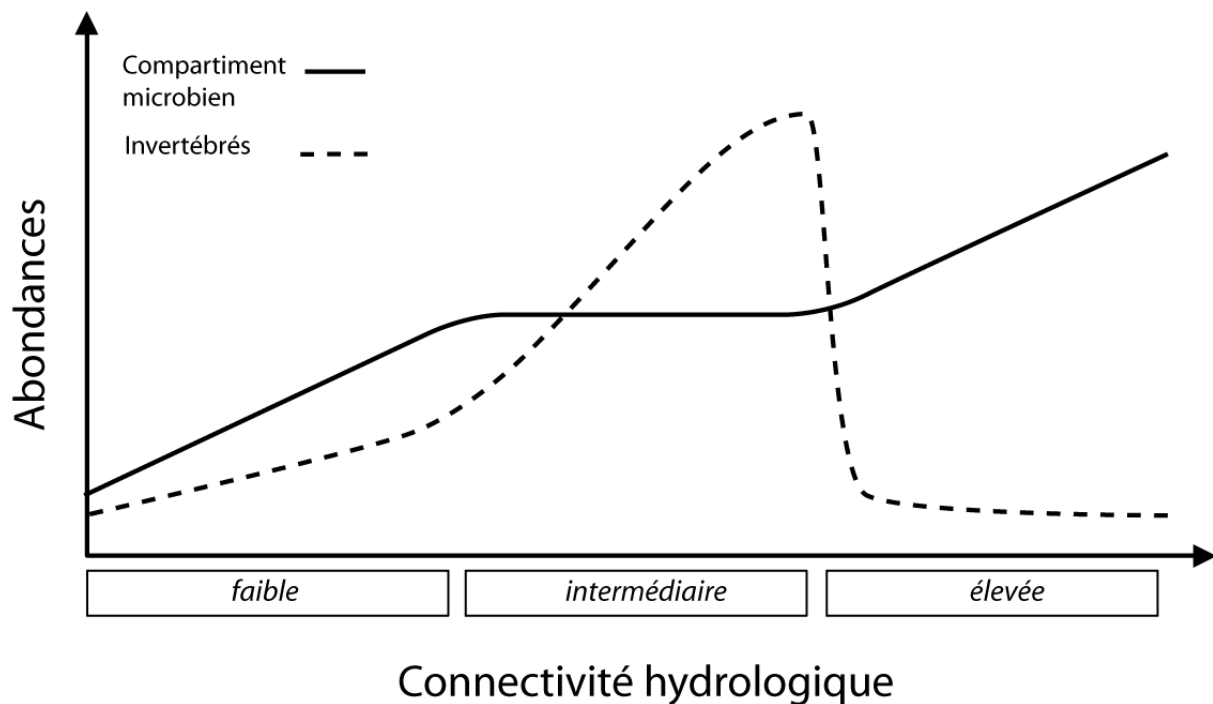


Figure 1.7 : Modèle prédictif de la réponse des biocénoses souterraines le long d'un gradient croissant de connectivité hydrologique avec la surface

Les facteurs contrôlant les abondances au sein de chaque compartiment sont supposés varier de manière continue mais trois situations peuvent être distinguées. Pour les aquifères présentant une **faible connectivité hydrologique** avec la surface, les apports de COD limitent fortement la productivité du compartiment microbien dont les faibles abondances restreignent la densité et la diversité des peuplements d'invertébrés. Pour une situation de **connectivité hydrologique intermédiaire**, la productivité microbienne atteint des valeurs permettant une augmentation significative des abondances d'invertébrés. Cette augmentation induit une intensification de la pression de prédation sur le compartiment microbien entraînant un découplage entre la productivité et les abondances microbiennes. La productivité microbienne augmente en réponse au flux de COD mais les abondances microbiennes sont maintenues constantes par l'activité de broutage des invertébrés. Au-delà d'un seuil de **connectivité hydrologique élevée**, la forte instabilité du milieu et/ou la désoxygénation des eaux associée aux respirations microbiennes constituent un stress important pour les communautés d'invertébrés. L'allocation d'énergie à la réponse au stress et la diminution des abondances d'invertébrés réduisent le contrôle exercé sur le compartiment microbien. Le compartiment microbien est alors à nouveau principalement soumis à un contrôle par la ressource disponible. Ainsi, le long du gradient de connectivité hydrologique, le compartiment microbien est successivement contrôlé par la quantité de ressource disponible, par l'action combinée de la ressource et de la prédation pour une connectivité hydrologique intermédiaire et à nouveau par la ressource pour une connectivité hydrologique élevée. Les peuplements d'invertébrés sont d'abord contrôlés par la quantité de ressource disponible puis par les perturbations environnementales.

## **1.4. LA RECHARGE ARTIFICIELLE DES AQUIFÈRES**

### **1.4.1. Infiltration induite des eaux de ruissellement pluvial**

L'augmentation constante de la population mondiale et de la pollution des eaux de surface entraîne une sollicitation croissante des ressources en eaux souterraines afin de satisfaire les besoins en eau potable des sociétés humaines (Young *et al.* 1994). En France, 7 milliards de m<sup>3</sup> d'eau souterraine sont prélevés annuellement dans plus de 200 aquifères régionaux afin de couvrir 60% des besoins en eau potable de la population (Guillemin & Roux 1994, Margat, 1994). Les diverses techniques d'infiltration d'eau de surface vers les aquifères, regroupées sous le nom de recharge artificielle des aquifères, ont initialement été développées afin de compenser l'augmentation des prélèvements d'eau souterraine. Cette recharge artificielle permet d'augmenter les quantités d'eau stockées dans les aquifères tout en améliorant la qualité des eaux souterraines en reposant sur les processus naturels d'atténuation au sein du sol, de la zone non saturée et des nappes (Huisman & Olsthoorn 1983, Balke & Zhu 2008, Kohlemainen *et al.* 2007). La notion de service écosystémique (Hooper *et al.* 2005) prend ici tout son sens puisque les sociétés utilisent la capacité des chaînes trophiques souterraines à dégrader la matière organique afin d'accélérer le recyclage naturel des eaux et par conséquent, la productivité en eau des aquifères. La recharge artificielle des aquifères regroupe de multiples techniques consistant à alimenter les aquifères avec des eaux de surface (lac, rivière), des eaux usées, des eaux de ruissellement pluvial soit par infiltration (irrigation, bassin d'infiltration), injection dans la zone non saturée ou saturée des aquifères, ou pompage dans des aquifères situés à proximité d'un cours d'eau (effet filtre des berges). Toutes ces techniques ont en commun d'augmenter considérablement la



connectivité hydrologique entre la surface et les aquifères puisqu'elles consistent à concentrer dans le temps et dans l'espace les quantités d'eau infiltrées vers les écosystèmes souterrains.

La recharge artificielle des aquifères s'est notamment développée à proximité de nombreuses villes dont l'alimentation en eau potable dépend parfois entièrement des eaux souterraines. A l'échelle de la planète, les villes occupent moins de 2% des sols mais elles regroupent 50% de la population mondiale (75% dans les pays développés) et la proportion de population urbaine devrait atteindre 60% d'ici 2025 (Lambin *et al.* 2001, United Nations 2007). Malgré leur relativement faible étendue spatiale, les zones urbaines influencent profondément le climat et le cycle naturel de l'eau car elles concentrent 70% des demandes énergétiques mondiales et 70% des émissions de CO<sub>2</sub> (IEA 2008). L'augmentation des surfaces imperméabilisées modifie la recharge naturelle des aquifères en limitant les surfaces disponibles pour l'infiltration des eaux pluviales (Arnold & Gibbons 1996). Contrairement à une idée reçue, la diminution des surfaces disponibles pour l'infiltration directe des précipitations n'implique pas forcément une diminution de la recharge des aquifères urbains (Lerner 2002). La diminution des surfaces imperméables peut en effet être compensée, de manière incontrôlée, par une recharge localisée au niveau de fuites des réseaux de canalisations dédiés à la distribution d'eau potable, à la collecte d'eaux usées ou au drainage des eaux pluviales. A titre d'exemple, les pertes enregistrées au niveau du réseau de distribution d'eau de la ville de Mexico s'élèvent à 30% et correspondent à la consommation en eau potable de 4 millions de personnes (Tortajada 2000).

De manière plus contrôlée, les techniques alternatives de gestion des eaux pluviales mises en place dans de nombreuses agglomérations à travers le monde participent significativement à la recharge des aquifères urbains (Giry 1997). Le terme « alternative » désigne ici le fait que les eaux pluviales ne sont plus acheminées avec les eaux usées par le biais d'un réseau unitaire, vers des stations d'épuration, mais sont collectées au sein d'un réseau dit « séparatif » les acheminant vers des ouvrages destinés à promouvoir leur infiltration vers les aquifères (Figure 1.8). Les avantages de l'infiltration artificielle des eaux de ruissellement pluvial sont nombreux et consistent principalement en une limitation des volumes d'eau de ruissellement pluvial lors des épisodes pluvieux (minimisant ainsi les risques d'inondation) tout en rechargeant les aquifères urbains fortement sollicités par les prélèvements dédiés à la consommation en eau potable, l'irrigation ou l'industrie. La gestion durable de ces pratiques repose pleinement sur les capacités d'épuration du sol, de la zone non saturée et des niveaux

supérieures des nappes phréatiques puisqu'elles consistent à infiltrer rapidement (temps de rétentions < 2 jours) sur des surfaces réduites (bassins d'infiltrations < 1 ha) des quantités massives d'eaux chargées en matière organique généralement collectées sur de grands bassins versants urbains (surfaces > 100 ha). L'augmentation des flux de carbone organique, de la variabilité de l'oxygène et de la température aux horizons supérieurs des nappes phréatiques est probablement liée aux quantités d'eaux infiltrées (taille du bassin versant) mais elle est modulée par les différents processus biotiques et abiotiques prenant place au sein du complexe sol-zone non saturée.



Figure 1.8: Photographies de deux bassins d'infiltration d'eau pluviale de l'Est Lyonnais (gauche : Django Reinhardt (Chassieu), droite : Minerve (St Priest)) (photo G. Bouger).

#### **1.4.2. Augmentation des flux de carbone organique dissous**

Les recherches relatives aux effets de l'infiltration artificielle sur la qualité des eaux souterraines ont essentiellement consisté à évaluer la capacité des ouvrages d'infiltration à retenir et dégrader des polluants issus spécifiquement du lessivage des surfaces urbaines tels que des métaux lourds et des composés organiques, notamment les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et les polychlorobiphényles (PCB) (Appleyard 1993, Chebbo *et al.* 1995, Mason *et al.* 1999, Pitt *et al.* 1999, Fischer *et al.* 2003). La majorité des études a ainsi montré que ces polluants, très rarement présents dans les nappes rechargées artificiellement par des eaux de ruissellement pluvial, étaient effectivement piégés et/ou dégradés dans les premiers centimètres du lit des bassins d'infiltrations. Datry *et al.* (2005) sont les premiers auteurs à développer une approche écosystémique destinée à évaluer les effets d'une augmentation des flux de carbone organique sur les processus biogéochimiques,

la diversité et la densité des organismes souterrains à l'aplomb d'ouvrages d'infiltration d'eau de ruissellement pluvial. Plusieurs études ont pourtant montré que la recharge artificielle entraînait une augmentation significative de la concentration en COD dans les eaux souterraines (Mikkelsen *et al.* 1994, Barraud *et al.* 1999, Datry *et al.* 2004). Selon Datry (2003a), les flux de COD atteignant la surface libre de la nappe sous un petit bassin d'infiltration d'eau de ruissellement pluvial de l'agglomération lyonnaise (bassin versant : 2,5 ha) seraient 300 fois supérieurs à ceux mesurés sur un site de référence non soumis à une recharge artificielle.

Si les eaux de ruissellement pluvial s'enrichissent en COD lors de leur parcours sur les surfaces urbaines, leur concentration en COD est généralement inférieure à 10 mg C l<sup>-1</sup> (Hatt *et al.* 2004, Datry *et al.* 2004, Prestes *et al.* 2006). En revanche, le lessivage des surfaces urbaines génère une grande quantité de matières en suspension très organiques dont l'accumulation au sein du lit des ouvrages d'infiltration constitue une source prédominante de carbone organique dont une partie est éluée lors de chaque épisode d'infiltration. Des expérimentations en colonne ont ainsi montré que la concentration en COD d'eau de surface pouvait atteindre 40 mg C l<sup>-1</sup> lorsqu'elle percolait à travers des sédiments organiques urbains retenus dans le lit de bassins d'infiltration (Datry *et al.* 2003b, Larmet 2007, Nogaro *et al.* 2007). Pourtant, la concentration en COD des eaux d'infiltration atteignant les nappes est généralement inférieure à 5 mg C l<sup>-1</sup> car la majeure partie du COD est retenue et dégradée dans le sol et la zone non saturée. L'augmentation des temps de résidence des eaux d'infiltration dans le sol et la ZNS favorisant les processus d'adsorption et de biodégradation d'une quantité plus importante de COD, la quantité de matière organique dissoute atteignant le toit des nappes est d'autant plus faible que l'épaisseur du sol et de la ZNS est importante (Pabich *et al.* 2001, Datry *et al.* 2005, McMahon & Chapelle 2008). Aucune étude ne permet à ce jour de quantifier la biodégradabilité du COD atteignant les nappes à l'aplomb des ouvrages d'infiltration et sa capacité à stimuler le compartiment microbien. Cette biodégradabilité est souvent estimée de manière très indirecte à partir de la décroissance avec la profondeur sous la surface libre des nappes de la concentration en COD (Starr & Gillham 1993, Pabich *et al.* 2001, Datry 2003a). Toutefois, l'augmentation des concentrations en COD au toit des nappes peut également traduire un apport de COD peu biodégradable et difficilement assimilable par les communautés microbiennes. Dans ce cas, les profils verticaux décroissants de la concentration en COD refléteraient essentiellement une

diminution de la proportion d'eau de ruissellement pluvial riche en COD au sein de la nappe (mélange avec les eaux souterraines).

### **1.4.3. Perturbations liées à la recharge artificielle**

#### **Désoxygénation des eaux souterraines**

La désoxygénation des eaux souterraines à l'aplomb des ouvrages d'infiltration est une perturbation qui peut sévèrement limiter la contribution des invertébrés à la dégradation de la matière organique. Les exemples de désoxygénation partielle ou totale des eaux souterraines à l'aplomb d'ouvrages d'infiltration sont courants dans la littérature (Fischer *et al.* 2003, Datry *et al.* 2004) mais les causes exactes de cet appauvrissement en oxygène ont rarement été élucidées. La cause la plus souvent évoquée est une augmentation des respirations au sein de la nappe suite à un apport excessif de COD facilement biodégradable (Pabich *et al.* 2001, McMahon & Chapelle 2008). Alternativement, la diminution des concentrations en OD des eaux souterraines situées à l'aplomb des ouvrages d'infiltration peut traduire une recharge avec des eaux de ruissellement pluvial appauvries en oxygène lors de leur passage dans le lit d'infiltration des bassins. Datry *et al.* (2004) ont ainsi suggéré que la dynamique de l'OD dans les nappes à l'aplomb des ouvrages d'infiltration était fortement influencée par des variations de consommation d'oxygène dans les lits d'infiltration en réponse aux fluctuations saisonnières de la température. L'échauffement estival des lits d'infiltration stimule probablement les respirations microbiennes qui entraînent de ce fait une désoxygénation des eaux d'infiltration. Par ailleurs, les désoxygénations observées peuvent aussi refléter une baisse de la solubilité de l'oxygène lors de l'échauffement estival des nappes rechargées artificiellement avec des eaux de ruissellement pluvial.

#### **Variabilité thermique des eaux souterraines**

De la même manière que les apports d'eaux pluviales ayant ruisselé sur des surfaces urbaines perturbent le régime thermique des écosystèmes aquatiques de surface (Roa-Espinosa *et al.* 2003, Herb *et al.* 2008), les pratiques d'infiltration modifient drastiquement le régime thermique des aquifères urbains en favorisant les transferts de chaleur par advection. Datry *et al.* (2005) ont ainsi montré que l'amplitude thermique annuelle des eaux souterraines à l'aplomb de 2 bassins d'infiltration de l'agglomération lyonnaise était proche de 10 °C alors qu'elle n'atteignait pas 2 °C sur des sites non soumis à une recharge artificielle. Bien que

l'ampleur des variations thermiques observées à l'aplomb de certains bassins (8-21 °C) soit de nature à altérer la reproduction voire la survie des peuplements d'invertébrés (température létale), les processus biogéochimiques et la migration des organismes pathogènes, très peu d'études sont aujourd'hui disponibles afin de quantifier ces variations thermiques et d'en déterminer les principaux facteurs de contrôle. Les modifications du régime thermique des aquifères dépendent probablement de la quantité et la température des eaux infiltrées, des échanges de chaleur dans la zone non saturée et de la distribution saisonnière des précipitations.

Les perturbations thermiques liées à la recharge artificielle des aquifères sont probablement plus importantes lorsque que cette dernière intervient dans un milieu urbanisé, lui même déjà très perturbé. En effet, les surfaces urbaines imperméabilisées présentent des caractéristiques thermiques qui impliquent des capacités d'emménagement et de restitution de l'énergie solaire sous forme de chaleur plus importantes que les surfaces naturelles. D'un point de vue climatique, les zones urbaines sont ainsi caractérisées par un phénomène désigné sous le terme d' « îlot de chaleur urbain » (Bornstein 1968) se traduisant par une augmentation de température de l'air au sein de villes pouvant s'élever jusqu'à 10°C en comparaison aux zones alentours non urbanisées. Ces augmentations de température peuvent se propager en profondeur sous les villes et des exemples de réchauffement des eaux souterraines ont été rapportés pour de nombreux centres urbains (Karl *et al.* 1988, Allen *et al.* 2003, SDUD 2005, Taniguchi 2006). Les modifications de température de l'air peuvent également induire une modification du régime des pluies. Une analyse des précipitations menée sur plusieurs villes des Etats-Unis rapporte une augmentation des taux de précipitations lors de la saison chaude de 5% au centre-ville et pouvant atteindre 116% dans les zones situées à une cinquantaine de kilomètres en aval dans le sens des vents dominants (Shepherd *et al.* 2002).

#### **1.4.4. Réponse des réseaux trophiques**

A ma connaissance, aucune étude ne permet aujourd'hui de documenter la réponse du biofilm microbien dans les horizons supérieurs des nappes à une recharge artificielle d'eau de ruissellement pluvial. L'augmentation des flux de COD au toit des nappes est supposée stimuler la productivité et l'activité microbienne sans que l'on sache toutefois prédire l'amplitude de cette stimulation et la manière dont la productivité et l'activité microbiennes varieront en fonction des quantités d'eau infiltrées (taille du bassin versant) et du temps de

résidence des eaux dans le sol et la zone non saturée. Datry *et al.* (2005) ont montré que la richesse et la densité des peuplements d'invertébrés souterrains dans les aquifères de l'agglomération lyonnaise étaient significativement plus élevées sur les sites de recharge que dans les sites non soumis à une infiltration artificielle d'eau de ruissellement pluvial. Cette diversification n'étant observée que sur les sites présentant une zone non saturée peu épaisse (ZNS < 10 m) également caractérisés par de plus fortes concentrations en COD, les auteurs ont suggéré que cette diversification biologique était probablement liée à une augmentation de la production de biofilm microbien brouté par les invertébrés. Cette possible régulation ascendante des réseaux trophiques souterrains en réponse à une augmentation des flux de COD est une des hypothèses ayant guidé les recherches menées dans le cadre de cette thèse.

## 1.5. OBJECTIFS DE LA THÈSE

Le principal objectif de ce travail consiste à déterminer les effets d'une augmentation des flux de COD, d'une part, sur l'activité du compartiment microbien, et d'autre part, sur les interactions trophiques entre ce compartiment microbien et les invertébrés souterrains. Il s'agit plus précisément de tester deux hypothèses.

**Hypothèse 1 :** l'augmentation des flux d'eau infiltrés engendre une augmentation des flux de COD au toit des nappes qui est de nature à stimuler l'activité du compartiment microbien.

**Hypothèse 2 :** l'augmentation des flux de COD atteignant les nappes intensifie les interactions trophiques entre le compartiment microbien et les invertébrés. Un contrôle ascendant impliquerait une augmentation de la densité des peuplements d'invertébrés dont l'activité de broutage pourrait limiter l'augmentation de la biomasse microbienne (contrôle descendant).

La méthodologie développée dans ce travail combine: (1) une approche de terrain qui vise à identifier les effets d'une augmentation des flux d'eau infiltrée sur les flux de COD atteignant la nappe, l'activité des communautés microbiennes et l'abondance des d'invertébrés: (2) des expérimentations en laboratoire qui permettent de tester la réponse du compartiment microbien et les interactions trophiques entre ce compartiment et les invertébrés dans des conditions contrôlées d'apport croissant de carbone organique dissous facilement biodégradable.

# 2

## MÉTHODOLOGIE

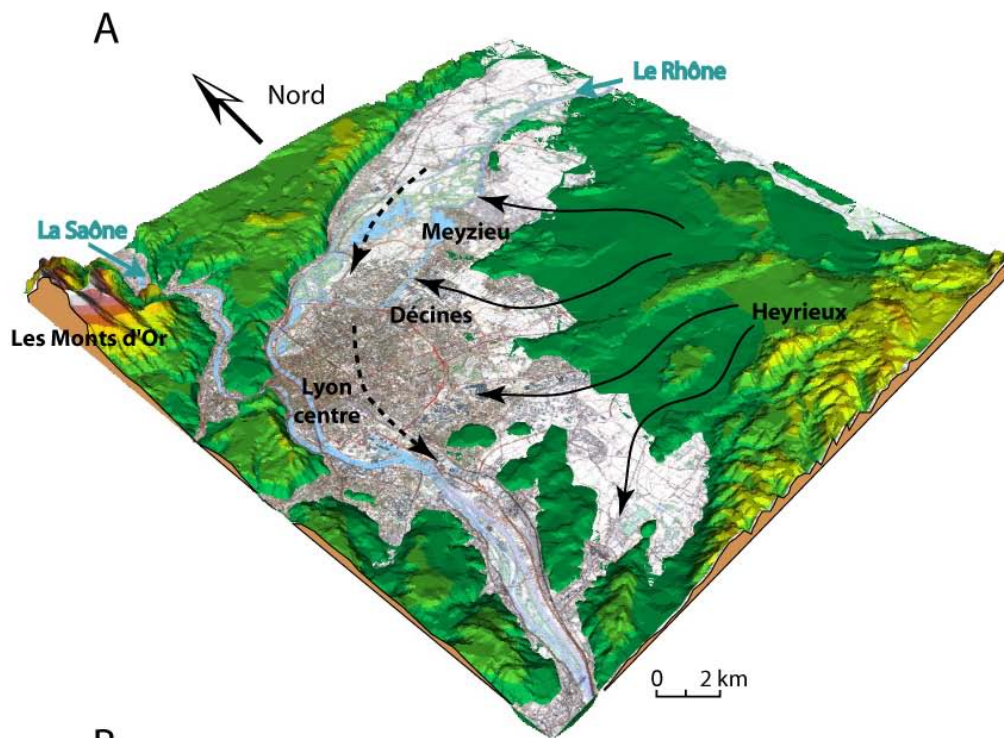


## 2.1. APPROCHE DE TERRAIN

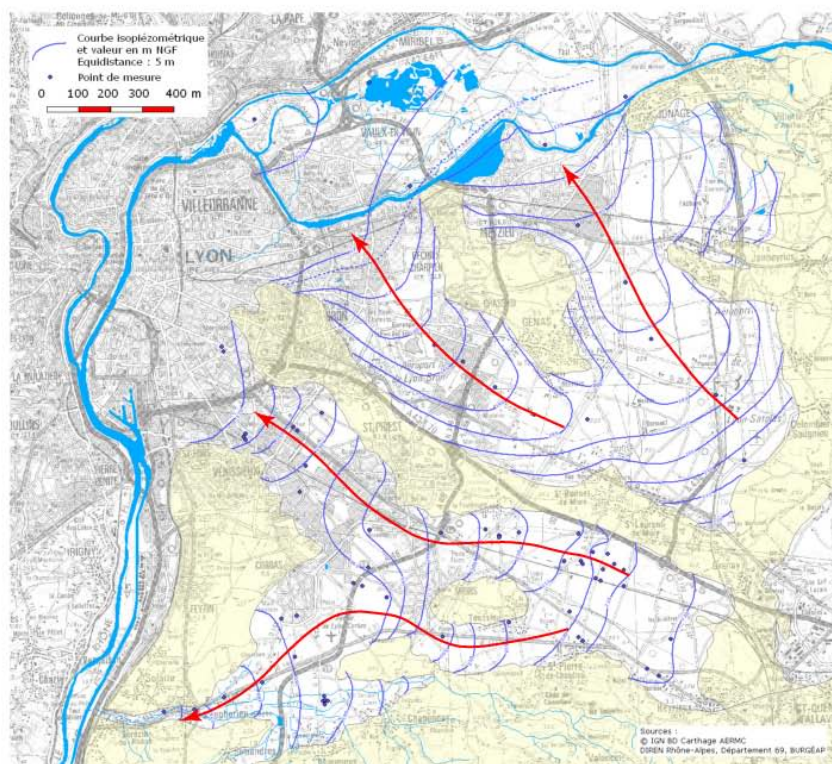
### 2.1.1. La nappe de l'Est lyonnais

Les sites sélectionnés se situent tous au sein du système aquifère « nappe de l'Est lyonnais – nappe d'accompagnement du Rhône » de l'agglomération lyonnaise, France, qui compte 1,2 million d'habitants (Figure 2.1A). La nappe de l'Est (surface: 200 km<sup>2</sup>) comprend trois corridors séparés par des buttes morainiques à faible perméabilité ( $10^{-5}$ - $10^{-8}$  m s<sup>-1</sup>) (BURGEAP 1995). Les corridors contiennent des sédiments fluvioglaciers très perméables (perméabilité:  $10^{-3}$ - $10^{-2}$  m s<sup>-1</sup>) et sont drainés par les alluvions modernes du Rhône. La figure 2.1B présente une piézométrie générale de la nappe réalisée en 2004 dans le cadre du schéma d'aménagement et de gestion des eaux de l'Est Lyonnais (Commission Locale de l'Eau 2005). L'épaisseur de la zone non saturée décroît d'Est en Ouest : elle atteint 40 m à l'amont des couloirs mais n'est plus que de 4 m à la périphérie de la ville de Lyon (Datry 2003a).

L'Est de Lyon comprend 34 % de ses surfaces occupées par l'habitation, 13 % par l'industrie et 13 % par les infrastructures, soit 60 % de surfaces imperméabilisées sur lesquelles les eaux de pluie ruissellent (Datry 2003a). L'expansion, notamment industrielle, vers l'Est de l'agglomération, l'absence de cours d'eau et la forte perméabilité des sédiments fluvioglaciers ont favorisé le développement des pratiques d'infiltration d'eau de ruissellement pluvial. Au total, plus de 200 bassins d'infiltration ont ainsi été recensés dans l'agglomération (BURGEAP 1995, Giry 1997, Datry 2003a). Sur la base d'un calcul simple se fondant sur une pluviométrie moyenne de 835 mm an<sup>-1</sup>, un coefficient de ruissellement urbain de 0.35, 20 bassins de 100 ha et 200 bassins de 2 ha, la recharge artificielle en eau de ruissellement pluvial atteindrait 7 millions de m<sup>3</sup> an<sup>-1</sup>, soit 10% au moins du débit annuel de la nappe estimé à 69.1 millions de m<sup>3</sup> (Giry 1997).



B



**Figure 2.1:** A - Vue de l'agglomération lyonnaise (Lyon, France) et direction générale des écoulements souterrains au sein de la nappe d'accompagnement du Rhône (traits pointillés) et de la nappe de l'Est (traits pleins). Le relief a été volontairement accentué (facteur 6) afin de faire ressortir les buttes morainiques (d'après Datry 2003). B - Carte piézométrique de la nappe de l'Est lyonnais (état observé fin mai 2004; d'après Commission Locale de l'Eau 2005).

## 2.1.2. Réseau de sites

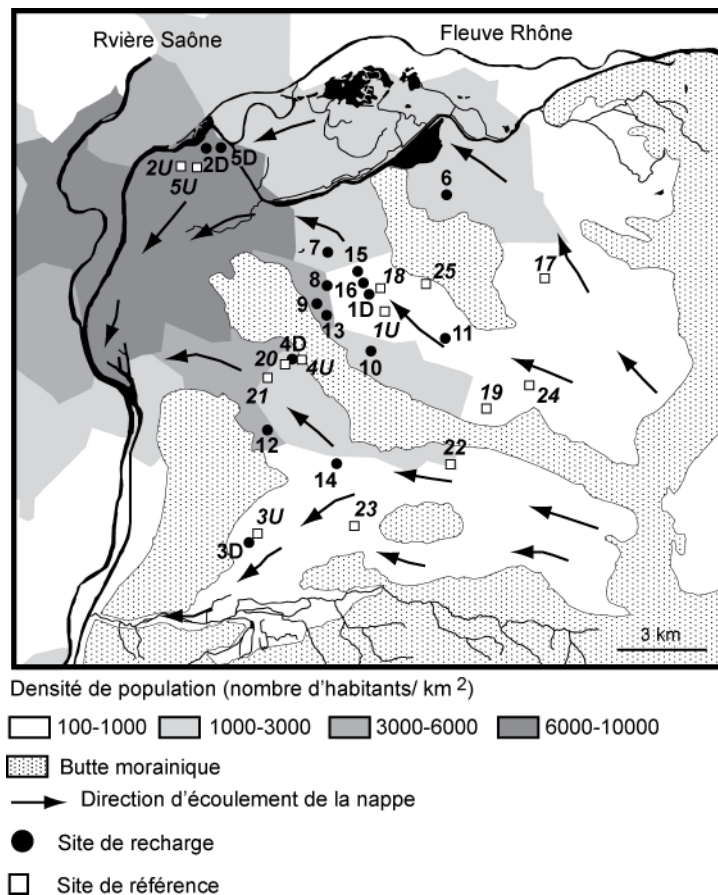


Figure 2.2: Situation des sites de recharge et de référence sélectionnés au sein de la nappe de l'Est lyonnais (Lyon, France).

Un réseau de sites instrumentés depuis 1999 dans le cadre de l'OTHU (Observatoire de Terrain en Hydrologie Urbaine ; Barraud *et al.* 2002, Bertrand-Krajewski *et al.* 2008) a été utilisé afin d'identifier les effets d'une augmentation des flux d'eau infiltrée sur les flux de COD atteignant la nappe, la dynamique de l'oxygène, la température et l'activité des communautés microbiennes et l'abondance des d'invertébrés (Figure 2.2). Au total, 30 sites ont été étudiés dont 16 sites de recharge situés à l'aplomb hydraulique de bassins d'infiltration et 14 sites de référence non soumis à une infiltration induite d'eau de ruissellement pluvial. Les caractéristiques des sites notamment l'épaisseur de la zone non saturée (ZNS) et la recharge annuelle en eau de ruissellement pluvial sont indiquées dans le Tableau 1. La recharge annuelle sous les bassins est en moyenne de  $79 \pm 56$  m<sup>3</sup> d'eau de ruissellement pluvial / m<sup>2</sup> de nappe (n=13 bassins). A titre de comparaison, la recharge annuelle pour les sites de référence est estimée à 0.24 m<sup>3</sup> de pluie / m<sup>2</sup> de nappe (i.e. 29 % des précipitations

annuelles) (BURGEAP 1995). Tous les sites sont dotés d'au moins un piézomètre équipé d'une crépine recoupant le premier mètre sous la surface libre de la nappe. Sur les sites de recharge, les piézomètres sont installés sur les berges des bassins d'infiltration et recourent le panache d'eau pluviale dans la nappe.

Tableau 1: Caractéristiques des sites de recharge et de référence sélectionnés pour l'étude de la dynamique du carbone organique dissous (COD), de l'oxygène et de la température (Chapitre 1) et des communautés microbienne et d'invertébrés (Chapitres 2 et 3) dans les horizons supérieurs de la nappe de l'est lyonnais (Lyon, France). La recharge annuelle sur les sites de référence provient uniquement de l'infiltration naturelle des eaux de pluie ( $0,24 \text{ m}^3 \text{ m}^{-2}$ ).

Nom du site	Site					Caractéristiques					Etudes		
	Type	Longitude (Lambert II étendu)	Latitude (Lambert II étendu)	Altitude (m)	Epaisseur zone non saturée (m)	Bassin versant (ha)	Bassin infiltration (ha)	Recharge annuelle ( $\text{m}^3 \text{ m}^{-2}$ )	Dynamique du COD et de l' $\text{O}_2$	Régime thermique	Communauté microbienne et invertébrés		
Django (central)	Recharge	804159	2084817	203	19.0	180.0	1.00	52.6	Oui	Oui	Oui		
UT (1-5 m)	Recharge	797928	2090611	167	2.8	2.5	0.08	9.1	Oui	Oui	Oui		
Granges Blanches	Recharge	799403	6076285	187	1.7	100.0	0.40	73.1	Oui	Oui	Oui		
Minerve	Recharge	800781	2082758	186.	3.2	270.0	0.39	202.3	Oui	Oui	Oui		
UT (10-90 cm)	Recharge	797928	2090611	167	2.8	2.5	0.08	9.7	Oui	Oui	Oui		
Carreaux	Recharge	806664	2088995	192	13.6	45.0	0.08	164.4	Oui	Oui	Oui		
Pivoles	Recharge	802200	2086700	192	15.0	51.0	0.12	124.2	Oui	Oui	Oui		
ZAC du Chêne	Recharge	802147	2085548	194	13.5	74.0	0.77	28.1	Oui	Oui	Oui		
Triangle de Bron	Recharge	801998	2084801	196	9.2	33.7	0.11	89.5	Oui	Oui	Oui		
Épithoud	Recharge	803775	2083098	207	7.9	145.0	0.77	55.0	Oui	Oui	Oui		
Revoisson	Recharge	806351	2083500	213	19.3	50.0	0.15	97.4	Oui	Oui	Oui		
Charbonnier	Recharge	799948	2080203	200	7.0	285.0	0.90	92.5	Oui	Oui	Oui		
Centre Routier	Recharge	802169	2084667	195	13.9	2.7	0.06	13.2	Oui	Oui	Oui		
Léopha	Recharge	802132	2079044	208	10.6	210.0	2.26	27.2	Oui	Oui	Oui		
Django (aval: SC28)	Recharge	803817	2085335	201	18.0	180.0	1.00	52.6	Oui	Oui	Oui		
Django (aval: SC29)	Recharge	803834	2085247	201	18.0	180.0	1.00	52.6	Oui	Oui	Oui		
Django (amont)	Référence	804159	2084817	203	19.0				Oui	Oui	Oui		
UT (1-5 m)	Référence	796896	2089793	167	4.2				Oui	Oui	Oui		
Granges Blanches	Référence	799403	2076478	188	2.4				Oui	Oui	Oui		
Minerve	Référence	801165	2082759	188	3.5				Oui	Oui	Oui		
UT (10-90cm)	Référence	796896	2089793	203	4.2				Oui	Oui	Oui		
Azieu	Référence	810133	2085773	220	28.2				Oui	Oui	Oui		
Django (latéral droit)	Référence	804071	2085272	202	17.8				Oui	Oui	Oui		
Grandes Terres	Référence	807998	2080997	228	20.3				Oui	Oui	Oui		
Portes des Alpes	Référence	800643	2082705	189	5.9				Oui	Oui	Oui		
Leader (amont)	Référence	799883	2082134	189	7.1				Oui	Oui	Oui		
DIREN	Référence	806750	2078000	233	19.9				Oui	Oui	Oui		
Chemin de Feyzin	Référence	802673	2076963	209	9.9				Oui	Oui	Oui		
Bois Carré	Référence	809324	2081808	239	19.6				Oui	Oui	Oui		
Chemin de Raquin	Référence	805714	2085814	209	20.0				Oui	Oui	Oui		

an + Flute de pan aval # Flute de pan amont

### 2.1.3. Dispositif spécifique pour l'étude des horizons supérieurs de la nappe

Cinq sites sont équipés d'un dispositif spécifique permettant de quantifier les variations de la température, du COD, de l'oxygène, des communautés microbiennes et d'invertébrés en fonction de la profondeur sous la surface libre de la nappe. Deux résolutions verticales sont utilisées. Les sites 1 et 2 ont été équipés de 1999 à 2001 d'une batterie de piézomètres en flûte de pan qui permet des mesures aux profondeurs de 1, 2, 3, 4 et 5 m sous la surface libre de la nappe à l'aplomb et à l'amont hydraulique du bassin d'infiltration (Figure 2.3A). Les piézomètres en PVC ou Plexiglas transparent ont un diamètre de 6 cm et sont perforés sur une hauteur de 50 cm à partir de leur fond.

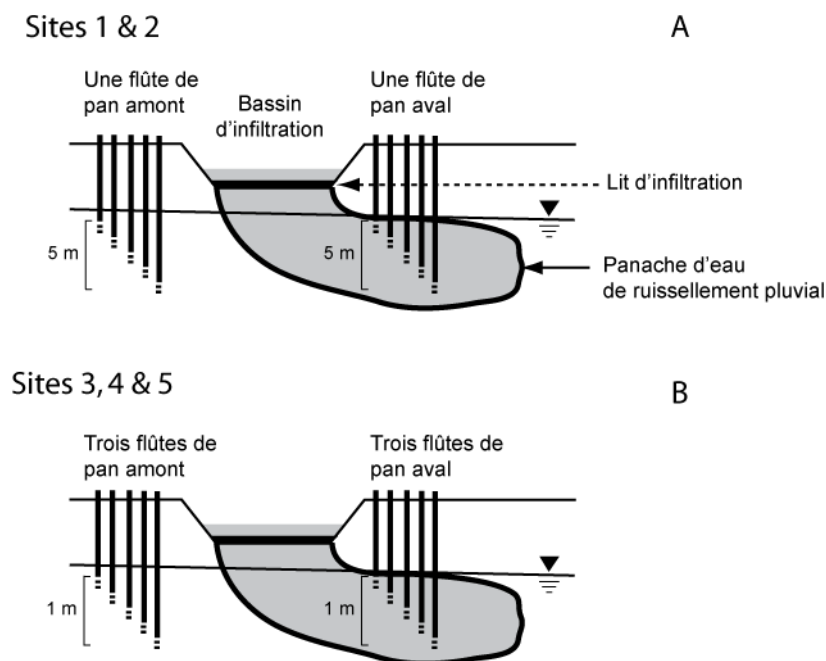


Figure 2.3 : Schématisation des flûtes de pan utilisées pour l'étude des horizons supérieurs de la nappe de l'Est lyonnais (Lyon, France) avec une résolution **A.** verticale métrique (sites 1 et 2) et **B.** décimétrique (sites 3, 4 et 5).

Dans le cadre de cette thèse, les sites 3, 4 et 5 ont été équipés de mars à septembre 2006 de 6 batteries de piézomètres en flûte de pan qui permettent de prélever l'eau, les sédiments, et les invertébrés à des profondeurs de 10, 30, 50, 70 et 90 cm sous la surface libre de la nappe (Figure 2.3B). Le dispositif comprend pour chacun de ces 3 sites trois batteries de piézomètre (3 répliqués  $\times$  5 profondeurs) situées à l'aplomb hydraulique du bassin d'infiltration et trois batteries de piézomètre (3 répliqués  $\times$  5 profondeurs) situées à l'amont hydraulique du bassin.

Les piézomètres sont des tubes métalliques perforés sur une hauteur de 13 cm qui ont été enfoncés par battage (Figure 2.4). En raison des fluctuations saisonnières du niveau de la nappe ( $\pm 1$  m), 132 piézomètres au total ont ainsi été installés sur ces 3 sites (longueur totale : 520 m) afin de permettre des prélèvements à profondeur constante sous la surface libre de la nappe. Les batteries aval sont utilisées comme des sites de recharge car elles recoupent le panache d'eau de ruissellement pluvial généré par les bassins d'infiltration. Les batteries amont sont utilisées comme des sites de référence parce qu'elles recoupent une partie de la nappe non directement influencée par la recharge en eau de ruissellement pluvial.



**Figure 2.4:** Installation des batteries de piézomètres en flûtes de pan aux sites 3 (Granges Blanches), 4 (Minerve) et 5 (IUT).

#### **2.1.4. Campagnes d'échantillonnage et suivi en continu**

L'analyse de la dynamique du COD et de l'oxygène au toit des nappes en réponse à une augmentation des flux d'eau infiltrés (section 3.1. du Chapitre 3) est fondée sur : **(1)** 4 campagnes d'échantillonnage (octobre 2001, avril, juin et octobre 2002) sur 21 sites du réseau d'observation de la nappe de l'Est lyonnais ; **(2)** 6 campagnes d'échantillonnage par temps sec et lors de 3 épisodes pluvieux (octobre 2003, octobre 2004 et octobre 2005) sur les batteries de piézomètre en flûte de pan du site 1 ; **(3)** 6 campagnes d'échantillonnage par temps sec (novembre 2001, mars et novembre 2002) et lors d'épisodes pluvieux (novembre 2001, mars et juin 2002) sur les batteries de piézomètre en flûte de pan du site 2 ; **(4)** Deux campagnes d'échantillonnage sur les batteries de piézomètre en flûte de pan des sites 3, 4 et 5 ; **(5)** un suivi en continu (pas de temps horaire) de la concentration en oxygène dissous des eaux souterraines sur les sites 1 (janvier 2003 – juillet 2005) et 2 (novembre 2001 – septembre 2002).

L'analyse de la perturbation thermique engendrée par une augmentation des flux d'eau infiltrés (section 3.2. du Chapitre 3) s'appuie sur des mesures en continu de la température, de la conductivité électrique et de l'oxygène dissous effectuées entre 2001 et 2007 sur une durée minimale d'au moins 8 mois sur 12 sites de recharge et 7 sites de référence du réseau d'observation de la nappe de l'Est lyonnais.

L'analyse des effets d'une augmentation des flux d'eau infiltrés sur l'activité des communautés microbiennes et l'abondance des d'invertébrés (section 4.1. du Chapitre 4 et Chapitre 5) s'appuie sur 2 campagnes d'échantillonnage effectuées en septembre 2006 et mai 2007 sur 90 piézomètres des sites 3, 4 et 5 (3 sites × 2 modalités [aplomb ou amont hydraulique des bassins] × 5 profondeurs × 3 répliqués).

<p>Les données antérieures à septembre 2005 ont été mises à ma disposition pour analyse par l'Observatoire de Terrain en Hydrologie Urbaine ; les données postérieures à 2005 ont été spécifiquement acquises dans le cadre de mon travail de thèse.</p>
--



## 2.2. APPROCHE EXPÉRIMENTALE EN LABORATOIRE

Deux expérimentations en laboratoire ont été réalisées afin de tester la réponse du compartiment microbien et les interactions trophiques entre ce compartiment et les invertébrés dans des conditions contrôlées d'apport croissant de carbone organique dissous facilement biodégradable. La première expérimentation sur colonnes de sédiment a été menée afin d'identifier l'influence relative du flux de COD et de l'amphipode souterrain *Niphargus rhenorhodanensis* Schellenberg 1937 sur le compartiment microbien. Les colonnes ont un diamètre interne de 10 cm et comprennent 2 modules de 10 cm et un troisième module sommital d'une hauteur de 5 cm (Mermillod-Blondin *et al.* 2005a) (Figures 2.5 et 2.6).

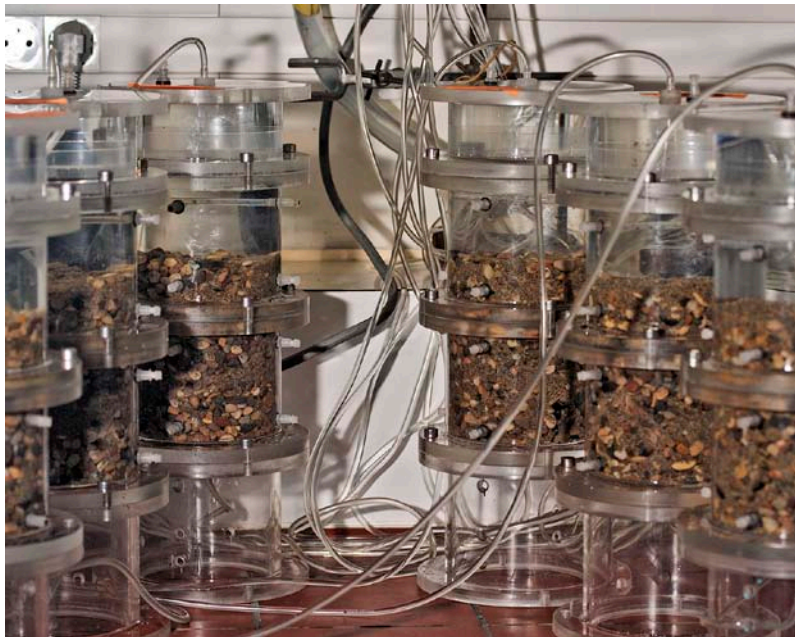


Figure 2.5: Photographie des colonnes expérimentales

Les colonnes sont remplies avec du gravier inerte et du sable frais sur une hauteur de 15 cm. Environ 10 cm d'eau libre sont laissés au sommet de la colonne. Les graviers (taille des grains: 5-8 mm) sont lavés avec de l'eau déionisée et séchés à 60 °C. Le sable frais (taille des grains: 100-1000 µm) a été collecté par pompage Bou -Rouch (Bou & Rouch 1967) à une profondeur de 1 m sous le lit d'une gravière recoupant l'aquifère fluvioglacière de l'est lyonnais. Des quantités de gravier inerte (500 g, 500 g et 400 g) et de sable frais (150 g, 150 g et 120 g) ont été alternativement ajoutées dans les colonnes afin de créer un milieu poreux hétérogène. Lors du remplissage, des traceurs particuliers (luminophores) ont été introduits dans les colonnes à 2.5-3.5 cm (luminophores de couleur jaune) et 6-7 cm (luminophores de couleur rose) de profondeur dans les sédiments afin d'évaluer l'activité de bioturbation de *N. rhenorhodanensis*.

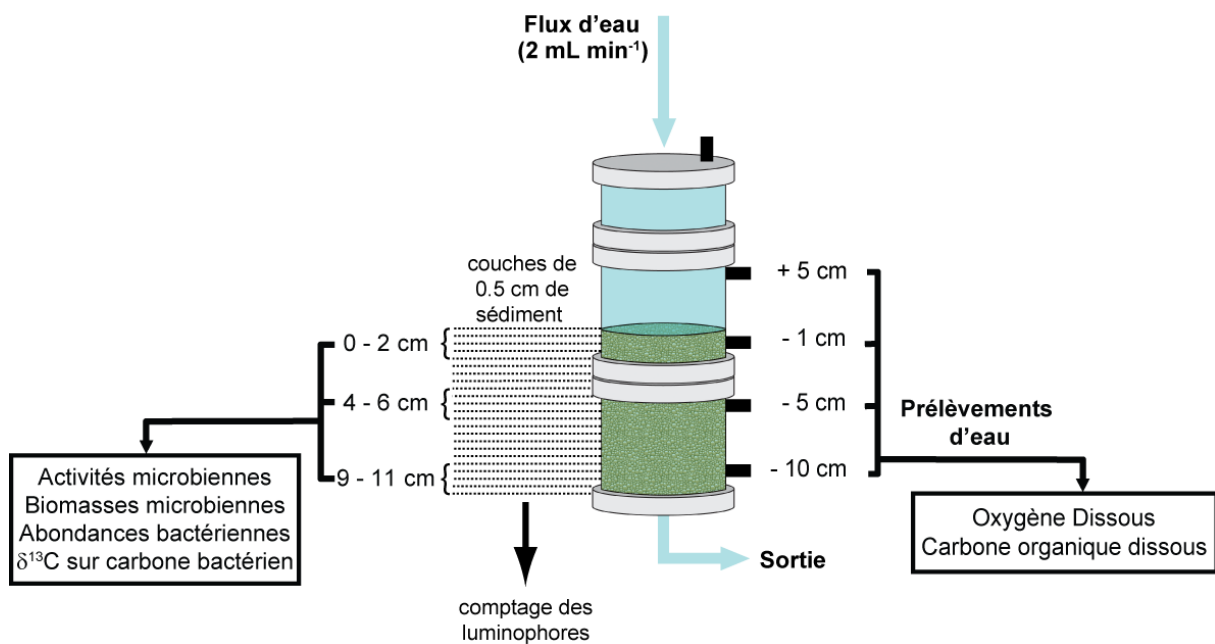


Figure 2.6: Colonne expérimentale et paramètres mesurés

Les expérimentations ont été conduites à température constante ( $15 \pm 0.5^\circ\text{C}$ ) et à l'obscurité. Les colonnes sont alimentées avec de l'eau reconstituée ( $96 \text{ mg l}^{-1} \text{ NaHCO}_3$ ,  $39.4 \text{ mg l}^{-1} \text{ CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $60 \text{ mg l}^{-1} \text{ MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  et  $4 \text{ mg l}^{-1} \text{ KCl}$ ,  $19 \text{ mg l}^{-1} \text{ Ca(NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , US EPA 1991) grâce à une pompe péristaltique (débit d'alimentation:  $2 \text{ ml min}^{-1}$ ). L'eau reconstituée est aérée afin de maintenir une concentration en OD de  $8,5\text{-}9,5 \text{ mg O}_2 \text{ l}^{-1}$  à l'entrée des

colonnes. Trois concentrations d'acétate de sodium (i.e. 0.5 mg, 1.5 mg et 2.5 mg C-NaC<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub> l<sup>-1</sup>) qui représente une forme facilement biodégradable de COD, ont été appliquées avec 3 réplicats par concentration. L'acétate apporté a été enrichi avec 0,2 % d'acétate marqué en <sup>13</sup>C (<sup>13</sup>C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>) dans le but de suivre le devenir du COD dans les systèmes expérimentaux. Une semaine après la mise en circulation des colonnes, 10 *N. rhenorhodanensis* ont été introduits dans 3 colonnes pour chaque concentration en COD testée. L'échantillonnage de l'eau pour l'analyse du COD et la mesure de l'oxygène est effectué à 4 profondeurs (5 cm au dessus de la surface des sédiments et 1, 5 et 10 cm sous la surface des sédiments) grâce à des dérivations latérales. L'échantillonnage est intervenu à 6, 10, 14, 18, 22 et 26 jours d'expérimentation. Au jour 26, les colonnes ont été démontées et le sédiment frais a été collecté par épaisseurs de 0.5 cm sur les 12 cm de la colonne sédimentaire (n=24 échantillons). Sur chaque échantillon, 1 g de sédiment frais a été prélevé pour évaluer le remaniement sédimentaire par quantification des luminophores retrouvés à chaque profondeur. Les sédiments collectés correspondant aux couches de 0-2, 4-6 et 9-11 cm et non utilisés pour le comptage des luminophores ont permis l'analyse du carbone organique sédimentaire, de l'abondance (nombre total de bactéries et nombre de bactéries actives), de la biomasse (protéines, carbohydrates) et de l'activité (respiration potentielle, activités déshydrogénasique et hydrolytique) du compartiment microbien ainsi que de l'enrichissement du compartiment microbien en <sup>13</sup>C (mesure du rapport <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C). De plus, les amphipodes *N. rhenorhodanensis* ont été collectés en fin d'expérimentation afin de mesurer leur enrichissement en <sup>13</sup>C (mesure du rapport <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C) en fonction des concentrations en COD apportées.

Une seconde expérimentation a été réalisée afin de quantifier le taux d'assimilation du COD par les bactéries et l'amphipode *N. rhenorhodanensis*. Un total de 36 bouteillons (Erlenmeyers de 250 ml) ont été remplis de sédiment frais (masse sèche de 30 g par bouteillon, sédiments frais similaires à ceux de l'expérimentation 1) et de 160 ml d'eau reconstituée (comme ci-dessus) enrichie en acétate marqué en <sup>13</sup>C pour obtenir une concentration de 25 mg l<sup>-1</sup> de COD en début d'expérimentation (Figure 2.7A). Dans 18 bouteillons, quatre spécimens de *N. rhenorhodanensis* ont été introduits (Figure 2.7B). Afin de mesurer l'incorporation du carbone organique dans le compartiment microbien et les invertébrés, 6 bouteillons (3 sans invertébrés et 3 avec invertébrés) ont été sacrifiés à chaque temps d'échantillonnage (0h -état initial-, 12h, 24h, 48h, 72h et 96h). Pour chaque temps, la teneur en carbone organique dissous, la teneur en carbone organique particulaire sur les

sédiments, l'abondance des bactéries et des bactéries actives ainsi que le rapport  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  des sédiments et des invertébrés (permettant d'estimer les taux d'assimilation du carbone dans les différents compartiments biologiques) ont été mesurés.

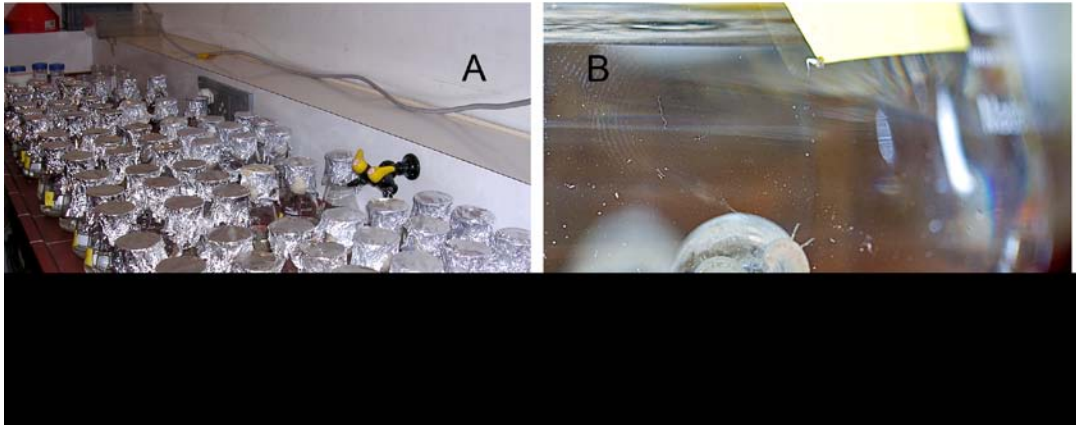


Figure 2.7: Photographies **A.** des bouteillons utilisés dans le cadre de la seconde expérimentation destinée à quantifier le taux d'assimilation du COD par les bactéries et **B.** l'amphipode *N. rhenorhodanensis*.

## 2.3. VARIABLES MESURÉES ET ESTIMÉES

### **Flux d'eau infiltrés et flux de COD atteignant la nappe**

Les quantités d'eau de ruissellement déversées dans le bassin d'infiltration sont mesurées au pas de temps horaire uniquement sur le site 1 qui est lourdement instrumenté dans le cadre de l'OTHU (Barraud *et al.* 2002, Bertrand-Krajewski *et al.* 2008). Ces quantités ont par ailleurs été reproduites de manière satisfaisante à partir d'un modèle à réservoir linéaire fondé sur les précipitations, la taille du bassin versant, et son coefficient de ruissellement (section 3.2. du Chapitre 3). Ces 3 paramètres ont donc été utilisés afin d'estimer la recharge annuelle en eau de ruissellement pluvial sur les autres sites de recharge. Le flux annuel de COD atteignant les horizons supérieurs de la nappe est obtenu en multipliant les quantités d'eau infiltrées par la concentration en COD mesurée dans les 10 premiers centimètres sous la surface libre de la nappe.

### **Dynamique des perturbations**

L'étude de la dynamique des perturbations liées aux variations thermiques et/ou à une désoxygénation du milieu s'appuie sur une mesure en continu (pas de temps horaire) de la température, de la concentration en oxygène dissous et de la conductivité électrique des eaux. Les suivis en continu sont effectués grâce à des sondes multi paramètres de type YSI 600 XLM qui sont relevées et transportées au laboratoire toutes les 2 à 3 semaines afin de transférer les données, de vérifier les résultats (ex: dérive) et de réaliser la maintenance des électrodes et leur calibration. La conductivité électrique de l'eau est utilisée comme un traceur conservatif qui permet de détecter les apports d'eau de ruissellement pluvial dans la nappe à l'aplomb hydraulique des bassins. La conductivité des eaux de ruissellement pluvial est en

effet très inférieure ( $100 \mu\text{S cm}^{-1}$ ) à celle des eaux souterraines ( $> 500 \mu\text{S cm}^{-1}$ ). Le caractère "conservatif" de la conductivité électrique est justifié par Datry *et al.* (2003b, 2004) et Foulquier *et al.* (2009) à partir de relations entre la conductivité et la concentration en chlorure mesurées sur de multiples échantillons d'eau de nappe (n=163 échantillons).

### **Réponse des communautés microbiennes et d'invertébrés**

Le nombre de bactéries est compté par microscopie à épifluorescence après décrochage du sédiment et coloration par un fluorochrome se fixant sur l'ADN, le 4'-6-diamino-2-phenylindole (DAPI, Porter & Feig 1980). La biomasse du biofilm est estimée par la mesure des protéines selon la méthode de Lowry (1951) modifiée par Peterson (1977) et par la mesure des carbohydrates selon la méthode de Dubois *et al.* (1956). L'activité microbienne est estimée au moyen de deux tests biochimiques fondés sur le dosage des produits issus du métabolisme des micro-organismes : l'activité hydrolytique par hydrolyse du FDA (Fluorescéine diacétate, Jørgensen *et al.* 1992) et l'activité déshydrogénasique par réduction de l'INT (2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitro-phenyl)-5-phenyl tetrazolium chloride, Hourri-Davignon *et al.* 1989). Les mesures de respiration potentielle des communautés microbiennes sont effectuées selon la méthode de Furutani *et al.* (1984) par incubation des sédiments fraîchement prélevés et mesure du dégagement de  $\text{CO}_2$  par micro-catharométrie. Pour les expérimentations de laboratoire, une analyse supplémentaire est effectuée afin d'estimer les abondances de bactéries actives par hybridation in situ (méthode FISH utilisant une sonde universelle EUB, (Amann *et al.* 1997). La structure des communautés microbiennes a été déterminée par l'analyse des différences de mobilité sur un gel d'électrophorèse dénaturant des séquences d'ADN double brin (après amplification par PCR) selon la méthode DGGE (Muyzer *et al.* 1993). L'abondance et la richesse des peuplements d'invertébrés dans les horizons supérieurs de la nappe sont estimées à partir du tri, du dénombrement et de l'identification des invertébrés obtenus par pompage Bou-Rouch (Bou & Rouch 1967) dans les piézomètres. En laboratoire, l'activité de bioturbation des invertébrés est mesurée par la méthode des luminophores (Gerino *et al.* 1990) permettant d'estimer le remaniement sédimentaire en présence ou en absence d'invertébrés. L'utilisation d'un substrat carboné enrichi en  $^{13}\text{C}$  dans les expérimentations en laboratoire a permis d'évaluer l'assimilation de COD dans la chaîne trophique par mesure de la signature isotopique des bactéries attachées et de l'amphipode *N. rhenorhodanensis*.

# 3

DYNAMIQUE DU CARBONE ORGANIQUE  
DISSOUS, DE L'OXYGÈNE ET DE LA  
TEMPÉRATURE DANS LES HORIZONS  
SUPÉRIEURS DES NAPPES PHRÉATIQUES

Ce chapitre analyse les effets de l'infiltration induite des eaux de ruissellement pluvial tant sur les apports de COD disponible pour le compartiment microbien que sur le niveau de perturbation (désoxygénation et variation thermique) auquel sont soumis les invertébrés. La première partie consacrée à la dynamique du COD et de l'oxygène dissous détermine l'influence relative des processus hydrologiques et biologiques sur les gradients verticaux mesurés dans les horizons supérieurs des nappes. La seconde partie identifie les effets du transport advectif de chaleur lié à la recharge artificielle en eau de ruissellement pluvial sur le régime thermique des eaux souterraines.



### **3.1. CHANGE IN DISSOLVED ORGANIC CARBON AND OXYGEN AT THE WATER TABLE REGION OF AN AQUIFER RECHARGED WITH STORMWATER : BIOLOGICAL UPTAKE OR MIXING ? (ARTICLE 1)**

Les exemples d'enrichissement en COD et de désoxygénation des eaux souterraines à l'aplomb d'ouvrages d'infiltration sont courants dans la littérature mais les causes exactes de ces modifications ont rarement été élucidées (Barraud *et al.* 1999, Fischer *et al.* 2003, Datry *et al.* 2004). Les décroissances verticales de la concentration en COD et OD dans les horizons supérieurs des nappes sont souvent attribuées à une dégradation aérobie alors qu'elles peuvent refléter, plus particulièrement dans les zones de forte recharge, un mélange des eaux d'infiltration et des eaux souterraines. Les objectifs de ce premier article consistaient donc à : (1) quantifier l'enrichissement en COD et l'appauvrissement en OD des eaux souterraines à l'aplomb de bassins d'infiltration; (2) déterminer les mécanismes à l'origine des gradients verticaux de concentrations en COD et en OD à l'aplomb de ces bassins d'infiltration et; (3) évaluer la biodégradabilité du COD atteignant la nappe.

La méthodologie utilisée comprend trois volets. Le premier permet de tester statistiquement l'influence de l'infiltration des eaux de ruissellement pluvial sur les concentrations en COD et en OD à partir de mesures réalisées sur 21 sites de l'agglomération lyonnaise dont 12 sites de recharge situés à l'aplomb hydraulique de bassins d'infiltration et 9 sites de référence non soumis à une infiltration induite d'eau de ruissellement pluvial. Le deuxième volet a pour but de déterminer si un simple processus de mélange entre les eaux de ruissellement pluvial et les eaux de nappe suffit à rendre compte des variations verticales de la concentration en COD et en OD à l'aplomb des bassins d'infiltration. Enfin, le dernier volet évalue les différences de respiration entre les sites de recharge et de référence et examine à travers des

expérimentations de laboratoire la réponse de la respiration microbienne à un flux croissant de COD biodégradable.

La concentration en COD des eaux de la nappe de l'agglomération lyonnaise est en moyenne de  $1 \pm 0.6 \text{ mg C l}^{-1}$  (n=228 échantillons) et varie de 0.1 à  $3.1 \text{ mg C l}^{-1}$ . Celle des eaux de ruissellement pluvial est en moyenne de  $4.6 \pm 1.9 \text{ mg C l}^{-1}$  (n=34 échantillons; gamme: 2.5 -  $11 \text{ mg C l}^{-1}$ ). Comparativement aux sites de référence, les eaux de nappe à l'aplomb des bassins d'infiltration sont enrichies en COD et appauvries en OD. L'augmentation du COD à l'aplomb des bassins est en moyenne de  $0.3 \text{ mg C l}^{-1}$  et la diminution d'OD est en moyenne de  $1.51 \text{ mg O}_2 \text{ l}^{-1}$ . Sur les sites de référence comme pour les sites de recharge, le COD augmente et l'OD diminue lorsque l'épaisseur de la zone non saturée diminue. L'effet de la recharge ne dépend pas de l'épaisseur de la ZNS pour des épaisseurs de ZNS variant de 3 à plus de 20 mètres.

L'utilisation d'un modèle de mélange indique que les gradients verticaux décroissants de la concentration en COD à l'aplomb des bassins reflètent essentiellement une réduction en profondeur de la proportion d'eau de ruissellement pluvial dans la nappe. La biodégradabilité du COD atteignant la nappe ne semble pas suffisante au premier abord pour induire une consommation d'oxygène qui puisse être détectée dans les horizons supérieurs de la nappe. Cette conclusion est renforcée par le fait que les respirations microbiennes dans la nappe à l'aplomb des ouvrages d'infiltration ne sont pas statistiquement plus fortes que celles mesurées sur les sites de référence. Des expérimentations de laboratoire permettent par ailleurs de montrer que les respirations microbiennes sont pourtant extrêmement sensibles à un apport de COD facilement biodégradable.

La diminution de la concentration en OD dans les eaux souterraines à l'aplomb des bassins traduit donc essentiellement une recharge avec des eaux de ruissellement pluvial appauvries en oxygène lors de leur passage dans le lit d'infiltration des bassins et non pas une consommation d'oxygène dans la nappe liée à une recharge avec des eaux fortement enrichies en COD biodégradable. La dynamique de l'OD dans les nappes à l'aplomb des bassins d'infiltration est fortement influencée par des variations de consommation d'oxygène dans le lit d'infiltration en réponse aux fluctuations saisonnières de la température. L'échauffement estival des lits d'infiltration stimule probablement les respirations microbiennes, entraînant de ce fait une désoxygénation des eaux d'infiltration.

# Article 1

## **Change in dissolved organic carbon and oxygen at the water table region of an aquifer recharged with stormwater: biological uptake or mixing?**

A. FOULQUIER <sup>1</sup>, F. MALARD <sup>1</sup>, F. MERMILLOD-BLONDIN <sup>1</sup>,  
T. DATRY <sup>2</sup>, L. SIMON <sup>1</sup>, B. MONTUELLE <sup>3</sup> & JANINE GIBERT <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Université de Lyon, Lyon, F-69622, France ; Université Lyon 1, Lyon, F-69622, France ; CNRS, UMR 5023, Ecologie des Hydrosystèmes Fluviaux, Villeurbanne, F-69622, France.

<sup>2</sup> CEMAGREF, Laboratoire Dynamiques, Indicateurs et Modèles en Ecohydrologie, 3 bis Quai Chauveau, CP 220, 69336 Lyon Cedex 09, France

<sup>3</sup> CEMAGREF, Laboratoire d'Ecologie Microbienne des Hydrosystèmes Anthropisés, 3 bis Quai Chauveau, CP 220, 69336 Lyon Cedex 09, France

**Soumis à *Biogeochemistry***

## **ABSTRACT**

Decreases in dissolved organic carbon (DOC) and dissolved oxygen (DO) with increasing depth below the groundwater table are often considered as evidence for aerobic respiration; however, they may reflect mixing of infiltrating water and groundwater. We found that groundwater DOC concentration was on average  $0.3 \text{ mg C l}^{-1}$  higher and DO concentration  $1.5 \text{ mg O}_2 \text{ l}^{-1}$  lower at recharge sites replenished with stormwater than at reference sites fed by direct infiltration of rain water from the land surface. Groundwater DOC increased and DO decreased with increasing vadose zone thickness (VZT) at both recharge and reference sites. There was no significant interaction between the effects of stormwater infiltration and VZT. Vertical changes in DOC and DO below the groundwater table at recharge sites could satisfactorily be accounted for by a simple mixing of infiltrating stormwater and groundwater. Moreover, aquifer sediment respiration (SR) was not significantly higher at recharge sites than at reference sites. However, slow filtration column experiments showed that SR increased significantly with an increasing supply of easily biodegradable DOC. We conclude that the observed reduction in DOC below the groundwater table at recharge sites was essentially due to water mixing rather than biological uptake because of the low biodegradability of the DOC and the short transit time of stormwater in the upper layers of groundwater. Our results highlight the need to distinguish between the effect of hydrological and biological processes on DOC and DO patterns below the groundwater before conclusions are made on the efficiency of groundwater in degrading surface-derived DOC.

## **KEY WORDS**

DOC, dissolved oxygen, aquifer sediment respiration,  
groundwater, vadose zone, stormwater infiltration

## INTRODUCTION

Groundwater ecosystem metabolism depends on transport of organic substances (electron donors) and electron acceptors from the surface (Chapelle 1993). The supply of dissolved organic carbon (DOC) to groundwater is usually low because the mineral soil layers and the vadose zone intercept most of the DOC solubilized in the humic soil layer (Michalzik et al. 2001; Neff & Asner 2001; Cannavo et al. 2004; Goldscheider et al. 2006). Weak DOC supply was shown to limit the rate of several biogeochemical processes in groundwater including aerobic respiration (Baker et al. 2000), nitrification (Holmes et al. 1994), and denitrification (Starr & Gillham 1993; Siemens et al. 2003) and might also constrain the abundance and diversity of invertebrate assemblages (Datry et al. 2005). The residence time of water, environmental conditions (e.g. temperature, moisture, water flux) and the strength of attenuation processes in the soil and vadose zone interact in a complex way to control the amount of DOC reaching the groundwater table (Kalbitz et al. 2000). Several studies have found an inverse relationship between the concentration of DOC in groundwater and vadose zone thickness (VZT), indicating vadose flowpaths with longer residence time exhibited more DOC retention (Pabich et al. 2001; Jardine et al. 2006; McMahon & Chapelle 2008). The relationship between groundwater DOC concentration and the percolation rate of infiltrating water is unclear because higher water fluxes simultaneously reduce the transit time of water, dilute the soil DOC solution, and potentially stimulate microbial activity in response to increased soil moisture (Amiel et al. 1990; Kalbitz et al. 2000).

The soil DOC leached to groundwater is retained onto aquifer sediments and consumed by microorganisms as groundwater moves either vertically or horizontally away from the recharge zone (Malard & Hervant 1999). The concentration of dissolved oxygen (DO) in groundwater decreases with decreasing VZT (McMahon & Chapelle 2008) and shallow water-table aquifers typically exhibit higher vertical loss rates of DOC and DO than deep water-table aquifers (Malard & Hervant 1999; Pabich et al. 2001). These are strong arguments in favor of a biological degradation of DOC in the upper groundwater layers. However, the losses of DOC and DO with increasing depth below the groundwater table or increasing distance from the stream in downwelling areas cannot be taken in isolation as proof of aerobic respiration because they may be caused by other factors, including the mixing of distinct water sources and the spatio-temporal variability of the source and sink of DOC and DO (Rutherford & Hynes 1987; Malard & Hervant 1999; Sobczak & Findlay 2002; Wassenaar &

Hendry 2007). For example, water mixing rather than denitrification was reported to explain the apparent change in nitrate concentration in a number of aquifers (Howard 1985; McMahon & Bohlke 1996; Pinay et al. 1998). The significance of water mixing in generating declining gradients of DOC and DO is more likely to be enhanced at sites where groundwater is being rapidly recharged, either naturally or intentionally, with surface water. Indeed, high recharge rates generate pronounced variation in the proportion of infiltrating water with increasing depth below the water table. In addition, they increase groundwater flow velocity, thereby limiting the biological uptake of DOC per distance unit.

The present study aimed to disentangle the effect of water mixing and biological uptake on spatial variation in the concentrations of DOC and DO at the water table region of an aquifer intentionally recharged with stormwater. We hypothesized that the reduction in DOC and DO concentration with increasing depth below the groundwater table at sites recharged with stormwater reflected water mixing rather than an *in situ* biological uptake of DOC. First, we tested the influence of vadose zone thickness (VZT) and recharge by measuring DOC and DO concentrations in groundwater beneath a range of vadose zone thicknesses at multiple recharge and reference sites (i.e. sites not intentionally recharged with stormwater). Second, a mixing model was used to determine whether vertical gradients of DOC and DO at recharge sites could be accounted for by a simple mixing of infiltrating stormwater and groundwater. Third, we examined differences in aquifer sediment respiration among recharge and reference sites and tested the response of sediment respiration to an increasing supply of easily biodegradable DOC using slow filtration column experiments.

## MATERIAL AND METHODS

### *Study sites*

Study sites were located in the eastern aquifer of the Lyon metropolitan area, France (Fig. 1A). The aquifer (catchment area: 314 km<sup>2</sup>) consisted of 3 corridors separated by moraine hills of low hydraulic conductivity (10<sup>-5</sup>-10<sup>-8</sup> m s<sup>-1</sup>) (BURGEAP 2001; Datry 2003a). Aquifer corridors consisted of highly permeable glaciofluvial sediments (hydraulic conductivity: 10<sup>-3</sup>-10<sup>-2</sup> m s<sup>-1</sup>) and were drained by the Rhône River. The aquifer was artificially recharged with stormwater at multiple locations to compensate for reduced natural recharge caused by the sealing due to urban surfaces. Artificial groundwater recharge with stormwater represented at

least 10 % of the annual flux of groundwater which was estimated at 69.1 million m<sup>3</sup> (Giry 1997; Foulquier et al. 2009).

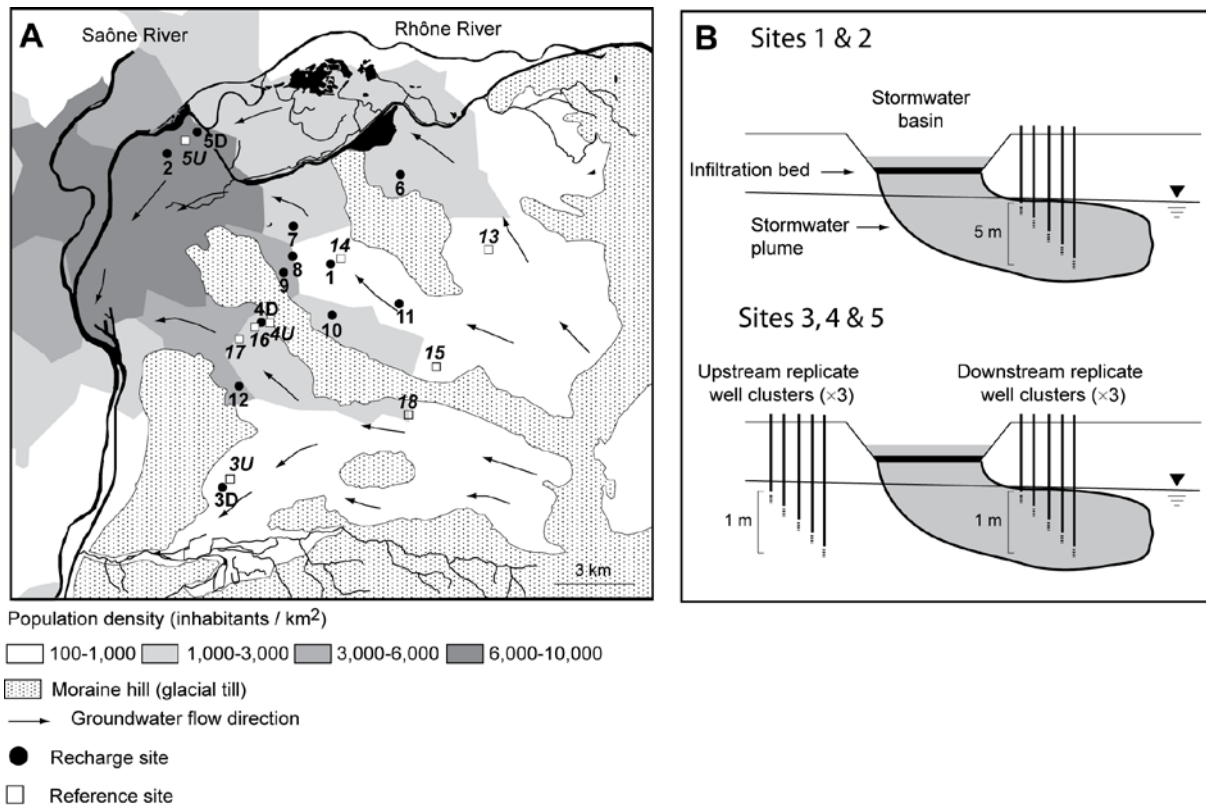


Figure 1: A. Locations of recharge sites (stormwater infiltration basins) and reference sites. B. Cross sectional illustration of well clusters at site 1 to 5.

### Monitoring sites

Twenty one sites were selected with a VZT ranging from 1.7 to 28.2 m (Fig. 1A). Twelve recharge sites were in groundwater areas intentionally recharged by stormwater infiltration basins, and 9 reference sites in groundwater areas fed exclusively by direct infiltration of rain water from the land surface. The stormwater infiltration basins rapidly infiltrate (< 2 days) large quantities of runoff water collected during rainfall events from residential, commercial and/or industrial catchments into the aquifer (Barraud et al. 2002). Catchment areas and surface areas of the infiltration basins ranged from 2.5 to 285 ha and 0.08 to 1 ha, respectively (Table 1). The annual groundwater recharge below each stormwater system was estimated as follows:

$$\text{Groundwater recharge (m}^3 \text{ of stormwater m}^{-2}\text{)} = P \times RC \times CA_{IB} / SA_{IB}$$

where:

P (m): annual precipitation ( $0.835 \text{ m} \pm 0.125 \text{ m}$ ; n=38 years, 1970-2007)

RC (%): runoff coefficient on urban catchment (0.35)

CA<sub>IB</sub>: catchment area of the infiltration basin (m<sup>2</sup>)

SA<sub>IB</sub>: surface area of the infiltration basin (m<sup>2</sup>)

The annual groundwater recharge below stormwater basins averaged  $89 \pm 56 \text{ m}^3$  of stormwater m<sup>-2</sup> (n=11 basins) (Table 1). For comparison, the annual groundwater recharge at reference sites was estimated at  $0.24 \text{ m}^3$  of rainwater m<sup>-2</sup> (i.e. 29 % of annual precipitation) (BURGEAP 1995). All recharge and reference sites were equipped with monitoring wells with a perforated casing intersecting the first 5 meters below the groundwater table. At recharge sites, monitoring wells were in the immediate downstream vicinity of infiltration basins in order to intersect the stormwater plume flowing into groundwater.

**Table 1:** Characteristics of recharge (below stormwater infiltration basins) and reference sites. Recharge at reference sites was derived only from the natural infiltration of rainwater ( $0.24 \text{ m}^3 \text{ m}^{-2}$ ).

Site	Type	Vadose zone thickness (m)	Catchment area (ha)	Basin area (ha)	Annual recharge (m <sup>3</sup> m <sup>-2</sup> )
1 *	Recharge	19.0	180.0	1.00	52.6
2 *	Recharge	2.8	2.5	0.08	9.7
3D **	Recharge	1.7	100.0	0.40	73.1
4D **	Recharge	3.2	270.0	0.39	202.3
5D **	Recharge	2.8	2.5	0.08	9.7
6	Recharge	13.6	45.0	0.08	160.4
7	Recharge	15.0	51.0	0.12	119.7
8	Recharge	13.5	74.0	0.77	28.0
9	Recharge	9.2	33.7	0.11	89.5
10	Recharge	7.9	145.0	0.77	55.0
11	Recharge	19.3	50.0	0.15	97.4
12	Recharge	7.0	285.0	0.90	92.5
3U **	Reference	2.4			
4U **	Reference	3.5			
5U **	Reference	4.2			
13	Reference	28.2			
14	Reference	17.8			
15	Reference	20.3			
16	Reference	5.9			
17	Reference	7.1			
18	Reference	19.9			

\* Well cluster sites

+ Downstream well clusters

‡ Upstream well clusters



### Well-cluster sites

Recharge sites 1 and 2 were equipped with one cluster of 5 wells that were successively installed at depths of 1, 2, 3, 4 and 5 m below the groundwater table (Fig. 1B). The wells intersected a groundwater zone that was artificially recharged with stormwater. They were drilled with the down-the-hole hammer technique and were separated from each other by a distance of approximately 2 m (Fig. 1B). The well casings were screened at their lower end over a height of only 0.5 m (slot size: 2 mm).

Sites 3 to 5 were instrumented with 6 clusters of 5 wells that were successively installed at depths of 10, 30, 50, 70 and 90 cm below the groundwater table. At each site, three replicate well clusters were located upstream of the infiltration basin and three other replicate clusters were located in the immediate downstream vicinity of the basin. The upstream well clusters intersecting the groundwater zone that was not recharged with stormwater were used as reference sites while the downstream well clusters were used as recharge sites because they intersected the stormwater plume induced by the infiltration basins. Distances between the 3 replicate clusters did not exceed 10 m and wells within each replicate cluster were separated from each other by a distance of 0.5 m. All wells were constructed of 3.8 cm inner diameter steel pipe with a screen of 13 cm in height (hole diameter: 0.5 cm) at their lower ends. They were installed at the desired depths using a vibrating electric-powered hammer.

### *Effect of vadose zone thickness and recharge on DOC and DO concentrations*

Groundwater samples were collected from the 21 monitoring sites on four occasions to test for the effect of VZT and recharge with stormwater on the concentrations of DOC and DO in groundwater. Groundwater was collected at a depth of 1 m below the water table by pumping each well with a pneumatic piston pump equipped with 2 inflatable packers (discharge rate ~ 10 l min<sup>-1</sup>) (UWITEC Company, Mondsee, Austria). The first 50 L of pumped water were discarded as rinse. Then, water was collected in 0.1-L burned glass bottles for the determination of DOC. Water samples were stored at 4°C, brought within 4 h to the laboratory, and filtered through a 0.45 µm membrane filter. Depth of the water table was measured in each well with an OTT contact gauge. Dissolved oxygen was measured in the field with an O<sub>2</sub> meter (WTW OXI 330 meter, Weilheim, Germany) whose readings had been previously checked with the Winkler method.

DOC was determined using a carbon analyser (multi N / C<sup>®</sup> 3100, Analytik Jena, Jena, Germany) based on thermocatalytic oxidation (850 °C) of organic carbon and infrared detection of CO<sub>2</sub>. We used an automatic selection outlier method in which repeated injection of the same water samples was carried out until the coefficient of variation between any 2 injections was less than 2 %. The reproducibility of measurements calculated from repeated analyses of in-house standard (K-Phthalate solution, 1 mg C l<sup>-1</sup>) was better than ± 0.05 mg C l<sup>-1</sup> (1 σ).

#### *Vertical profiles of DOC and DO concentrations in groundwater*

Changes in the concentration of DOC, DO, and chloride (Cl<sup>-</sup>) and specific conductance at depth below the water table were determined by collecting groundwater from well clusters during 3 rainfall events and 3 dry-weather periods at sites 1-2 and one rainfall event at sites 3-5. Chloride and specific conductance were used as tracers to detect depth variation in the relative proportion of stormwater into groundwater because Cl<sup>-</sup> concentration and specific conductance of stormwater (ca 5 mg Cl<sup>-</sup> l<sup>-1</sup>, 100 μS cm<sup>-1</sup>) were much lower than those of groundwater (ca 22 mg Cl<sup>-</sup> l<sup>-1</sup>, > 500 μS cm<sup>-1</sup>). Chloride was determined by ion chromatography on water samples collected in polypropylene bottles. Specific conductance was measured in the field with a portable meter (WTW LF 330, Weilheim, Germany). The groundwater sampling procedure at sites 1 and 2 was the same as those described above. At sites 3 to 5, groundwater was pumped from the 6 well clusters with a suction piston pump (discharge rate: 10 l min<sup>-1</sup>). The first 10 L of pumped water were discarded as rinse. Samples of stormwater also were collected in the infiltration basins.

Concentration of DO in groundwater was recorded at 1-hr intervals for one year in well clusters at sites 1 and 2 to determine differences in oxygen depth profile among multiple rainfall events. A YSI 600 XLM multiparameter logger (Yellow Springs Instrument Co., Yellow Springs, Ohio, USA) equipped with three probes measuring specific conductance, temperature and DO was positioned at screen depth in each well. Loggers were transported to the laboratory every 15 to 21 days for data transfer, data examination, probe maintenance and calibration. On several occasions we checked that measurements provided by the loggers were similar to those made on groundwater samples collected from the wells. Rainfall and air temperature data (1-hr intervals) for sites 1 and 2 were obtained from the nearest station of the Meteorological Survey of the city of Lyon.

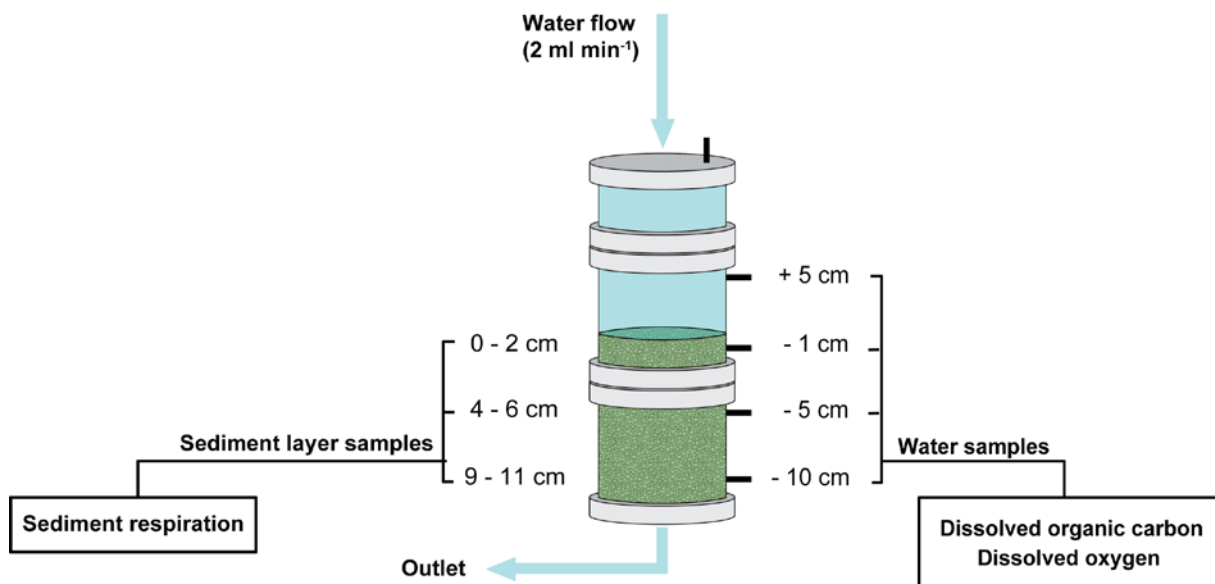
### *Effect of recharge and depth below groundwater table on sediment respiration and SOC*

Aquifer sediment was collected from upstream and downstream well clusters at sites 3 to 5 during one rainfall event (n=90 samples) to test for the effect of recharge and depth below the groundwater table on sediment respiration (SR) and sedimentary organic carbon (SOC). A mixture of water and sediment was extracted using a hand piston pump from each piezometer. After sediment settling, at least 0.5 L of sediment was collected in polypropylene containers that were stored at ~ 20 °C and brought within 4 h to the laboratory for analysis. The sediment was sieved wet through a 1-mm sieve and respiration was measured using the slurry technique (Furutani et al. 1984). About 10 g of wet sediment with 5 mL of groundwater collected in the wells were placed in 150 mL flasks. The samples were incubated under aerobiosis at 20 °C in the dark under a gentle shaking. At  $t = 3$  h and  $t = 6$  h, CO<sub>2</sub> was measured by gas chromatography on a MTI 200 microcatharometer (Agilent, Santa Clara, CA, USA). Dry weights of sediment were determined after drying at 60 °C and sediment respiration was expressed as ng of CO<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> sediment dry weight (DW) h<sup>-1</sup>. Sedimentary organic carbon was measured on replicate samples of 0.25 g that were placed in pre-combusted ceramic boats, dried at 50 °C and treated with 2M HCl to remove inorganic carbon. Acid treatment consisted of repeated additions of small quantities of acid (up to 400 µL) with the samples being dried in a warming oven at 50 °C between each acid addition. The incremental addition of acid continued until there was no visual evidence of effervescence. The organic carbon content of sediment was then determined using a carbon analyser (multi N / C<sup>®</sup> 3100, Analytik Jena, Jena, Germany) based on thermocatalytic oxidation (900 °C) of organic carbon and infrared detection of CO<sub>2</sub>. Replicate sediment samples were analyzed until the coefficient of variation between any 2 replicate samples was less than 10 %. The reproducibility of measurements calculated from repeated measurements of calcite powder (4.2 mg CaCO<sub>3</sub>; 120 g C kg<sup>-1</sup>) was better than ± 26.5 µg C (1 σ).

### *Sediment respiration under controlled supply of biodegradable DOC*

Slow filtration column experiments were conducted to test for the effect of an increasing supply of easily biodegradable DOC (BDOC) on sediment respiration. Columns had an inner diameter of 10 cm and consisted of two experimental modules (10 cm high) topped by a third module of 5 cm in height (Mermillod-Blondin et al. 2005) (Fig. 2). They were filled with inert gravel and fresh sand to a height of 15 cm. About 10 cm of water was left above the sediment surface. Gravels (grain size: 5-8 mm) were cleaned with deionized water and dried at 60°C.

Fresh sand (grain size 100-1000  $\mu\text{m}$ ) was collected at a depth of 1 m below the bed of a gravel pit intersecting the water table of the glaciofluvial aquifer using the Bou-Rouch method (Bou & Rouch 1967). Masses of gravel (500 g, 500 g and 400 g) and sand (150 g, 150 g and 120 g) were alternately introduced into the columns to obtain a heterogeneous porous media.



**Figure 2:** Schematic diagram of a slow filtration column and description of the sampling procedure.

Experiments were performed at constant temperature ( $15 \pm 0.5^\circ\text{C}$ ) in the dark. The columns were supplied from the top with reconstituted water ( $96 \text{ mg NaHCO}_3 \text{ l}^{-1}$ ,  $39.4 \text{ mg CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O l}^{-1}$ ,  $60 \text{ mg MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O l}^{-1}$  and  $4 \text{ mg KCl l}^{-1}$ ,  $19 \text{ mg Ca(NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O l}^{-1}$ , US EPA 1991) using a peristaltic pump controlling a constant infiltration flow rate of  $2 \text{ ml min}^{-1}$ . Supplied water was aerated to maintain concentrations of DO between  $8.5$  and  $9.5 \text{ mg l}^{-1}$  at the inlet of the columns throughout the experiment. Three concentrations of sodium acetate (i.e.  $0.5 \text{ mg}$ ,  $1.5 \text{ mg}$  and  $2.5 \text{ mg C-NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2 \text{ l}^{-1}$ ), an easily biodegradable form of DOC, were applied to the columns with three replicate columns per concentration. Water sampling for DOC determination and oxygen measurements were made at four depths (5 cm above the sediment surface, and 1, 5 and 10 cm below the sediment surface) by means of lateral water derivation outlets on days 6, 10, 14, 18, 22 and 26 after the start of the experiments. For DO measurements, an oxygen micro-sensor probe (Unisense, Aarhus, Denmark) was directly

connected to the lateral water derivation, thereby preventing any contact with atmospheric oxygen. On day 26, the columns were dismantled and 3 sediment layers (0-2, 4-6 and 9-11 cm below the sediment surface) were collected for the determination of SR and SOC. Analytical procedures for these 2 parameters were the same as those described above.

### *Data analysis*

Linear regression analyses were performed to evaluate the relationships between VZT and concentrations of DOC and DO in groundwater. We used the average concentrations of DOC and DO from groundwater samples collected over the 4 sampling dates at 21 monitoring sites to avoid a pseudoreplication effect (i.e. unjustified increase in the degrees of freedom). Analysis of covariance (ANCOVA) was used to determine whether the relationships differed between recharge and reference sites. The design was a 2 (i.e. recharge versus reference sites) by 1 (i.e. VZT in m) analysis.

A two-end member mixing model based on measured concentrations of chloride was used to: (i) determine vertical change in the proportion of inflow stormwater in groundwater at recharge sites and (ii) to test whether the observed vertical changes in DOC and DO below the water table could be accounted for by a simple mixing of water sources. Water sampled at each depth below the groundwater table during rainfall events was assumed to be a mix of pre-event groundwater and inflow stormwater infiltrating through the vadose zone. The relative proportion at depth  $x$  of water from depth  $x-1$  was calculated using the following formula:

$$f_{x-1} = (C_x - C_{g_x}) / (C_{x-1} - C_{g_x})$$

where  $f_{x-1}$  was the proportion at depth  $x$  of water from depth  $x-1$ , and  $C_x$ ,  $C_{g_x}$  and  $C_{x-1}$  represented the chloride concentrations of post-event groundwater, pre-event groundwater, and water collected at depth  $x-1$ , respectively. Chloride was used as a conservative tracer (Triska et al. 1993). The proportion  $f_{x-1}$  was used to calculate the concentrations of DOC and DO at each depth under the assumption of a simple mixing of water sources. Concentrations in upstream well clusters (sites 3 to 5) and groundwater collected during dry weather periods (sites 1 and 2) were used as pre-event groundwater concentrations. Concentrations of DOC and DO in stormwater collected in the infiltration basins were used as input concentrations in the model for calculating DOC and DO concentrations in the uppermost layer of groundwater.

Calculated concentrations were plotted against measured concentrations and were compared using a Wilcoxon paired test. In order to test the validity of our mixing model, we checked that the calculated/measured ratio of specific conductance, which was also expected to behave as a conservative tracer, did not significantly differ from 1.

We used continuous measurements of DO at sites 1 and 2 to examine differences in the vertical gradient of DO between cold and warm seasons. Warm and cold seasons corresponded to months with higher and lower mean air temperature than the annual air temperature, respectively.

Analysis of variance (ANOVA) was used to test for the effect of recharge and depth below the water table on SR and SOC using data collected at well cluster sites 3 to 5 (n=90 wells). A nested design with sites and recharge nested in sites and depth as main effects was used in order to avoid confounding between-site variation with variation induced by recharge. The interactions between depth and recharge nested in sites as well as between depth and sites were also tested. ANOVA was performed to test for the effect of an increasing supply of BDOC on SR and SOC using data from the slow filtration column experiments. The design was a 3 (BDOC concentrations of 0.5, 1.5, and 2.5 mg C l<sup>-1</sup>) by 3 (depths of 1, 5 and 10 cm below the sediment surface) analysis. We examined the relationship between SR and the removal rate of DOC and DO in the slow filtration columns. The removal rate in each sediment layer (i.e. 0-2, 4-6 and 9-11 cm below the sediment surface) was calculated using data obtained on day 26 of the experiments as follows:

$$RR = (\Delta_C \times Q) / (V \times P)$$

Where:

RR: Removal rate of DOC and DO in mg l<sup>-1</sup> sediment h<sup>-1</sup>

$\Delta_C$ : Difference in DOC or DO concentration (mg l<sup>-1</sup>) between 2 consecutive depths

Q: water discharge (l h<sup>-1</sup>) through the sediment layer

V: volume of the sediment layer (l)

P: porosity

Statistical analyses were performed using R (R Development Core team 2006) and the Statistica 6<sup>®</sup> software package (Statsoft Inc., Tulsa, Oklahoma, USA). Significance for all statistical tests was accepted at  $\alpha < 0.05$ .

## RESULTS

### *Effect of vadose zone thickness and recharge on DOC and DO concentrations*

Groundwater DOC concentration varied from 0.1 to 3.1 and averaged  $1 \pm 0.6$  (n=228), whereas that of stormwater averaged  $4.6 \pm 1.9$  (n=34; range: 2.5 - 11). DOC was negatively correlated and DO was positively correlated with VZT at both reference and recharge sites (Fig. 3). DOC was significantly higher and DO was significantly lower at recharge sites than at reference sites (Fig. 3, Tables 2 & 3). The increase in DOC and decrease in DO averaged  $0.3 \text{ mg C l}^{-1}$  and  $1.51 \text{ mg O}_2 \text{ l}^{-1}$ , respectively. Near anoxic conditions (i.e.  $\text{DO} < 1 \text{ mg O}_2 \text{ l}^{-1}$ ) occurred at only 2 out of 11 recharge sites. The slopes of the regressions between VZT and DOC and DO concentrations did not differ between reference and recharge sites, indicating that the effect of recharge did not depend upon VZT.

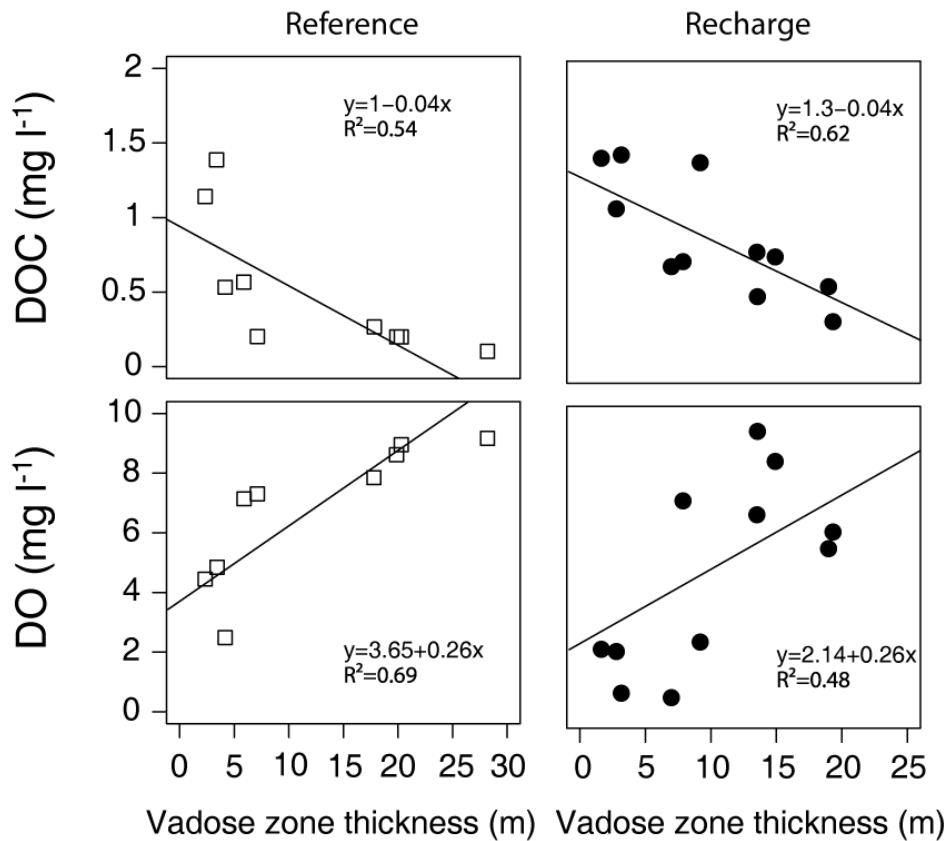


Figure 3: Relationships between the concentrations of dissolved organic carbon (DOC) and dissolved oxygen (DO) in groundwater and vadose zone thickness at reference sites (left panels) and recharge sites (right panels).

Table 2: Results of analysis of covariance for testing the effect of recharge and vadose zone thickness (VZT) on the concentrations of dissolved organic carbon (DOC) and dissolved oxygen (DO).

	df	DOC		DO	
		F	p	F	p
VZT	1	21.72	0.0003	17.70	0.0006
Recharge	1	8.33	0.0107	4.84	0.0429
Recharge × VZT	1	0.55	0.4705	1.34	0.2631
Error	16				

#### *Vertical profiles of concentration at recharge sites*

DOC decreased with increasing depth below the groundwater table but vertical gradients were typically more pronounced at recharge sites 1, 2 and 3 characterized by a distinct vertical reduction in the proportion of infiltrating stormwater (Fig. 4, Table 3). There was almost no variation in DOC concentration with depth at sites 4 and 5, which showed little vertical

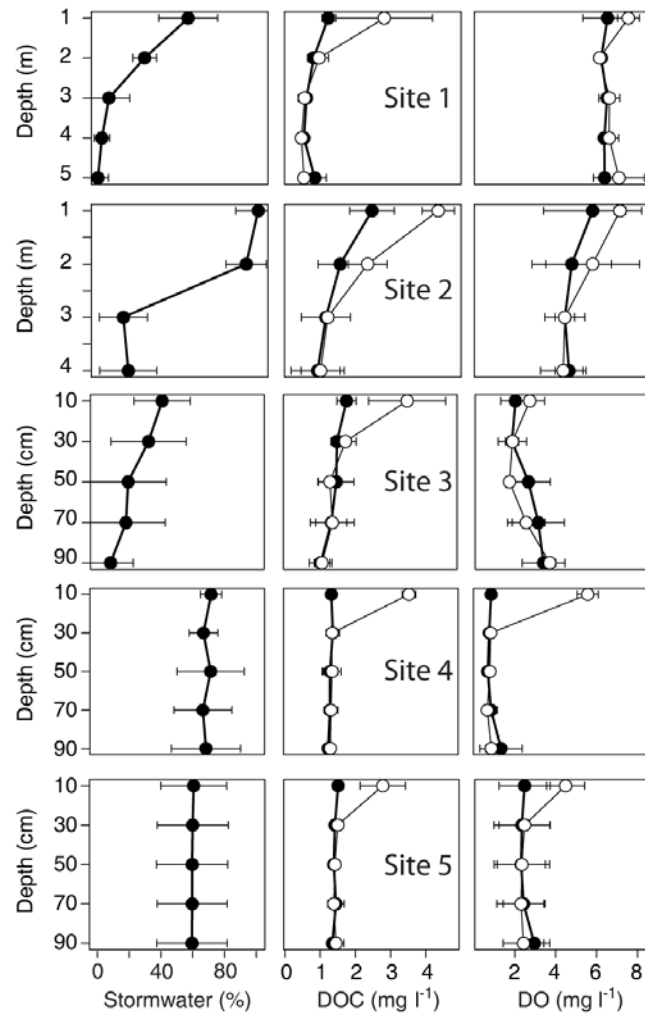


change in the proportion of infiltrating stormwater. Wilcoxon matched pairs test indicated no difference ( $p=0.13$ ,  $n=72$ ) between measured values of specific conductance and those calculated with the mixing model based on chloride concentrations (Fig. 5).

**Table 3:** Results of nested analysis of variance for testing the effect of recharge and depth below the groundwater table on the concentrations of dissolved organic carbon (DOC) and dissolved oxygen (DO) in groundwater, sediment respiration (SR) and sedimentary organic carbon (SOC).

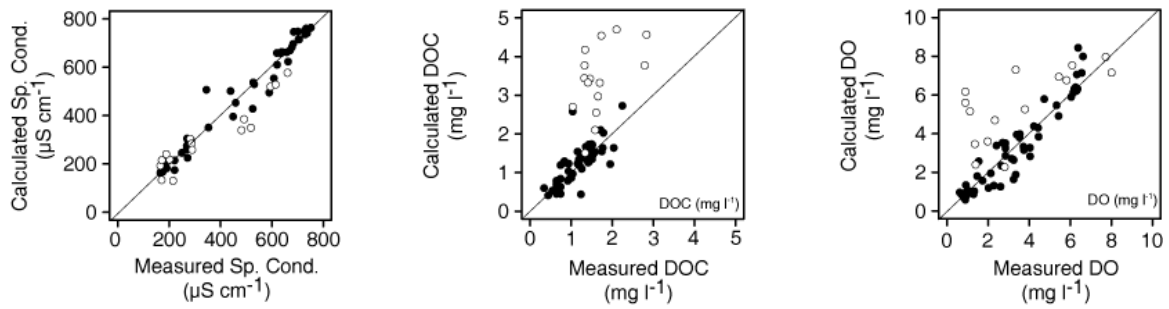
	df	SR		SOC		DOC		DO	
		<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>
Site	2	0.94	0.503	0.32	0.749	0.474	0.663	0.12	0.891
Recharge (Site)	3	2.21	0.140	17.36	< 0.001	52.40	< 0.001	109.59	< 0.001
Depth	4	0.93	0.492	0.33	0.853	3.79	0.050	12.12	0.002
Site × Depth	8	0.83	0.596	1.28	0.336	0.79	0.623	0.35	0.927
Recharge (Site) × Depth	12	1.10	0.378	1.69	0.091	1.04	0.429	0.90	0.551
Error	60								

There also were no differences ( $p>0.05$ ) between calculated and measured concentrations of DOC at sites 1 and 3 (Figs 4 & 5). At site 2, measured concentrations of DOC were significantly lower than calculated concentrations ( $n=12$ ;  $p=0.03$ ) but the difference was no longer statistically significant ( $n=9$ ,  $p=0.17$ ) when data at depth of 1 m below the groundwater table were excluded from the analysis. Vertical changes in DO below the groundwater table at recharge sites could also be accounted for by a simple mixing of infiltrating stormwater and groundwater (Figs 4 & 5).



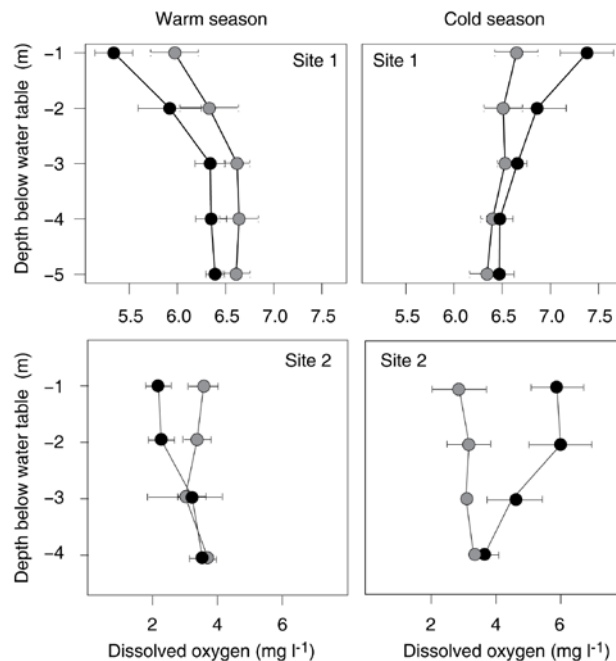
**Figure 4:** Changes at depth below the groundwater table in: 1) the relative proportion of stormwater into groundwater (left panels); 2) measured (black circles) and calculated (white circles) concentrations of dissolved organic carbon (DOC) (middle panels) and; 3) measured (black circles) and calculated (white circles) concentrations of dissolved oxygen (DO) (right panels). Horizontal bars show  $\pm 1$  standard deviation for 3 rainfall events at sites 1 and 2 and 3 replicate wells at sites 3 to 5.

At sites 2, 3, 4 and 5 measured concentrations of DO did not differ significantly ( $p > 0.05$ ) from calculated concentrations. At site 1, measured concentrations of DO were significantly lower than calculated concentrations ( $n = 15$ ,  $p = 0.047$ ) but the difference was no longer statistically significant ( $n = 12$ ,  $p = 0.21$ ) when data at depth of 1 m below the groundwater were excluded from the analysis.



**Figure 5:** Calculated values from the two-end member mixing model based on chloride concentrations versus measured values for specific conductance (Sp. Cond.), dissolved organic carbon (DOC), and dissolved oxygen (DO). Values (n=72) were from all sites, dates and depths. White symbols correspond to the uppermost depth. The line indicates 1:1 equivalence relationships.

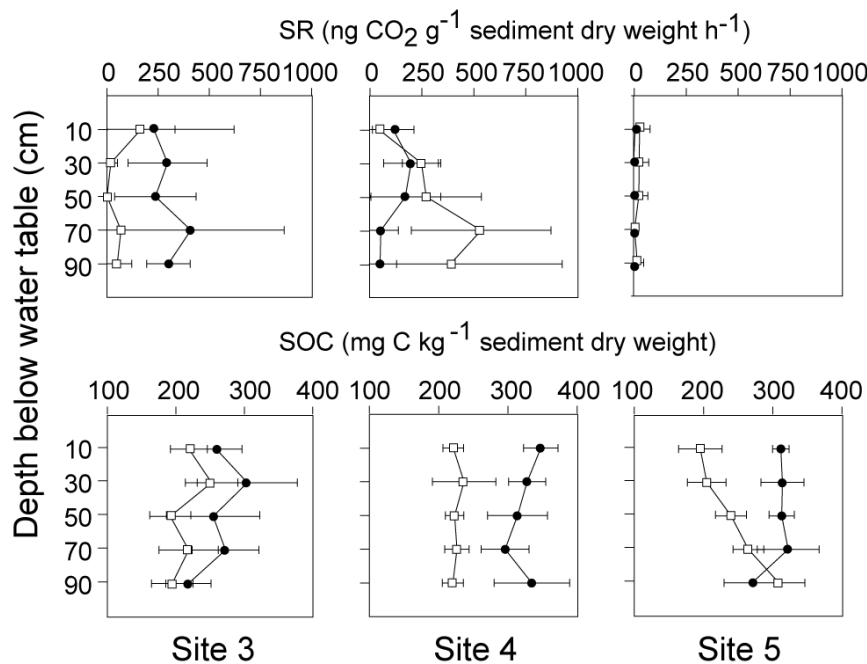
Vertical profiles of DO at sites 1 and 2 exhibited a clear seasonal shift (Fig. 6), although DOC concentration always decreased with depth during recharge events (sites 1 and 2, Fig. 4). DO concentration decreased with depth during cold recharge events (i.e. cold rains), whereas it increased during warm recharge events.



**Figure 6:** Vertical gradients of dissolved oxygen below the groundwater table at recharge sites 1 and 2 before (grey circles) and after (black circles) rainfall events during the warm (left panels) and cold (right panels) seasons. Horizontal bars show  $\pm 1$  standard deviation for multiple rainfall events (n = 5 warm events and 5 cold events at site 1; n = 6 warm and cold events at site 2).

### *Effect of recharge and depth below groundwater table on SR and SOC*

Sediment respiration (SR) varied greatly among sites 3-5 but was not significantly higher in downstream well clusters than in upstream well clusters nor did it decrease with increasing depth below the water table (Fig. 7, Table 3). A non-significant effect of groundwater recharge with stormwater on SR was observed although DOC was significantly higher and DO was significantly lower in downstream well clusters than in upstream well clusters (Table 3). SOC was significantly higher in downstream well clusters but there were no differences among depths (Table 3).

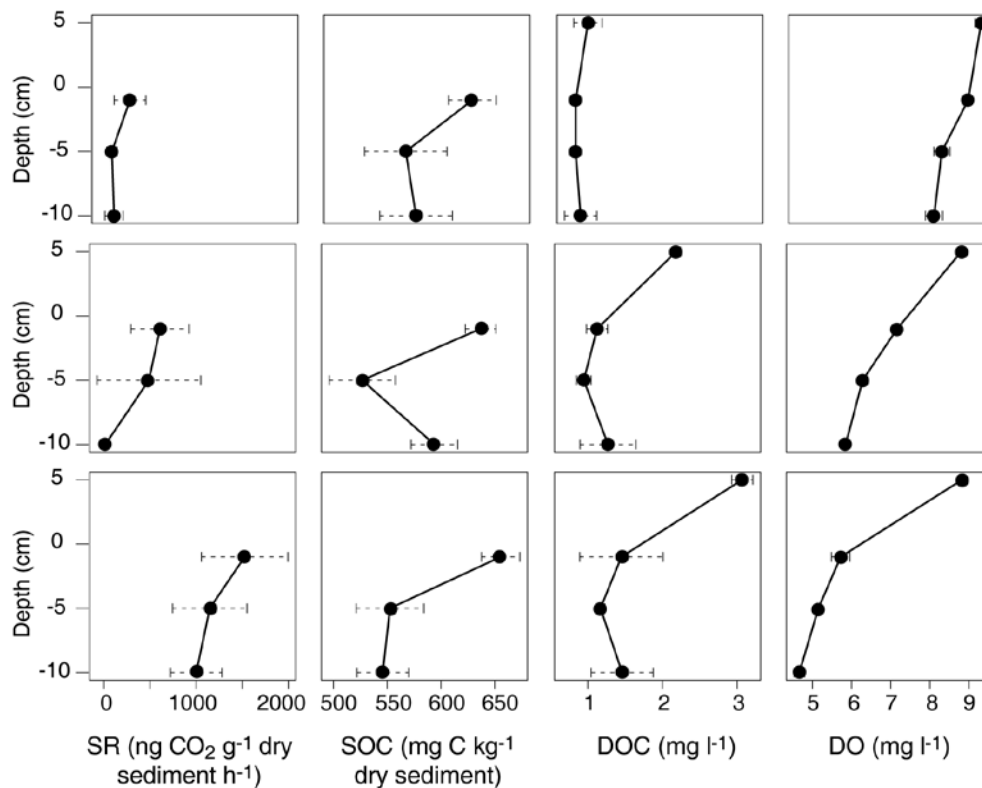


**Figure 7:** Changes at depth below the groundwater table in sediment respiration (SR) and sedimentary organic carbon (SOC) in upstream (white square) and downstream (black circles) well clusters at sites 3 to 5. Horizontal bars show  $\pm 1$  standard deviation for 3 replicate wells.

### *Response of sediment respiration to DOC enrichment under controlled conditions*

Sediment respiration increased significantly with increasing BDOC supply and decreased with depth (Fig. 8, Table 4). The increase in sediment respiration was typically more pronounced in the first cm of sediment (i.e. significant interaction between the effects of BDOC supply and depth). Sediment respiration with a supply of BDOC ( $\text{SR}=547 \pm 601 \text{ ng}$

$\text{CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ dry sediment weight h}^{-1}$ ) was on average 4.3 times higher than that measured under field conditions ( $\text{SR}=127 \pm 206 \text{ ng CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ dry sediment weight h}^{-1}$ ).



**Figure 8:** Vertical gradients of sediment respiration (SR), sedimentary organic carbon (SOC), dissolved organic carbon (DOC) and dissolved oxygen (DO) at day 26 in slow filtration columns supplied with water containing 0.5 (upper panels), 1.5 (middle panels) and 2.5 (lower panels) mg C-sodium acetate  $\text{l}^{-1}$ .

Sediment respiration resulted in a steep decreasing gradient in the concentration of DOC and DO in the slow filtration columns. The removal rates of DOC and DO (RR) increased significantly with increasing BDOC supply and were linearly correlated with sediment respiration ( $\text{RR}_{\text{DOC}}$  in  $\text{mg C l}^{-1} \text{ sediment h}^{-1} = 0.003 \times \text{SR}$ ,  $n=27$ ,  $r^2=0.64$ ,  $p<0.001$ ;  $\text{RR}_{\text{DO}}=0.006 \times \text{SR}$ ,  $n=27$ ,  $r^2=0.72$ ,  $p<0.001$ ) (Table 4). The molar ratio of consumed  $\text{O}_2$  to removed C equaled 0.65 and did not vary among depths ( $\text{RR}_{\text{DO}}$  in  $\text{mol O}_2 \text{ l}^{-1} \text{ sediment h}^{-1} = 0.65 \times \text{RR}_{\text{DOC}}$ ,  $n=27$ ,  $r^2=0.95$ ,  $p<0.001$ ). Sedimentary organic carbon did not significantly increase with increasing BDOC supply but it was significantly higher in the first cm of sediment (Fig. 8, Table 4).

**Table 4:** Results of analysis of variance for testing the effect of an increasing supply of labile dissolved organic carbon (DOC as sodium acetate) and depth on removal rates of

dissolved organic carbon (RR-DOC) and dissolved oxygen (RR-DO) in slow filtration columns, sediment respiration (SR) and sedimentary organic carbon (SOC).

	df	SR		SOC		RR-DOC		RR-DO	
		<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>
DOC supply	2	45.11	< 0.001	0.06	0.944	4.43	0.027	101.78	< 0.001
Depth	2	6.43	0.014	27.84	< 0.001	41.07	< 0.001	674.36	< 0.001
DOC supply × depth	4	1.76	0.212	2.37	0.091	5.80	0.003	78.18	< 0.001
Error	18								

## DISCUSSION

### *Effect of vadose zone thickness and recharge on DOC and DO concentrations*

Our finding that groundwater DOC concentration decreased and DO increased with increasing vadose zone thickness corroborated the results of recent studies conducted in several aquifers of the United States (Pabich et al. 2001; McMahon & Chapelle 2008). A longer residence time of water in the vadose zone enabled an increasing amount of soil-derived DOC to be removed from solution either by adsorption or respiration. The subsequent mineralization of the remaining soil DOC fraction leached to groundwater probably accounted for the observed positive relationship between DO concentration and VZT. The diffusion of oxygen through the vadose zone and into the saturated zone was another process that might have influenced DO concentrations in groundwater. However, Neale et al. (2000) showed that the reaeration flux rate decreased with increasing VZT. The linear relationships between DOC and DO concentrations and VZT observed in this study differed from exponential relationships reported for several aquifers of the United States for which the reduction rate in DOC was much higher for VZT less than 2 to 3 m (Pabich et al. 2001; McMahon & Chapelle 2008). This difference was essentially due to a lack of DOC measurements for VZT < 2 m because of the scarcity of shallow water-table sites in the glaciofluvial aquifer of the Lyon City.

The increase in groundwater DOC concentration at recharge sites was caused by localized infiltration of stormwater enriched in organic matter during runoff from urban catchments. Stormwater also leached DOC as it percolated through the infiltration beds. Slow filtration column experiments showed that the concentration of DOC in stormwater could increase by 10 to 40 mg C l<sup>-1</sup> as it percolated through bed sediments of recharge sites 1 and 2 (Datry et al.

2003b; Larmet 2007; Nogaro et al. 2007). Two distinct, albeit not mutually exclusive, mechanisms could account for the observed reduction in groundwater DO at recharge sites. The first mechanism was the mineralization in groundwater of an excess of labile DOC brought by infiltrating water. The second mechanism did not necessitate a supply of labile DOC but corresponded to groundwater recharge with stormwater that had been depleted of dissolved oxygen during its transit through the infiltration bed (Datry et al. 2003b, 2004; Foulquier et al. 2008). Both mechanisms could also explain why the effect of recharge on DOC and DO concentrations did not appear to depend on VZT. The first mechanism implies that an increased amount of labile DOC reached the groundwater at recharge sites but this amount and the resulting DO consumption in groundwater was controlled by VZT in the same way as at reference sites. The second mechanism implies that excess DOC leached to groundwater at recharge sites was poorly biodegradable and did not stimulate microbial respiration. In addition, replenishment of groundwater with oxygen-poor stormwater decreased DO concentration at all recharge sites independently of VZT.

#### *Significance of water mixing on vertical gradient of DOC and DO*

Results of the mixing model strongly indicated that decreasing gradients of DOC were essentially due to a decrease in the proportion of DOC-rich infiltrating water with increasing depth below the groundwater table. This was consistent with the lack of DOC attenuation with depth at recharge sites 4 and 5, which were characterized by a constant proportion of newly infiltrating stormwater at all depths. DOC concentration was not markedly affected by biological uptake or adsorption within the first m below the groundwater table. Our conclusion that groundwater was not a sink of DOC was based on the assumption that the mixing model provided a reasonable estimate of concentrations expected if only mixing processes were important. This assumption was robust because the calculated/measured ratio of specific conductance that was expected to be conservative did not significantly differ from 1. Results of the mixing model also depended on estimates of chloride, DOC and DO concentrations for each water source and depth. The only major uncertainty was the concentration of DOC and DO of infiltrating water reaching the uppermost layer of groundwater. The mixing model probably overestimated the attenuation of DOC and consumption of DO in the uppermost layer of groundwater because stormwater was assumed to reach groundwater with DOC and DO concentrations equaled to those measured in the

infiltration basins. In any case, this uncertainty did not affect the model calculations at subsequent depths.

The mixing model satisfactorily explained vertical gradients of DO in recharge areas even in cases when declines in DOC were accompanied by a concomitant loss in DO. Moreover, we found that DO evolved independently of the DOC decline because it alternatively increased and decreased with depth during winter and summer rainfall events. This implied that DO gradients were controlled by the concentration of infiltrating water reaching the groundwater table rather than by *in situ* consumption of DO in groundwater. Datry et al. (2004) and Foulquier et al. (2009) suggested that the dynamics of DO in groundwater below stormwater infiltration basins might be strongly influenced by temperature-induced changes in the rate of oxygen consumption in infiltration beds. Summer warming of the bed probably stimulated microbial respiration, thereby leading to a downward flow of oxygen-poor stormwater. Datry et al. (2003b) and Nogaro et al. (2007) showed that oxygen uptake in filtration columns filled with sediment collected in infiltration beds at recharge sites 1 and 2 could lead to near anoxic conditions at a depth of only 5 cm below the water sediment interface. Reaeration of infiltrating water due to O<sub>2</sub> diffusion in the vadose zone was probably minimal because the high stormwater infiltration rate (i.e. 0.014 l m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) rapidly led to pore space saturation with water (Refsgaard et al. 1991; Le Coustumer & Barraud 2007; Goutaland et al. 2008). Groundwater DO depletion below stormwater infiltration basins was reported in a number of studies but the causal mechanisms remained unclear (Fischer et al. 2003). Determining the relative significance of replenishment with deoxygenated but DOC-poor water and *in situ* DO consumption due to a supply of labile DOC is of paramount importance because these two processes may result in dissimilar changes in the rate of microbial terminal electron acceptor processes in groundwater (e.g. denitrification, iron reduction).

#### *Effect of DOC supply on sediment respiration*

The lack of stimulation of sediment respiration at recharge sites was congruent with our observation that the decrease in DOC and DO concentrations with depth essentially reflected mixing of infiltrating water and groundwater. Studies of biological activity along subsurface flowpaths in which DOC loss was observed provided equivocal results with some studies with not all reporting a concomitant decrease in sediment respiration, bacterial activity or abundance (Findlay et al. 1993; Marmonier et al. 1995; Ellis et al. 1998; Battin 2000, Craft et



al. 2002; Sobczak & Findlay 2002). Stormwater reaching groundwater was probably a source of low biodegradable DOC since slow filtration column experiments demonstrated that sediment respiration was extremely sensitive to an increase in BDOC supply. The increase in sediment respiration within slow filtration columns enabled an increasing quantity of dissolved acetate (up to  $1 \text{ mg C l}^{-1} \text{ sediment h}^{-1}$ ) to be almost totally removed within only 10 cm of sediment. Baker et al. (1999) found that acetate injected into hyporheic sediment of Rio Calaveras stream, New Mexico, with an initial concentration of  $7.9 \text{ mg C l}^{-1}$  stimulated aerobic and anaerobic respiration and was entirely consumed along flowpath length  $< 50 \text{ cm}$ . In the present study, the more labile fraction of DOC was likely to be intercepted in the soil and vadose zone, leaving only the refractory fraction to reach the underlying groundwater. Pabich et al. (2001) found that the DOC loss rate as a function of depth below the groundwater table in Cape Cod, USA decreased with increasing VZT indicating that DOC was either less labile or sorbable under thicker vadose zones. The low DOC concentration ( $< 2 \text{ mg C l}^{-1}$ ) and the lack of stimulation of sediment respiration in groundwater at recharge sites characterized by high stormwater infiltration rate and  $\text{VZT} < 3 \text{ m}$  indicated that the soil and vadose zone were very efficient in retaining DOC either by mineralization or adsorption. The increase in sediment moisture associated with stormwater infiltration could stimulate microbial activity, thereby enhancing microbial degradation of DOC in the soil and vadose zone (Kalbitz et al. 2000; Marschner & Kalbitz 2003). Amiel et al. (1990) pointed out that the biological degradation of sewage derived DOC in the vadose zone was more efficient under saturated conditions prevailing below infiltration ponds than under unsaturated conditions prevailing below land irrigated with wastewater effluent.

Adsorption of dissolved organic matter onto mineral particles, its retention by microbial extracellular polymeric substances and its assimilation into bacterial biomass might also contribute to reduce DOC concentration along groundwater flowpaths (Kaplan & Newbold 2000). Unlike microbial respiration, these mechanisms were expected to result in a decreasing gradient of SOC with depth. SOC was significantly higher at recharge sites than at reference sites but it did not exhibit any decreasing trend with depth that might have indicated a preferential retention of DOC in the uppermost layers of groundwater. In slow filtration columns, the first cm of sediment that exhibited the highest removal rates of BDOC and DO also had a distinctively higher SOC concentration. SOC accumulation within this uppermost layer probably reflected a biological retention and/or assimilation of BDOC rather than a

physical adsorption of BDOC onto mineral particles because our C to O<sub>2</sub> molar ratio of 0.65 effectively corresponded to values reported in the literature for microbial degradation of BDOC (Bauerfind 1985; Pusch & Schwoerbel 1994; Roy et al. 1999). Baker et al. (1999) did not observe any acetate sorption onto aquifer sediment samples of Rio Calaveras that were incubated for 30 min in acetate solutions with concentrations ranging from 1 to 100 mg C l<sup>-1</sup>.

Our conclusion that the vertical gradient of DOC and DO at recharge sites was essentially due to water mixing might seem to contradict our interpretation of a positive relation between DO and VZT being caused by mineralization of DOC leached to groundwater at reference sites. Depending on the biodegradability of DOC leached to groundwater at recharge sites, the contact time of water with sediment in the upper layers of groundwater could be too short to result in a detectable decreasing trend in DOC and DO with depth. At site 1, the vertical velocity of stormwater in the upper layers of groundwater during rainfall events was found to average 7 m day<sup>-1</sup> based on phase differences between time series of specific conductance at multiple depths below the groundwater table (Foulquier et al. 2008). This vertical velocity was 10 times higher than that estimated at reference sites using a three-dimension model of groundwater flow in the glaciofluvial aquifer (Kaskassian et al. 2008). Kalbitz et al. (2003), who conducted 90-day liquid incubation experiments with DOC from diverse soil samples, found a mean residence time of 3.3 to 8.9 days for the labile DOC pool and 0.3 to 12.5 years for the stable DOC pool.

Our results suggest that non-retentive processes such as water mixing or differential residence time of water can lead us to over-estimate the ability of groundwater to act as a sink of DOC being transported through the vadose zone. This highlights the need for detailed studies of coupled hydrological and biogeochemical processes for determining the DOC retention capacity of the upper layers of groundwater. Current research in this glaciofluvial aquifer is examining the combined effect of DOC biodegradability and flow characteristics on the fate of DOC in the upper layers of groundwater under different recharge conditions.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

This study was conducted within the framework of the experimental observatory for urban hydrology (OTHU, <http://www.graie.org/othu/>). It was funded by the French National

Research Agency (project ANR-05-ECOT-006; <http://www.graie.org/ecopluiies/>), the French programme EC2CO-Cytrix from INSU/CNRS (project “NAPCOD”), the urban community of Lyon, and the Rhône-Alpes Region. We are indebted to G. Bouger, E. Malet, Y. Negrutiu, B. Volat, and F. Vallier for their most dedicated support with the field and laboratory work. We thank Ton Snelder for his comments that improved an earlier version of the manuscript.

## REFERENCES

- Amiel AJ, Magaritz M, Ronen D et al (1990) Dissolved organic carbon in the unsaturated zone under land irrigated by wastewater effluent. *Res J Water Pollut Control Fed* 62:861-866
- Baker MA, Dahm CN, Valett HM (1999) Acetate retention and metabolism in the hyporheic zone of a mountain stream. *Limnol Oceanogr* 44:1530-1539
- Baker M.A., Valett H.M., Dahm C.N. (2000) Organic carbon supply and metabolism in a shallow groundwater ecosystem. *Ecology* 81:3133-3148.
- Barraud S, Gibert J, Winiarski T et al (2002) Implementation of a monitoring system to measure impact of stormwater runoff infiltration. *Water Sci Technol* 45:203-210
- Battin TJ (2000) Hydrodynamics is a major determinant of streambed biofilm activity: from the sediment to reach scale. *Limnol Oceanogr* 45:1308-1319
- Bauerfind S (1985) Degradation of phytoplankton detritus by bacteria : estimation of bacterial consumption and respiration in an oxygen chamber. *Mar Ecol Prog Ser* 21:27-36
- Bou C, Rouch R (1967) Un nouveau champ de recherches sur la faune aquatique souterraine. *CR Acad Sci Paris* 265:369-370
- BURGEAP (1995) Etude de la nappe de l’Est Lyonnais. Hydrogeological report, BURGEAP, Lyon, France, available from: <http://www.burgeap.fr>
- BURGEAP (2001) Etude hydrogéologique du secteur du bassin d’infiltration Django Reinhardt à Chassieu 69. Hydrogeological report Ly.765/A.7302. BURGEAP, Lyon, France, available from: <http://www.burgeap.fr>
- Cannavo P, Richaume A, Lafolie F (2004) Fate of nitrogen and carbon in the vadose zone: in situ and laboratory measurements of seasonal variations in aerobic respiratory and denitrifying activities. *Soil Biol Biochem* 36:463-478
- Chapelle FH (1993) *Groundwater microbiology and geochemistry*. John Wiley and Sons, New York

- Craft JA, Stanford JA, Pusch M (2002) Microbial respiration within a floodplain aquifer of a large gravel-bed river. *Freshwat Biol* 47:251-261
- Datry T (2003a) Urbanisation et qualité des nappes phréatiques: réponses des écosystèmes aquatiques souterrains aux pratiques d'infiltration d'eau pluviale. PhD thesis, University Lyon 1, Lyon, France
- Datry T, Malard F, Vitry L et al (2003b) Solute dynamics in the bed of a stormwater infiltration basin. *J Hydrol* 273:217-233
- Datry T, Malard F, Gibert J (2004) Dynamics of solutes and dissolved oxygen in shallow urban groundwater below a stormwater infiltration basin. *Sci Total Environ* 329:215-229
- Datry T, Malard F, Gibert J (2005) Response of invertebrate assemblages to increased groundwater recharge rates in a phreatic aquifer. *J N Am Benthol Soc* 24:461-477
- Ellis BK, Stanford JA, Ward JV (1998) Microbial assemblages and production in alluvial aquifers of the Flathead River, Montana, USA. *J N Am Benthol Soc* 17:382-402
- Findlay S, Strayer D, Goumbala C et al (1993) Metabolism of streamwater dissolved organic carbon in the shallow hyporheic zone. *Limnol Oceanogr* 38:1493-1499
- Fischer D, Charles EG, Baehr AL (2003) Effects of stormwater infiltration on quality of groundwater beneath retention and detention basins. *J Environ Eng* 129:464-471
- Foulquier A, Malard F, Barraud S et al (2009) Thermal influence of urban groundwater recharge from stormwater basins *Hydrological Processes* 23(12):1701-1713.
- Furutani A, Rudd JW, Kelly CA (1984) A method for measuring the response of sediment microbial communities to environmental perturbations. *Can J Microbiol* 30:1408-1414
- Giry G (1997) Mise en place d'un suivi qualitatif et quantitatif de la nappe de l'est lyonnais. MS Thesis, Ecole Supérieure de l'Energie et des Matériaux, Orléans, France
- Goldscheider N, Hunkeler D, Rossi P (2006) Review: microbial processes in pristine aquifers and an assessment of investigative methods. *Hydrogeol J* 14:926-941
- Goutaland D, Winiarski T, Dubé JS et al (2008) Hydrostratigraphic characterization of glaciofluvial deposits underlying an infiltration basin using ground penetrating radar. *Vadose Zone J* 7:194-207
- Holmes RM, Fisher SG, Grimm NB (1994) Parafluvial nitrogen dynamics in a desert stream ecosystem. *J N Am Benthol Soc* 13:468-478
- Howard KWF (1985) Denitrification in a major limestone aquifer. *J Hydrol* 76:265-280

- Jardine PM, Mayes MA, Mulholland PJ et al (2006) Vadose zone flow and transport of dissolved organic carbon at multiple scales in humid regimes. *Vadose Zone J* 5:140-152
- Kalbitz K, Solinger S, Park J-H et al (2000) Controls on the dynamics of dissolved organic matter in soils: a review. *Soil Science* 165:277-304
- Kalbitz K, Schmerwitz J, Schwesig D et al (2003) Biodegradation of soil-derived dissolved organic matter as related to its properties. *Geoderma* 113:273– 291
- Kaplan LA, Newbold JD (2000) Surface and subsurface dissolved organic carbon. In: Gibert J, Danielopol D, Stanford JA (eds), *Groundwater Ecology*. Academic Press, San Diego, pp 237-258
- Kaskassian S, Chastanet J, Côme J-M et al (2008) Transport de chaleur et température des nappes phréatiques à l'aplomb des bassins d'infiltration d'eau de ruissellement pluvial. Hydrogeological Report ANR-05-ECOT-006, BURGEAP, Lyon, France, available from <http://www.graie.org/ecopluiies/>
- Larmet H (2007) Mobilisation et transfert de Zn, Cd, Cu et des colloïdes bactériens dans les bassins d'infiltration d'eaux pluviales : influence des conditions hydrodynamiques. PhD Thesis, University Joseph Fourier, Grenoble, France.
- Le Coustumer S, Barraud S (2007) Long-term hydraulic and pollution retention performance of infiltration systems. *Water Sci Technol* 55:235-243
- Malard F, Hervant F (1999) Oxygen supply and the adaptations of animals in groundwater. *Freshwat Biol* 41:1-30
- Marmonier P, Fontvieille D, Gibert J et al (1995) Distribution of dissolved organic carbon and bacteria at the interface between the Rhône River and its alluvial aquifer. *J N Am Benthol Soc* 14:382-392
- Marschner B, Kalbitz K (2003) Controls of bioavailability and biodegradability of dissolved organic matter in soils. *Geoderma* 113:211 –235
- McMahon PB, Bohlke JK (1996) Denitrification and mixing in a stream-aquifer system: effects on nitrate loading to surface water. *J Hydrol* 186:105-128.
- McMahon PB, Chapelle FH (2008) Redox processes and water quality of selected principal aquifer systems. *Ground Water* 46:259-271
- Mermillod-Blondin F, Mauclaire L, Montuelle B (2005) Use of slow filtration columns to assess oxygen respiration, consumption of dissolved organic carbon, nitrogen

- transformations, and microbial parameters in hyporheic sediments. *Water Res* 39:1687-1698
- Michalzik B, Kalbitz K, Park JH et al (2001) Fluxes and concentrations of dissolved organic carbon and nitrogen - a synthesis for temperate forests. *Biogeochemistry* 52:173-205
- Neale CN, Hughes JB, Ward CH (2000) Impacts of unsaturated zone properties on oxygen transport and aquifer reaeration. *Ground Water* 38:789-794
- Neff JC, Asner GP (2001) Dissolved organic carbon in terrestrial ecosystems: synthesis and a model. *Ecosystems* 4:29-48
- Nogaro G, Mermillod-Blondin F, Montuelle B et al (2007) Influence of a stormwater sediment deposit on microbial and biogeochemical processes in infiltration porous media. *Sci Total Environ* 377:334-348
- Pabich WJ, Valiela I, Hemond HF (2001) Relationship between DOC concentration and vadose zone thickness and depth below the water table in groundwater of Cape Cod, U.S.A.. *Biogeochemistry* 55:247-268
- Pinay G, Ruffinoni C, Wondzell S et al (1998) Change in groundwater nitrate concentration in a large river floodplain: denitrification, uptake, or mixing? *J N Am Benthol Soc* 17:179-189
- Pusch M, Schwoerbel J (1994) Community respiration in hyporheic sediments of a mountain stream (Steina, Black Forest). *Archiv Hydrobiol* 130:33-52
- R Development Core Team (2006) R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing: Vienna. <http://www.R-project.org>
- Refsgaard JC, Christensen TH, Ammentorp HC (1991) A model for oxygen transport and consumption in the unsaturated zone. *J Hydrol* 129:349-369
- Roy SO, Packard TT, Berdalet E et al (1999) Impact of acetate, pyruvate, and physiological state on respiration and respiratory quotients in *Pseudomonas nautica*. *Aquat Microb Ecol* 17:105-110
- Rutherford JE, Hynes HBN (1987) Dissolved organic carbon in streams and groundwater. *Hydrobiologia* 154:33-48
- Siemens J, Haas M, Kaupenjohann M (2003) Dissolved organic matter induced denitrification in subsoils and aquifers? *Geoderma* 113:253-271
- Sobczak WV, Findlay S (2002) Variation in bioavailability of dissolved organic carbon among stream hyporheic flowpaths. *Ecology* 83:3194-3209

- Starr RC, Gillham RW (1993) Denitrification and organic carbon availability in two aquifers. *Ground Water* 31: 934-947
- Triska F, Duff JH, Avanzino R (1993) The role of water exchange between a stream channel and its hyporheic zone in nitrogen cycling at the terrestrial-aquatic interface. *Hydrobiologia* 251:167-184
- US EPA (1991) Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. Report EPA/600/4-90/27, Fourth edition, U.S. Environmental Protection Agency, Washington
- Wassenaar LI, Hendry MJ (2007) Dynamics and stable isotope composition of gaseous and dissolved oxygen. *Ground Water* 45:447-460.

### **3.2. THERMAL INFLUENCE OF URBAN GROUNDWATER RECHARGE FROM STORMWATER INFILTRATION BASINS. (ARTICLE 2)**

L'augmentation de la température des eaux souterraines sous les grandes agglomérations urbaines est un phénomène avéré dont l'ampleur est désormais de nature à modifier la diversité biologique, le fonctionnement biogéochimique et la qualité des eaux des aquifères couvrant les besoins en eau des populations (Karl *et al.* 1988, Allen *et al.* 2003, SDUD 2005, Taniguchi 2006). Les causes du réchauffement observé interviennent à différentes échelles spatiales : globale (réchauffement du climat), locale (l'îlot de chaleur urbain, Bornstein 1968), et ponctuelle (pertes de chaleur par les habitations, pompes à chaleur, ouvrages d'infiltration). Leur contribution relative au réchauffement observé est difficilement quantifiable mais la multiplication des sources ponctuelles de chaleur est telle que leurs effets ajoutés ne peuvent plus être négligés. Pourtant, très peu de données permettent aujourd'hui de documenter et comprendre l'impact thermique de sources ponctuelles telles que des immeubles (Ferguson & Woodbury 2004), des pompes à chaleur (Charguéron *et al.* 2007) ou des ouvrages d'infiltration (Foulquier *et al.* 2007).

Les pratiques d'infiltration d'eau de ruissellement pluvial qui consistent à infiltrer rapidement de grandes quantités d'eau sur de petites surfaces peuvent modifier, au moins localement, les caractéristiques thermiques des nappes urbaines car elles augmentent les transports de chaleur par advection vers les eaux souterraines. Les objectifs de ce second article sont : (1) de déterminer l'influence de la recharge artificielle en eau de ruissellement pluvial sur le régime thermique des eaux souterraines à de multiples profondeurs sous la surface libre des nappes phréatiques; (2) d'identifier les principaux facteurs contrôlant l'influence thermique des bassins d'infiltration aux échelles événementielle, annuelle et pluriannuelle. Les modifications



du régime thermique sont identifiées à partir de l'analyse corrélatrice des chroniques de données (précipitation, débit de ruissellement, température de l'air et des eaux de surface et souterraines, conductivité électrique des eaux de surface et souterraine) collectées sur 9 bassins d'infiltration et 6 sites de référence de l'agglomération lyonnaise.

La principale conséquence de l'infiltration des eaux de ruissellement est d'augmenter considérablement les variations de température de l'eau de nappe aux échelles événementielles et annuelles. A l'échelle de l'événement pluvieux, la variation de température dans la nappe à l'aplomb des bassins d'infiltration est fonction de l'interaction entre le volume infiltré et l'écart de température entre les eaux de ruissellement pluvial et les eaux souterraines. A volume constant, les infiltrations estivales et hivernales ont donc un effet plus marqué sur la température de la nappe que les pluies printanières et automnales. En général, l'augmentation ou la diminution de la température de la nappe liée à un événement pluvieux dépasse rarement 3°C. L'influence thermique d'un événement pluvieux dépend également des échanges de chaleur intervenant dans la zone non saturée entre l'eau infiltrée et les sédiments. Les eaux d'infiltration se réchauffent en hiver dans la zone non saturée et s'y refroidissent en été. L'effet de ces échanges de chaleur sur la température des eaux d'infiltration atteignant la nappe est d'autant plus prononcé que la quantité d'eau infiltrée augmente. Ce résultat est probablement lié à l'hétérogénéité des écoulements dans la zone non saturée (Goutaland *et al.* 2008a, 2008b). Les petits événements pluvieux sollicitent de manière répétée des chemins d'écoulements préférentiels à travers des sédiments qui maintiennent une forte teneur en eau au cours du temps. Les événements pluvieux plus conséquents et donc plus rares sollicitent une proportion plus importante du lit d'infiltration et des régions de la zone non saturée qui ont été peu affectées par les échanges de chaleur avec les eaux d'infiltration.

A l'échelle annuelle, l'infiltration artificielle d'eau de ruissellement pluvial augmente considérablement l'amplitude thermique de la nappe et réduit le déphasage entre les évolutions saisonnières des températures de l'air et de la nappe. À l'aplomb des bassins d'infiltration, l'amplitude thermique annuelle est en moyenne 9 fois supérieure à celle des sites de référence. Cette amplitude thermique affecte par simple effet de solubilité la dynamique saisonnière de l'oxygène dissous au toit de la nappe. Par ailleurs, les températures maximales observées (i.e.  $\geq 20^{\circ}\text{C}$ ) sur des périodes estivales supérieures à 2 mois sont de nature à affecter la survie des invertébrés souterrains. Sous les sites de référence affectés essentiellement par un transfert de chaleur par conduction, l'amplitude diminue de façon

exponentielle avec l'épaisseur de la zone non saturée. Sous les bassins d'infiltration où le transport de chaleur par advection est prédominant, l'amplitude thermique annuelle des eaux souterraines augmente de façon logarithmique avec la taille du bassin versant associé au bassin d'infiltration.

La variabilité interannuelle de la température moyenne des eaux souterraines sous les bassins d'infiltration dépend essentiellement de la distribution saisonnière des précipitations. Une dominance de pluies chaudes entraîne un réchauffement, alors qu'une dominance de pluies froides entraîne un refroidissement de la nappe. Ce résultat implique que l'effet de l'infiltration artificielle sur la température moyenne des eaux souterraines dépend du type de climat considéré. Cet effet sera celui d'un réchauffement local pour les régions présentant des précipitations plus importantes lors de la saison chaude (climat continental) et un refroidissement lorsque les précipitations ont lieu principalement lors de la saison froide (climat méditerranéen). L'augmentation de la température moyenne annuelle de la nappe à l'aplomb d'un bassin est toutefois modérée ( $< 0.4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Ce réchauffement local reste bien inférieur à celui engendré par les pompes à chaleur. À une échelle annuelle, le bassin d'infiltration de Django Reinhardt (site 1), associé à un bassin versant de 180 ha, infiltre des eaux de ruissellement pluvial arrivant avec un débit moyen avoisinant les  $60 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$  et une température moyenne de  $14.4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  (moyenne pondérée par les débits). Pour comparaison, il existe dans des zones densément peuplées de l'agglomération lyonnaise, pas moins d'une pompe à chaleur tous les 80 ha, avec un débit de  $50 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$  et une température de rejet supérieure à  $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$  (Horizons 2000).

Quelle que soit l'échelle temporelle considérée, les variations de température engendrées par l'infiltration d'eau de ruissellement pluvial s'atténuent considérablement avec la profondeur sous la surface libre de la nappe. De plus, ces variations thermiques s'atténuent fortement avec la distance à l'ouvrage d'infiltration. L'amplitude thermique annuelle des eaux de nappe est de  $6.7 \text{ }^{\circ}\text{C}$  à l'aplomb du bassin d'infiltration de Django Reinhardt (site 1) alors qu'elle n'est plus que de 4 et  $0.8 \text{ }^{\circ}\text{C}$  à des distances respectives de 60 et 130 m à l'aval hydraulique de cet ouvrage.

## Article 2

### **Thermal influence of urban groundwater recharge from stormwater infiltration basins**

A. FOULQUIER <sup>1</sup>, F. MALARD <sup>1</sup>, S. BARRAUD <sup>2</sup> & J. GIBERT <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Université de Lyon, Lyon, F-69622, France ; Université Lyon 1, Lyon, F-69622, France ; CNRS, UMR 5023, Ecologie des Hydrosystèmes Fluviaux, Villeurbanne, F-69622, France.

<sup>2</sup> Université de Lyon, Université Lyon 1, Lyon, F-69622, France ; INSA de Lyon, LGCIE, Villeurbanne, F-69621, France.



## **ABSTRACT**

Groundwater warming below cities has become a major environmental issue; but the effect of distinct local anthropogenic sources of heat on urban groundwater temperature distributions is still poorly documented. Our study addressed the local effect of stormwater infiltration on the thermal regime of urban groundwater by examining differences in water temperature beneath stormwater infiltration basins (SIB) and reference sites fed exclusively by direct infiltration of rainwater at the land surface. Stormwater infiltration dramatically increased the thermal amplitude of groundwater at event and season scales. Temperature variation at the scale of rainfall events reached 3°C and was controlled by the interaction between runoff amount and difference in temperature between stormwater and groundwater. The annual amplitude of groundwater temperature was on average 9 times higher below SIB (range: 0.9 – 8.6 °C) than at reference sites (range: 0 – 1.2 °C) and increased with catchment area of SIB. Elevated summer temperature of infiltrating stormwater (up to 21°C) decreased oxygen solubility and stimulated microbial respiration in the soil and vadose zone, thereby lowering dissolved oxygen concentration in groundwater. The net effect of infiltration on average groundwater temperature depended upon the seasonal distribution of rainfall: groundwater below large SIB warmed up (+ 0.4 °C) when rainfall occurred predominantly during warm seasons. The thermal effect of stormwater infiltration strongly attenuated with increasing depth below the groundwater table indicating advective heat transport was restricted to the uppermost layers of groundwater. Moreover, excessive groundwater temperature variation at event and season scales can be attenuated by reducing the size of catchment areas drained by SIB and by promoting source control drainage systems.

## **KEY WORDS**

urban groundwater, stormwater infiltration,  
groundwater temperature, dissolved oxygen.

## INTRODUCTION

Half of the world's population lives in cities and this number is predicted to reach 60% in 2030 (United Nations, 2007). This proportion is even higher in European countries where 80% of the population lives in the cities (EEA, 2006). Many cities are groundwater dependent and it is estimated that 2 billion people in the world rely on groundwater for drinking water (Morris *et al.*, 2003). Any increase in urban groundwater temperature is a critical issue because temperature is a key variable affecting most physico-chemical and biological processes including groundwater flow, gas solubility, and microbial activity (Chapelle, 1993; Jones and Mulholland, 2000; Anderson, 2005). Groundwater temperature below major cities was found to be 2 to 3 °C higher and typically more heterogeneous over space and time than in surrounding areas (Allen *et al.*, 2003; Ferguson and Woodbury, 2004; SDUD, 2005; Taniguchi, 2006). Groundwater warming in urban environments was attributed to the increase in air temperature within cities (i.e. the urban heat island effect, Bornstein, 1968; Karl *et al.*, 1988) but also to multiple local sources of heat including heat loss from buildings (Ferguson and Woodbury, 2004), increase in soil temperature as a result of pavement (Dorava *et al.*, 2003; Thompson *et al.*, 2007), and heat transfer due to groundwater heat pumps used for air conditioning (SDUD, 2005).

Stormwater infiltration practices, which consist of infiltrating rapidly large quantities of runoff water into localized areas, potentially contribute to the warming of urban groundwater by increasing advective heat transfer in the subsurface. Urban stormwater infiltration into the ground is increasingly used as an alternative to traditional stormwater network for many reasons. It is recognized to limit peak flows and volumes, reducing hydraulic and flooding impact. It is supposed to improve the quality of water courses by limiting pipe discharge (Pitt *et al.*, 1999). Moreover, it can compensate for reduced groundwater recharge caused by the sealing of urban surfaces, replenish urban groundwater with dissolved oxygen, and promote the retention and degradation of contaminants in the soil and vadose zone (Fergusson, 1994; Pitt *et al.*, 1999; Fischer *et al.*, 2003). Although much research effort has been devoted to subsurface transport of stormwater contaminants including heavy metals, organic compounds and nutrients (Pitt *et al.*, 1996; Mason *et al.*, 1999; Dechesne *et al.*, 2004a), very few studies have examined the influence of stormwater infiltration systems on the thermal regime of groundwater (Foulquier *et al.*, 2007). Advective heat transfer during stormwater infiltration expectedly increases groundwater annual temperature amplitude and decreases phase

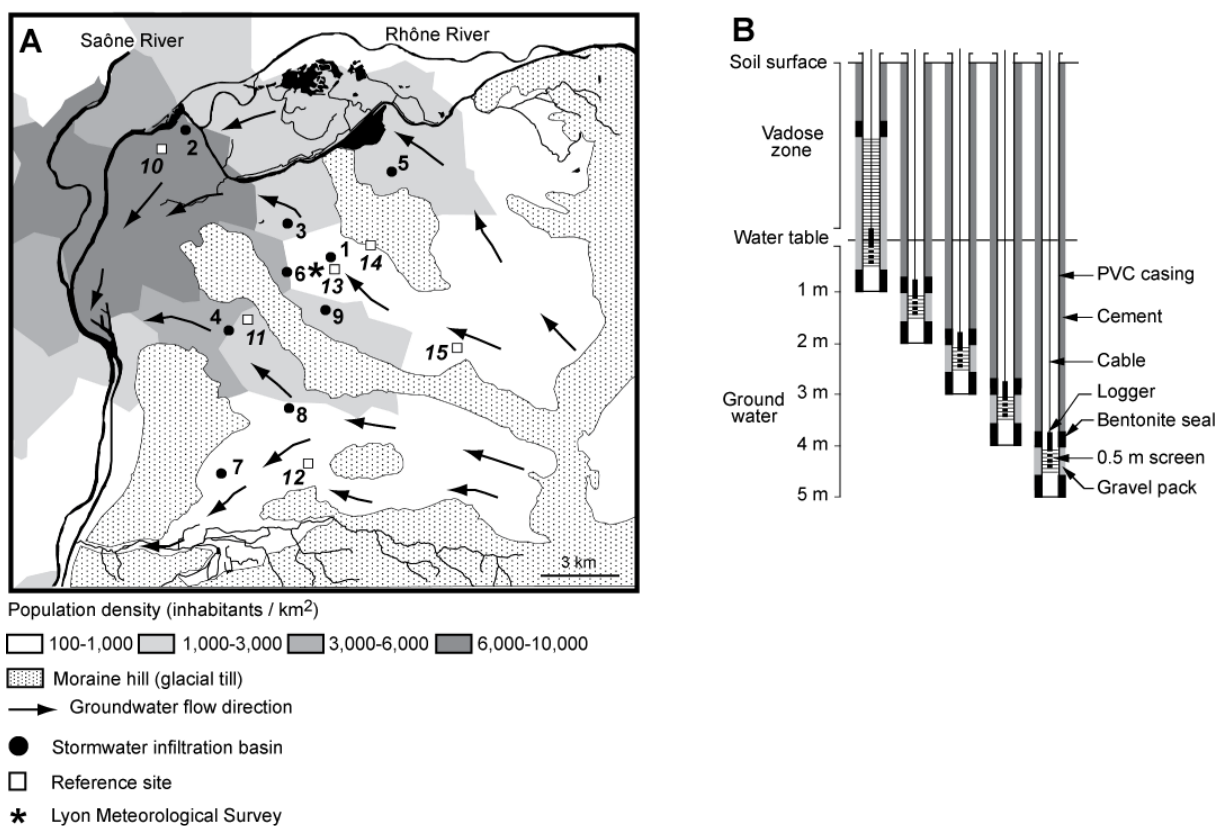
difference between the ambient air and groundwater temperature (Blasch *et al.*, 2004; Stonestrom and Constantz, 2003). However, the net effect on average groundwater temperature is hard to predict because it depends on the rainfall distribution between the cold and warm seasons. Increased variation in subsurface temperature below stormwater infiltration basins (SIB) may also affect the rate of biogeochemical processes, thereby altering the dynamics of solutes and gases in groundwater. Datry *et al.* (2004) showed that the temporal dynamics of dissolved oxygen in groundwater below SIB may be controlled, in part, by temperature-driven changes in microbial respiration rate within the soil and vadose zone.

The aim of this study was to examine the influence of stormwater infiltration on the thermal regime of groundwater at multiple depths below the water-table of an urban phreatic aquifer using time series of groundwater temperature beneath SIB and reference sites fed exclusively by direct infiltration of rainwater at the land surface. More specifically, our objectives are to determine (1): the increase in temperature annual amplitude and reduction in seasonal lag between air and groundwater temperature below SIB with contrasting catchment areas, (2) the link between the seasonal distribution of rainfall and the yearly moving average temperature of groundwater at recharge sites, and (3) the relationship between stormwater temperature and dissolved oxygen consumption during infiltration. Finally, we discuss how stormwater infiltration practices may contribute to the warming of urban groundwater.

## **MATERIAL AND METHODS**

### *Study sites*

Study sites were located in the Lyon metropolitan area, France, which comprised 1.2 million inhabitants (Fig. 1A). The glaciofluvial aquifer (surface area: 200 km<sup>2</sup>) consisted of 3 corridors separated by moraine hills of low hydraulic conductivity (10<sup>-5</sup>-10<sup>-8</sup> m/s) (BURGEAP, 2001; Datry, 2003). Aquifer corridors consisted of highly permeable glaciofluvial sediments (hydraulic conductivity: 10<sup>-3</sup>-10<sup>-2</sup> m/s) and were drained by the Rhône River. Groundwater temperature increased westward from 13.1 to 16 °C with increasing population density, although spatial distribution of temperature was extremely patchy in response to multiple anthropogenic sources of heat, particularly heat pumps (Horizons, 2000; Malard *et al.*, unpublished data).



**Figure 1:** A. Locations of recharge sites (stormwater infiltration basins) and reference sites. B. Cross sectional illustration of well clusters at recharge site 1.

Fifteen sites were selected (Fig. 1A). Nine recharge sites were in groundwater areas artificially recharged by stormwater infiltration systems, and 6 reference sites in groundwater areas fed exclusively by direct infiltration of rain water from the land surface. Artificial groundwater recharge with stormwater represented at least 10 % of the annual flux of groundwater within the glaciofluvial aquifer of the Lyon metropolitan area (Datry, 2003; Giry, 1997). Stormwater infiltration systems consisted of a retention and an infiltration basins that collected stormwater from residential, commercial and/or industrial areas. Catchment areas of SIB and vadose zone thickness (VZT) ranged from 2.5 to 210 ha and 5 to 20 m, respectively (Table 1). All sites were equipped with a monitoring well with a perforated casing intersecting the groundwater-table region of the aquifer. At recharge sites, monitoring wells were installed in the banks of SIB to intersect the groundwater zone artificially recharged with stormwater.



Table 1: Characteristics of recharge (below stormwater infiltration basins) and reference sites.

Site	Type	Measurement period	Vadose zone thickness (m)	Catchment area (ha)	Coefficient of imperviousness
1	Recharge	01/01/2003 to 31/08/2006	20	180	0.7
2	Recharge	24/10/2001 to 31/08/2002	5	2.5	0.7
3	Recharge	11/02/2005 to 14/02/2006	15	51	0.5
4	Recharge	11/02/2005 to 14/02/2006	7.8	20	0.8
5	Recharge	27/02/2005 to 25/09/2005	13.5	45	0.36
6	Recharge	27/02/2005 to 25/09/2005	13.9	2.7	0.95
7	Recharge	15/06/2005 to 08/02/2006	8	100	0.5
8	Recharge	11/02/2005 to 14/02/2006	10.6	210	0.45
9	Recharge	15/06/2005 to 08/02/2006	7.9	145	0.55
10	Reference	24/10/2001 to 31/08/2002	5	-	-
11	Reference	15/06/2004 to 08/02/2005	6.2	-	-
12	Reference	11/02/2005 to 14/02/2006	9.9	-	-
13	Reference	01/01/2003 to 31/08/2006	19	-	-
14	Reference	27/02/2005 to 25/09/2005	20	-	-
15	Reference	27/02/2005 to 25/09/2005	19.6	-	-

Recharge site 1 was equipped with a cluster of 5 wells implemented to determine changes in specific conductance (electrical conductivity) and groundwater temperature with depth below the water table. Wells were drilled with the down-the-hole hammer technique and were separated from each other by a distance of about 2 m (Fig. 1B). The well casings were screened at their lower end over a height of only 0.5 m (slot size: 2 mm) and were successively installed at depths of 1, 2, 3, 4 and 5 m below the groundwater table. An artificial gravel pack made of siliceous gravel (5/6 mm) was positioned in front of the screen and was isolated by a lower and upper impermeable seal of Bentonite. In order to prevent any vertical flow of stormwater along the well casing, a 35-mm thick annulus between the well casing and the temporary drilling pipe was filled with cement from the top of the upper seal to the soil surface.

### *Field measurements and data collection*

#### Rainfall and discharge, specific conductance and temperature of stormwater

Rainfall and air temperature data (1-h intervals) for each site were obtained from the nearest station of the Meteorological Survey of the city of Lyon. At site 1, discharge, specific

conductance and temperature of stormwater were continuously measured (2-min intervals) at the inlet of the retention and infiltration basins. Stormwater discharge was measured directly in the two inlet pipes by means of four flowmeters, each one being composed of two water depth sensors and two flow velocity meters. Specific conductance and temperature were measured by means of sensors which were placed in a transit tank fed with stormwater continuously pumped from the inlet pipes. Detailed information on the characteristics of the monitoring system is reported in Barraud *et al.* (2002) and Bertrand-Krajewski *et al.* (2008). Since cross correlation analyses required time series with no missing values, gaps in the time series of stormwater discharge due either to technical troubles or maintenance activity were filled using a simulation model applied to rainfall series measured nearby the site. For the catchment simulation, a linear reservoir model was used with the following equation:

$$Q_{in}(t) = Q_{in}(t-dt) \exp^{-dt/K} + C_r * S_c * i(t) * (1 - \exp^{-dt/K}) \quad (1)$$

Where:

$Q_{in}(t)$ : discharge at the inlet of the retention basin at time  $t$

$K$ : catchment lag-time

$C_r$ : runoff coefficient (i.e. ratio of runoff to precipitation).

$S_c$ : catchment area

$i(t)$ : rainfall intensity

$dt$ : time step

The retention basin simulation was done according to the “flows method” described in Dechesne *et al.* (2004b) and based on three simultaneous equations:

$$\text{a continuity equation: } dV(t)/dt = Q_{in}(t) - Q_{out}(t) \quad (2a)$$

$$\text{a storage equation: } V(t) = f(h(t)) \quad (2b)$$

$$\text{an outflow equation: } Q_{out}(t) = g(h(t)) \quad (2c)$$

Where

$Q_{out}(t)$ : discharge at the outlet of the retention basin (i.e. inlet of the infiltration basin) depending on  $h(t)$  and on the flow control device used

$h(t)$ : water depth in the retention basin

$V(t)$ : volume stored in the basin at time  $t$  calculated from basin topography

$f, g$ : function depending on  $h(t)$

Temperature of stormwater runoff was found to be well correlated to several variables including rainfall temperature and air temperature and solar radiation prior to the storm (Herb *et al.*, 2008). In the present study, the following relationship (equation 3) between air and stormwater temperature was used to fill the gaps in the time series of stormwater temperature at the inlet of the SIB.

$$T_s(t) = 7.5 + 0.56 \times T_A(t-1) \quad (3)$$

( $r^2 = 0.82$ ;  $n=1145$  hourly observations)

Where:

$T_s(t)$  is stormwater temperature at time  $t$

$T_A(t-1)$  was air temperature at time  $t-1$

#### Specific conductance, temperature and dissolved oxygen in groundwater

Specific conductance and temperature were recorded in wells using YSI 600 XLM multi-parameter loggers (Yellow Spring Instrument Co., Yellow Springs, Ohio, USA) which were placed at a depth of 1 m below the groundwater table (except at site 1, see Fig. 1B). At recharge site 1 and nearby reference site 13, multi-parameters loggers were equipped with dissolved oxygen (DO) probes. Record period varied from 8 months to more than 3 years (Table 1). Specific conductance is considered as a good tracer of water exchange between surface and groundwater (Cox *et al.*, 2007) and was used as a tracer to detect inputs of stormwater into groundwater because specific conductance of stormwater (ca.  $122 \pm 49 \mu\text{S}/\text{cm}$ ) was much lower than that of groundwater ( $> 500 \mu\text{S}/\text{cm}$ ). Based on manufacturer information, the accuracy and resolution of the probes were  $\pm 2\%$  and  $1 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  for specific conductance (4 electrode cell),  $\pm 0.15^\circ\text{C}$  and  $0.01^\circ\text{C}$  for temperature (Thermistor) and  $\pm 2\%$  and  $0.01\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  for DO (polarographic Clark type), respectively. Parameters were measured at 1 h intervals and the loggers were transported to the laboratory every 15 to 21 days for data transfer, data examination, probe maintenance and calibration. Data were downloaded onto a computer and each series was checked for inconsistencies (i.e. drift, erroneous values). Loggers were placed in a water bath to test for differences between readings provided by the individual loggers and those provided by calibrated portable meters. Then, specific conductance and dissolved oxygen were calibrated and differences between measurements

from the individual loggers were tested before deploying the loggers into the wells. On several occasions, we checked that measurements provided by the loggers were similar to those made on groundwater samples collected from the wells.

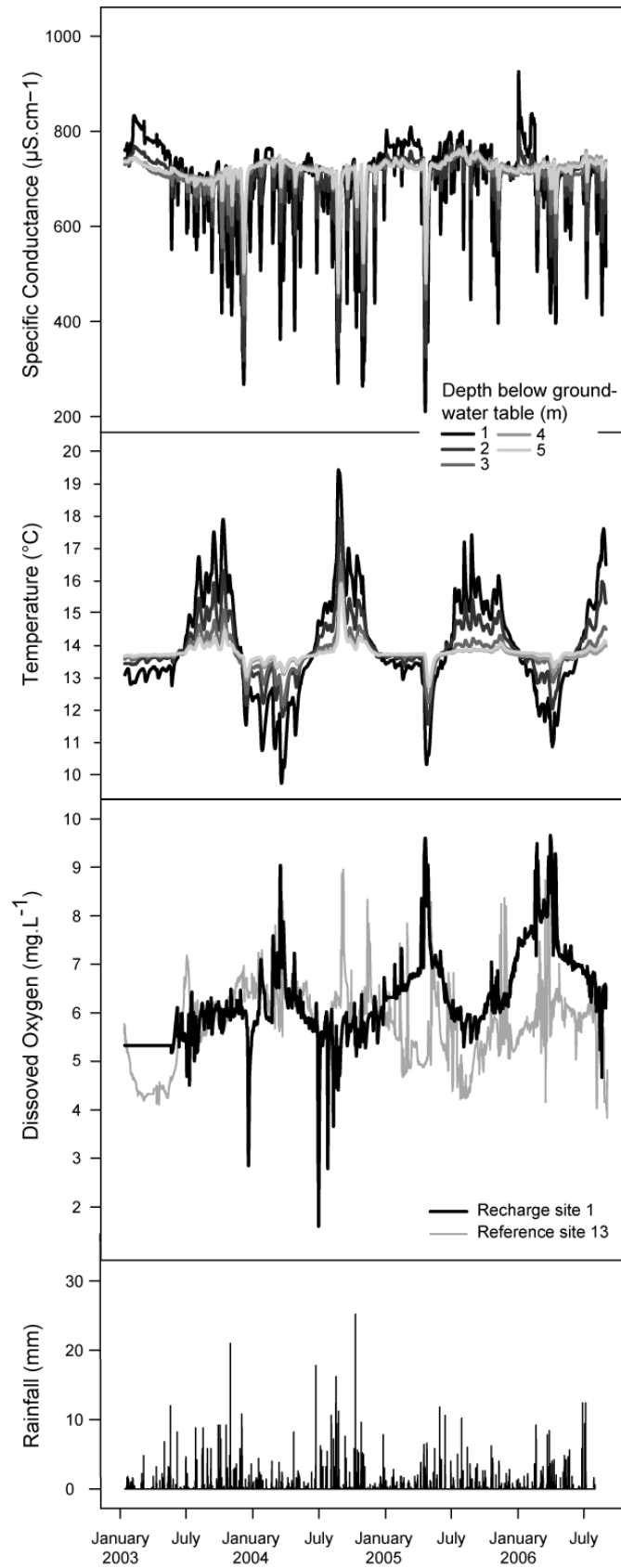


Figure 2: Time series (1-h intervals) of specific conductance, temperature, dissolved oxygen, and rainfall at recharge site 1.

### *Data analysis*

#### Variation in specific conductance and temperature of groundwater

We examined the relationship between decrease in specific conductance of groundwater induced by a rainfall event and the amount of rain caught by the watershed (runoff amount (m<sup>3</sup>) = total rainfall depth (mm) × catchment area (ha) × 10). Decrease in specific conductance ( $\Delta_{SPevent}$ ) was calculated as the highest difference between specific conductance of pre- and post-event groundwater. Similarly, groundwater temperature variation caused by rainfall events ( $\Delta_{Tevent}$ ) was measured as the highest difference between pre- and post-event groundwater temperatures. A linear model was used to examine the relationship between  $\Delta_{Tevent}$  at site 1 and runoff amount, difference in temperature between stormwater and groundwater, and their interaction. The difference in temperature between stormwater and groundwater was calculated using 4380-h moving average series. Temperature annual amplitude of groundwater ( $\Delta_{Tannual}$ ) was plotted against vadose zone thickness, depth below groundwater table and effective catchment area of SIB. Annual amplitude of groundwater temperature was calculated using monthly average temperatures as:  $\Delta_{Tannual} = T_{max} - T_{min}$ . The effective catchment area was obtained by multiplying the catchment area by the runoff coefficient.

#### Lag times between surface and groundwater series

Cross-correlation analyses (Box and Jenkins, 1976) between time series of rainfall (or stormwater discharge at site 1) and specific conductance of groundwater, and rainfall and groundwater temperature were used to evaluate stormwater flow through the vadose zone to groundwater during rainfall events and associated heat transfer. Time series of stormwater discharge at site 1 (2-min intervals) were transformed into a time interval of 1 hr for comparison with time series of groundwater parameters. Cross-correlograms displayed values of the cross-correlation coefficient ( $\rho_{XY}$ ) between two time series (X, Y) shifted by a particular number of hourly observations (k=lag). The cross-correlation coefficient was defined as follows (Box and Jenkins, 1976):

$$\rho_{XY}(k) = \gamma_{XY}(k) / \sigma_X \sigma_Y \quad (4)$$

Where:

$\gamma_{XY}(k)$ : covariance coefficient between X and Y shifted by k hours

$\sigma_X, \sigma_Y$ : X and Y standard-deviation, respectively

A confidence interval (0.95) was computed for each correlogram. The seasonal component of groundwater temperature was removed by subtracting the 4380-h moving average series to the original time series. Then, cross-correlation was performed on absolute values of the filtered time series. Lag times corresponding to the first highest absolute values of the cross-correlation coefficient between rainfall and specific conductance ( $Lag_{SPevent}$ ) and rainfall and groundwater temperature ( $Lag_{Tevent}$ ) were used as indicators of the travel time of stormwater and associated heat in the vadose zone and groundwater. Cross-correlation analyses performed on data from site 1 showed that the use of rainfall instead of stormwater discharge as an input time series did not affect the values of  $Lag_{SPevent}$  and  $Lag_{Tevent}$ . The lag time between seasonal patterns of air and groundwater temperatures ( $Lag_{Tannual}$ ) was determined by cross-correlation analysis between 4380-h moving average series of air and groundwater temperatures. We examined changes in  $Lag_{SPevent}$ ,  $Lag_{Tevent}$  and  $Lag_{Tannual}$  with increasing vadose zone thickness, depth below groundwater table, and effective catchment area of SIB.

#### Stormwater temperature change and dissolved oxygen consumption in the vadose zone

A two-end member mixing model based on recorded values of specific conductance was used to determine: (i) the proportion of stormwater inflow at a depth of 1 m below the groundwater table at site 1, and (ii) changes in temperature of infiltrating stormwater in the vadose zone ( $\Delta_{TVz}$ ). The following formula established for multiple samples of stormwater and groundwater ( $n = 163$ ) collected at site 1 was used to calculate chloride concentration from specific conductance:

$$[Cl] = 2 \times e^{0.0036 \times \text{specific conductance}} \quad (5)$$

Chloride is usually considered as a better conservative tracer (Gooseff and McGlynn, 2005) than specific conductance (but see Datry *et al.*, 2003, 2004 for a comparison of the conservative behaviour of these two parameters in highly permeable sediments below SIB). Water sampled at a depth of 1 m below the groundwater table during rainfall events was assumed to be a mix of pre-event groundwater and inflow stormwater infiltrating through the vadose zone. The relative proportion of inflow stormwater at a depth of 1 m below the groundwater table was calculated using the following formula:

$$f_i = (C_1 - C_2)/(C_i - C_2) \quad (6)$$

where  $f_i$  was the proportion of inflow stormwater and  $C_1$ ,  $C_2$  and  $C_i$  represented the chloride concentrations of post-event groundwater, pre-event groundwater, and inflow stormwater, respectively. The temperature of stormwater reaching the groundwater table was then calculated using the following formula (simple mixing of water source):

$$T_i = [T_1 - T_2 \times (1 - f_i)] / f_i \quad (7)$$

where  $f_i$  was the proportion of inflow stormwater and  $T_1$ ,  $T_2$  and  $T_i$  represented the temperature of post-event groundwater, pre-event groundwater, and inflow stormwater, respectively. The variation in temperature of infiltrating stormwater in the vadose zone was calculated using the following formula:

$$\Delta_{TVZ} = T_i - T_s \quad (8)$$

where  $\Delta_{TVZ}$  was the variation in temperature of infiltrating stormwater in the vadose zone and  $T_i$  and  $T_s$  was the temperature of stormwater reaching the groundwater table and that of stormwater in the SIB, respectively.

We examined the relationship between  $\Delta_{TVZ}$  and runoff amount, the difference in temperature between stormwater and groundwater, and their interaction. The mixing model was also used to calculate the consumption of dissolved oxygen (DO) in the vadose zone at site 1. DO consumption ( $\Delta_{DOVZ}$ ) was defined as the difference in DO concentrations between stormwater in the SIB and inflow stormwater reaching the groundwater table. DO measurements made during rainfall events showed that stormwater in the SIB was saturated with oxygen.

#### Between-year variability in groundwater temperature

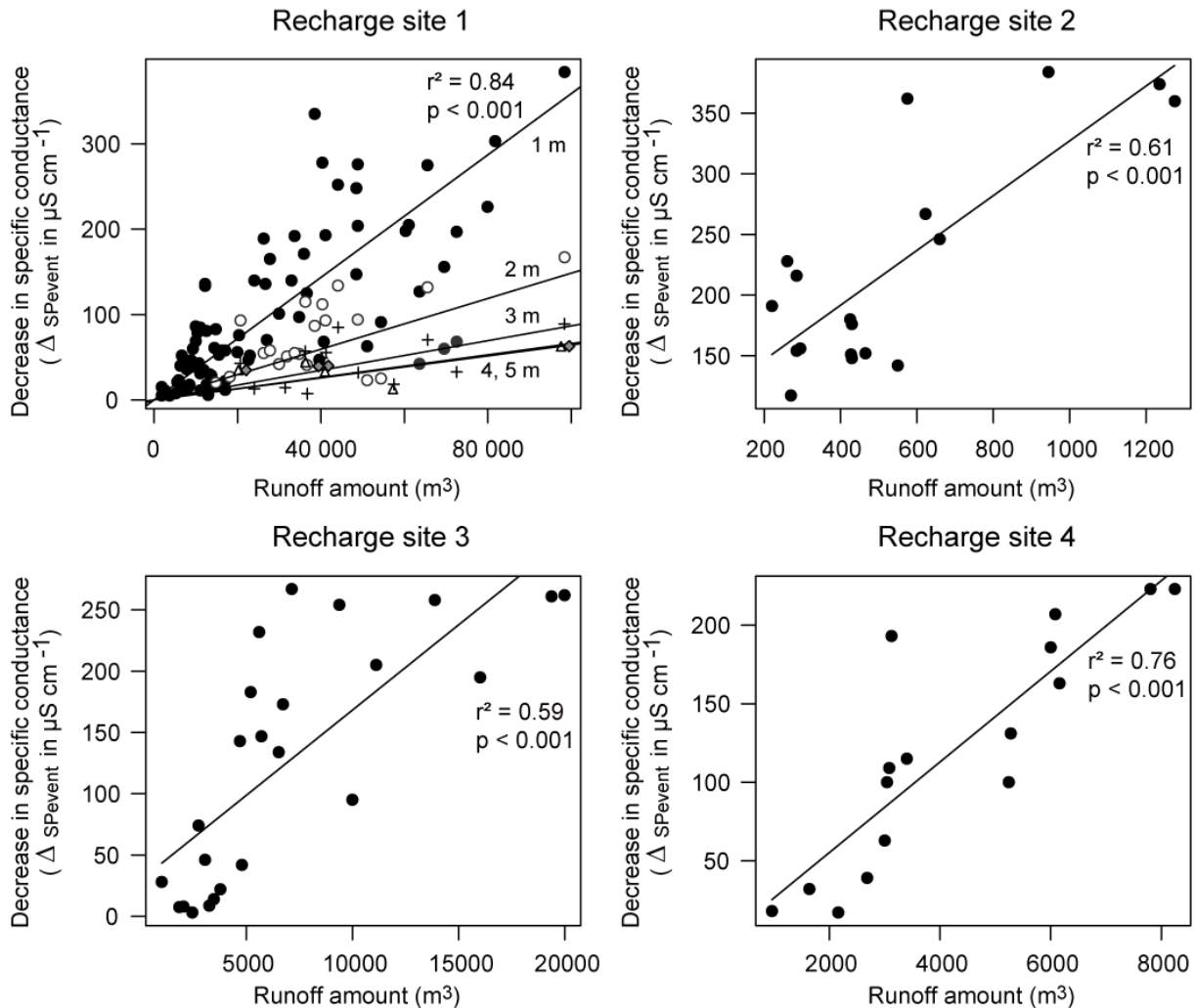
We distinguished between the amounts of rainfall during the warm and cold seasons and examined the influence of their relative contribution on between-year variability in groundwater temperature at site 1. Warm and cold seasons corresponded respectively to months with higher and lower mean air temperature than the annual air temperature. Between-year variability in groundwater temperature was assessed using time series of yearly moving average temperature at multiple depths below the water table. Cross-correlation analyses,



regression models and statistical tests were done in R (R Development Core team, 2006). Significance for all statistical tests was accepted at  $p < 0.05$ .

## RESULTS

### *Variation in specific conductance of groundwater during rainfall events*



**Figure 3:** Relationships between the decrease in specific conductance of groundwater induced by rainfall events and the amount of runoff in the catchment of stormwater infiltration basins at four recharge sites. Relationships were expressed for depths of 1, 2, 3, 4 and 5 m below the groundwater table at recharge site 1.

Stormwater inputs into groundwater during rainfall events caused repeated and sharp specific conductance decreases at most recharge sites (Fig. 2 and Appendix 1). In contrast, specific conductance at reference sites was typically  $> 600 \mu\text{S/cm}$  and varied little over time (Appendix 1).  $\Delta s_{\text{Pevent}}$  increased linearly with increasing amount of rain in the catchment (Fig. 3). The slope of the relationship decreased with increasing depth below the water table at site 1, indicating that stormwater flow occurred mainly in the upper layers of groundwater (Fig. 3).  $\text{Lag}_{\text{SPevent}}$  varied from 23 to 67 h among recharge sites and was positively correlated with vadose zone thickness ( $\text{Lag}_{\text{SPevent}}$  (in h) =  $2.68 \text{ VZT (in m)} + 10.8$ ,  $n=7$  sites,  $r^2=0.87$ ,  $p$

<0.01) (Table 2). Lag<sub>SPevent</sub> increased logarithmically with increasing depth below the water table at site 1 ( $\text{Lag}_{\text{SPevent}} \text{ (in h)} = 41 \text{ Ln}(\text{depth in m}) + 70$ ,  $n=5$  depths,  $r^2=0.98$ ,  $p < 0.01$ ).

**Table 2:** Thermal characteristics of groundwater and lag times between surface and groundwater time series at recharge and reference sites.

Site	Type	Mean temperature ± SD (°C) <sup>(1)</sup>	Lag <sub>SPevent</sub> (h) <sup>(2)</sup>	Lag <sub>Tevent</sub> (h) <sup>(3)</sup>	Δ T <sub>annual</sub> (°C) <sup>(4)</sup>	Lag <sub>Tannual</sub> (h) <sup>(5)</sup>
1 (depth: 1 m)	Recharge	14.05 ± 1.63	67	163	6.19	1266
1 (depth: 2 m)	Recharge	13.98 ± 0.91	101	264	3.40	1235
1 (depth: 3 m)	Recharge	13.78 ± 0.53	119	311	2.15	1309
1 (depth: 4 m)	Recharge	13.77 ± 0.33	128	314	1.29	1348
1 (depth: 5 m)	Recharge	13.78 ± 0.31	131	326	1.22	1417
2	Recharge	14.76 ± 2.94	23	33	8.63	1272
3	Recharge	14.40 ± 1.59	51	337	4.92	2166
4	Recharge	14.44 ± 0.91	41	93	2.83	1363
5	Recharge	14.44 ± 1.75	49	n.s.	4.73	2628
6	Recharge	15.12 ± 0.34	41	n.s.	0.89	2057
7	Recharge	14.84 ± 1.86	27	n.s.	5.52	1832
8	Recharge	12.39 ± 2.16	n.s.	n.s.	5.74	4819
9	Recharge	12.97 ± 1.34	n.s.	n.s.	3.61	3121
10	Reference	15.39 ± 0.49	-	-	1.23	3778
11	Reference	13.97 ± 0.39	-	-	0.97	4271
12	Reference	13.43 ± 0.03	-	-	0.50	1062
13	Reference	14.54 ± 0.11	-	-	0.38	16151
14	Reference	13.15 ± 0.01	-	-	0.03	19084
15	Reference	13.19 ± 0.01	-	-	0.04	18541
Air	Air	12.94 ± 9.04			24.34	

<sup>(1)</sup> SD: standard deviation

<sup>(2)</sup> Lag<sub>SPevent</sub> : lag time between rainfall and specific conductance

<sup>(3)</sup> Lag<sub>Tevent</sub> : lag time between rainfall and groundwater temperature

<sup>(4)</sup> ΔT<sub>annual</sub> : temperature annual amplitude

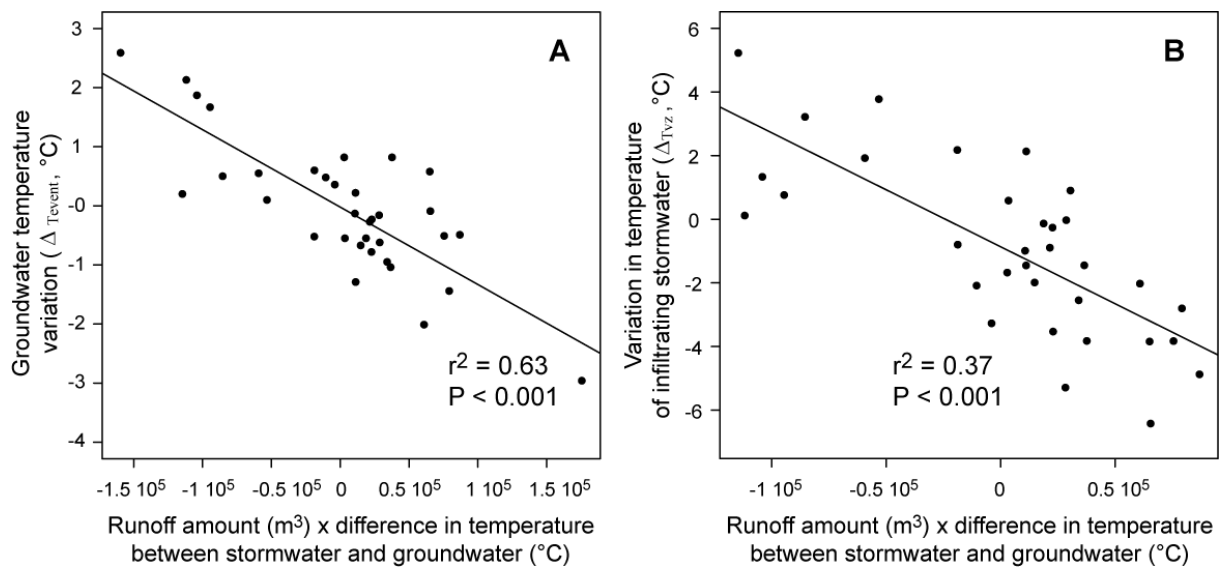
<sup>(5)</sup> Lag<sub>Tannual</sub> : lag time between air and groundwater temperature

n.s. : not significant

### *Variation in groundwater temperature during rainfall events*

Short-term variations in groundwater temperature induced by rainfall events ( $\Delta T_{\text{event}}$ ) were observed below recharge sites 1, 2, 3, and 4 (Fig. 2 and appendix 1). Lag<sub>Tevent</sub> varied from 33 to 337 h among these 4 recharge sites and the ratio of Lag<sub>Tevent</sub> to Lag<sub>SPevent</sub> averaged  $3.2 \pm 2.3$  (Table 2). At site 1,  $\Delta T_{\text{event}}$  at a depth of 1 m below the water table varied from -3 to 2.8 °C.

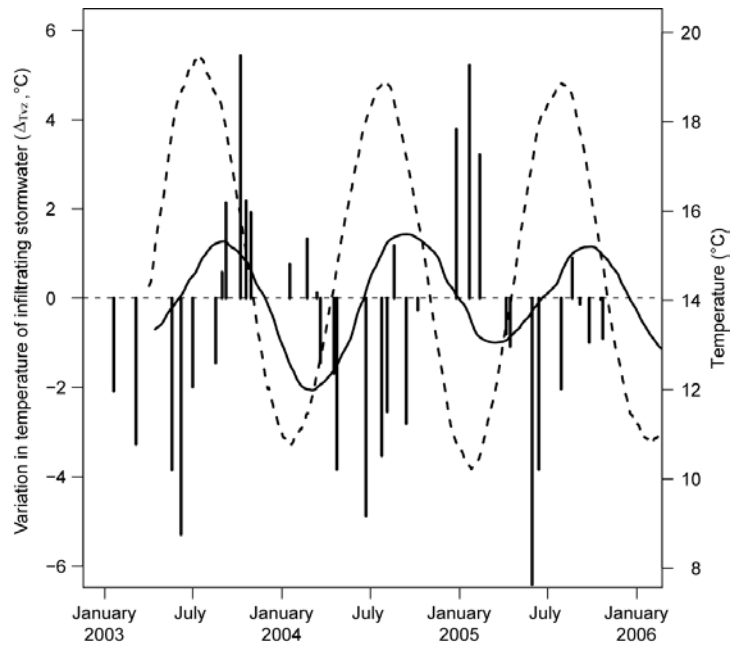
$\Delta_{T_{event}}$  was not significantly correlated with either runoff amount or to difference between stormwater and groundwater temperatures alone, but it was linearly related to the interaction between these two variables (Fig. 4A). The thermal influence of stormwater infiltration on groundwater increased with increasing runoff amount when the difference between stormwater and groundwater temperatures was kept constant. Lag  $T_{event}$  between rainfall and temperature increased logarithmically with increasing depth below the water table at site 1 (Lag  $T_{event}$  (in h) = 102 Ln (depth in m) + 178, n=5 depths,  $r^2=0.93$ ,  $p < 0.01$ ) (Table 2).



**Figure 4:** Effect of the interaction between runoff amount and difference in temperature between stormwater and groundwater on A. temperature variation of groundwater during rainfall events; B. temperature variation of infiltrating stormwater in the vadose zone.

#### *Stormwater temperature variation in the vadose zone during rainfall events*

The difference between the temperature of stormwater reaching the groundwater table and that of stormwater in the SIB ( $\Delta_{TVz}$ ) exhibited a clear seasonal pattern: it was positive from September to February and negative from March to August (Fig. 5). Warming or cooling in the vadose zone could result in a temperature change of infiltrating stormwater of about 6°C.  $\Delta_{TVz}$  was not significantly correlated either with runoff amount or with the difference between stormwater and groundwater temperatures alone, but it was linearly related to the interaction between these two variables (Fig. 4B). For a constant difference in temperature between stormwater and groundwater before infiltration, warming or cooling of stormwater in the vadose zone was all the more pronounced than runoff amount was high.



**Figure 5:** Seasonal pattern in temperature variation of infiltrating stormwater in the vadose zone as calculated by the two-end member mixing model for 35 rainfall events (vertical bar, left axis). Broken and continuous curves are 4380-h moving average time series of stormwater and groundwater temperatures, respectively (right axis).

#### *Seasonal variation of groundwater temperature*

Temperature annual amplitude of groundwater ( $\Delta_{\text{Tannual}}$ ) was on average 9 times higher at recharge than at reference sites and lag time between seasonal patterns of air and groundwater temperatures ( $\text{Lag}_{\text{Tannual}}$ ) 4 times lower (Table 2).  $\Delta_{\text{Tannual}}$  decreased exponentially and  $\text{Lag}_{\text{Tannual}}$  increased with VZT at reference sites (Fig. 6A).  $\Delta_{\text{Tannual}}$  and  $\text{Lag}_{\text{Tannual}}$  were not statistically related to VZT at recharge sites. Instead,  $\Delta_{\text{Tannual}}$  increased logarithmically with increasing effective catchment area of SIB (Fig. 6B).  $\Delta_{\text{Tannual}}$  decreased exponentially and  $\text{Lag}_{\text{Tannual}}$  increased linearly with increasing depth below the groundwater table at recharge site 1 ( $\Delta_{\text{Tannual}} = -0.34 + 9.53 e^{-0.4233 \times \text{depth}}$ ,  $r^2=0.97$ ,  $p=0.0016$ ;  $\text{Lag}_{\text{Tannual}} = 1190 + 41.5 \text{ depth}$ ,  $r^2=0.85$ ,  $p=0.027$ ) (Table 2).

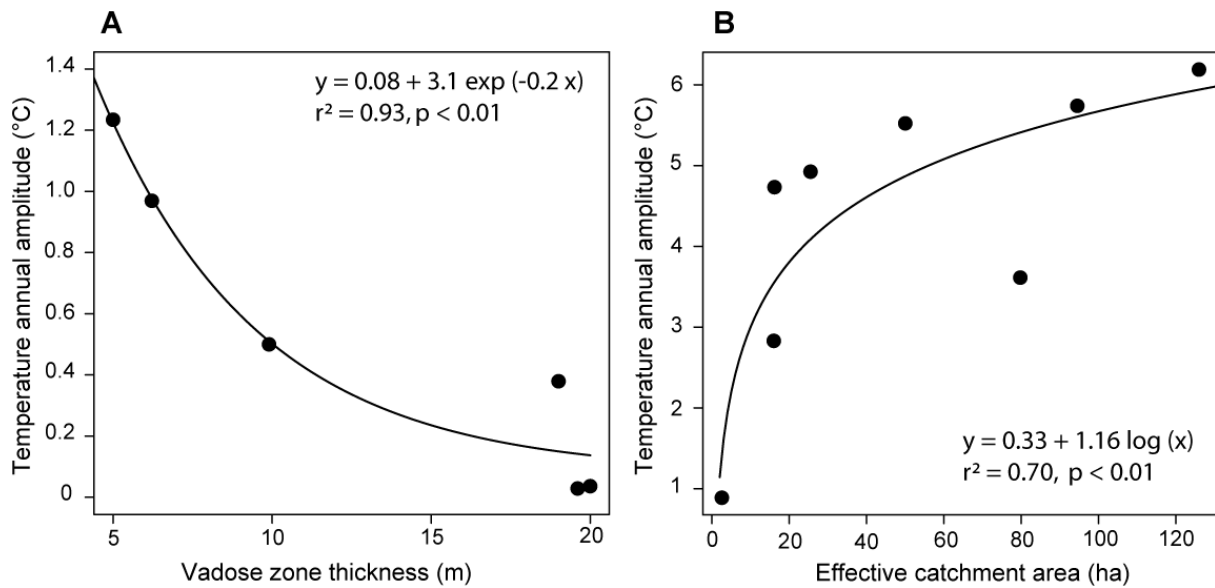


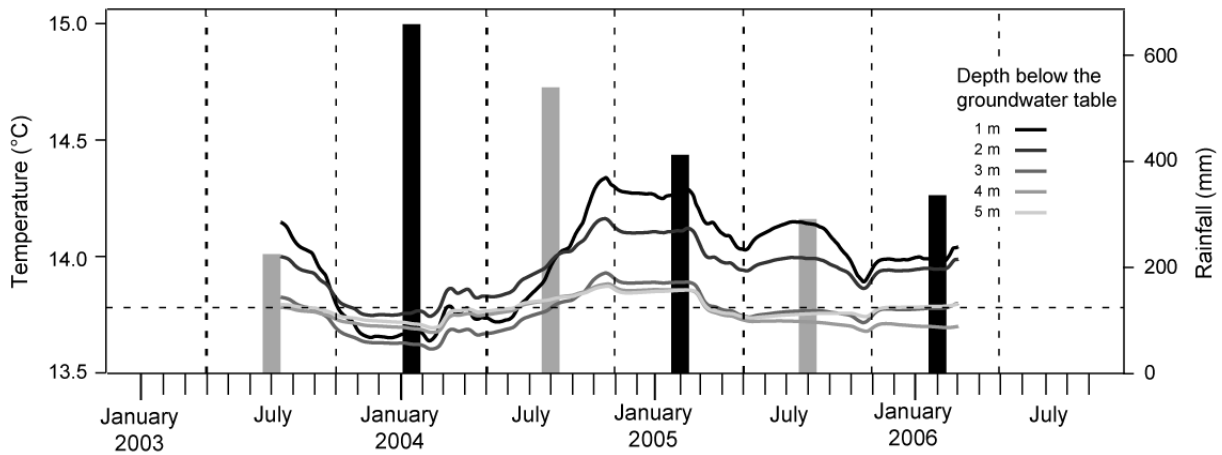
Figure 6: Temperature annual amplitude of groundwater *versus* vadose zone thickness at reference sites (A) and effective catchment area of stormwater infiltration basins at recharge sites (B).

#### *Between-year variability in groundwater temperature*

Differences in yearly moving average of groundwater temperature between depths below the water table depended upon rainfall distribution between the warm and cold seasons (Fig. 7). Yearly moving average of groundwater temperature and between-depth difference in temperature were the lowest in 2003 when the amount of cold stormwater greatly exceeded the amount of warm water. The yearly moving average of groundwater temperature at depths of 1 and 2 m below the water table increased and became distinctly higher than at depths of 3, 4, and 5 m as the relative proportion of warm stormwater exceeded or equaled that of cold stormwater in 2004 and 2005, respectively (Fig. 7).

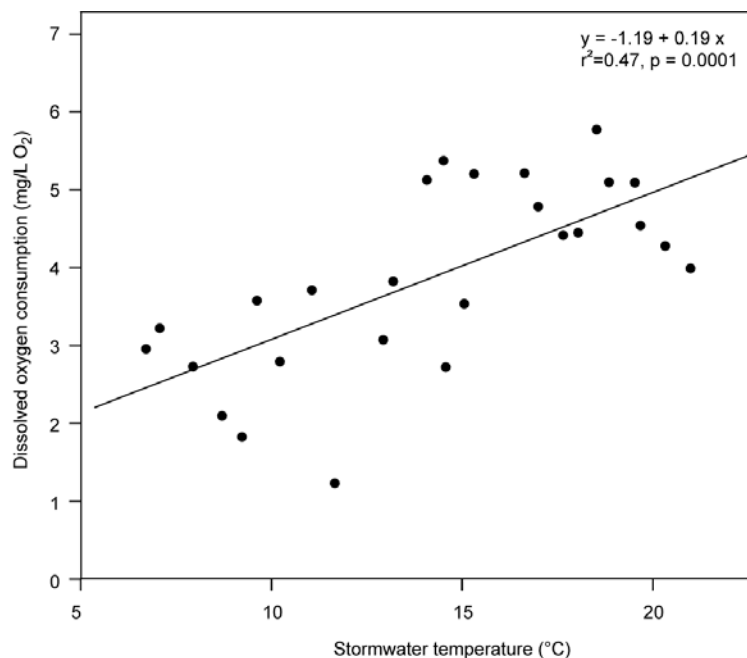
#### *Temperature effect on dissolved oxygen dynamics*

DO concentration at reference site 13 did not show any seasonal component and DO peaks associated with the heaviest rainfall events were positive whatever the season (Fig. 2C). In contrast, time series of DO concentration at recharge site 1 exhibited a clear seasonal pattern that was out of phase with the seasonal pattern of groundwater temperature. DO peaks induced by rainfall events were superimposed on that seasonal trend (lag time between rainfall and dissolved oxygen = 69 h). Recharge with stormwater elevated DO concentration



**Figure 7:** Yearly moving average temperature of groundwater at recharge site 1. Each point in the time series is centered for the 8760 hours (i.e. one year) used for calculating the annual average temperature. Grey and black bars indicate rainfall amounts during the warm and cold seasons for years 2003-2006. Vertical broken lines delineate the warm and cold seasons. The horizontal broken line is the average groundwater temperature at a depth of 5 m below the groundwater table.

during cold seasons, whereas it decreased DO concentration during warm seasons. DO consumption in the vadose zone as calculated with the mixing model ( $\Delta_{DO_{vz}}$ ) could exceed 5 mg/L and increased linearly with temperature of infiltrating stormwater (Fig. 8).



**Figure 8:** Relationship between dissolved oxygen consumption in the vadose zone as calculated by the two-end member mixing model and temperature of stormwater.

## DISCUSSION

### *Stormwater flow pattern*

Stormwater infiltration in highly permeable glaciofluvial deposits of the Lyon metropolitan area was a highly dynamic process which consisted in infiltrating rapidly large amount of water over small areas. At recharge site 1, approximately 10,000 m<sup>3</sup> of runoff water generated during an 18-mm rainfall event lasting 5 hours infiltrated in about 20 hours over a surface area of 1 ha. The average infiltration discharge for rainfall events > 20 mm was 0.14 m<sup>3</sup> s<sup>-1</sup> ±0.07 (n=14 events) (Le Coustumer and Barraud, 2007). Recharge of groundwater with stormwater resulted in a low-specific conductance plume that flowed vertically and horizontally into the aquifer. The lag time between rainfall and specific conductance increased with increasing vadose zone thickness but the transit time of stormwater in the vadose zone was short because of the fast vertical velocity of stormwater (i.e. 0.3 m.h<sup>-1</sup>). At most recharge sites, the stormwater plume persisted for less than 10 days in groundwater below SIB. Continuous measurements of specific conductance conducted in two observation wells located at distances of 60 and 130 m from recharge site 1 indicated that the stormwater plume progressed downstream at an average velocity of about 2 m.h<sup>-1</sup>. The decrease in specific conductance of groundwater during rainfall events was proportional to the amount of runoff but stormwater rarely penetrated at depth greater than 3 m below the water table. The proportion of stormwater at a depth of 1 m below the water table for rainfall quantities ranging from 5 to 50 mm varied between 25 to 70%, but this proportion fell to 5 - 35% at a depth of 2 m. Datry *et al.* (2004) reported a similar reduction in the proportion of inflow stormwater with increasing depth below the water table for a small SIB (catchment area: 2.5 ha) of the Lyon metropolitan area. In contrast, Appleyard (1993) demonstrated that groundwater recharge from large SIB draining impervious catchments of the Perth metropolitan area, Australia, decreased the concentration of total dissolved solids to depths of more than 10 m below the water table.

### *Thermal influence of groundwater recharge from stormwater infiltration basins*

Localized groundwater recharge with stormwater typically adds to the numerous local sources of heat that contribute to the strong spatio-temporal heterogeneity of groundwater temperature below cities (Allen *et al.*, 2003). Groundwater temperature below SIB had an irregular pattern overprinting seasonal trends, which was influenced by rainfall events. In contrast,



groundwater temperature at reference sites was relatively constant at the seasonal scale and lacked any event-based variation associated with rainfall. Groundwater temperature variations at the scales of rainfall event or season at depths > 10 m below SIB were comparable to those reported at depths < 5 m from the hyporheic zone of losing streams (Kulongoski and Izbicki, 2008; Stonestrom and Constantz, 2003; Constantz and Thomas, 1997). Over a year, groundwater temperature at a depth of 20 m below the soil surface at recharge site 1 varied from 9.5 to 19 °C whereas it fluctuated by less than 0.4 °C at nearby reference site 13.

At the scale of a rainfall event, groundwater temperature variation was controlled by the interaction between runoff amount and difference in temperature between stormwater and groundwater. Temperature variations during the wettest months (i.e. May, June, September and October) were not necessarily high because of a reduced difference between air and groundwater temperature (i.e. < 5 °C). The highest temperature variations were typically induced by moderate to heavy rainfalls (> 15 mm) that occurred during periods of high thermal difference between air and groundwater temperatures (i.e. > 7°C from January to March and July to August). The lag time between rainfall and groundwater temperature ( $Lag_{Tevent}$ ) was greater than the lag time between rainfall and specific conductance ( $Lag_{SPevent}$ ). This reflected the lower velocity of an advective-only temperature transport compared to the transport velocity of a conservative solute (Hoehn and Cirpka, 2006, Cirpka *et al.*, 2007). The retardation factor for temperature, defined as  $R_T = Lag_{Tevent} / Lag_{SPevent}$ , averaged  $3.2 \pm 2.3$  and fell inside the range of values reported in the literature for glaciofluvial outwash (i.e.  $2.5 < R_T < 3.5$ ) (Hoehn and Cirpka, 2006). The thermal influence of a rainfall event also depended on heat exchange with glaciofluvial deposits in the vadose zone that modified the temperature of infiltrating stormwater. As indicated by the significant interaction between runoff amount and difference between stormwater and groundwater temperature, the effect of heat exchange on the temperature of infiltrating water was all the more pronounced than the total amount of stormwater during a rainfall event was high. This result probably reflected the highly heterogeneous nature of stormwater flow in glaciofluvial deposits that exhibited strong spatial variation in saturated hydraulic conductivity (i.e.  $10^{-4}$  to  $10^{-1}$  m/s) and volumetric water content (Goutaland *et al.*, 2008a). Recent studies on the dynamics of stormwater infiltration at site 1 suggested that small rainfall events repeatedly solicited preferential flow paths that maintained high water content over time (Le Coustumer and Barraud, 2007; Goutaland *et al.*,

2008b). In contrast, larger rainfall events activated an increasing fraction of the infiltration bed and vadose zone that had been little affected by heat exchange with infiltrating water.

Induced infiltration of stormwater considerably increased the temperature annual amplitude of groundwater ( $\Delta_{\text{Tannual}}$ ) and reduced the phase difference between ambient air and groundwater temperatures ( $\text{Lag}_{\text{Tannual}}$ ) at a local scale. At reference sites,  $\Delta_{\text{Tannual}}$  and  $\text{Lag}_{\text{Tannual}}$  were 1.2 °C and 5.2 months at a depth of 5 m below the soil surface, respectively, whereas they were > 5 °C and < 2.5 months at depths of 8 to 20 m below the bed of large SIB (e.g. recharge sites 1, 7 and 8). The exponential decrease in amplitude and linear increase in seasonal lag time with increasing depth below the surface indicated that heat transfer from the surface was mainly by conduction at reference sites (Hillel, 1982; Stonestrom and Constantz, 2003). The vertical shift in thermal amplitude and phase difference observed at reference sites was consistent with that reported in other studies and seasonal variation of groundwater temperature was typically less than 0.2 °C at depth > 15 m (Schoeller, 1962; Lu and LeCain, 2003; Lee and Hahn, 2006). The annual amplitude of groundwater temperature at recharge sites no longer correlated to vadose zone thickness but increased with catchment areas of SIB, indicating heat transport occurred predominantly by advection. Stormwater infiltration probably also promoted conductive heat flow by maintaining elevated water content of glaciofluvial sediment (de Vries, 1975; Stonestrom and Constantz, 2003).

Between-year comparison at recharge site 1 showed that the annual amplitude of groundwater temperature and the net effect of infiltration on average groundwater temperature depended upon the seasonal rainfall distribution. In the absence of between-year differences in the seasonal pattern of stormwater temperature, groundwater warming in the upper layers of the groundwater table at recharge site 1 was all the more pronounced than the annual fraction of warm stormwater increased. Rainfall measurements for the city of Lyon over the period 1971-2000 showed that the amount of warm rainfall (481.8 mm) was on average 1.3 times higher than that of cold rainfall (361.5 mm). This disproportionally higher amount of warm runoff would result in a moderate local warming of about 0.4 °C in the upper layers of groundwater below large SIB such as recharge site 1 (Fig. 7). This local warming would typically be less than the effect of other anthropogenic heat sources such as heat pumps used for air conditioning. About 60 m<sup>3</sup>/h of stormwater with a discharge-weighted average temperature of 14.4 °C was infiltrated into the ground at recharge site 1, which drained an area of 180 ha. For

comparison, Horizons (2000) inventoried not less than one heat pump per 80 ha with a discharge of 50 m<sup>3</sup>/h and a discharge water temperature > 20 °C in the most densely-populated areas of the Lyon city.

Regardless of the temporal scale considered, the thermal effect of stormwater infiltration strongly attenuated with increasing depth below the groundwater table. Temperature variations at the scales of rainfall event and season were considerably lower at depths of 3, 4 and 5 m below the water table. The vertical pattern of temperature was consistent with that observed for specific conductance indicating advective heat transport below SIB was mainly restricted to the uppermost layers of groundwater. Moreover, recent data from observational wells located downstream of recharge site 1 indicated that temperature variations strongly attenuated with increasing distance from SIB. Temperature annual amplitude of groundwater was 6.7 °C beneath recharge site 1 in 2007 but it decreased to 4 and 0.8 °C at distances of 60 and 130 m from the SIB (Foulquier *et al.*, unpublished data).

#### *Temperature effect on dissolved oxygen dynamics*

Groundwater recharge with stormwater is expected to replenish urban groundwater with DO because runoff water is near-saturated with respect to DO (Appleyard, 1993; Datry, 2003). However, decrease in DO concentration of groundwater below SIB was reported in several studies (Fischer *et al.*, 2003; Datry *et al.*, 2004). Datry *et al.* (2004) demonstrated that DO concentration in shallow urban groundwater below a small SIB (catchment area: 2.5 ha) overlying a 3-m thick vadose zone alternatively increased and decreased during cold and warm rainfall events. Our study not only expands the findings of Datry *et al.* (2004) to a large SIB (catchment area: 180 ha) overlying a 20-m thick vadose zone but it also emphasizes the influence of stormwater infiltration on the seasonal trend of DO in groundwater. Indeed, simultaneous measurements of DO and temperature at recharge site 1 showed that temperature differences between seasons and rainfall events also resulted in the alternation of DO replenishment and depletion. Seasonal changes in DO solubility induced by annual temperature variation of groundwater (i.e. 6.2 °C) were sufficient to explain between-season differences in DO of groundwater (i.e. < 1.5 mg/L O<sub>2</sub>) at recharge site 1. However, temperature-induced changes in DO solubility were too small to account for variation in DO concentration of groundwater during rainfall events. Instead, our results indicated that the dynamics of DO in groundwater was controlled by temperature-induced changes in the rate of

oxygen consumption in the soil and vadose zone. Increased stormwater temperature probably stimulated microbial respiration, thereby leading to summer groundwater recharge with oxygen-poor stormwater. Dissolved oxygen consumption most likely occurred in the upper layers of the infiltration bed which stored large amounts of stormwater sediments enriched with organic matter (i.e. organic content: 5-15 % sediment dry wet) (Datry *et al.*, 2003; Winiarski *et al.*, 2006). Nogaro *et al.* (2007) showed that oxygen consumption in filtration columns filled with stormwater sediment collected at recharge site 1 could lead to near anoxic conditions at a depth of only 5 cm below the water sediment interface. However, the bulk of runoff water probably infiltrated in highly permeable areas of the infiltration bed showing little stormwater sediment accumulation. Moreover, re-oxygenation of infiltrating stormwater could also occur in deeper layers of the vadose zone. Nevertheless, the downward flow of anoxic stormwater during warm rainfall events could promote the migration at depth of dissolved phosphate produced by the mineralization organic matter stored in the infiltration bed (Hendricks and White, 2000; Nogaro *et al.*, 2007). This plausible mechanism would account for the increase in phosphate concentrations of groundwater observed below several SIB of the Lyon metropolitan area (Datry *et al.*, 2005). Similarly, Massman *et al.* (2006) showed that the summer anoxia of groundwater below an artificial recharge pond led to an increase in  $Mn^{2+}$  concentration. Excessive dissolved oxygen consumption is only one of the many undesirable effects that may result from the considerable increase in thermal variation caused by stormwater infiltration. For example, the inactivation rate of public-health related microorganisms in subsurface water (e.g. poliovirus, coliform bacteria, and enterococci) showed a strong temperature dependency with reduced inactivation at low temperatures (Gordon and Toze, 2003; John and Rose, 2005).

## CONCLUSIONS AND IMPLICATIONS

Heat transport from the surface to groundwater occurred predominantly by conduction at reference sites whereas the localized infiltration of large quantities of runoff water promoted advective heat transfer into groundwater below SIB. Consequently, the most notable effect of stormwater infiltration was to increase dramatically the temperature variation amplitude of groundwater at seasonal and event scales below SIB. The annual amplitude of groundwater temperature was on average 9 times higher below SIB (range: 0.9 – 8.6 °C) than at reference sites (range: 0 – 1.2 °C). The excessive increase in groundwater temperature during summer

(up to 21 °C) was accompanied by a concomitant decrease in groundwater dissolved oxygen concentration that reflected a lower oxygen solubility and higher microbial respiration in the soil and vadose zone. However, groundwater temperature variation at seasonal and event scales can be attenuated by reducing the size of catchment areas drained by SIB and by promoting source control drainage systems. Our results imply that the net effect of stormwater infiltration on average groundwater temperature is climate-dependent. Stormwater infiltration basins will locally warm up groundwater in regions where rainfall occurs predominantly during warm seasons (e.g. continental climate) whereas they cool down urban groundwater in cold-rain dominating regions (e.g. Mediterranean climate). However, groundwater warming below large SIB is moderate (~ 0.4 °C) and typically less than that induced by heat pumps used for air conditioning. Current research is using sediment, hydraulic, and physico-chemical data from heavily-instrumented recharge sites to model flow and heat transport in variably-saturated glaciofluvial deposits beneath and downstream stormwater infiltration basins.

### ACKNOWLEDGEMENTS

This work was part of the OTHU project (Experimental Observatory for Urban Hydrology) and was funded by the urban community of Lyon, the Rhône-Alpes Region and the French National Research Agency (Ecopluies Project). We are indebted to G. Bouger for his most dedicated support with the field work and data acquisition. We thank D.C. Culver for his comments that improved an earlier version of the manuscript.

### REFERENCES

- Allen A, Milenic D, Sikora P. 2003. Shallow gravel aquifers and the urban 'heat island effect': a source of low enthalpy geothermal energy. *Geothermics* 32: 569-578.
- Anderson MP. 2005. Heat as a ground water tracer. *Ground Water* 43: 951-968.
- Appleyard SJ. 1993. Impact of stormwater infiltration basins on groundwater quality, Perth metropolitan region, Western Australia. *Environmental Geology* 21: 227-236.
- Barraud S, Gibert J, Winiarski T, Bertrand-Krajewski JL. 2002. Implementation of a monitoring system to measure impact of stormwater runoff infiltration. *Water Science and Technology* 45: 203-210.

- Bertrand-Krajewski JL, Barraud S, Gibert J, Malard F, Winiarski T, Delolme C. 2008. The OTHU case study: integrated monitoring of stormwater in Lyon, France. In *Data Requirements for Integrated Urban Water Management*, Fletcher TD, Deletic A. (eds). UNESCO, Paris; 303-314.
- Blasch KW, Ferré TPA, Hoffmann JP. 2004. A statistical technique for interpreting streamflow timing using streambed sediment thermographs. *Vadose Zone Journal* 3:936-946.
- Bornstein RD. 1968. Observations of the urban heat island effect in New York City. *Journal of Applied Meteorology* 7: 575-582.
- Box GEP, Jenkins GM. 1976. *Time Series Analysis: Forecasting and Control*. Holden-Day: San Francisco; 575.
- BURGEAP 2001. *Etude hydrogéologique du secteur du bassin d'infiltration Django Reinhardt à Chassieu (69)*. Hydrogeological report Ly.765/A.7302.. BURGEAP, Lyon, France (available from: <http://www.burgeap.fr>); 30.
- Chapelle FH. 1993. *Ground-Water Microbiology & Geochemistry*. Wiley & Sons: New York; 424.
- Cirpka OA, Fienen MN, Hofer M, Hoehn E, Tessarini A, Kipfer R, Kitanidis PK. 2007. Analyzing bank filtration by deconvoluting time series of electric conductivity. *Ground Water* 45: 318-328.
- Constantz J, Thomas CL. 1997. Stream bed temperature profiles as indicators of percolation characteristics beneath arroyos in the middle Rio Grande Basin, USA. *Hydrological Processes* 11: 1621-1634.
- Cox MH, Su GW, Constantz J. 2007. Heat, chloride, and specific conductance as ground water tracers near streams. *Ground Water* 45: 187-195.
- Datry T. 2003. *Urbanisation et qualité des nappes phréatiques: réponses des écosystèmes aquatiques souterrains aux pratiques d'infiltration d'eau pluviale*. PhD thesis. Université Lyon 1, Lyon, France; 220.
- Datry T, Malard F, Vitry L, Hervant F, Gibert J. 2003. Solute dynamics in the bed of a stormwater infiltration basin. *Journal of Hydrology* 273: 217-233.
- Datry T, Malard F, Gibert J. 2004. Dynamics of solutes and dissolved oxygen in shallow urban groundwater below a stormwater infiltration basin. *Science of the Total Environment* 329: 215-229.

- Datry T, Malard F, Gibert J. 2005. Response of invertebrate assemblages to increased groundwater recharge rates in a phreatic aquifer. *Journal of the North American Benthological Society* 24: 461-477.
- de Vries DA. 1975. Heat Transfer in Soils. In *Heat and Mass Transfer in the Biosphere*, de Vries DA, Afgan NH. (eds). Scripta Book Co.: Washington; 5-28.
- Dechesne M, Barraud S, Bardin JP. 2004a. Spatial distribution of pollution in an urban stormwater infiltration basin. *Journal of Contaminant Hydrology* 72: 189-205.
- Dechesne M, Barraud S, Bardin JP. 2004b. Indicators for hydraulic and pollution retention assessment of stormwater infiltration basins. *Journal of Environmental Management* 71:371-380.
- Dorava JM, Roa-Espinosa A, Johnson K. 2003. Enhancing storm water infiltration to reduce water temperature downstream. In *National Conference on Urban Stormwater: Enhancing programs at the local level*, Minamyer S. (ed.). U.S. Environmental Protection Agency: Cincinnati; 85-97.
- European Environmental Agency 2006. *Urban sprawl in Europe – The ignored challenge*. Copenhagen (Denmark):EEA – European Environmental Agency, 56p.
- Ferguson BK. 1994. *Stormwater Infiltration*. CRC Press, Boca Raton; 269.
- Ferguson G, Woodbury AD. 2004. Subsurface heat flow in an urban environment. *Journal of Geophysical Research* 109: B02402. DOI: 10.1029/2003JB002715.
- Fischer D, Charles EG, Baehr AL. 2003. Effects of stormwater infiltration on quality of groundwater beneath retention and detention basins. *Journal of Environmental Engineering* 129: 464-471.
- Foulquier A, Malard F, Gibert J. 2007. Régime thermique des nappes phréatiques à l'aplomb de bassins d'infiltration. In *Les Nappes d'Eau Souterraines en Contexte Urbain*, Chastagner P. Gouisset Y. (eds). Comité Français d'Hydrogéologie : Lyon, France; 179-183.
- Giry G. 1997. Mise en place d'un suivi qualitatif et quantitatif de la nappe de l'est lyonnais. MS Thesis. Ecole Supérieure de l'Energie et des Matériaux, Orléans, France; 80.
- Gooseff MN, McGlynn BL. 2005. A stream tracer technique employing ionic tracers and specific conductance data applied to the Maimai catchment, New Zealand. *Hydrological Processes* 19: 2491-2506.
- Gordon C, Toze S. 2003. Influence of groundwater characteristics on the survival of enteric viruses. *Journal of Applied Microbiology* 95: 536-544.

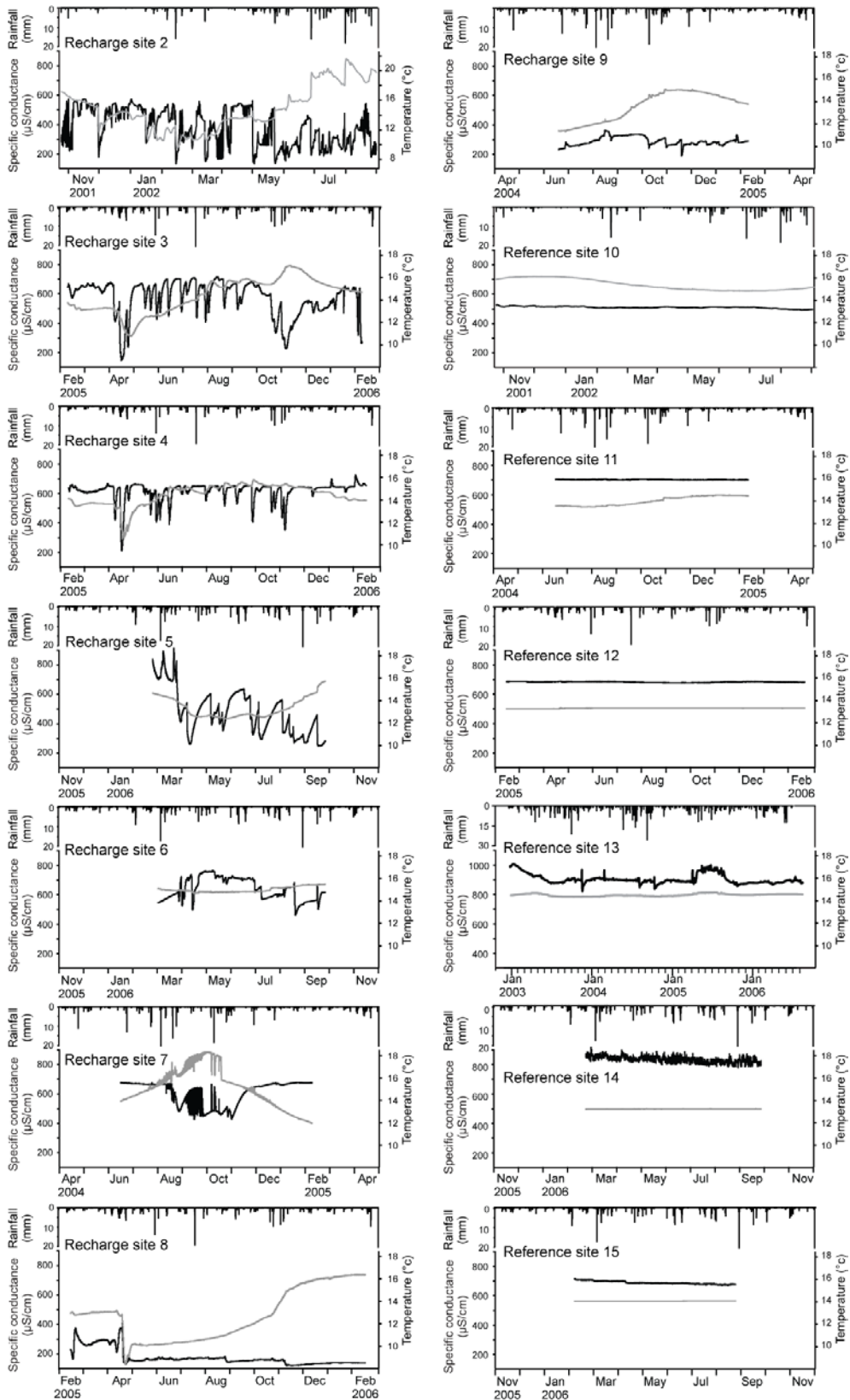
- Goutaland D, Winiarski T, Angulo-Jaramillo R, Lassabatere L, Bièvre G, Buoncristiani J-F, Dubé J-S, Mesbah A, Cazalets H. 2008a. Etude hydrogéophysique de la zone non saturée hétérogène d'un bassin d'infiltration d'eaux pluviales. *Bulletin des Laboratoires des Ponts et Chaussées* 268-269: 173-192.
- Goutaland D, Winiarski T, Dubé J-S, Bièvre G, Buoncristiani J-F, Chouteau M, Giroux B. 2008b. Hydrostratigraphic characterization of glaciofluvial deposits underlying an infiltration basin using ground penetrating radar. *Vadose Zone Journal* 7:194-207.
- Hendricks SP, White DS. 2000. Stream and groundwater influences on phosphorus biogeochemistry. In *Streams and Ground Waters*, Jones JB, Mulholland PJ (eds). Academic Press: San Diego; 221-235.
- Herb WR, Janke B, Mohseni O, Stefan HG. 2008. Thermal pollution of streams by runoff from paved surfaces. *Hydrological Processes* 22:987-999.
- Hillel D. 1982. *Introduction to soil physics*. Academic Press: San Diego, CA; 392.
- Hoehn E, Cirpka OA. 2006. Assessing hyporheic zone dynamics in two alluvial flood plains of the Southern Alps using water temperature and tracers. *Hydrology and Earth System Science Discussions* 3: 335-364.
- Horizons. 2000. *Synthèse hydrogéologique et thermique des forages pompes à chaleur. Lyon - Villeurbanne (69)*. Hydrogeological Report DH160, Horizons, Villefontaine, France; 32.
- John DE, Rose JB. 2005. Review of factors affecting microbial survival in groundwater. *Environmental Science & Technology* 39: 7345-7356
- Jones JB, Mulholland PJ (eds). 2000. *Streams and Ground Waters*. Academic Press: San Diego; 425.
- Karl TR, Diaz HF, Kukla G. 1988. Urbanization: its detection and effect in the United States Climate Record. *Journal of Climate* 1: 1099-1123.
- Kulongoski JT, Izbicki JA. 2008. Simulation of fluid, heat transport to estimate desert stream infiltration. *Ground Water* doi:10.1111/j.1745-6584.2007.00403.x
- Le Coustumer S, Barraud S. 2007. Long-term hydraulic and pollution retention performance of infiltration systems. *Water Science and Technology* 55: 235-243.
- Lee J-Y, Hahn J-S. 2006. Characterization of groundwater temperature obtained from the Korean national groundwater monitoring stations: implications for heat pumps. *Journal of Hydrology* 329: 514-526.



- Lu N, LeCain GD. 2003. Percolation induced heat transfer in deep unsaturated zones. *Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering* 129: 1040-1053.
- Mason Y, Amman A, Ulrich A, Sigg L. 1999. Behavior of heavy metals, nutrients and major components during roof runoff infiltration. *Environmental Science and Technology* 33: 1588-1597.
- Massman G, Greskowiak J, Dünnbier U, Zuehlke S, Knappe A, Pekdeger A. 2006. The impact of variable temperatures on the redox conditions and the behaviour of pharmaceutical residues during artificial recharge. *Journal of Hydrology* 328: 141-156.
- Morris BL, Lawrence ARL, Chilton PJC, Adams B, Calow RC, Klinck BA. 2003. *Groundwater and its Susceptibility to Degradation: A Global Assessment of the Problem and Options for Management*. Early Warning and Assessment Report Series, RS.03-3. United Nations Environment Programme, Nairobi, Kenya; 126.
- Nogaro G, Mermillod-Blondin F, Montuelle B, Boisson J-C, Bedell J-P, Ohannessian A, Volat B, Gibert J. 2007. Influence of a stormwater sediment deposit on microbial and biogeochemical processes in infiltration porous media. *Science of the Total Environment* 377: 334–348
- Pitt R, Clark S, Field R. 1999. Groundwater contamination potential from stormwater infiltration practices. *Urban Water* 1: 217-236.
- Pitt R, Clark S, Parmer K, Field R. 1996. *Groundwater contamination from stormwater infiltration*. Ann Arbor Press: Chelsea; 219.
- R Development Core Team. 2006. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing: Vienna. <http://www.R-project.org>.
- Schoeller H. 1962. *Les eaux souterraines*. Masson: Paris; 642.
- SDUD, 2005. Berlin Digital Environmental Atlas: groundwater temperature. *Senate Department for Urban Development: Berlin; 7*  
([http://www.stadtentwicklung.berlin.de/umwelt/umweltatlas/ed214\\_02.htm](http://www.stadtentwicklung.berlin.de/umwelt/umweltatlas/ed214_02.htm))
- Stonestrom DA, Constantz J. 2003. *Heat as a tool for studying the movement of ground water near streams*. Circular 1260, U.S. Geological Survey: Denver; 96.
- Taniguchi M. 2006. Anthropogenic effects on subsurface temperature in Bangkok. *Climate of the Past* 2: 831-846.

- Thompson AM, Gemechu AL, Norman JM, Roa-Espinosa A. 2007. Modeling the effect of summertime heating on urban runoff temperature. *AGU Fall meeting, San Francisco, CA, USA, 1609*.
- United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division. 2007. *World Population Prospects: The 2006 Revision, Highlights*. Working Paper No. ESA/P/WP.202. United Nations : New York; 96.
- Winiarski T, Bedell J-P, Delolme C, Perrodin Y. 2006. The impact of stormwater on a soil profile in an infiltration basin. *Hydrogeology Journal* 14: 1244-1251.

## **APPENDIX**



Appendix 1: Time series of rainfall (vertical bars), specific conductance (black lines) and temperature (grey lines) of groundwater at recharge and reference sites.

# 4

## RÉGULATION ASCENDANTE ET DESCENDANTE DES COMMUNAUTÉS MICROBIENNES SOUTERRAINES

Ce chapitre est consacré à l'étude des régulations ascendante et descendante dans les réseaux trophiques souterrains. La première partie analyse les réponses du compartiment microbien (activité, abondance et biomasse) à une augmentation des apports de COD. La comparaison des réponses mesurées sur le terrain et celles obtenues au laboratoire en présence d'une source facilement assimilable de carbone permet d'apprécier la biodégradabilité du COD atteignant la surface libre de la nappe à l'aplomb des sites de recharge. Dans la deuxième partie, les résultats de deux expérimentations en laboratoire sont utilisés afin d'évaluer l'influence relative d'une augmentation de COD biodégradable et de l'activité de bioturbation et de nutrition des invertébrés sur l'activité et l'abondance des micro-organismes. Une originalité de ces expériences est d'utiliser une source carbonée enrichie en  $^{13}\text{C}$  permettant par analyse isotopique de suivre le devenir du carbone dans les différents compartiments de la chaîne trophique.

#### **4.1. RESPONSE OF SEDIMENT BIOFILM TO INCREASED DOC SUPPLY IN GROUNDWATER ARTIFICIALLY RECHARGED WITH STORMWATER. (ARTICLE 3)**

Les exemples de réponse du compartiment microbien à des apports de COD de différentes qualités et quantités sont courants dans la littérature (Starr & Gillham 1993, Findlay *et al.* 2003, Wilczek *et al.* 2004). Néanmoins, les difficultés inhérentes à l'accessibilité du milieu souterrain font que très peu de données permettent de documenter les interactions entre la ressource nutritive et le compartiment microbien associé aux sédiments (biofilm) dans les nappes alluviales (Goldscheider *et al.* 2006). Comme suggéré par Datry *et al.* (2005), l'étude conjointe de sites influencés par l'infiltration artificielle d'eau pluviale et de sites de référence associés permet de quantifier l'influence d'une augmentation des flux de carbone organique dissous sur le compartiment microbien dans les horizons supérieurs de la nappe. Les objectifs de l'article sont donc de : 1) quantifier les changements de biomasse, d'abondance et d'activité du compartiment microbien présent à l'aplomb de bassins d'infiltration en comparaison avec des zones sans infiltration artificielle ; 2) d'évaluer le degré de réponse des micro-organismes par rapport aux flux de DOC estimés sur chaque bassin et ; 3) comparer les réponses mesurées sur le terrain avec celles obtenues au laboratoire en présence d'une source facilement utilisable de carbone afin d'apprécier la biodégradabilité du COD atteignant la surface libre de la nappe à l'aplomb des sites de recharge.

La méthodologie utilisée comprend deux volets. Le premier permet de tester statistiquement l'influence de l'infiltration des eaux de ruissellement pluvial sur les micro-organismes à partir de mesures réalisées sur 6 sites de l'agglomération lyonnaise dont 3 sites de recharge situés à l'aplomb hydraulique de bassins d'infiltration et 3 sites de référence non soumis à une infiltration induite d'eau de ruissellement pluvial. Les estimations des flux de COD sur chaque

site sont ainsi reliées aux changements microbiologiques observés entre sites de recharge et sites témoin. Le deuxième volet évalue les différences de réponse du compartiment microbien à un COD biodégradable grâce à des expérimentations de laboratoire.

La biomasse et l'activité des micro-organismes sont significativement plus fortes sous les sites de recharge par rapport aux sites témoins. De plus, l'activité spécifique (activité rapportée par cellule bactérienne) est stimulée sous les sites de recharge, témoignant d'une modification physiologique des communautés microbiennes. Ainsi, l'augmentation du rapport protéines/carbohydrates des micro-organismes avec la recharge en eau pluviale souligne un investissement plus fort du compartiment microbien dans de la synthèse protéique (associée à la cellule) que dans la production de polysaccharides (associés aux substances extracellulaires). Dans la littérature, un faible rapport protéines/carbohydrates témoigne souvent d'un stress pour le biofilm (Uhlinger & White 1983). Les résultats suggèrent donc que les apports en COD associés à l'infiltration artificielle des eaux pluviales réduisent le stress trophique rencontré par les micro-organismes dans les nappes alluviales. Les flux de COD estimés sur chaque site montrent d'ailleurs que les réponses du compartiment microbien sont d'autant plus marquées que les flux en COD sont élevés.

L'expérimentation de laboratoire témoigne d'une réponse très marquée du compartiment microbien à un flux croissant de COD biodégradable. La comparaison de ces résultats avec les réponses du compartiment microbien mesurées sur le terrain suggère que seulement 7% des flux de COD atteignant la surface libre de la nappe à l'aplomb des sites de recharge sont facilement biodégradables. Comme cela a été montré dans le chapitre 3, le sol et la zone non saturée sont des filtres physiques et biologiques efficaces pour la matière organique réduisant considérablement la proportion de carbone organique facilement exploitable par le compartiment microbien.

## **Article 3**

### **Response of sediment biofilm to increased DOC supply in groundwater artificially recharged with stormwater.**

A. FOULQUIER, F. MERMILLOD-BLONDIN,  
F. MALARD & J. GIBERT

Université de Lyon, CNRS, UMR 5023, Ecologie des Hydrosystèmes Fluviaux,  
69622 Villeurbanne cedex, France.



Soumis à *Water Research*

## **ABSTRACT**

Best management practices encompass diverse artificial groundwater recharge (AGR) systems that heavily rely upon the capacity of the soil and vadose zone to retain large quantities of organic matter generated during runoff on urban catchments. However, the supply of stormwater-derived dissolved organic carbon (DOC) at the water-table region of aquifers can enhance the rate of biogeochemical processes by fueling heterotrophic microbial metabolism. This study examined changes in the abundance and activity of sediment biofilm in response to increased DOC supply at the water table of an urban aquifer intentionally recharged with stormwater. Biofilm was significantly more abundant and active beneath AGR sites than at control sites not intentionally recharged with stormwater. Individual cells also exhibited higher specific dehydrogenase and hydrolytic activities and apparently favored the synthesis of proteins rather than the production of extracellular polymeric substances. The stimulation of the microbial community was all the more pronounced when the flux of DOC reaching the groundwater table was high. However, the increase in microbial biomass and activity at AGR sites was 7.5 times lower than that measured in slow filtration columns in which aquifer sediments were supplied with an easily biodegradable source of DOC. This indicated that the soil and vadose zone at AGR sites efficiently retained the more labile fraction of DOC, thereby enabling the infiltration of large quantities of stormwater without excessively stimulating groundwater microbial respiration. Our results show that groundwater biofilms could be used as sensitive indicators for assessing the DOC removal of AGR systems because they experience severe organic carbon limitation in most pristine aquifers.

## **KEY WORDS**

Artificial groundwater recharge, stormwater, DOC, attached bacteria, dehydrogenase and hydrolytic activities, EPS.

## INTRODUCTION

Urban areas host half of the world's population and this proportion is predicted to reach 60% by 2030 (United Nations 2007). One of the major landscape modifications associated with urbanization is an increase in the impervious surface coverage (Arnold & Gibbons 1996). The sealing of urban surfaces alters the natural water cycle because it increases stormwater runoff during rainfall events thereby reducing groundwater recharge (Niemczynowicz 1999). Stormwater management practices, also designated as Best Management Practices (BMPs), have been developed for 30 years in several countries to limit surface runoff and compensate for reduced groundwater recharge (Marsalek & Chocat 2002). BMPs encompass diverse artificial groundwater recharge (AGR) systems (i.e. trenches, wells, basins) which collect stormwater from residential, commercial or industrial catchment before infiltration into soils at localized areas. AGR systems rely heavily upon the retention capacity of the soil, vadose zone and groundwater table because they considerably increase the infiltration flux of water enriched in dissolved organic carbon (DOC) during runoff on urban catchments (Datry et al. 2003). Many cities are groundwater dependent (Morris et al. 2003), and the DOC removal performance of AGR systems needs evaluation because excessive DOC supply into groundwater can enhance the rate of microbial terminal electron acceptor processes (e.g. aerobic respiration, iron reduction) and the transport of heavy metals (Christensen et al. 1996). Studies evaluating the DOC removal of AGR systems have provided equivocal results with some studies, but not all, reporting an increase in DOC concentration and a decrease in dissolved oxygen (DO) in groundwater beneath stormwater infiltration sites (Barraud et al. 1999; Pitt et al. 1999; Fischer et al. 2003; Datry et al. 2004). However, there have been no attempts to quantify changes in the biomass, activity and composition of groundwater microbial communities induced by AGR with stormwater although stormwater-derived DOC can fuel heterotrophic microbial metabolism in groundwater.

Groundwaters are heterotrophic systems whose metabolism relies on the supply of organic matter from surface ecosystems. Most groundwater ecosystems experience strong carbon limitation with DOC concentration, DOC flux and particulate organic carbon content being typically lower than  $2 \text{ mg l}^{-1} \text{ C}$ ,  $5 \text{ Kg C ha}^{-1} \text{ yr}^{-1}$ , and 0.5% by dry weight, respectively (Leenheer et al. 1974, Michalzik et al. 2001; Pabich et al. 2001, Malard and Hervant 1999). Thus, the availability of organic carbon is generally assumed to constrain the biomass, activity, physiological state and composition of subsurface microbial communities (Bengtsson

1989, Kazumi & Capone 1994, Watson 1998). Indeed, microbial biomass in the soil, vadose zone and hyporheic zone was found to decrease along subsurface flowpaths in which DOC declined (Konopka and Turco 1991, Marmonier et al. 1995, Holden and Fierer 2005, Rauch-Williams and Drewes 2006). Kolehmainen et al. (2007) showed that the number of free-living bacteria decreased from 15 to less than  $2 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$  of water as the DOC concentration of infiltrating water was reduced from 14 to 2  $\text{mg l}^{-1}$  during AGR with humic lake water. Increased DOC supply during stream and lake water infiltration was also found to stimulate respiratory and extracellular microbial activities implicated in organic matter processing (Findlay et al. 2003, Miettinen et al. 1996, Kolehmainen et al. 2009) and modified the composition of bacterial communities (Eiler et al. 2003; Kolehmainen et al. 2007). However, most studies examining the effect of AGR focused on free-living bacteria (Miettinen et al. 1996, Kolehmainen et al. 2009). In oligotrophic subsurface environments, most bacteria grow attached to sediments thereby forming a biofilm made of cell aggregates embedded in a matrix of extracellular polymeric substances (EPS) (Costerton 1995; Alfreider et al. 1997; Griebl et al. 2002). The EPS matrix essentially made of carbohydrates traps DOC which is subsequently degraded into low molecular weight compounds by exoenzymes before microbial assimilation. EPS were found to accumulate during periods of carbon limitation with a concomitant reduction in the size of bacterial cells and protein synthesis rate in response to starvation (Uhlinger & White 1983, Allison 1998).

The present study assessed the response of groundwater sediment biofilm to increased DOC supply at multiple depths below the water table of an urban aquifer intentionally recharged with stormwater. DOC supply at ARG sites was expected to stimulate microbial growth and metabolism thereby increasing biofilm biomass, dehydrogenase and hydrolytic activity per bacterial cell, and the ratio of protein to carbohydrates. More specifically, we expected microbial growth and metabolism to be positively linked to DOC flux reaching the groundwater table, with the most pronounced increase in bacterial biomass and activity being observed at AGR sites showing the highest stormwater infiltration flux. First, we assessed the influence of AGR with stormwater by quantifying the biomass and activity of attached bacteria in groundwater at three AGR sites and three control sites not intentionally recharged with stormwater. Second, we determined whether the difference in microbial biomass and activity among AGR sites was dependent upon the flux of DOC reaching the groundwater.

Third, we tested the response of sediment biofilm to an increasing supply of easily biodegradable DOC using slow filtration column experiments.

## MATERIALS AND METHODS

### *Study sites*

The AGR sites were located in the eastern aquifer of the Lyon metropolitan area, France (Fig. 1A). The aquifer (catchment area: 314 km<sup>2</sup>) consisted of 3 corridors separated by moraine hills of low hydraulic conductivity (10<sup>-5</sup>-10<sup>-8</sup> m/s) (BURGEAP 2001; Datry 2003). Aquifer corridors consisted of highly permeable glaciofluvial sediments (hydraulic conductivity: 10<sup>-3</sup>-10<sup>-2</sup> m/s) and were drained by the Rhône River. The aquifer was artificially recharged with stormwater at multiple sites to compensate for reduced natural recharge caused by the sealing of urban surfaces. AGR with stormwater represented at least 10 % of the annual flux of groundwater, which was estimated at 69.1 million m<sup>3</sup> (Giry 1997; Foulquier et al. 2009a). The AGR sites consisted of a settling and an infiltration basin that collected stormwater from residential, commercial and/or industrial areas (Table 1). The annual groundwater recharge at each AGR site was estimated as follows:

$$\text{Groundwater recharge (m}^3 \text{ of stormwater m}^{-2}\text{)} = P \times RC \times CA_{IB} / SA_{IB}$$

where:

P (m): annual precipitation (0.835 m ± 0.125 m; n=38 years, 1970-2007)

RC (%): runoff coefficient on urban catchment (0.35)

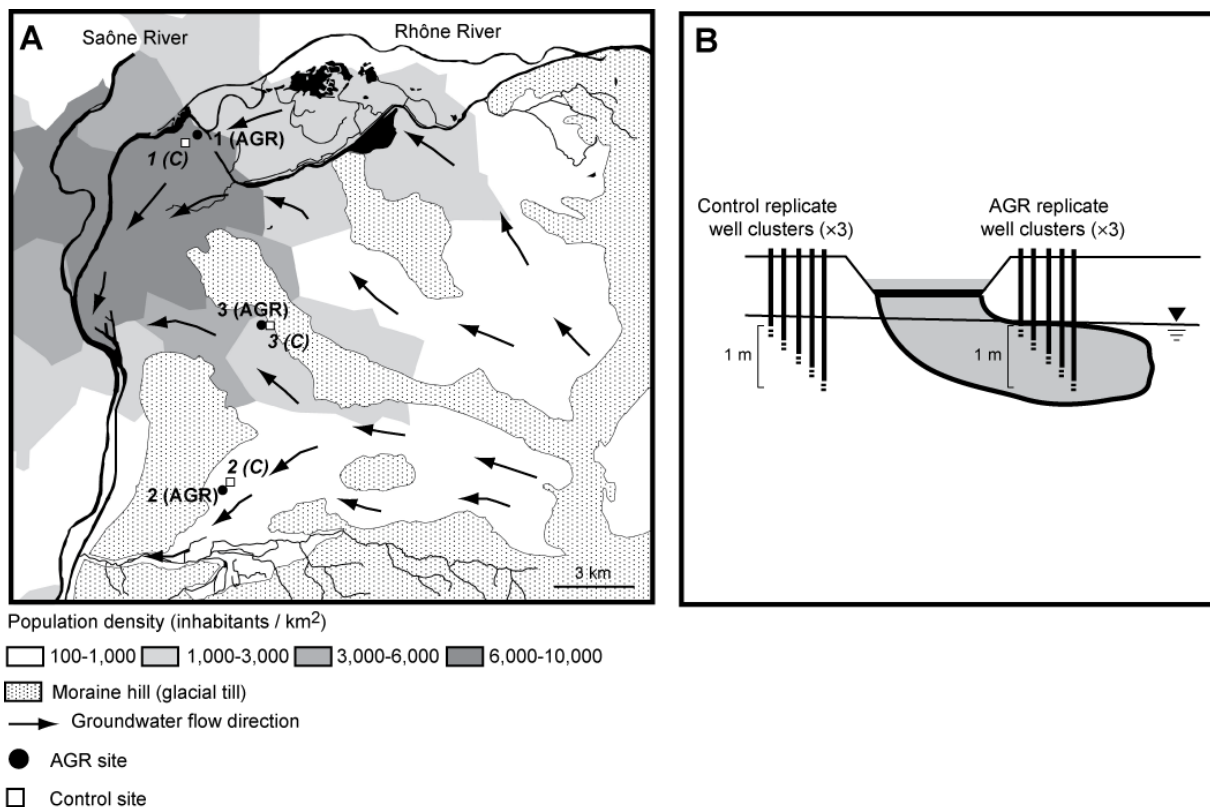
CA<sub>IB</sub>: catchment area of the infiltration basin (m<sup>2</sup>)

SA<sub>IB</sub> (m<sup>2</sup>): surface area of the infiltration basin

### *Site instrumentation*

The three AGR sites were instrumented with 6 clusters of 5 wells that were successively installed at depths of 10, 30, 50, 70 and 90 cm below the groundwater table (Fig. 1B). At each site, three replicate well clusters were located upstream of the stormwater infiltration basin and three other replicate clusters were located in the immediate downstream vicinity of the basin. The upstream well clusters intersecting the groundwater zone that was not recharged with stormwater were used as control sites while the downstream well clusters were used as AGR sites because they intersected the stormwater plume induced by the infiltration basins. The vadose zone thickness at AGR and control sites averaged 3.0 m ± 0.9 m (Table 1).

Distances between the 3 replicate clusters did not exceed 10 m and wells within each replicate cluster were separated from each other by a distance of 0.5 m. All wells were constructed of 3.8 cm inner diameter steel pipe with a screen of 13 cm in height (hole diameter: 0.5 cm) at their lower ends. They were installed at the desired depths using a vibrating electric-powered hammer.



**Figure 1:** **A.** Locations of artificial groundwater recharge (AGR) sites and control (C) sites in the eastern aquifer of the Lyon metropolitan area, France. **B.** Cross sectional illustration of well clusters at AGR and control sites.

### *Water and sediment sampling*

Water and sediment were collected from upstream and downstream well clusters at the three sites (n=90 samples) from 10 to 21 September 2006 to test for the effect of AGR and depth below the groundwater table on DOC concentration and biomass and activity of biofilm. A mixture of water and sediment was extracted using a hand piston pump from each well (Bou & Rouch 1967). Water was collected in 0.1-L burned glass bottles for the determination of DOC. Water samples were stored at 4°C, brought within 4 h to the laboratory, and filtered through a 0.45 µm membrane filter. Dissolved oxygen (WTW OXI 330) was measured in the

field with an O<sub>2</sub> meter (WTW OXI 330 meter, Weilheim, Germany) whose readings had been previously checked with the Winkler method. After sediment settling, at least 0.5 L of sediment was collected in polypropylene containers that were stored at ~ 20 °C and brought within 4 h to the laboratory. The sediment was sieved wet through a 1-mm sieve before microbial analyses.

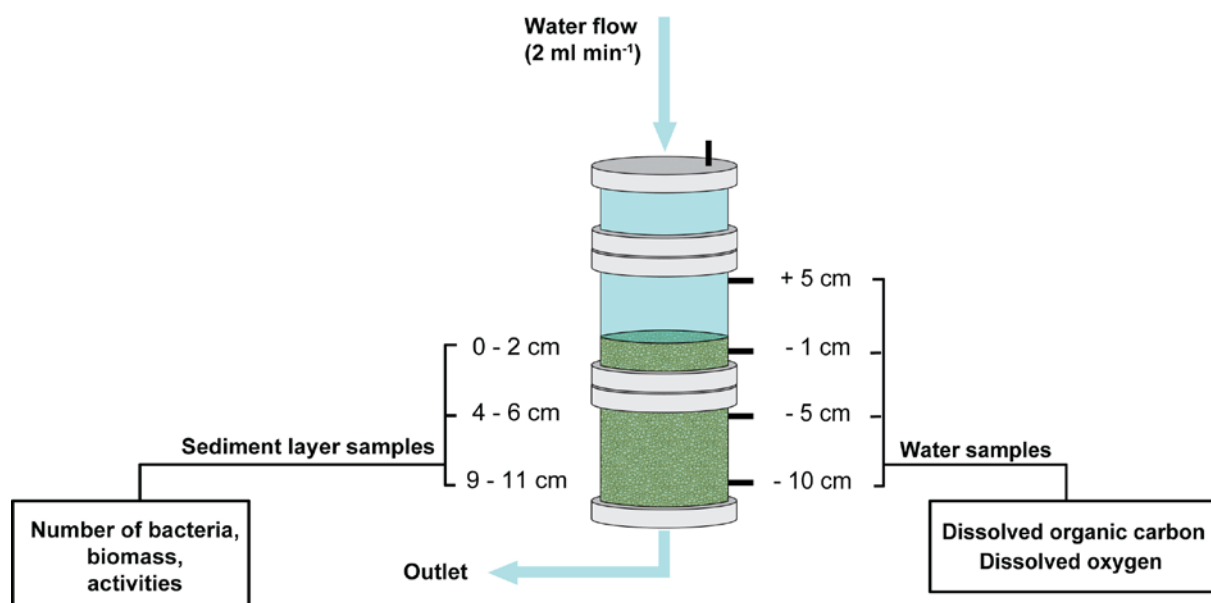
**Table 1:** Characteristics of artificial groundwater recharge sites (AGR) and control sites. Recharge at control sites was derived only from the natural infiltration of rainwater.

Site	Type	Vadose zone thickness (m)	Catchment area (ha)	Basin area (ha)	Annual recharge (m <sup>3</sup> m <sup>-2</sup> )	DOC flux (g C m <sup>-2</sup> year <sup>-1</sup> )
1	AGR	2.8	2.5	0.08	9.7	13.7
2	AGR	1.7	100	0.40	73.1	129
3	AGR	3.2	270	0.39	202.3	269
1	control	4.2			0.24	0.15
2	control	2.4			0.24	0.32
3	control	3.5			0.24	0.29

#### *Slow filtration columns*

Slow filtration column experiments were conducted to test for the effect of an increasing supply of easily biodegradable DOC (BDOC) on the biomass and activity of biofilm. Columns had an inner diameter of 10 cm and consisted of two experimental modules (10 cm high) topped by a third module of 5 cm in height (Mermillod-Blondin et al. 2005) (Fig. 2). They were filled with inert gravel and fresh sand to a height of 15 cm. About 10 cm of water was left above the sediment surface. Gravels (grain size: 5-8 mm) were cleaned with deionized water and dried at 60°C. Fresh sand (grain size 100-1000 µm) was collected at a depth of 1 m below the bed of a gravel pit intersecting the water table of the glaciofluvial aquifer using a hand piston pump. Masses of gravel (500 g, 500 g and 400 g) and sand (150 g, 150 g and 120 g) were alternately introduced into the columns to obtain a heterogeneous porous media.

Experiments were performed at constant temperature ( $15 \pm 0.5^\circ\text{C}$ ) in the dark. The columns were supplied from the top with reconstituted water ( $96 \text{ mg L}^{-1} \text{ NaHCO}_3$ ,  $39.4 \text{ mg L}^{-1} \text{ CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $60 \text{ mg L}^{-1} \text{ MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  and  $4 \text{ mg L}^{-1} \text{ KCl}$ ,  $19 \text{ mg L}^{-1} \text{ Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , US EPA 1991) using a peristaltic pump controlling a constant infiltration flow rate of  $2 \text{ ml min}^{-1}$ . Supplied water was aerated to maintain concentrations of DO between  $8.5$  and  $9.5 \text{ mg L}^{-1}$  at the inlet of the columns throughout the experiment. Three concentrations of sodium acetate (i.e.  $0.5 \text{ mg}$ ,  $1.5 \text{ mg}$  and  $2.5 \text{ mg L}^{-1} \text{ C-NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$ ), an easily biodegradable form of DOC, were applied to the columns with three replicate columns per concentration. Water sampling for DOC determination and oxygen measurements was made at four depths (5 cm above the sediment surface, and 1, 5 and 10 cm below the sediment surface) by means of lateral water derivation outlets on days 6, 10, 14, 18, 22 and 26 after the start of the experiments. For DO measurements, an oxygen micro-sensor probe (Unisense, Aarhus, Denmark) was directly connected to the lateral water derivation, thereby preventing any contact with atmospheric oxygen. On day 26, the columns were dismantled: the sediment was collected at three successive layers (0-2, 4-6 and 9-11 cm below the sediment surface) and was sieved wet through a 1-mm sieve before microbial analyses.



**Figure 2:** Schematic diagram of a slow filtration column and description of the sampling procedure.



### *DOC measurement and microbial analyses*

DOC was determined using a carbon analyser (multi N / C<sup>®</sup> 3100, Analytik Jena, Jena, Germany) based on thermocatalytic oxidation (850 °C) of organic carbon and infrared detection of CO<sub>2</sub>. We used an automatic selection outlier method in which repeated injection of the same water samples was carried out until the coefficient of variation between any 2 injections was less than 2 %. The reproducibility of measurements calculated from repeated analyses of in-house standard (K-Phthalate solution, 1 mg C l<sup>-1</sup>) was better than ± 0.05 mg C l<sup>-1</sup> (1 σ).

Number of bacteria was counted using DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindol) staining (Porter & Feig 1980). Wet sand (1 g) fixed with formaldehyde (final concentration: 4%) was diluted with 20 mL of a solution with pyrophosphate (0.1%). Bacteria were detached from sediment by sonication (100 W, 2 periods of 60 s) and aliquots were spotted onto slides and stained with DAPI solution (Schönholzer et al. 1999). The slides were examined at 1000 × magnification with a BH2-RFCA Olympus microscope fitted for epifluorescence with a high-pressure mercury bulb (50 W) and filter set BP 405 (for DAPI). Bacteria were counted in 30 fields per sample with up to 20 cells per field and were expressed as numbers of bacteria per g of dry weight (DW) of sediment (cells g<sup>-1</sup> sediment DW).

Proteins associated with the aquifer sediment were measured to assess microbial biomass. Measurements were made according to Peterson (1977) using the Sigma Protein Assay Kit P-5656 (Sigma Diagnostics, St. Louis, MO, USA). Sediment sample (1 g fresh weight) was treated with 2 mL of a 50% solution of Lowry reagent for 20 min at 15°C. A vigorous shaking was applied after the Lowry solution was added to improve the contact between protein on sediment and reagent. After incubation with Lowry reagent, 0.5 mL of Folin reagent was added and a coloration reaction lasted 30 min in the dark. The 750-nm absorbance of the filtered supernatant (0.45 μm, Millipore) was measured and reported onto a calibration curve performed with bovine serum albumin (BSA). Total proteins were expressed as mg of protein per g of dry weight (DW) of sediment (mg protein g<sup>-1</sup> sediment DW).

Carbohydrates were measured on sediment samples using the Dubois method (Dubois et al. 1956) to estimate EPS development. Sediment sample (0.25-0.5 g in dry mass) was mixed with 1 mL of a phenol solution (10%), and 5 mL of sulphuric acid (95%). Incubation lasted 1

h in the dark at room temperature. Absorbance of the supernatant was measured at 495 nm with a photometer. Total carbohydrates was obtained from a calibration curve performed with glucose and was expressed as mg of carbohydrates per g of dry weight (DW) of sediment (mg carbohydrate g<sup>-1</sup> sediment DW).

The 2-(p-iodophenyl)-3-(p-nitrophenyl)-5-phenyl tetrazolium chloride (INT) was used to measure dehydrogenase activity (respiratory activity) as modified from Hourii- Davignon et al. (1989). Sediment sample (1 g fresh weight) was incubated in a 0.02% INT solution for 2 h at 15°C and then filtered on a nylon membrane (0.22 µm, MSI). Controls were prepared by adding formaldehyde (2% final) in an INT solution. Extraction of INT-formazan was made in vials containing 5 ml of methanol. Each vial was sonicated for 30s, at power 4 and 80% active cycle using a Vibracell sonicator (Type 72401; 300 W; 20 KHz; Bioblock, Illkirch, France) fitted with a 3 mm microtip to raise solvent extraction yield (Maurines-Carboneill et al., 1998). The INT-formazan extract was measured with a spectrophotometer adjusted at 480 nm against control blank. The quantity of INT-formazan was computed by using the molar extinction coefficient of 18,000 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> at 480 nm and was expressed as µmol of INT per h per g dry weight (DW) of sediment (µmol INT h<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> sediment DW).

Hydrolytic activity of biofilm was estimated using the fluorescein diacetate (FDA) hydrolysis method (Jørgensen et al. 1992). Sediment samples (1 g fresh weight) were placed into 3 ml of a pH 7.6 phosphate buffer solution with 0.15 ml of 4.8 mM FDA solution. The incubation was maintained for 1 to 3 h until a green coloration of fluorescein appeared to ensure that FDA concentration was not limiting enzymatic activity. The reaction was stopped by freezing the sample after the addition of 4.5 ml of a solution of HgCl<sub>2</sub> (400 mg L<sup>-1</sup>). Fluorescein concentration was estimated from the absorbance of the filtered supernatant (0.45 µm, Millipore) measured at 490 nm and was expressed as µmol of FDA per h per g dry weight (DW) of sediment (µmol FDA h<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> sediment DW).

Repeated analyses (n=3) of the same sediment sample were carried out for total proteins, carbohydrates and microbial activities.

### *Data analysis*

The annual flux of DOC reaching the groundwater table at AGR and control sites ( $\text{g DOC m}^{-2} \text{ yr}^{-1}$ ) was obtained by multiplying the annual groundwater recharge ( $\text{m}^3$  of water  $\text{m}^{-2}$ ) by the average concentration of DOC measured at a depth of 10 cm below the groundwater table ( $n=3$  replicate wells per site). The annual groundwater recharge at control sites was estimated at  $0.24 \text{ m}^3$  of rainwater  $\text{m}^{-2}$  (i.e. 29 % of annual precipitation) (BURGEAP 1995). The flux of DOC in the uppermost layer (0-2 cm) of slow filtration columns was calculated as follows:

$$\text{DOC flux (g C m}^{-2} \text{ yr}^{-1}) = Q * 24 * 365 * \text{DOC} / S$$

Where

Q ( $\text{l h}^{-1}$ ): infiltration flow rate at column inlet ( $0.12 \text{ l h}^{-1}$ )

DOC ( $\text{g l}^{-1}$ ): DOC supply at column inlet ( $0.5, 1.5, 2.5 \times 10^{-3} \text{ g l}^{-1}$ )

S ( $\text{m}^2$ ): surface area of the slow filtration column ( $0.00785 \text{ m}^2$ )

The protein and carbohydrate content per bacterial cell and specific microbial activities (i.e.  $\mu\text{mol INT}$  and  $\text{FDA h}^{-1} \text{ cell}^{-1}$ ) were calculated by dividing measurements made on sediments by the number of bacteria. This calculation provided an estimate of the average cell activity but it did not consider differences in activity among cells. The ratio of protein to carbohydrate (P/C ratio) was used to assess whether AGR influenced the relative production of cells and EPS by microorganisms.

Analysis of variance (ANOVA) was used to test for the effect of AGR and depth below the groundwater table on DOC concentration and bacterial biomass and activity. A nested design with sites, AGR nested in sites and depth as main effects, was used in order to avoid confounding between-site variation with variation induced by AGR. The interactions between depth and AGR nested in sites as well as between depth and sites were also tested. Post hoc Tukey's tests were performed to determine whether pairwise differences in the effect of AGR between sites reflected differences in the annual flux of DOC reaching the groundwater table.

ANOVA was used to test for the effect of an increasing supply of BDOC on bacterial biomass and activity in slow filtration columns with DOC flux and depth as main effects. The interactions between DOC flux and depth were also tested for significance. Data were  $\log_{10}$  transformed before analysis to satisfy assumption of normality and homoscedasticity. Statistical analyses were performed using R (R Development Core team 2006) and the

Statistica 6<sup>®</sup> software package (Statsoft Inc., Tulsa, Oklahoma, USA). Significance for all statistical tests was accepted at  $\alpha < 0.05$ .

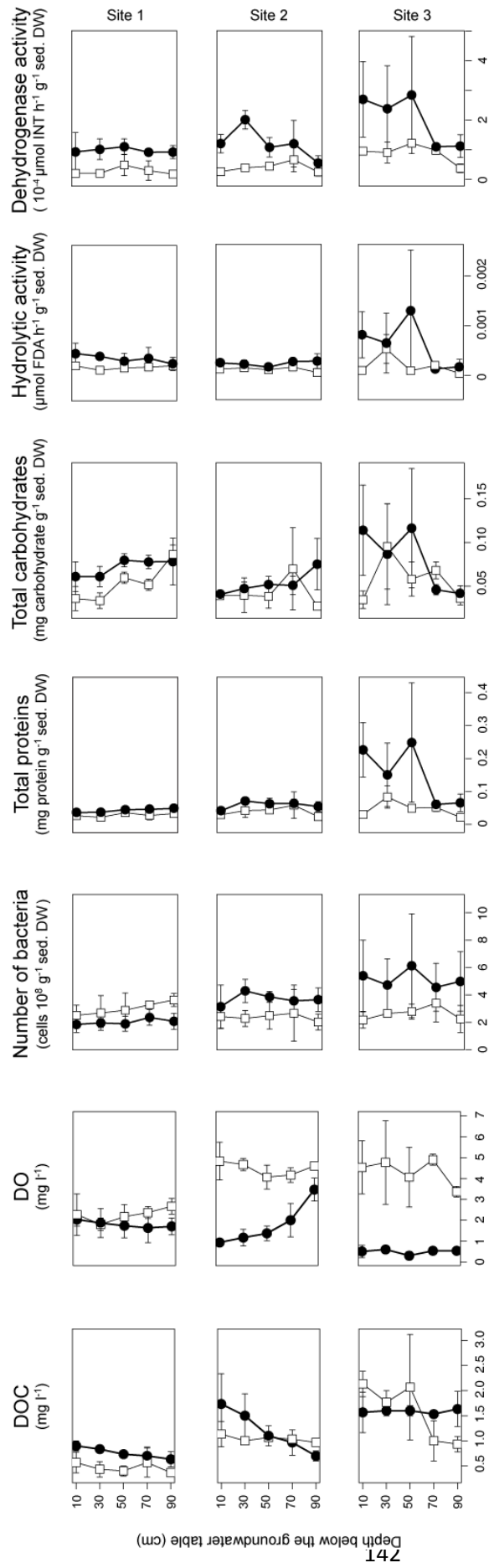
## RESULTS

### *Differences in DOC concentrations and fluxes among AGR and control sites*

Groundwater DOC concentration averaged  $1.1 \pm 0.5$  mg C l<sup>-1</sup> (n=90) and ranged from 0.3 to 3.1 mg C l<sup>-1</sup>. DOC concentration was significantly higher at AGR sites than at control sites and decreased with increasing depth below the groundwater table at AGR sites 1 and 2 (Fig. 3, Table 2). The average DOC concentration at AGR sites was only 0.15 mg C l<sup>-1</sup> higher than at control sites but the annual flux of DOC reaching the groundwater table at AGR sites was 90 to 1700 fold higher than the flux of DOC at control sites (Table 1). Groundwater DO concentration averaged  $2.5 \pm 1.6$  mg O<sub>2</sub> l<sup>-1</sup> and ranged from 0.1 to 7 mg O<sub>2</sub> l<sup>-1</sup>. DO concentration was significantly lower at AGR sites and did not vary significantly among depths (Fig. 3, Table 2). Near anoxic conditions (i.e. DO < 1 mg O<sub>2</sub> l<sup>-1</sup>) occurred only at recharge site 3.

**Table 2:** Results of nested analysis of variance for testing the effect of artificial groundwater recharge (AGR) and depth below the groundwater table on the biomass and activity of groundwater sediment biofilm.

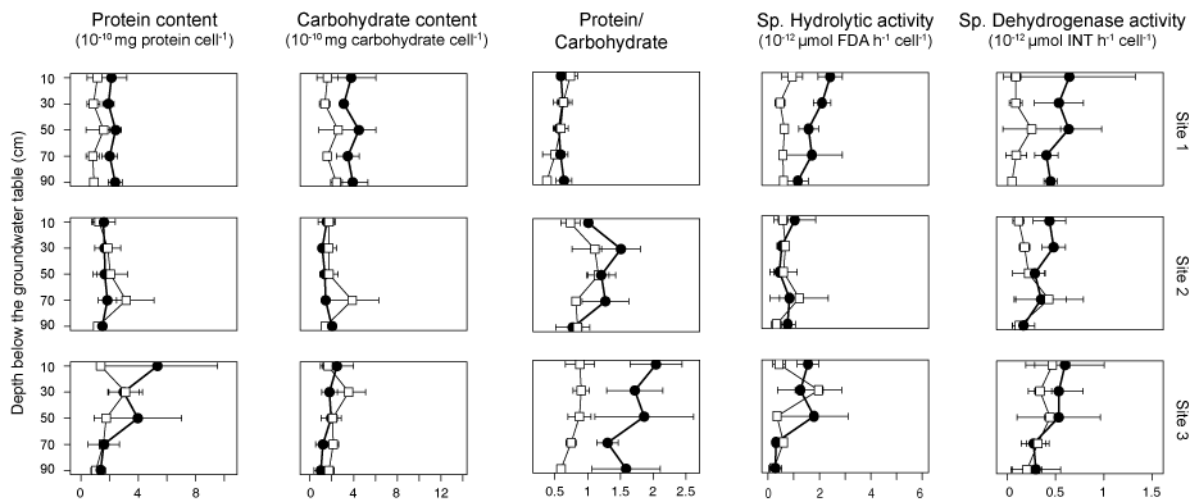
	Site		Recharge(Site)		Depth		Site x Depth		Recharge(Site) x Depth	
	F <sub>2,3</sub>	<i>p</i>	F <sub>3,12</sub>	<i>p</i>	F <sub>4,8</sub>	<i>p</i>	F <sub>8,12</sub>	<i>p</i>	F <sub>12,60</sub>	<i>p</i>
DOC	9.76	0.062	6.89	<b>0.006</b>	4.85	<b>0.028</b>	0.56	0.792	1.21	0.297
DO	0.17	0.851	63.86	<b>&lt;0.001</b>	0.48	0.749	1.13	0.408	1.87	0.057
Number of bacteria	0.53	0.636	38.45	<b>&lt;0.001</b>	0.66	0.639	1.48	0.261	0.28	0.991
Total proteins	1.00	0.456	12.11	<b>0.001</b>	1.03	0.450	1.72	0.192	1.73	0.083
Total carbohydrates	1.08	0.434	2.16	0.145	0.39	0.810	1.34	0.311	2.44	<b>0.012</b>
Hydrolytic activity	0.25	0.798	5.54	<b>0.013</b>	1.57	0.273	0.74	0.660	2.81	<b>0.004</b>
Dehydrogenase activity	0.75	0.542	41.35	<b>&lt;0.001</b>	4.06	<b>0.044</b>	1.45	0.271	1.03	0.438
Protein content	0.94	0.471	11.05	<b>0.001</b>	1.03	0.450	1.83	0.167	1.80	0.068
Carbohydrate content	0.96	0.468	2.68	0.094	0.44	0.775	1.30	0.329	2.10	<b>0.030</b>
Protein/Carbohydrate	2.76	0.209	18.69	<b>&lt;0.001</b>	3.80	0.051	0.99	0.486	1.65	0.103
Specific hydrolytic activity	0.18	0.841	6.72	<b>0.007</b>	1.48	0.294	0.66	0.717	2.39	<b>0.013</b>
Specific dehydrogenase activity	0.88	0.500	46.62	<b>&lt;0.001</b>	3.61	0.058	1.63	0.216	0.90	0.555



**Figure 3:** Changes at depth below the groundwater table in dissolved organic carbon (DOC), dissolved oxygen (DO) and global bacterial parameters at control sites (white squares) and artificial groundwater recharge sites (black circles). Horizontal bars show ± 1 standard deviation for 3 replicate wells.

### Effect of AGR on sediment biofilm

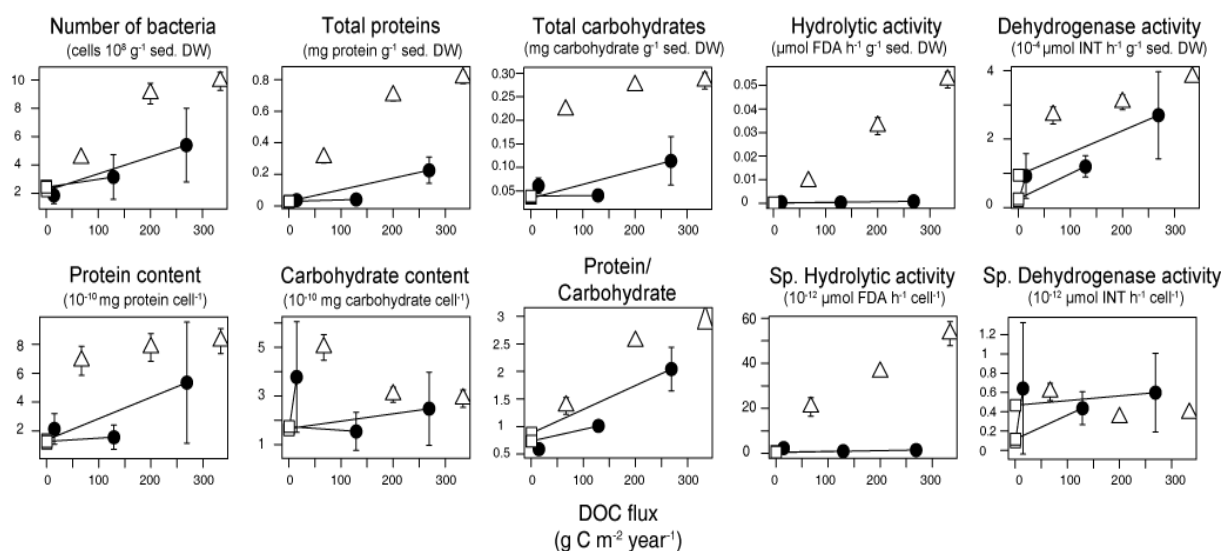
Number of bacteria, proteins, and dehydrogenase and hydrolytic activities were significantly higher at AGR sites than at control sites (Fig. 3, Table 2). AGR not only increased bacterial cell abundance but also stimulated the physiological activity of cells because the protein content per cell and specific bacterial activities were significantly higher at AGR sites (Fig. 4, Table 2). AGR did not affect the quantity of carbohydrates or the specific content of carbohydrates per cell but it significantly increased the P/C ratio. Dehydrogenase activity was the only bacterial parameter to exhibit a significant decreasing trend with increasing depth below the groundwater table. All bacterial parameters were significantly correlated with each other but only two of them, protein content and dehydrogenase activity, were positively correlated with DOC concentration (Table 3).



**Figure 4:** Changes at depth below the groundwater table in specific bacterial parameters at control sites (white squares) and artificial groundwater recharge sites (black circles). Horizontal bars show  $\pm 1$  standard deviation for 3 replicate wells.

### Effect of increasing DOC fluxes on sediment biofilm

Post hoc Tukey's tests showed that all bacterial parameters except the quantity of carbohydrates and global and specific hydrolytic activities were significantly higher ( $p < 0.05$ ) at AGR site 3. This site had the highest annual flux of DOC while AGR site 1 was characterized by the lowest DOC flux (Fig. 5). Number of bacteria, dehydrogenase activity, and the P/C ratio exhibited a clear increasing trend with increasing DOC fluxes.

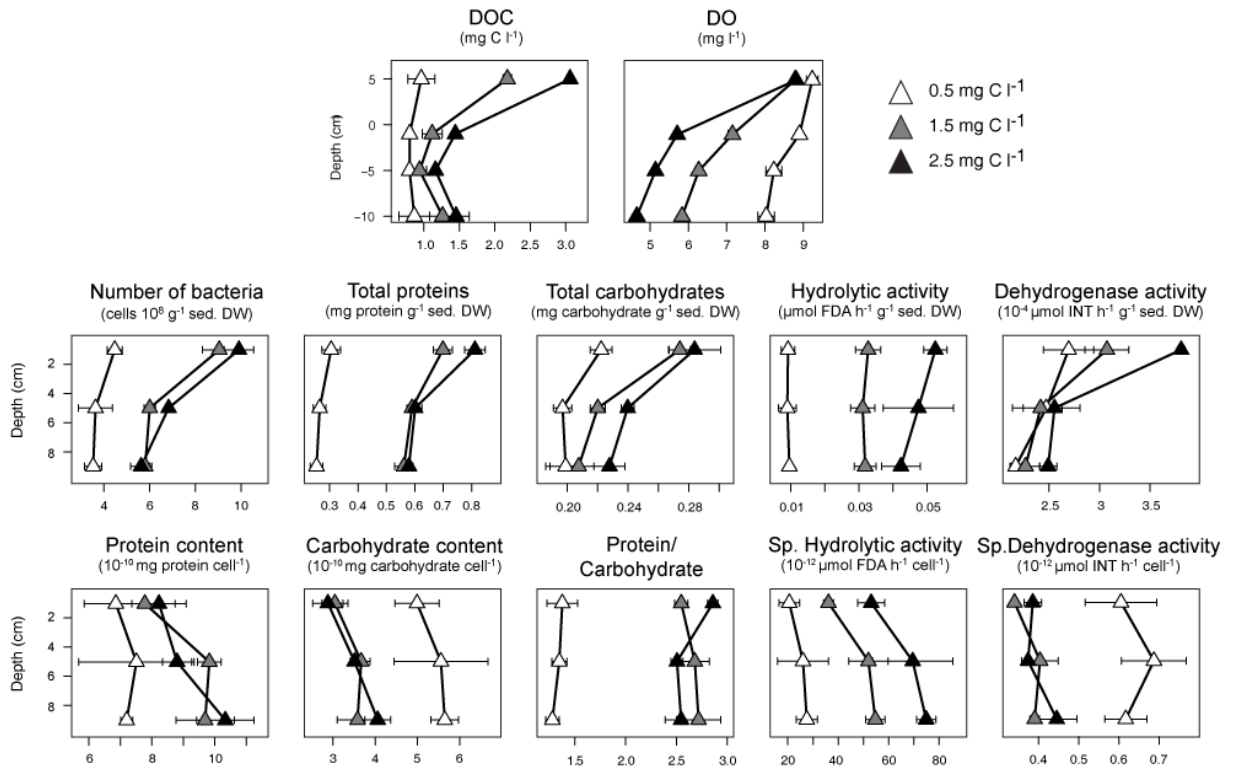


**Figure 5:** Global and specific bacterial parameters expressed as a function of dissolved organic carbon (DOC) flux at control sites (white squares), artificial groundwater recharge (AGR) sites (black circles) and slow filtration columns (white triangles). Black lines link control sites to their respective AGR sites. Vertical bars show  $\pm 1$  standard deviation for 3 replicate wells (depth of 10 cm below the groundwater table) and three replicate columns (depth of 1 cm below the sediment surface).

Number of bacteria, proteins, carbohydrates and dehydrogenase and hydrolytic activities increased significantly with increasing BDOC supply and decreased with depth (except hydrolytic activity) in slow filtration columns (Fig. 5 & 6, Table 4). The protein content per cell, P/C ratio and specific hydrolytic activity also increased significantly with increasing BDOC supply whereas a reverse trend was observed for carbohydrate content per cell and specific dehydrogenase activity. Bacterial activity resulted in a steep decreasing gradient in the concentration of DOC and DO in the slow filtration columns (Fig. 6).

All bacterial parameters were significantly correlated with each other and all of them were also positively correlated with DOC concentration (Table 3). Bacterial counts, biomass and activities with a supply of BDOC were 1.4 to 7.5 times higher than those measured under field conditions although DOC fluxes at AGR sites and slow filtration columns were comparable (Fig. 5).





**Figure 6:** Vertical gradients of dissolved organic carbon (DOC), dissolved oxygen (DO) and global and specific bacterial parameters at day 26 in slow filtration columns supplied with water containing 0.5 (white triangles), 1.5 (gray triangles) and 2.5 (black triangles) mg C - sodium acetate l<sup>-1</sup>. Horizontal bars show  $\pm 1$  standard deviation for 3 replicate columns.

**Table 3:** Pearson correlation coefficients between microbial parameters. For each parameter, the top and bottom lines show correlation coefficients for the field (n = 30) and laboratory (n = 27) experiments, respectively.

	DOC	Number of bacteria	Total proteins	Total carbohydrates	Hydrolytic activity
Number of bacteria	0.12*** 0.82***				
Total proteins	0.27** 0.63***	0.53*** 0.84***			
Total carbohydrates	0.004 0.80***	0.13* 0.72***	0.50*** 0.57***		
Hydrolytic activity	0.017 0.47***	0.16* 0.66***	0.55*** 0.85***	0.64*** 0.37**	
Dehydrogenase activity	0.40*** 0.67***	0.23** 0.54***	0.66*** 0.30**	0.28** 0.63***	0.35*** 0.14

0 \*\*\* 0.001 \*\* 0.01 \* 0.05 . 0.1

**Table 4:** Results of analysis of variance for testing the effect of an increasing supply of labile dissolved organic carbon (DOC as sodium acetate) and depth on sediment biofilm in slow filtration columns.

	DOC supply		Depth		DOC supply x Depth	
	F <sub>2,18</sub>	<i>p</i>	F <sub>2,18</sub>	<i>p</i>	F <sub>4,18</sub>	<i>p</i>
DOC	86.27	<0.001	124.16	<0.001	16.08	<0.001
DO	1042.01	<0.001	127.14	<0.001	4.75	0.008
Number of bacteria	130.44	<0.001	51.46	<0.001	2.78	0.058
Total proteins	592.66	<0.001	61.60	<0.001	7.08	0.001
Total carbohydrates	35.04	<0.001	47.16	<0.001	2.89	0.052
Hydrolytic activity	154.63	<0.001	1.29	0.298	1.13	0.375
Dehydrogenase activity	19.16	<0.001	61.49	<0.001	6.94	0.001
Protein content	12.21	<0.001	5.02	0.018	1.05	0.411
Carbohydrate content	49.94	<0.001	9.12	0.002	1.04	0.414
Protein/Carbohydrate	387.49	<0.001	1.19	0.326	2.57	0.073
Specific hydrolytic activity	59.13	<0.001	7.72	0.004	0.15	0.960
Specific dehydrogenase activity	91.75	<0.001	3.45	0.054	2.26	0.103

## DISCUSSION

### *Effect of AGR on sediment biofilm*

AGR with stormwater significantly stimulated the biomass and activities of attached bacteria in the upper layers of groundwater. Our finding corroborated the results of previous studies on the effect of AGR with lake water on bacterial enzyme activities (Miettinen et al., 1996). Kolehmainen et al. (2009) suggested that the increase in extracellular biofilm hydrolytic activity during groundwater recharge with lake water was likely to result from DOC supplies with high molecular weight needing fractionation before microbial assimilation. However, the relationship between attached bacterial biomass and activity is not necessarily linear because the biofilm can reach a critical thickness that limits substrate diffusion at depth into the biofilm (Lazarova & Manem 1995, Battin & Sengschmitt 1999). The concomitant increase in biomass and activity observed in our study was probably linked to the carbon-limited conditions prevailing in most deep water-table aquifers (i.e. vadose zone thickness > 2 m;

Goldscheider et al. 2006). Under strong carbon limitation, any increase in organic carbon supply stimulates biofilm growth and metabolism because groundwater microbes are in a phase of low biomass and metabolic activity (Bengtsson 1989, Kazumi & Capone 1994).

AGR with stormwater not only increased cell number but also resulted in a detectable shift in bacterial cell physiology that was characterized by elevated protein content per cell and specific dehydrogenase and hydrolytic activities. Experimental studies demonstrated that bacterial cells growing under carbon-limited conditions adopted a survival strategy characterized by a reduction in cell size and a reduced rate of protein synthesis (Wilson 1983, Characklis 1990, Watson 1998). There was also evidence that degradation of protein and other storage polymers occurred during survival (Reeve et al 1984, Bengtsson 1989, Freeman & Lock 1995). Thus, increased DOC supply at AGR sites probably reduced carbon limitation for microorganisms living in the upper layers of groundwater, thereby increasing the protein synthesis rate per cell and specific dehydrogenase and hydrolytic activities (Mermillod-Blondin et al. 2005).

Carbohydrate and the accumulation of carbohydrate per cell were the only microbial measures that were not significantly affected by AGR with stormwater. Carbohydrates were used to estimate EPS development in several studies because they are the main component of the matrix of extracellular polymeric substances (Underwood et al. 1995, Battin & Sengschmitt 1999). EPS production was correlated with biomass growth rate in some studies (see examples in Lapidou & Rittmann 2002) but was generally favored at slow growth rate as a response to starvation (Bengtsson 1989, Sutherland 2001). However, the EPS matrix can also constitute a carbon source during carbon depletion (Freeman & Lock 1995). The multiple factors involved in the regulation of EPS production, including resistance to desiccation and nutrient deprivation, probably act in concert at the water-table region of aquifers, thereby limiting the usefulness of carbohydrates as a valuable indicator of bacterial physiology.

On the contrary, the P/C ratio which took into account the investment of microorganisms in both cell and EPS production was strongly influenced by groundwater recharge with stormwater. As observed in slow filtrations, groundwater biofilm at AGR sites apparently favored protein synthesis rather than EPS production under conditions of increased DOC supply. The P/C ratio has been considered as a pertinent indicator of the physiological status

of biofilm because of the increase in protein synthesis and concomitant reduction in carbohydrate production during the exponential growth phase of microorganisms (Rice et al. 2000, D'Souza et al. 2005). For example, the P/C ratio was used to distinguish between exponential growth phase and nutrient-deficient conditions in planktonic microorganisms (Sakshaug et al 1983, Pick 1987). Pick (1987) found that the P/C ratio of lake plankton fell below 1 during strong nutrient limitation. In the present study, the P/C ratio was  $< 1$  at sites showing the lowest DOC fluxes (control sites and AGR site 1) whereas it was  $> 1$  at AGR sites 2 and 3 receiving the highest fluxes of DOC. This result suggests that the P/C ratio could also be used as a sensitive indicator for characterizing the availability of DOC and physiological state of biofilm in groundwater ecosystems under a range of recharge conditions.

#### *Effect of increasing DOC fluxes on sediment biofilm*

Differences in the response of sediment biofilm to stormwater infiltration among the 3 AGR sites showed that the change in bacterial biomass and activity was dependent upon the flux of DOC reaching the groundwater table. The increase in the number of bacteria, dehydrogenase activity, and P/C ratio at AGR sites was all the more pronounced when the flux of DOC was high. DOC concentration alone was not sufficient to account for variation in the biomass and activity of biofilm among AGR sites, because they were primarily influenced by large differences in annual groundwater recharge.

Our finding that biofilm growth and metabolism at AGR sites was driven by variation in the flux of DOC was corroborated by the results of slow filtration column experiments. The increase in biomass and activity of sediment biofilm in response to increasing flux of BDOC in slow filtration columns was congruent with the results of several studies demonstrating the stimulating effect of an easily degradable source of DOC on biofilm growth and metabolism (Findlay et al. 2003, Molz 1986). The comparison of bacterial response to increased DOC flux at AGR sites with that measured under conditions of increased BDOC supply in slow filtration columns indicated that stormwater reaching groundwater was probably a source of low biodegradable DOC. Indeed, bacterial parameters were up to 7.5 times lower in groundwater beneath AGR sites than in slow filtration columns although DOC fluxes under field and laboratory conditions were similar. The highest bacterial biomass and activity measured at AGR site 3 were at best equal to those measured with the lowest BDOC

treatment. Using the relationships between total protein, total carbohydrate and the flux of BDOC in slow filtration columns (total proteins =  $0.022 \text{ flux}^{0.633}$ ,  $n=9$ ,  $r^2=0.95$ ; total carbohydrates =  $0.115 \text{ flux}^{0.158}$ ,  $n=9$ ,  $r^2=0.87$ ), we estimated that less than 7% of DOC flux reaching the groundwater table beneath AGR sites was easily biodegradable. These estimates suggested that the bed of stormwater infiltration basins and the vadose zone were an efficient barrier in retaining the more labile fraction of DOC. Pabich et al. (2001), who examined the DOC loss rate as a function of depth below groundwater table in Cape Cod, USA, found that DOC was less labile under vadose zone thicknesses  $> 2$  m. Earlier studies also demonstrated that vertical changes in DOC and DO concentrations below the groundwater table at AGR sites could satisfactorily be accounted for by a simple mixing of groundwater and deoxygenated infiltrating stormwater impoverished in labile DOC rather than by biological uptake of labile DOC and concomitant DO consumption in groundwater (Datry et al. 2004, Foulquier et al. 2009b). Microbial stimulation beneath AGR sites in comparison to control sites was most probably linked to the dramatic increase in DOC flux rather than to an increase in the labile fraction of DOC reaching the water table. Even if a minimal fraction of the DOC remained biodegradable, AGR with stormwater would significantly enhance the quantity of labile DOC delivered to microorganisms because the annual groundwater recharge rate was 40 to 850 times higher at AGR sites than at control sites.

## CONCLUSIONS

The preservation of urban groundwater resources relies notably upon the capacity of best management practices to retain and degrade large quantities of organic matter generated during stormwater runoff on urban catchments. Groundwater biofilms hold much promise for assessing the DOC removal of stormwater infiltration systems because they experience severe organic carbon limitation in most pristine aquifers (Goldscheider et al. 2006). However, to the best of the authors' knowledge, this study was the first to document the response of groundwater sediment biofilm to AGR with stormwater. Groundwater biofilm was globally more abundant and active beneath AGR sites than at control sites. Individual cells also exhibited higher specific dehydrogenase and hydrolytic activities and favored protein synthesis rather than EPS production. The response of sediment biofilm to AGR with stormwater was all the more pronounced when the flux of DOC reaching the groundwater table was high. However, the activity of microorganisms beneath AGR sites was apparently limited by the weak biodegradability of DOC reaching the groundwater table, thereby

enabling the infiltration of large quantities of stormwater without inducing anoxification of groundwater. Our results highlight the need for future studies that simultaneously consider changes in the flux and biodegradability of DOC for predicting the response of groundwater biofilm to stormwater infiltration during the conception phase of AGR systems. We anticipate that the flux of DOC would primarily be controlled by the catchment area of the infiltration system whereas the biodegradability of DOC is most likely to be governed by the residence time of water in the infiltration bed and the vadose zone.

### ACKNOWLEDGEMENTS

This study was conducted within the framework of the experimental observatory for urban hydrology (OTHU, <http://www.graie.org/othu/>). It was funded by the French National Research Agency (project ANR-05-ECOT-006; <http://www.graie.org/ecopluiers/>), the French programme EC2CO-Cytrix from INSU/CNRS (project “NAPCOD”), the urban community of Lyon, and the Rhône-Alpes Region. We are indebted to G. Bouger, E. Malet, Y. Negrutiu, L. Simon and F. Vallier for their most dedicated support with the field and laboratory work.

### REFERENCES

- Alfreider A., Krössbacher M. and Psenner R. (1997) Groundwater samples do not reflect bacterial densities in subsurface systems. *Water Research* 31(4), 832-840.
- Allison D.G., Ruiz B., San Jose C., Jaspe A. and Gilbert P. (1998) Extracellular products as mediators of the formation and detachment of *Pseudomonas fluorescens* biofilms. *FEMS Microbiology Letters* 167, 179-184.
- Arnold C.P. and Gibbons C.J. (1996) Impervious surface coverage: the emergence of a key environmental indicator. *Journal of the American Planning Association* 62(2), 243-258.
- Barraud S., Gautier A., Bardin J.P. and Riou V. (1999) The impact of intentional stormwater infiltration on soil and groundwater. *Water Science and Technology* 39(2), 185-192.
- Battin T.J. and Sengschmitt D. (1999) Linking sediment biofilms, hydrodynamics, and river bed clogging: Evidence from a large river. *Microbial Ecology* 37, 185-196.

- Bengtsson G. (1989) Growth and metabolic flexibility in groundwater bacteria. *Microbial Ecology* 18(3):235-248.
- Bou C. and Rouch R. (1967) Un nouveau champ de recherches sur la faune aquatique souterraine. *Comptes-Rendus de l'Académie des Sciences Paris* 265 : 369-370.
- BURGEAP (1995) Etude de la nappe de l'Est Lyonnais. Hydrogeological Report, BURGEAP, Lyon, France. available from : <http://bwww.burgeap.fr>
- BURGEAP (2001) Etude hydrogéologique du secteur du bassin d'infiltration Django Reinhardt à Chassieu 69. Hydrogeological Report Ly.765/1.7302, BURGEAP, Lyon, France, available from : <http://bwww.burgeap.fr>
- Characklis W.G. (1990) Biofilms processes. In: *Biofilms*, Eds. W.G. Characklis and K.C. Marshall), John Wiley and Sons, New York, Chapter 7, pp 195-231.
- Christensen J.B., Jensen D.L. and Christensen T.H. (1996) Effect of dissolved organic carbon on the mobility of cadmium, nickel and zinc in leachate polluted groundwater. *Water Research*, 30, 3037-3049.
- Costerton J.W., Lewandowski Z., Caldwell D.E., Korber D.R. and Lappin-Scott H.M. (1995) Microbial biofilms. *Annual Review of Microbiology* 49, 711-745.
- Datry T., Malard F. and Gibert J. (2004) Dynamics of solutes and dissolved oxygen in shallow urban groundwater below a stormwater infiltration basin. *Science of the Total Environment* 329, 215-229.
- Datry T. (2003) Urbanisation et qualité des nappes phréatiques: réponse des écosystèmes aquatiques souterrains aux pratiques d'infiltration d'eau pluviale. PhD thesis. University Lyon 1, Lyon, France.
- Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A. and Smith F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28, 350-356.
- D'Souza F., Garg A. and Bhosle N.B. (2005) Seasonal variation in the chemical composition and carbohydrate signature compounds of biofilm. *Aquatic Microbial Ecology* 41, 199-207.
- Eiler A., Langenheder S., Bertilsson S. and Tranvik L.J. (2003) Heterotrophic bacterial growth efficiency and community structure at different natural organic carbon concentrations. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 3701-3709.
- Findlay S.E.G., Sinsabaugh R.L., Sobczak W.V. and Hoostal M. (2003) Metabolic and structural response of hyporheic microbial communities to variations in supply of dissolved organic matter. *Limnology and Oceanography* 48(4), 1608-1617.

- Fischer D., Charles E.G. and Baehr A.L. (2003) Effects of stormwater infiltration on quality of groundwater beneath retention and detention basins. *Journal of Environmental Engineering* 129(5), 464-471.
- Foulquier A., Malard F., Barraud S. and Gibert J. (2009a) Thermal influence of urban groundwater recharge from stormwater basins. *Hydrological Processes* 23(12):1701-1713.
- Foulquier A., Malard F., Mermillod-Blondin F., Datry T., Simon L., Montuelle B. and Gibert J. (2009b) Change in dissolved organic carbon and oxygen at the water table region of an aquifer recharged with stormwater: biological uptake or mixing? *Biogeochemistry* (submitted).
- Freeman C. and Lock M.A. (1995) The biofilm polysaccharide matrix: A buffer against changing organic substrate supply? *Limnology and Oceanography* 40(2), 273-278.
- Giry (1997) Mise en place d'un suivi qualitatif et quantitatif de la nappe de l'Est Lyonnais. MS Thesis, Ecole Supérieure de l'Energie et des Matériaux, Orléans, France.
- Goldscheider N., Hunkeler D. and Rossi P. (2006) Review: Microbial biocenoses in pristine aquifers and an assessment of investigative methods. *Hydrogeology Journal* 14(6), 926-941.
- Griebler C., Mindl B., Slezak D. and Geiger-Kaiser M. (2002) Distribution patterns of attached and suspended bacteria in pristine and contaminated shallow aquifers studied with an *in situ* sediment exposure microcosm. *Aquatic Microbial Ecology* 28, 117-129.
- Holden P.A. and Fierer N. (2005) Microbial processes in the vadose zone. *Vadose Zone Journal* 4, 1-21.
- Houri-Davignon C., Relexans J.C. and Etcheher H. (1989) Measurements of actual electron transport system (ETS) activity in marine sediments by incubation with INT. *Environmental Technology* 10, 91-100.
- Jørgensen P.E., Eriksen T. and Jensen B.K. (1992) Estimation of viable biomass in wastewater and activated sludge by determination of ATP, oxygen utilization rate and FDA hydrolysis. *Water Research* 26(11), 1495-1501.
- Kazumi J. and Capone D.G. (1994) Heterotrophic microbial activity in shallow aquifer sediments of Long Island, New York. *Microbial Ecology* 28(1), 19-37.



- Kolehmainen R.E., Langwaldt J.H. and Puhakka J.A. (2007) Natural organic matter (NOM) removal and structural changes in the bacterial community during artificial groundwater recharge with humic lake water. *Water Research* 41(12), 2715-2725.
- Kolehmainen R.E., Korpela J.P., Münster U., Puhakka J.A. and Tuovinen O.H. (2009) Extracellular enzyme activities and nutrient availability during artificial groundwater recharge. *Water Research* 43(2), 405-416.
- Konopka A. and Turco R. (1991) Biodegradation of organic compounds in vadose zone and aquifer sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 57(8), 2260-2268.
- Lapidou C.S. and Rittmann B.E. (2002) A unified theory for extracellular polymeric substances, soluble microbial products, and active and inert biomass. *Water Research* 36(11), 2711-2720.
- Lazarova V. and Manem J. (1995) Biofilm characterization and activity analysis in water and wastewater treatment. *Water Research* 29(10), 2227-2245.
- Leenheer J.A., Malcolm R.L., McKinley P.W. and Eccles L.A. (1974) Occurrence of dissolved organic carbon in selected ground-water samples in the United States. *Journal of Research of the US Geological Survey* 2(3), 361-369.
- Malard F. and Hervant F. (1999) Oxygen supply and the adaptations of animals in groundwater. *Freshwater Biology* 41, 1-30.
- Marmonier P., Fontvieille D., Gibert J. and Vanek V. (1995) Distribution of dissolved organic carbon and bacteria at the interface between the Rhone River and its alluvial aquifer. *Journal of the North American Benthological Society* 14(3), 382-392.
- Marsalek J. and Chocat B. (2002) International report: Stormwater management. *Water Science Technology* 46(6-7), 1-17.
- Maurines-Carboneill C., Pernelle J.J., Morin L., Sachon G. and Leblon G. (1998) Relevance of the INT test response as an indicator of the ETS activity in monitoring heterotrophic aerobic bacterial populations in activated sludges. *Water Research* 32, 1213-1221.
- Mermillod-Blondin F., Mauclair L. and Montuelle B. (2005) Use of slow filtration columns to assess oxygen respiration, consumption of dissolved organic carbon, nitrogen transformations, and microbial parameters in hyporheic sediments. *Water Research* 39(9), 1687-1698.
- Michalzik B., Kalbitz K., Park J.H., Solinger S. and Matzner E. (2001) Fluxes and concentrations of dissolved organic carbon and nitrogen - a synthesis for temperate forests. *Biogeochemistry* 52(2), 173-205.

- Miettinen I.T., Vartiainen T. and Martikainen P.J. (1996) Bacterial enzyme activities in ground water during bank filtration of lake water. *Water Research* 30(10), 2495-2501.
- Molz F.J., Widdowson M.A. and Benefield L.D. (1986) Simulation of microbial growth dynamics coupled to nutrient and oxygen transport in porous media. *Water Resources Research* 22(8), 1207-1216.
- Morris B.L., Lawrence A.R.L., Chilton P.J.C., Adams B., Calow R.C. and Klinck B.A. (2003) *Groundwater and its Susceptibility to Degradation: A Global Assessment of the Problem and Options for Management*. Early Warning and Assessment Report Series, RS.03-3. United Nations Environment Programme, Nairobi, Kenya.
- Niemczynowicz J. (1999) Urban hydrology and water management – present and future challenges. *Urban Water* 1(1), 1-14.
- Pabich W.J., Valiela I and Hemond H.F. (2001) Relationship between DOC concentration and vadose zone thickness and depth below water table in groundwater of Cape Cod, U.S.A.. *Biogeochemistry* 55(3), 247-268.
- Peterson G.L. (1977) A modification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry* 83(2), 346-356.
- Pick F.R. (1987) Carbohydrate and protein content of lake seston in relation to plankton nutrient deficiency. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 44, 2095-2101.
- Pitt R., Clark S. and Field R. (1999) Groundwater contamination potential from stormwater infiltration practices. *Urban Water* 1(3), 217-236.
- Porter K.S. and Feig Y.S. (1980) The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnology and Oceanography* 25(5), 943-948.
- R Development Core Team (2006) *R: a language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing: Vienna. <http://www.R-project.org>.
- Rauch-Williams T. and Drewes J.E. (2006) Using soil biomass as an indicator for the biological removal of effluent-derived organic carbon during soil infiltration. *Water Research* 40(5), 961-968.
- Reeve C.A., Bockman A.T. and Martin A. (1984) Role of protein degradation in the survival of carbon-starved *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology* 157(3), 758-763.
- Rice A., Hamilton M. and Camper A. (2000) Apparent surface associated lag time in growth of primary biofilm cells. *Microbial Ecology* 40, 8-15.

- Sakshaug E., Andresen K., Myklestad S and Olsen Y. (1983) Nutrient status of phytoplankton communities in Norwegian waters (marine, brackish, and fresh) as revealed by their chemical composition. *Journal of Plankton Research* 5(2), 175-196.
- Schönholzer, F., Hahn, D. and Zeyer, J. (1999) Origins and fate of fungi and bacteria in the gut of *Lumbricus terrestris* L. studied by image analysis. *FEMS Microbiology Ecology* 28, 235-248.
- Sutherland IW (2001) Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology* 147, 3-9.
- Underwood G.J.C., Paterson D.M. and Parkes R.J. (1995) The measurement of microbial carbohydrate exopolymers from intertidal sediments. *Limnology and Oceanography* 40(7), 1243-1253.
- Uhlinger D.J. and White D.C. (1983) Relationship between physiological status and formation of extracellular polysaccharide glycocalyx in *Pseudomonas atlantica*. *Applied and Environmental Microbiology* 45(1), 64-70.
- United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division (2007) World Population Prospects: The 2006 Revision, Highlights. Working Paper No. ESA/P/WP.202. United Nations : New York.
- US EPA (1991) Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. Report EPA/600/4-90/27, Fourth edition, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C.
- Watson S.P., Clements M.O. and Foster S.J. (1998) Characterization of the starvation-survival response of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology* 180(7), 1750-1758.
- Wilson J.T., McNabb J.F., Balkwill D.L. and Ghiorse W.C. (1983) Enumeration and characterization of bacteria indigenous to shallow water-table aquifer. *Ground Water* 21(2),134-142.

## **4.2. RELATIVE INFLUENCES OF DOC FLUX AND SUBTERRANEAN FAUNA ON MICROBIAL ABUNDANCE AND ACTIVITY IN AQUIFER SEDIMENTS: NEW INSIGHTS FROM <sup>13</sup>C-TRACER EXPERIMENTS. (ARTICLE 4)**

Il est communément admis que la structuration des communautés aquatiques souterraines est dépendante des apports en matière organique provenant des écosystèmes de surface (Gibert & Deharveng 2002). Dans les aquifères poreux, le transfert de la matière organique dissoute vers les invertébrés souterrains passe par le compartiment microbien qui se situe à la base des chaînes trophiques (Simon *et al.* 2003). Si la régulation (ascendante) des communautés microbiennes par la ressource a fait l'objet d'un grand nombre d'études, très peu de données permettent aujourd'hui de documenter la régulation descendante des communautés microbiennes par les invertébrés souterrains. Récemment, Boulton *et al.* (2008) ont pourtant évalué que les invertébrés souterrains pouvaient avoir un effet prépondérant sur le compartiment microbien et par conséquent sur les processus de transformation de la matière organique. L'objectif de cet article est donc de quantifier et évaluer les importances relatives de la ressource trophique et de la présence de consommateurs sur l'activité et l'abondance des micro-organismes.

Dans cette optique, une expérimentation de laboratoire a été menée en colonnes infiltrantes (Mermillod-Blondin *et al.* 2005a) afin de quantifier l'influence relative d'une augmentation de COD biodégradable et de l'activité de bioturbation et de nutrition de l'amphipode *Niphargus rhenorhodanensis* sur le compartiment microbien. Afin de quantifier précisément les taux de nutrition de *N. rhenorhodanensis* sur le compartiment microbien, une deuxième expérimentation fondée sur un traçage de la source carbonée par enrichissement en <sup>13</sup>C a été

développée en microcosmes afin de modéliser les flux de carbone dans la chaîne trophique (DOC → micro-organismes → invertébrés).

Les travaux effectués en colonnes infiltrantes montrent que l'abondance bactérienne ainsi que la biomasse et l'activité microbienne sont essentiellement influencées par le flux de carbone organique dissous apporté, la présence de l'amphipode *N. rhenorhodanensis* n'ayant qu'une influence restreinte sur les micro-organismes. Par exemple, si l'abondance bactérienne est stimulée par 2 lorsque le flux de COD biodégradable est multiplié par 3, celle-ci n'est aucunement affectée par les activités de *N. rhenorhodanensis*. L'ensemble de nos résultats supporte la vision communément admise dans les écosystèmes souterrains d'une prépondérance de la régulation ascendante des communautés microbiennes par la matière organique (Ghiorse & Wilson 1988). La modélisation des flux de carbone en microcosmes avec traçage du  $^{13}\text{C}$  montre que le taux de nutrition de l'amphipode est trop limité pour modifier significativement le compartiment microbien. Alors que les micro-organismes incorporent 890  $\mu\text{g}$  de DOC dans leurs tissus au cours de l'expérimentation, *N. rhenorhodanensis* présente une assimilation de carbone microbien 20 fois inférieure (41  $\mu\text{g}$  de C incorporé). Dans ces conditions, l'amphipode souterrain ne peut produire de réduction significative de la biomasse des micro-organismes. De plus, les expérimentations en colonnes infiltrantes indiquent que la bioturbation induite par *N. rhenorhodanensis* n'affecte pas significativement la structure physique de la colonne sédimentaire et les conditions de vie des micro-organismes.

Les faibles activités de nutrition et de bioturbation de l'amphipode souterrain sont probablement liées au phénomène d'hypométabolisme rencontré chez *N. rhenorhodanensis* (Hervant *et al.* 1997) et chez la plupart des invertébrés souterrains soumis à des stress nutritifs (Hervant & Renault 2002). Dans ces conditions, les organismes souterrains tels que *N. rhenorhodanensis* qui présentent des adaptations métaboliques à des milieux pauvres en ressources nutritives (stratégie d'économie énergétique) ont probablement un rôle très limité sur les flux de matière et d'énergie dans les écosystèmes souterrains.

## Article 4

# Relative influences of DOC flux and subterranean fauna on microbial abundance and activity in aquifer sediments: new insights from $^{13}\text{C}$ -tracer experiments

A. FOULQUIER <sup>1</sup>, L. SIMON <sup>1</sup>, F. GILBERT <sup>2,3</sup>,

F. FOUREL <sup>4</sup>, F. MALARD <sup>1</sup>, F. MERMILLOD-BLONDIN <sup>1</sup>

<sup>1</sup> UMR CNRS 5023, Ecologie des Hydrosystèmes Fluviaux, Université Claude Bernard Lyon 1, Bât Forel, 43 Bd 11 Novembre 1918, F-69622 Villeurbanne Cedex, France.

<sup>2</sup> Université de Toulouse ; UPS, INP ; EcoLab (Laboratoire d'écologie fonctionnelle) ; 29 rue Jeanne Marvig, F-31055 Toulouse, France

<sup>3</sup> CNRS ; EcoLab ; F-31055 Toulouse, France

<sup>4</sup> UMR CNRS 5125, PaléoEnvironnements & PaléobioSphère, Université Claude Bernard Lyon 1, Bât Géode, 43 Bd 11 Novembre 1918, F-69622 Villeurbanne Cedex, France.

Soumis à *Freshwater Biology*

## ABSTRACT

Groundwaters are considered as bottom-up controlled ecosystems due to their dependence on organic matter supply from surface ecosystems. Micro-organisms are generally assumed to form the base of the food web and to respond strongly to organic matter supply. Although the bottom-up control of micro-organisms by carbon sources has been largely documented, the potential top-down control of obligate groundwater invertebrates on micro-organisms has never been tackled. Therefore, the main aims of the present study were to (1) quantify the relative influences of the activity of a subterranean amphipod (*Niphargus rhenorhodanensis*) and the flux of dissolved organic carbon (DOC) on microbial biofilm and organic matter processing in slow-filtration columns mimicking an alluvial aquifer, and (2) determine the feeding rate of *N. rhenorhodanensis* on sedimentary microbes by tracing the flux of a <sup>13</sup>C-labeled source of DOC in batches. Slow-filtration column experiments showed that microbial abundance, biomass and activity were primarily controlled by DOC flux because the activity of *N. rhenorhodanensis* had only a slight effect on the microbial compartment. Modelling of carbon fluxes in the <sup>13</sup>C-tracer experiments indicated that the feeding activity of the amphipod was too low to significantly modify microbial growth and activity. Therefore, our experiments supported the assumption that groundwater ecosystems are bottom-up controlled. The low influence of *N. rhenorhodanensis* on the microbial compartment was probably linked to its slow metabolism which was an adaptation to food limitation in groundwater. Our results highlight the need for further experiments to examine the relationship between metabolic rates of subterranean organisms and their role in ecosystem functioning.

## KEY WORDS

animal-microbe interactions, top-down control,  
bottom-up control, *Niphargus rhenorhodanensis*, carbon cycle

## INTRODUCTION

Aquatic subterranean ecosystems are heterotrophic, their functioning depending on the supply of allochthonous organic matter originating from surface ecosystems. The lack of photosynthesis (and primary production) in groundwater implies that the food webs are truncated (Gibert & Deharveng, 2002). Theory predicts that heterotrophic and organic matter-limited environments such as groundwater ecosystems are bottom-up controlled because the quantity and quality of organic matter entering the system determine the food web structure (Notenboom, Plénet & Turquin, 1994; Malard *et al.*, 1994; Datry, Malard & Gibert, 2005). The soil and vadose zone act as strong physical, chemical and biological filters that dramatically reduce the transfer of organic detritus (particulate organic matter – POM) from surface to groundwater. Consequently, dissolved organic carbon (DOC) is the main source of food for life in aquifers and micro-organisms that process DOC represent a strong link of energy and nutrients to higher trophic levels (Simon, Benfield & Macko, 2003). According to the bottom-up control hypothesis, microbial biomass and activity in aquifer sediments are tightly linked to available DOC and microbial biofilm acts as a main source of food for groundwater invertebrates (Starr & Ghillam, 1993).

Although this “bottom-up view” of groundwater ecosystems is largely accepted, there have been no attempts to quantify the influence of the obligate groundwater fauna on the microbial compartment and DOC dynamics (Gibert *et al.*, 2009). In a recent review, Boulton *et al.* (2008) pointed out that obligate groundwater invertebrates should affect many of the microbial processes involved in the C and N cycles in a similar way to that observed for surface dwelling aquatic invertebrates. In sediments, grazing activities of invertebrates may enhance biofilm productivity (e.g. Traunspurger, Bergtold & Goedkoop, 1997), whereas bioturbation activities (burrowing, gallery building, and fecal pellet production) may indirectly influence microbial communities through modifications of physico-chemical conditions (Danielopol, 1989; Mermillod-Blondin & Rosenberg, 2006). However, clear evidence of the role of invertebrates on microbial processes in sediment has essentially concerned surface dwelling species, which lack many of the behavioural and physiological adaptations to food limitation shared by most obligate groundwater invertebrates (Hervant, Mathieu & Barré, 1999). Thus, the main aim of the present study was to test whether a model obligate-groundwater species, the amphipod *Niphargus rhenorhodanensis* Schellenberg 1937, had a significant influence on the microbial compartment and organic matter processing in aquifer sediments. We developed two laboratory experiments in order to (1) quantify the



relative influences of the amphipod activities (top-down control) and the flux of DOC (bottom-up control) on the microbial compartment and DOC processing in slow-filtration columns mimicking an alluvial aquifer habitat, and (2) determine the feeding rate of *N. rhenorhodanensis* on attached bacteria by tracing the flux of a  $^{13}\text{C}$ -labeled source of DOC in batches.

## MATERIAL AND METHODS

### *Collection of sediments*

Gravel collected from the Rhône River was sieved manually to select particle sizes ranging from 5-8 mm and then was cleaned with deionized water before being dried at 60°C. For the two experiments, 10 kg of fresh sand was collected at a depth of 1 m below the bed of a gravel pit intersecting the water table of a glaciofluvial aquifer using the Bou-Rouch method (Bou & Rouch, 1967). DOC concentrations in groundwater collected from this glaciofluvial aquifer were between 0.4 and 0.9 mg L<sup>-1</sup>. Particulate organic carbon contained in the collected sand was  $0.42 \pm 0.03$  mg g<sup>-1</sup> of dry mass and was dominated by bacteria-associated carbon. After collection, the sand was manually sieved to select particle sizes ranging from 100-1000 µm and then kept in an oxygenated water bath in the laboratory for two days before experiments started.

### *Collection of subterranean organisms*

The obligate groundwater amphipod *Niphargus rhenorhodanensis* (dry weight = 1.0-1.3 mg) inhabits both karstic and alluvial aquifers. This is an opportunistic species showing a generalist feeding strategy (Ginet, 1960; Danielopol, 1989). Individuals of *N. rhenorhodanensis* were collected using traps sunk in the sediments of a ditch draining the alluvial aquifer of the Dombes Forest, France (45°58'28'' N, 5°24'25'' E, clade I in Lefébure *et al.*, 2007). To acclimatize animals to experimental conditions (temperature, granulometry and food), they were maintained in the laboratory for more than 15 days before experiment initiation.

*Experiment I: Relative influences of *N. rhenorhodanensis* and DOC flux on the microbial compartment in slow filtration microcosms*

Slow filtration column experiments were conducted to test for the influences of amphipod activity (top-down control) and the flux of DOC (bottom-up control) on the microbial compartment and DOC processing in sediments. Columns had an inside diameter of 10 cm and consisted of two experimental modules (10 cm high) topped by a third module of 5 cm in height (Fig. 1a). They were filled with inert gravel and fresh sand to a height of 15 cm. About 10 cm of water was left above the sediment surface. Masses of gravel (500 g, 500 g and 400 g) and sand (150 g, 150 g and 120 g) were alternately introduced into the columns to obtain a heterogeneous porous media. During sediment introduction, particle tracers (luminophores) were deposited at depths of 2.5-3.5 cm (1 g of yellow luminophores) and 6-7 cm (1 g of pink luminophores) below the sediment surface to estimate sediment reworking induced by amphipods (method described below).

Experiments were performed at constant temperature ( $15 \pm 0.5^\circ\text{C}$ ) in the dark. The columns were supplied from the top with reconstituted groundwater ( $96 \text{ mg L}^{-1} \text{ NaHCO}_3$ ,  $39.4 \text{ mg L}^{-1} \text{ CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $60 \text{ mg L}^{-1} \text{ MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  and  $4 \text{ mg L}^{-1} \text{ KCl}$ ,  $19 \text{ mg L}^{-1} \text{ Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) using a peristaltic pump controlling a constant infiltration flow rate of  $2 \text{ mL min}^{-1}$ . Supplied water was aerated to maintain concentrations of DO between 8.5 and  $9.5 \text{ mg L}^{-1}$  at the inlet of the columns. The experiment was designed to couple three modalities of DOC flux (i.e. 0.5, 1.5 and  $2.5 \text{ mg L}^{-1}$  of easily degradable DOC supplied as sodium acetate) with two modalities of fauna (absence or presence of 10 individuals of *N. rhenorhodanensis*) in order to test for the interaction between DOC supply and the activity of *N. rhenorhodanensis* on organic matter processing and microbial parameters (Fig. 1b). A total of 6 experimental treatments were tested with three replicate columns per treatment. Dissolved acetate supplied to all columns was enriched with 0.2% of  $^{13}\text{C}$ -marked acetate ( $^{13}\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ , 99 atom%  $^{13}\text{C}$ , Sigma Aldrich) to determine the assimilation of DOC in attached bacteria and amphipods.

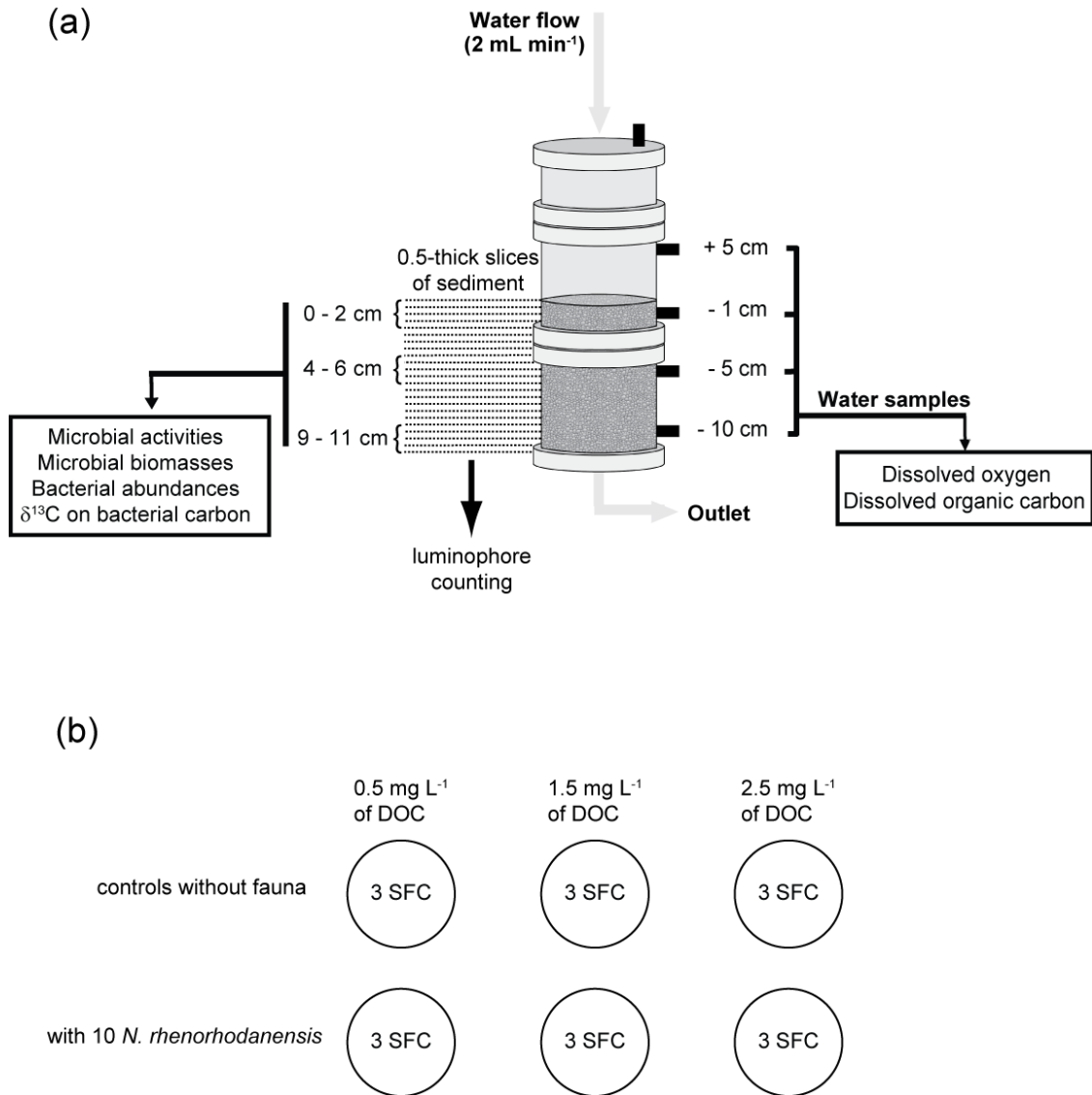
After one week of column stabilization, 10 individuals of *N. rhenorhodanensis* were introduced in half of the columns ( $n = 3$  columns per DOC treatment). Amphipod density in slow filtration columns (i.e.  $8.4 \text{ individuals L}^{-1}$  of sediment) was similar to that measured in artificial substrata inserted in the bed sediment of streams ( $7.2 \pm 2.6 \text{ individuals L}^{-1}$  of sediment, Mathieu & Essafi-Chergui, 1990). Measurements of DOC and dissolved oxygen

(DO) were made at four depths (5 cm above the sediment surface, and 1, 5 and 10 cm below the sediment surface) on days 0 (before addition of amphipods in the system), 6, 10, 14, 18, 22 and 26 after the addition of *N. rhenorhodanensis* to determine the removal rates of DOC and DO (aerobic respiration) in slow filtration columns (Fig. 1a). After the last measurements (day 26), columns were dismantled, the water layer was removed and columns were opened to sample sediment (Fig. 1a). The top 11 cm of fresh sediment were sampled in 0.5 cm thick slices. Each layer was sieved to remove gravel and invertebrates, homogenised, and a 1 g sub-sample was used for sediment reworking analyses (see below). Remaining fresh sediments corresponding to three layers (0-2, 4-6 and 9-11 cm below the sediment surface) were used to analyse the  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  ratio of bacteria (incorporation of acetate into bacteria, see model in data analysis section), bacterial abundance (numbers of bacteria and active eubacteria), microbial activities (hydrolytic activity, dehydrogenase activity) and biochemical markers of biofilm biomass (carbohydrates and proteins). Carbohydrates and proteins were used to estimate biomasses of extracellular polymeric substances and bacterial cell, respectively (Foulquier *et al.*, submitted). Individuals of *N. rhenorhodanensis* were recovered from columns to analyze their  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  ratio and calculate the incorporation rate of acetate in animals (see model in data analysis section).

### *Experiment II: Incorporation of DOC into the food web*

We designed a second experiment with simplified experimental units to quantify the assimilation of DOC in attached bacteria and subterranean amphipods. A total of 36 erlenmeyer flasks were used to measure bacterial growth and the temporal dynamics of  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  ratio in bacteria and amphipods. Flasks (250 mL) were filled with 30 g dry mass of fresh sand (collected and treated as in experiment I) and 160 mL of reconstituted groundwater (ionic composition as in Experiment I). Reconstituted groundwater was enriched with  $^{13}\text{C}$ -labeled acetate ( $^{13}\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ , 99 atom%  $^{13}\text{C}$ ) to fit an initial concentration of 25 mg L<sup>-1</sup> of DOC and a  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  ratio of 47 atom%. Four individuals of *N. rhenorhodanensis* were introduced in half of the flasks (n = 18) to measure their capacity to assimilate DOC and modify DOC incorporation in attached bacteria. At six dates during the experiment (0 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h and 96 h), three flasks of each treatment (absence or presence of *N. rhenorhodanensis*) were sacrificed to determine DOC concentrations in the overlying water, number of bacteria and

active eubacteria on the sediment, and the  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  ratios of the bacteria and amphipods (used for calculation of assimilation rates, see model in data analysis section).



**Figure 1:** Schematic representation of (a) slow filtration columns indicating the positions of sampling and (b) experimental design of the experiment I in slow filtration columns. SFC = slow filtration column.

### *Physical, chemical and microbial analyses*

#### Sediment reworking analyses

Sediment reworking by amphipods was assessed by using luminophores (natural sediment particles of 350–500  $\mu\text{m}$  in size, dyed with a fluorescent paint) as particle tracers (Gerino *et*

*al.*, 1998). Each sub-sample of fresh sediment collected at the end of the experiment from 0.5 cm thick slices was lyophilised for luminophore counting. Detection of luminophores was performed under UV-light (digital camera Olympus C-2500L) for further automatized counting on acquired images (image analysis software Image-Pro Plus). Luminophores quantities were finally reported to the quantity of dry sand collected in each slice.

#### Dissolved oxygen and DOC analyses

DO measurements in slow filtration columns were made with an oxygen micro-sensor probe (Unisense, Aarhus, Denmark). The probe was directly connected to the 4 lateral water derivation outlets, thereby preventing any contact with atmospheric oxygen. Water samples for DOC analyses were filtered through HAWP filters (porosity: 0.45  $\mu\text{m}$ , Millipore) and analyzed with a total carbon analyzer (multi N/C<sup>®</sup> 3100, Analytik Jena) based on thermocatalytic oxidation and MC-NDIR detection after removing inorganic carbon with hydrochloric acid (5  $\mu\text{L ml}^{-1}$ ) and CO<sub>2</sub> stripping under 15 minutes of oxygen flow.

#### Stable isotope analysis

Sediment samples (with attached bacteria) and amphipods were oven-dried at 50°C for more than 48 h and then crushed using a mortar and pestle. About 500 mg of dry sediments were placed in pre-cleaned Oakridge centrifugation tubes and HCl 2 M was added for 12 h at room temperature to remove calcite. After centrifugation, the supernatant was discarded; sediments were rinsed three times with ultrapure water and oven-dried at 50°C. An amount of 2.5 mg of dry sediments were weighted in tin capsules for stable isotope analysis. Dry amphipods were placed in glass vials and acidified with 400  $\mu\text{L}$  of HCl 2 M to remove calcium carbonate. Samples were oven-dried at 50°C without subsequent rinse. A total of 250  $\mu\text{g}$  of dry amphipod were weighed in tin capsules for stable isotope analysis.

Stable isotope ratios of carbon (<sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C) were measured by continuous flow stable isotope ratio mass spectrometer (CF-IRMS) using a GVI Isoprime mass spectrometer interfaced with a Eurovector EuroEA3028-HT elemental analyser. <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C ratios were expressed as  $\delta$  in part per thousand (‰) and referenced to V-PDB standard. The analytical precision achieved for tyrosine standards analysed along with the samples was better than 0.1‰ ( $\pm$  standard deviation).

### Microbiological analyses

The DNA intercalating dye (DAPI) and a Cy3-probe (EUB 338, eubacteria) were used on sediment samples to determine the total number of bacteria and the percentage of active eubacteria. Sediment samples (1 g) were fixed, homogenised, spotted on slides, and hybridized according to Mermillod-Blondin *et al.* (2005). Slides were mounted with Citifluor solution (Citifluor Ltd, London, U.K.) and the preparations were examined at 1000 X magnification with a BH2-RFCA Olympus microscope fitted for epifluorescence with a high-pressure mercury bulb (50 W) and filter sets BP 405 (for DAPI) and BP 545 (for Cy3). Bacteria from the samples were analyzed in 20 fields per sample with up to 30 cells per field. Numbers of DAPI- and Cy3-bacteria were counted separately from the same field to determine the percentages of active eubacteria (% Cy3-bacteria/DAPI bacteria). Total numbers of bacteria were expressed as number of cells  $g^{-1}$  dry weight (DW) of sediment.

The 2-(p-iodophenyl)-3-(p-nitrophenyl)-5-phenyl tetrazolium chloride (INT) dye was used to measure dehydrogenase activity as modified from Hourri-Davignon, Relexans & Etcheher (1989). Sediment samples (1 g fresh weight) were incubated with a 0.02% INT solution (final solution) for 2 h at 15°C and then filtered on a nylon membrane (0.22  $\mu m$ , MSI). Controls were prepared by adding formaldehyde (2% final) in INT solution. Extraction of INT-formazan was made in vials containing 5 ml of methanol. Each vial was sonicated at 100 W during two periods of 60 s using a sonicator fitted with a 2-mm diameter probe (Sonicator XL 2020) to increase solvent extraction yield (Maurines-Carboneill *et al.*, 1998). The INT-formazan extract was measured by a spectrophotometer adjusted at 480 nm against a control blank. The quantity of INT-formazan was computed by using the molar extinction coefficient of 18,000  $M^{-1}cm^{-1}$  at 480 nm and was expressed as  $\mu mol$  of INT  $h^{-1} g^{-1}$  DW of sediment.

Hydrolytic activity was estimated using the fluorescein diacetate (FDA) hydrolysis method (Jørgensen, Eriksen & Jensen, 1992) Sediment samples (1 g fresh weight) were placed into 3 mL of a pH 7.6 phosphate buffer solution with 0.15 mL of 4.8 mM FDA solution. The incubation was maintained for 1 to 3 h until a green coloration of fluorescein appeared. The reaction was stopped by freezing the sample after the addition of 4.5 mL of a solution of  $HgCl_2$  (400  $mg L^{-1}$ ). Fluorescein concentration was estimated from the absorbance of the filtered supernatant (0.45  $\mu m$ , Millipore) measured at 490 nm and was expressed as  $\mu mol$  of FDA  $h^{-1} g^{-1}$  DW of sediment.

Total proteins were directly measured within the fresh sediment according to the micro Lowry method modified by Peterson (1977), using the Sigma Protein Assay Kit (P 5656 Sigma

Diagnostics, St Louis, MO, USA). Concentration was expressed as mg of protein g<sup>-1</sup> DW of sediment.

Carbohydrates were quantified on dry sediment (24 h at 60°C in an oven) using the Dubois method (Dubois *et al.*, 1956). A homogenised sample of dry sediment (0.25 g) was mixed with 1 mL of a phenol solution (10%) and 5 mL of sulphuric acid (95%). Incubation was performed at room temperature in the dark for 1 h. Absorbance was measured at 495 nm. Absorbance of the supernatant was measured at 495 nm and carbohydrate content was expressed as mg of carbohydrates g<sup>-1</sup> DW of sediment.

### *Data analysis*

#### Experiment 1

The quantification of luminophore redistribution following sediment reworking by *N. rhenorhodanensis* was realized using a model inspired by the gallery-diffusion model of François *et al.* (2002). This model describes both the diffusive-like mixing of particles in the region of intense burrowing activity ( $D_b$ ), and the non-local mixing pattern ( $r$ ) associated with a biologically induced transfer of particles from one layer to another in a discontinuous pattern (i.e. non-continuous transport; Boudreau, 1986; Meysman, Boudreau & Middelburg, 2003). Detailed information about this model can be found in Gilbert *et al.* (2007). Biodiffusion-like coefficients of particles obtained for yellow and rose luminophores were compared among DOC and fauna treatments using a two-way analysis of variance (ANOVA). Tuckey's post hoc tests were performed to identify significant pairwise differences between treatments.

Concentrations of DO and DOC measured on day 26 at 4 depths in slow filtration columns were used to calculate the removal rate of DOC and DO in three sediment layers (i.e. 0-2, 2-5 and 5-10 cm below the sediment surface) as follows:

$$RR = (\Delta_C \times Q) / (V \times P) \quad (1)$$

Where:

RR: Removal rate of DOC and DO in mg h<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup> sediment

$\Delta_C$ : Difference in DOC or DO concentration (mg L<sup>-1</sup>) between 2 consecutive layers

Q: water discharge ( $L h^{-1}$ ) through the sediment layer

V: volume of the sediment layer (L)

P: porosity

A three-way ANOVA was used to test for the effects of depth, DOC flux and amphipods on the removal rates of DO and DOC, microbial parameters (abundance, activities and biochemical markers) and  $^{13}C/^{12}C$  ratio of attached bacteria. A one-way ANOVA was used to compare the  $^{13}C/^{12}C$  ratio of amphipod tissues collected at the end of the experiment between DOC treatments. Tuckey's post hoc tests were performed to identify significant pairwise differences between treatments.

The fraction of DOC incorporated into the microbial compartment ( $f_S$ ) was calculated by a simple mass balance model, where an infinitesimal amount of acetate was incorporated into attached bacteria and then left the system:

$$f_S = -\ln\left(\frac{\delta^{13}C_{BACT} - \delta^{13}C_A^i}{\delta^{13}C_{BACT}^i - \delta^{13}C_A^i}\right) \quad (2)$$

where  $\delta^{13}C_A^i$  and  $\delta^{13}C_{BACT}^i$  were the carbon isotope composition of acetate and attached bacteria, respectively, at the start of the experiment, and  $\delta^{13}C_{BACT}$  was the carbon isotope composition of attached bacteria at the end of the experiment. The fraction ( $f_N$ ) of DOC incorporated into subterranean amphipods was calculated as follows:

$$f_N = -\left(\frac{\delta^{13}C_N^f - \delta^{13}C_N^i}{\delta^{13}C_N^f - \delta^{13}C_A^i}\right) \quad (3)$$

where  $\delta^{13}C_N^i$  and  $\delta^{13}C_N^f$  are the carbon isotope composition of amphipods at the start and at the end of the experiment, respectively.

## Experiment II

Student t-tests were performed on measurements made at 0 h to verify that there were no differences in DOC concentrations, bacterial counts and  $^{13}C/^{12}C$  ratios of attached bacteria between the 2 series of flasks ( $n = 3$ ) attributed to each fauna treatment before addition of *N. rhenorhodanensis*. After 0 h, a two-way ANOVA with fauna (presence or absence of *N. rhenorhodanensis*) and time (12 h, 24 h, 48 h, 72 h and 96 h) was used to test for differences



in the temporal dynamics of DOC, bacterial counts, and  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  ratios of attached bacteria between fauna treatments. A one-way ANOVA was used to compare the  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  ratios of amphipod tissues among dates.

#### *Modelling of carbon fluxes*

The modelling of carbon fluxes between DOC, attached bacteria and *N. rhenorhodanensis* was performed using a similar approach as in Mauclaire *et al.* (2003). Bacteria growth was assumed to follow Monod kinetics (Monod, 1942). The change in DOC concentration ( $C_{DOC}$ ) over time  $t$  in the experimental system was described by the following differential equation:

$$\frac{dC_{DOC}}{dt} = -\frac{1}{Y_1} \mu_1 \frac{C_{DOC}}{K_s + C_{DOC}} B \quad (4)$$

where  $B$  was the bacterial biomass,  $K_s$  was the Monod constant,  $\mu_1$  was the maximum growth rate of bacteria, and  $Y_1$  was the carbon conversion efficiency between acetate and bacterial biomass. The feeding rate of amphipods on bacteria was assumed to depend on the bacterial biomass and we neglected biomass changes due to natural decay, which yielded the equation:

$$\frac{dN}{dt} = \mu_2 BN \quad (5)$$

with  $N$  as amphipod biomass and  $\mu_2$  as growth rate.

Total change of bacteria biomass was then calculated as follows:

$$\frac{dB}{dt} = \left( \mu_1 \frac{C_{DOC}}{K_s + C_{DOC}} B \right) - \mu_3 B - \frac{1}{Y_2} \mu_2 BN \quad (6)$$

where  $\mu_3$  was the bacterial natural decay rate and  $Y_2$  was the carbon conversion efficiency between bacteria and amphipod biomasses.

$^{13}\text{C}$  fluxes were modelled in order to describe changes in the  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  ratio of attached bacteria and amphipod tissues. We assumed that there was no isotopic fractionation between DOC and attached bacteria, and between bacteria and amphipods during C assimilation. This assumption was a reasonable simplification because C isotope fractionations during aerobic metabolism are generally low (0 to few per mil), thus negligible relative to the high  $^{13}\text{C}$  enrichment of this study. The change of  $^{13}\text{C}$  mass in DOC was given by:

$$\frac{d^{13}C_{DOC}}{dt} = -\frac{1}{Y_1} \mu_1 \frac{^{13}C_{DOC}}{K_s + C_{DOC}} B \quad (7)$$

while the evolution through time of  $^{13}C$  in bacteria ( $^{13}C_B$ ) and amphipods ( $^{13}C_N$ ) were expressed as:

$$\frac{d^{13}C_B}{dt} = \left( \mu_1 \frac{^{13}C_{DOC}}{K_s + C_{DOC}} B \right) - \mu_3 ^{13}C_B - \frac{1}{Y_2} \mu_2 ^{13}C_B N \quad (8)$$

$$\frac{d^{13}C_N}{dt} = \mu_2 ^{13}C_B N \quad (9)$$

The carbon mass and the isotopic compositions of the DOC, bacteria and amphipods were computed at each time step by solving the system of differential equations (4)-(8) that described their budget using a 4-th order Runge-Kutta numerical integration procedure (Press *et al.*, 1992). In order to compare the result of the model to the experimental data, the carbon isotope composition of total organic carbon attached to sediment (comprising the organic carbon contained in bacterial cells and bacterial exopolymeric substances) was calculated using a simple mass-balance equation:

$$\delta^{13}C_{TOC} = \frac{B \delta^{13}C_B + C_{TOC}^i \delta^{13}C_{TOC}^i}{B + C_{TOC}^i} \quad (10)$$

where  $C_{TOC}^i$  was the total organic carbon attached to sediments at the start of the experiment.

Cell bacterial biomass at the start of the experiment was estimated from DAPI counts using a conversion factor of 30 fg of C cell<sup>-1</sup> (Fukuda *et al.*, 1998; Trousselier *et al.*, 1997). Invertebrates contained about 500 µg of C per individual at t=0.

Unknown parameters of the model ( $\mu_1$ ,  $\mu_2$ ,  $\mu_3$ ,  $K_s$ ,  $Y_1$  and  $Y_2$ , Table 1) were calculated by adjusting the simulation results to measured DOC concentrations,  $\delta^{13}C$  values of total organic carbon and  $\delta^{13}C$  of amphipod tissues. The quality of the fit between modelled and measured data was evaluated by calculating the sum of the squared differences between observed and calculated values.

For all parametric tests, homoscedasticity and data normality were checked using Levene's tests and Shapiro's tests, respectively. Whenever necessary, data were ln or square-root transformed to homogenise variances and fit data normality. For variables expressed as percentages (% of active eubacteria), data were arcsine transformed. All statistical analyses were performed using Statistica 6 TM (Statsoft, Tulsa).



## RESULTS

### *Experiment I: Relative influences of *N. rhenorhodanensis* and DOC flux on microbial compartment in slow filtration microcosms*

Sediment reworking measured with luminophores was solely driven by continuous eddy diffusion ( $D_b$  coefficient) resulting in the absence of non-local coefficient ( $r$ ) and was not significantly affected by amphipods (Fig. 2, two-way ANOVA, fauna effect,  $F_{(1,12)} < 0.4$ ,  $P > 0.5$  for the two investigated sediment layers). There was no significant effect of DOC flux on sediment reworking at depths of 6-7 cm (two-way ANOVA, DOC effect,  $F_{(2,12)} < 0.1$ ,  $P > 0.9$ ), whereas biodiffusion-like coefficients at depths of 2.5-3.5 cm significantly decreased with increasing DOC flux (two-way ANOVA, DOC effect,  $F_{(2,12)} = 0.56$ ,  $P < 0.03$ ).

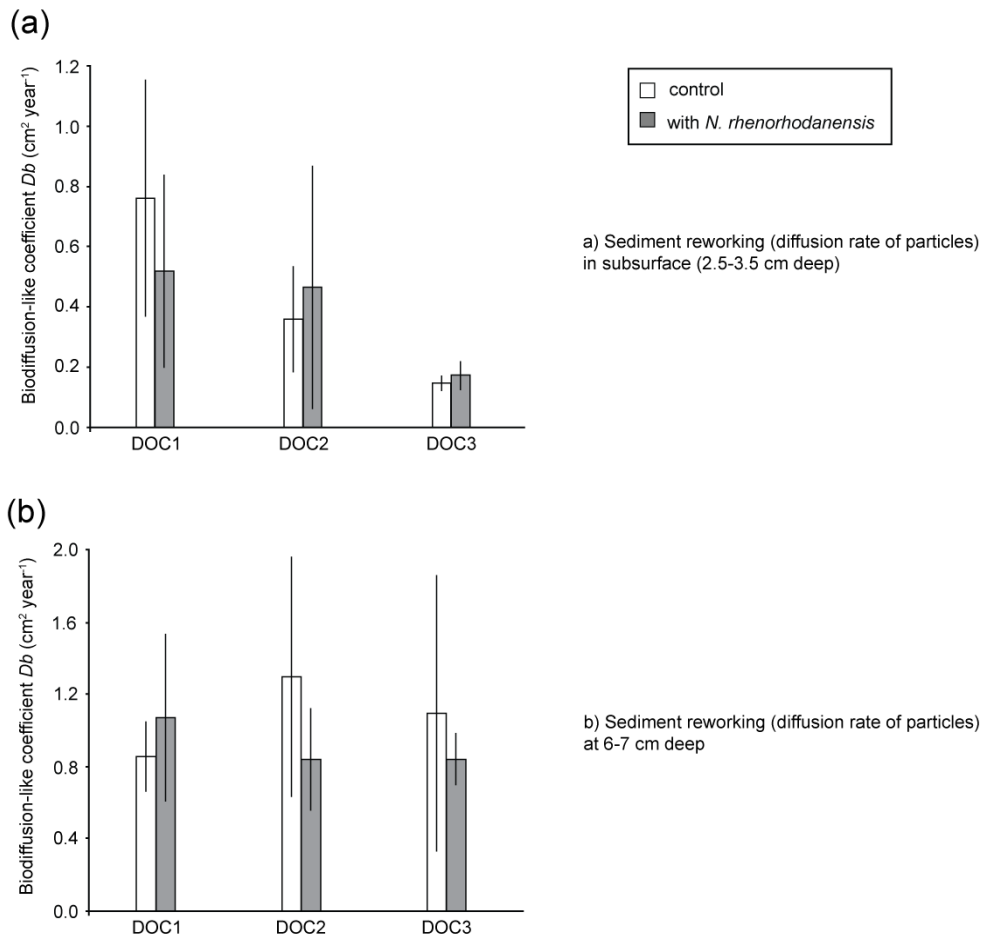
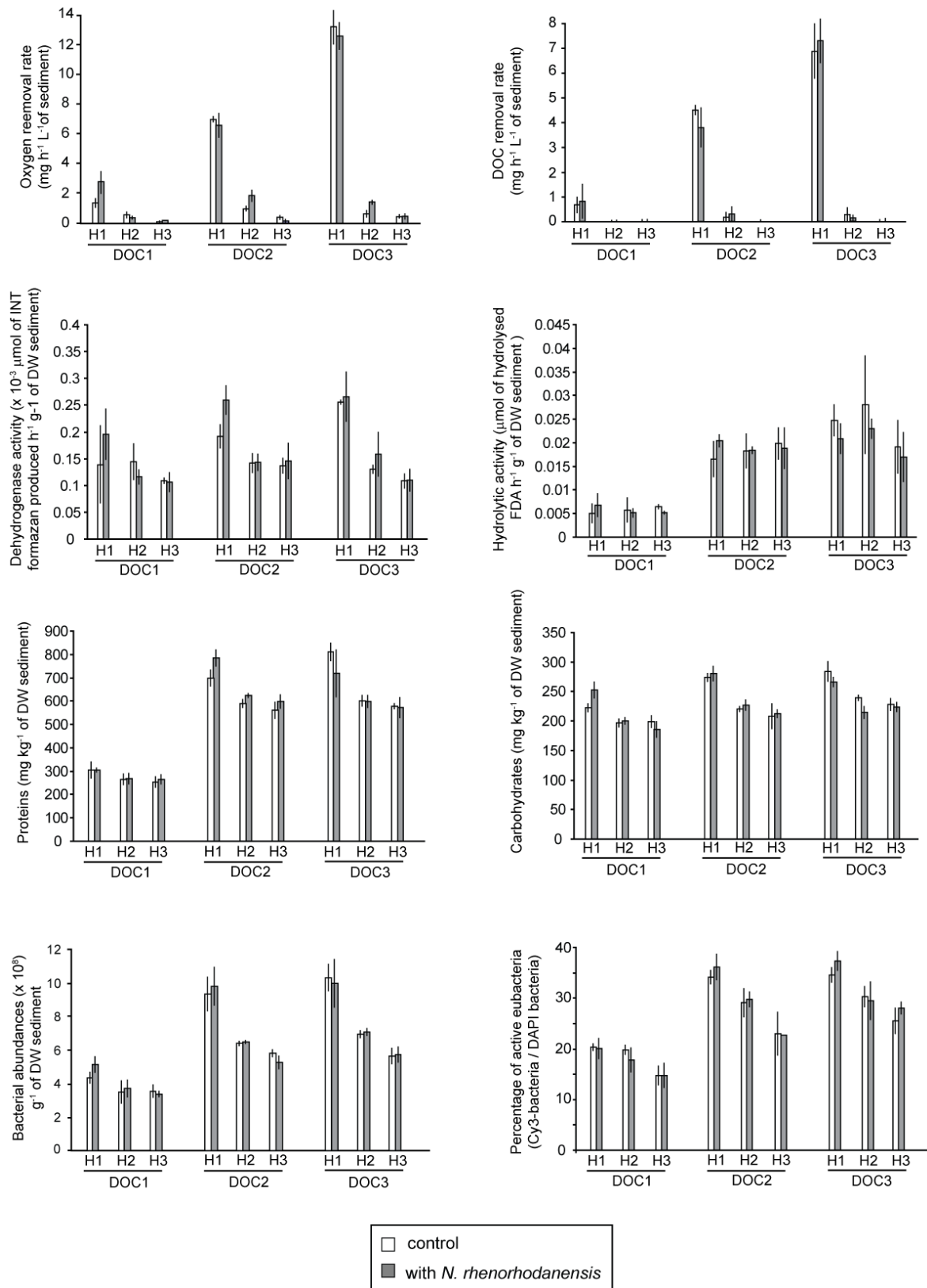


Figure 2: Biodiffusion-like coefficients ( $D_b$ ) calculated for (a) yellow luminophores deposited between 2.5 and 3.5 cm below the sediment surface and (b) pink luminophores deposited between 6 and 7 cm below the sediment surface in columns for the 6 tested treatments (3 DOC flux treatment x 2 animal treatments). Symbols for DOC supply: DOC1 = 0.5 mg L<sup>-1</sup>, DOC2 = 1.5 mg L<sup>-1</sup>, and DOC3 = 2.5 mg L<sup>-1</sup>. Values are means  $\pm$  SD (n = 3 columns per treatment).



**Figure 3:** Microbial activities, biomasses and abundances measured at 3 layers in columns for the 6 tested treatments (3 DOC flux treatment x 2 animal treatments). Symbols for DOC supply: DOC1 = 0.5 mg L<sup>-1</sup>, DOC2 = 1.5 mg L<sup>-1</sup>, and DOC3 = 2.5 mg L<sup>-1</sup>. Symbols for depth layers: H1 = 0-2 cm, H2 = 4-6 cm, and H3 = 9-11 cm below the sediment surface. Values are means ± SD (n = 3 columns per treatment).

Most variables did not show any significant influence of *N. rhenorhodanensis* on the microbial compartment (Fig. 3, three-way ANOVA, fauna effect,  $F_{(1,36)} < 0.8$ ,  $P > 0.35$  for DOC removal, hydrolytic activity, protein content, carbohydrate content, and bacterial and active eubacteria abundances). Amphipods only had a significant positive effect on oxygen removal rate (three-way ANOVA, fauna effect,  $F_{(1,36)} = 13.1$ ,  $P < 0.001$ ) and dehydrogenase activity (three-way ANOVA, fauna effect,  $F_{(1,36)} = 5.2$ ,  $P < 0.03$ ) in slow filtration columns. In contrast, the increase in DOC flux had a significant positive effect (three-way ANOVA,  $F_{(2,36)} > 11$ ,  $P < 0.001$ ) on microbial processes (DO removal, DOC removal, and dehydrogenase and hydrolytic activities), microbial biomass (proteins and carbohydrates) and bacterial counts (total number of cells and percentage of active eubacteria). The removal rates of DOC in the uppermost layer of sediment (H1) as calculated with equation (1) were 0.8, 4.1 and 7.1 mg of C h<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup> of sediment for DOC supply of 0.5, 1.5 and 2.5 mg C L<sup>-1</sup>, respectively. The influence of DOC supply on microbial parameters decreased with increasing depth in slow filtration columns (three-way ANOVA, depth effect,  $F_{(2,36)} > 60$ ,  $P < 0.0001$  for all parameters, except hydrolytic activity). The  $\delta^{13}\text{C}$  content of attached bacteria also increased with increasing DOC flux (3-way ANOVA, carbon flux effect,  $F_{(2,32)} = 64.7$ ,  $P < 0.0001$ ) and decreased with depth (Fig. 4a, three-way ANOVA, depth effect,  $F_{(2,32)} = 185.6$ ,  $P < 0.0001$ ). As observed for microbial parameters, *N. rhenorhodanensis* did not have a significant influence on  $\delta^{13}\text{C}$  of attached bacteria (three-way ANOVA, fauna effect,  $F_{(1,32)} = 0.35$ ,  $P > 0.55$ ) but  $\delta^{13}\text{C}$  values of amphipods showed a higher incorporation of organic carbon in their tissues for the highest DOC treatment (Fig. 4b, one-way ANOVA,  $F_{(3,9)} = 7.4$ ,  $P < 0.01$ ). The assimilation rate of supplied <sup>13</sup>C labelled DOC as calculated with equation 2 ranged from 0 to 0.35 mg C · (g invertebrate dry mass · day)<sup>-1</sup> (<sup>13</sup>C enrichment ranging from 0 to 1.5 ‰, Fig. 4b).

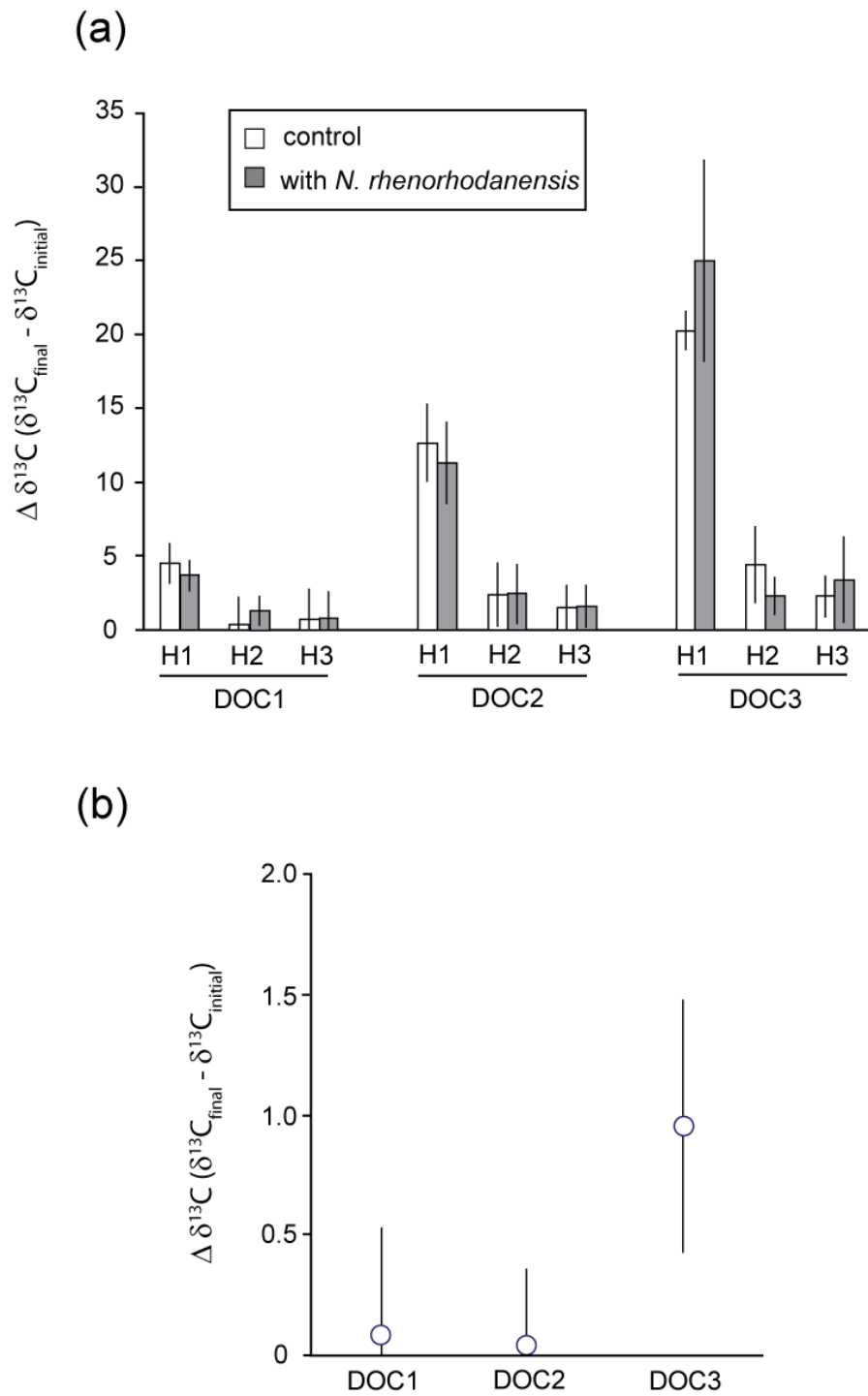
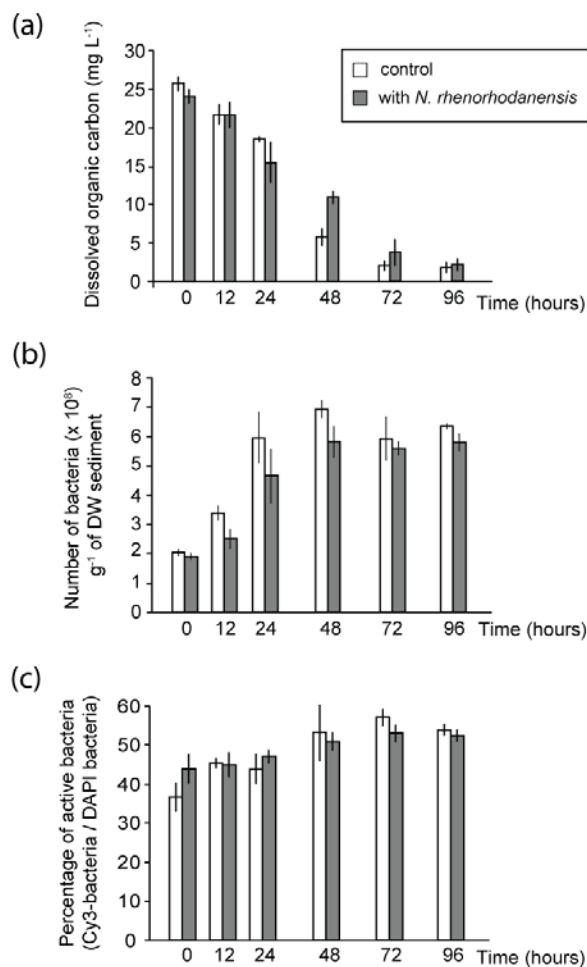


Figure 4: Changes in  $\delta^{13}\text{C}$  of (a) attached bacteria and (b) tissues of *N. rhenorhodanensis* during the course of slow filtration column experiment. Values are means  $\pm$  SD (n = 3 columns per treatment).



*Experiment II: Incorporation of DOC into the food web*

DOC decreased rapidly with time (Fig. 5a, two-way ANOVA, time effect,  $F_{(4,18)} = 162.5$ ,  $P < 0.001$ ) owing to consumption by the microbial compartment, the abundance of which concomitantly increased over time (Fig. 5b, two-way ANOVA, time effect,  $F_{(4,18)} = 32.9$ ,  $P < 0.001$ ). The percentage of active eubacteria also evolved significantly during the experiment but to a lesser extent than the total number of bacteria (Fig. 5c, two-way ANOVA, time effect,  $F_{(4,18)} = 16.1$ ,  $P < 0.001$ ). The occurrence of *N. rhenorhodanensis* did not significantly affect the microbial compartment (two-way ANOVAs, fauna effect,  $F_{(1,18)} < 0.5$ ,  $P > 0.3$ ) although amphipods significantly delayed the DOC decrease during the experiment (Fig. 5a, two-way ANOVA, “time  $\times$  fauna” effect,  $F_{(4,18)} = 7.1$ ,  $P < 0.01$ ).



**Figure 5:** Changes in (a) the concentration of dissolved organic carbon, (b) bacterial abundance, and (c) percentage of active eubacteria during experiment II in treatments with or without individuals of *N. rhenorhodanensis*. Values are means  $\pm$  SD (n = 3 flasks per treatment)

A significant increase in  $\delta^{13}\text{C}$  was measured in the microbial compartment (Fig. 6b, two-way ANOVA, time effect,  $F_{(4,18)} = 67.3$ ,  $P < 0.001$ ) and tissues of amphipods (Fig. 6c, one-way ANOVA,  $F_{(5,12)} = 39.9$ ,  $P < 0.001$ ). The best model fit of DOC concentration (Fig. 6a) and  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  ratio of total organic carbon associated with sediments (Fig. 6b) and amphipods (Fig. 6c) was obtained with parameter values reported in Table 1. According to differences in DOC decrease with time between control and fauna treatments (two-way ANOVA, “time  $\times$  fauna” effect,  $F_{(4,18)} = 7.1$ ,  $P < 0.01$ ), a lower half velocity constant ( $K_S$ ) and a higher maximum growth rate of bacteria ( $\mu_1$ ) were estimated in the control treatment in comparison with the fauna treatment (Table 1). Although amphipods delayed DOC decrease and bacterial growth rate, a slightly higher conversion coefficient of DOC into bacterial carbon ( $Y_1$ ) was measured in fauna treatment (Table 1). The growth rate of amphipods reported as bacterial biomass ( $\mu_2$ ) was  $0.35 \times 10^{-6}$  (bacterial  $\mu\text{gC} \cdot \text{day}^{-1}$ ). The carbon conversion efficiency of bacteria biomass to amphipods ( $Y_2$ ) was 0.06, indicating that 6% of ingested bacterial carbon was incorporated into *N. rhenorhodanensis* biomass.

**Table 1:** Parameters used in the model and best estimated values from the fitting procedure in control and amphipod treatments

Parameters	Definition	Estimated value	
		<i>control</i>	<i>with amphipods</i>
$K_S$	Monod constant (half velocity constant) (mg C)	2.55	2.66
$\mu_1$	maximum growth rate for bacteria ( $\text{day}^{-1}$ )	1.17	1.11
$\mu_2$	growth rate parameter for amphipods ( $\mu\text{g C bacteria} \cdot \text{day}^{-1}$ )	-	0.35
$\mu_3$	rate of natural decay ( $\text{day}^{-1}$ )	<0.05	<0.05
$Y_1$	carbon conversion efficiency between DOC and bacteria ( $\text{g C} \cdot (\text{g C bacteria})^{-1}$ )	0.22	0.26
$Y_2$	carbon conversion efficiency between bacteria and <i>N. rhenorhodanensis</i> ( $\text{g C bacteria} \cdot (\text{g C amphipods})^{-1}$ )	-	0.06

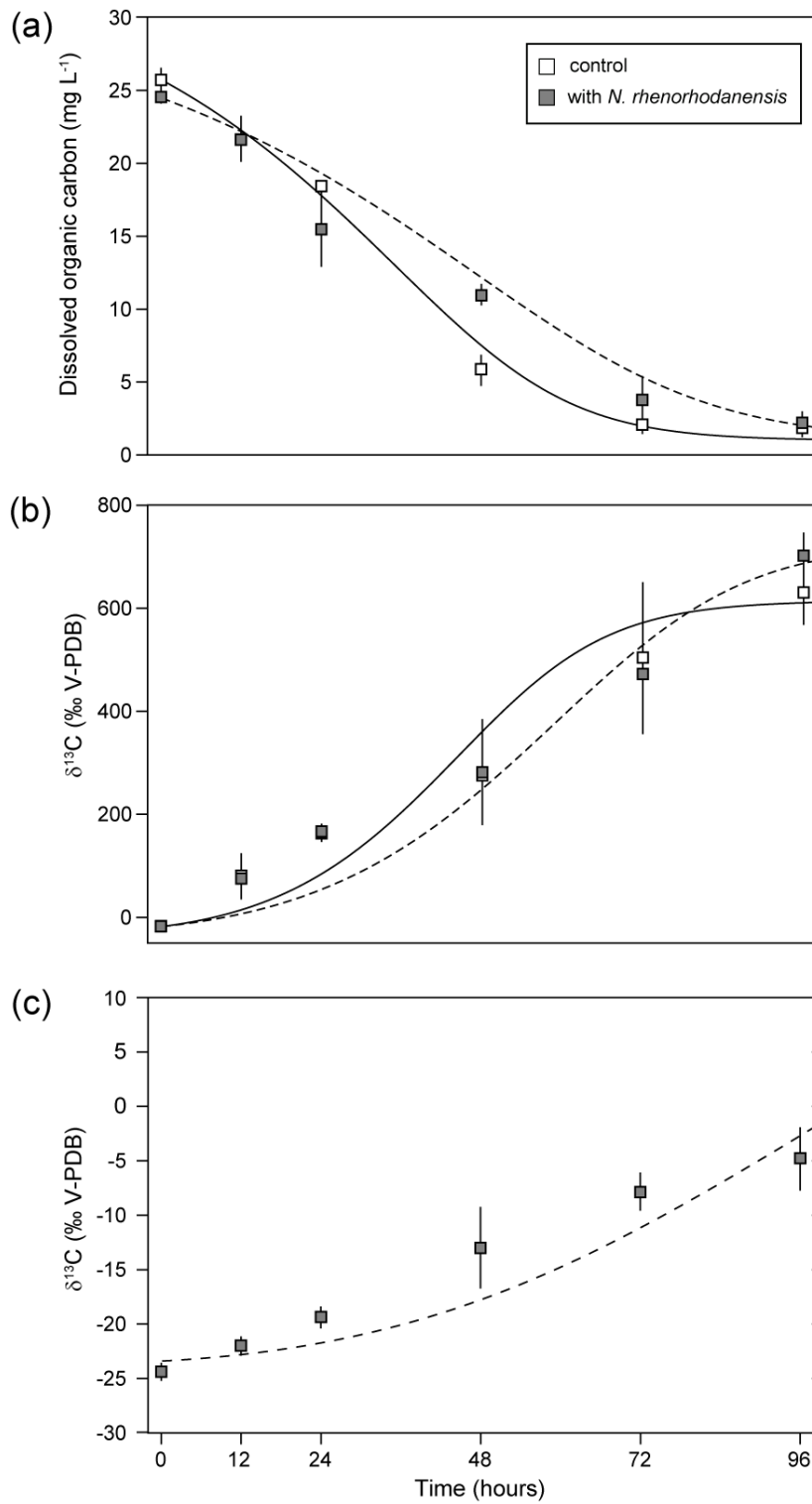


Figure 6: Changes in (a) DOC concentrations, (b)  $\delta^{13}\text{C}$  values of total organic carbon attached to sediment and (c) *N. rhenorhodanensis* during experiment II. Values are means  $\pm$  SD (n = 3 flasks per treatment). Curves represent modelling results with (dashed lines) and without *N. rhenorhodanensis* (plain lines).

## DISCUSSION

In recent years, there has been increased interest in the role potentially played by fauna in groundwaters (Edler & Dodds, 1996; Boulton, 2000; Boulton *et al.*, 2008). Several studies were performed on animal communities living in the hyporheic zone (Danielopol, 1989; Marshall & Hall, 2002; Mermillod-Blondin *et al.*, 2004) but very few attempts were made to assess the role of obligate groundwater invertebrates inhabiting the deeper strata of alluvial and karst aquifers. Edler & Dodds (1996) tested the influence of the subterranean isopod *Caecidotea tridentata* and organic carbon addition (D-glucose) on abundance and activity (thymidine incorporation) of attached bacteria in sediments collected from a North American cave. The authors reported a significant stimulation of bacteria (both abundance and activity) by the subterranean isopod whereas dextrose addition had no effect on bacteria. Such a positive influence of subterranean invertebrates on the microbial biofilm compartment was not observed in our experiment with the amphipod *N. rhenorhodanensis* because the growth and activity of bacteria were predominantly driven by DOC fluxes. The overriding effect of DOC supply on biomass (protein and carbohydrate contents), abundances (total number of bacteria and number of active eubacteria) and activities (respiration rate, organic carbon consumption, dehydrogenase and hydrolytic activities) of biofilm indicated a predominance of bottom-up control over top-down control on groundwater microbial communities. This finding is in accordance with the generally held view that microbial growth and activities are essentially dependent on organic matter entering groundwater (Ghiorse & Wilson, 1988; Goldscheider, Hunkeler & Rossi, 2006).

In columns, *N. rhenorhodanensis* had a significant influence on oxygen consumption and dehydrogenase activity of bacteria. According to data reported in Malard & Hervant (1999), the respiration alone of 10 individuals of *N. rhenorhodanensis* should have resulted in an increase in oxygen consumption of  $40 \mu\text{g h}^{-1} \text{L}^{-1}$  of sediment whereas the observed increase was up to  $1300 \mu\text{g h}^{-1} \text{L}^{-1}$  of sediment in the presence of amphipods. Therefore, the feeding and/or bioturbation activity of *N. rhenorhodanensis* apparently had a positive influence on respiratory activity of bacteria. However, this stimulating effect of amphipods on the microbial compartment was not associated with a significant increase in the biomass and abundances of bacteria (total number and number of active bacteria). Modelling of carbon fluxes in batches clearly indicated that the feeding rate of *N. rhenorhodanensis* on sedimentary biomass was too low to significantly influence bacterial biomass (top-down effect). Although the DOC decrease in batches was delayed by the occurrence of amphipods

(increase of  $K_s$  and decrease of  $\mu_l$ ), the efficiency of DOC incorporation into bacteria ( $Y_l$ ) was stimulated by amphipods. The fast and efficient assimilation of DOC by micro-organisms probably compensated for the microbial loss induced by the feeding rate of *N. rhenorhodanensis*. Indeed, a total of 890  $\mu\text{g}$  of DOC were incorporated into bacterial tissues in each batch during the 4 days of the experiment, whereas only 41  $\mu\text{g}$  of bacterial carbon were incorporated into amphipod tissues during the same time period. We did not detect any significant effect of *N. rhenorhodanensis* on the physical structure of the sediment. Amphipods did not influence sediment transport coefficients (calculated with luminophore tracers) although they were observed to move in the sediment column during the experiment (visual observations on inner wall of the columns). The lack of sediment reworking implied that the bioturbation due to amphipods did not significantly modify the living conditions for micro-organisms growing on sediment particles. Thus, our experiments clearly indicated that the feeding and bioturbation activities of *N. rhenorhodanensis* were much too low for significantly affecting microbial processes in sediments. This result was probably linked to the slow metabolism of *N. rhenorhodanensis*, a characteristic shared by most subterranean species (Huppel, 1985; Hervant *et al.*, 1999). Indeed, subterranean invertebrates have developed efficient energy-saving strategies (low metabolism, storage of energy reserves) for fitting their physiological function to food-limited conditions prevailing in most aquifers (e.g., Danielopol *et al.*, 1994; Hervant & Renault, 2002). The ecophysiology of the *N. rhenorhodanensis* population used in the present study was studied in great details by Hervant *et al.* (1997, 1999) and Issartel *et al.* (2005). At a temperature of 15°C, the obligate groundwater amphipod *N. rhenorhodanensis* had a 20-25 % lower metabolism (expressed as respiration rate) and a 6-fold lower locomotion activity than the aquatic surface dwelling amphipod *Gammarus fossarum*, (Issartel *et al.*, 2005). The reduced metabolism of *N. rhenorhodanensis* could explain its low influence on ecosystem functioning. Our finding differed markedly from that of Edler & Dodds (1996) on the stimulating effect of the subterranean isopod *Caecidotea tridentata* on sedimentary bacterial activity. The difference in feeding and foraging activity between *N. rhenorhodanensis* and *Caecidotea tridentata* could arise from the fact that the latter population was collected in a carbon-rich cave stream. Clearly, further experiments are needed to explore the relationships between the metabolic rate of subterranean species and their ability to influence ecosystem functioning.

## CONCLUSIONS

Our laboratory experiments did not confirm the hypothesis of Boulton *et al.* (2008) that subterranean amphipods could have a significant influence on organic matter processing in interstitial systems. Microbial activity was tightly linked to the flux of dissolved organic matter in slow filtration columns system, but the feeding and burrowing activities of *N. rhenorhodanensis* were far too low for influencing microbial processes. We suggest that the natural adaptation of most subterranean species to low-food conditions might severely reduce their ability to affect their environment. Testing this hypothesis needs to extend our experiments to a wide range of subterranean organisms, including species with multiple populations living in habitats with contrasting food supply.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This study was funded by the French programme EC2CO-Cytrix from INSU/CNRS (project “NAPCOD”), the Institut Fédératif de Recherche No. 41 (Bio-Environnement et Santé), the urban community of Lyon (project OTHU, <http://www.graie.org/othu/>), and the Rhône-Alpes Region.

## REFERENCES

- Bou C. & Rouch R. (1967) Un nouveau champ de recherches sur la faune aquatique souterraine. *Comptes-Rendus de l'Académie des Sciences, Paris*, **265**, 369-370.
- Boudreau B.P. (1986) Mathematics of tracer mixing in sediments: I. Spatially-dependent, diffusive mixing. *American Journal of Science*, **286**, 161-198.
- Boulton A.J. (2000) The functional role of the hyporheos. *Verhandlungen International Vereinigung Limnologie*, **27**, 51-63.
- Boulton A.J., Fenwick G.D., Hancock P.J. & Harvey M.S. (2008) Biodiversity, functional roles and ecosystem services of groundwater invertebrates. *Invertebrate Systematics*, **22**, 103-116.
- Danielopol D.L. (1989) Groundwater fauna associated with riverine aquifers. *Journal of the North American Benthological Society*, **8**, 18-35.

- Danielopol D.L., Creuzé Des Châtelliers M., Moeszlacher F., Pospisil P. & Popa R. (1994) Groundwater contamination and its impact on groundwater animals and ecosystems. In: *Groundwater Ecology* (Eds J. Gibert, D.L. Danielopol & J.A. Stanford), pp. 217-243. Academic Press, UK.
- Datry T., Malard F. & Gibert J. (2005) Response of invertebrate assemblages to increased groundwater recharge rates in a phreatic aquifer. *Journal of the North American Benthological Society*, **24**, 461-477.
- Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A. & Smith F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, **28**, 350-356.
- Edler C.C. & Dodds W.K. (1996) The ecology of a subterranean isopod, *Caecidotea tridentata*. *Freshwater Biology*, **35**, 249-259.
- Foulquier A., Mermillod-Blondin F., Malard F. & Gibert J. (*submitted*) Modifications in biofilm biomass and activities at the groundwater table in response to DOC enrichment induced by stormwater infiltration practices.
- François F., Gerino M., Stora G., Durbec J.-P. & Poggiale J.-C. (2002) A functional approach to sediment reworking by gallery-forming macrobenthic organisms: modelling and application with the polychaete *Nereis diversicolor*. *Marine Ecology Progress Series*, **229**, 127-136.
- Fukuda R., Ogawa H., Nagata T. & Koike I. (1998) Direct determination of carbon and nitrogen contents of natural bacterial assemblages in marine environments. *Applied and Environmental Microbiology*, **64**, 3352-3358.
- Gerino M., Aller R.C., Lee C., Cochran J.K., Aller J.Y., Green M.A. & Hirschberg D. (1998) Comparison of different tracers and methods used to quantify bioturbation during a spring bloom: 234-Thorium, luminophores and chlorophyll a. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, **46**, 531-547.
- Ghiorse W.C. & Wilson J.T. (1988) Microbial ecology of the terrestrial subsurface. *Advances in Applied Microbiology*, **33**, 107-172.
- Gibert J. & Deharveng L. (2002) Subterranean ecosystems: a truncated functional biodiversity. *Bioscience*, **52**, 473-481.
- Gibert J., Culver D.C., Dole-Olivier M.J., Malard F., Christman M.C. & Deharveng L. (2009) Assessing and conserving groundwater biodiversity: synthesis and perspectives. *Freshwater Biology*, **54**, 930-941.

- Gilbert F., Hulth S., Grossi V., Poggiale J.-C., Desrosiers G., Rosenberg R., Gerino M., François-Carcaillet F., Michaud E. & Stora G. (2007) Sediment reworking by marine benthic species from the Gullmar Fjord (Western Sweden): importance of faunal biovolume. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **348**, 133-144.
- Ginet R. (1960) Écologie, éthologie et biologie de *Niphargus*. *Annales de Spéléologie*, **15**, 127-237.
- Goldscheider N., Hunkeler D. & Rossi P. (2006) Review: microbial biocenoses in pristine aquifers and an assessment of investigative methods. *Hydrogeology Journal*, **14**, 926-941.
- Hervant F. & Renault D. (2002) Long-term fasting and realimentation in hypogean and epigean isopods: a proposed adaptative strategy for groundwater organisms. *The Journal of Experimental Biology*, **205**, 2079-2087.
- Hervant F., Mathieu J., Barré H., Simon K. & Pinon C. (1997) Comparative study on the behavioral, ventilatory, and respiratory responses of hypogean and epigean crustaceans to long-term starvation and subsequent feeding. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, **118**, 1277-1283.
- Hervant F., Mathieu J. & Barré H. (1999) Comparative study on the metabolic responses of subterranean and surface-dwelling amphipods to long-term starvation and subsequent refeeding. *The Journal of Experimental Biology*, **202**, 3587-3595.
- Houri-Davignon C., Relexans J.C. & Etcheher H. (1989) Measurements of actual electron transport system (ETS) activity in marine sediments by incubation with INT. *Environmental Technology*, **10**, 91-100.
- Hüppop K. (1985) The role of metabolism in the evolution of cave animals. *Bulletin of the National Speleological Society*, **47**, 136-146.
- Issartel J., Hervant F., Voituron Y., Renault D. & Vernon P. (2005) Behavioural, ventilatory and respiratory responses of epigean and hypogean crustaceans to different temperatures. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, **141**, 1-7.
- Jørgensen P.E., Eriksen T. & Jensen B.K. (1992) Estimation of viable biomass in wastewater and activated sludge by determination of ATP, oxygen utilisation rate and FDA hydrolysis. *Water Research*, **26**, 1495-1501.
- Lefébure T., Douady C.J., Malard F. & Gibert J. (2007) Testing dispersal and cryptic diversity in a widely distributed groundwater amphipod (*Niphargus rhenorhodanensis*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **42**, 676-686.



- Malard F., Reygrobellet J.L., Mathieu J. & Lafont M. (1994) The use of invertebrate communities to describe groundwater flow and contaminant transport in a fractured rock aquifer. *Archiv für Hydrobiologie*, **131**, 93-110.
- Malard F. & Hervant F. (1999) Oxygen supply and adaptations of animals in groundwater. *Freshwater Biology*, **41**, 1-30.
- Marshall M.C. & Hall R.O.J. (2004) Hyporheic invertebrates affect N cycling and respiration in stream sediment microcosms. *Journal of the North American Benthological Society*, **23**, 416-428.
- Mathieu J. & Essafi-Chergui K. (1990) Le peuplement aquatique interstitiel à l'interface karst/plaine alluviale. 1. Cas d'une alimentation en eau essentiellement karstique. *Mémoires de Biospéologie*, **17**, 113-122.
- Mauclaire L., Pelz O., Thullner M., Abraha, W.-R. & Zeyer J. (2003) Assimilation of toluene carbon along a bacteria-protist food chain determined by <sup>13</sup>C-enrichment of biomarker fatty acids. *Journal of Microbiological Methods*, **55**, 635-649.
- Maurines-Carboneill C., Pernelle J.J., Morin L., Sachon G. & Leblon G. (1998) Relevance of the INT test response as an indicator of the ETS activity in monitoring heterotrophic aerobic bacterial populations in activated sludges. *Water Research*, **32**, 1213-1221.
- Mermillod-Blondin F. & Rosenberg R. (2006) Ecosystem engineering: the impact of bioturbation on biogeochemical processes in marine and freshwater benthic habitats. *Aquatic Sciences*, **68**, 434-442.
- Mermillod-Blondin F., Gerino M., Sauvage S. & Creuzé des Châtelliers M. (2004) Influence of nontrophic interactions between benthic invertebrates on river sediment processes: a microcosm study. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **61**, 1817-1831.
- Mermillod-Blondin F., Nogaro G., Datry T., Malard F. & Gibert J. (2005) Do tubificid worms influence the fate of organic matter and pollutants in stormwater sediments? *Environmental Pollution*, **134**, 57-69.
- Meysman F.J.R., Boudreau B.P. & Middelburg J.J. (2003) Relations between local, nonlocal, discrete and continuous models of bioturbation. *Journal of Marine Research*, **61**, 391-410.
- Monod J. (1942) *Recherches sur la Croissance des Cultures Bactériennes*. Hermann & Co, Paris.

- Notenboom J., Plénet S. & Turquin M.-J. (1994) Groundwater contamination and its impact on groundwater animals and ecosystems. In: *Groundwater Ecology* (Eds J. Gibert, D.L. Danielopol & J.A. Stanford), pp. 477-504. Academic Press, UK.
- Peterson G.L. (1977) A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry*, **83**, 346-356.
- Press W.H., Teukolsky S.A., Vetterling W.T. & Flannery B.P. (1992) *Numerical recipes in Fortran 77*, 2<sup>nd</sup> edn. Cambridge University Press, UK.
- Simon K.S., Benfield E.F. & Macko S.A. (2003) Food web structure and the role of epilithic biofilms in cave streams. *Ecology*, **84**, 2395-2406.
- Starr R.C. & Gillham R.W. (1993) Denitrification and organic carbon availability in two aquifers. *Ground Water*, **31**, 934-947.
- Traunspurger W., Bergtold M. & Goedkoop W. (1997) The effects of nematodes on bacterial activity and abundance in a freshwater sediment. *Oecologia*, **112**, 118-122.
- Troussellier M., Bouvy M., Courties C. & Dupuy C. (1997) Variation of carbon content among bacterial species under starvation condition. *Aquatic Microbial Ecology*, **13**, 113-119.

# 5

INTERACTIONS ENTRE LE FLUX DE COD,  
LES COMMUNAUTÉS MICROBIENNES ET  
LES INVERTÉBRÉS SOUTERRAINS

Ce chapitre est consacré à l'étude des interactions entre les flux de matière organique, les communautés microbiennes et les invertébrés souterrains au sein des écosystèmes aquatiques souterrains. Ce chapitre analyse la réponse des biocénoses souterraines à une augmentation de la connectivité hydrologique avec les écosystèmes de surface et évalue l'intensité relative des régulations ascendantes et descendantes sur la structure des communautés.

## **5.1. LINKS BETWEEN RESOURCE SUPPLY, SEDIMENT BIOFILM AND INVERTEBRATES IN GROUNDWATER. (ARTICLE 5)**

L'intensité relative des contrôles par la ressource et la prédation sur la structure des communautés est un important sujet de débat en écologie (Oksanen *et al.* 1981, Hunter & Price 1992, Strong 1992, Polis & Strong 1996). Au sein des écosystèmes aquatiques souterrains, les apports de matière et d'énergie provenant des écosystèmes de surface sont généralement considérés comme un facteur exerçant un contrôle (ascendant) important sur la structure des communautés (Gibert & Deharveng 2002). Ainsi, l'augmentation des flux de matière et d'énergie transitant par le compartiment microbien est supposée favoriser la diversification des peuplements d'invertébrés. En revanche, nos connaissances sur les capacités des invertébrés souterrains à exercer un fort contrôle descendant sur les communautés microbiennes à travers leur activité de nutrition sont encore fragmentaires. De plus, l'augmentation des flux de matière et d'énergie vers les écosystèmes aquatiques souterrains est généralement associée à une augmentation de la connectivité hydrologique avec les écosystèmes de surface. Les modifications des conditions environnementales associées à une plus forte connectivité hydrologique peuvent à travers leurs effets directs sur les invertébrés limiter les interactions trophiques entre le compartiment microbien et les invertébrés. L'objectif de ces travaux est de déterminer la réponse des communautés souterraines à une augmentation de la connectivité hydrologique avec les écosystèmes de surface et d'évaluer l'importance relative des contrôles ascendants et descendants sur la structure des communautés souterraines.

La méthodologie utilisée comprend deux volets et s'appuie sur des mesures réalisées sur 6 sites de l'agglomération lyonnaise correspondant à 3 sites de recharge situés à l'aplomb hydraulique de bassins d'infiltration et 3 sites de référence non soumis à l'infiltration

artificielle d'eau de ruissellement pluvial. Le premier volet permet de tester statistiquement les effets d'une augmentation de la connectivité hydrologique avec les écosystèmes de surface sur (1) les conditions physico-chimiques, (2) les caractéristiques du compartiment microbien (biomasse, activités et structure des communautés) ainsi que (3) les abondances d'invertébrés dans les horizons supérieurs des nappes phréatiques. Le deuxième volet s'appuie sur une analyse multi-tableaux afin de déterminer l'intensité des relations existant entre les conditions environnementales, la biomasse et les activités microbiennes, la structure des communautés bactériennes et les assemblages d'invertébrés.

L'augmentation de la connectivité hydrologique avec les écosystèmes de surface entraîne une stimulation de la production microbienne sur les sites de recharge qui s'accompagne d'une modification de la structure des communautés bactériennes. Cependant, la structure des communautés bactériennes est plus fortement liée aux conditions environnementales qu'aux paramètres caractérisant les biomasses et activités microbiennes. Malgré l'augmentation de la ressource trophique constituée par le compartiment microbien, l'absence d'augmentation significative des abondances d'invertébrés sur les sites de recharge indique un faible transfert de matière et d'énergie le long de la chaîne trophique. Les résultats obtenus suggèrent que les conditions environnementales sur les sites de recharge (faibles concentrations en oxygène dissous, températures élevées) constituent un stress physiologique pour les invertébrés qui est à même de limiter l'intensité des interactions trophiques entre le compartiment microbien et les invertébrés. Dans ce contexte, les faibles abondances d'invertébrés et l'allocation potentielle d'énergie à la réponse aux stress environnementaux limitent leur capacité à contrôler efficacement les abondances et activités microbiennes. Les perturbations environnementales successives à une augmentation de la connectivité hydrologique limiteraient donc le rôle attribué aux invertébrés sur les processus biogéochimiques dans les écosystèmes souterrains.

# Article 5

## Links between resource supply, sediment biofilm and invertebrates in groundwater

A. FOULQUIER <sup>1,\*</sup>, F. MALARD <sup>1</sup>, F. MERMILLOD-BLONDIN<sup>1</sup>,  
B. MONTUELLE <sup>2</sup>, S. DOLEDEC <sup>1</sup>, B. VOLAT <sup>2</sup> & J. GIBERT <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Université de Lyon, Lyon, F-69622, France ; Université Lyon 1, Lyon, F-69622, France ; CNRS, UMR 5023, Ecologie des Hydrosystèmes Fluviaux, Villeurbanne, F-69622, France.

<sup>2</sup> CEMAGREF, Laboratoire d'Ecologie Microbienne des Hydrosystèmes Anthropisés, 3 bis Quai Chauveau, CP 220, 69336 Lyon Cedex 09, France

**En préparation**





## ABSTRACT

Groundwaters are increasingly viewed as resource-limited ecosystems in which fluxes of organic matter from surface water can be efficiently mineralized by a consortium of microorganisms that assimilate dissolved organic carbon (DOC) and invertebrates that graze microbial biofilm. Increased DOC supply at groundwater sites intensively recharged with surface water is usually expected to enhance the productivity of microorganisms, the biomass of which may be kept constant by grazing as invertebrates become more abundant. We tested for differences in groundwater physico-chemistry, microbial activity and biomass, structure of bacterial communities and invertebrate density among control sites and sites artificially recharged with stormwater (AGR sites). Multivariate correlation coefficient (RV coefficient) and multiple co-inertia analysis (MCOA) were used to identify significant links among these four distinct data sets. Groundwater recharge significantly increased fluxes of DOC and phosphate, elevated groundwater temperature and diminished dissolved oxygen (DO) concentration. Bacterial cell counts, hydrolytic and dehydrogenase activities, and protein content per cell were significantly higher at AGR sites than at control sites. Bacterial community structure as revealed by DGGE fingerprint also differed significantly between control and AGR sites. However, the effect of groundwater recharge only accounted for 7% of the variance in bacterial community structure. Invertebrate density was not significantly higher at AGR sites. RV coefficients showed that microbial activity and biomass, bacterial community structure and invertebrate assemblages were significantly correlated to groundwater physico-chemistry. There was no relationship between invertebrate assemblages and microbial activity and biomass. MCOA ordinated samples along a gradient of increasing hydrologic connectivity with surface water showing that most invertebrate taxa were absent in DOC-rich groundwater characterized by high microbial activity and biomass but reduced DO concentration and elevated temperature. Microbial communities were bottom-up regulated by DOC and nutrient fluxes but trophic interactions between microorganisms and invertebrates were apparently limited by environmental disturbances, particularly DO depletion and groundwater warming, which maintained low invertebrate densities at AGR sites. We conclude that hydrological connectivity with surface water is a key factor setting up the strength of bottom-up and top-down controls within DOC-based groundwater food webs through its dual effect on resource supply and environmental disturbances.

## **KEY WORDS**

Groundwater recharge, dissolved organic carbon, environmental disturbance, food web, trophic relationships, sediment biofilm, crustaceans, microbial biomass, microbial activity, bacterial community structure, denaturing gradient gel electrophoresis.

## INTRODUCTION

The relative importance of bottom-up and top-down controls on the structure of communities has long been a matter of intense debates (Oksanen et al. 1981, Hunter & Price 1992, Strong 1992, Polis & Strong 1996). The exploitation ecosystem hypothesis (EEH) predicts that resource availability and predation should alternatively control densities within adjacent trophic levels as food chain length increases with increasing productivity (Oksanen et al. 1981). In the least productive ecosystems, the density of basal species which is severely constrained by resource availability cannot support a significant consumer level (Menge 2000). In more productive ecosystems, the productivity of basal species increases with elevated resources but their density is kept constant by predation as consumers become more abundant (Steiner 2001). However, a number of biological and environmental factors can affect the predictions of the EEH (Power 1992, Hunter & Price 1992, Leibold et al. 1997, Menge et al. 2002). A shift toward consumer-resistant or less edible species enables a concomitant increase in the density of basal species and consumers along a gradient of increasing productivity (Hunter & Price 1992, Strong 1992, Polis & Strong 1996, Leibold 1996, Steiner 2001). Reduction of consumer density by environmental disturbances or energy allocation in response to stress can decrease the strength of top-down control on basal species (Menge et al. 2002).

Our present understanding of regulating factors within food webs essentially derives from the study of interactions between photosynthetic producers and herbivores (Power 1992, Hunter & Price 1992, Strong 1992). The strength of bottom-up and top-down forces within detritus-based food webs comparatively have attracted little attention (Mikola & Setälä 1998a, Rosemond et al. 2001), although the latter fuel the major proportion of primary production (Moore et al. 2004). Groundwaters provide excellent arenas for testing factors regulating detritus-based food webs because they exhibit a reduced diversity of organic matter sources and lack any substantial autotrophic food chains that might interfere with heterotrophic food chains (Huxel & McCann 1998, Simon *et al.* 2003). In deep water-table aquifers made of unconsolidated sediments (i.e. vadose zone thickness > 2 m), dissolved organic matter (DOC) brought by infiltrating water is the main source of organic matter available for groundwater microbial biofilm (Brunke & Gonser 1997, Goldscheider et al. 2006), which represents the basal resource for invertebrate assemblages composed essentially of crustaceans (Ward et al. 1998, Pusch et al. 1998, Simon et al. 2003). Obligate groundwater invertebrates are thought to

affect the abundance, activity and composition of microbial communities via their grazing and bioturbation activities (Danielopol 1989, Boulton et al., 2008) although their top-down control on microbial communities has rarely been evaluated (Edler & Dodds 1996). In oligotrophic ecosystems, grazing exerts a major control on microbial biomass whereas in nutrient-rich ecosystems microorganisms can compensate for increased consumer pressure through structural community changes including shift toward small cells and selection of rapidly growing bacteria (Langenheder & Jürgens 2001, Gasol et al. 2002).

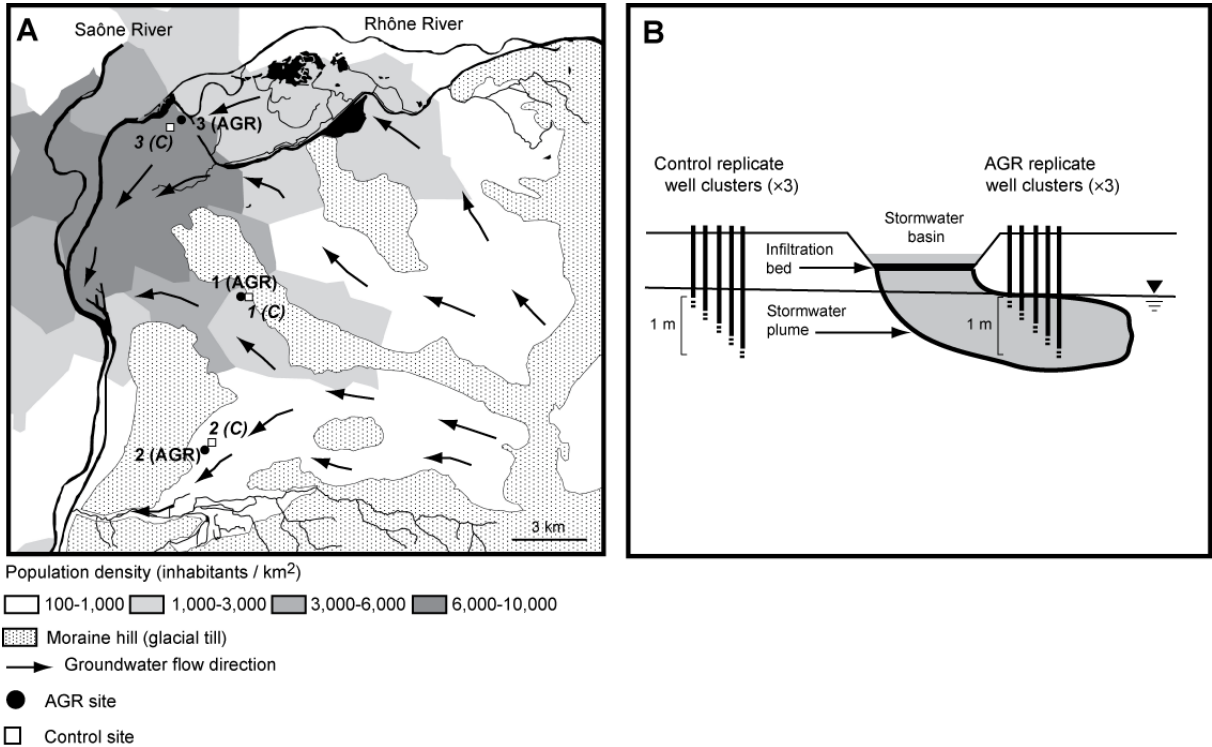
Most groundwater ecosystems experience strong carbon limitation that severely constrains the biomass, activity and composition of microbial communities (Bengtsson 1989, Kazumi & Capone 1994, Baker et al. 2000, Goldscheider 2006). Several studies showed that the productivity and activity of microbial biofilms was distinctly higher in groundwater recharge areas with elevated surface water infiltration rate leading to an increase in DOC supply (Jones et al. 1995, Baker et al. 2000, Craft et al. 2002). Although increased microbial production should theoretically support higher metazoan density, environmental disturbances induced by an increase in hydrologic connectivity with surface water might limit trophic interactions between microbial biofilm and invertebrates (Storey & Williams 2004). Particularly, groundwater warming caused by increased advective heat transfer from the surface and dissolved oxygen (DO) depletion due to microbial degradation of DOC can alter invertebrate communities (Malard & Hervant 1999, Issartel et al. 2005). Strayer et al. (1997) showed that invertebrate density in the hyporheic zone of several streams in the eastern United States was positively correlated with organic matter content of sediments as long as DO concentration was  $> 1 \text{ mg/l O}_2$ .

The main objectives of this paper are (1) to determine the response of sediment biofilm and invertebrate assemblages to increased DOC supply at multiple depths below the groundwater table of an aquifer artificially recharged with stormwater and (2) to assess the relative significance of bottom-up and top-down controls in a DOC-based groundwater food web. DOC supply at artificial groundwater recharge (AGR) sites was expected to stimulate microbial productivity, thereby leading to increased invertebrate density. Dehydrogenase and hydrolytic activities rather than biomass were used as a surrogate for microbial productivity because microbial biomass could be kept constant as a result of increased grazing by invertebrates. First, we tested for differences in groundwater and sediment physico-chemistry,

microbial activity and biomass, structure of bacterial communities and invertebrate density between AGR sites and control sites not intentionally recharged with stormwater. Second, we used multi-table analyses for identifying significant links among these four distinct data sets.

### STUDY SITE

The eastern aquifer of the Lyon metropolitan area, France, consists of 3 corridors separated by moraine hills of low hydraulic conductivity ( $10^{-5}$ - $10^{-8}$  m/s) (Datry et al. 2003a; Fig. 1A). Aquifer corridors consists of highly permeable glaciofluvial sediments (hydraulic conductivity:  $10^{-3}$ - $10^{-2}$  m/s) and are drained by the Rhône River. The aquifer is artificially recharged with stormwater at multiple sites to compensate for reduced natural recharge caused by the sealing of urban surfaces. AGR with stormwater represents at least 10 % of the annual flux of groundwater which is estimated at 69.1 million m<sup>3</sup> (Foulquier et al. 2009a). The three selected AGR sites consist of a settling and infiltration basins that collect stormwater from residential, commercial and/or industrial areas. The annual groundwater recharge and vadose zone thickness at AGR sites ranges from 9.7 to 202.3 m<sup>3</sup> of water per m<sup>2</sup> and 1.7 to 3.2 m, respectively (Table 1).



**Figure 1:** **A.** Locations of artificial groundwater recharge (AGR) sites and control (C) sites in the eastern aquifer of the Lyon metropolitan area, France. **B.** Cross sectional illustration of well clusters at AGR and control sites.

**Table 1:** Characteristics of artificial groundwater recharge sites (AGR) and control sites. Recharge at control sites was derived only from the natural infiltration of rainwater.

Site	Type	Vadose zone thickness (m)	Catchment area (ha)	Basin area (ha)	Annual recharge (m <sup>3</sup> m <sup>-2</sup> )
1	AGR	3.2	270	0.39	202.3 *
2	AGR	1.7	100	0.40	73.1 *
3	AGR	2.8	2.5	0.08	9.7 *
1	control	3.5			0.24
2	control	2.4			0.24
3	control	4.2			0.24

\* annual precipitation × runoff coefficient on urban catchment × catchment area of the infiltration basin / surface area of the infiltration basin

## METHODS

### *Site instrumentation*

The three AGR sites were instrumented with 6 clusters of 5 wells that were successively installed at depths of 10, 30, 50, 70 and 90 cm below the groundwater table (Fig. 1B). At each site, three replicate well clusters were located upstream of the stormwater infiltration basin and three other replicate clusters were located in the immediate downstream vicinity of the basin. The upstream well clusters intersecting the groundwater zone that was not recharged with stormwater were used as control sites while the downstream well clusters were used as AGR sites because they intersected the stormwater plume induced by the infiltration basins. Distances between the 3 replicate clusters did not exceed 10 m and wells within each replicate cluster were separated from each other by a distance of 0.5 m. All wells were constructed of 3.8 cm inner diameter steel pipe with a screen of 13 cm in height (hole diameter: 0.5 cm) at their lower ends. They were installed at the desired depths using a vibrating electric-powered hammer.

### *Sampling of groundwater, sediment and invertebrates*

Water, sediment and invertebrates were collected from upstream and downstream well clusters at the three sites (n=90 samples) from 10 to 21 September 2006 to test for the effect of recharge and depth below the groundwater table on DOC concentration, microbial activity and biomass, structure of bacterial communities and invertebrate density. A mixture of water and sediment was extracted using a hand piston pump from each piezometer (n=90). The first 5 L of water were filtered through a 100- $\mu\text{m}$  mesh net and faunal samples were preserved in 4% formaldehyde. In the laboratory, invertebrates were sorted, counted, and identified to the lowest practical taxonomic level using a dissecting microscope.

Groundwater was collected in 0.1-L burned glass bottles for the determination of DOC and in 1-L propylene bottles for the analysis of dissolved nutrients ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ , and  $\text{PO}_4^{3-}$ ) and sulphate. Water samples were stored at 4°C, brought within 4 h to the laboratory, and filtered through a 0.45  $\mu\text{m}$  membrane filter. Dissolved oxygen, pH, temperature and specific conductance were measured in the field using portable meters (WTW OXI 330, WTW pH 330 and WTW LF 330, Weilheim, Germany). Sulphate and specific conductance were used as hydrological tracers to detect inputs of stormwater into groundwater because sulphate concentration and specific conductance of stormwater (ca.  $7.6 \pm 4.1 \text{ mg SO}_4^{2-} \text{ l}^{-1}$ ,  $122 \pm 49 \mu\text{S cm}^{-1}$ ) were much lower than those of groundwater (ca.  $55.4 \pm 35.9 \text{ mg SO}_4^{2-} \text{ l}^{-1}$ ,  $> 500 \mu\text{S/cm}$ ).

After sediment settling, at least 0.5 L of sediment was collected in polypropylene containers that were stored at  $\sim 20^\circ\text{C}$  and brought within 4 h to the laboratory. The sediment was sieved wet through a 1-mm sieve before microbiological analyses and analysis of particulate organic carbon (POC), particulate nitrogen (PN) and particulate phosphorus (PP). About 3 g of sediment was frozen at  $-80^\circ\text{C}$  for the analysis of bacterial community structure using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE).

#### *Chemical analyses of groundwater and sediment*

The grain size distribution of sediment samples was determined by laser diffraction using a Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, Malvern, UK) to check whether differences in microbial activity and biomass between AGR and control sites could be accounted for by variation in specific area of sediment. Dissolved organic carbon and POC was determined using a carbon analyser (multi N / C<sup>®</sup> 3100, Analytik Jena, Jena, Germany) based on thermocatalytic oxidation ( $850\text{-}900^\circ\text{C}$ ) of organic carbon and infrared detection of  $\text{CO}_2$ . The annual flux of DOC reaching the groundwater table at AGR and control sites ( $\text{g DOC m}^{-2} \text{ yr}^{-1}$ ) was obtained by multiplying the annual groundwater recharge ( $\text{m}^3$  of water  $\text{m}^{-2}$ ) by the

average concentration of DOC measured at a depth of 10 cm below the groundwater table (n=3 replicate wells per site). Particulate nitrogen (PN) was analyzed by high-temperature combustion and subsequent measurement of N<sub>2</sub> by thermal conductivity (FlashEA 1112, Thermo Electron Corporation, Waltham, MA, United States). Particulate phosphorus (PP) was analyzed by inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry after microwave-assisted digestion of sediment with HNO<sub>3</sub> and HCl. Sulfates and nitrates were determined by ion chromatography. The indophenol-blue method and ascorbic acid method were used for the determination of ammonium and phosphate, respectively.

### *Microbiological analyses*

A full description of methods used for microbiological analyses was provided by Foulquier et al. (2009b). Total number of bacteria was counted using DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindol) staining (Porter & Feig 1980). Proteins associated with the aquifer sediment were measured to assess microbial biomass. Measurements were made according to Peterson (1977) using the Sigma Protein Assay Kit P-5656 (Sigma Diagnostics, St. Louis, MO, USA). Carbohydrates were measured on sediment samples using the Dubois method (Dubois et al. 1956) to estimate the production of extracellular polymeric substances (EPS). The 2-(p-iodophenyl)-3-(p-nitrophenyl)-5-phenyl tetrazolium chloride (INT) was used to measure dehydrogenase activity (respiratory activity) as modified from Hourri- Davignon et al. (1989). Hydrolytic activity of biofilm was estimated using the fluorescein diacetate (FDA) hydrolysis method (Jørgensen et al. 1992). Repeated analyses (n=3) of the same sediment sample were carried out for total proteins, carbohydrates and microbial activities. The protein and carbohydrate content per bacterial cell and specific microbial activities (i.e.  $\mu\text{mol INT}$  and  $\text{FDA h}^{-1} \text{ cell}^{-1}$ ) were calculated by dividing measurements made on sediments by the number of bacteria. The ratio of protein to carbohydrate (P/C ratio) was used to assess whether AGR influenced the relative production of cells and EPS by microorganisms. The P/C ratio was used as an indicator of microbial growth because of the increase in protein synthesis and concomitant reduction in carbohydrate production during the exponential growth phase (Sutherland 2001, D'Souza et al. 2005).

### *Bacterial community structure*

#### PCR amplification of 16S rRNA gene fragments



Genomic DNA was extracted with a bead procedure using the Fast DNA Spin kit for soil, (MP Biomedicals) according to manufacturer's instructions. The V3 to V5 regions PCR amplification of bacterial 16S rRNA gene was done with 30 ng of template DNA and the primers 358GC including GC clamp and reverse 907rM leading to a ~ 590 bp fragment (Schauer et al. 2000). PCR amplifications were performed on 50  $\mu$ L volumes containing a 10X Taq reaction buffer (GE Healthcare), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 120  $\mu$ M of each deoxynucleotide, 1  $\mu$ M of each primer, bovine serum albumin (Sigma, 0.5 mg mL<sup>-1</sup> final concentration), and 1.25 U *Taq* DNA polymerase (Recombinant Taq DNA polymerase, GE Healthcare). All PCR reactions were performed using the Thermal Cycler T-Personal (Biometra). For each set of reactions, a negative control, in which the template was replaced by an equivalent volume of sterile deionized water, was included. PCR reactions for 16S rDNA amplification were carried out as described in Schauer et al. (2000). The presence of PCR products of the correct size was confirmed by analyzing 4  $\mu$ L of product on an ethidium-bromide stained 1.2% (w/vol) agarose gel in 1X TBE buffer (89 mM Tris-base, 89 mM boric acid, 2 mM EDTA, pH 8.0).

#### Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)

DGGE analysis was performed using the CBS-DGGE 2000 system (C.B.S. Scientific Co., Inc.) on 1-mm-thick 6% polyacrylamide gels (ratio of acrylamide to bisacrylamide was 37.5 : 1) submerged in 1X TAE buffer (40 mM Tris acetate pH 7.4, 20 mM sodium acetate, 1 mM Na<sub>2</sub>-EDTA). Urea and deionized formamide were used as denaturing agents, and gel gradient ranging from 55% to 65% was applied to optimize the separation of PCR-amplified 16S rRNA gene fragments (100% denaturant contains 7 M urea and 40% v/v formamide; Dorigo et al. 2006). PCR products were loaded and run at a constant voltage of 100 V and at a temperature of 60°C for about 17 h. A standard reference was loaded on each gel. Separated PCR products were stained for 1 h in the dark with SYBRGold (Invitrogen), visualized on a UV transilluminator (Claravision), and photographed with a camera (Scion Corporation). Digital images of the gel were saved. Image analysis of DGGE gels were performed using the GelCompar II version 4.6 software (Applied Maths, Ghent, Belgium). Sample patterns were normalized with reference profiles included in each gel. A matrix (with samples as rows and 30 DGGE bands as columns) based on the presence (1) or absence (0) of a nucleic acid band at a given height in each lane was constructed. Dissimilarity in DGGE bands was calculated

between all pairs of samples using the Dice coefficient (Dice 1945), and the Ward's method was used to compute a hierarchical tree.

### *Data analysis*

Analysis of variances (ANOVA) was used to test for the effect of AGR and depth below the groundwater table on groundwater and sediment physico-chemistry, biofilm activity and biomass and invertebrate density. A nested design with AGR nested in sites and depth as main effects was used in order to avoid confounding between-site variation with variation induced by AGR. The interactions between depth and AGR nested in sites as well as between depth and sites were also tested. Post hoc Tukey's tests were performed to determine pairwise differences among sites. A non-parametric multivariate analysis of variance (MANOVA) was performed on Dice's dissimilarity matrix to determine the amount of variation in bacterial community structure that could be accounted for by the effects of AGR, sites and depth (Anderson 2001, McArdle and Anderson 2001).

Multi-table analyses were performed to examine the links between groundwater and sediment physico-chemistry, microbial activity and biomass, bacterial community structure and invertebrate assemblages using 4 distinct data tables, each table comprising the same 30 samples as rows (data averaged per depth). The physico-chemical and microbiological tables comprised 13 variables (specific area of sediment, specific conductance,  $\text{SO}_4^{2-}$ , pH, temperature, DO, DOC, POC,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ , PN,  $\text{PO}_4^{3-}$  and PP) and 5 variables (number of bacteria, protein, carbohydrates, and dehydrogenase and hydrolytic activities) as columns, respectively. The data table describing bacterial community structure was a presence (1) - absence (0) data set for 30 nucleic acid bands revealed by DGGE. The invertebrate data table consisted of the number of individuals per 5-L of pumped water for 6 taxonomic groups (Cyclopoida, Harpacticoida, Ostracoda, Syncarida, Isopoda and Amphipoda).

Correlation between each pair of tables was measured using the RV-coefficient (Robert & Escoufier 1976). The RV coefficient between two tables ranges between 0 and 1 and is a multivariate equivalent to the correlation coefficient between two variables. To test the significance of RV coefficients, rows were randomly permuted within tables.

Randomizations were repeated 1,000 times to obtain a null distribution of RV coefficients. Statistical significance was assessed by determining the proportion of null values that were greater than the observed RV coefficients. We determined the relative importance of any two tables  $X_1$  and  $X_2$  in determining a third table  $Y$  by testing the null Hypothesis  $RV(X_1, Y) = RV(X_2, Y)$  against the alternative  $RV(X_1, Y) > RV(X_2, Y)$ . Bootstraps were performed on the statistics  $t = RV(X_1, Y) - RV(X_2, Y)$  using 1000 replicates for accurate estimation.

Multiple co-inertia analysis (MCOA; Chessel and Hanafi 1996) was used to provide an ordination of samples along the physico-chemical and biological variables that contributed most in linking the 4 data tables. This multivariate ordination technique maximizes the co-inertia between  $K$  tables in order to build a reference structure that summarizes the information common to all tables (see Chessel and Hanafi, 1996 for mathematical details and Bady et al. 2004, Hedde et al. 2005, and Daufresne et al. 2007 for ecological applications). RV coefficients were calculated to assess the agreement between each data table and the reference structure. Samples and variables in each data table were ordinated according to their factorial scores along the first axis of the reference structure. The values of variables for each sample were graphically displayed using squares, the size of which was proportional to the log transformed and/or normalized values of raw data. Multitable analyses and graphical displays were performed using package *ade4* in R (R Development Core team 2006).

## RESULTS

### *Response of microbial and invertebrate communities to AGR*

#### Physico-chemistry of groundwater and sediment

Input of low-salinity stormwater into groundwater at AGR sites resulted in a significant decrease in specific conductance and sulphate concentrations of groundwater (Fig. 2, Tables 2 & 3). DOC and phosphates were significantly higher at AGR sites than at control sites and aquifer sediments were significantly enriched in PP and PN. The annual flux of DOC reaching the groundwater table was 269, 129, and 14 g DOC m<sup>-2</sup> at AGR sites 1, 2, and 3, respectively, whereas it was only about 0.3 g DOC m<sup>-2</sup> at control sites. Recharge with stormwater significantly elevated groundwater temperature and decreased DO concentration at all sites.

Temperature was as high as 22.7 °C and DO was < 0.5 mg O<sub>2</sub> l<sup>-1</sup> at AGR site 1 with the highest annual recharge rate.

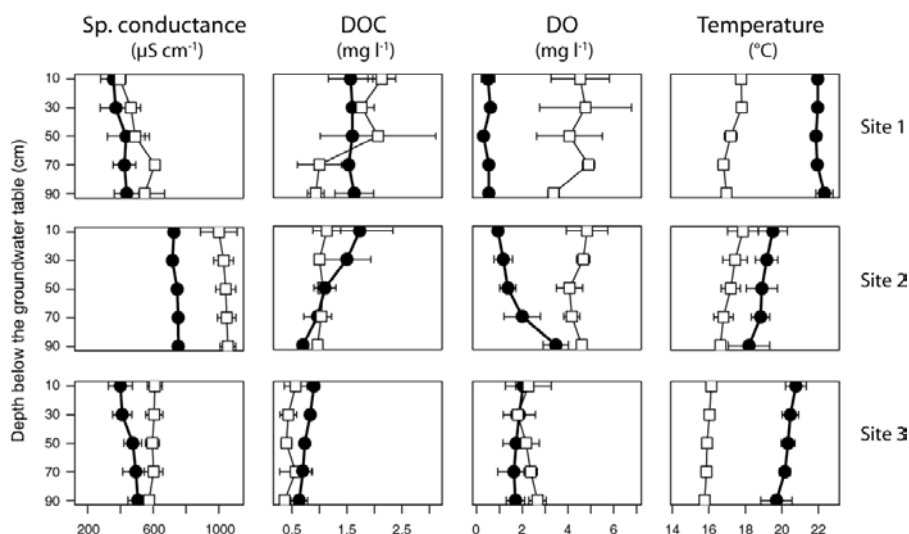


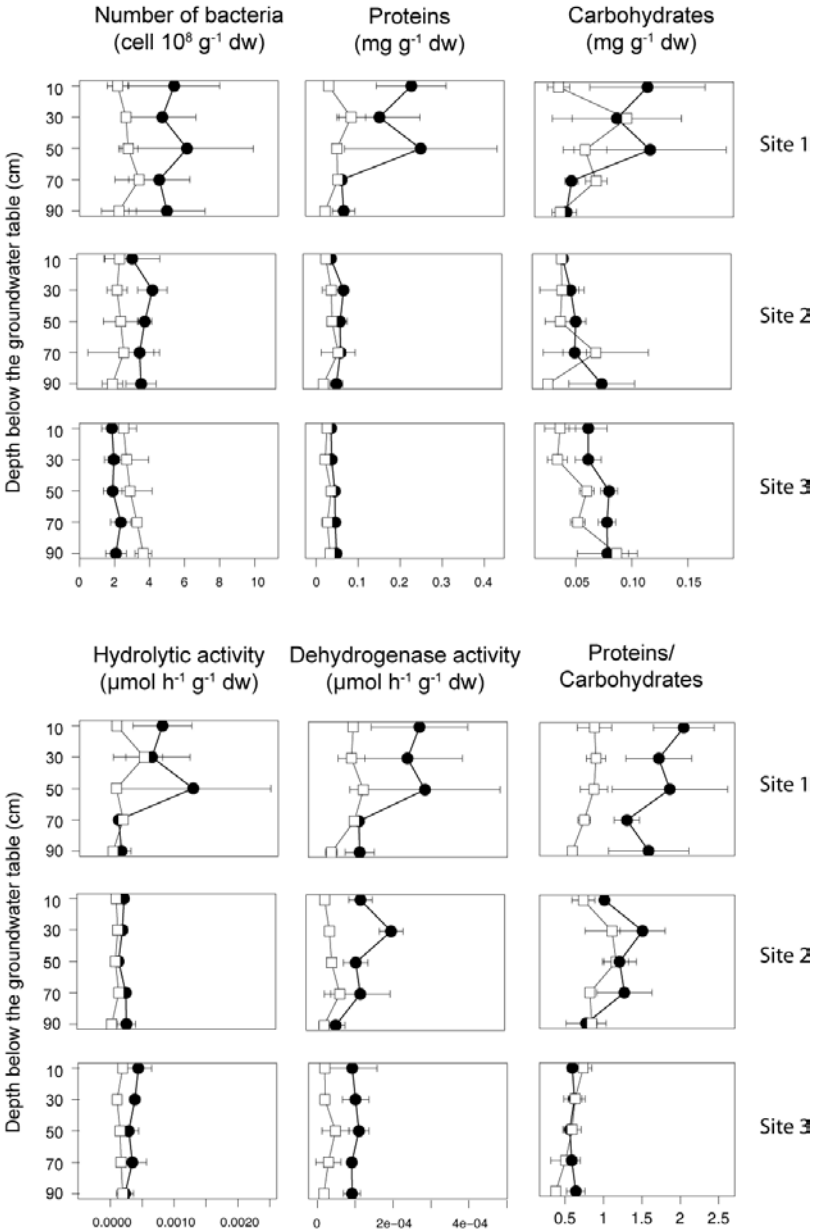
Figure 2: Changes at depth below the groundwater table in specific conductance, dissolved organic carbon (DOC), dissolved oxygen (DO) and temperature at control (white square) and AGR (black circles) well clusters sites 1 to 3. Horizontal bars show  $\pm 1$  standard deviation for 3 replicate wells.

Table 2: Physico-chemistry of groundwater and sediment at AGR and control sites (average  $\pm$  standard deviation, n = 15 samples)

	Site 1		Site 2		Site 3	
	Control	AGR	Control	AGR	Control	AGR
DO (mg l <sup>-1</sup> )	4.33 $\pm$ 1.21	0.49 $\pm$ 0.19	4.47 $\pm$ 0.54	1.79 $\pm$ 1.03	2.25 $\pm$ 0.57	1.79 $\pm$ 0.50
Temperature (°C)	17.31 $\pm$ 0.48	22.01 $\pm$ 0.29	17.19 $\pm$ 0.68	18.92 $\pm$ 0.82	15.94 $\pm$ 0.18	20.29 $\pm$ 0.59
pH	7.39 $\pm$ 0.15	7.50 $\pm$ 0.13	7.10 $\pm$ 0.60	7.14 $\pm$ 0.04	7.30 $\pm$ 0.03	7.48 $\pm$ 0.13
Sp. Conductance ( $\mu$ S cm <sup>-1</sup> )	501.5 $\pm$ 97.7	405.1 $\pm$ 82.0	1035.1 $\pm$ 63.4	739.0 $\pm$ 20.5	597.2 $\pm$ 39.7	457.2 $\pm$ 72
DOC (mg l <sup>-1</sup> )	1.58 $\pm$ 0.70	1.59 $\pm$ 0.21	1.04 $\pm$ 0.12	1.20 $\pm$ 0.49	0.47 $\pm$ 0.18	0.76 $\pm$ 0.14
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg l <sup>-1</sup> )	15.43 $\pm$ 10.92	4.64 $\pm$ 3.52	25.32 $\pm$ 1.25	16.88 $\pm$ 10.07	10.86 $\pm$ 1.02	6.99 $\pm$ 1.09
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg l <sup>-1</sup> )	0.22 $\pm$ 0.34	0.05 $\pm$ 0.03	0.10 $\pm$ 0.13	0.08 $\pm$ 0.05	0.04 $\pm$ 0.01	0.05 $\pm$ 0.02
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (mg l <sup>-1</sup> )	21.17 $\pm$ 8.17	34.63 $\pm$ 24.47	120.29 $\pm$ 16.72	69.44 $\pm$ 16.60	48.31 $\pm$ 4.28	38.53 $\pm$ 11.91
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (mg l <sup>-1</sup> )	0.003 $\pm$ 0.002	0.002 $\pm$ 0.002	0.003 $\pm$ 0.002	0.106 $\pm$ 0.096	0.005 $\pm$ 0.002	0.013 $\pm$ 0.008
Specific surface area (m <sup>2</sup> g <sup>-1</sup> )	0.0077 $\pm$ 0.0014	0.0071 $\pm$ 0.0008	0.0073 $\pm$ 0.0009	0.0072 $\pm$ 0.0006	0.0082 $\pm$ 0.0019	0.0082 $\pm$ 0.0006
POC (mg C Kg <sup>-1</sup> )	269.2 $\pm$ 72.1	294.7 $\pm$ 107.7	240.5 $\pm$ 55.2	275.8 $\pm$ 31.5	291.7 $\pm$ 54.1	320.7 $\pm$ 27.8
PN (mg N Kg <sup>-1</sup> )	38.1 $\pm$ 4.8	39.8 $\pm$ 8.2	42.9 $\pm$ 7.3	60.1 $\pm$ 6.2	46.8 $\pm$ 9.1	45.2 $\pm$ 5.4
PP (mg P Kg <sup>-1</sup> )	175.2 $\pm$ 46.1	194.7 $\pm$ 25.1	170.9 $\pm$ 29.2	315.5 $\pm$ 88.8	141.8 $\pm$ 32.8	187.2 $\pm$ 38.7

### Microbial activity and biomass

Specific surface area of sediment (grain size < 1 mm) neither significantly differed between AGR and control sites nor between sites. Number of cells, protein content, and global hydrolytic and dehydrogenase activities were significantly higher at recharge sites than at control sites (Fig. 4, Tables 2 and 3). Recharge with stormwater not only increased cell abundance but also enhanced cell physiology because the protein content per cell, specific bacterial activities and P/C ratio were significantly higher at AGR sites. All microbial variables except the quantity of carbohydrates and global and specific hydrolytic activities were significantly higher (post hoc Tukey's tests,  $p < 0.05$ ) at AGR site 3 showing the highest annual flux of DOC than at AGR site 1 characterized by the lowest DOC flux.



**Figure 3:** Changes at depth below the groundwater table in microbial parameters at control (white square) and AGR (black circles) well clusters sites 1 to 3. Horizontal bars show  $\pm 1$  standard deviation for 3 replicate wells.

**Table 3:** Results of nested analysis of variance for testing the effect of recharge and depth below the groundwater table on groundwater physico-chemistry, biofilm biomass and activity and invertebrate density.

	Recharge(Site)		Site		Depth		Site x Depth		Recharge(Site) x Depth	
	F <sub>3,12</sub>	<i>p</i>	F <sub>2,3</sub>	<i>p</i>	F <sub>4,8</sub>	<i>p</i>	F <sub>8,12</sub>	<i>p</i>	F <sub>12,60</sub>	<i>p</i>
DOC	6.89	<b>0.006</b>	9.76	0.062	4.85	<b>0.028</b>	0.56	0.792	1.21	0.297
DO	63.86	<b>&lt;0.001</b>	0.17	0.851	0.48	0.749	1.13	0.408	1.87	0.057
Temperature	562.35	<b>&lt;0.001</b>	0.23	0.810	6.47	<b>0.013</b>	1.27	0.344	0.80	0.652
Specific conductance	43.42	<b>&lt;0.001</b>	6.40	0.081	4.10	<b>0.043</b>	1.31	0.323	0.80	0.650
pH	14.35	<b>&lt;0.001</b>	7.64	0.059	2.01	0.186	1.67	0.204	0.81	0.636
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	13.49	<b>&lt;0.001</b>	1.49	0.353	5.01	<b>0.026</b>	1.20	0.376	1.34	0.223
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	3.82	<b>0.039</b>	1.00	0.488	2.24	0.154	0.53	0.816	0.73	0.721
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	18.18	<b>&lt;0.001</b>	9.53	<b>0.045</b>	1.64	0.256	1.68	0.202	0.61	0.822
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	28.58	<b>&lt;0.001</b>	0.89	0.498	0.29	0.877	0.99	0.490	0.91	0.541
POC	1.64	0.233	1.61	0.297	0.05	0.994	1.91	0.151	1.59	0.120
PN	8.81	<b>0.002</b>	1.81	0.302	0.97	0.474	1.16	0.393	1.78	0.073
PP	17.30	<b>&lt;0.001</b>	0.85	0.508	2.47	0.129	1.25	0.351	2.03	<b>0.037</b>
Specific surface area	0.41	0.748	6.93	0.075	2.68	0.110	0.53	0.811	3.12	<b>0.002</b>
Number of bacteria	38.45	<b>&lt;0.001</b>	0.53	0.636	0.66	0.639	1.48	0.261	0.28	0.991
Proteins	12.11	<b>0.001</b>	1.00	0.456	1.03	0.450	1.72	0.192	1.73	0.083
Carbohydrates	2.16	0.145	1.08	0.434	0.39	0.810	1.34	0.311	2.44	<b>0.012</b>
Hydrolytic activity	5.54	<b>0.013</b>	0.25	0.798	1.57	0.273	0.74	0.660	2.81	<b>0.004</b>
Dehydrogenase activity	41.35	<b>&lt;0.001</b>	0.75	0.542	4.06	<b>0.044</b>	1.45	0.271	1.03	0.438
Protein content per cell	11.05	<b>0.001</b>	0.94	0.471	1.03	0.450	1.83	0.167	1.80	0.068
P/C ratio	18.69	<b>&lt;0.001</b>	2.76	0.209	3.80	0.051	0.99	0.486	1.65	0.103
Sp. hydrolytic activity	6.72	<b>0.007</b>	0.18	0.841	1.48	0.294	0.66	0.717	2.39	<b>0.013</b>
Sp. dehydrogenase activity	46.62	<b>&lt;0.001</b>	0.88	0.500	3.61	0.058	1.63	0.216	0.90	0.555
Invertebrate density	1.68	0.224	7.84	0.183	1.20	0.380	0.51	0.829	1.78	0.073

**Table 4:** Results of non-parametric multivariate analysis of variance (MANOVA) for testing the effect of recharge and depth below the groundwater table on bacterial community structure.

Bacterial community structure			
	df	F	p
Recharge(Site)	3	2.40	<b>0.001</b>
Site	2	5.41	<b>0.001</b>
Depth	4	0.85	0.824
Site x Depth	8	0.88	0.837
Recharge(Site) x Depth	12	0.98	0.521
Error	58		

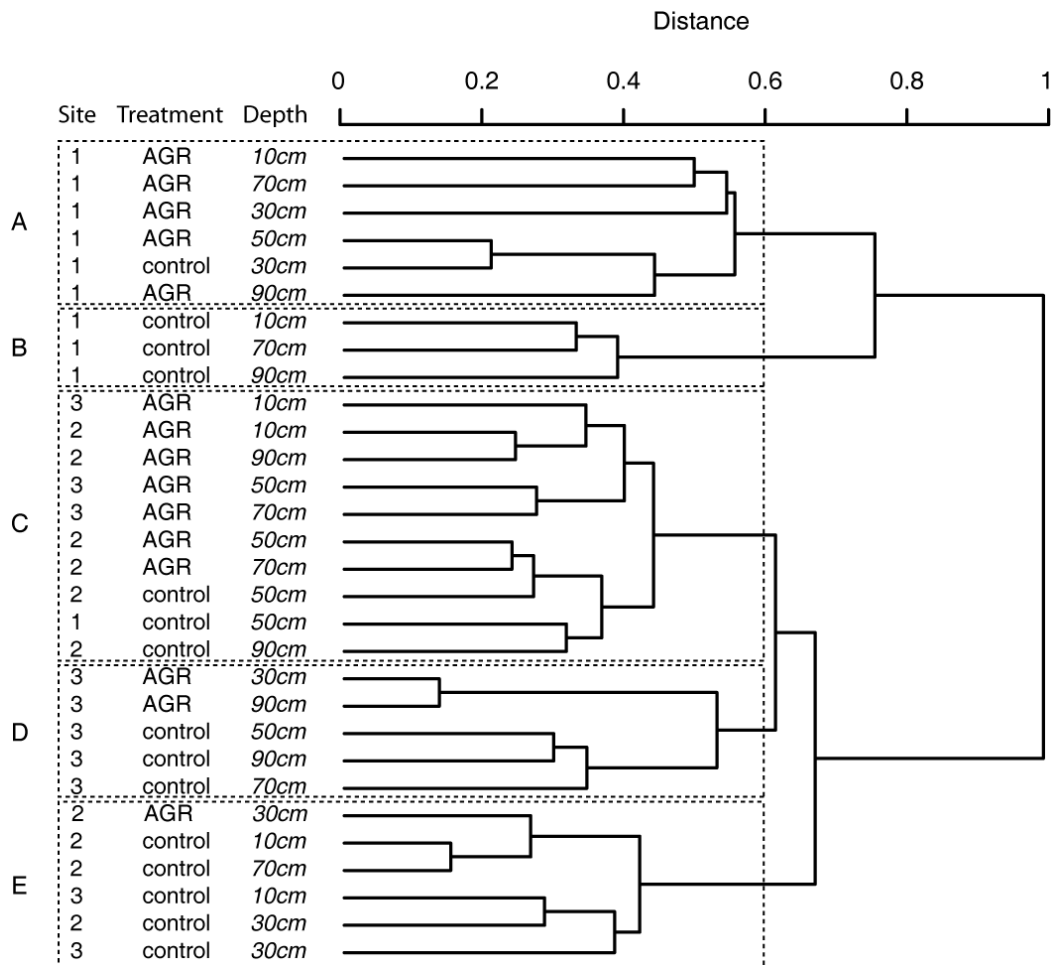


Figure 4: Clustering of 16S rRNA gene-based DGGE profiles of bacteria in sediment samples (n=30; data summed per depth) determined using Ward's clustering method. Site number, treatment (AGR versus control) and depth below the groundwater table are indicated for each sample. Clusters A to E were delineated using an arbitrary distance of 0.6.

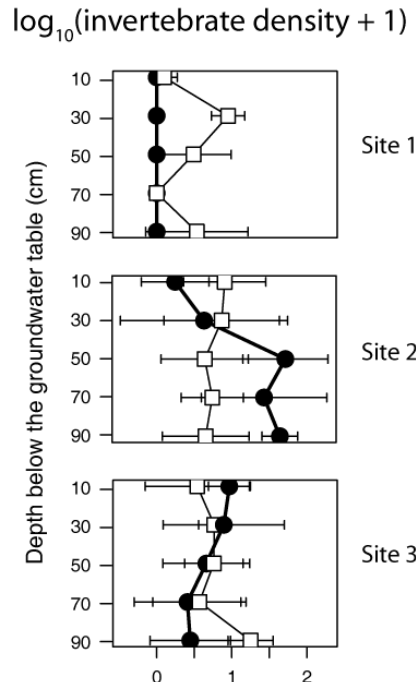


### Structure of bacterial communities

A total of 30 nucleic acid bands were identified; the number of bands averaged  $14 \pm 4$  per sample ( $n=90$ ). Dissimilarity between samples averaged  $0.44 \pm 0.09$  and ranged from 0.14 to 0.67. Sites and AGR had a significant effect on bacterial community structures (Table 4). However, the effects of sites and AGR only accounted for 11% ( $F_{2, 58}= 5.4, p=0.001$ ) and 7% ( $F_{3, 58}=2.4, p=0.001$ ) of total variability, respectively. Cluster analysis distinguished between two groups of samples that belonged to site 1 (clusters A & B) and sites 2 and 3 (clusters C, D & E) (Figure 4). Groups were further separated into distinct clusters that essentially gathered samples belonging to AGR sites (clusters A and C) and control sites (clusters B, D and E).

### Invertebrate assemblages

AGR, sites and depth had no significant effect on invertebrate density (Fig. 5, Table 3). Cyclopoida was by far the most abundant taxon, representing 80% of the 1094 invertebrates collected at all sites. Invertebrate density was only  $12 \pm 25$  individuals / 5 L of pumped water and ranged from 0 to 168 individuals. It was maximal at AGR site 2 whereas no invertebrate was collected at AGR site 1 showing the highest annual flux of DOC (Fig. 5).



**Figure 5:** Changes at depth below the groundwater table in invertebrate density at control (white square) and AGR (black circles) well cluster sites 1 to 3. Horizontal bars show  $\pm 1$  standard deviation for 3 replicate wells.

*Links between environmental attributes, microorganisms, and invertebrates*

The physico-chemical table was significantly correlated ( $RV > 0.4$ ,  $p = 0.001$ ) with the three data tables describing microbial activity and biomass, bacterial community structure and invertebrate assemblages (Fig. 6). Bacterial community structure was significantly linked to invertebrate assemblages ( $RV=0.37$ ,  $p = 0.001$ ). However, there was no relationship between invertebrate assemblages and activity and biomass of microbial biofilm ( $RV=0.07$ ,  $p = 0.35$ ). Microbial activity and biomass was significantly more correlated to physico-chemistry than to bacterial community structure ( $RV_{[0.42]} > RV_{[0.24]}$ ,  $p = 0.001$ ).

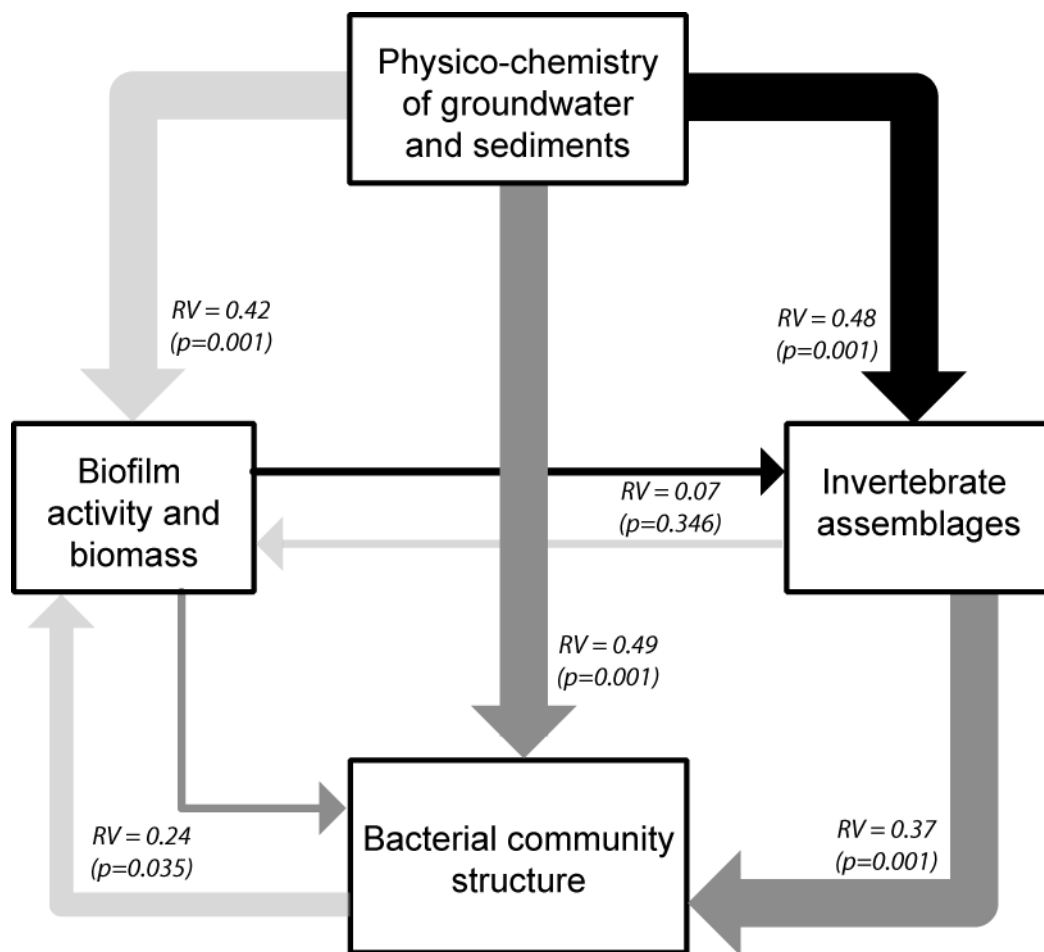
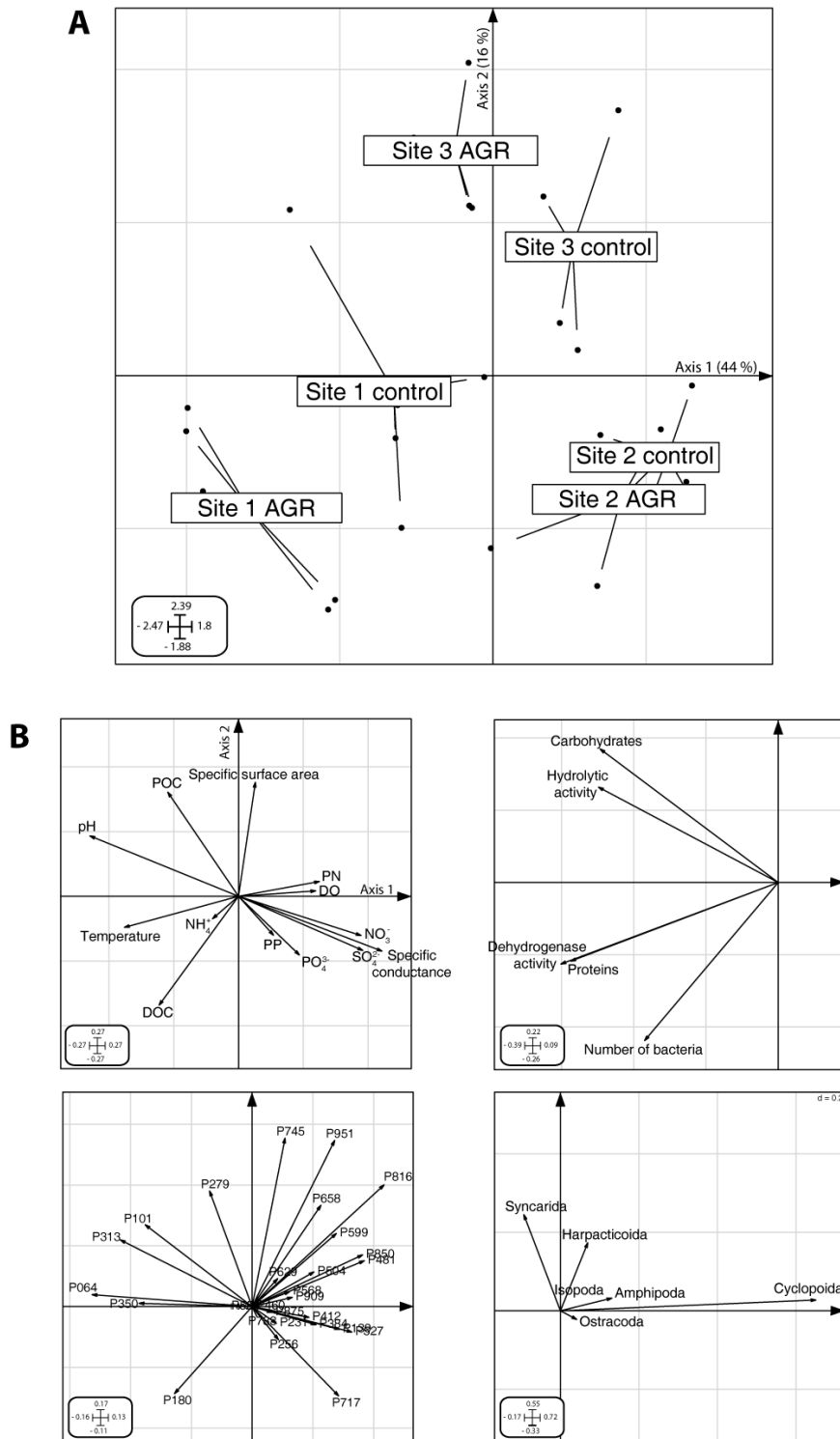


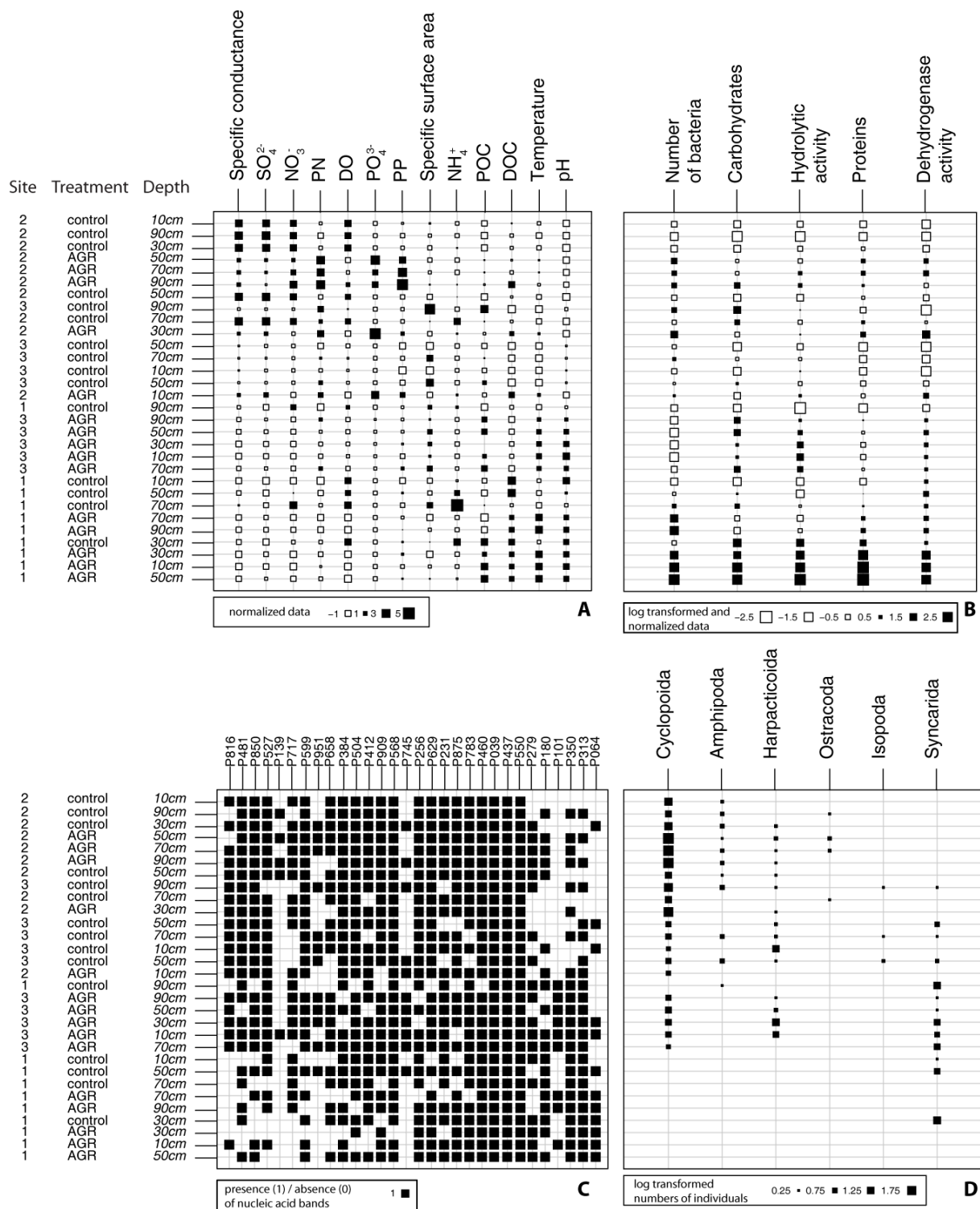
Figure 6: Synthesis of relationships among multivariate data sets. Light grey, grey and black arrows indicate potential controls of biofilm activity and biomass, bacterial community structure and invertebrate assemblages, respectively. RV coefficients with  $p$  values show correlations between tables. Differences in thickness among arrows of a same color reaching a data set indicate the relative importance of controls as determined by bootstrap.

The first and second axes of MCOA explained 44 and 16%, respectively, of the total covariance between the 4 data tables. Sites and treatments (i.e. AGR versus control) were clearly separated along axes 1 and 2 of the reference structure describing the information common to the 4 tables (Fig. 7). RV-coefficients between the reference structure and individual data table showed that the variability within each table was best reproduced in the following order: physico-chemistry of groundwater and sediment (RV=0.83), bacterial community structure (RV=0.68), biofilm activity and biomass (RV=0.55) and invertebrate assemblages (RV=0.52).

Data reorganization according to the first axis of MCOA ordinated samples along a gradient of increasing hydrologic connectivity with surface water which was characterized by a decrease in specific conductance and sulphate concentration and a concomitant increase in pH, temperature, and DOC. (Fig. 8A). Aquifers sediment with high microbial activity and biomass typically occurred in low-salinity groundwater, more particularly in samples collected at AGR site 1. Although a majority of nucleic acid bands appeared in most samples, some bands occurred preferentially in low-salinity groundwater (P180, P101, P350, P313, P064) whereas others were most frequent in high-salinity groundwater (P816, P481, P850 and P527) (Fig. 8C). The composition of invertebrate assemblages also varied along the hydrologic connectivity gradient with most taxa, except Syncarida, being absent in samples characterized by elevated values of DOC, temperature and biofilm activity (Fig. 8D).



**Figure 7:** Results of MCOA performed on physico-chemistry of groundwater and sediment, biofilm activity and biomass, bacterial community structure and invertebrate assemblages. **A.** Factorial scores of samples (dots) on the first two axes of the reference structure. Control and AGR sites stand at the center of gravity of samples (n=5 samples averaged per depth). Each sample is connected to the center of gravity with a line. **B.** Factorial scores of physico-chemical and microbial variables, nucleic acid bands, and invertebrate taxa on the first two axes of the reference structure. Variables with long arrows contribute most to the building of the reference structure.



**Figure 8:** Ordination of samples and variables of the 4 data sets (A – Physico-chemistry of groundwater and sediments, B – Biofilm activity and biomass, C – Bacterial community structure, D – Invertebrate assemblages) according to their factorial scores along the first axis of the MCOA. Squares indicate values of variables for each sample. The size of white (negative) and black (positive) squares is proportional to the normalized or centered values of raw data.

## DISCUSSION

### *Influence of resource supply on groundwater microbial communities*

Our first hypothesis that an increase in DOC flux at AGR sites would stimulate microbial productivity was supported by the results. Moreover, AGR increased the supply of phosphates and the sedimentary stock of phosphorus which might also have contributed to enhance microbial growth and metabolism (Pace & Cole 1994). Our study adds to an increasing body of literature showing that groundwater microbial communities are bottom-up controlled by the availability of organic carbon and nutrients (Bengtsson 1989, Kazumi & Capone 1994, Baker *et al.* 2000). Microbial stimulation was all the more pronounced when the flux of DOC reaching the groundwater table at AGR sites was high. The increase in extracellular hydrolytic activity, dehydrogenase activity and microbial biomass (i.e. cell number and protein content) probably reflected the conversion of DOC into low-molecular weight compounds prior to assimilation and subsequent respiration or incorporation into bacterial biomass (Lazarova & Manem 1995, Marmonier *et al.* 1995). Increased resource supply at AGR sites also stimulated cell metabolism because bacteria exhibited higher specific dehydrogenase and hydrolytic activities, elevated protein content per cell and apparently favored the synthesis of proteins rather than the production of extracellular polymeric substances (Sutherland 2001, Mermillod-Blondin *et al.* 2005).

The small proportion in the variability of nucleic acid bands among samples accounted for by AGR suggested that increased resource supply stimulated autochthonous microorganisms without leading to a major shift in bacterial community structure. Moreover, RV coefficients indicated that microbial activity and biomass were mostly related to groundwater physico-chemistry rather than to bacterial community structure. Major shifts in the structure of groundwater microbial communities typically occurred in organic contaminant plumes along which marked variation in redox potential and concentration of specific organic compounds promoted the growth of distinct bacterial strains (Haack & Bekins 2000, Franklin *et al.* 2000, Röling *et al.* 2001, Haack *et al.* 2004). Artificial groundwater recharge with stormwater neither markedly increased the biodegradability of DOC leached to groundwater nor did it result in strong reducing conditions ( $E_h > 100$  mV, data not shown). Despite high stormwater infiltration rates, Foulquier *et al.* (2009c) showed that most of the DOC reaching the groundwater table was refractory because the more labile fraction was intercepted in the soil and vadose zone. Nevertheless, a number of nucleic acid bands were found to occur

preferentially at either ends of the hydrologic connectivity gradient revealed by MCOA. A further step of DNA isolation and sequencing would enable identification of whether these particular bands correspond to distinct trophic bacterial groups. For example, alpha-proteobacteria predominate in oligotrophic freshwater ecosystems whereas beta-proteobacteria and members of the *Cytophaga-Flavobacterium* group are known to be implicated in the degradation of complex recalcitrant organic compounds (Eiler et al. 2003, Gao et al. 2005).

#### *Response of invertebrates to an increase in resource availability*

Our second hypothesis that an increase in microbial productivity would support higher invertebrate densities was not supported. Energy transfer from biofilm to invertebrates was apparently limited. Invertebrate density was not significantly higher at AGR sites and invertebrate assemblages did not significantly correlate ( $R^2=0.07$ ) with microbial activity and biomass. Studies evaluating the relationship between resource supply and groundwater invertebrate assemblages provided equivocal results with some studies but not all reporting a positive relationship between invertebrate density and bacterial abundance (Brunke & Fischer 1999, Franken *et al.* 2001, Storey & Williams 2004), microbial activity (Mauclair et al. 2000, Storey & Williams 2004) or dissolved and particulate organic matter (Brunke & Gonser 1999, Datry *et al.* 2005, Storey & Williams 2004). Mösslacher and Notenboom (1999) and Strayer et al. (1997) pointed out that invertebrate density in groundwater and the hyporheic zone of streams should increase with increasing organic matter supply until DO deficiency resulting from microbial respiration becomes a limiting factor. Similarly, we suggest that environmental disturbances associated with an increase in hydrologic connectivity, particularly DO depletion and excessive heat transfer, offset the beneficial effect of food supply. Indeed, invertebrate assemblages were significantly related to groundwater and sediment physico-chemistry ( $R^2=0.48$ ) while they did not correlate to microbial activity and biomass. Moreover, invertebrates were almost totally absent in groundwater characterized by elevated temperature (i.e. 22 °C) and near-anoxic conditions although aquifer sediment supported the highest microbial activity and biomass. Foulquier et al. (2009a) showed that advective heat transfer due to stormwater infiltration dramatically increased the annual amplitude of groundwater at AGR sites (minimum and maximum temperatures of 8 and 24 °C). Summer warming of infiltration beds stimulated aerobic respiration in the soil and vadose zone, thereby leading to groundwater recharge with oxygen-poor stormwater (Datry et

al. 2003b, Foulquier et al. 2009a). Obligate groundwater animals are typically more resistant to low oxygen concentrations than their epigeal relatives, but they cannot survive prolonged anoxic periods (Malard & Hervant 1999). Issartel et al. (2005) measured increased mortality rates in the subterranean amphipods *Niphargus rhenorhodanensis* and *N. virei* when water temperature exceeded 17 to 21 °C. According to the environmental stress model (Menge & Sutherland 1976, Menge et al. 2002), energy allocation by invertebrates in response to multiple stresses induced by an increase in hydrologic connectivity could have weakened trophic interactions between microorganisms and invertebrates, thereby impeding the flow of energy through groundwater food webs. The environmental stress model may be particularly relevant for understanding the functioning of groundwater DOC-based food webs because labile DOC fluxes are more rapidly attenuated at depth into the sediment than environmental disturbances. Datry et al. (2005) and Foulquier et al. (2009a) showed that seasonal surface-water temperature fluctuations could be transmitted at depths of several meters below the soil surface at AGR sites whereas considerable attenuation of surface-derived DOC occurred within the first 2 m of the vadose zone.

#### *Top-down control of microorganisms by invertebrates*

Invertebrates were shown to exert a strong control on the productivity and structure of microbial communities in a number of ecosystems including soils (Mikola & Setälä 1998b), streams (Perlmutter & Meyer 1991), and sediments (Edler and Dodds 1996). Edler and Dodds (1996) showed that the subterranean isopod *Caecidotea tridentata* enhanced by four fold the abundance and activity of attached bacteria in sediments collected from a North American cave. In the present study, low invertebrate density and the potential allocation of energy in response to hypoxia and elevated temperature probably prevented a strong top-down control of groundwater invertebrates on microbial communities. We used literature values of aquifer microbial productivity and ingestion rate of microbial carbon by copepods to assess the potential effect of grazing on microbial production at the most densely populated site, which yielded an average of 100 cyclopoid per 5 l of pumped water. Assuming a microbial productivity of 0.19 mg C dm<sup>-3</sup> day<sup>-1</sup> (Craft *et al.* 2002), an ingestion rate of microbial carbon of 0.47 µg C copepod<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup> (highest value in Perlmutter & Meyer 1991) and an invertebrate density of 4 cyclopoid per dm<sup>3</sup>, grazing pressure would at most account for a reduction of only 1% of microbial production. Foulquier et al. (2009d) who traced the flux of <sup>13</sup>C-labelled



DOC in sediment batches containing individuals of the subterranean amphipods *N. rhenorhodanensis* demonstrated that the feeding activity of the amphipod was too low to impede an increase in microbial biomass in response to increasing DOC flux. The significant correlation between invertebrate assemblages and bacterial community structure ( $R^2= 0.37$ ) may temptingly be considered as evidence for a top-down control by invertebrates. Several studies found that selective grazing by protozoans of cells showing distinct morphology modified the structure of bacterial communities (Šimek et al. 2001, Hahn & Höfle 2001, Rønn et al. 2002). However, the absence of a significant link between invertebrate assemblages and biofilm biomass and activity indicated that the relationship between invertebrate assemblages and bacterial community structure was most likely due to the fact that they were both correlated to groundwater and sediment physico-chemistry. Indeed, modifications in the structure of planktonic (Hahn and Höfle 2001, Langenheder and Jürgens 2001), soil (Rønn et al. 2002) and benthic (Perlmutter & Meyer 1991) communities of bacteria were always induced by a strong grazing pressure that also affected microbial activity and biomass.

## CONCLUSIONS

Quantifying the strength of trophic interactions within groundwater food webs is a critical step for understanding the influence of microbial communities and invertebrates on biogeochemical processes involved in the C and N cycles (Boulton et al. 2008). Although our knowledge of subterranean food webs is still fragmentary, any increase in resource supply is usually expected to stimulate microbial productivity and enhance trophic interactions between microorganisms and invertebrates (Brunke & Fischer 1999, Gibert & Deharveng 2002). Our study revealed a strong bottom-up regulation of attached microbial communities by DOC fluxes in the uppermost layers of groundwater artificially recharged with stormwater, but a weak transfer of energy to the next trophic level composed of crustaceans. Dissolved oxygen depletion and groundwater warming caused by the increase in hydrologic connectivity maintained low invertebrate densities at recharge sites, thereby preventing a significant top-down regulation of microbial biomass by invertebrates. Hydrologic connectivity with surface water appears as a key factor setting up the strength of bottom-up and top-down controls through its dual effect on resource supply and environmental disturbances. In heavily-recharged groundwater areas, organic carbon processing at the upstream end of DOC-rich groundwater flow paths would essentially be due to microbial activity because environmental disturbances severely constrain top-down regulation of micro-organisms by invertebrates. A

next important step is to assess the relative influence of bottom-up and top-down controls within groundwater food webs among aquifers differing in their hydrologic connectivity with surface water.

## ACKNOWLEDGMENTS

This study was conducted within the framework of the experimental observatory for urban hydrology (OTHU, <http://www.graie.org/othu/>). It was funded by the French National Research Agency (project ANR-05-ECOT-006; <http://www.graie.org/ecopluiers/>), the French programme EC2CO-Cytrix from INSU/CNRS (project “NAPCOD”), the urban community of Lyon, and the Rhône-Alpes Region. We are indebted to G. Bouger, E. Malet, Y. Negrutiu, L. Simon, D. Ferreira and F. Vallier for their most dedicated support with the field and laboratory work.

## LITERATURE CITED

- Anderson M.J. (2001) A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecology* 26, 32-46.
- Bady P., Doledec S., Dumont B., Fruget J.F. (2004) Multiple co-inertia analysis: a tool for assessing synchrony in the temporal variability of aquatic communities. *Académie des Sciences. Comptes Rendus. Biologies.* 327, 29-36.
- Baker M.A., Valett H.M., Dahm C.N. (2000) Organic carbon supply and metabolism in a shallow groundwater ecosystem. *Ecology* 81, 3133-3148.
- Bengtsson G. (1989) Growth and metabolic flexibility in groundwater bacteria. *Microbial Ecology* 18(3), 235-248.
- Boulton A.J., Fenwick G.D., Hancock P.J., Harvey M.S. (2008) Biodiversity, functional roles and ecosystem services of groundwater invertebrates. *Invertebrate Systematics* 22, 103-116.
- Brunke M., Gonser T. (1997) The ecological significance of exchange process between rivers and groundwater. *Freshwater Biology* 37, 1-33.
- Brunke M., Gonser T. (1999) Hyporheic invertebrates - the clinical nature of interstitial communities structured by hydrological exchange and environmental gradients. *Journal of the North American Benthological Society* 18, 344-362.

- Brunke M., Fischer H. (1999) Hyporheic bacteria – relationships to environmental gradients and invertebrates in a prealpine stream. *Archiv Fur Hydrobiologie* 146, 189-217.
- Chessel D., Hanafi M. (1996) Analyse de la co-inertie de K nuages de points. *Revue de Statistique Appliquée* 44, 35-60.
- Craft J., Stanford J., Pusch M. (2002) Microbial respiration within a floodplain aquifer of a large gravel-bed river. *Freshwater Biology* 47, 251-261.
- Danielopol D.L. (1989) Groundwater fauna associated with riverine aquifers. *Journal of the North American Benthological Society* 8, 18-35.
- Datry T. (2003a) Urbanisation et qualité des nappes phréatiques: réponse des écosystèmes aquatiques souterrains aux pratiques d'infiltration d'eau pluviale. PhD thesis. Université Lyon 1, Lyon, France.
- Datry T., Malard F., Vitry L., Hervant F., Gibert J. (2003b) Solute dynamics in the bed of a stormwater infiltration basin. *Journal of Hydrology* 273, 217-233.
- Datry T., Malard F., Gibert J. (2005) Response of invertebrate assemblages to increased groundwater recharge rates in a phreatic aquifer. *Journal of the North American Benthological Society* 24, 461-477.
- Daufresne M., Bady P., Fruget J.F. (2007) Impacts of global changes and extreme hydro-climatic events on macroinvertebrate community structures in the French Rhône River. *Oecologia* 151, 544-559.
- Dice L.R. (1945) Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology* 26, 297-302.
- Dorigo U., Fontvieille D., Humbert J.F. (2006) Spatial variability in the dynamic and the composition of the bacterioplankton community of the Lac du Bourget (France). *FEMS Microbiology Ecology* 58, 109-119.
- D'Souza F., Garg A., Bhosle N.B. (2005) Seasonal variation in the chemical composition and carbohydrate signature compounds of biofilm. *Aquatic Microbial Ecology* 41, 199-207.
- Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A. and Smith F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28, 350-356.
- Edler C.C., Dodds W.K. (1996) The ecology of a subterranean isopod, *Caecidotea tridentata*. *Freshwater Biology* 35, 249-259.
- Eiler A., Langenheder S., Bertilsson S., Tranvik L.J. (2003) Heterotrophic bacterial growth efficiency and community structure at different natural organic carbon concentrations. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 3701-3709.

- Foulquier A., Malard F., Barraud S., Gibert J. (2009a) Thermal influence of urban groundwater recharge from stormwater infiltration basins. *Hydrological Processes* 23(12), 1701-1713.
- Foulquier A., Mermillod-Blondin F., Malard F., Simon L., Gibert J. (2009b) Response of sediment biofilm to increased DOC supply in groundwater artificially recharged with stormwater (submitted to *Water Research*)
- Foulquier A., Malard F., Mermillod-Blondin F., Detry T., Simon L., Montuelle B., Gibert J. (2009c) Change in dissolved organic carbon and oxygen at the water table region of an aquifer recharged with stormwater: biological uptake or mixing? (submitted to *Biogeochemistry*)
- Foulquier A., Simon L., Gilbert F., Fourel F., Malard F., Mermillod-Blondin F. (2009d) Relative influences of DOC flux and subterranean fauna on microbial abundance and activity in aquifer sediments: new insights from <sup>13</sup>C-tracer experiments (submitted to *Freshwater Biology*)
- Franken R., Storey R., Williams D. (2001) Biological, chemical and physical characteristics of downwelling and upwelling zones in the hyporheic zone of a north-temperate stream. *Hydrobiologia* 444, 183-195.
- Franklin R.B., Taylor D.R., Mills A.L. (2000) The distribution of microbial communities in anaerobic and aerobic zones of a shallow coastal plain aquifer. *Microbial Ecology* 38(4), 377-386.
- Gao X.Q., Olapade O.A., Leff L.G. (2005) Comparison of benthic bacterial community composition in nine streams. *Aquatic Microbial Ecology* 40, 51-60.
- Gasol J.M., Pedros-Alio C., Vaque D. (2002) Regulation of bacterial assemblages in oligotrophic plankton systems: results from experimental and empirical approaches. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81, 435-452.
- Gibert J., Deharveng L. (2002) Subterranean ecosystems: a truncated functional biodiversity. *Bioscience* 52, 473-481.
- Goldscheider N., Hunkeler D., Rossi P. (2006) Review: Microbial biocenosis in pristine aquifers and an assessment of investigation methods. *Hydrogeology Journal* 14, 926-941.
- Haack S.K., Bekins B.B. (2000) Microbial populations in contaminant plumes. *Hydrogeology Journal* 8, 63-76.

- Haack S.K., Fogarty L.R., West T.G., Alm E.W., McGuire J.T., Long D.T., Hyndman D.W., Forney L.J. (2004) Spatial and temporal changes in microbial community structure associated with recharge-influenced chemical gradients in a contaminated aquifer. *Environmental Microbiology* 6(5), 438-448.
- Hahn M.W., Höfle M.G. (2001) Grazing of protozoa and its effect on populations of aquatic bacteria. *FEMS Microbiology Ecology* 35, 113-121.
- Hedde M., Lavelle P., Joffre R., Jiménez J.J., Decaëns T. (2005) Specific functional signature in soil macro-invertebrate biostructures. *Functional Ecology* 19, 785-793.
- Houri-Davignon C., Relexans J.C., Etcheher H. (1989) Measurements of actual electron transport system (ETS) activity in marine sediments by incubation with INT. *Environmental Technology* 10, 91-100.
- Hunter M.D., Price, P.W. (1992) Playing chutes and ladders: heterogeneity and the relative roles of bottom-up and top-down forces in natural communities. *Ecology* 73, 724-732.
- Huxel G.R., McCann K. (1998) Food web stability: the influence of trophic flows across habitats. *American Naturalist* 152, 460-469.
- Issartel J., Hervant F., Voituron Y., Renault D., Vernon P. (2005) Behavioural, ventilatory and respiratory responses of epigeal and hypogean crustaceans to different temperatures. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology* 141, 1-7.
- Jones J.B., Fisher S.G., Grimm N.B. (1995) Vertical hydrological exchange and ecosystem metabolism in a Sonoran Desert stream. *Ecology* 76, 942-952.
- Jørgensen P.E., Eriksen T., Jensen B.K. (1992) Estimation of viable biomass in wastewater and activated sludge by determination of ATP, oxygen utilization rate and FDA hydrolysis. *Water Research* 26(11), 1495-1501.
- Kazumi J., Capone D.G. (1994) Heterotrophic microbial activity in shallow aquifer sediments of Long Island, New York. *Microbial Ecology* 28(1), 19-37.
- Langenheder S., Jürgens K. (2001) Regulation of bacterial biomass and community structure by metazoan and protozoan predation. *Limnology and Oceanography* 46(1), 121-134.
- Lazarova V. and Manem J. (1995) Biofilm characterization and activity analysis in water and wastewater treatment. *Water Research* 29(10), 2227-2245.
- Leibold M.A. (1996) A graphical model of keystone predators in food webs: trophic regulation of abundance, incidence and diversity patterns in communities. *American Naturalist* 147, 784-812.

- Leibold M.A., Chase J.M., Shurin J.B., Downing A.L. (1997) Species turnover and the regulation of trophic structure. *Annual Review of Ecology and Systematics* 28, 467-494.
- Malard F., Hervant F. (1999) Oxygen supply and the adaptations of animals in groundwater. *Freshwater Biology* 41, 1-30.
- Marmonier P., Fontvieille D., Gibert J. and Vanek V. (1995) Distribution of dissolved organic carbon and bacteria at the interface between the Rhone River and its alluvial aquifer. *Journal of the North American Benthological Society* 14(3), 382-392.
- Mauclaire L., Gibert J., Claret C. (2000) Do bacteria and nutrients control faunal assemblages in alluvial aquifers? *Archiv Fur Hydrobiologie* 148(1), 85-98.
- McArdle B.H., Anderson M.J. (2001) Fitting multivariate models to community data: a comment on distance-based redundancy analysis. *Ecology* 82, 290-297.
- Menge B.A., Sutherland J. (1976) Species diversity gradients: synthesis of the roles of predation, competition and temporal heterogeneity. *American Naturalist* 110, 351-369.
- Menge B.A. (2000) Top-down and bottom-up community regulation in marine rocky intertidal habitats. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 250, 257-289.
- Menge B.A., Olson A.M., Dahlhoff E.P. (2002) Environmental stress, bottom-up effects, and community dynamics: Integrating molecular-physiological and ecological approaches. *Integrative and Comparative Biology* 42, 892-908.
- Mermillod-Blondin F., Mauclaire L., Montuelle B. (2005) Use of slow filtration columns to assess oxygen respiration, consumption of dissolved organic carbon, nitrogen transformations, and microbial parameters in hyporheic sediments. *Water Research* 39(9), 1687-1698.
- Mikola J., Setälä H. (1998a) No evidence of trophic cascades in an experimental microbial-based soil food web. *Ecology* 79(1), 153-164.
- Mikola J., Setälä H. (1998b) Productivity and trophic-level biomasses in a microbial-based soil food web. *Oikos* 82, 158-168.
- Moore J.C., Berlow E.L., Coleman D.C., De Ruiter P.C., Dong Q., Hastings A. *et al.* (2004) Detritus, trophic dynamics and biodiversity. *Ecology Letters* 7, 584-600.
- Mösslacher F., Notenboom J. (1999) Groundwater biomonitoring. Biomonitoring of polluted water. Trans Tech Publications, Zürich, Switzerland.

- Oksanen L., Fretwell S.D., Arruda J., Niemela P. (1981) Exploitation ecosystems in gradients of primary productivity. *American Naturalist* 118, 240-261.
- Pace M.L., Cole J.J. (1994) Comparative and experimental approaches to top-down and bottom-up regulation of bacteria. *Microbial Ecology* 28, 181-193.
- Perlmutter D.G., Meyer J.L. (1991) The impact of a stream-dwelling harpacticoid copepod upon detritally associated bacteria. *Ecology* 71, 2170-2180.
- Peterson G.L. (1977) A modification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry* 83(2), 346-356.
- Polis G.A., Strong D.R. (1996) Food web complexity and community dynamics. *American Naturalist* 147, 813-846.
- Porter K.S., Feig Y.S. (1980) The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnology and Oceanography* 25(5), 943-948.
- Power M.E. (1992) Top-down and bottom-up forces in food webs: do plants have primacy? *Ecology* 73, 733-746.
- Pusch M., Fiebig D., Brettar I., Eisenmann H., Ellis B.K., Kaplan L.A., Lock M.A., Naegeli M.W., Traunspurger W. (1998) The role of micro-organisms in the ecological connectivity of running waters. *Freshwater Biology* 40, 453-495.
- R Development Core Team (2006) R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing: Vienna. <http://www.R-project.org>.
- Robert P., Escoufier Y. (1976) A unifying tool for linear multivariate statistical methods: the RV-coefficient. *Applied Statistics* 25, 257-265.
- Röling W.F.M., Van Breukelen B.M., Braster M., Lin B., Van Verseveld H.W. (2001) Relationships between microbial community structure and hydrochemistry in a landfill leachate-polluted aquifer. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 4619-4629.
- Rønn R., McCaig A., Griffiths B., Prosser J. (2002) Impact of protozoan grazing on bacterial community structure in soil microcosms. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 6094-6105.
- Rosemond A.D., Pringle C.M., Ramirez A., Paul M.J. (2001) A test of top-down and bottom-up control in a detritus-based food web. *Ecology* 82, 2279-2293.
- Schauer M., Massana R., Pedrós-Alió C. (2000) Spatial differences in bacterioplankton composition along the Catalan coast (NW Mediterranean) assessed by molecular fingerprinting. *FEMS Microbiology Ecology* 33, 51-59.

- Šimek K., Pernthaler J., Weinbauer M.G., Hornák K., Dolan J.R., Nedoma J., Mašín M., Amann R. (2001) Changes in bacterial community composition and dynamics and viral mortality rates associated with enhanced flagellate grazing in a mesoeutrophic reservoir. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 2723-2733.
- Simon K.S., Benfield E.F., Macko S.A. (2003) Food web structure and the role of epilithic biofilms in cave streams. *Ecology* 84, 2395-2406.
- Steiner C.F. (2001) The effects of prey heterogeneity and consumer identity on the limitation of trophic-level biomass. *Ecology* 82, 2495-2506.
- Storey R.G., Williams D.D. (2004) Spatial responses of hyporheic invertebrates to seasonal changes in environmental parameters. *Freshwater Biology* 49, 1468-1486.
- Strayer D.L., May S.E., Nielsen P., Wolheim W., Hausam S. (1997) Oxygen, organic matter, and sediment granulometry as controls on hyporheic animal communities. *Archiv Fur Hydrobiologie* 140, 131-144.
- Strong D.R. (1992) Are trophic cascades all wet? the redundant differentiation in trophic architecture of high diversity ecosystems. *Ecology* 73, 747-754.
- Sutherland I.W. (2001) Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology* 147, 3-9.
- Ward J.V., Bretschko G., Brunke M., Danielopol D., Gibert J., Gonsler T., Hildrew A.G. (1998) The boundaries of river systems: the metazoan perspective. *Freshwater Biology* 40, 531-569.



# 6

## SYNTHÈSE ET PERSPECTIVES

## 6.1. SYNTHÈSE ET DISCUSSION

### 6.1.1. Hypothèses testées

#### Hypothèse 1

L'augmentation des flux d'eau infiltrés engendre une augmentation des flux de COD au toit des nappes qui est de nature à stimuler l'activité du compartiment microbien.

#### Hypothèse 2

L'augmentation des flux de COD atteignant les nappes intensifie les interactions trophiques entre le compartiment microbien et les invertébrés. Un contrôle ascendant impliquerait une augmentation de la densité des peuplements d'invertébrés dont l'activité de broutage pourrait limiter l'augmentation de la biomasse microbienne (contrôle descendant).

Les résultats obtenus durant cette thèse soutiennent l'hypothèse selon laquelle l'augmentation des flux d'eau infiltrés induit une augmentation des flux de COD de nature à stimuler l'activité du compartiment microbien dans les horizons supérieurs des nappes phréatiques. Cependant, malgré une augmentation considérable des flux de COD, la stimulation des communautés microbiennes apparaît fortement limitée par la qualité de ces apports dont la partie la plus facilement assimilable est probablement rapidement consommée lors de l'écoulement à travers le sol et la zone non saturée. La seconde hypothèse stipulant une intensification des interactions trophiques entre le compartiment microbien et les invertébrés en réponse à une augmentation des flux de COD atteignant les nappes n'a pas été vérifiée. Les résultats obtenus suggèrent une faible régulation de la densité des peuplements d'invertébrés

par la quantité de ressource disponible et une absence de contrôle des communautés microbiennes par les invertébrés. Si cette absence d'interactions peut résulter d'une augmentation insuffisante de la production microbienne, l'intensification du régime des perturbations induite par des flux d'eau de surface constitue également un facteur limitant l'intensification des relations trophiques. Dans le cadre du modèle conceptuel présenté dans le premier chapitre de ce document, le fonctionnement des horizons supérieurs des nappes phréatiques rechargées avec des eaux de ruissellement pluvial traduit de faibles apports en COD facilement assimilable stimulant peu la production microbienne, mais également une situation d'intenses perturbations environnementales limitant l'établissement de populations d'invertébrés. Ce résultat reflète une atténuation des flux de COD facilement assimilable avec le temps de résidence au sein de la zone non saturée plus efficace que l'atténuation des perturbations lors de la recharge. Cette différence entre les dynamiques de transmission de la ressource et des perturbations limitent nécessairement les cas possibles où une augmentation de la production microbienne peut effectivement intensifier les interactions entre le compartiment microbien et les invertébrés. Par ailleurs, les expériences réalisées en laboratoire dans des conditions de production microbienne élevée et en l'absence de perturbations n'ont pas permis d'observer un fort contrôle du compartiment microbien par les invertébrés. Ces résultats laissent penser que les invertébrés ont un rôle tenu sur le fonctionnement des écosystèmes souterrains.

### **6.1.2. Influence de la recharge sur les flux de carbone organique, de chaleur et les processus biogéochimiques**

Les résultats obtenus ont montré que dans le cadre des pratiques de recharge artificielle des aquifères, l'infiltration localisée dans le temps et dans l'espace de volumes importants d'eaux de ruissellement pluvial entraînait une augmentation considérable des quantités d'eau et de COD atteignant les horizons supérieurs des nappes phréatiques. Ainsi, les flux d'eau et de carbone organique dissous atteignant le toit des aquifères aux zones de recharge atteignent respectivement des valeurs jusqu'à 850 et 1700 fois plus élevées qu'aux zones de référence soumises à une recharge naturelle par infiltration directe des précipitations. Cette augmentation des flux de COD se traduit cependant par un accroissement significatif mais modéré ( $0.3 \text{ mg C l}^{-1}$ ) de la concentration en COD aux horizons supérieurs des nappes phréatiques. D'un point de vue général, il est probable que les flux de COD atteignant le toit

des nappes soient principalement liés aux flux d'eau infiltrés alors que les concentrations en COD, dépendantes de l'épaisseur de zone non saturée, reflètent plutôt la nature du COD. Les concentrations plus élevées au toit des nappes proches de la surface sont ainsi susceptibles de traduire des apports de COD plus biodégradable que les concentrations plus faibles traduisant une nature plus réfractaire. L'augmentation des temps de résidence des eaux d'infiltration dans le sol et la zone non saturée permet une dégradation plus importante du COD biodégradable dont les quantités atteignant le toit des nappes sont donc fonction de l'épaisseur de la zone non saturée. Pabich *et al.* (2001) ont ainsi observé que les concentrations en COD mesurées au toit des nappes diminuent de manière exponentielle avec l'épaisseur de ZNS, les différences de biodégradabilité étant reflétées par une atténuation plus rapide et également exponentielle du COD avec la profondeur sous la surface libre des nappes les plus proches de la surface ( $ZNS < 2$  m). Une décroissance des concentrations en COD avec l'épaisseur de ZNS a également été observée dans le cadre de mes travaux, mais de manière linéaire, tant sur les sites de recharge que de référence. De plus, malgré l'augmentation considérable des flux de COD infiltrés au niveau du sol, l'absence de décroissance exponentielle des concentrations en COD sous la surface libre des nappes suggère que l'épaisseur de ZNS est suffisante pour entraîner une consommation de la majorité du COD biodégradable avant son arrivée au toit des nappes, même dans le cas des nappes les plus proches de la surface considérées dans ces travaux ( $1.5 \text{ m} < ZNS < 3.5 \text{ m}$ ). Dans le cadre des pratiques de traitement des eaux par infiltration, les premiers mètres du sol et de la zone non saturée sont généralement considérés comme les principales zones de rétention et de dégradation de la matière organique, le compartiment microbien assurant la majorité de la dégradation du COD biodégradable (Quanrud *et al.* 2003, Rauch-Williams & Drewes 2006, Långmark *et al.* 2004). Quanrud *et al.* (2003) montrent que lors de l'infiltration d'eaux usées présentant des concentrations en COD supérieures à  $15 \text{ mg C l}^{-1}$ , la plus forte réduction des concentrations a lieu dans les 3 premiers mètres, la fraction la plus facilement biodégradable étant consommée en moins de 1.5 m. L'ensemble des mesures effectuées dans le cadre de cette thèse suggère en effet que les apports de COD atteignant les horizons supérieurs des nappes phréatiques sont constitués d'une fraction faiblement assimilable par le compartiment microbien. L'utilisation d'un modèle de mélange indique clairement que lors des épisodes de recharge, les décroissances en COD et en OD au toit des nappes sont principalement liées à un phénomène de mélange entre les eaux d'infiltration et les eaux souterraines. Ces résultats indiquent que la dégradation du COD par le compartiment microbien et la consommation d'OD associée interviennent

principalement dans le sol et la zone non saturée. Les respirations aérobies sont d'ailleurs stimulées par les températures élevées au sein du lit d'infiltration des ouvrages lors des périodes estivales. L'identification d'une forte consommation de l'OD contenu dans les eaux d'infiltration lors de leur passage à travers la zone non saturée rejoint les travaux de Datry *et al.* (2003b) et Nogaro *et al.* (2007) montrant une désoxygénation presque totale des eaux d'infiltration après leur passage à travers la couche de sédiments organiques retenus dans le lit des ouvrages d'infiltration. De plus, les mesures de respiration potentielle par micro-catharométrie n'ont pas permis d'identifier une stimulation des respirations aérobies au toit des nappes lors des épisodes de recharge malgré la sensibilité de la méthode dans le cadre des apports de COD biodégradable en laboratoire. Des expériences d'incubation de COD issu de divers types de sols ont montré que les différences de biodégradabilité pouvaient entraîner des temps de résidence s'étalant de 2 jours pour la fraction la plus assimilable jusqu'à plus de 10 ans pour la fraction la plus réfractaire (Kalbitz *et al.* 2003). En utilisant la relation établie en laboratoire reliant les taux d'abattement en COD et OD et les respirations mesurées par micro-catharométrie, la capacité d'abattement en COD et en OD aux horizons supérieurs des nappes phréatiques (calculée à partir de la valeur médiane des respirations mesurées sur le terrain i.e. 14 ng CO<sub>2</sub> par gramme de sédiment et par heure) est de 0.042 mg C et 0.084 mg O<sub>2</sub> par litre de sédiment et par heure. En considérant un flux d'eau de 50 l m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup> au toit des nappes lors des épisodes pluvieux, la diminution de concentration en COD et en OD après l'écoulement vertical à travers un mètre de sédiment serait de 0.17 mg C l<sup>-1</sup> et de 0.34 mg O<sub>2</sub> l<sup>-1</sup>. La cinétique de dégradation du COD faiblement assimilable atteignant le toit des nappes implique donc que le processus de dégradation lors des épisodes de recharge ne peut intervenir entièrement au toit des nappes. Ce processus devrait ainsi se poursuivre durant les écoulements en aval des bassins d'infiltration.

Les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse permettent également une meilleure compréhension des effets et des mécanismes mis en cause dans le cadre d'une augmentation de la connectivité hydrologique avec les écosystèmes de surface sur le régime thermique des horizons supérieurs des nappes phréatiques. Ces effets et mécanismes abordés dans ce document à travers une analyse corrélatoire des séries temporelles ont par ailleurs été l'objet d'une modélisation qui a permis d'identifier les paramètres prépondérants contrôlant les transferts de chaleur (Chastanet *et al.* 2008, Baudoin *et al.* 2009). La faible amplitude thermique annuelle (<1.5°C) observée aux sites de référence témoigne de l'atténuation

exponentielle des variations de température de l'air avec la profondeur dans le sol dans le cadre d'un transfert de chaleur par conduction (Smerdon *et al.* 2003). En revanche, l'augmentation considérable des flux d'eau infiltrés favorisant les transferts de chaleur par advection, le régime thermique des nappes phréatiques aux sites de recharge apparaît comme intensément perturbé. Si lors des épisodes de recharge, les variations de température au toit des nappes dépassent rarement 3°C, l'amplitude thermique annuelle y est en moyenne 9 fois supérieure à celle observée aux sites de référence. Pour certains sites, cette augmentation d'amplitude se traduit par un maintien de la température des eaux souterraines à des valeurs supérieures à 20°C pour des périodes s'étalant jusqu'à 3 mois consécutifs. D'un point de vue physiologique, ces conditions sont incompatibles avec la survie des populations d'invertébrés souterrains (Issartel *et al.* 2005). Si les échanges de chaleur au sein de la zone non saturée régulent en partie la température des eaux d'infiltration atteignant la nappe lors des épisodes pluvieux, l'épaisseur de zone non saturée a cependant peu d'influence sur l'amplitude thermique annuelle des eaux souterraines qui est en fait principalement liée aux quantités d'eaux infiltrées aux zones de recharge. Ce résultat souligne les différences de dynamique entre les apports de carbone organique facilement assimilable et les apports de chaleur aux horizons supérieurs des nappes phréatiques : dans le cadre d'une augmentation de connectivité hydrologique, les apports de carbone organique facilement assimilables sont rapidement dégradés dans les premiers mètres de zone non saturée contrairement à la perturbation thermique qui est faiblement atténuée et dont l'intensité augmente avec les quantités d'eaux infiltrées. Toutefois, la perturbation thermique engendrée par l'infiltration d'eau de ruissellement pluvial s'atténue considérablement avec la profondeur sous la surface libre de la nappe et concerne principalement les deux premiers mètres au toit des nappes.

### **6.1.3. Réponse des communautés microbiennes à une augmentation des flux de carbone organique**

Les résultats obtenus ont permis de confirmer l'hypothèse selon laquelle le compartiment microbien des aquifères interstitiels est limité par les apports de matière et d'énergie provenant de la surface. L'augmentation des flux de matière et d'énergie aux zones de recharge induit une stimulation de l'ensemble des processus microbiens impliqués dans le cycle du carbone se traduisant par une augmentation des densités, biomasses et activités des bactéries attachées aux sédiments dans le premier mètre sous la surface libre de la nappe.

L'augmentation des activités hydrolytiques extracellulaires reflète une intensification des activités enzymatiques impliquées dans l'étape de conversion de composés de haut poids moléculaire en composés de plus faibles poids pouvant être assimilés par les cellules bactériennes. Les quantités plus élevées de carbone assimilé par le compartiment microbien sont reflétées par une production secondaire (nombre de cellules, contenu en protéines et en carbohydrates des sédiments) et des respirations (activité déshydrogénase) plus élevées aux zones de recharge. Cependant, l'augmentation de ces mesures globales destinées à caractériser les biomasses et activités microbiennes attachées aux sédiments n'est pas seulement liée à un nombre de cellules bactériennes plus élevé mais correspond également à une modification de l'état physiologique des communautés microbiennes présentes au sein du biofilm. Les conditions de forte limitation en carbone organique caractérisant les écosystèmes souterrains impliquent que les communautés microbiennes des eaux souterraines sont généralement caractérisées par un faible nombre de cellules actives et des taux de croissance réduits (Bengtsson 1989, Kazumi & Capone 1994, Goldscheider *et al.* 2006). L'augmentation des activités spécifiques et du ratio protéines/carbohydrates en réponse à des flux de COD plus importants aux zones de recharge reflète ainsi potentiellement des communautés microbiennes présentant un nombre de cellules actives et des taux de croissances plus élevés. Toutefois, la comparaison de l'ensemble des valeurs caractérisant le développement de biofilm au toit des nappes avec celles obtenues en laboratoire, dans un contexte de flux de COD comparables en termes de quantité mais présentant une biodégradabilité plus importante, suggère une limitation des communautés microbiennes par la qualité des apports de COD aux zones de recharge. Pour une gamme de flux de COD comparable, les valeurs obtenues dans les horizons supérieurs des nappes phréatiques sont jusqu'à 7.5 fois inférieures aux valeurs observées en laboratoire avec des apports de COD biodégradable, renforçant ainsi l'idée d'une faible biodégradabilité des apports de COD atteignant le toit des nappes.

Si la question de la qualité des apports de COD apparaît comme un des points importants de ces travaux, c'est que la dégradabilité de la matière organique constitue un paramètre déterminant dans l'efficacité des transferts de matière et d'énergie transitant par le compartiment microbien vers les niveaux trophiques supérieurs, notamment dans les conditions oligotrophes rencontrées dans les écosystèmes souterrains. Pour une quantité donnée de COD présente dans le milieu, l'efficacité de conversion du COD en biomasse microbienne [ratio production/(production+respiration)] définit la part de carbone disponible

pour les niveaux trophiques supérieurs qui est inversement liée à celle directement dissipée sous forme de CO<sub>2</sub> par le compartiment microbien (Findlay *et al.* 1991, Eiler *et al.* 2003). Le coût énergétique lié au maintien des fonctions cellulaires étant plus élevé dans les milieux oligotrophes (del Giorgio & Cole 1998, Russel & Cook 1995), les apports de carbone sont en majorité respirés, entraînant ainsi une faible efficacité de conversion du carbone en biomasse microbienne. Cette efficacité est d'autant plus faible que les apports sont constitués de COD faiblement assimilable nécessitant la synthèse d'enzymes extracellulaires permettant leur dégradation (Eiler *et al.* 2003).

La caractérisation du compartiment microbien attaché aux sédiments des horizons supérieurs des nappes phréatiques par la méthode DGGE suggère une faible différenciation dans la structure des communautés à l'échelle de la zone d'étude. Les résultats obtenus impliquent que la stimulation du compartiment microbien en réponse à l'augmentation des apports de COD n'est pas associée à un fort changement de structure des communautés entre les zones de recharge et de référence. Cette faible différenciation est potentiellement liée à la nature du COD atteignant les nappes mais également aux propriétés des biofilms microbiens. Les changements de composition des apports de matière organique sont généralement considérés comme un facteur de contrôle induisant d'importantes modifications dans la composition des communautés microbiennes au sein de différents écosystèmes aquatiques (Eiler *et al.* 2003, Findlay *et al.* 2003, Kirchman *et al.* 2004, Judd *et al.* 2006.). Les études réalisées au sein d'aquifères contaminés par une pollution organique rapportent également une différenciation importante entre les communautés présentes au sein du panache de pollution associé à des conditions anoxiques et les communautés situées en dehors de la zone contaminée (Franklin *et al.* 2000, Röling *et al.* 2001). Il est probable que dans notre cas, la proportion de COD biodégradable atteignant la nappe reste trop faible pour affecter de manière importante la composition des communautés microbiennes y compris dans les cas de figure où les flux globaux de COD sont considérablement augmentés. La plupart des études réalisées dans des aquifères contaminés concernent les bactéries planctoniques et seules quelques études ont étudié la composition des communautés microbiennes attachées aux sédiments (Haack *et al.* 2004, Brad *et al.* 2008). De la même manière que pour les bactéries planctoniques, ces auteurs ont observé que les communautés attachées aux sédiments reflètent les différents types de polluants et les conditions d'oxydoréduction du milieu mais qu'une partie importante de la variabilité dans la structure de ces communautés est expliquée par d'autres facteurs tels que



l'hétérogénéité des sédiments et des écoulements. De plus, la matrice de substances polymériques extracellulaires au sein de laquelle se développent les bactéries induit une résistance plus élevée aux variations environnementales que pour les bactéries planctoniques en jouant un rôle de « tampon » entre le milieu extérieur et les cellules bactériennes (Costerton *et al.* 1995, Freeman & Lock 1995, Davey & O'Toole 2000). Cette résistance est d'ailleurs évoquée par Röling *et al.* (2001) comme une explication potentielle au lien plus fort existant entre la composition des communautés de bactéries planctoniques et la pollution des eaux en comparaison avec les bactéries attachées aux sédiments. Enfin, le mode vie à l'état de biofilm permet une coopération entre de nombreux groupes bactériens et constitue un réservoir de diversité fonctionnelle (Findlay *et al.* 2003). Certains groupes bactériens incapables de dégrader un composé donné peuvent ainsi se développer en profitant des enzymes extracellulaires produites par d'autres groupes bactériens présents dans le biofilm (Davey & O'Toole 2000).

#### **6.1.4. Interactions entre le compartiment microbien et les invertébrés**

L'hypothèse selon laquelle l'augmentation des flux de COD atteignant les nappes intensifie les interactions trophiques entre le compartiment microbien et les invertébrés n'a pas été vérifiée. Cette hypothèse s'inscrivait dans le cadre du modèle EEH (Oksanen *et al.* 1981) et prédisait, dans le cadre des transferts de matière et d'énergie le long des chaînes trophiques, qu'une augmentation de la production microbienne en réponse à des flux de COD élevés devait favoriser une augmentation de la densité des peuplements d'invertébrés. Cette régulation de la densité des peuplements d'invertébrés par la quantité de ressource disponible n'a pas été observée de manière systématique. Si les densités les plus élevées ont effectivement été observées au premier mètre sous la surface libre de la nappe d'un site de recharge en eaux pluviales (bassin Granges-Blanches), le site de recharge présentant les flux de matière organique les plus élevés à l'échelle de la zone d'étude (bassin Minerve) ne présentait aucun invertébré. De manière générale, les zones de recharge et de référence présentaient de faibles densités avec une moyenne de 12 invertébrés (valeur médiane = 2) contenus dans 5 L de prélèvements, les densités les plus élevées ne dépassant généralement pas 100 individus. Certaines études suggèrent pourtant un contrôle important de la distribution des communautés d'invertébrés par la quantité de ressource disponible (Brunke & Fischer

1999, Brunke & Gonser 1999, Franken *et al.* 2001, Datry *et al.* 2005). L'absence de relation significative entre les assemblages d'invertébrés et les paramètres caractérisant le développement de biofilm microbien suggèrent que les flux de matière et d'énergie atteignant les horizons supérieurs des nappes phréatiques et assimilés au niveau du compartiment microbien sont faiblement transmis jusqu'au niveau trophique supérieur constitué par les invertébrés. Si une augmentation de biomasse microbienne insuffisante est une explication potentielle à ce faible transfert, elle ne permet cependant pas d'expliquer de manière satisfaisante l'absence d'invertébrés au site présentant les abondances microbiennes les plus élevées. Il est en revanche plus probable que l'absence d'augmentation nette des densités d'invertébrés traduise les conséquences d'une forte connectivité hydrologique avec la surface sur le régime des perturbations environnementales aux horizons supérieurs des nappes phréatiques. L'influence des conditions environnementales sur la distribution des invertébrés est d'ailleurs reflétée par la relation significative établie entre les assemblages d'invertébrés et les paramètres physico-chimiques à l'échelle de la zone d'étude. L'ensemble des effets associés à l'augmentation des flux d'eau de surface (diminutions de la concentration en OD, amplitude thermique annuelle élevée) constituent une source de stress pour les peuplements d'invertébrés hypogés dont les traits biologiques reflètent l'adaptation à des conditions environnementales plus stables. Si l'allocation d'énergie à la réponse au stress constitue un facteur limitant potentiellement l'établissement de peuplements d'invertébrés présentant des densités élevées, les conditions les plus extrêmes (concentrations en OD inférieures à 0.5 mg l<sup>-1</sup>, températures supérieures à 20°C) sont clairement incompatibles avec la survie de nombreuses espèces d'invertébrés. Ainsi, la dualité inhérente à la connectivité hydrologique avec la surface, dont les valeurs élevées sont synonymes de flux de ressource mais également de perturbations intenses, restreint nécessairement le nombre d'habitats souterrains pour lesquels un transfert efficace des flux de carbone du compartiment microbien vers les invertébrés peut avoir lieu. Ces habitats potentiels doivent présenter des flux de COD biodégradable élevés associés à une atténuation forte des perturbations environnementales de surface. De telles conditions se rencontrent potentiellement au niveau des nappes sub-affleurantes en contact avec les horizons organiques du sol mais également dans les horizons intermédiaires de la zone hyporhéique des cours d'eau.

L'ensemble des résultats obtenus dans le cadre de prélèvements de terrains ou d'expériences en laboratoire n'a permis d'attribuer qu'un rôle ténu aux communautés d'invertébrés

souterrains dans le fonctionnement des horizons supérieurs des aquifères interstitiels. Sur le terrain, la structure des communautés d'invertébrés ne présente pas de relation significative avec la biomasse et les activités microbiennes impliquant ainsi une absence de contrôle du compartiment microbien par les activités de broutage des invertébrés. Au vu des faibles densités d'invertébrés enregistrées sur le terrain, l'absence de contrôle sur le compartiment microbien n'est pas surprenante si l'on considère qu'une augmentation significative des densités d'invertébrés constitue un pré-requis à l'observation d'un tel contrôle (modèle conceptuel, Figure 1.7). Toutefois, dans des conditions contrôlées en laboratoire correspondant à une ressource microbienne élevée et une absence de perturbation, l'amphipode *Niphargus rhenorhodanensis* présente également de faibles capacités de contrôle du compartiment microbien. Les activités de broutage et de bioturbation de cette espèce n'ont pas entraîné de stimulation nette des activités du compartiment microbien et des processus biogéochimiques. Ces effets sont particulièrement faibles en comparaison aux fortes stimulations du compartiment microbien (augmentation des respirations, activités hydrolytiques extracellulaires, nombres de bactéries actives) observées dans d'autres études et induites par les activités de nutrition et de bioturbation d'espèces d'invertébrés interstitiels tels que *Tubifex tubifex*, les larves de *Chironomus sp.* ou *Asellus aquaticus* (Mermillod-Blondin *et al.* 2003, Mermillod-Blondin *et al.* 2005b, Nogaro *et al.* 2008). Dans le cadre de mes expériences, les seuls effets significatifs observés en présence de *N. rhenorhodanensis* correspondent à une consommation d'oxygène et des activités déshydrogénasiques plus élevées dans les colonnes sédimentaires et une meilleure efficacité de conversion du carbone en biomasse microbienne dans les expériences en bouteillons. De manière générale, malgré des effets significatifs, la faiblesse des stimulations observées en présence de *N. rhenorhodanensis* suggère une faible influence de cette espèce sur le fonctionnement biogéochimique des aquifères interstitiels. Cette faible influence en comparaison aux espèces épigées évoquées précédemment provient probablement du métabolisme réduit de cette espèce et qui caractérise également la plupart des espèces hypogées (Hervant & Renault 2002, Issartel *et al.* 2005). Cette adaptation à des conditions de limitation des ressources trophiques peut expliquer que le taux d'ingestion de carbone microbien le plus élevé obtenu pour *N. rhenorhodanensis* (0.35 µg C par individu et par jour) soit dans la gamme de valeur observée pour des copépodes épigés présentant une masse pourtant 100 fois plus faible (Perlmutter & Meyer 1991). Les faibles capacités de bioturbation de cette espèce impliquent également que seule une partie des ressources présentes dans le milieu interstitiel est réellement

consommable, les capacités de déplacement étant limitées aux interstices interconnectés et accessibles aux invertébrés. Contrairement aux suggestions de Boulton *et al.* (2008), la faible influence de *N. rhenorhodanensis* sur les processus biogéochimiques en microcosmes dans des conditions « idéales » (ressources trophiques importantes et absence de perturbation environnementale) incite à considérer avec prudence l'idée d'un rôle fonctionnel significatif des communautés d'invertébrés au sein des aquifères interstitiels.

## 6.2. IMPLICATIONS POUR LA GESTION DE L'INFILTRATION DES EAUX DE RUISSELLEMENT PLUVIAL

L'essor des pratiques d'infiltration d'eau de ruissellement pluvial à travers le monde entraîne de la part des gestionnaires une demande croissante de règles permettant d'ajuster ces pratiques du point de vue du dimensionnement et de la gestion des ouvrages. Actuellement, ce dimensionnement est réalisé sur des critères hydrauliques prenant en compte la perméabilité des sols, qui influence les temps de vidange, et les caractéristiques du bassin versant dont la surface et le coefficient de ruissellement définissent les volumes d'eau à stocker lors des événements pluvieux (Barraud *et al.* 2009). Le dimensionnement doit ainsi permettre d'éviter le débordement de l'ouvrage et les risques d'inondations associés aux événements pluvieux exceptionnels. Il existe cependant peu de règles de dimensionnement et de gestion des ouvrages d'infiltration quant au risque potentiel de dysfonctionnement biogéochimique des aquifères sous-jacents. Afin d'assurer des temps de rétention et de dégradation suffisants des polluants au niveau du sol et de la zone non saturée, les recommandations existantes déconseillent la conception d'ouvrages d'infiltration pour des sols présentant des perméabilités supérieures à  $10^{-2}$  m/s ainsi que pour des conditions de nappes peu profondes situées à moins d'un mètre de la surface. La majorité des métaux et des hydrocarbures contenus dans les eaux de ruissellement pluvial étant retenus dans les 10 premiers centimètres du sol, les nappes situées au-delà d'un mètre sous la surface du sol semblent effectivement protégées vis-à-vis de ces polluants (Barraud *et al.* 1999).

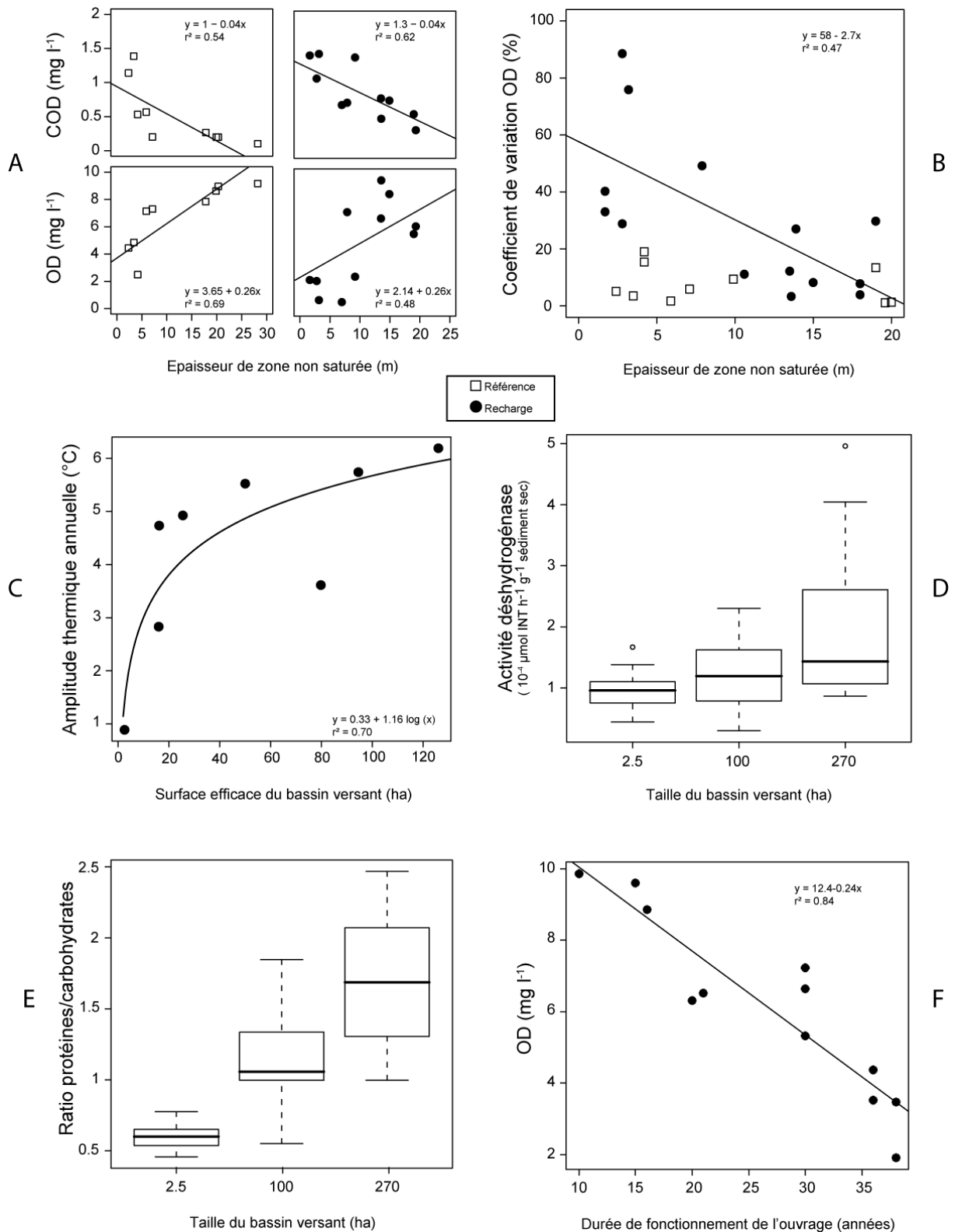


Figure 6.1: Relations pour l'établissement de règles de gestion.

Dans le cadre de mes travaux, il est apparu que la zone non saturée joue également un rôle fondamental dans la régulation des flux de COD atteignant le toit des nappes (Figure 6.1A).

La matière organique contenue dans les eaux destinées à la production d'eau potable constitue un élément indésirable puisque lors du traitement des eaux, l'oxydation de la matière organique par le chlore forme des sous-produits (Trihalométhanes : chloroforme, bromoforme, bromodichlorométhane, chlorodibromométhane) présentant une toxicité élevée (Waller *et al.* 1998). L'accumulation de matière organique dans les réseaux de distribution d'eau potable peut également favoriser le développement de biofilms microbiens potentiellement pathogènes. A partir des résultats obtenus au cours de cette thèse et des données de la littérature, une épaisseur de zone non saturée comprise entre 2 et 3 mètres semble suffisante pour entraîner une dégradation de la majorité du COD facilement biodégradable. Par ailleurs, une épaisseur de zone non saturée élevée permet de maintenir une oxygénation convenable des eaux souterraines (Figure 6.1A) mais également de tamponner les variations de concentrations en OD au toit des nappes (Figure 6.1B).

Jusqu'à présent, peu de données permettaient d'évaluer l'influence de la taille du bassin versant sur l'intensité des perturbations engendrées par les pratiques de recharge artificielle. La relation établie entre la taille du bassin versant et l'amplitude thermique annuelle permet d'observer que pour une épaisseur de zone non saturée donnée, le passage d'une surface efficace du bassin versant (surface \* coefficient de ruissellement) de 5 à 20 ha entraîne le passage d'une amplitude thermique annuelle de 2.2 à 3.8 °C (Figure 6.1C) . De plus, même si une faible proportion de COD biodégradable atteint le toit des nappes, la multiplication de ces faibles quantités par les flux d'eau infiltrés permet une stimulation du compartiment microbien dans le premier mètre sous la surface libre des nappes qui augmente avec la taille du bassin versant (Figure 6.1D & 6.1E). Dès lors qu'une épaisseur de zone non saturée de 3 à 5 mètres est conservée lors de la conception d'un ouvrage, permettant ainsi une rétention efficace du carbone organique biodégradable quelles que soient les quantités infiltrées, il n'apparaît pas aujourd'hui pertinent de recommander une taille de bassin versant particulière. Par ailleurs, une réelle atténuation des amplitudes thermiques engendrées par l'infiltration nécessiterait en fait d'opter pour des systèmes d'infiltration à la source puisque l'augmentation de l'amplitude thermique des eaux souterraines intervient très rapidement pour des ouvrages présentant des bassins versants à faible surface.

Il n'a pas été possible d'établir une relation entre les quantités d'eaux infiltrées et la concentration en oxygène dissous des eaux souterraines. Cette relation eût été attendue si les quantités d'eaux infiltrées engendraient des apports importants en COD biodégradable

stimulant les respirations microbiennes au toit des nappes. En revanche, l'analyse de chroniques d'OD pour 12 sites permet d'établir une relation entre la durée de fonctionnement des ouvrages d'infiltration et les concentrations moyennes en oxygène des nappes sous-jacentes (Figure 6.1F). Cette relation, si l'on admet que la durée de fonctionnement de l'ouvrage reflète la quantité de matière organique accumulée dans le sol et la zone non saturée, est en accord avec la vision proposée d'une consommation d'oxygène ayant lieu préférentiellement dans les horizons supérieurs du sol et de la zone non saturée. Ce résultat confirme l'intérêt des pratiques favorisant la décantation des matières en suspension en amont des ouvrages d'infiltration ainsi que l'entretien régulier des ouvrages dans le cadre du curage des couches superficielles. Il est toutefois fort probable que cette augmentation progressive des respirations puisse intervenir malgré les efforts consentis pour maintenir les capacités hydrauliques des ouvrages. Cette évolution devrait dès lors nous amener à considérer l'idée selon laquelle la durée de vie « écologique » des ouvrages d'infiltration (i.e. capacité à ne pas modifier localement au cours du temps la qualité des eaux souterraines) pourrait être inférieure à leur durée de vie « hydraulique » (i.e. capacité à infiltrer efficacement les flux d'eau de surface). Enfin, les perturbations thermiques et leurs conséquences écologiques et biogéochimiques étant fortement liés à la température des eaux de surface et à la distribution saisonnière des précipitations, le contrôle des ouvrages doit nécessairement être maintenu au cours du temps car leurs impacts sont amenés à évoluer dans un contexte de changements climatiques globaux, localement amplifiés au niveau des zones urbaines.



## 6.3. PERSPECTIVES

### 6.3.1. Biodégradabilité du carbone organique dissous

La réponse des biocénoses interstitielles des horizons supérieurs des nappes, plus particulièrement celle du compartiment microbien, à une augmentation des flux de COD implique une intense dégradation de la fraction biodégradable du COD dans le sol et la zone non saturée. Si de nombreux résultats obtenus au cours de ce travail supportent cette implication, une première perspective de recherche consistera à quantifier l'importance de cette dégradation. La biodégradation du COD qui correspond à l'utilisation des composés organiques par les micro-organismes peut être mesurée par la disparition du COD ou de l'oxygène ou par l'évolution de la concentration en CO<sub>2</sub> (Marschner & Kalbitz 2003). L'objectif est donc de quantifier la biodégradation du COD au cours de son transfert des eaux de surface vers les nappes phréatiques. Pour ce faire, des expérimentations en laboratoire seront menées afin de mesurer la décroissance au cours du temps de la concentration en oxygène dissous dans des respiromètres (colonnes) à recirculation d'eau, préalablement remplis avec des sédiments de nappe. Trois types d'eau seront appliqués, des eaux de ruissellement pluvial, des eaux interstitielles du lit des bassins d'infiltration, des eaux d'infiltration atteignant les horizons supérieurs de la nappe et deux contrôles constitués d'eau ultrapure et d'eau enrichie avec une solution de carbone facilement biodégradable (glucose ou acétate). Les décroissances d'oxygène mesurées pour chaque traitement permettront d'estimer l'évolution du taux de biodégradation du COD au cours de son transfert vers les nappes selon une approche décrite par Kalbitz *et al.* (2003). Par ailleurs, la concentration en COD de chaque type d'eau et sa composition (analyse fluorimétrique afin de caractériser les familles de composés constitutifs de la matière organique dissoute) seront mesurées avant et après

incubation dans les respiromètres afin d'établir un lien entre la biodégradation du COD et ces caractéristiques compositionnelles (i.e. aromaticité, contenu en carbohydrates).

### **6.3.2. Lien entre fonctionnement biogéochimique et transfert des polluants**

Les connaissances acquises durant ce travail sur les dynamiques de l'oxygène et du carbone organique dissous à l'aplomb des sites de recharge en eau de ruissellement pluvial ouvrent une seconde perspective de recherche qui consistera à tester l'importance de certains mécanismes censés favoriser le transfert des polluants vers les nappes, plus particulièrement celui du phosphore et des métaux lourds. De nombreuses études ont cherché à évaluer les risques de contamination des eaux souterraines par les nutriments (N et P), les métaux lourds, et les composés organiques (e.g. hydrocarbures) lors de l'infiltration des eaux de ruissellement pluvial (Schorer & Eisele 1997, Barraud *et al.* 1999). La majorité de ces études ont ainsi démontré que le carbone organique, le phosphore, les métaux lourds et les composés organiques étaient efficacement piégés dans les premiers centimètres des sols, diminuant ainsi fortement leur probabilité d'atteindre la nappe (Barraud *et al.* 1999, Winiarski *et al.*, 2006). Toutefois, l'accumulation de matière organique dans les sols entraîne une désoxygénation des eaux d'infiltration qui peut favoriser la migration des orthophosphates vers la nappe (Hendricks & White 2000, Datry *et al.* 2003b). Le lessivage du COD issu de la minéralisation de la matière organique peut également favoriser le transfert des métaux lourds (phénomène de complexation et de transport colloïdal), normalement peu mobiles, vers les nappes (Christensen *et al.* 1996).

Mon objectif consistera donc à établir un lien entre les mécanismes favorisant la migration du phosphore (désorption en conditions anoxiques) et des métaux lourds (capacité du COD à former des complexes avec les métaux), la dynamique de l'oxygène dissous et du COD, et la distribution spatiale des concentrations en phosphore et métaux lourds sur les sédiments des nappes pour différentes épaisseurs de zone non saturée. Il s'agira plus précisément de tester si la désoxygénation des eaux d'infiltration et la migration du COD à l'aplomb des sites de recharge présentant une faible épaisseur de zone non saturée (i.e. 2 m) favorisent l'adsorption de quantités significativement plus élevées de phosphore et de métaux lourds sur les sédiments des horizons supérieurs des nappes soumis à l'infiltration.

Afin de tester cette hypothèse, les profils verticaux des concentrations en phosphore et métaux lourds (Zn, Cu, Pb et Ni) ont été mesurés en 2007 dans l'eau et les sédiments à une échelle décimétrique sur 3 sites de recharge et 3 sites de référence de l'agglomération lyonnaise (sites 3, 4 et 5 de la Figure 2.2). Par ailleurs, les concentrations de phosphore et de métaux lourds (Zn, Cu, Pb et Ni) ont également été mesurées dans les eaux souterraines à 4 reprises sur 23 sites de recharge et de référence de l'agglomération lyonnaise dont l'épaisseur de la zone non saturée variait de 2 à 25 m (Figure 2.2). L'analyse de ces données sera menée afin de tester si: 1) les sédiments à l'aplomb des sites de recharge ont accumulé des quantités significativement plus élevées de phosphore, Cu, Pb et Ni que les sédiments collectés sur les sites de référence; 2) les concentrations de phosphates dans les eaux souterraines sont non seulement plus élevées à l'aplomb des sites de recharge mais diminuent également avec l'épaisseur de la zone non saturée; 3) la quantité de métaux lourds adsorbée sur les sédiments s'accroît significativement avec la concentration en COD des eaux souterraines au toit des nappes.

### **6.3.3. Structuration des réseaux trophiques en fonction de la quantité et de la diversité des sources de carbone organique**

Les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse ainsi que les résultats qui en découlent ne constituent qu'une étape vers une meilleure compréhension de la structure trophique des communautés souterraines. Le cadre conceptuel présenté s'appuyait sur le modèle EEH (Oksanen *et al.* 1981) et stipulait qu'une augmentation des apports de COD devait intensifier les interactions trophiques entre le compartiment microbien et les invertébrés dans les horizons supérieurs des nappes phréatiques. Malgré l'utilité du modèle EEH en tant que fondement conceptuel associant l'influence de la ressource et de la prédation sur la structure trophique des communautés, de nombreux auteurs ont critiqué une vision simplifiée ne prenant pas en compte la diversité des prédateurs ou l'hétérogénéité des ressources partagées par les organismes au sein d'un même niveau trophique (Hunter & Price 1992, Polis & Strong 1996). Dans le cadre de mes travaux, le milieu étudié présentait la particularité d'apports de matière organique uniquement sous forme dissoute impliquant ainsi que la seule ressource disponible pour le niveau trophique constitué par les invertébrés correspondait au COD assimilé par le compartiment microbien ou adsorbé sur la matrice de substances polymériques extracellulaires. Cependant, l'hypothèse selon laquelle le compartiment microbien constitue la

seule ressource disponible pour les invertébrés n'est probablement plus vérifiée dans des habitats où les apports de matière organique sous forme particulière constituent une part plus élevée des ressources disponibles. De plus, le regroupement de l'ensemble des invertébrés au sein d'un même niveau trophique ne prend pas en compte les possibilités de prédation entre les différentes espèces. Cependant, les connaissances actuelles sur la position trophique des différentes espèces d'invertébrés et l'utilisation des ressources disponibles dans le milieu souterrain sont fortement limitées (Culver 1994, Simon *et al.* 2003). Cette limitation freine considérablement tout essai de quantification des relations entre productivité et interactions trophiques dans des milieux nettement plus diversifiés que les aquifères interstitiels profonds. Aussi, le principal objectif des perspectives détaillées ci-dessous est de déterminer l'influence de la quantité et de la diversité des sources de carbone organique sur la structure trophique des communautés souterraines. Les recherches envisagées associent une approche expérimentale de terrain et des expériences de laboratoire en conditions contrôlées.

### **Spécialisation trophique le long d'un gradient de connectivité hydrologique avec la surface**

Dans les milieux tels que la zone hyporhéique ou les réseaux karstiques au sein desquels les apports de matière organique sous forme particulière sont nettement plus élevés qu'au sein des aquifères interstitiels profonds, la quantité et la diversité des sources de matière organique diminue le long d'un gradient de connectivité hydrologique avec la surface (Brunke & Gonsler 1997). L'abondance et la diversité des sources de carbone organique devraient permettre l'établissement de peuplements d'invertébrés présentant des régimes trophiques diversifiés, cette diversité se réduisant le long du gradient de connectivité hydrologique. L'objectif des recherches sera de tester l'hypothèse selon laquelle l'augmentation et la diversification des ressources disponibles favorise la structuration du réseau trophique à travers une spécialisation trophique des espèces (préférence alimentaire) et l'établissement de niveaux trophiques bien identifiés. Au contraire, une faible connectivité hydrologique induisant une diminution de la quantité et de la diversité des sources de carbone organique devrait favoriser l'omnivorie.

L'approche de terrain envisagée consisterait à prélever la faune interstitielle, l'eau et les sédiments le long d'un transect établi entre le chenal principal (zone hyporhéique présentant

une forte connectivité hydrologique avec la surface et une grande diversité de sources de carbone organique) et la zone riparienne d'une plaine alluviale où la matière organique est essentiellement présente sous forme dissoute et la ressource disponible limitée au compartiment microbien attaché aux sédiments. Les prélèvements permettront d'identifier et de quantifier les différents types de ressource disponible (biofilm microbien attaché aux sédiments, matière organique particulaire supérieure et inférieure à 1 mm). La détermination de la structure trophique des communautés le long du gradient de connectivité hydrologique sera réalisée par une analyse des isotopes stables du carbone et de l'azote permettant d'identifier la ressource trophique utilisée et la position dans la chaîne trophique (consommateur ou prédateur) des invertébrés. Les mesures d'enrichissement en  $\delta^{15}\text{N}$  et  $\delta^{13}\text{C}$  ont rarement été utilisées dans les écosystèmes souterrains mais deux études réalisées en milieux hyporhéique et karstique (Stanford *et al.* 1994, Simon *et al.* 2003) ont fourni des résultats prometteurs. Ces deux études ont ainsi montré que les amphipodes appartenant au genre *Stygobromus* étaient essentiellement prédateurs d'autres d'invertébrés. Il est également envisagé de séparer les individus d'une même espèce en différentes classes de taille afin d'envisager la possibilité d'une variation du régime trophique en fonction des étapes du cycle de vie ou une structuration des chaînes trophiques par la taille des individus. Les résultats obtenus permettront en première approche d'évaluer la stabilité des liens trophiques et leur évolution en fonction de la disponibilité et de la diversité des ressources en carbone organique.

### **Concordance entre niches trophiques réalisées et potentielles**

Les invertébrés aquatiques sont généralement regroupés en différents groupes fonctionnels trophiques selon leurs adaptations morpho-anatomiques supposées leur imposer un mode de nutrition dominant (Cummins & Klug 1979). Certaines études suggèrent pourtant que cette classification ne reflète pas la diversité des ressources utilisables par une même espèce (MacNeil *et al.* 1997). Hall *et al.* (2000) montrent également que les débris de bois normalement peu assimilables par les invertébrés sont utilisés de manière plus intense lorsque la litière qui constitue la ressource privilégiée n'est plus disponible au sein du cours d'eau. Par ailleurs, l'accessibilité aux différentes sources de matière organique pour les consommateurs peut dépendre des conditions d'oxygénation de même que la variation de mobilité des proies peut amener un prédateur à privilégier l'omnivorie. Dès lors, le régime alimentaire réalisé ne

correspond pas nécessairement aux sources de nourriture les plus assimilables. L'objectif de cette seconde perspective consistera donc à évaluer si la niche trophique « réalisée » évaluée à partir d'une approche isotopique de terrain correspond effectivement à la niche trophique « potentielle » des espèces.

Des expérimentations de laboratoire couplées à des analyses isotopiques seront effectuées afin de déterminer les taux d'ingestion et d'assimilation dans les tissus des invertébrés des principales sources de matière organique consommées dans les milieux étudiés. Les quantités proposées seront amenées à varier afin de déterminer si la préférence trophique pour une ressource varie en fonction de sa disponibilité dans le milieu. Ces expériences pourront être complétées par des analyses stoichiométriques (rapport C/N/P) des différentes sources disponibles afin de déterminer si un lien existe entre la qualité de la ressource et son utilisation par les invertébrés.

### **Effets de l'omnivorie chez les prédateurs sur la dynamique des proies**

Le comportement des prédateurs vis à vis de la ressource basale a des implications écologiques différentes suivant qu'il s'agit de prédateurs "stricts" ou d'omnivores consommant simultanément des proies et leur ressource basale. Dans les conditions où la ressource basale est faiblement exploitée par le prédateur et qu'une intense pression de prédation est maintenue sur la proie, le contrôle de la structure des communautés devrait suivre les hypothèses du modèle EEH, la densité de prédateurs augmentant avec la productivité des proies (Holt & Polis 1997). Lorsque la ressource basale est efficacement exploitée par le prédateur, l'énergie supplémentaire fournie par cette ressource lui permet d'exercer une pression de prédation plus importante sur les proies qui peut ainsi entraîner leur extinction.

L'objectif de cette dernière perspective est de déterminer le degré d'omnivorie des prédateurs souterrains et d'en évaluer ses effets sur les proies en fonction de la quantité de ressources basales. Les expériences feront intervenir une ressource basale, un consommateur et un prédateur. Pour une quantité fixée de ressource basale, la densité de consommateurs sera augmentée tout en maintenant une même densité de prédateurs. Les valeurs d'enrichissement en  $\delta^{15}\text{N}$  des prédateurs seront utilisées afin d'évaluer si la prédation augmente avec la densité de proies disponibles. Elles devront permettre d'évaluer les phénomènes de compétition pour

la ressource basale, c'est à dire de déterminer si dans des milieux présentant une quantité de ressource basale importante, les prédateurs utilisent cette ressource disponible en plus de leurs proies ou se comportent comme des prédateurs stricts.

Les informations relatives à la niche trophique réalisée des espèces, à leurs préférences trophiques, et au comportement des prédateurs permettront d'envisager l'étude *in situ* des relations entre productivité et interactions trophiques dans des milieux souterrains diversifiés. Elles pourraient aussi fournir de précieuses indications sur le degré d'implication des différentes espèces dans les processus biogéochimiques. Ainsi, les espèces consommant préférentiellement des débris organiques influenceraient directement les processus de dégradation de la matière organique alors que les espèces consommant préférentiellement le biofilm exerceraient un contrôle indirect sur les processus de dégradation en influençant les activités microbiennes.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

### A

- Alfreider A., Krössbacher M., Psenner R. (1997) Groundwater samples do not reflect bacterial densities in subsurface systems. *Water Research* 31(4), 832-840.
- Allen A., Milenic D., Sikora P. (2003) Shallow gravel aquifers and the urban 'heat island effect': a source of low enthalpy geothermal energy. *Geothermics* 32, 569-578.
- Amann R, Glöckner F.O., Neef A. (1997) Modern methods in subsurface microbiology—*in situ* identification of microorganisms with nucleic acid probes. *FEMS Microbiology Reviews* 20, 191–200.
- Appleyard S.J. (1993) Impact of stormwater infiltration basins on groundwater quality, Perth metropolitan region, Western Australia. *Environmental Geology* 21, 227-236.
- Arnold C.P., Gibbons C.J. (1996) Impervious surface coverage: the emergence of a key environmental indicator. *Journal of the American Planning Association* 62, 243-258.

### B

- Baker M.A., Valett H.M., Dahm C.N. (2000) Organic carbon supply and metabolism in a shallow groundwater ecosystem. *Ecology* 81, 3133-3148.
- Balke K.D., Zhu Y. (2008) Natural water purification and water management by artificial groundwater recharge. *Journal of Zhejiang University - Science B* 9(3), 221-226.



- Barraud S., Gautier A., Bardin J.P., Riou V. (1999) The impact of intentional stormwater infiltration on soil and groundwater. *Water Science & Technology* 39(2), 185-192.
- Barraud S., Gibert J., Winiarski T., Bertrand-Krajewski J.L. (2002) Implementation of a monitoring system to measure impact of stormwater runoff infiltration. *Water Science and Technology* 45, 203-210.
- Barraud S. et collaborateurs (2009) Guide technique pour la faisabilité, la conception et la gestion des ouvrages d'infiltration des eaux pluviales en milieu urbain. *Ouvrage collectif du programme ANR Ecopluies*. Disponible à <http://www.graie.org/ecopluies>.
- Battin T.J., Sengschmitt D. (1999) Linking sediment biofilms hydrodynamics, and river bed clogging: evidence from a large river. *Microbial Ecology* 37, 185-196.
- Baudoin A., Gaudet J.P., Foulquier A., Malard F. (2009) Modélisation des transports d'eau, de chaleur et de soluté sous un bassin d'infiltration. *Symposium Méditerranéen de Geoengineering*, 20-21 juin, Alger.
- Bengtsson G. (1989) Growth and metabolic flexibility in groundwater bacteria. *Microbial Ecology* 18(3), 235-248.
- Bertrand J.Y. (1974) Recherche sur l'écologie de *Faucheria faucheri* (crustacé Cirolanide). Thèse de 3<sup>e</sup> Cycle, Université Paris VI.
- Bertrand-Krajewski J.L., Barraud S., Gibert J., Malard F., Winiarski T., Delolme C. (2008) The OTHU case study: integrated monitoring of stormwater in Lyon, France. In: *Data Requirements for Integrated Urban Water Management*. Fletcher T.D., Deletic A. (eds). UNESCO, Paris, pp. 303-314.
- Biddanda B., Ogdahl M., Cotner J. (2001) Dominance of bacterial metabolism in oligotrophic relative to eutrophic waters. *Limnology and Oceanography* 46, 730-739.
- Bornstein R.D. (1968) Observations of the urban heat island effect in New York City. *Journal of Applied Meteorology* 7, 575-582.

- Boulton A.J., Fenwick G.D., Hancock P.J., Harvey M.S. (2008) Biodiversity, functional roles and ecosystem services of groundwater invertebrates. *Invertebrate Systematics* 22, 103-116.
- Bou C., Rouch R. (1967) Un nouveau champ de recherches sur la faune aquatique souterraine. *Comptes-Rendus de l'Académie des Sciences Paris* 265, pp. 369-370.
- Brad T., van Breukelen B.M., Braster M., van Straalen N.M., Röling W.F.M. (2008) Spatial heterogeneity in sediment-associated bacterial and eukaryotic communities in a landfill leachate-contaminated aquifer. *FEMS Microbiology Ecology* 65, 534-543.
- Brunke M., Gonser T. (1997) The ecological significance of exchange process between rivers and groundwater. *Freshwater Biology* 37, 1-33.
- Brunke M., Gonser T. (1999) Hyporheic invertebrates - the clinical nature of interstitial communities structured by hydrological exchange and environmental gradients. *Journal of the North American Benthological Society* 18, 344-362.
- Brunke M., Fischer H. (1999) Hyporheic bacteria – relationships to environmental gradients and invertebrates in a prealpine stream. *Archiv Fur Hydrobiologie* 146, 189–217.
- Burgéap (1995) Etude de la nappe de l'Est Lyonnais. *Hydrogeological Report, BURGEAP*, Lyon, France. available from : <http://bwww.burgeap.fr>

## C

- Carpenter S.R., Kitchell J.F., Hodgson J.R. (1985) Cascading trophic interactions and lake productivity. *BioScience* 35, 634-639.
- Chapelle F.H. (1993) Ground-water microbiology and geochemistry. John Wiley and Sons, New York, 424 pp.
- Characklis W.G. (1990) Biofilms processes. In: *Biofilms*. Characklis W.G., Marshall K.C. (eds) New York: John Wiley and Sons, pp. 195-231.
- Chase J.M. (2003) Strong and weak trophic cascades along a productivity gradient. *Oikos* 101, 187-195.

- Chastanet J., Kaskassian S., Côme J.M., Malard F., Foulquier A. (2008) Transport de chaleur et temperature des nappes phréatiques à l'aplomb des bassins d'infiltration d'eau de ruissellement pluvial. *Projet ANR-05-ECOT-006*.
- Chebbo G., Mouchel J.M., Saget A., Gousailles M. (1995) La pollution des rejets urbains par temps de pluie : flux, nature et impacts. *Technique Science et Méthodes* 11, 796-804.
- Chelius M.K., Beresford G., Horton H., Quirk M., Selby G., Simpson R.T., Horrocks R., Moore J.C. (2009) Impacts of alterations of organic inputs on the bacterial community within the sediments of Wind Cave, South Dakota, USA. *International Journal of Speleology* 38(1), 1-10.
- Christensen J.B., Jensen D.L., Christensen T.H. (1996) Effect of dissolved organic carbon on the mobility of cadmium, nickel and zinc in leachate polluted groundwater. *Water Research* 30, 3037-3049.
- Claret C., Marmonier P., Bravard J.P. (1998) Seasonal dynamics of nutrient and biofilm in interstitial habitats of two contrasting riffles in a regulated large river. *Aquatic Sciences* 60, 33-55.
- Commission Locale de l'Eau (2005) Le schéma d'aménagement et de gestion des eaux (SAGE) de l'Est Lyonnais. <http://www.sage-est-lyonnais.fr>.
- Costerton J.W., Lewandowski Z., Caldwell D.E., Korber D.R., Lappin-Scott H.M. (1995) Microbial biofilms. *Annual Reviews in Microbiology* 49, 711-745.
- Craft J., Stanford J., Pusch M. (2002) Microbial respiration within a floodplain aquifer of a large gravel-bed river. *Freshwater Biology* 47, 251-261.
- Culver D.C. (1994) Species interactions. In: *Groundwater Ecology*. Gibert J., Danielopol D.L., Stanford J.A. (eds) San Diego, CA: Academic Press, pp. 271-286.
- Cummins K.W., Klug M.J. (1979) Feeding ecology of stream invertebrates. *Annual Review of Ecology and Systematics* 10, 147-172.

## D

- Datry T. (2003a) Urbanisation et qualité des nappes phréatiques: réponse des écosystèmes aquatiques souterrains aux pratiques d'infiltration d'eau pluviale. PhD thesis. Université Lyon 1, Lyon, France.
- Datry T., Malard F., Vitry L., Hervant F., Gibert J. (2003b) Solute dynamics in the bed of a stormwater infiltration basin. *Journal of Hydrology* 273, 217-233.
- Datry T., Malard F., Gibert J. (2004) Dynamics of solutes and dissolved oxygen in shallow urban groundwater below a stormwater infiltration basin. *Science of the Total Environment* 329, 215-229.
- Datry T., Malard F., Gibert J. (2005) Response of invertebrate assemblages to increased groundwater recharge rates in a phreatic aquifer. *Journal of the North American Benthological Society* 24, 461-477.
- Davey M.E., O'Toole G.A. (2000) Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64, 847-867.
- del Giorgio P.A., Cole J.J. (1998) Bacterial growth efficiency in natural aquatic systems. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 29, 503-541.
- Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28, 350-356.
- Duffy J.E. (2002) Biodiversity and ecosystem function: the consumer connection. *Oikos* 99(2), 201-219.

## E

- Eiler A., Langenheder S., Bertilsson S., Tranvik L.J. (2003) Heterotrophic bacterial growth efficiency and community structure at different natural organic carbon concentrations. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 3701-3709.
- Elton C. (1927) *Animal ecology*. London, UK: Sidgwick and Jackson.

## F

- Ferguson G., Woodbury A.D. (2004) Subsurface heat flow in an urban environment. *Journal of Geophysical Research* 109(B02402), 1-9. DOI: 10.1029/2003JB002715.
- Ferreira D. (2005) Biodiversité aquatique souterraine de France : bases de données, patrons de distribution et implications en termes de conservation. PhD thesis. Université Lyon 1, Lyon, France. 442 pp.
- Findlay S., Pace M.L., Lints D., Cole J.J., Caraco N.F., Peierls B. (1991) Weak coupling of bacterial and algal production in a heterotrophic ecosystem, the Hudson River Estuary. *Limnology and Oceanography* 36, 268–278.
- Findlay S., Strayer D.L., Goumbala C., Gould K. (1993) Metabolism of streamwater dissolved organic carbon in the shallow hyporheic zone. *Limnology and Oceanography* 38, 1493–1499.
- Findlay S.E.G., Sinsabaugh R.L., Sobczak W.V., Hoostal M. (2003) Metabolic and structural response of hyporheic microbial communities to variations in supply of dissolved organic matter. *Limnology and Oceanography* 48, 1608-1617.
- Fischer D., Charles E.G., Baehr A.L. (2003) Effects of stormwater infiltration on quality of groundwater beneath retention and detention basins. *Journal of Environmental Engineering* 129(5), 464-471.
- Flemming H.C., Wingender J. (2001) Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs). Part I Structural and ecological aspects. *Water Science and Technology* 43, 1-8.
- Foulquier A., Malard F., Gibert J. (2007) Régime thermique des nappes phréatiques à l'aplomb de bassins d'infiltration. In: *Les Nappes d'Eau Souterraines en Contexte Urbain*, Chastagner P. Gouisset Y. (eds). Comité Français d'Hydrogéologie : Lyon, France, pp. 179-183.

- Foulquier A., Malard F., Barraud S., Gibert J. (2009) Thermal influence of urban groundwater recharge from stormwater infiltration basins. *Hydrological Processes* 23(12), 1701-1713.
- Franken R., Storey R., Williams D. (2001) Biological, chemical and physical characteristics of downwelling and upwelling zones in the hyporheic zone of a north-temperate stream. *Hydrobiologia* 444, 183-195.
- Franklin R.B., Taylor D.R., Mills A.L. (2000) The distribution of microbial communities in anaerobic and aerobic zones of a shallow coastal plain aquifer. *Microbial Ecology* 38(4), 377-386.
- Freeman C., Lock M.A. (1995) The biofilm polysaccharide matrix: A buffer against changing organic substrate supply? *Limnology and Oceanography* 40(2), 273-278.
- Fretwell S.D. (1977) The regulation of plant communities by the food chains exploiting them. *Perspectives in Biology and Medicine* 20, 169-185.
- Furutani A., Rudd J.W., Kelly C.A. (1984) A method for measuring the response of sediment microbial communities to environmental perturbations. *Canadian Journal of Microbiology* 30, 1408-1414.

## G

- Gasol J.M., Comerma M., Garcia J.C., Armengol J., Casamayor E.O., Kojacka P., Simek K. (2002) A transplant experiment to identify the factors controlling bacterial abundance, activity, production, and community composition in a eutrophic canyon-shaped reservoir. *Limnology and Oceanography* 47, 62-77.
- Gasol J.M., Pedros-Alio C., Vaque D. (2002) Regulation of bacterial assemblages in oligotrophic plankton systems: results from experimental and empirical approaches. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81, 435-452.
- Gerino M. (1990) The effects of bioturbation on particle redistribution in Mediterranean coastal sediment – preliminary results. *Hydrobiologia* 207, 251-258.

- Ghiorse W.C., Wilson J.T. (1988) Microbial ecology of the terrestrial subsurface. *Advances in Applied Microbiology* 33, 107-172.
- Gibert J., Stanford J.A., Dole-Olivier M.J., Ward J.V. (1994) Basic attributes of groundwater ecosystems and prospects for research. In: *Groundwater Ecology*. Gibert J., Danielopol D.L., Stanford J.A. (eds) San Diego, CA: Academic Press, pp. 7-40.
- Gibert J., Deharveng L. (2002) Subterranean ecosystems: A truncated functional biodiversity. *BioScience* 52, 473-481.
- Giry O. (1997) Mise en place du suivi qualitatif et quantitatif de la nappe de l'Est Lyonnais. Rapport de stage, Ecole supérieure de l'Energie et des Matériaux.
- Goldscheider N., Hunkeler D., Rossi P. (2006) Review: Microbial biocenosis in pristine aquifers and an assessment of investigation methods. *Hydrogeology Journal* 14, 926-941.
- Goutaland D., Winiarski T., Angulo-Jaramillo R., Lassabatere L., Bièvre G., Buoncristiani J.F., Dubé J.S., Mesbah A., Cazalets H. (2008a) Etude hydrogéophysique de la zone non saturée hétérogène d'un bassin d'infiltration d'eaux pluviales. *Bulletin des Laboratoires des Ponts et Chaussées* 268-269, 173-192.
- Goutaland D., Winiarski T., Dubé J.S., Bièvre G., Buoncristiani J.F., Chouteau M., Giroux B. (2008b) Hydrostratigraphic characterization of glaciofluvial deposits underlying an infiltration basin using ground penetrating radar. *Vadose Zone Journal* 7, 194-207.
- Griebler C., Mindl B., Slezak D., Geiger-Kaiser M. (2002) Distribution patterns of attached and suspended bacteria in pristine and contaminated shallow aquifers studied with an *in situ* sediment exposure microcosm. *Aquatic Microbial Ecology* 28, 117-129.
- Griebler C., Lueders T. (2008) Microbial biodiversity in groundwater ecosystems. *Freshwater Biology* 54(4), 649-677.
- Gruner D.S., Smith J.E., Seabloom E.W., Sandin S.A., Ngai J.T. *et al.* (2008) A cross-system synthesis of consumer and nutrient resource control on producer biomass. *Ecology Letters* 11, 740-755.

Guillemin C., Roux J.C. (1994) Pollution des eaux souterraines en France. *Manuels & Méthodes*, Editions du BRGM n°23, 262 pp.

## H

Haack S.K., Bekins B.B. (2000) Microbial populations in contaminant plumes. *Hydrogeology Journal* 8, 63-76.

Haack S.K., Fogarty L.R., West T.G., Alm E.W., McGuire J.T., Long D.T., Hyndman D.W., Forney L.J. (2004) Spatial and temporal changes in microbial community structure associated with recharge-influenced chemical gradients in a contaminated aquifer. *Environmental Microbiology* 6(5), 438-448.

Hahn H.J. (2006) The GW-Fauna-Index: a first approach to a quantitative ecological assessment of groundwater habitats. *Limnologica* 36, 119-137.

Hairston N.G., Smith F.E., Slobodkin L.B. (1960) Community structure, population control, and competition. *American Naturalist* 44, 421-425.

Hairston N.G., Hairston N.G. (1993) Cause-effect relationships in energy flow, trophic structure and interspecific interactions. *American Naturalist* 142, 379-411.

Hall R.O. (1995) Use of a stable carbon isotope addition to trace bacterial carbon through a stream food web. *Journal of the North American Benthological Society* 14, 269-277.

Hatt B.E., Fletcher T.D., Walsh C.J., Taylor S.L. (2004) The influence of urban density and drainage infrastructure on the concentrations and loads of pollutants in small streams. *Environmental Management* 34, 112-124.

Hall R.O., Meyer J.L. (1998) The trophic significance of bacteria in a detritus-based stream food web. *Ecology* 79, 1995-2012.

Hall R.O., Wallace J.B., Eggert S.L. (2000) Organic matter flow in stream food webs with reduced detrital resource base. *Ecology* 81, 3445-3463.



- Hendricks S.P. (1993) Microbial ecology of the hyporheic zone: a perspective integrating hydrology and biology. *Journal of the North American Benthological Society* 12, 70-78.
- Hendricks S.P., White D.S. (2000) Stream and groundwater influences on phosphorus biogeochemistry. In: *Streams and Ground Waters*. Jones J.B., Mulholland P.J. (eds) San Diego, CA: Academic Press, pp. 221-235.
- Herb W.R., Janke B., Mohseni O., Stefan H.G. (2008) Thermal pollution of streams by runoff from paved surfaces. *Hydrological Processes* 22(7), 987-999.
- Hervant F., Mathieu J., Barre H., Simon K., Pinon C. (1997) Comparative study on the behavioral, ventilatory and respiratory responses of hypogean and epigean crustaceans to long-term starvation and subsequent feeding. *Comparative Biochemistry and Physiology* 118, 1277-1283.
- Hervant F., Renault D. (2002) Long-term fasting and realimentation in hypogean and epigean isopods: a proposed adaptive strategy for groundwater organisms. *Journal of Experimental Biology* 205, 2079-2087.
- Hobbs III H.H. (2000) Crustacea. In : *Subterranean Ecosystems. Ecosystems of the World* 30. Wilkens H., Culver D.C., Humphreys W.F. (eds.) Amsterdam : Elsevier, pp. 95-108.
- Holmes R.M., Fisher S.G., Grimm N.B. (1994) Parafluvial nitrogen dynamics in a desert stream ecosystem. *Journal of the North American Benthological Society* 13, 468-478.
- Holt R.D., Polis G.A. (1997) A theoretical framework for intraguild predation. *American Naturalist* 149(4), 745-764.
- Holt R.D., Loreau M. (2001) Biodiversity and ecosystem functioning: the role of trophic interactions and the importance of system openness. In: *The Functional Consequences of Biodiversity*. Kinzig A.P. et al. (eds), Princeton University Press, pp. 246–262.
- Hooper D.U., Chapin F.S., Ewel J.J., Hector A., Inchausti P. et al. 2005. Effects of biodiversity on ecosystem functioning: a consensus of current knowledge. *Ecological Monographs* 75, 3-36.

Horizons (2000) Synthèse hydrogéologique et thermique des forages pompes à chaleur. Lyon - Villeurbanne (69). *Hydrogeological Report DH160*, Horizons, Villefontaine, France, 32 pp.

Houri-Davignon C., Relexans J.C., Etcheher H. (1989) Measurements of actual electron transport system (ETS) activity in marine sediments by incubation with INT. *Environmental Technology* 10, 91-100.

Huisman L., Olsthoorn T.N. (1983) *Artificial Groundwater Recharges*. Pitman Books Limited, Boston.

Hunter M.D., Price, P.W. (1992) Playing chutes and ladders: heterogeneity and the relative roles of bottom-up and top-down forces in natural communities. *Ecology* 73, 724-732.

## I

IEA. (2008) *World Energy Outlook 2008*, International Energy Agency/OECD, Paris.

Issartel J., Hervant F., Voituron Y., Renault D., Vernon P. (2005) Behavioural, ventilatory and respiratory responses of epigeal and hypogean crustaceans to different temperatures. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology* 141, 1-7.

## J

Jones J.B., Fisher S.G., Grimm N.B. (1995a) Vertical hydrological exchange and ecosystem metabolism in a Sonoran Desert Stream. *Ecology* 76, 942-952.

Jones J.B., Fisher S.G., Grimm N.B. (1995b) Nitrification in the hyporheic zone of a desert stream ecosystem. *Journal of the North American Benthological Society* 14(2), 249-258.

Jones J.B., Holmes R.M., Fisher S.G., Grimm N.B., Green D.M. (1995c) Methanogenesis in Arizona, USA dryland streams. *Biogeochemistry* 31, 155-173.

Jørgensen P.E., Eriksen T., Jensen B.K. (1992) Estimation of viable biomass in wastewater and activated sludge by determination of ATP, oxygen utilization rate and FDA hydrolysis. *Water Research* 26(11), 1495-1501.

Judd K.E., Crump B.C., Kling G.W. (2006) Variation in dissolved organic matter controls bacterial production and community composition. *Ecology* 87, 2068-2079.

## K

Kalbitz K., Solinger S., Park J.H., Michalzik B., Matzner E. (2000) Controls on the dynamics of dissolved organic matter in soils: a review. *Soil Science* 165, 277-304.

Karl T.R., Diaz H.F., Kukla G. (1988) Urbanization: its detection and effect in the United States Climate Record. *Journal of Climate* 1, 1099-1123.

Kazumi J., Capone D.G. (1994) Heterotrophic microbial activity in shallow aquifer sediments of Long Island, New York. *Microbial Ecology* 28(1), 19-37.

Kirchman D.L., Dittel A.I., Findlay S.E.G., Fischer D. (2004) Changes in bacterial activity and community structure in response to dissolved organic matter in the Hudson River, New York. *Aquatic Microbial Ecology* 35, 243-257.

King L.A., Parker B.C. (1988) A simple, rapid method for enumerating total viable and metabolically active bacteria in groundwater. *Applied and Environmental Microbiology* 54, 1630-1631.

Kolehmainen R.E., Langwaldt J.H., Puhakka J.A. (2007) Natural organic matter (NOM) removal and structural changes in the bacterial community during artificial groundwater recharge with humic lake water. *Water Research* 41(12), 2715-2725.

## L

Lambin E.F., Turner B.I., Geist H.J., Agbola S.B., Angelsen A., Bruce J.W. *et al.* (2001) The causes of land-use and land-cover change: moving beyond the myths. *Global Environmental Change* 11, 261-269.

- Långmark J., Storey M.V., Ashbolt N.J., Stenström T.A. (2004) Artificial groundwater treatment: biofilm activity and organic carbon removal performance. *Water Research* 38, 740-748.
- Larmet H. (2007) Mobilisation et transfert de Zn, Cd, Cu et des colloïdes bactériens dans les bassins d'infiltration d'eaux pluviales : influence des conditions hydrodynamiques. PhD Thesis, University Joseph Fourier, Grenoble, France.
- Leenheer J.A., Malcolm R.L., McKinley P.W., Eccles L.A. (1974) Occurrence of dissolved organic carbon in selected ground-water samples in the United States. *Journal of Research of the US Geological Survey* 2(3), 361-369.
- Lefébure T., Douady C.J., Gouy M., Trontelj P., Briolay J., Gibert J. (2006) Phylogeography of a subterranean amphipod reveals cryptic diversity and dynamic evolution in extreme environments. *Molecular Ecology* 15, 1797-1806.
- Leibold M.A. (1996) A graphical model of keystone predators in food webs: trophic regulation of abundance, incidence and diversity patterns in communities. *American Naturalist* 147, 784-812.
- Leibold M.A., Chase J.M., Shurin J.B., Downing A.L. (1997) Species turnover and the regulation of trophic structure. *Annual Review of Ecology and Systematics* 28, 467-494.
- Lerner D.N. (2002) Identifying and quantifying urban recharge: a review. *Hydrogeology Journal* 10, 143-152.
- Lindeman R. (1942) The trophic-dynamic aspect of ecology. *Ecology* 23, 399-418.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193, 265-275.

# M

- MacNeil C., Dick J.T.A., Elwood R.W. (1997) The trophic ecology of freshwater *Gammarus* spp. (Crustacea: Amphipoda): problems and perspectives concerning the functional feeding group concept. *Biological Reviews* 72, 349-364.
- Malard F., Mathieu J., Reygrobellet J.L., Lafont M. (1996) Biomonitoring groundwater contamination: application to a karst area in Southern France. *Aquatic Sciences - Research Across Boundaries* 58(2), 158-187.
- Malard F., Hervant F. (1999) Oxygen supply and the adaptations of animals in groundwater. *Freshwater Biology* 41, 1-30.
- Margat J. (1994) Les ressources en eau. *Manuels & Méthodes*, Editions du BRGM n°28, 148 pp.
- Marmonier P., Vervier P., Gibert J., Dole-Olivier M.J. (1993) Biodiversity in groundwaters: a research field in progress. *Trends in Ecology and Evolution* 8, 392-395.
- Marsalek J., Chocat B. (2002) International report: Stormwater management. *Water Science Technology* 46(6-7), 1-17.
- Marschner B., Kalbitz K. (2003) Controls of bioavailability and biodegradability of dissolved organic matter in soils. *Geoderma* 113, 211-235.
- Mason Y., Amman A., Ulrich A., Sigg L. (1999) Behavior of heavy metals, nutrients and major components during roof runoff infiltration. *Environmental Science and Technology* 33, 1588-1597.
- Mauclaire L., Gibert J., Claret C. (2000) Do bacteria and nutrients control faunal assemblages in alluvial aquifers? *Archiv Fur Hydrobiologie* 148(1), 85-98.
- McMahon P.B., Chapelle F.H. (2008) Redox processes and water quality of selected principal aquifer systems. *Ground Water* 46(2), 259-271.
- Menge B., Sutherland J. (1976) Species diversity gradients: synthesis of the roles of predation, competition and temporal heterogeneity. *American Naturalist* 110, 351-369.

- Menge B., Olson A.M., Dahloff E.P. (2002) Environmental stress, bottom-up effects, and community dynamics: Integrating molecular-physiological and ecological approaches. *Integrative and Comparative Biology* 42, 892-908.
- Mermillod-Blondin F., Gaudet J.P., Gérino M., Desrosiers G., Creuzé Des Châtelliers M. (2003) Influence of macroinvertebrates on physicochemical and microbial processes in hyporheic sediments. *Hydrological Processes* 17, 779-794.
- Mermillod-Blondin F., Mauclaire L., Montuelle B. (2005a) Use of slow filtration columns to assess oxygen respiration, consumption of dissolved organic carbon, nitrogen transformations, and microbial parameters in hyporheic sediments. *Water Research* 39(9), 1687-1698.
- Mermillod-Blondin F., Nogaro G., Datry T., Malard F., Gibert J. (2005b) Do tubificid worms influence the fate of organic matter and pollutants in stormwater sediments? *Environmental Pollution* 134, 57-69.
- Mermillod-Blondin F. (2006) Fonctionnement de l'horizon supérieur des nappes phréatiques: influence du flux de matière organique dissoute, de la diversité fonctionnelle et d'un hydrocarbure aromatique polycyclique sur la dynamique du carbone organique dissous. Rapport interne. Université Lyon 1, UMR CNRS 5023 Ecologie des Hydrosystèmes Fluviaux, Equipe hydrobiologie et écologie souterraines. Villeurbanne, France, 23 pp.
- Michalzik B., Kalbitz K., Park J.H., Solinger S., Matzner E. (2001) Fluxes and concentrations of dissolved organic carbon and nitrogen - a synthesis for temperate forests. *Biogeochemistry* 52, 173-205.
- Miettinen I.T., Vartiainen T., Martikainen P.J. (1996) Bacterial enzyme activities in ground water during bank filtration of lake water. *Water Research* 30(10), 2495-2501.
- Mikkelsen P.S., Weyer G., Berry C., Walden Y., Colandini V., Poulsen S., Grothmann D., Rohlffing R. (1994) Pollution from urban stormwater infiltration. *Water Science and Technology* 29, 293-302.

Mikola J., Setälä H. (1998) No evidence of trophic cascades in an experimental microbial-based soil food web. *Ecology* 79(1), 153-164.

Moore J.C., Berlow E.L., Coleman D.C., De Ruiter P.C., Dong Q., Hastings A. *et al.* (2004) Detritus, trophic dynamics and biodiversity. *Ecology Letters* 7, 584-600.

Muyzer G., de Waal E.C., Uitterlinden A.G. (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes encoding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 695-700.

## N

Nogaro G., Mermillod-Blondin F., Montuelle B., Boisson J.C., Bedell J.P., Ohannessian A., Volat B., Gibert J. (2007) Influence of a stormwater sediment deposit on microbial and biogeochemical processes in infiltration porous media. *Science of the Total Environment* 377, 334-348.

Nogaro G., Mermillod-Blondin F., Montuelle B., Boisson J.C., Gibert J. (2008) Chironomid larvae stimulate biogeochemical and microbial processes in a riverbed covered with fine sediment. *Aquatic Sciences* 70(2), 156-168.

Notenboom J., Plénet S., Turquin M.J. (1994) Groundwater contamination and its impact on groundwater animal and ecosystems. In: *Groundwater Ecology*. Gibert J., Danielopol D.L., Stanford J.A. (eds) San Diego, CA: Academic Press, pp. 477-504.

## O

Oksanen L., Fretwell S.D., Arruda J., Niemela P. (1981) Exploitation ecosystems in gradients of primary productivity. *American Naturalist* 118, 240-261.

## P

Pabich W.J., Valiela I., Hemond H.F. (2001) Relationship between DOC concentration and vadose zone thickness and depth below the water table in groundwater of Cape Cod, U.S.A.. *Biogeochemistry* 553, 247-268

- Pace M.L., Cole J.J. (1994) Comparative and experimental approaches to top-down and bottom-up regulation of bacteria. *Microbial Ecology* 28, 181-193.
- Perlmutter D.G., Meyer J.L. (1991) The impact of a stream-dwelling harpacticoid copepod upon detritally associated bacteria. *Ecology* 71, 2170-2180.
- Petchey O.L., McPhearson P.T., Casey T.M., Morin P.J. (1999) Environmental warming alters food-web structure and ecosystem function. *Nature* 402, 69-72.
- Peterson G.L. (1977) A modification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry* 83(2), 346-356.
- Pitt R., Clark S., Field R. (1999) Groundwater contamination potential from stormwater infiltration practices. *Urban Water* 1, 217-236.
- Polis G.A., Strong D.R. (1996) Food web complexity and community dynamics. *American Naturalist* 147, 813-846.
- Porter K.S., Feig Y.S. (1980) The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnology and Oceanography* 25(5), 943-948.
- Power M.E. (1992) Top-down and bottom-up forces in food webs: do plants have primacy? *Ecology* 73, 733-746.
- Prestes E.C., dos Anjos V.E., Sodr  F.F., Grassi M.T. (2006) Copper, lead and cadmium loads and behavior in urban stormwater runoff in Curitiba, Brazil. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 17(1), 53-60.
- Pringle C.M. (2001) Hydrologic connectivity and the management of biological reserves: a global perspective. *Ecological Applications* 11, 981-998.
- Pusch M., Fiebig D., Brettar I., Eisenmann H., Ellis B.K., Kaplan L.A., Lock M.A., Naegeli M.W., Traunspurger W. (1998) The role of micro-organisms in the ecological connectivity of running waters. *Freshwater Biology* 40, 453-495.



## Q

Quanrud D.M., Hafer J., Karpiscak M.M., Zhang J., Lansey K.E., Arnold R.G. (2003) Fate of organics during soil-aquifer treatment: sustainability of removals in the field. *Water Research* 37, 3401-3411.

## R

Rauch-Williams T., Drewes J.E. (2006) Using soil biomass as an indicator for the biological removal of effluent-derived organic carbon during soil infiltration *Water Research* 40(5), 961-968.

Roa-Espinosa A., Wilson T.B., Norman J.M., Johnson K. (2003) Predicting the Impact of Urban Development on Stream Temperature Using a Thermal Urban Runoff Model (TURM). *National Conference on Urban Stormwater: Enhancing Programs at the Local Level*. February 17-20. Chicago, IL.

Röling W.F.M., Van Breukelen B.M., Braster M., Lin B., Van Verseveld H.W. (2001) Relationships between microbial community structure and hydrochemistry in a landfill leachate-polluted aquifer. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 4619-4629.

Rosemond A.D., Pringle C.M., Ramirez A., Paul M.J. (2001) A test of top-down and bottom-up control in a detritus-based food web. *Ecology* 82, 2279-2293.

Russell J.B., Cook G.M. (1995) Energetics of bacterial growth: balance of anabolic and catabolic reactions. *Microbiological Reviews* 59(1), 48-62.

## S

Scheffer M., Carpenter S., Foley J.A., Folke C., Walker B. (2001) Catastrophic shifts in ecosystems. *Nature* 413, 591-596.

Scheffer M., Bascompte J., Brock W.A., Brovkin V., Carpenter S.R., Dakos V., Held H., van Nes E.H., Rietkerk M., Sugihara G. (2009) Early-warning signals for critical transitions. *Nature* 461, 53-59.

- Scheffer M., Carpenter S.R. (2003) Catastrophic regime shifts in ecosystems: linking theory to observation. *TRENDS in Ecology and Evolution* 18(12), 648-656.
- Schmidt S.I., Hahn H.J., Hatton T.J., Humphreys W.F. (2007) Do faunal assemblages reflect the exchange intensity in groundwater zones? *Hydrobiologia* 583, 1-19.
- Schmitz O.J. (1994) Resource edibility and trophic exploitation in an old-field food web. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 91, 5364-5367.
- Schorer M., Eisele M. (1997) Accumulation of inorganic and organic pollutants by biofilms in the aquatic environment. *Water, Air & Soil Pollution* 99, 651-659.
- SDUD (2005) Berlin Digital Environmental Atlas: groundwater temperature. *Senate Department for Urban Development: Berlin; 7.*  
([http://www.stadtentwicklung.berlin.de/umwelt/umweltatlas/ed214\\_02.htm](http://www.stadtentwicklung.berlin.de/umwelt/umweltatlas/ed214_02.htm))
- Shepherd J.M., Pierce H., Negri A.J. (2002) Rainfall modification by major urban areas: Observations from spaceborne rain radar on the TRMM satellite. *Journal of Applied Meteorology* 41, 689-701.
- Shurin J.B., Borer E.T., Seabloom E.W., Anderson K., Blanchette C.A., Broitman B., Cooper S.D., Halpern B.S. (2002) A cross-ecosystem comparison of the strength of trophic cascades. *Ecology Letters* 5, 785-791.
- Shurin J.B., Gruner D.S., Hillebrand H. (2006) All wet or dried up? Real differences between aquatic and terrestrial food webs. *Proceedings of the Royal Society B, Biology Sciences* 273, 1-9.
- Simon K.S., Benfield E.F., Macko S.A. (2003) Food web structure and the role of epilithic biofilms in cave streams. *Ecology* 84, 2395-2406.
- Smerdon J.E., Pollack H.N., Enz J.W., Lewis M.J. (2003) Conduction-dominated heat transport of the annual temperature signal in soil. *Journal of Geophysical Research*, 108(B9), 2431, doi:10.1029/2002JB002351.

Stanford J.A., Ward J.V., Ellis B.K. (1994) Ecology of the alluvial aquifers of the Flathead River, Montana. In: *Groundwater Ecology*. Gibert J., Danielopol D.L., Stanford J.A. (eds) San Diego, CA: Academic Press, pp. 367-390.

Starr R.C., Gillham R.W. (1993) Denitrification and organic carbon availability in two aquifers. *Ground Water* 31, 934-947.

Strayer D.L. (1994) Limits to biological distributions in groundwater. In: *Groundwater Ecology*. Gibert J., Danielopol D.L., Stanford J.A. (eds) San Diego, CA: Academic Press, pp. 287-310.

Strayer D.L., May S.E., Nielsen P., Wolheim W., Hausam S. (1997) Oxygen, organic matter, and sediment granulometry as controls on hyporheic animal communities. *Archiv Fur Hydrobiologie* 140, 131-144.

Strong D.R. (1992) Are trophic cascades all wet? the redundant differentiation in trophic architecture of high diversity ecosystems. *Ecology* 73, 747-754.

## T

Taniguchi M. (2006) Anthropogenic effects on subsurface temperature in Bangkok. *Climate of the Past* 2, 831-846.

Thébaud E., Loreau M. (2003) Food-web constraints on biodiversity-ecosystem functioning relationships. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100(25), 14949-14954.

Tortajada C. (2000) Water supply and distribution in the metropolitan area of Mexico City. In: *Water for Urban Areas*. Uitto J.I., Biswas A.K. (eds). Tokyo: United Nations University Press, pp. 112-134.

## U

Uhlinger D.J., White D.C. (1983) Relationship between physiological status and formation of extracellular polysaccharide glycocalyx in *Pseudomonas atlantica*. *Applied and Environmental Microbiology* 45(1), 64-70.

United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division. (2007) *World Population Prospects: The 2006 Revision, Highlights*. Working Paper No. ESA/P/WP.202. United Nations: New York; 96.

US EPA (1991) Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. *Report EPA/600/4-90/27, Fourth edition*, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC.

## W

Waller K., Swan S.H., DeLorenze G., Hopkins B. (1998) Trihalomethanes in drinking water and spontaneous abortion. *Epidemiology* 9, 134-140.

Walsh C.J. (2000) Urban impacts on the ecology of receiving waters: a framework for assessment, conservation and restoration. *Hydrobiologia* 431, 107-114.

Ward J.V., Bretschko G., Brunke M., Danielopol D., Gibert J., Gonser T., Hildrew A.G. (1998) The boundaries of river systems: the metazoan perspective. *Freshwater Biology* 40, 531-569.

Wilczek S., Fischer H., Brunke M., Pusch M.T. (2004) Microbial activity within a subaqueous dune in a large lowland river (River Elbe, Germany). *Aquatic Microbial Ecology* 36, 83-97.

Wilson J.T., McNabb J.F., Balkwill D.L., Ghiorse W.C. (1983) Enumeration and characterization of bacteria indigenous to shallow water-table aquifer. *Ground Water* 21(2), 134-142.

Winiarski T., Bedell J.P., Delolme C., Perrodin Y. (2006) The impact of stormwater on a soil profile in an infiltration basin. *Hydrogeology Journal* 14, 1244-1251.

## Y

Young G.L., Dooge J.C.I., Rodda J.G. (1994) *Global water resources issue*. Cambridge, U.K.: Cambridge University Press, 342 pp.

# FOULQUIER Arnaud

---

## **Écologie fonctionnelle dans les nappes phréatiques : liens entre flux de matière organique, activité et diversité biologiques**

---

### **RÉSUMÉ**

Les réseaux trophiques jouent un rôle primordial dans la régulation des flux de matière et d'énergie au sein des écosystèmes. Dans le cadre des pratiques de recharge artificielle des aquifères, les biocénoses souterraines sont pleinement sollicitées et leur capacité à dégrader les flux de matière organique de surface conditionne le maintien de la qualité des eaux souterraines. L'objectif de ce travail est de déterminer l'influence d'une augmentation des flux de carbone organique dissous sur l'intensité des interactions trophiques entre les communautés microbiennes et les assemblages d'invertébrés au toit des nappes phréatiques rechargées artificiellement avec des eaux de ruissellement pluvial. A travers une approche expérimentale de terrain et de laboratoire, ce travail permet d'évaluer l'intensité des relations existant entre les flux de carbone organique dissous, les conditions environnementales, l'activité et la diversité de communautés microbiennes et l'abondance des communautés d'invertébrés.

### **MOTS-CLÉS**

Aquifère, Recharge artificielle, Carbone organique dissous, Réseaux trophiques, Contrôle bottom-up, Contrôle top-down, Biofilms microbiens, Crustacés.

---

## **Functional ecology in groundwater: linking organic matter flux and biological activity and diversity**

---

### **ABSTRACT**

Food webs play a crucial role in regulating the fluxes of matter and energy within ecosystems. Artificial recharge of aquifers relies heavily on the ability of groundwater biocenoses to degrade organic matter fluxes that is a condition to maintain the quality of groundwater. The objective of this work is to determine the impact of increased dissolved organic carbon supply on the trophic interactions between the microbial communities and invertebrate assemblages at the upper layers of groundwater artificially recharged with stormwater. Through a combined field and laboratory experimental approach, this work allows ranking the strength of relationship between dissolved organic carbon fluxes, environmental conditions, activity and diversity of microbial communities and abundance of invertebrate assemblages.

### **KEYWORDS**

Aquifer, Artificial recharge, Dissolved organic carbon, Food web, Bottom-up control, Top-down control, Microbial biofilm, Crustacea.

---

### **DISCIPLINE**

Écologie

---

### **INTITULÉ & ADRESSE DU LABORATOIRE**

UMR CNRS 5023 – Laboratoire d'Écologie des Hydrosystèmes Fluviaux, Équipe d'Hydrobiologie et Ecologie Souterraines – Université Claude Bernard Lyon 1, Bâtiment Forel, 43 Boulevard du 11 novembre 1918, F-69622 Villeurbanne Cedex, France.