



**HAL**  
open science

# Influence des pratiques de recharge des aquifères par des eaux pluviales sur les communautés microbiennes des nappes phréatiques

Jérémy Voisin

► **To cite this version:**

Jérémy Voisin. Influence des pratiques de recharge des aquifères par des eaux pluviales sur les communautés microbiennes des nappes phréatiques. Ecologie, Environnement. Université de Lyon, 2017. Français. NNT : 2017LYSE1113 . tel-01617606

**HAL Id: tel-01617606**

**<https://theses.hal.science/tel-01617606>**

Submitted on 16 Oct 2017

**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.



N°d'ordre NNT : 2017LYSE1113

**THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON**  
opérée au sein de  
**l'Université Claude Bernard Lyon 1**

**Ecole Doctorale ED341**  
**Evolution Ecosystèmes Microbiologie Modélisation**

**Spécialité de doctorat** : Ecologie Microbienne  
**Discipline** : Biologie

Soutenue publiquement le 12/07/2017, par :  
**Jérémy VOISIN**

---

**Influence des pratiques de recharge des  
aquifères par des eaux pluviales sur les  
communautés microbiennes des nappes  
phréatiques**

---

Devant le jury composé de :

BOUCHEZ, Agnès  
LUCAS, Françoise  
BARRAUD, Sylvie  
RODRIGUEZ-NAVA, Verónica

Directrice de Recherche, INRA Thonon  
Professeure, Paris-Est Créteil  
Professeure, INSA Lyon  
Maitre de conférence, Lyon 1

Rapporteure  
Rapporteure  
Examinatrice  
Examinatrice

COURNOYER, Benoit  
MERMILLOD-BLONDIN, Florian

Directeur de Recherche, Lyon 1  
Chargé de Recherche, Lyon 1

Directeur de thèse  
Co-directeur

# UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

## **Président de l'Université**

Président du Conseil Académique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire

Vice-président de la Commission Recherche

Directrice Générale des Services

**M. le Professeur Frédéric FLEURY**

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Didier REVEL

M. le Professeur Philippe CHEVALIER

M. Fabrice VALLÉE

Mme Dominique MARCHAND

## ***COMPOSANTES SANTE***

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Faculté d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur G.RODE

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Directeur : M. X. PERROT

Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

## ***COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE***

Faculté des Sciences et Technologies

Département Biologie

Département Chimie Biochimie

Département GEP

Département Informatique

Département Mathématiques

Département Mécanique

Département Physique

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Polytech Lyon

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. F. DE MARCHI

Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD

Directeur : Mme C. FELIX

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : M. le Professeur J-C PLENET

Directeur : M. Y.VANPOULLE

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Directeur : M. le Professeur E.PERRIN

Directeur : M. G. PIGNAULT

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Directeur : M. N. LEBOISNE

## REMERCIEMENTS

Il est temps pour moi de remercier toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont permis à ce travail de thèse de voir le jour, d'avancer et de se terminer.

Je remercie tout d'abord les membres de mon jury de thèse, Sylvie Barraud, Agnès Bouchez, Françoise Lucas et Véronica Rodriguez-Nava d'avoir acceptées d'évaluer ce travail.

Il est important pour moi de remercier mes deux directeurs de thèse, Benoit Cournoyer et Florian Mermillod-Blondin, de m'avoir offert l'opportunité d'effectuer cette thèse dans de très bonnes conditions. Merci à vous deux pour la confiance que vous avez placée en moi, pour votre disponibilité, votre aide, pour vos conseils enrichissants, vos relectures...

J'exprime également ma reconnaissance aux membres de mon comité de suivi de thèse, Laurent Lassabatère, Jean Martins, Emilie Lyautey et Fabrice Vavre, pour leurs conseils et avis, qui ont contribué au bon déroulement de cette thèse.

Je remercie Laetitia Bacot et Nicolas Walker et plus largement l'OTHU, soutien indispensable pour réaliser les expérimentations de cette thèse. Merci également à la métropole de Grand Lyon et en particulier Nelly Maamir pour l'accès aux bassins d'infiltration et pour l'autorisation d'instrumenter les sites d'étude. Merci également à la région Auvergne-Rhône-Alpes pour le financement de cette thèse dans le cadre du dispositif ARC Environnement.

J'ai pu côtoyer pendant quelques mois le couloir du Mendel 5<sup>ème</sup> étage. Je remercie en particulier les personnes qui m'ont accueillies et guidées lors de mes premières manips de début de thèse. Merci à Claire Monnez, Amine Boukerb, Sabine Favre Bonté et Babeth. Merci également à Myriam Moisan-Rougeau d'avoir apporté un vent de fraîcheur du Québec afin de m'aider quelques semaines au cours d'un stage.

Je remercie également Audrey Dubost et la plateforme IBIO pour l'accès au serveur et pour l'aide apportée dans les analyses bioinformatiques.

Un grand merci à l'ensemble des membres de l'équipe 6 et en particulier Romain Marti, Sébastien Ribun, Laurence Marjolet, Laurence Pages, Claire Bernardin, Didier Blaha, Audrey Gleizal, Florian Vautrin, Emilie Bourgeois pour leur aide, conseils, discussions et soutien.



Merci également à l'ensemble de l'équipe E3S. Vous m'avez permis d'accomplir cette thèse dans un environnement stimulant mais également propice à la bonne humeur et aux fous rires. J'ai une pensée envers chacun d'entre vous...

Merci à Léa et Margot de m'avoir aidé pour certaines tâches ingrates (à compter, trier ou encore peser des billes) mais qui se sont révélées indispensables. Merci à Félix et Lara qui, respectivement, m'ont permis d'avancer sur les dosages en chimie et en biologie moléculaire. Un immense merci à Antonin pour les heures passées sur le terrain avec entre autre la Bou-Rouch, les diverses sondes et parfois même les moustiques (et les heures passées à grogner...)

A côté du travail, n'oublions pas de remercier (par ordre alphabétique pour éviter les jalousies) tous les potes du labo qui ont été à mes côtés pour le meilleur... et parfois pour le pire : Adeline, Antoine, Antonin, Arnaud, Clémentine D, Clémentine F, David, Delphine, Edwige, Elodie et Jaja, Florian, Hugo, Ivan, Jérôme, Julia, Léa, Louise, Ludovic, Mailys, Margot, Marine, Mathilde, Morgane, Natacha, Nathanaëlle, Pax, Valérian... Merci pour tous les Toï-Toï, bières, soirées, pots de thèse animés, sorties à la montagne, sorties au Domus à 11h30 pétante (avec dons volontaires ou non de frites ou parts de pizza), pauses 16h (avec dons volontaires ou non de biscuits en tout genre)... Tout oubli dans cette liste serait involontaire de ma part et pourrait être dû à l'effet secondaire d'une soirée endiablée...

J'adresse un immense merci à mes parents et mes proches qui m'ont toujours soutenu et qui ont toujours cru en moi. Sans eux je n'aurais jamais pu effectuer mes études et cette thèse dans d'aussi bonnes conditions... Merci !

Enfin, les lignes qui suivent ces remerciements n'auraient sans doute pas pu voir le jour sans le soutien sans faille de Roxane. Merci à toi d'avoir su être patiente sur mes derniers mois de rédaction, de m'avoir supporté et encouragé dans les moments difficiles. Merci pour tous les moments passés ensemble et ceux à venir...

Bonne lecture... Pour toutes les personnes qui iront plus loin que les remerciements ;)

## RESUME

En ville, les systèmes de récupération et d'infiltration des eaux pluviales dans le sous-sol ont pour conséquence d'augmenter la connectivité hydrologique entre la surface et la nappe phréatique. Ces pratiques d'infiltration produisent de nombreuses perturbations physico-chimiques au niveau de la nappe (ex. augmentation des variations thermiques, baisse des concentrations en oxygène dissous, enrichissement de la nappe en matière organique dissoute) mais les conséquences sur le compartiment microbien restent peu connues. L'objectif principal de la thèse est de déterminer les effets de l'infiltration des eaux pluviales sur les communautés microbiennes des nappes phréatiques, aussi bien en termes d'abondance, d'activités que de diversité génétique bactérienne. En se basant sur les changements environnementaux associés à l'infiltration des eaux pluviales et l'analyse des communautés bactériennes, un objectif fondamental est d'évaluer l'importance des phénomènes de dispersion (ex. transferts) et de sélection par des facteurs abiotiques (ex. disponibilité des ressources nutritives) sur les assemblages bactériens au sein des nappes phréatiques. Ces travaux ont été axés sur des expérimentations de terrain utilisant deux approches d'échantillonnage : une méthode active (prélèvements d'eau) et une méthode passive (incubation de substrats artificiels). La description des communautés a été effectuée par une méthode de séquençage de nouvelle génération (i.e. Illumina MiSeq) en se basant sur le gène *rrs*. Les résultats de ce travail mettent en avant une influence significative des pratiques d'infiltration sur les bactériomes d'un aquifère. En effet, le développement, les activités et la diversité des micro-organismes retrouvés dans la nappe ont été stimulés significativement par l'enrichissement en carbone organique dissous biodégradable engendré par ces pratiques. Néanmoins, cet impact est fortement réduit dans les systèmes étudiés où la zone non saturée est épaisse (> 10 m) et agit comme un filtre physique, chimique et biologique efficace entre le bassin d'infiltration et l'aquifère. Les faibles similarités entre les structures génétiques des bactériomes des eaux d'infiltration et dans la nappe indiquent que la zone non saturée joue un rôle efficace sur la rétention des bactéries dans les systèmes étudiés. En conclusion, cette thèse constitue la première étude d'envergure visant à quantifier la réponse du compartiment microbien des aquifères à des perturbations engendrées par l'infiltration des eaux pluviales en milieu urbain. Elle ouvre aussi de nouvelles perspectives sur les méthodes et outils d'évaluation de la qualité des nappes phréatiques.

## ABSTRACT

In urban area, managed aquifer recharge (MAR) systems raises hydrological connectivity between surface and groundwater. These infiltration practices are the cause of many disturbances in groundwaters (e.g. increase of thermal variations, decrease of dissolved oxygen or enrichment in organic matter) but associated consequences on microbial compartment remains unclear. The main aim of the thesis is to determine the effects of stormwater runoff infiltration on microbial communities of groundwater, in terms of abundance, activities and bacterial diversity. Based on environmental changes associated to MAR practices and bacterial community analyses, a fundamental question is to assess the importance of dispersal (e.g. transfers) and selection by abiotic factors (e.g. nutrients availability) on groundwater communities assemblage. This study is based on field experiments with two complementary strategies of sampling: an active one (i.e. groundwater sampling) and a passive one (incubation of artificial substrate). Communities' description was made by next-generation sequencing (i.e. Illumina MiSeq) of *rrs* gene. The results showed a significant influence of MAR practices on microbial communities. Growth, activities and diversity of groundwater micro-organisms were mainly stimulated by biodegradable dissolved organic carbon enrichment associated to MAR practices. Nonetheless, this impact was reduced in systems where the vadose zone is thick (> 10 m) and acts as a physical, chemical and biological filter between the infiltration basin and the aquifer. Low similarities between bacterial communities of infiltration waters and bacterial communities of groundwaters reveal that vadose zone is effective on the retention of bacteria in studied systems. To conclude, this thesis constitutes the first major study that aimed to quantify microbial compartment response to disturbances caused by MAR practices in urban area. It also opens new perspectives on assessment tool for groundwater quality.

## MOTS-CLES

Aquifère, Recharge Artificielle, Communauté microbienne, Diversité, Transfert, Sélection, Substrats Artificiels, Séquençage de nouvelle génération, ADNr 16S

# TABLE DES MATIERES

<b>INTRODUCTION GENERALE.....</b>	<b>9</b>
<b>OBJECTIFS ET ORGANISATION DU DOCUMENT.....</b>	<b>11</b>
<b>PROGRAMMES DE RECHERCHES SOUTENANT CE TRAVAIL.....</b>	<b>14</b>
<b>CHAPITRE 1 : CADRE CONCEPTUEL.....</b>	<b>15</b>
1.1. Les communautés microbiennes : de la structure aux fonctions réalisées au sein des écosystèmes.....	16
1.1.1. Processus d'assemblage des communautés microbiennes.....	16
1.1.2. Les communautés microbiennes et fonctionnement des écosystèmes.....	22
1.1.3. Méthodes d'études des communautés microbiennes et de la diversité.....	23
1.2. Les nappes phréatiques : un écosystème souterrain.....	26
1.2.1. Généralités.....	26
1.2.2. Un milieu vivant.....	29
1.2.3. Services écosystémiques joués par les nappes phréatiques.....	32
1.3. Gestion des eaux pluviales et impacts sur les nappes phréatiques.....	34
1.3.1. Urbanisation et gestion des eaux pluviales.....	34
1.3.2. Contaminations des eaux pluviales.....	36
1.3.3. Bassins d'infiltration.....	38
1.3.4. Recharges artificielles et conséquences sur la nappe.....	40
<b>CHAPITRE 2 : TRANSFERT DE L'OXYGENE DISSOUS, DE NUTRIMENTS ORGANIQUES ET INORGANIQUES ET DE BACTERIES DANS LES NAPPES PHREATIQUES EN FONCTION DE LA HAUTEUR DE LA ZONE NON SATUREE.....</b>	<b>43</b>
<b>Article 1:</b> Urban stormwater runoff infiltration systems: influence of vadose zone thickness on nutrient and bacterial transfers to groundwaters.....	46

<b>CHAPITRE 3 : DEVELOPPEMENT D'UN SYSTEME D'ECHANTILLONNAGE PASSIF DES COMMUNAUTES MICROBIENNES DES NAPPES PHREATIQUES.....</b>	<b>77</b>
<b><u>Article 2:</u></b> Assessment of artificial substrates for evaluating groundwater microbial quality.....	80
<b>CHAPITRE 4 : INFLUENCE DU CARBONE ORGANIQUE DISSOUS SUR LE DEVELOPPEMENT DES BIOFILMS ET LA DIVERSITE DES COMMUNAUTES MICROBIENNES.....</b>	<b>109</b>
<b><u>Article 3:</u></b> Biofilm development indicators and <i>rrs</i> next generation sequencing datasets evidence groundwater bacterial diversity changes driven by dissolved organic matter transferred from managed aquifer recharge systems.....	112
<b>CHAPITRE 5 : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>138</b>
5.1. Conclusions.....	139
5.2. Perspectives.....	143
<b>ANNEXES.....</b>	<b>149</b>
Annexe 1. Vues aériennes des sites d'études.....	149
Annexe 2. <b><u>Article 4:</u></b> Utilisation de billes de verre comme substrats artificiels pour la caractérisation des communautés microbiennes dans les nappes phréatiques : Mise au point méthodologique.....	153
<b>REFERENCES.....</b>	<b>167</b>

## INTRODUCTION GENERALE

Les micro-organismes sont la forme de vie la plus ancienne sur Terre, apparue il y a environ 3,4 milliards d'années (Trevors, 2002). Les procaryotes sont également considérés comme les êtres vivants les plus nombreux sur Terre. Par exemple, il a été estimé que le nombre de cellules bactériennes serait de  $5 \times 10^{30}$  (Whitman et al., 1998). Il est généralement admis que seuls quelques facteurs limitent leur distribution, i.e. température extrême ( $> 121^\circ\text{C}$ ), acidité ou alcalinité extrême ( $\text{pH} < 0,5$  et  $\text{pH} > 12,5$ ) et la disponibilité en eau (Hendry, 2006). De ce fait, il est considéré que tous les milieux sont colonisés par des micro-organismes. Bien qu'invisible à l'œil nu, leur nombre, leur diversité immense et leurs activités diverses font que les procaryotes jouent des rôles capitaux dans les écosystèmes. Les micro-organismes ont façonné la Terre en enrichissant l'atmosphère en oxygène (i.e. par les premiers organismes photosynthétiques que sont les cyanobactéries ; Berla et al., 2013) et façonnent encore aujourd'hui le monde dans lequel nous vivons en tant que moteur des grands cycles biogéochimiques entre autres (Field et al., 1998). Ils peuvent, par exemple, contribuer à la formation de la matière organique via les processus photosynthétiques et chimiosynthétiques, ou encore participer à la décomposition de la matière organique, souvent avec libération de composés inorganiques (e.g.  $\text{CO}_2$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{CH}_4$ ,  $\text{H}_2$ ...), via les processus de minéralisation. Les micro-organismes peuvent aussi servir de source alimentaire riche en nutriments pour d'autres micro-organismes chimiohétérotrophes, protozoaires ou animaux mais aussi contribuer à la vie des plantes ou des animaux par des interactions biotiques positives et négatives. La prise de conscience de ce que les écosystèmes nous apportent (en termes de biens et services ; Daily 1997) et du rôle crucial des micro-organismes dans ces services montre l'importance de mieux comprendre la dynamique et la distribution des micro-organismes et de leurs fonctions dans les écosystèmes.

Au sein des écosystèmes, les micro-organismes sont regroupés sous forme de communautés. Les communautés étant définies comme des assemblages de populations espèces, où les organismes vivent ensemble dans un environnement contigu et interagissent entre eux directement ou via la production de métabolites (Konopka, 2009). Comprendre les mécanismes d'assemblage des communautés microbiennes au sein des écosystèmes est une thématique clé en écologie microbienne. De nombreux paramètres influencent la composition des communautés microbiennes (Vellend, 2010) et *in fine* le fonctionnement des écosystèmes. Avec les activités humaines, les communautés microbiennes subissent de nombreuses

pressions pouvant affecter à la fois leur composition et leurs fonctions. Ces pressions anthropiques sont en particulier très importantes dans les systèmes urbains, où la densité de population est la plus forte.

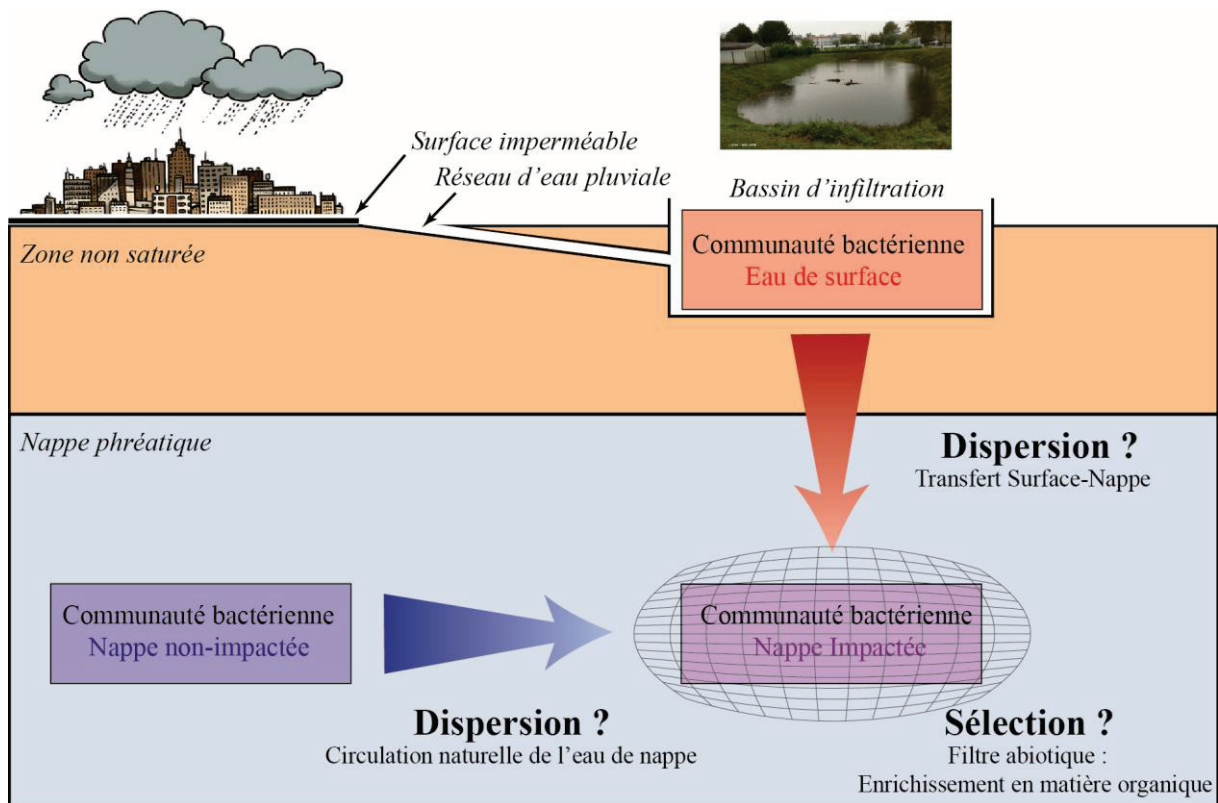
Les écosystèmes aquatiques souterrains constituent des réservoirs en eau cruciaux pour les populations humaines. Cependant, ces nappes d'eau souterraines peuvent être menacées par une large gamme d'activités anthropiques (prélèvements, agriculture, urbanisation). Ainsi, l'urbanisation, de par l'imperméabilisation des sols, engendre une modification du cycle naturel de l'eau avec une diminution de l'infiltration des eaux de surface vers les nappes phréatiques, limitant ainsi la recharge naturelle des eaux souterraines. Prenant en compte cette observation et dans l'optique d'une bonne gestion des eaux pluviales (i.e. être en capacité d'évacuer des volumes d'eau de ruissellement importants lors d'épisodes pluvieux), des pratiques de recharge artificielle des nappes phréatiques par des eaux pluviales ont vu le jour il y a plusieurs décennies (Marsalek et Chocat, 2002). Cependant, les importants volumes d'eau infiltrés dans les nappes peuvent perturber cet écosystème et les micro-organismes s'y développant (Foulquier et al., 2009). Etudier ces perturbations est d'autant plus nécessaire que les eaux de ruissellements sont fortement chargées en polluants (Chocat 1997).

Tout l'enjeu de cette thèse est d'étudier l'impact de pratiques d'infiltration des eaux pluviales sur les communautés microbiennes des nappes phréatiques, tant sur leur diversité que sur leur croissance ou leurs activités.

## **OBJECTIFS ET ORGANISATION DU DOCUMENT**

L'objectif principal de la thèse est de déterminer les effets de l'infiltration des eaux pluviales sur les communautés microbiennes des nappes phréatiques, aussi bien en termes d'abondance et d'activités mais aussi en termes de diversité bactérienne. En se basant sur les changements environnementaux associés à l'infiltration des eaux pluviales et l'analyse des communautés bactériennes, l'objectif fondamental était d'évaluer l'importance des phénomènes de dispersion (i.e. transfert) et des phénomènes de sélection par des facteurs abiotiques (augmentation des ressources nutritives) sur l'assemblage des communautés au sein des nappes phréatiques (Figure I.1). Ces travaux sont basés sur des expérimentations de terrain utilisant deux méthodes d'échantillonnages complémentaires : une méthode active (prélèvements d'eau) et une méthode passive (incubation de substrats artificiels). Le couplage de ces deux méthodes permet d'évaluer, d'une part, les transferts de bactéries (analyse des eaux) et d'autre part leur développement dans la nappe phréatique (production de biofilms sur substrats artificiels). De plus, l'utilisation de substrats artificiels a aussi un objectif appliqué de développement d'un outil d'échantillonnage passif qui nous permette des prélèvements plus fiables des bactéries tout en ayant un outil de bioindication sur le développement et l'activité des communautés bactériennes des nappes phréatiques.





**Figure I.1 :** Illustration représentant les objectifs fondamentaux de la thèse qui sont : (1) d'évaluer l'influence de la dispersion à travers les transferts surface-nappe et les transferts nappe non-impactée-nappe impactée sur l'assemblage des communautés impactées et (2) d'évaluer l'influence de la sélection par un filtre abiotique (i.e. enrichissement en matière organique) sur les communautés impactées

Le manuscrit est structuré en cinq chapitres dont trois sous forme d'articles scientifiques qui reprennent les objectifs principaux de la thèse. Le **premier chapitre** de cette thèse présente le cadre conceptuel de ce travail de recherche. Dans un premier temps, il est question de faire la présentation des différents mécanismes déterminant l'assemblage des communautés bactériennes, qu'ils soient déterministes ou stochastiques. Il est ensuite rappelé l'importance des communautés bactériennes dans le fonctionnement des écosystèmes avant d'exposer les techniques actuelles pour explorer la composition des communautés. L'accent est ensuite mis sur mon objet d'étude : l'écosystème « nappe phréatique ». Les communautés bactériennes sont une composante biologique importante de ces écosystèmes souterrains et jouent un rôle crucial dans les services écosystémiques rendus par cet écosystème. Cependant, de nombreuses pressions sont exercées sur les nappes phréatiques qui peuvent impacter la qualité des eaux et les services rendus par cet écosystème. Le dernier point présente donc les pressions et impacts connus sur les nappes phréatiques, en me focalisant sur la recharge

artificielle des nappes par des eaux pluviales ; qui est l'impact sur lequel j'ai le plus spécifiquement travaillé au cours de ma thèse.

Le **chapitre 2** s'intéresse particulièrement au processus de dispersion et de transfert de bactéries de la surface à la nappe phréatique dans des systèmes d'infiltration des eaux pluviales (bassins d'infiltration). Le travail réalisé sur 6 bassins d'infiltration ayant des hauteurs de zone non saturée contrastées permet de tester le rôle joué par cette ZNS sur la protection des nappes à une contamination microbiologique. L'hypothèse de ce chapitre est que l'infiltration des eaux pluviales permet un transfert des bactéries qui est inversement proportionnel à la hauteur de la zone non saturée. Autrement dit, les phénomènes de dispersion dans l'assemblage des communautés bactériennes seraient plus importants sur les sites dont la zone non saturée est peu épaisse.

Le **chapitre 3** concerne une méthodologie d'échantillonnage/piégeage des bactéries dans les nappes phréatiques (développement de substrats artificiels pour étudier les biofilms dans les nappes) développée au cours de cette thèse. Dans cette partie, nous faisons les hypothèses que la rugosité des substrats artificiels va jouer un rôle prépondérant sur le développement du biofilm (l'utilisation de billes d'argile ou de graviers est préférentielle à l'utilisation de billes de verre moins rugueuses) et que ces substrats artificiels permettent un échantillonnage représentatif de la diversité des eaux testées.

Dans le **chapitre 4**, nous utilisons les substrats artificiels sélectionnés et testés précédemment pour déterminer la réponse en termes de diversité et d'activités des biofilms microbiens aux enrichissements en matière organique dissoute de la nappe engendrés par l'infiltration des eaux pluviales. Dans ce dernier chapitre, nous faisons l'hypothèse que l'augmentation des flux de DOC et BDOC atteignant les nappes phréatiques influence les communautés microbiennes avec une augmentation de l'abondance et des activités microbiennes et de la diversité bactérienne. Nous nous attendons donc à une relation positive entre le BDOC et la diversité bactérienne. Il est aussi supposé que la disponibilité du carbone organique soit un facteur de sélection intervenant dans l'assemblage des communautés bactériennes des nappes phréatiques.

Dans le **chapitre 5**, il s'agit de faire la synthèse du travail effectué en pointant les résultats phares de cette thèse concernant l'impact des pratiques d'infiltration sur les communautés microbiennes des nappes phréatiques et en particulier sur les facteurs qui influencent la diversité et la composition de celles-ci. Ce manuscrit se termine ensuite sur la présentation de quelques perspectives de recherche à court et moyen termes qui s'inscrivent dans la continuité de ce travail de recherche.

## **PROGRAMMES DE RECHERCHES SOUTENANT CE TRAVAIL**

Ce travail de thèse est financé par une allocation doctorale de recherche financée par la région Auvergne-Rhône-Alpes dans le cadre de l'ARC Environnement (Axe Ecotechnologie). Les expérimentations de terrains et de laboratoires sont menées dans le cadre des programmes ANR-11-CESA-012 CABRRES (<http://www.graie.org/cabrres/>) et ANR-16-CE32-0006 « FROG » de l'Agence National de la Recherche et s'appuient sur l'Observatoire de Terrain en Hydrologie Urbaine (OTHU), fédération de recherche pluridisciplinaire dont l'enjeu est d'observer et de comprendre les rejets urbains et leurs impacts afin de proposer une meilleure gestion des eaux pluviales (OTHU, <http://www.graie.org/othu/>).

# 1

## CADRE CONCEPTUEL

## **1.1. Les communautés microbiennes : de la structure aux fonctions réalisées au sein des écosystèmes.**

### 1.1.1. Processus d'assemblage des communautés microbiennes

Un des objectifs majeurs de l'écologie des communautés est d'identifier les processus qui déterminent leur organisation, quelle que soit l'échelle spatiale ou temporelle considérée. Le principe général de l'étude des règles d'assemblage est l'idée que les communautés sont des sous-échantillons d'espèces présentes dans un pool régional d'espèces (Cornell et Harrison, 2014). En général, on définit ce pool comme "régional" et comprenant les espèces présentes dans la région à cause de contingences biogéographiques ou historiques. Les communautés observées sont ensuite le reflet des effets d'une succession de filtres liés à différents processus écologiques appelés « règles d'assemblage ». Vellend (2010) propose 4 grands processus qui vont régir l'assemblage des communautés. Ces processus sont la sélection, la diversification (ou spéciation), la dispersion et la dérive écologique. Cette théorie initialement développée sur les macro-organismes est également applicable aux communautés microbiennes (Nemergut et al., 2013).

#### *La sélection*

La sélection est l'un des processus les plus importants dans l'assemblage des communautés microbiennes. Cette sélection est un processus déterministe où de nombreux facteurs abiotiques et biotiques vont exercer une pression sur les espèces. On retrouve parfois les termes de filtres environnementaux ou de « tri des espèces » (i.e. species sorting) pour désigner la sélection.

Le filtre abiotique regroupe toutes les contraintes environnementales de nature chimique ou physique qui vont déterminer les espèces capables de se développer dans le milieu en fonction de leur adaptation physiologique. Parmi ces filtres, la température (Rui et al., 2015 ; Zogg et al., 1997) et le pH (Rousk et al., 2010 ; Bartam et al., 2014 ; Kim et al., 2016) peuvent, par exemple, avoir des rôles importants sur la composition des communautés microbiennes. Dans les environnements aquatiques, de nombreuses études montrent que la composition des communautés microbiennes dépend des concentrations en nutriments organiques ou inorganiques (Eiler et al., 2003 ; Besemer et al., 2005 ; Judd et al., 2006 ; Li et al., 2012). La contamination des écosystèmes par des composés xénobiotiques influence également les communautés microbiennes. En effet, ces composés peuvent être une source de carbone pour les micro-organismes, ou être toxique pour d'autres (Heider, 2007 ; Foght,

2008). Par exemple, il a été montré que les aquifères pollués par les BTEX (i.e., benzène, toluène, éthyl-benzène et xylène) ont des compositions bactériennes différentes des aquifères non contaminés (Röling et al., 2001, Hendrickx et al., 2005, Fahy et al., 2005). D'autres travaux ont également montrés l'effet des pesticides sur les communautés microbiennes que ce soit dans les eaux ou dans les sols (Mauffret et al., 2017, Lo 2010). Dans les écosystèmes souterrains, tels que les nappes phréatiques où les concentrations en nutriments sont faibles, d'autres facteurs peuvent également entrer en compte dans l'établissement des communautés microbiennes qui se développent sous forme de biofilms. C'est le cas, par exemple, de la composition minérale des sédiments, la taille des grains ou leur rugosité (Edwards et Rutenberg, 2001 ; Köster et al., 2005) qui vont jouer un rôle important dans la colonisation bactérienne et ainsi influencer la composition finale de la communauté. Grösbacher et al. (2016) montrent même que des interactions existent entre la concentration en hydrocarbure et le type de matrice sédimentaire. En effet, dans le cas où les concentrations en BTEX sont élevées, les propriétés des sédiments sont moins importantes dans l'établissement et la composition des communautés microbiennes attachées aux surfaces. A l'inverse, ces propriétés deviennent plus importantes quand les concentrations en hydrocarbures sont plus faibles.

L'étude du filtre biotique est beaucoup moins documenté que le filtre abiotique. Malgré tout, ce filtre est important puisque comprenant toutes les interactions biotiques de type compétition, prédation, parasitisme, commensalisme ou encore mutualisme. Ces interactions peuvent être négatives (ex : compétition pour les ressources avec exclusion des espèces les moins compétitives) ou positives (co-occurrence de 2 espèces qui s'apportent des bénéfices mutuels). La table 1.1 montre les différents types d'interactions existantes et leurs effets respectifs (i.e., positifs, négatifs ou neutre) sur les espèces impliquées. Parmi ces interactions, la compétition est une des principales dans l'assemblage des communautés. Chez les micro-organismes, les phénomènes de compétition sont plus difficiles à mettre en évidence que chez les animaux ou les plantes. Néanmoins certains travaux ont pu démontrer des phénomènes de compétition, notamment vis-à-vis des ressources nutritives (Hibbing et al, 2010 ; Goberna et al., 2014 ; Koeppel et Wu, 2014). La prédation est également une interaction intervenant dans les assemblages de communautés. En effet, le broutage des bactéries par les protozoaires ou encore la lyse virale par des bactériophages (plutôt du parasitisme) sont généralement mis en avant dans le contrôle de la structure des communautés microbiennes (Simek et al., 2001 ; Longnecker et al., 2010 ; Chow et al., 2014, Cram et al., 2016).

	Espèce A	Espèce B
Neutralisme	0	0
Compétition	-	-
Prédation, Parasitisme	+	-
Commensalisme	+	0
Amensalisme	0	-
Mutualisme, Symbiose	+	+

**Table 1.1 :** Les différents types d'interactions biotiques et leurs conséquences sur les espèces mises en jeu. Un « 0 » indique un effet neutre sur l'espèce, un « - » indique un effet négatif et un « + » un effet positif sur l'espèce.

Les interactions biotiques ne se font pas uniquement entre micro-organismes. En effet, il existe, par exemple, de nombreuses interactions entre les plantes et les bactéries souvent de nature mutualiste ou symbiotique (Philippot et al., 2013). Ainsi, les communautés microbiennes dans les rhizosphères sont généralement différentes des communautés du sol adjacent (Lundberg et al., 2012 ; Peiffer et al., 2013). De plus, l'espèce de plante étudiée (Marschner et al., 2004) ou encore le cultivar (Edwards et al., 2015) peuvent également intervenir dans l'assemblage de la communauté microbienne.

Les interactions entre facteurs biotiques et abiotiques génèrent une multitude de combinaisons jouant un rôle dans l'assemblage des communautés microbiennes. Paver et Kent (2016) montrent, par exemple, grâce à des systèmes expérimentaux, que la température seule n'influence pas les communautés bactériennes issues de lacs. Les changements de communautés dus à la température interviennent seulement en présence de phytoplancton et des interactions entre ce compartiment et les communautés bactériennes planctoniques.

### La dispersion

La dispersion correspond au déplacement des individus dans l'espace d'une communauté à une autre. A cause de la taille, des fortes abondances et des temps de génération plus courts des micro-organismes, les processus de dispersion chez ces organismes sont difficilement étudiables. Généralement, la répartition spatiale des micro-organismes est alors utilisée comme un proxy de dispersion (Nemergut et al., 2013). Il y a donc de nombreuses limitations dans l'étude de la dispersion chez les micro-organismes avec l'utilisation de ce type de proxy car il est difficile à partir d'un échantillonnage de

communauté qui est forcément non exhaustif de conclure qu'un organisme est absent de l'environnement étudié. De plus, la distribution des organismes observés est généralement soumise à des processus de sélection comme nous venons de le voir. Néanmoins, de nombreuses études mettent en avant ce processus dans l'assemblage des communautés microbiennes (Fazi et al., 2008 ; Lindström et Ostman, 2011 ; Crump et al., 2012 ; Shabarova et al., 2014).

La dispersion chez les micro-organismes est considérée stochastique car passive (transport par l'air, l'eau...). De ce fait, ce processus est généralement mis en avant dans les écosystèmes aquatiques (Heino et al., 2015) car les cellules peuvent se déplacer plus facilement dans l'eau que dans les sédiments ou les sols. De nombreuses espèces ont également la capacité de se mouvoir par elles-mêmes (motilité bactérienne : e.g. « swimming », « swarming » ; Harshey 2003), pouvant rendre ce processus déterministe. Cependant, ces processus actifs se font sur de très courtes distances et ne sont donc pas ou très peu impliqués dans la dispersion (Martiny et al. 2006).

Dans certains environnements dont la connectivité est forte (e.g. fleuves, systèmes côtiers...), les phénomènes de dispersion peuvent être très importants. On parle alors d'effet de masse (i.e., mass effect). Cet effet de masse tend à homogénéiser des communautés locales adjacentes qui deviennent plus similaires à la communauté régionale (Shabarova et al., 2013 ; Heino et al., 2015). A l'inverse, dans des environnements plutôt isolés (e.g. étangs, lacs...), des phénomènes de limitations (i.e., dispersal limitation) sont parfois mis en avant pour expliquer de fortes divergences entre les communautés locales (Eisenlord et al., 2012). De plus, l'effet de masse tend à s'accroître quand la distance entre les sites se réduit et la limitation de la dispersion augmente quand la distance entre sites augmente également.

### *La diversification*

Ce processus également appelé spéciation est l'apparition de nouvelles espèces (ou variants génétiques – émergence de nouveaux génotypes à partir d'une souche mère) dans un milieu donné. Chez les bactéries, la notion d'espèce est sujette à débat (Achtman et Wagner, 2008). Néanmoins, il existe des particularités chez les micro-organismes qui peuvent jouer un rôle dans la génération de variation génétique et donc dans la composition des communautés. C'est le cas, par exemple, des transferts horizontaux de gènes qui permettent de diversifier les organismes par des échanges de matériels génétiques (Papke et Gogarten, 2012). Ainsi des gènes d'intérêts apportant des avantages compétitifs dans un environnement donné peuvent se



transférer à des espèces n'ayant initialement pas ses gènes et leur permettant de survivre, voire se développer dans cet environnement et au sein de cette communauté.

### La dérive

La dérive (i.e. drift) est totalement stochastique et correspond aux changements dans la démographie (abondances) des organismes par pur hasard. Des études sur des macro-organismes ont montré que la dérive était plus importante quand la sélection, mais aussi la diversité, étaient faibles (Chase et Myers, 2011). Chez les micro-organismes, ces phénomènes ont, par exemple, été observés dans des systèmes de traitements des eaux usées (Ofiteru et al., 2010) mais aussi dans le microbiote intestinal de certains animaux (Lankau et al., 2012).

### Parts respectives des processus déterministes et stochastiques

Actuellement, il existe deux approches différentes pouvant expliquer l'assemblage des communautés et des patrons de diversité. Une première approche totalement déterministe (i.e., théorie des niches : Chase et Leibold, 2003) où les communautés sont assemblées par des processus prévisibles comme la sélection environnementale. La deuxième approche, stochastique (i.e., théorie neutre : Hubbell, 2001), insiste sur le fait que la composition de la communauté locale ne peut pas être prédite par les conditions environnementales et que les événements rares ou aléatoires ont une grande importance (e.g. processus de dérive, dispersion). Ce modèle neutre suppose donc que les organismes mis en jeu ont des probabilités de migration, de naissance, de mort et de spéciation identiques (Hubbell, 2001).

En réalité, les processus déterministes et stochastiques agissent ensemble mais leur part respective dans l'assemblage des communautés peut différer en fonction des organismes ou des écosystèmes (Leibold et al., 2004 ; Vellend, 2010 ; Heino et al., 2015). Stegen et al. (2012) ont estimé que la part des processus déterministes était supérieure aux processus stochastiques dans l'assemblage de communautés microbiennes dans les nappes phréatiques. Hu et al. (2015) arrivent à la même conclusion dans des pergélisols. Caruso et al. (2011), dans une étude à l'échelle globale dans des milieux désertiques, concluent que les processus déterministes et stochastiques interagissaient entre eux, mais que leur part respective pouvait varier en fonction de l'échelle spatiale ou temporelle observée. Pour Chase (2014), il est impossible de démêler l'importance relative de ces deux types de processus sans prendre en compte l'échelle spatiale. Il propose une hypothèse selon laquelle, plus l'échelle d'observation est faible, plus la part des processus stochastiques serait forte et la part des processus déterministes serait faible (et inversement).

### Influence des perturbations

Les perturbations, qu'elles soient d'origines naturelles ou anthropiques, ont une influence sur les communautés bactériennes, en termes de composition ou d'abondance. Ces perturbations peuvent modifier l'environnement physique ou chimique de l'écosystème, par des changements de concentrations des ressources nutritives par exemple. L'invasion d'espèces peut également être considérée comme une perturbation, notamment l'invasion de micro-organismes (Litchman, 2010). Il existe différents types de perturbations (Nimmo et al., 2015). Des perturbations de type « pulse », telles que les feux de forêt ou les inondations, qui sont généralement rapides. D'autres sont de types « press », où la perturbation induit une pression constante sur l'environnement (e.g. urbanisation). Enfin, les dernières, de type « ramp », correspondent plus à une perturbation persistante dans le temps, avec des variations dans son intensité (e.g. sécheresse). Les écosystèmes ne sont pas tous impactés de la même façon. Hawkes et Keitt (2015) ont conclu de leurs travaux que les communautés microbiennes provenant d'environnements stables et constants (comme les nappes phréatiques) étaient plus sensibles aux changements environnementaux.

Des études empiriques ont démontré que les perturbations pouvaient causer une augmentation de la part des processus déterministes sur l'assemblage des communautés (Chase, 2007 ; Jiang et Patel, 2008). D'autres recherches suggèrent, à l'inverse, que les perturbations favorisent les processus stochastiques (Didham et al., 2005 ; Didham et Norton, 2006). Les travaux de Ferrenberg et al. (2013) montrent que les perturbations importantes engendrées par les feux de forêt induisaient à la fois des processus stochastiques et déterministes sur l'assemblage des communautés microbiennes. L'importance relative de chacun des processus était en fonction du temps passé après la perturbation de l'écosystème. Ils proposent un modèle où les processus stochastiques sont plus importants juste après la perturbation (importance des processus de dispersion initialement), avant que les processus déterministes prennent le dessus (fort effet de sélection de l'environnement perturbé sur les organismes qui commencent à se développer et se diviser).

Chaque micro-organisme ou communauté ne va pas réagir de la même façon face à une perturbation. Certains vont être plus ou moins résistants, d'autres plus ou moins résilients et cela va déterminer l'état de la communauté après une perturbation. La résistance est définie comme la capacité d'une espèce, d'une communauté ou d'un écosystème à persister sans modification après une perturbation. La résilience se définit, quant à elle, comme la vitesse à

laquelle l'espèce, la communauté ou l'écosystème retourne à son état initial après avoir subi une perturbation (Allison et Martiny, 2008). Ces phénomènes de résistance et de résilience vont donc avoir leur importance dans l'assemblage et la dynamique des communautés (e.g. Chase 2007, Zhou et al. 2014).

### 1.1.2. Les communautés microbiennes et fonctionnement des écosystèmes

Le fonctionnement d'un écosystème est défini comme l'ensemble des processus liés aux flux de matière et d'énergie dans cet écosystème (apports, transferts et pertes). La table 1.2 montre quelques exemples de processus écosystémiques (aussi appelés processus fonctionnels) dans les écosystèmes aquatiques d'après Giller et al. (2004).

Classe du Processus	Processus écosystémique
Flux de matière et d'énergie	Production primaire
	Production secondaire
Transformation de matière organique	Décomposition de matière organique
	Importation/exportation de matière organique
Métabolisme écosystémique	Minéralisation du carbone
	Consommation/Production d'oxygène
Cycle des éléments	Dénitrification, Nitrification, Fixation de l'azote
	Echange des nutriments limitant
Structuration physique	Bioturbation
	Sédimentation
	Biofilm microbien
	Agrégation et mouvement des particules

**Table 1.2 : Exemples de processus fonctionnels**

(D'après Giller et al. 2004, traduit et modifié)

A cette définition se rajoute parfois le terme de propriétés fonctionnelles de l'écosystème. Cela correspond à la fois à l'amplitude des variables d'état (e.g. biomasse des groupes fonctionnels (i.e. groupement d'espèces ayant des effets similaires sur les processus majeurs de l'écosystème, définition de Chapin et al. 1992), masse des éléments inorganiques, etc...) et à la stabilité (e.g. résistance, résilience).

Du fait du rôle crucial des micro-organismes dans les processus biogéochimiques, la composition des communautés microbiennes a un impact majeur sur le fonctionnement de

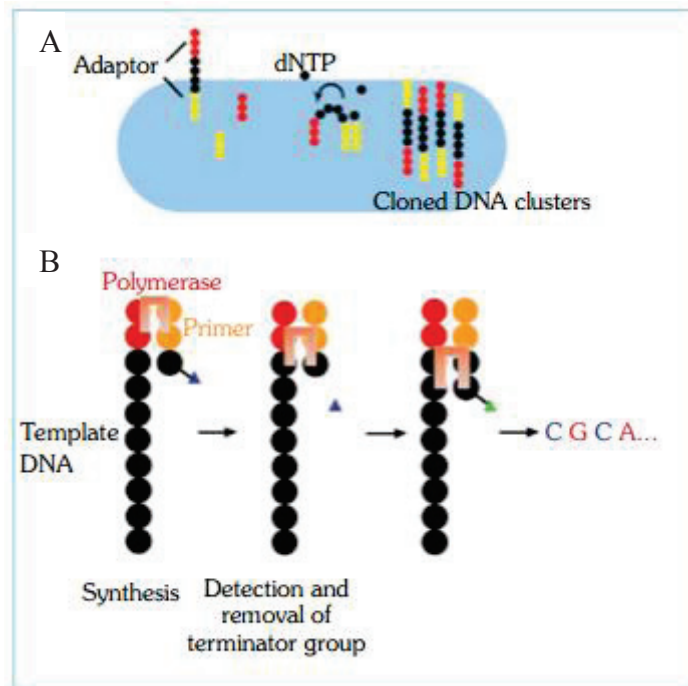
l'écosystème. Une des questions importantes en écologie est l'évaluation du rôle de la biodiversité dans le fonctionnement des écosystèmes. Basés sur la richesse spécifique des organismes étudiés, plusieurs modèles et hypothèses ont été émis pour relier diversité et fonctionnement (Loreau et al., 2001 ; Naeem et al., 1999 ; Tilman et al., 2014). Il est généralement admis qu'une réduction de la biodiversité avait un effet négatif sur le fonctionnement de l'écosystème (Loreau et al., 2001 ; Giller et O'Donovan 2002 ; Hooper et al., 2005). Schwartz et al. (2000) ont fait le constat que la plupart des études montraient que la relation entre biodiversité et fonctionnement de l'écosystème était de type « redondante ». Cette relation de redondance spécifique suggère qu'il existe une diversité minimale nécessaire au fonctionnement de l'écosystème ; au-delà, la plupart des espèces sont redondantes dans leur rôle. Ainsi, une communauté peut être assimilée à un ensemble de groupes fonctionnels, chacun comprenant quelques espèces écologiquement équivalentes. La perte d'espèces dans la communauté entraîne alors de faibles effets sur le fonctionnement de l'écosystème aussi longtemps que le groupe fonctionnel est représenté. Cependant, cette relation ne serait pas aussi simple et il existerait des espèces dites « drivers » ayant un rôle majeur dans le fonctionnement de l'écosystème et des espèces dites « passagers » ayant des rôles mineurs (Walker 1992). Ainsi la perte de certaines espèces n'aurait pas le même poids sur les fonctions écosystémiques et la relation biodiversité-fonctionnement de l'écosystème ne serait pas uniquement fonction de la simple richesse spécifique, mais serait également dépendante d'autres paramètres (e.g. identité, abondances, activités, interactions des espèces présentes ; Walker 1992).

### 1.1.3. Méthodes d'études des communautés microbiennes et de la diversité

Les premiers travaux visant à décrire les communautés bactériennes dans les écosystèmes étaient basés sur des méthodes culture-dépendantes et phénotypiques, consistant à réaliser des enrichissements, des comptages sur boîtes de Pétri (e.g. méthode du Nombre le Plus Probable : NPP) ou des isolements sur milieu sélectif. L'identification des bactéries se faisait sur des critères morphologiques et métaboliques. Cependant, ces méthodes sous estiment la diversité bactérienne car il est avéré que les bactéries cultivables en laboratoire représentent une fraction mineure (de 1 à 10% selon les estimations) de l'ensemble des bactéries (Stewart 2012). Elles ont, cependant, l'avantage de permettre une étude des phénotypes dont l'évaluation des potentialités pour la réalisation de certaines fonctions (dénitrification, dégradation de certaines molécules, etc). Ces méthodes sont cependant très chonophages malgré une évolution vers des « phenotypic microarrays » (e.g. omnilog). Des

méthodes s'affranchissant de l'étape de culture microbienne ont donc vu le jour. Elles ont toutes pour principe une approche basée sur l'étude de l'ADN. L'ADN est extrait de la communauté microbienne : le métagénome ; et peut être analysé de différentes manières : (1) En clonant et séquençant les gènes, puis en réalisant des inférences phylogénétiques (e.g. ARNr 16S). (2) En analysant tous les gènes étudiés, aussi bien par le clonage aléatoire d'inserts longs ou courts d'une librairie que par des méthodes clone-indépendantes comme le pyroséquençage. (3) En utilisant des méthodes d'empreintes moléculaires comme la T-RFLP, la DGGE ou encore l'ARISA. (4) En utilisant le séquençage haut débit d'amplicons PCR de segments d'ADN permettant, entre autres, des inférences phylogénétiques (e.g. ARNr 16S).

Ces approches présentent des avantages et des inconvénients mais le séquençage d'amplicons PCR a permis d'augmenter la profondeur des analyses dédiées à l'appréciation de la structure génétique des communautés microbiennes. En effet, les technologies de séquençage de l'ADN ont connues des améliorations impressionnantes ces dernières années avec l'émergence des plateformes de séquençage de nouvelle génération (next-generation sequencing (NGS) en anglais) (Shendure & Ji 2008; Glenn 2011). Ces plateformes peuvent fournir des milliards de séquences dans une simple expérience, ce qui dépasse très largement les anciennes méthodes de séquençage comme la méthode de Sanger. Le séquençage à haut débit est maintenant démocratisé et révolutionne l'écologie microbienne en donnant une description plus complète de la diversité microbienne de n'importe quel échantillon. Il existe plusieurs méthodes de séquençage haut débit (e.g. Roche 454 ; Illumina ; Solid ; voir Mardis 2008). La technologie Illumina MiSeq a été utilisée au cours de cette thèse. Pour cette technique, l'amplification PCR de l'échantillon à analyser ne s'effectue pas en solution mais sur un support solide. La réaction de séquençage est alors réalisée directement sur le support où l'ADN a été amplifié (Figure 1.1A). Elle se déroule position après position et après ajout d'un mélange contenant toutes les bases associées chacune à un fluorophore différent. L'extrémité de ces bases est protégée pour empêcher l'addition de bases supplémentaires à chaque cycle d'incorporation. Un laser détecte les bases incorporées au fur et à mesure. Le clivage des fluorophores permet ensuite l'incorporation de la base suivante. La lecture est effectuée ainsi cycle après cycle (Figure 1.1B). Chaque position étant lue l'une après l'autre, les erreurs principales de cette technologie sont des erreurs de substitution d'une base par une autre.



**Figure 1.1** : Séquençage par la technologie Illumina MiSeq.

A : Représentation du support solide (flow cell) permettant la fixation de l'ADN avec des adaptateurs et les réactions PCR (amplification en pont) nécessaires au séquençage par synthèse.

B : Représentation du séquençage par synthèse : les bases sont ajoutées puis détectées par le séquenceur grâce à la présence d'un fluorophore. Le clivage du fluorophore entraîne l'incorporation de la base suivante.

Les gènes les plus communément utilisés pour étudier les communautés microbiennes sont les gènes codant pour l'ARNr 16S chez les bactéries et l'ARNr 18S chez les champignons. Les travaux de Carl Woese (1987) ont démontré que les séquences codant l'ARNr 16S étaient des marqueurs évolutifs en accord avec les différenciations taxonomiques proposées sur la base des analyses phénotypiques. Toutes les cellules contiennent des ARNr, qui sont des composants essentiels à leur fonctionnement. En effet, les ribosomes sont les unités cellulaires permettant la synthèse des protéines en effectuant la traduction des ARN messagers. Les cellules eucaryotes possèdent des ARNr 28S, 18S, 5.8S et 5S. Les cellules procaryotes possèdent des ARNr 23S, 16S et 5S. Le gène de l'ARNr 16S a l'avantage d'être constitué d'une mosaïque de domaines hautement conservés (ayant peu évolués au cours du temps) et de domaines variables, mais aussi de présenter une taille d'environ 1500 nucléotides aisément séquençables. Aujourd'hui, la majorité des études de diversité des bactéries s'effectuent seulement sur la base des séquences d'ARNr 16S. Quand l'ARNr 16S est utilisé

pour identifier et classer les bactéries, le terme d'OTU désignant l'Unité Taxonomique Opérationnelle est alors employé (OTU en anglais). Les OTUs basés sur l'identification des ARNr 16S permettent de définir une catégorie proche des rangs taxonomiques du genre et de l'espèce si le degré d'identité est au moins de 97%. L'utilisation de ce gène comme biomarqueur en taxonomie a permis de révéler la biodiversité des eubactéries et archaebactéries dans de nombreux environnements et de pallier certaines limites de l'approche culturelle. L'existence de banques spécialisées dans les séquences de gène codant les ARNr comme la base de données SILVA, disponible sur le site <http://www.arb-silva.de/>, permet d'avoir accès aux séquences des gènes d'ARNr 16S et 23S des Bacteria et d'Archaea mais également des gènes ribosomiaux eucaryotes. A l'heure actuelle, environ 5,6 millions de séquences d'ARNr 16S (taille minimale > 300 pb) sont référencées dans la base de données SSU (Small Subunit) de SILVA (version 128).

## **1.2. Les nappes phréatiques : un écosystème souterrain**

L'eau douce, indispensable à la vie sur Terre, représente seulement 3 % de l'eau sur Terre. Environ 69% de cette eau douce est sous forme solide (i.e. calottes glaciaires et glaciers) et n'est donc pas directement utilisable. Le restant, sous forme liquide (forme utilisable et vitale pour l'Homme), se trouve à 30 % dans les nappes phréatiques alors que moins de 1 % se trouve en surface (i.e. lacs, marais, fleuves...). La croissance des pays en voie de développement et le confort des pays développés créent une demande toujours plus forte en eau douce, à des fins domestiques, agricoles ou industrielles. Au-delà de l'utilisation directe de cette ressource, les nappes phréatiques sont de véritables écosystèmes fournissant des biens et des services nécessaires au bien-être de l'Homme (Griebler et Avramov, 2015 ; Boulton et al., 2008). Cependant, les pressions anthropiques sur cette ressource sont importantes et menacent directement cet écosystème ainsi que les biens et services qu'il peut apporter.

### **1.2.1. Généralités**

On appelle nappe phréatique les zones d'un sol où tous les pores sont saturés en eau. Les zones du sol où l'eau passe de façon transitoire (e.g. infiltration) sont appelées zone non saturée ou zone vadose. Cette zone fait l'interface entre l'atmosphère-pédosphère et la nappe phréatique. La zone de transition entre zone saturée et zone non saturée est appelée frange capillaire. Cette zone varie dans le temps du fait de la hauteur de la nappe phréatique qui

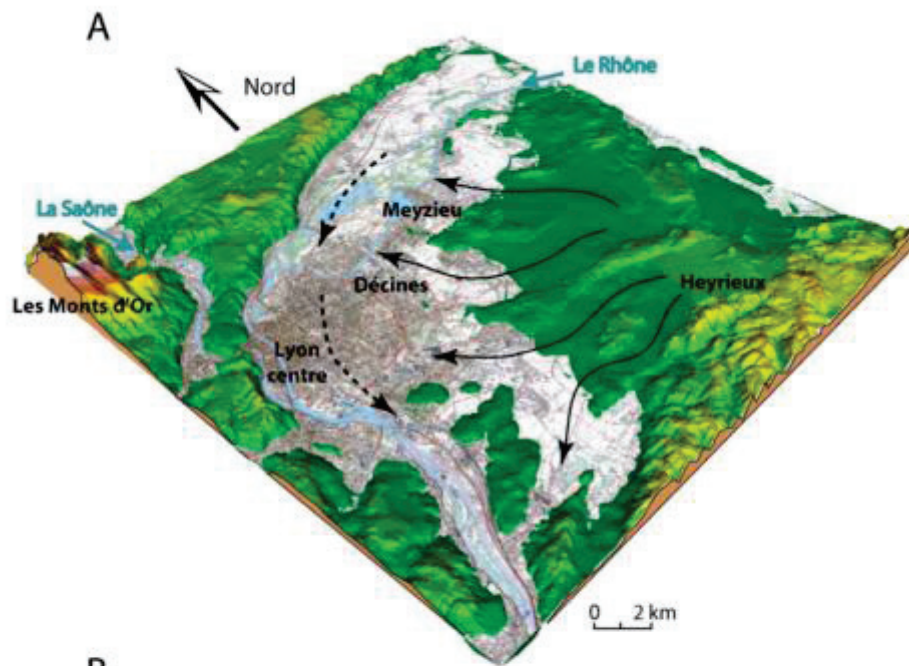


change au cours du temps notamment en fonction de la pluviométrie. Les nappes phréatiques sont des écosystèmes dont la taille et la complexité structurale varient. Ainsi, certains systèmes font quelques kilomètres comme les aquifères alluviaux accompagnants rivières ou fleuves, d'autres ont une échelle beaucoup plus importante et peuvent faire des centaines de kilomètres (e.g. aquifère guarani en Amérique du Sud : Kemper et al., 2003). De même, les eaux souterraines peuvent se retrouver à des profondeurs variables, allant de moins d'un mètre à plusieurs centaines de mètres. De nombreux environnements souterrains sont hydrologiquement connectés entre eux et peuvent être considérés comme un écosystème continu (Wall Freckman et al., 1997). Les nappes phréatiques constituent un compartiment important du cycle hydrologique. Les précipitations qui tombent au sol peuvent ruisseler et rejoindre les rivières, lacs et mers ou s'infiltrer et ainsi alimenter les aquifères. Il existe une circulation des eaux souterraines au sein des sols. Cette circulation peut être rapide dans le cas d'aquifères dans des formations karstiques (plusieurs dizaines de mètres par heure) ou très lentes (quelques mètres par an) dans des sols peu perméables. Ainsi, le temps de résidence des eaux dans ces milieux est également variable, allant de quelques jours à des milliers d'années. L'eau finit généralement par retrouver la surface, soit naturellement (sources) soit artificiellement (collecte par pompage). L'utilisation de l'eau pour la consommation humaine a d'ailleurs comme conséquence une accélération du cycle de l'eau avec des temps de résidence de l'eau dans les nappes qui sont raccourcis.

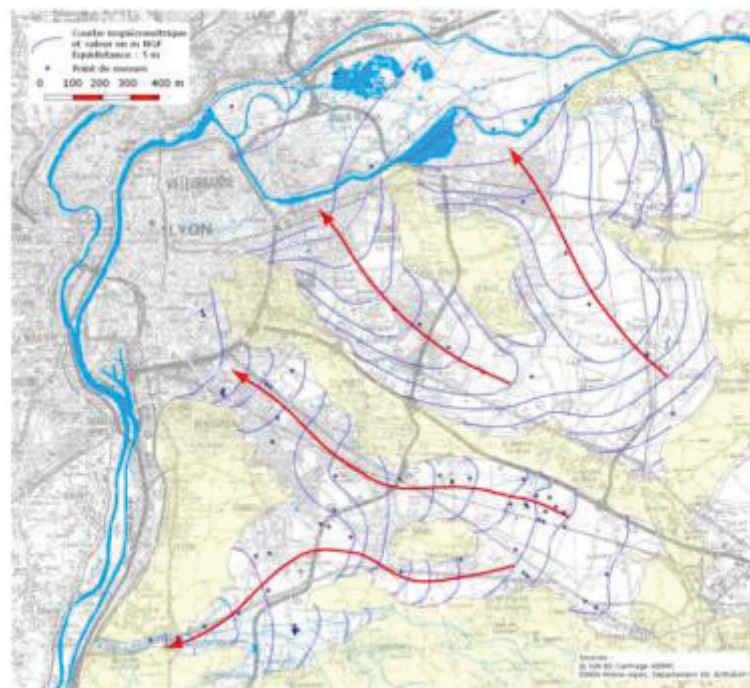
#### *Cas de la nappe de l'Est Lyonnais*

Les sites d'étude sélectionnés dans cette thèse se situent au sein du système aquifère « nappe de l'Est Lyonnais – nappe d'accompagnement du Rhône » de l'agglomération lyonnaise en France (Figure 1.2). La nappe de l'Est d'une surface de 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>). Les corridors contiennent des sédiments fluvioglaciaires très perméables ( $10^{-3}$ - $10^{-2}$  m.s<sup>-1</sup>) et sont drainés par les alluvions modernes du Rhône. L'épaisseur de la zone non saturée décroît d'Est en Ouest : elle atteint 40 mètres à l'amont des couloirs mais n'est plus que de 4 mètres à la périphérie de la ville de Lyon (Thèse Datry 2003).





B



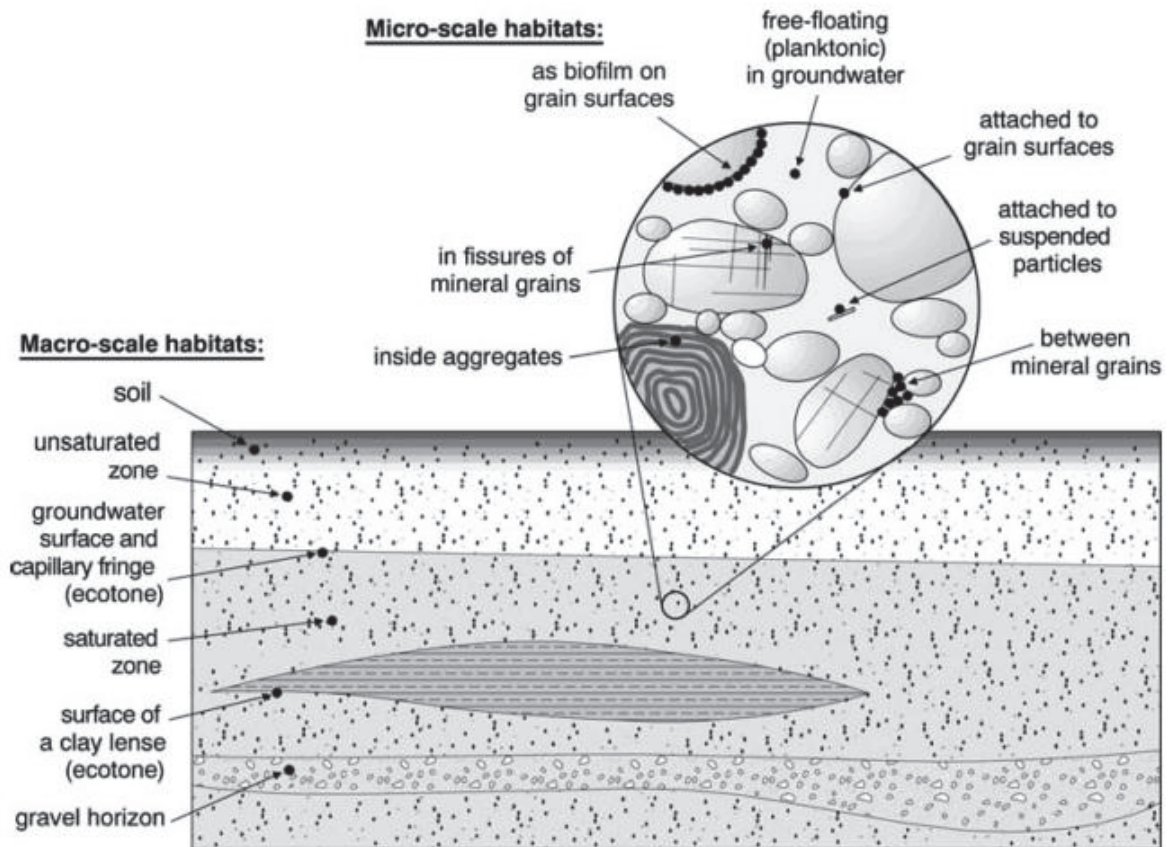
**Figure 1.2 :** A – Vue de l’agglomération lyonnaise (France) et direction générale des écoulements souterrains au sein de la nappe d’accompagnement du Rhône (traits pointillés) et de la nappe de l’Est (traits pleins). B – Carte piézométrique de la nappe de l’Est Lyonnais)  
(D’après Datry 2003 et Foulquier 2009)

### 1.2.2. Un milieu vivant

Le milieu aquatique souterrain, initialement considéré comme un milieu uniquement « minéral », constitue un milieu où la vie est présente. Parfois qualifié comme un environnement extrême dû à une absence de lumière, peu de nutriments disponibles (pas d'activité photosynthétique et donc absence de production primaire) mais aussi des concentrations en oxygène souvent basses, on retrouve néanmoins des invertébrés (stygofaune) et des micro-organismes (Danielopol et al., 2000). Tous types de micro-organismes sont retrouvés dans les nappes phréatiques : bactéries, archées, protozoaires, champignons. Etant donné la relative méconnaissance de la biologie des nappes phréatiques, mon travail de thèse s'est focalisé sur les bactéries qui sont plus largement étudiées dans les autres écosystèmes et représentent des briques essentielles dans les grands cycles biogéochimiques. Du fait de l'absence de photosynthèse, les bactéries vivant dans les nappes sont entièrement dépendantes des apports de matière et d'énergie provenant de la surface. Dans les nappes phréatiques naturelles, le carbone organique dissous (COD), facilement utilisable par les bactéries, représente souvent plus de 90% du carbone organique total (TOC) (Batiot et al., 2003). Néanmoins, les concentrations en COD dans les aquifères interstitiels sont faibles, le plus souvent inférieures à 5 mg/L (Rivett et al., 2007). Ainsi, les bactéries présentes dans les nappes phréatiques sont généralement adaptées aux conditions oligotrophes et ont des caractéristiques qui leur sont propres (Goldscheider et al. 2006, Griebler et Lueders 2009). Par exemple, la taille des cellules est généralement réduite en comparaison avec des milieux eutrophes, ce qui permet de maximiser le rapport surface/volume des cellules en améliorant ainsi les échanges avec le milieu (Wilson et al. 1983). Le nombre total de bactéries retrouvées dans les nappes phréatiques varie fortement. Des concentrations variant de  $10^2$  à  $10^6$  bactéries par  $\text{cm}^3$  dans les eaux, et de  $10^4$  à  $10^8$  bactéries par  $\text{cm}^3$  de sédiments peuvent être retrouvées (Griebler and Lueders, 2009).

Dans les milieux poreux saturés, différents paramètres physiques gouvernent le transport microbien : flux d'eau, la filtration, l'exclusion par la taille (Ginn et al., 2002). Ainsi, même si les sols jouent un rôle de filtre physique pour les bactéries, il n'est pas rare de trouver des bactéries allochtones dans des nappes phréatiques qui peuvent être éloignées des milieux de surface (plusieurs dizaines de mètres). Des indicateurs de contamination fécale mais aussi des formes pathogènes pour l'homme sont parfois retrouvés dans ces écosystèmes (Arnaud et al. 2015, Borchardt et al. 2007, Li et al. 2015). Néanmoins, des études montrent une décroissance des concentrations en bactéries avec la distance parcourue dans un milieu poreux (Masciopinto et al. 2008, Pang et al. 2004, Pang et al. 2005, Stevik et al. 2004), permettant

ainsi aux nappes phréatiques profondes d'être mieux isolées que les nappes phréatiques peu profondes face aux contaminations par des bactéries allochtones. Les bactéries susceptibles d'être transportées dans les milieux poreux sont considérées libres (ou planctoniques, mais pouvant former des agrégats de cellules sous la forme de grappes, chapelets, filaments ou amas constitués de bactéries et autres particules) dans l'eau. Il faut souligner que ces bactéries planctoniques sont minoritaires dans les nappes phréatiques (Figure). En effet, il est reconnu que les communautés microbiennes des eaux souterraines vivent principalement attachées aux surfaces, sur des particules, dans des fissures. Les écosystèmes aquatiques souterrains présentent une diversité d'habitats importante (figure 1.3). Dans tous les cas, le mode de vie sous forme de biofilm reste privilégié et confère aux bactéries un certain nombre d'avantages (e.g. protection contre les antibiotiques, contre la dessiccation...) par rapport au mode de vie planctonique. Les biofilms sont définis comme un assemblage de cellules microbiennes attachées à une surface et enveloppées dans une matrice extracellulaire (EPS) (Donlan 2002). Ces biofilms évoluent dans le temps et certaines de leurs composantes peuvent se détacher en fonction des pressions du milieu. Cette matrice correspond à 75-90% du biofilm alors que les cellules microbiennes représentent 10-25% (Garrett et al., 2008). Elle est composée principalement de polysaccharides. D'autres molécules peuvent être retrouvées (e.g. protéines, lipides, ADN...). La matrice extracellulaire permet ainsi une protection des cellules microbiennes contre certaines molécules comme les antibiotiques. Son taux d'hydratation permet également une plus forte résistance contre la dessiccation. Il a été montré que la matrice pouvait être un moyen de résistance aux variations environnementales, par exemple vis-à-vis des fluctuations des apports de matières organiques dissoutes (Freeman et Lock 1995).



**Figure 1.3 :** Illustration schématique des différents types d'habitats pour les micro-organismes à l'échelle microscopique et macroscopique

(D'après Goldscheider et al. 2006)

### Diversité des bactéries dans les nappes phréatiques

L'abondance des micro-organismes dans les environnements souterrains (nappes phréatiques incluses) n'est pas négligeable et il a été estimé que sa biomasse pouvait constituer jusqu'à 40 % de la biomasse microbienne globale, ce qui correspondrait à environ  $0,25-2,5 \cdot 10^{30}$  cellules (Whitman et al., 1998). Les résultats des différentes études de diversité montrent généralement que les taxons majoritaires dans les nappes phréatiques sont les *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* et les *Actinobacteria* (Griebler and Lueders 2009, Hemme et al., 2015). Cependant, avec l'avènement des techniques de séquençage de nouvelles générations, la présence de taxons plus rares, difficilement détectables voire indétectables auparavant a été mise en évidence. Des taxons comme les *Chloroflexi*, *Verrucomicrobia*, *Nitrospirae* voire des taxons complètement inconnus (e.g. TM7...) sont maintenant fréquemment observés (e.g. Hug et al., 2015 ; Ino et al., 2016 ; Sarkar et al., 2016). Cependant, l'ensemble des taxons détectés dans les nappes phréatiques sont retrouvés

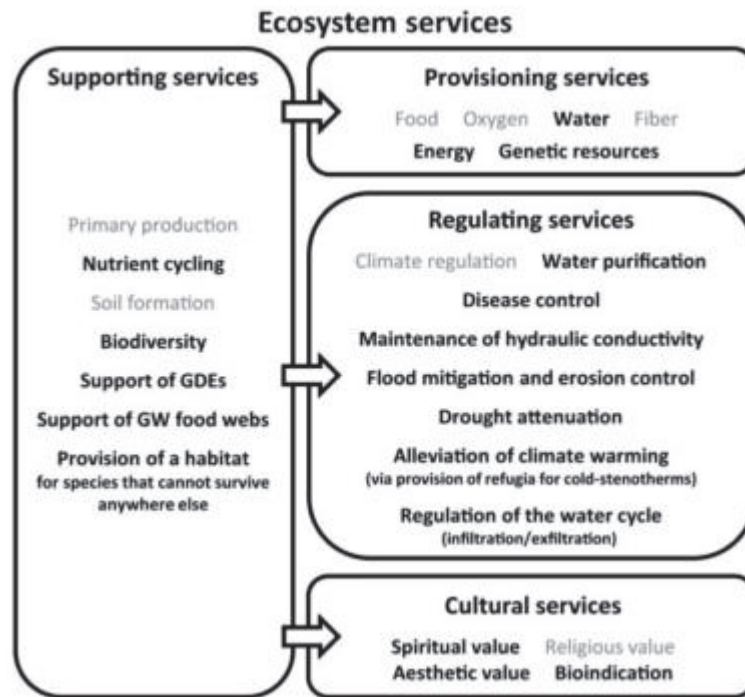
également dans d'autres environnements. Actuellement, aucun microbiote propre aux nappes phréatiques a pu être mis en évidence, comme il peut généralement être observé pour la faune souterraine (e.g. Marmonier et al. 1993 ; Danielopol et al. 2000). Ceci est en partie la résultante d'une faible résolution des classifications inférées par les méthodologies basées sur l'analyse de l'ARNr 16S. Ces classifications ne permettent pas, ou difficilement, l'étude de la répartition des espèces et elles se limitent classiquement aux analyses de phyla et genres bactériens. De plus, de nombreux OTU détectés par les séquençages massifs ne peuvent être classés au sein de genres connus.

### 1.2.3. Services écosystémiques joués par les nappes phréatiques

La biodiversité et le fonctionnement de l'écosystème ont une importance majeure dans la provision de biens et services écosystémiques que fournissent les environnements naturels (Kremen 2005). L'homme peut tirer des bénéfices directs de la biodiversité et du fonctionnement des écosystèmes, appelés *biens écologiques*. En effet, la biodiversité est source de nombreuses ressources (agro-alimentaires, matières premières, ressources énergétiques, etc...) et joue également un rôle majeur dans la productivité et la stabilité des écosystèmes et agrosystèmes. Des bénéfices indirects peuvent également être apportés par les processus fonctionnels des écosystèmes, ils sont alors appelés *services écologiques*. Ces services sont très variés et permettent par exemple d'avoir une eau douce de qualité (phénomènes de dépollution), interviennent dans les cycles biogéochimiques (e.g. carbone, azote), le contrôle de l'érosion, la fertilité des sols, la régulation du climat, la pollinisation ou encore dans la limitation de la propagation des maladies.

L'écosystème « nappe phréatique » ne déroge pas à cette règle et de nombreux services écosystémiques y sont associés (Boulton et al., 2008 ; Griebler et al., 2014 ; Griebler et Avramov, 2015). Le Millenium Ecosystem Assessement (2005) a réparti les services écosystémiques des nappes phréatiques dans 4 catégories : (1) des services de soutien, (2) des services d'approvisionnement, (3) des services de régulation et (4) des services culturels (Figure 1.4) dont quelques exemples vont être décrits ci-dessous.





**Figure 1.4 :** Exemples de biens et de services écosystémiques fournis par les nappes phréatiques et répartis dans les 4 catégories du Millenium Ecosystem Assesment (2005)  
(D'après Griebler et Avramov 2015)

### Services de soutien

La présence de la nappe phréatique en elle-même est un service de soutien. En effet, de nombreux écosystèmes terrestres et aquatiques de surface dépendent directement de la bonne qualité et de la quantité suffisante des nappes phréatiques. En effet, les nappes phréatiques doivent être considérées comme des écosystèmes ouverts connectés aux autres écosystèmes de surface. On parle alors d'écosystèmes dépendants des nappes phréatiques (Boulton, 2005 ; Humphreys, 2006 ; Murray et al., 2006). Par exemple, les rivières et ruisseaux par temps secs peuvent être exclusivement alimentés par des eaux de nappes phréatiques (Allan 1995). La biosphère et notamment les arbres peuvent être dépendants des nappes phréatiques, en puisant leur eau dedans. Il a même été montré que certaines espèces végétales peuvent développer des systèmes racinaires jusqu'à des nappes de 50-60 mètres de profondeur (Canadell et al., 1996).

### Services d'approvisionnement

La production naturelle et le stockage de l'eau potable sont les services d'approvisionnement principaux que les nappes phréatiques puissent fournir. En Europe, il a

été estimé qu'environ 75% de l'eau potable provient des nappes phréatiques. Près d'un tiers de la population à l'échelle mondiale se servirait des nappes phréatiques comme sources d'eau potable (Sampat, 2000). Couvertes par un sol et des couches de sédiments, les nappes phréatiques sont souvent mieux protégées que les eaux de surface des impacts anthropiques. Une eau potable stagnante dans des réseaux de distribution ou gardée à l'air libre se dégrade en quelques heures (Lautenschlager et al., 2010) alors que, dans un aquifère sain, la qualité de l'eau peut être gardée voire améliorée pendant des siècles. Cela permet dans certaines villes comme Vienne ou Munich d'avoir une eau potable prélevée et distribuée sans traitement préalable (Griebler et Avramov, 2015).

#### Services de régulation

L'écosystème nappe phréatique permet une transformation et une dégradation biologique des contaminants (Tufenkji et al., 2002). Cela est indispensable pour purifier l'eau et maintenir une qualité satisfaisante. Les nappes phréatiques ont un immense potentiel pour atténuer naturellement, dégrader en aérobie ou anaérobie une diversité importante de polluants provenant de la surface (Diaz et al., 2013 ; Jeon and Madsen, 2013 ; Gieg et al., 2014). De plus, les micro-organismes autochtones ont souvent la capacité de développer de nouvelles voies de dégradation et ainsi de pouvoir dégrader de nouvelles molécules émergentes (Van der Meer 2006 ; Kolvenbach et al., 2014). Dans la plupart des cas, les processus permettant une atténuation naturelle sont suffisants pour éviter la dispersion sur de longues distances d'une pollution. Parfois, l'atténuation naturelle est augmentée par action de l'homme (bioremédiation) dans certains sites contaminés (Herman et al. 2001).

#### Services culturels

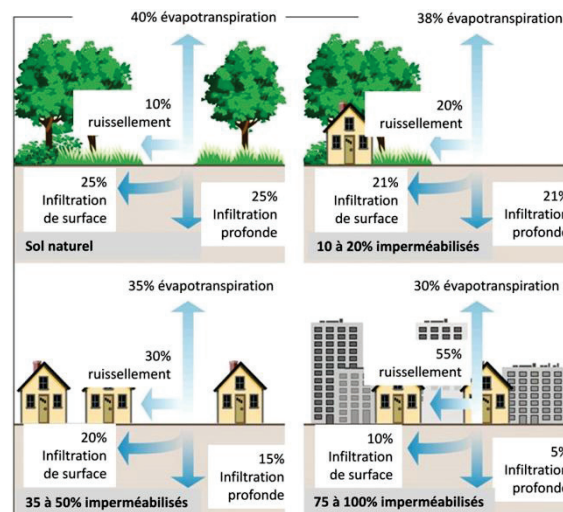
Enfin, les aquifères peuvent également fournir des services culturels. En effet, les grottes en milieux karstiques sont souvent l'objet d'attractions touristiques. Des sources d'eau chaude provenant du sous-sol peuvent également être utilisées de façon récréative.

### **1.3. Gestion des eaux pluviales et impacts sur les nappes phréatiques**

#### 1.3.1. Urbanisation et gestion des eaux pluviales

A l'heure où plus de 50 % de la population mondiale vit dans les villes (75 % dans les pays développés), l'urbanisation ne cesse de s'accélérer. L'une des conséquences les plus visibles de l'urbanisation sur le cycle de l'eau est l'imperméabilisation des sols. Ce

phénomène entraîne principalement deux conséquences en terme d'hydrologie : (1) une augmentation des volumes d'eau de ruissellement qui est généralement mise en avant pour expliquer les inondations urbaines et (2) un déficit dans la réalimentation des nappes souterraines dû à une infiltration de l'eau réduite. Ce dernier phénomène est accentué en cas de pompages dans la même nappe pour l'alimentation en eaux potables de la ville. En effet, sur un sol naturel, il est estimé que les eaux pluviales s'infiltrent à 50% et que seulement 10% ruissellent. Le reste (i.e., 40%) est évapotranspiré. Plus le sol est imperméabilisé, plus le ruissellement augmente et l'infiltration diminue. Pour un sol urbain fortement imperméabilisé, il est estimé que le ruissellement peut atteindre environ 55% alors que l'infiltration diminue jusqu'à 15%. La part d'évapotranspiration diminue également jusqu'à 30%, notamment dû au fait que les villes soient peu végétalisées (Figure 1.5).



**Figure 1.5 :** Relations entre l'imperméabilisation des sols et les différents modes d'évacuation des eaux pluviales

(D'après le site : <http://www.graie.org/eaumelimelo/>)

Depuis 150 ans, le système traditionnel de gestion des eaux pluviales consiste à les évacuer le plus rapidement possible de la ville en utilisant un système de canalisation souterrain. Il existe deux grands types de systèmes d'assainissement :

Les systèmes unitaires : Les eaux pluviales (celles issues du ruissellement de l'eau de pluie sur les surfaces urbaines) sont mélangées aux eaux usées (celles qui ont été utilisées) au sein des mêmes canalisations. Les eaux sont alors directement amenées vers une station d'épuration dont le but est de réduire la concentration de matière organique avant un retour dans le milieu naturel. Les débits d'eaux usées sont assez constants et prévisibles



contrairement aux eaux pluviales. En cas de fortes pluies, la capacité des stations d'épuration peut être insuffisante pour traiter les volumes d'eau engendrés et ne sont pas non plus capables de traiter les divers polluants présents dans les eaux de ruissellement (cf. partie 3.2). Ce mélange d'eaux pluviales et d'eaux usées est alors directement rejeté dans le milieu naturel sans traitement préalable par des ouvrages appelés « déversoirs d'orage ».

Les systèmes séparatifs : Dans ce cas, il existe deux réseaux distincts : un pour les eaux usées qui les achemine vers les stations d'épuration dans un réseau adapté et un autre pour les eaux pluviales. Ces dernières sont alors rejetées le plus directement possible vers le milieu naturel, souvent sans traitement préalable. L'exutoire final du réseau d'eau pluviale peut être dans certains cas les bassins de rétention/infiltration.

### 1.3.2. Contaminations des eaux pluviales

#### *Types de contaminants*

Les polluants qui sont retrouvés dans les eaux pluviales sont principalement des micro-polluants. Ces micro-polluants peuvent être minéraux ou organiques. Pour les premiers, cela concerne principalement les éléments métalliques, comme le plomb, le zinc, le cuivre, le cadmium, etc. Leurs origines sont diverses : industrielles, corrosions des métaux (e.g. toitures, gouttières), trafic routier, etc... Les micro-polluants dits organiques vont regrouper tous les hydrocarbures, PCB ou encore pesticides par exemple. Les concentrations d'hydrocarbures dans les eaux pluviales sont de l'ordre de plusieurs mg/L (Chocat, 1997). Les hydrocarbures trouvés dans l'environnement ont une origine naturelle (synthèse biologique, volcanisme, feux de forêts...) ou anthropique. Cette dernière origine est beaucoup plus importante en milieu urbain et correspond à l'utilisation des produits pétroliers par l'homme (apports chroniques ou accidentels) mais aussi à la combustion de carburants automobiles (gaz d'échappements). Certains hydrocarbures comme les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) ont des propriétés toxiques, mutagènes et cancérigènes. C'est le cas, par exemple, du naphthalène, du phénanthrène ou du benzo(a)pyrène. Sur la base de leur abondance et de leur toxicité, l'US Environmental Protection Agency (EPA) a inclus 16 HAPs sur leur liste de polluants prioritaires pour le risque qu'elles représentent (Samanta et al., 2002). De nombreux HAP sont retrouvés dans les eaux pluviales. En plus de ces contaminants qui peuvent avoir des effets néfastes pour la santé humaine, il ne faut pas oublier les autres types de contaminations même si celles-ci n'ont pas d'effet sur la santé. On retrouve par exemple des nutriments organiques dans les eaux pluviales. Ils peuvent être sous forme particulaires ou dissous. Ces matières organiques peuvent être oxydées par des micro-

organismes lors de la respiration cellulaire. Cela entraîne généralement une consommation d'oxygène qui est souvent mesurée pour estimer indirectement la quantité de matière organique dans les eaux usées ou pluviales (i.e. mesure de demande biochimique en oxygène (DBO)). Des mesures directes de cette matière organique dissoute peuvent également être réalisées par des dosages de carbone organique dissous (COD). Les nutriments inorganiques sont quant à eux des molécules comme les nitrates ( $\text{NO}_3^-$ ), les phosphates ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), l'ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ), etc... Ces molécules sont issues principalement de l'agriculture, des rejets industriels et domestiques via l'utilisation de détergents, lessives par exemple. En plus des contaminations chimiques on retrouve, dans les eaux de ruissellement, des contaminants d'origine biologique. De nombreuses bactéries sont retrouvées et notamment des indicateurs de contamination fécales (e.g. *E. coli*, coliformes ou entérocoques), bactéries pathogènes ou encore virus (e.g. Makepeace et al., 1995 ; Parker et al., 2010 ; Hathaway et al., 2011 ; Sauer et al., 2011 ; Sidhu et al., 2013)

#### Sources de contaminants

Une partie de la pollution des eaux de ruissellement provient de la pluie en elle-même. En effet, l'atmosphère contient des particules d'origines naturelles (érosions des surfaces, incendies de forêts, volcans) et d'origine anthropique. L'eau qui traverse cette atmosphère se charge des contaminants présents. Cette part est non négligeable puisque estimée entre 15% et 25% (Chocat 1997). Le reste de la pollution des eaux de ruissellement provient donc du lessivage du sol où les polluants se sont accumulés durant les périodes de temps sec. Chocat (1997) identifie six sources principales de pollutions des eaux pluviales liées aux activités urbaines :

Transport routier : Les véhicules motorisés sont une source directe avec des pollutions de type hydrocarbures, oxydes d'azote et de soufre mais aussi métaux lourds provenant de l'usure des pneus (Zn, Cd, Cu), des garnitures de freins (Cu, Zn, Pb), de la carrosserie et autres pièces métalliques (Pb, Cd), des pots catalytiques (Pt, Pd). Il y a également une source indirecte de pollution via l'usure des infrastructures routières (goudrons, marquages au sol...) mais aussi lors des périodes hivernales avec les sels de déneigement par exemple ( $\text{NaCl}$ ,  $\text{MgCl}_2$  ;  $\text{CaCl}_2$ ).

L'industrie : La pollution industrielle dépend des types d'installations et de leur situation par rapport à la ville. Des pollutions de métaux lourds (Pb, Zn, Cd), de résidus pétroliers ou encore de micropolluants organiques (e.g. solvants) sont généralement citées.

Les animaux : Les déjections d'animaux, domestiques ou non, sont une source importante de matière organique et de contamination bactérienne et virale. Les animaux domestiques, de

rente et d'élevage peuvent également être à l'origine d'une occurrence de médicaments dans l'environnement.

Les déchets solides : De nombreux déchets solides sont produits par les villes, aussi bien de nature organique, mais aussi des plastiques, métaux, etc... La contamination des eaux de ruissellement par ces déchets se fait généralement de manière directe dans les bouches d'égout ou sur les surfaces urbaines. Les sources sont nombreuses : rejets volontaires, poubelles non étanches, nettoyage des places de marchés, etc...

Les chantiers et l'érosion des sols : Par temps secs, l'érosion du sol par l'action du vent ou de la circulation des véhicules constitue une source importante de matière en suspension (MES). Cette pollution généralement minérale et inerte peut néanmoins être vectrice de contaminants comme des hydrocarbures ou des micro-organismes par exemple. Ces phénomènes d'érosion sont fortement augmentés lors de chantiers.

La végétation : C'est une source importante de matière carbonée plus ou moins biodégradable. C'est également une source indirecte d'azote et de phosphate (engrais) et de produits organochlorés (pesticides, herbicides).

### 1.3.3. Bassins d'infiltration

De nombreux bassins d'infiltration ont été créés dans le cadre de la gestion des eaux pluviales. Ces bassins représentent l'exutoire final de réseaux séparatifs. Ils ont, en effet, une grande capacité de stockage des eaux pluviales, avant que celle-ci s'infilte jusqu'à la nappe. Ces systèmes permettent donc de répondre à diverses problématiques liées à l'impact de l'urbanisation sur le cycle de l'eau : (1) collecter les eaux de ruissellement suite à des événements pluvieux, (2) permettre une recharge artificielle des nappes phréatiques (souvent limitée dû à l'imperméabilisation du sol dans les milieux urbains), (3) réduire l'incidence de la pollution urbaine sur les milieux aquatiques. Cette dernière fonction est plus récente mais constitue un enjeu important en termes de protection de l'environnement.

A l'amont des ouvrages d'infiltration peuvent parfois se trouver des ouvrages de prétraitement. Dans de nombreux cas, il s'agit de bassins de rétention permettant principalement de décanter les matières en suspension et de réduire ainsi leur apport au bassin d'infiltration. Ce phénomène permet de réduire les problèmes de colmatage du lit d'infiltration mais aussi de limiter le transfert des polluants, car de nombreux contaminants sont adsorbés aux MES. Il permet également d'augmenter le volume de stockage des eaux pluviales. D'autres techniques de prétraitement peuvent exister, comme des dégrilleurs (piégeage des déchets de taille importante comme les plastiques, bouteilles, bois, etc...), des

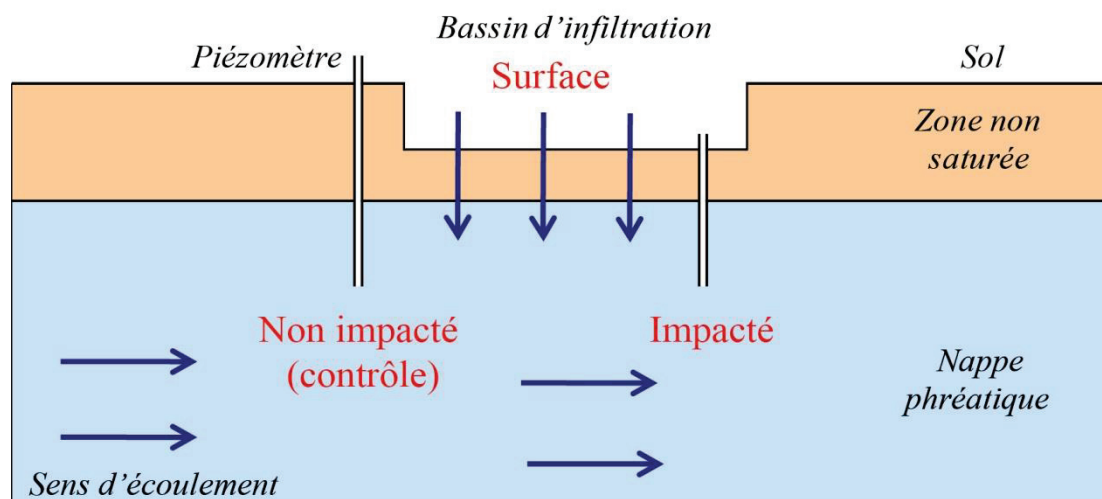
dessableurs (retenir les particules d'une taille supérieure à 200  $\mu\text{m}$ ) ou encore des séparateurs à hydrocarbures (séparer les hydrocarbures et autres graisses flottantes des eaux de ruissellement).

Le fonctionnement des bassins d'infiltration va dépendre du sol sous-jacent et de la position de la nappe. En effet, les bassins d'infiltration sont creusés directement dans le sol en place, et il est nécessaire que ce dernier présente une bonne conductivité hydraulique. Sur certains sites, le sol est laissé naturel. Sur d'autres, il est végétalisé ou encore recouvert d'une couche de matériaux drainant (sable, gravier ou galets).

#### *Bassins d'infiltration utilisés dans cette thèse*

Six bassins d'infiltration ont été choisis dans le cadre de cette thèse. Trois sites sont dits profonds, c'est-à-dire que l'épaisseur de la zone non saturée est supérieure à 10 mètres. Il s'agit des sites de : Django Reinhardt, Chemin de Feyzin et Chemin de Raquin. Les trois autres sont dits peu profonds car l'épaisseur de la zone non saturée est inférieure à 3 mètres. Il s'agit des bassins appelés : Minerve, Grange Blanche et IUT. Les six bassins sont situés dans le grand Lyon, la majorité sur la nappe de l'Est Lyonnais et un sur la nappe d'accompagnement du Rhône (i.e. bassin de l'IUT). Des photos aériennes indiquant leur localisation et l'emplacement des piézomètres sont présentées en Annexe 1.

Sur chaque site est présent un piézomètre dit « non impacté », qui est en dehors du panache d'infiltration des eaux pluviales. De ce fait, il est considéré comme témoin. Un autre piézomètre se situe en aval du bassin et donc dans le panache d'infiltration des eaux pluviales. On parle donc de piézomètre « impacté ». Ce piézomètre nous permet donc d'observer les impacts de l'infiltration des eaux pluviales sur les communautés microbiennes. Lorsque l'on parle de surface, il s'agit des eaux en surface des bassins d'infiltration, issues du ruissellement des eaux pluviales. Ces eaux sont prélevées en entrée du bassin d'infiltration (Figure 1.6).



**Figure 1.6 :** Illustration des différents points de prélèvement (i.e. surface, nappe non-impactée et nappe impactée) utilisés dans le design expérimental de la thèse

#### 1.3.4. Recharges artificielles et conséquences sur la nappe

Les diverses techniques d'infiltration des eaux de surface (et en particulier des eaux de ruissellement via l'intermédiaire des bassins d'infiltration) sont regroupées sous le nom de recharge artificielle des aquifères. Toutes ces techniques ont en commun d'augmenter considérablement la connectivité hydrologique entre la surface et les aquifères. La connectivité hydrologique étant définie comme le transfert par l'eau de la matière, de l'énergie et/ou des organismes entre les différents compartiments du cycle hydrologique (Pringle 2001). Les conséquences de l'augmentation de la connectivité hydrologique sont déjà bien documentées dans la littérature concernant la physico-chimie.

##### Carbone organique dissous

Les flux de matières organiques sont augmentés dans le cadre de la recharge artificielle des aquifères par des eaux de ruissellement. En effet, ces dernières sont fortement chargées en molécules organiques (voir partie correspondante). Les composés organiques comme les hydrocarbures (dont les HAP) et les PCB sont très rarement présents dans les nappes impactées par la recharge artificielle. Ces molécules sont généralement piégées et/ou dégradées dans les premiers centimètres du lit d'infiltration. Cependant, lorsque l'on s'intéresse à la fraction dissoute du carbone organique (COD), les études montrent une augmentation significative dans les nappes phréatiques impactées par la recharge artificielle en eaux pluviales (Datry et al., 2004 ; Mermillod-Blondin et al., 2013 ; Mermillod-Blondin et al. 2015). En effet, une augmentation de la concentration en COD et notamment du COD

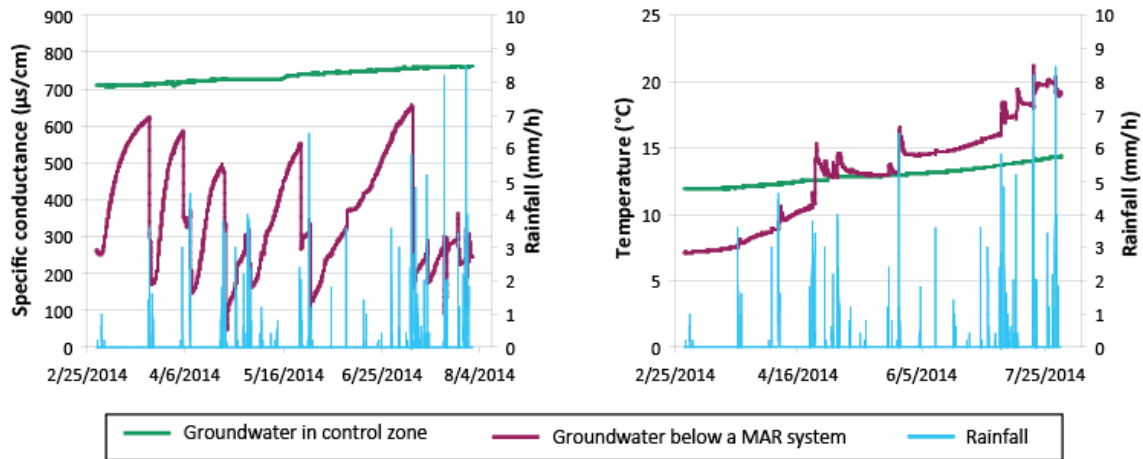
biodégradable (facilement assimilable par les micro-organismes) dans les nappes pourrait conduire à des modifications majeures au sein des communautés microbiennes.

#### Oxygène dissous

Une des conséquences de la charge importante en matières organiques des eaux pluviales et des sédiments de surface de bassin d'infiltration va être la désoxygénation des eaux d'infiltration. Cela entraîne des concentrations en oxygène dissous dans les nappes impactées significativement inférieures des concentrations habituelles des nappes témoins ce qui peut avoir des conséquences sur les communautés microbiennes. L'oxygène dissous dans les eaux de ruissellement est consommé par respiration microbienne suite aux concentrations élevées en COD biodégradable (Pabich et al., 2001 ; MacMahon et Chapelle 2008). Cette consommation continue également lors du transfert de l'eau dans les premiers centimètres du lit d'infiltration (Nogaro et al., 2007).

#### Variabilité thermique

Les eaux souterraines présentent généralement une grande stabilité thermique car les fortes variations de températures en surface, à l'échelle journalière ou saisonnière, sont rapidement amorties dans les premiers mètres du sol. Les transferts de chaleur dans les sols se font généralement par conduction. Lors de l'infiltration d'eaux pluviales, les transferts de chaleur par advection sont intensifiés ce qui crée de fortes variations thermiques. La figure 1.7 montre à la fois des variations périodiques suite aux événements pluvieux entraînant une augmentation transitoire de la température des nappes impactées, mais aussi des variations saisonnières beaucoup plus marquées que dans les nappes témoins. Ces résultats ont été largement démontrés par Datry et al. (2005) et Foulquier et al. (2009). L'ampleur de ces changements est de nature à modifier la diversité biologique, le fonctionnement biogéochimique et la qualité des eaux des aquifères.



**Figure 1.7 :** Illustration des variations chimiques et thermiques engendrées par les pratiques de recharges des nappes phréatiques

### Communautés microbiennes

Des travaux sur l'impact des techniques d'infiltration d'eaux de surface sur les communautés microbiennes ont été réalisés précédemment (Thèse Arnaud Foulquier, 2009). Les résultats suggéraient une stimulation du compartiment microbien dans les nappes impactées qui ne semblait pas être associée à de forts changements dans la structure génétique des communautés microbiennes. Néanmoins ces travaux se sont basés sur une étude d'empreinte moléculaire (i.e. DGGE = denaturing gradient gel electrophoresis) dont la résolution est grossière. De plus, ces études étaient réalisées sur les sédiments des nappes phréatiques. Donc la composition des communautés était influencée par l'histoire des sédiments, limitant du même coup l'impact de changements de conditions physico-chimiques transitoires. De plus, cette étude a été réalisée sur des bassins d'infiltration dont la zone non saturée était de faible épaisseur (< 3m). Aucune étude n'a pour le moment effectuée la comparaison avec des sites dont la zone non saturée est beaucoup plus épaisse et peut constituer un filtre physique, chimique et biologique plus efficace (Datry et al. 2005).

# 2

TRANSFERT DE L'OXYGENE DISSOUS, DE NUTRIMENTS  
ORGANIQUES ET INORGANIQUES ET DE BACTERIES DANS  
LES NAPPES PHREATIQUES EN FONCTION DE LA HAUTEUR  
DE LA ZONE NON SATUREE



Ce chapitre propose d'étudier les transferts de la surface à la nappe phréatique de la matière organique (carbone organique dissous), des principaux nutriments inorganiques (phosphates, nitrates, ammonium), de l'oxygène dissous ainsi que des bactéries dans le cadre des systèmes de recharge artificielle des aquifères et en fonction de la hauteur de la zone non saturée (ZNS).

Les systèmes de recharge artificielle des aquifères se développent largement dans les villes depuis plusieurs décennies. Dans la communauté urbaine de Lyon, il existe plusieurs bassins de rétention et d'infiltration ayant pour but de collecter les eaux de ruissellement pluvial et de les infiltrer vers les nappes phréatiques. La recharge en eaux pluviales dans la communauté urbaine de Lyon représente au moins 10% du flux annuel de la nappe phréatique estimé à 69,1 millions de m<sup>3</sup> (Foulquier et al. 2009), montrant ainsi l'impact potentiel de ces pratiques sur les aquifères. Cette connectivité hydrologique importante impacte les nappes phréatiques au niveau physico-chimiques. Par exemple, il est généralement observé une hausse des concentrations en carbone organique dissous (Datry et al., 2005 ; Foulquier et al., 2011 ; Mermillod-Blondin et al., 2013) ou encore une désoxygénation des eaux (Nogaro et al., 2007 ; Foulquier et al., 2010). Néanmoins, nous ne connaissons pas encore l'influence de l'épaisseur de la ZNS sur le transfert de ces molécules et l'impact qui en résulte au niveau de la nappe phréatique. Suite aux premiers travaux sur les communautés microbiennes par des méthodes d'empreinte moléculaire (Thèse Foulquier 2009), ce chapitre présente une étude des communautés bactériennes plus approfondie grâce à une approche de séquençage de nouvelle génération (NGS) basée sur le gène codant l'ARNr 16S. L'étude des structures génétiques inférées par ce marqueur permet ainsi d'évaluer l'importance des transferts de bactéries entre la surface et la nappe phréatique en fonction de la hauteur de la ZNS et de surcroît l'importance du phénomène de dispersion dans l'assemblage des communautés bactériennes des nappes phréatiques impactées par l'infiltration des eaux pluviales.

Le protocole expérimental est basé sur l'analyse des eaux de systèmes d'infiltration permettant de comparer les communautés bactériennes impactées ou non par l'infiltration sur chaque site (grâce à la présence de piézomètres témoins et impactés) mais aussi de mesurer les pourcentages de similarité entre les communautés retrouvées dans la nappe et celles présentes dans les eaux de surface. Le choix de six sites présentant des épaisseurs de ZNS contrastées a aussi pour objectif d'évaluer la capacité de ce filtre physique, chimique et biologique à limiter la contamination de la nappe. Ainsi, ce travail a permis de répondre à deux questions principales :

1- Est-ce que la structure des communautés de la nappe est affectée par le transfert de micro-organismes provenant des eaux pluviales lors d'épisodes pluvieux ?

2- Est-ce que l'efficacité de la zone non saturée à limiter le transfert de nutriments et de micro-organismes de la surface vers la nappe est dépendante de son épaisseur ?

Les résultats de cette étude sont présentés sous la forme d'un article scientifique intitulé « Urban stormwater runoff infiltration systems : influence of vadose zone thickness on nutrient and bacterial transfers to groundwater » en préparation pour soumission dans la revue « Science of the Total Environment ».

## Article 1

# **URBAN STORMWATER RUNOFF INFILTRATION SYSTEMS: INFLUENCE OF VADOSE ZONE THICKNESS ON NUTRIENT AND BACTERIAL TRANSFERS TO GROUNDWATERS**

**Jérémy VOISIN<sup>1,2</sup>, Benoit COURNOYER<sup>2</sup>, Antonin VIENNEY<sup>1</sup>, Florian MERMILLOD-BLONDIN<sup>1</sup>**

- 1- Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, ENTPE, UMR5023, Écologie des Hydrosystèmes Naturels et Anthropisés, Villeurbanne, F-69622, France
- 2- Université Lyon 1, VetAgro Sup, UMR CNRS 5557, & UMR INRA 1418, Ecologie Microbienne, Research Team "Bacterial Opportunistic Pathogens and Environment", Marcy L'Etoile, F-69280, France

*En préparation pour soumission dans  
Science of the Total Environment*

## ABSTRACT

Managed aquifer recharge (MAR) systems have been developed to reduce the environmental impacts of urban waters. They allow infiltration of large volumes of stormwater runoff but their retention capacity of urban contaminants largely depends on the soil and vadose zone properties. The present study aimed at evaluating the influence of a vadose zone thickness (VZT) on the transfer of common inorganic nutrients, dissolved organic matter and bacteria. A field experiment was conducted on three MAR sites with a thin vadose zone (< 3 meters) and three MAR sites with a thick vadose zone (> 10 meters) of the Lyon conurbation (France). For each MAR site, waters of three compartments were sampled: surface of the infiltration basin, groundwater impacted by recharge and groundwater not influenced by recharge. Samples were collected at three time periods over 10 days. These periods were characterized by successive rainfall events. Concentrations of inorganic nutrients ( $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ ), organic matter (dissolved organic carbon: DOC, biodegradable dissolved organic carbon: BDOC), and dissolved oxygen (DO) were measured on all water samples. Bacterial diversity was investigated through a next-generation sequencing (NGS) scheme of 16S rRNA gene segments (V5-V6). Chemical analyses showed a significant impact of VZT on the concentration of DO and phosphates in MAR-impacted groundwaters. Stormwaters percolating into groundwaters through infiltration were depleted of DO and enriched in  $\text{PO}_4^{3-}$  in MAR systems with a thin vadose zone whereas the opposite was observed in MAR systems with a thick vadose zone. Thick vadose zones allowed re-oxygenation of infiltration waters during their transfer. A major part of organic matter (DOC and BDOC) was retained or consumed in the vadose zone, regardless of its thickness. Bacterial transfers along the profiles were overall low and comparatively complex relative to chemicals. Data collected on day 10 of the experiment indicated a high bacterial transfer in MAR systems with a thin vadose zone. Water transit time (dependent upon soil properties) and water saturation of the vadose zone were found important parameters that could prevent or increase these bacterial transfers. Most bacterial taxa (> 60%) from groundwaters impacted by recharge were not detected in stormwater runoff and in non-impacted groundwaters, indicating that V5-V6 genetic structures of groundwaters were significantly modified by MAR systems. These impacts are likely related to environmental selection of bacteria associated with changes in groundwater physico-chemistry below MAR systems and/or dispersion and remobilization of bacterial cells from the soil and vadose zone during stormwater runoff infiltration.

## **KEYWORDS**

Bacterial communities; Dissolved organic carbon; Dissolved oxygen; MAR systems; Next-Generation Sequencing; 16S rRNA.

## 1. INTRODUCTION

Managed aquifer recharge (MAR) practices are largely developed in urban areas to prevent flooding and compensate reduced groundwater recharge due to road surface coverings. These practices involve collecting stormwater runoff and infiltrating them through porous media in order to recharge aquifers (Marsalek and Chocat, 2002; Hunt et al., 2010). Nevertheless, stormwater runoff can be contaminated by chemicals such as fuel-derivatives (PAH, long-chain hydrocarbons), heavy metals and nutrients but also exogenous microbial cells including pathogens and fecal bacteria (Pitt et al., 1999). Consequently, a MAR system designed for a fast infiltration of stormwater runoff (Grebel et al., 2013) could increase risks of chemical and microbial contamination of aquifers. Previous studies have shown that vadose zone can act as efficient filters toward common hydrophobic pollutants like hydrocarbons and heavy metals which become fixed on soil and sediment components (e.g., Datry et al., 2004; Tedoldi et al., 2016; Winiarski et al., 2006). However, the efficacy of these porous media at protecting groundwater against hydrophilic pollutants or trapping microorganisms remains unclear.

The vadose zone was shown to be an efficient filter for dissolved organic carbon (DOC) because of soil biological processes occurring during vertical transfer. Indeed, Mermillod-Blondin et al. (2015) showed that more than 75% of biodegradable DOC could be retained in the vadose zone of three MAR systems. Nevertheless, DOC retention efficiency depended upon the vadose zone thickness (VZT); its retention increasing with VZT and the transit time of water from surface to groundwater table (Datry et al. 2005; Foulquier et al. 2010; McMahan and Chapelle, 2008; Pabich et al., 2001). The biological consumption of DOC by aerobic microorganisms in soils can lead to a depletion of dissolved oxygen (DO) concentrations. The decreased DO concentrations in soils and vadose zones can be compensated by a re-oxygenation of water during its transfer in the vadose zone (Foulquier et al., 2010; McMahan and Chapelle, 2008). Consequently, a thick vadose zone may prevent DO decreases in groundwater which are often associated with releases of reduced compounds (e.g., phosphate:  $\text{PO}_4^{3-}$ ) and anaerobic processes such as denitrification or sulphate reduction (Foulquier et al., 2010; Gomez et al., 2002; Le Gall et al., 1996).

Few studies evaluated the influence of MAR systems on the transfer of bacteria from the surface to groundwater. Subsurface media (soil, natural sediment) act as natural filters for microorganisms through several processes like straining and physical filtration or bacterial

adsorption and adhesion to solid media (Murphy and Ginn, 2000). Although legislation assume that these processes are sufficient enough to retain bacteria in the first meters of the vadose zone, the presence of allochthonous microorganisms (e.g., fecal indicator microorganisms, bacterial pathogens or viruses, bacteria from domestic and industrial wastes) have been reported in aquifers protected by a vadose zone thicker than 10 meters (Arnaud et al., 2015; Borchardt et al., 2007; Li et al., 2015). These observations suggest that transfer from surface to groundwater can occur and depends on the main characteristics (porosity, occurrence of preferential flows, thickness) of the infiltration media. The transport of bacteria has been largely studied in laboratory experiments under saturated conditions (Ginn et al., 2002; Pang, 2009). General observation of these studies was that bacterial concentrations decayed with travel distance within the porous medium (Masciopinto et al., 2008; Pang et al., 2004, 2005; Stevik et al., 2004), suggesting that bacterial retention in infiltration systems would be positively correlated with VZT. Nevertheless, this prediction remains untested in MAR systems characterized by contrasting VZT and infiltration media.

The aim of the present study was to evaluate nutrient and bacterial transfers in 6 MAR systems in relationship to their VZTs. More specifically, our objectives were: (1) to validate the influence of VZT on the retention of nutrients and chemical compounds (i.e. increased VZT could increase nutrient retention/consumption), and (2) to determine whether VZT had a positive influence on the retention of bacteria during infiltration. A field experiment was conducted during a rainfall period on six MAR sites (i.e., three sites with a VZT lower than 3 meters whereas the other three sites had a VZT higher than 10 meters). Groundwaters below MAR systems and outside the influence of the MAR systems were sampled at three dates over 10 days, and compared with the content of the stormwater runoff waters (at the surface of the MAR systems). Inorganic nutrients ( $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ ), organic matter (DOC, biodegradable dissolved organic carbon: BDOC), dissolved oxygen and bacterial diversity were monitored on all water samples. Bacterial diversity was analysed through next-generation sequencing (NGS) of genes encoding 16S rRNA gene (*rrs*) following PCR amplification from sample DNA extracts, and allocated to bacterial taxa down to the genus level.

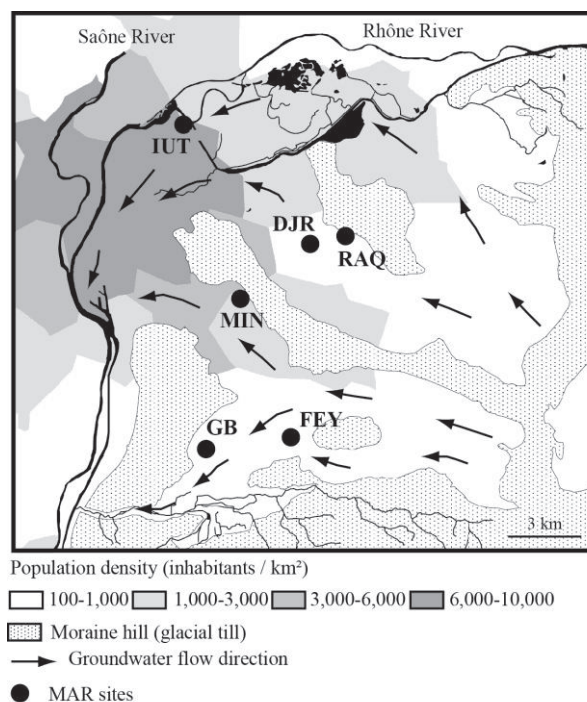
## **2. MATERIALS AND METHODS**

### 2.1. Experimental sites

Managed aquifer recharge (MAR) sites were located on the eastern main aquifer of the



Lyon metropolitan area, France (Fig. 1). The aquifer (catchment area: 314 km<sup>2</sup>) consisted of three corridors of highly permeable glaciofluvial sediments (hydraulic conductivity 10<sup>-3</sup>-10<sup>-2</sup> m/s) separated by moraine hills which are poorly permeable (hydraulic conductivity 10<sup>-5</sup>-10<sup>-8</sup> m/s) (Foulquier et al. 2009). The aquifer is artificially recharged with stormwater runoff at multiple sites to compensate for reduced natural recharge caused by the sealing of urban surfaces. Managed infiltration of groundwater represents at least 10% of the annual flux of groundwater which was estimated at 69.1 million m<sup>3</sup> (Foulquier et al. 2009). The MAR sites consisted of detention and infiltration basins that collected stormwater runoff from residential, commercial, and/or industrial areas.



**Figure 1:** Location of managed aquifer recharge (MAR) sites in the eastern aquifer of the Lyon metropolitan area, France

## 2.2. Experimental design

Six MAR sites were selected (Table 1): 3 with vadose zone thicknesses < 3 meters (IUT, Grange Blanche (GB) and Minerve (MIN) basins) and 3 with vadose zone thicknesses > 10 meters (Django Reinhardt (DJR), Raquin (RAQ) and Feyzin (FEY)). Each MAR site is equipped with one recharge well located in the aquifer zone impacted by stormwater runoff recharge (impacted well) and one reference well located in a zone non-impacted by the stormwater runoff plume (non-impacted well). Groundwater samples were collected in impacted and non-impacted wells of all sites during rain events. Samplings performed on three dates were used as replicate events. Groundwaters were sampled using an immersed

pump (PP36 inox, SDEC, Reignac-sur-Indre, France) previously cleaned with 70% ethanol. The first 50 pumped liters were used to rinse the sampling equipment and discarded. The following 6 liters were used for chemical and microbial analyses. Grab samples of stormwater runoff were performed at the inlet of the infiltration basins. All samples were collected and stored in pre-combusted glass bottles and brought back to the laboratory in an isotherm box at 4°C.

**Table 1:** Main characteristics of the six MAR sites

MAR sites	Characteristics		
	Catchment area (ha)	Infiltration bed surface (m <sup>2</sup> )	Vadose zone thickness (m)
DJR	185	8750	11
FEY	315	2550	12
RAQ	26	285	17
MIN	165	4200	2
IUT	2.5	850	2.5
GB	300	3200	< 1

### 2.3. Water physico-chemical measurements

During the course of the experiment, electrical conductivity (EC) and dissolved oxygen were monitored on a 1 hour step basis for the groundwater by field probes (LTC Levelogger<sup>®</sup> Junior, Solinst, Canada, for electrical conductivity measurements; HOBO<sup>®</sup> U26, Onset, USA, for dissolved oxygen measurements). These variables were measured instantly from the stormwater runoff grab samples (i.e., n=3; day 0, day 5 and day 10) with portable EC (electric conductivity) and DO-meter (HQ20, HACH, Dusseldorf, Germany) probes. Inorganic nutrients (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, and PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) and chloride (Cl<sup>-</sup>) were measured by standard colorimetric methods (Grasshoff et al., 1999) using an automatic analyzer (Smartchem200, AMS, Frepillon, France). DOC (dissolved organic carbon) was measured with a multi N/C<sup>®</sup> 3100 device (Analytik Jena, Jena, Germany) following Foulquier et al. (2009). Biodegradable DOC (BDOC) was determined by the method of Servais et al. (1987; 1989) following Mermillod-Blondin et al. (2015).

### 2.4. Bacterial V5-V6 16S rRNA gene analyses

Five liters of each water sample were filtered with 0.22 µm polycarbonate filters. DNA was extracted from filters using the FastDNA spin kit for soil (MP biomedical). The amount of extracted DNA was quantified by spectrophotometry using a Nanodrop ND1000 (Thermo

Fisher Scientific, USA).

Sequencing of the V5-V6 16S rRNA gene (*rrs*) were performed by MrDNA company (Shallowater, TX, USA) with Illumina MiSeq technology. Primers 799F (5'-ACCMGGATTAGATACCCKG-3') and 1193R (CRTCCMCACCTTCCTC) were used, and 20,000 reads (i.e., 2 x 300-bp paired-end reads) were generated per sample. Data processing was conducted using a pipeline inspired by standard operating procedure of Kozich et al. (2013) and realized with the MOTHUR software version 1.35.1 (Schloss et al., 2009). Raw sequences were discarded when reads were: (1) shorter than 200 bp and longer than 400 pb; (2) containing homopolymers longer than 8 bp; (3) showing more than one sequence mismatch to barcode DNA tags and more than two mismatches with the forward sequencing primer; (4) containing ambiguous bases; (5) having average sequencing quality score drops below 35 using a 50-bp sliding window (Schloss et al., 2011). Reads were then aligned against the SILVA database release 123 (Quast et al., 2013). Reads that could not be allocated to the V5-V6 area were deleted. A pre-cluster step was applied to reduce sequencing noise by clustering reads differing by only three bases (1 base every 100 bases) as recommended by Huse et al. (2010). Chimeric sequences were detected and removed using CHIMERA UCHIME (Edgar et al., 2011). Reads were classified according to the SILVA database using a 80 % minimum bootstrap cutoff (Wang et al., 2007). Sequences that were classified as *Archaea*, *Eukaryota*, chloroplasts or mitochondria were deleted. DNA sequences were grouped into operational taxonomic units (OTUs) by a clustering at 97% similarity (Schloss and Westcott, 2011). Singletons were removed from the dataset and the number of sequences per sample was finally made equal using a random resampling.

## 2.5. Statistical analyses

Groundwaters sampled from the impacted well during a rain event were assumed to be a mix of pre-event groundwater (non-impacted well) and stormwater runoff infiltrating through the vadose zone. Thus, nutrient concentrations observed in impacted groundwater are also from both infiltrated stormwater runoff and non-impacted groundwater circulating below MAR systems (in impacted wells). A two-end member mixing model was built using chloride ( $\text{Cl}^-$ ) as a conservative tracer (Triska et al., 1993). The percentage of stormwater runoff in impacted groundwater was calculated using the following formula:

$$\text{Percentage of stormwater runoff (\%)} = ([\text{Cl}^-]_{\text{niw}} - [\text{Cl}^-]_{\text{iw}}) / ([\text{Cl}^-]_{\text{niw}} - [\text{Cl}^-]_{\text{sw}}) \times 100$$

where  $[\text{Cl}^-]_{\text{niw}}$ ,  $[\text{Cl}^-]_{\text{iw}}$  and  $[\text{Cl}^-]_{\text{sw}}$  are the concentrations of chloride in non-impacted groundwater (niw - reference), impacted groundwater (iw) and stormwater runoff (sw),

respectively.

This ratio was used to predict concentrations of nutrients among mixed infiltrated stormwater runoff and groundwater. Comparisons between expected and observed values allowed inferring processes occurring in the vadose zone that can modify nutrient dynamics. The same procedure was applied on bacterial OTUs (97% identities). According to the two-end member mixing model, a predicted community for each groundwater collected below MAR systems (impacted well) was inferred on the basis of a simple scenario of transit being in line with water transport (inferred from Cl<sup>-</sup>) and mixes. This predicted V5-V6 16S OTU community was compared with the observed community. This allowed testing the incidence of VZT on bacterial retention. Similarities calculated with the Bray-Curtis dissimilarity index was used to compare predicted and observed bacterial communities at the three sampling dates.

Wilcoxon tests comparing means of observed and predicted nutrients and DO concentrations from the two-ends mixing model were performed. No significant differences (i.e., p-value > 0.05) indicated that the dynamics of nutrients and DO concentrations followed the mixing model. Differences between measured and predicted concentrations were calculated to test the influence of VZT condition (i.e., VZT < 3 m and VZT > 10 m) on nutrient and DO dynamics using nested ANOVAs with MAR sites nested in the two VZT conditions. A significant difference was considered when p-value < 0.05.

A hierarchical cluster analysis using Ward's method was performed on the Bray-Curtis dissimilarity matrix. Difference between bacterial communities structures were tested using permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA; Anderson, 2001). Statistical tests were based on 999 permutations of the Bray-Curtis matrix and significance was accepted at p-value < 0.05. Statistical tests were performed using R software (R Development Core Team 2008) and the Vegan package (Oksanen et al., 2007).

### **3. RESULTS**

#### **3.1. Influence of VZT on chemical transfers from surface to groundwater in MAR systems**

Electrical conductivity and chloride concentrations measured in impacted wells were always intermediate between values measured in surface (i.e., stormwater runoff) and in non-impacted wells (Table 2); illustrating the mixing of stormwater runoff and groundwater in impacted wells. These two variables were significantly correlated ( $r = 0.71$ ) and could be used

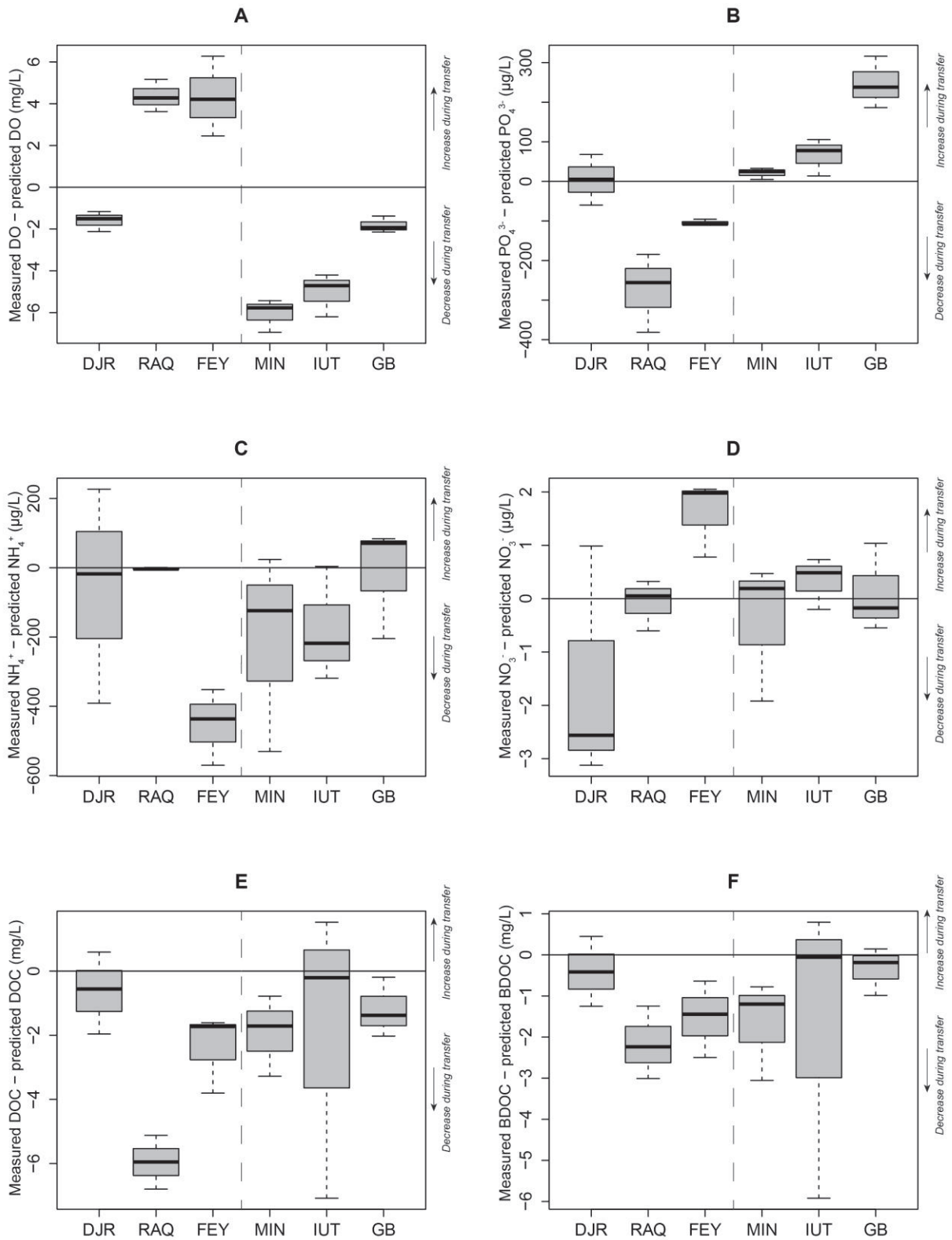
to calculate the percentage of stormwater runoff reaching the aquifer in impacted wells. For the three sites with VZT > 10 m, the computed percentages of stormwater runoff in impacted wells using chloride as conservative tracer were  $36.2 \pm 42.4\%$ ,  $87.5 \pm 1.1\%$  and  $88.7 \pm 12.8\%$  for DJR, RAQ and FEY, respectively. For the three sites with a VZT < 3m, the percentages were  $93.6 \pm 7.1\%$ ,  $83.5 \pm 28.6\%$  and  $52.9 \pm 8.5\%$  for MIN, IUT and GB, respectively. These percentages were not significantly influenced by VZT (nested one-way ANOVA,  $p = 0.855$ ). Despite comparable DO concentrations in stormwater runoff and groundwater in non-impacted wells (Figure 2), DO concentrations were fourfold higher in impacted groundwaters below deep vadose zone (DO = 7.85 mg/L) than in impacted groundwaters below shallow vadose zone (DO = 1.89 mg/L) (Table 2). For the two VZT conditions (deep and shallow), DO concentrations measured in impacted groundwaters did not follow the mixing model ( $p < 0.05$ , Wilcoxon test) but DO dynamics (consumption and/or re-oxygenation) depended upon VZT (nested one-way ANOVA,  $p < 0.05$ ). For MAR systems with a VZT < 3m, DO concentrations were lower than expected, indicating a consumption of DO and a low re-oxygenation of water during the transfer through soil and vadose zone. Opposite results were obtained in MAR systems with a VZT > 10m, indicating a re-oxygenation of water during transfer, although results were less clear for DJR site (Fig. 2A). Interestingly, the influence of VZT on phosphate ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) dynamics (observed-predicted values from mixing model) were inversely correlated with the influence of VZT on DO concentrations ( $r = -0.63$ ). Indeed, phosphate concentrations were higher than expected in MAR systems with a VZT < 3m ( $p < 0.05$ , Wilcoxon test) and low DO concentrations whereas the opposite  $\text{PO}_4^{3-}$  dynamics was observed in MAR systems with a VZT > 10m ( $p < 0.05$ , Wilcoxon test) and high DO concentrations. Nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) and ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) concentrations measured in groundwater collected in impacted wells ranged between concentrations measured in stormwater runoff and in groundwater collected in non-impacted wells (Figure 2). For the two VZT conditions, nitrate concentrations in groundwater significantly followed the mixing model (Wilcoxon tests,  $p = 1$  and  $p = 0.34$  for VZT < 3m and VZT > 10m, respectively). The same results were obtained for ammonium concentrations ( $p = 0.09$  and  $p = 0.16$  for VZT < 3m and VZT > 10m respectively, Wilcoxon test), although the vadose zone of the FEY site apparently reduced the concentration of ammonium found in groundwater in comparison with a simple mixing process (fig. 2C). Consequently, we did not detect a significant effect of VZT on nitrate and ammonium concentrations reaching the aquifer (nested one-way ANOVA,  $p = 0.98$  and  $p = 0.82$  for nitrate and ammonium, respectively). Dissolved organic carbon (DOC) and biodegradable DOC (BDOC) concentrations were higher in impacted than in non-

impacted groundwater in all MAR sites with the exception of FEY (Table 2). Despite this enrichment, measured concentrations of DOC and BDOC in groundwater impacted by MAR systems were lower than expected from the mixing model (Wilcoxon test,  $p < 0.05$ ), indicating a consumption of dissolved organic carbon during water transit through the vadose zone. This consumption was not significantly influenced by VZT (nested one-way ANOVA,  $p = 0.45$  and  $p = 0.87$  for DOC and BDOC, respectively).

**Table 2:** Physico-chemical measurements of the collected waters. EC, electrical conductivity; DO, dissolved oxygen; DOC, dissolved organic carbon; BDOC, biodegradable dissolved organic carbon; GW, groundwater. For all variables, mean values  $\pm$  SD (n = 3 replicates) are indicated.

MAR Sites		CT (mg/L)	EC ( $\mu$ S/cm)	DO (mg/L)	N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ( $\mu$ g/L)	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg/L)	P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> ( $\mu$ g/L)	DOC (mg/L)	BDOC (mg/L)
VZT > 10m	DJR								
	stormwater	8.97 ( $\pm$ 9.56)	230.25 ( $\pm$ 189.66)	5.62 ( $\pm$ 1.62)	262.7 ( $\pm$ 175.4)	1.0 ( $\pm$ 0.9)	40.2 ( $\pm$ 39.1)	4.3 ( $\pm$ 1.9)	2.2 ( $\pm$ 0.6)
	non-impacted GW	23.50 ( $\pm$ 0.64)	588.67 ( $\pm$ 10.69)	7.37 ( $\pm$ 0.18)	7.7 ( $\pm$ 8.7)	9.7 ( $\pm$ 0.8)	17.1 ( $\pm$ 2.6)	0.60 ( $\pm$ 0.08)	0.20 ( $\pm$ 0.17)
RAQ	impacted GW	18.72 ( $\pm$ 4.86)	450.33 ( $\pm$ 29.02)	5.43 ( $\pm$ 0.35)	85.7 ( $\pm$ 125.3)	5.2 ( $\pm$ 1.8)	43.8 ( $\pm$ 33.7)	0.94 ( $\pm$ 0.32)	0.45 ( $\pm$ 0.28)
	stormwater	1.35 ( $\pm$ 0.19)	119.75 ( $\pm$ 17.25)	5.09 ( $\pm$ 0.84)	23.0 ( $\pm$ 9.9)	0.2 ( $\pm$ 0.1)	327.8 ( $\pm$ 110.7)	8.13 ( $\pm$ 0.66)	3.21 ( $\pm$ 0.78)
	non-impacted GW	41.13 ( $\pm$ 0.43)	647.33 ( $\pm$ 58.59)	9.63 ( $\pm$ 0.03)	8.5 ( $\pm$ 6.8)	21.0 ( $\pm$ 1.1)	22.8 ( $\pm$ 1.7)	0.44 ( $\pm$ 0.15)	0.28 ( $\pm$ 0.16)
FEY	impacted GW	6.33 ( $\pm$ 0.57)	391.00 ( $\pm$ 23.26)	10.01 (0.03)	17.0 ( $\pm$ 11.7)	2.7 ( $\pm$ 0.3)	32.6 ( $\pm$ 9.3)	1.44 ( $\pm$ 0.44)	0.70 ( $\pm$ 0.44)
	stormwater	4.21 ( $\pm$ 1.05)	92.00 ( $\pm$ 16.77)	3.22 ( $\pm$ 0.98)	657.8 ( $\pm$ 230.2)	0.7 ( $\pm$ 0.3)	162.7 ( $\pm$ 52.1)	3.56 ( $\pm$ 0.79)	1.97 ( $\pm$ 0.72)
	non-impacted GW	35.64 ( $\pm$ 1.32)	613.67 ( $\pm$ 61.77)	8.62 ( $\pm$ 0.21)	6.3 ( $\pm$ 2.3)	9.3 ( $\pm$ 0.2)	14.8 ( $\pm$ 6.1)	1.18 ( $\pm$ 0.34)	0.62 ( $\pm$ 0.28)
VZT < 3m	MIN								
	impacted GW	7.72 ( $\pm$ 4.42)	355.00 ( $\pm$ 80.13)	8.1 ( $\pm$ 0.97)	44.5 ( $\pm$ 52.5)	3.2 ( $\pm$ 0.3)	17.7 ( $\pm$ 8.4)	1.05 ( $\pm$ 0.35)	0.47 ( $\pm$ 0.08)
	stormwater	41.11 ( $\pm$ 24.44)	248.50 ( $\pm$ 116.80)	6.92 ( $\pm$ 1.49)	227.0 ( $\pm$ 230.0)	0.4 ( $\pm$ 0.3)	21.8 ( $\pm$ 6.3)	4.90 ( $\pm$ 1.70)	2.74 ( $\pm$ 1.07)
IUT	non-impacted GW	34.52 ( $\pm$ 3.22)	673.67 ( $\pm$ 55.90)	7.76 ( $\pm$ 0.29)	13.3 ( $\pm$ 2.1)	14.2 ( $\pm$ 0.2)	34.5 ( $\pm$ 15.5)	1.00 ( $\pm$ 0.06)	0.56 ( $\pm$ 0.05)
	impacted GW	35.86 ( $\pm$ 24.98)	347.33 ( $\pm$ 90.74)	0.84 ( $\pm$ 1.44)	23.8 ( $\pm$ 7.1)	0.8 ( $\pm$ 0.6)	44.9 ( $\pm$ 20.1)	2.24 ( $\pm$ 0.46)	0.82 ( $\pm$ 0.05)
	stormwater	1.44 ( $\pm$ 0.16)	173.00 ( $\pm$ 64.28)	6.20 ( $\pm$ 0.01)	229.8 ( $\pm$ 155.0)	1.3 ( $\pm$ 1.1)	32.1 ( $\pm$ 9.7)	5.13 ( $\pm$ 3.12)	3.44 ( $\pm$ 2.80)
GB	non-impacted GW	21.91 ( $\pm$ 0.27)	562.00 ( $\pm$ 13.86)	3.29 ( $\pm$ 0.22)	15.7 ( $\pm$ 2.9)	2.6 ( $\pm$ 0.1)	16.9 ( $\pm$ 8.3)	1.02 ( $\pm$ 0.42)	0.50 ( $\pm$ 0.24)
	impacted GW	4.57 ( $\pm$ 6.16)	267.67 ( $\pm$ 186.49)	0.72 ( $\pm$ 0.75)	44.2 ( $\pm$ 14.0)	1.7 ( $\pm$ 1.3)	94.4 ( $\pm$ 46.6)	1.81 ( $\pm$ 0.21)	0.89 ( $\pm$ 0.08)
	stormwater	3.20 ( $\pm$ 0.49)	117.50 ( $\pm$ 35.86)	4.98 ( $\pm$ 0.48)	321.1 ( $\pm$ 200.9)	0.5 ( $\pm$ 0.4)	196.9 ( $\pm$ 69.2)	4.50 ( $\pm$ 1.14)	2.04 ( $\pm$ 0.73)
impacted GW	non-impacted GW	33.06 ( $\pm$ 1.68)	692.33 ( $\pm$ 48.19)	6.79 ( $\pm$ 0.27)	12.7 ( $\pm$ 6.0)	7.2 ( $\pm$ 0.2)	6.7 ( $\pm$ 5.0)	0.95 ( $\pm$ 0.08)	0.36 ( $\pm$ 0.15)
	impacted GW	18.71 ( $\pm$ 2.95)	579.33 ( $\pm$ 79.43)	4.10 ( $\pm$ 0.69)	181.3 ( $\pm$ 48.9)	4.1 ( $\pm$ 0.6)	351.6 ( $\pm$ 113.5)	1.61 ( $\pm$ 0.16)	0.82 ( $\pm$ 0.09)





**Figure 2:** Boxplots representing differences between measured concentrations in nutrients among MAR impacted groundwaters per site and theoretical values computed from a two-ends mixing model based on chloride measurements. **A:** dissolved oxygen concentrations; **B:** Phosphate concentrations, **C:** Ammonium concentrations, **D:** Nitrate concentrations; **E:** Dissolved organic carbon concentrations;

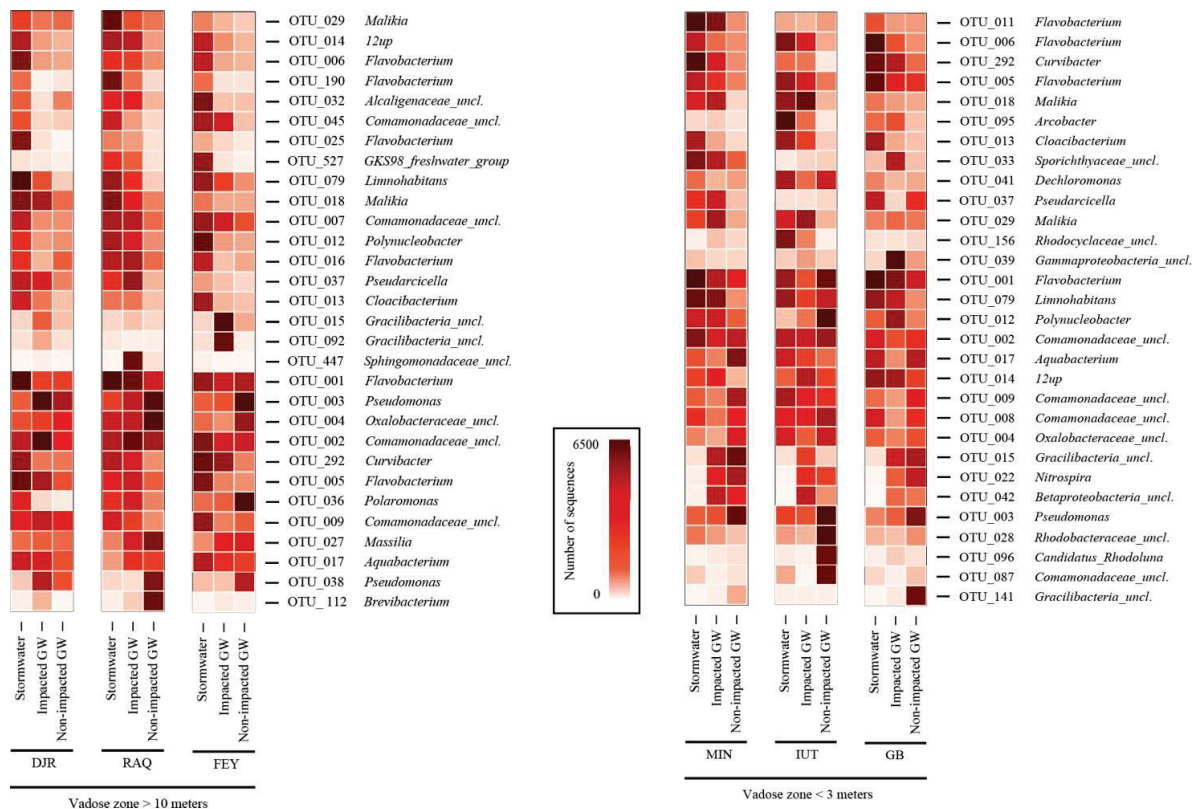
**F:** Biodegradable dissolved organic carbon concentrations. Vertical dashed line separate MAR sites with a VZT > 10m (left) and MAR sites with a VZT < 3m (right). The horizontal line at zero indicates no difference between measured and expected values. Values above this line indicate a higher concentration than expected by the mixing model, and below, a lower concentration than expected.

### 3.2. Influence of VZT on microbial transfers to groundwater

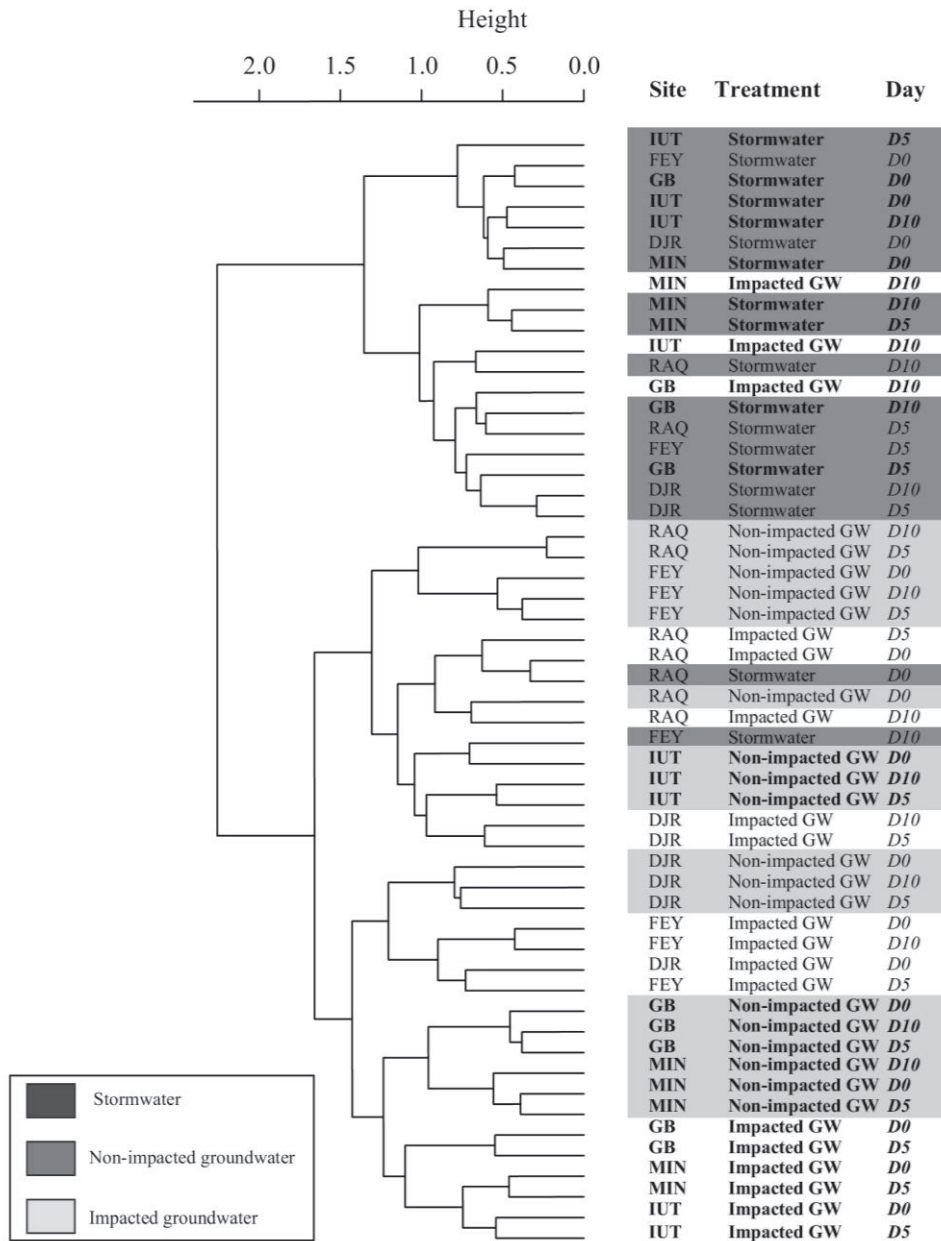
Next-generation sequencing of V5-V6 16S rRNA genes (*rrs*) were undertaken to compare bacterial communities from sampled waters, and to evaluate the influence of VZT on microbial transfers. A total of 1,303,553 *rrs* sequences were generated representing 20,263 OTUs (97% identities) that were allocated to 1265 bacterial genera including 437 unclassified genera (i.e. 34.55 %). Bacterial communities collected below MAR systems in impacted wells were significantly different from those of stormwater runoff and non-impacted groundwaters of each site and date (PERMANOVAs,  $p < 0.05$ ). Similarities computed (Similarities =  $1 - \text{Bray-Curtis dissimilarities}$ ) between impacted wells and stormwater runoff communities were not higher than 40 % for all MAR sites (the three dates were combined) whatever the VZT. Similarities between *rrs* genetic structures of non-impacted and impacted groundwaters were also low with an average of  $15.5 \pm 5.2$  % for MAR sites with a thick vadose zone and  $17.6 \pm 7.8$  % for MAR sites with a thin vadose zone. The V5-V6 *rrs* structures of impacted groundwaters could not be predicted by a simple mixing model considering the diversity observed in stormwater runoff and non-impacted groundwaters. Significant differences (in line with the above similarity computations) between *rrs* structures, including the ones generated by the two-ends mixing model (PERMANOVA,  $p < 0.01$ ), were obtained. Indeed, similarities between predicted and observed *rrs* structures were on average  $25.4 \pm 20.7$  % for MAR sites with thick vadose zones and  $22.7 \pm 14.8$  % for MAR sites with thin ones. Analyses at the OTU level clearly showed that most OTUs were only found in one type of waters (stormwater runoff, impacted groundwater, and non-impacted groundwater) for each site. Indeed,  $67.19 \pm 7.87$  % and  $64.00 \pm 6.26$  % of OTUs detected in groundwater from impacted wells were not detected in non-impacted groundwaters or in stormwater runoff for MAR sites with a VZT > 10m and a VZT < 3m, respectively. Among the most frequent OTUs of the dataset (i.e., the first 30 OTUs in term of number of reads), several OTUs were found in the three compartments (stormwater runoff, impacted groundwater and non-impacted groundwater) whatever the MAR site considered (Fig. 3). For example, this ubiquity was observed for some OTUs belonging to the genus *Flavobacterium* (e.g., OTU\_001, OTU\_005), for several betaproteobacteria such as *Malikia* (OTU\_029) or *Aquabacterium* (OTU\_017) and

for other genera belonging to the family Comamonadaceae (e.g., OTU\_002, OTU\_009) that could not be classified into particular genera (Fig. 3). OTUs essentially found in groundwaters or present at low numbers in stormwater runoff were detected. These restricted distributions in groundwaters were observed for reads allocated to *Nitrospira* (OTU\_022) but also several OTUs that could not be allocated to a genus (e.g., OTU\_042 belonging to the beta-proteobacteria or OTU\_015, OTU\_092 and OTU\_141 of the gracilibacteria). Reads from OTUs like OTU\_018 (genus *Malikia*) or OTU\_079 (genus *Limnohabitans*) were in higher numbers in stormwater runoff and MAR impacted groundwaters than in non-impacted ones. Other OTUs like those allocated to genera *Polynucleobacter* (OTU\_012) and *I2up* (OTU\_014) presented contrasted distributions depending upon VZT. They were found in stormwater runoff and detected in significant numbers in impacted groundwaters with a VZT < 3m whereas they were poorly represented in impacted groundwaters of the MAR sites characterized by a VZT > 10m (except for RAQ site).

A hierarchical cluster analysis based on Bray-Curtis dissimilarity index clearly separated *rrs* OTU profiles of stormwater runoff and from those of groundwaters impacted or not by MAR systems (Fig. 4). Nevertheless, on day 10, for the three MAR sites with a VZT < 3m, *rrs* OTU patterns from impacted groundwaters were more closely related to those recovered from stormwater runoff than non-impacted groundwaters. These patterns showed similarities equal to 48.3, 33.2 and 38.5 % for MIN, GB and IUT sites, respectively. On the contrary, similarities between non-impacted groundwaters and impacted groundwaters averaged 18.2 % for sites having a VZT > 10m. The RAQ site presented a peculiar organization of its bacteriome. It was the only site where impacted groundwaters had OTU profiles being clustered from the beginning (day 0 and day 5) with those of runoff waters (Fig. 4). Nevertheless, similarity measured at day 0 (similarity = 66.95 %) decreased during the course of this experiment to reach 17.1 % on day 10 (Fig. 4).



**Figure 3:** Heatmaps representing the number of V5-V6 16S rRNA gene reads allocated to the 30 most common OTUs recovered from stormwater runoff and groundwaters. Left panel, samples from MAR sites with a VZT > 10m; right panel, those from MAR sites with a VZT < 3m. A darker color indicates a higher proportion of reads for a defined OTU.



**Figure 4:** Hierarchical clustering of Bray-Curtis computed dissimilarities between OTU patterns of sampled waters. Clustering was performed using Ward’s method. Samples in bold represent MAR sites with a VZT < 3 meters. Other samples are MAR sites with a VZT > 10 meters.

#### 4. DISCUSSION

This is, to our knowledge, the first report describing the impact of MAR practices on chemical and bacterial transfers at a field scale (using a set of 6 contrasted infiltration basins). Coupling a quantification of water mixing with physico-chemical and microbial analyses using NGS gave an original evaluation of the efficacy of MAR systems at preventing

groundwater contaminations. Although chemical results followed our predictions of a significant influence of VZT on nutrient and organic matter transfers from surface to groundwater, bacterial transfers were more complex and were not strictly determined by VZT.

#### 4.1. Influence of VZT on chemical transfers from surface to groundwater in MAR systems

Dissolved oxygen and phosphate field measurements confirmed the prediction stating that the influence of stormwater runoff infiltration on groundwater chemistry was dependent upon VZT. As expected, groundwaters impacted by stormwater runoff recharge presented lower concentrations of DO in MAR sites with a thin vadose zone (i.e., VZT < 3 meters) than MAR sites with a thick one (i.e., VZT > 10 meters). Moreover, the concentrations of DO in impacted groundwaters were lower than expected from the mixing model for the three MAR sites with a thin vadose zone. These results indicate that DO present in stormwater runoff was consumed during its transfer from the surface to groundwater without a compensatory re-oxygenation within the vadose zone. Oxygen consumption was probably due to microbial respiration in the first centimeters of soil as observed by Nogaro et al. (2007) in experimental systems simulating the water-sediment interface of MAR systems. This biological consumption of DO was not compensated by a reaeration process of a thin vadose zone (< 3 m in our case) because of rapid pore space saturation with water during stormwater runoff infiltration in VZ (Goutaland et al., 2008; Refsgaard et al., 1991). In contrast, DO concentrations were higher than expected from the mixing model in MAR sites with a thick vadose zone at the notable exception of DJR. In these cases, despite a consumption of DO in the first centimeters of the soil, VZT was deep enough to permit a re-oxygenation of water during its passage through the unsaturated soil. The exception observed for the DJR site might have been due to differences in organic matter accumulating on the top layer of the MAR systems between this site and the other two sites (FEY and RAQ). Indeed, DJR is the oldest system (built in 1978) and accumulated more organic sediments (Dechesne, 2002; Foulquier, 2009) than FEY (built in 1988) and RAQ (built in 2001). Thus, it was possible that the consumption of DO in stormwater runoff was higher in the top soil layer of DJR site than in the other two sites, and, in addition, the water re-oxygenation through the vadose zone was not sufficient to compensate for DO loss due to biological consumption.

These dynamics of DO between MAR sites with thin and thick vadose zones clearly impacted some anaerobic processes such as the release of phosphate ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) in the percolating waters but not denitrification. On one hand, according to our initial prediction, phosphate concentrations measured in groundwaters impacted by MAR sites with a thin vadose zone



were higher than expected from the mixing model, suggesting a release of phosphorus. In the other MAR sites with a thick vadose characterized by aerobic conditions, phosphate was retained during its transfer from surface to groundwater. On the other hand, denitrification is a common anaerobic microbial process (Gomez et al., 2002) and one could have expected a reduction of nitrate concentrations in MAR sites characterized by a thin vadose zone and low DO concentrations. However, the two-ends mixing model showed that nitrate was not consumed or released during water transfer from surface to groundwater in all investigated MAR sites. As observed by Datry et al. (2004), nitrate behaved like a chemical conservative tracer in MAR systems. Indeed, it could have been used to determine the dilution factor of nitrate-poor stormwater runoff with the relatively nitrate-rich groundwaters. The lack of significant denitrification during water transfer in MAR systems could be explained by the low concentrations of nitrate in stormwater runoff, limiting the availability of this electron acceptor for micro-organisms living in the vadose zone.

Stormwater runoff infiltration enriched groundwater with DOC and BDOC in MAR sites at the exception of FEY. Nonetheless, the mixing model showed that the vadose zone was an efficient filter for dissolved organic matter because measured concentrations of DOC and BDOC were always lower than those predicted from a mixing of stormwater runoff and non-impacted groundwater. As indicated by Mermillod-Blondin et al. (2015), the retention of BDOC in the vadose zone was likely due to consumption by microbial processes whereas the retention of RDOC (refractory DOC) could be explained by physical processes like sorption. We did not detect a significant influence of VZT on the retention of DOC. These results contrasted with previous studies (Datry et al. 2005; Foulquier et al. 2010; McMahon and Chapelle 2008; Pabich et al. 2001) showing a negative correlation between VZT and DOC concentration in infiltration basins. This discrepancy may be due to a rapid consumption of DOC in the top centimeters of the soil and vadose zone of the investigated MAR systems. This suggests that a VZT of 1 m was as efficient as a VZT of 17 m to limit groundwater contamination with organic matter. Another explanation would be that the selected 6 MAR sites had physical characteristics (soil hydraulic conductivity, preferential water flows; e.g., Ben Slimene et al., 2015) that could have blurred the influence of VZT on DOC retention.

#### 4.2. Influence of VZT on microbial transfers to groundwater

For the 6 MAR sites, bacterial communities of the three water compartments were analyzed at three dates using a next-generation sequencing of 16S rRNA genes. These datasets were used to define OTUs, and to assess transfers of bacteria from surface to

groundwaters. At day 10, the experiment tended to validate our prediction that bacterial transfers were found negatively related to VZT. Indeed, Bray-Curtis dissimilarities between bacterial OTU patterns from stormwater runoff and impacted groundwater suggested more than two-fold higher similarities in MAR sites with a VZT < 3 m (mean value  $\pm$  SD =  $40.0 \pm 7.6$  %) than in MAR sites with a thicker vadose zone (mean value  $\pm$  SD =  $14.7 \pm 9.0$  %) at day 10. Therefore, an increase in VZT would reduce the transfer of bacteria from surface to groundwater in MAR systems. Nevertheless, at day 0 and 5, similar trends were not observed. Much greater dissimilarities were observed between bacterial OTU patterns from stormwater runoff and impacted groundwater of MAR sites with a VZT < 3 m (e.g., mean value  $\pm$  SD =  $7.4 \pm 3.3$  % on day 0). This observation suggests that bacterial transfer might depend upon the precedent dry or wet periods. A unique rainfall event would not be sufficient to favor bacterial transfers in VZT < 3 m but repetitive ones would increase these transfers. This would likely be due to water saturation of the vadose zone. Indeed, air contained in the soil and vadose zone was previously shown to limit bacterial transport (e.g., Powelson and Mills 1998; Schäfer et al. 1998). Furthermore, Abel et al. (2014), through soil column experiments, showed retention of *E.coli* and total coliforms to be higher during intermittent infiltration (i.e., wet and dry periods) than during a continuous one. Thus, successive rainfall events would saturate pores of the vadose zone and reduce its ability at retaining bacteria.

Although bacterial transfer from surface to groundwater was low for the 3 MAR sites with VZT > 10 m on day 10, RAQ site showed an unexpected behavior. This MAR system showed stormwater runoff and impacted groundwater OTU patterns to be highly similar ( $\approx 67$  %) at the beginning of the experiment (day 0). Some OTUs belonging to genera like *Polynucleobacter*, *I2up* (member of the family *Rhodocyclaceae*), and unclassified genera from the family *Alcaligenaceae* indicated high transfers at RAQ. Indeed, comparison of their proportions with those of the DJR and FEY sites confirmed that these OTUs were more frequent in the impacted groundwater of the RAQ site. Such a particular functioning could be explained by a rapid infiltration of stormwater runoff and associated free-living bacteria at this site. A rough assessment of water transit time from surface to groundwater (i.e., time between the start of the rain and the lowest electrical conductivity in groundwater; supplementary material 1) was performed, and supported the conclusions for the RAQ site. Indeed, a transit time several times shorter for RAQ ( $\approx 6$  hours) than for the other two MAR sites with a deep vadose ( $\approx 212$  hours for FEY and  $\approx 86$  hours for DJR) was measured. Soil type and the presence of preferential water paths could explain these differences (Cronin et



al., 2003; Martins et al., 2013).

While some field situations indicated bacterial transfers from stormwater runoff to groundwater, averaged similarities for all dates and all MAR sites remained low (< 20 %) and indicated a strong vadose zone effect. It is also worth noting that most OTUs (> 60 %) found among impacted groundwaters were not detected in stormwater runoff and non-impacted groundwaters. The vadose zone thus appeared to be an efficient barrier against bacterial transfers into the aquifer. Nevertheless, bacterial communities from impacted groundwaters were markedly different from those collected in non-impacted groundwaters. Averaged similarities for all MAR sites and days were  $16.5 \pm 6.5$  % and never exceeded 33 %. Therefore, stormwater runoff infiltration strongly influenced the genetic structures of aquatic bacterial communities found in an aquifer by favoring the presence of particular OTUs that were not detected in the two other compartments (non-impacted groundwater, stormwater runoff). Selection (species sorting) and dispersal are the two main mechanisms which could explain these results. First, modifications of groundwater chemistry below MAR systems due to stormwater runoff infiltration might have selected particular bacterial groups that were not detected or dominant in typical groundwater environment. This could have been triggered by dissolved organic matter quantity and quality below MAR systems which are known to stimulate microbial growth and activity (Mermillod-Blondin et al. 2013) and change bacterial diversity through selection (Findlay et al. 2003; Li et al. 2012; Shabarova et al. 2014). Second, bacterial dispersion and transfer to groundwater during stormwater runoff infiltration could have originated from connected soil systems and vadose zone. Although bacteria present in stormwater runoff were retained, these compartments might have acted as reservoirs/sources of micro-organisms in MAR systems. This explanation is in agreement with the observations made by Crump et al. (2012) on freshwater environments. They showed that bacterial genetic structures of stream and lake habitats were significantly structured by bacterial dissemination from soil reservoirs. The transport of bacteria in a soil and vadose zone of MAR systems likely influenced the receiving water body (groundwater) because of the “mass effect” probably exceeding the rate of local extinction by predation or natural decay (Crump et al. 2012; Leibold et al. 2004).

## 5. CONCLUSION

This study showed that a vadose zone can act as efficient filter against urban stormwater runoff bacteria during infiltration of stormwater runoff by MAR systems. Even if the transfer of bacteria from surface to groundwater was low, it was shown to increase when the vadose zone thickness decreased. Water transit time (dependent on soil properties) and water saturation of the vadose zone were found important parameters that could prevent or favor these bacterial transfers. Furthermore, water *rrs* genetic structures of groundwaters were found to be largely modified by MAR practices. These impacts are likely related to environmental selection of microorganisms due to changes in groundwater physico-chemistry and/or dispersion and remobilization of bacterial cells from connected soils and vadose zone during stormwater runoff infiltration. However, the relative importance of each phenomenon on groundwater bacterial diversity will need to be further investigated. This study was performed on a single 10-day period. Confirmatory analyses will need to be done on datasets generated from additional dates and field conditions.

The present study thus demonstrated changes in groundwater microbiology due to MAR practices. However, working on water samples and free-living bacteria gives poor information about the ability of these microorganisms at efficiently colonizing groundwater ecosystems and contributing to their functioning. Indeed, the groundwater environment is often characterized by its very low food content which limits bacterial survival and acclimation of exogenous cells originating from nutrient-rich environments (e.g., soil, freshwater, urban sediments). To determine the ability of free bacteria at colonizing and grow in groundwater environments, the use of artificial substrates was recently proposed (Voisin et al., 2016). Incubation of these artificial substrates in groundwater wells would allow an evaluation of the potential links between bacterial community changes among biofilms and key biogeochemical functions playing part in water purification processes such as denitrification and degradation of organic matter (Griebler & Avramov 2015). These artificial substrates can be retrieved, and their DNA, RNA and protein contents be analyzed. They could thus be used to confirm the preferential development of some bacterial taxa among the vadose zone, and infer their ecological benefits. Such datasets are needed for a reliable evaluation of the vulnerability of groundwater ecosystems by MAR practices.

## 6. ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the Auvergne-Rhône-Alpes region for Jérémy Voisin's Ph.D grant. This study was funded by ANR-16-CE32-0006 "FROG", ANR 11 CESA 012 "Cabres" (<http://www.graie.org/cabres/>), labex IMU, and Lyon Metropole within the framework of the experimental observatory for urban hydrology (OTHU, <http://www.graie.org/othu/>). We also thank Léa Dantony, Mathilde Pigneret and Felix Vallier for their support and advice during field and laboratory work.

## 7. SUPPLEMENTARY MATERIAL

Table: Transit time (h) of stormwater runoff from surface to groundwater table for the 6 MAR sites

	VZT > 10m			VZT < 3m		
	DJR	RAQ	FEY	MIN	IUT	GB
Time transit (h)	86.0 ± 12.4	6.3 ± 1.5	211.8 ± 90.5	15.2 ± 5.9	10.1 ± 3.3	15.5 ± 6.6

Values are the mean ± SD (n=6 rainfall events in 2015)

The transit times were estimated as the delay between each rainfall event and its associated minimal electrical conductivity in impacted groundwater (cf. figure below).

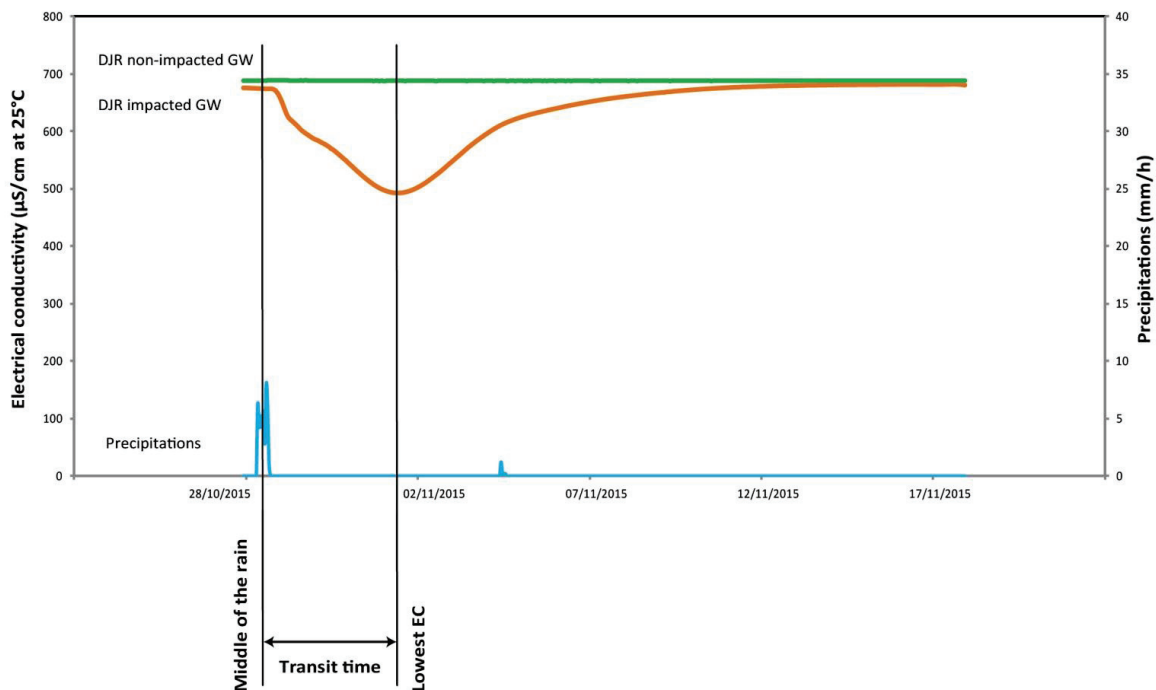


Figure: Example of transit time estimation based on continuous recording of electrical conductivity in impacted groundwater for DJR site.

## 8. REFERENCES

- Abel, C.D.T., Sharma, S.K., Mersha, S.A., Kennedy, M.D., 2014. Influence of intermittent infiltration of primary effluent on removal of suspended solids, bulk organic matter, nitrogen and pathogens indicators in a simulated managed aquifer recharge system. *Ecol. Eng.* 64, 100–107. doi:10.1016/j.ecoleng.2013.12.045
- Anderson, M.J., 2001. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecol.* 26, 32–46. doi:10.1111/j.1442-9993.2001.tb00081.x
- Arnaud, E., Best, A., Parker, B.L., Aravena, R., Dunfield, K., 2015. Transport of *Escherichia coli* through a Thick Vadose Zone. *J. Environ. Qual.* 44, 1424–1434. doi:10.2134/jeq2015.02.0067
- Ben Slimene, E., Lassabatere, L., Winiarski, T., Gourdon, R., Naturels, H., 2015. Modeling Water Infiltration and Solute Transfer in a Heterogeneous Vadose Zone as a Function of Entering Flow Rates. *Journal of Water Resource and Protection*, 7, 1017-1028. <http://dx.doi.org/10.4236/jwarp.2015.713083>
- Borchardt, M.A., Bradbury, K.R., Gotkowitz, M.B., Cherry, J.A., Parker, B.L., 2007. Human enteric viruses in groundwater from a confined bedrock aquifer. *Environ. Sci. Technol.* 41, 6606–6612. doi:10.1021/es071110+
- Cronin, A.A., Taylor, R.G., Powell, K.L., Barrett, M.H., Trowsdale, S.A., Lerner, D.N., 2003. Temporal variations in the depth-specific hydrochemistry and sewage-related microbiology of an urban sandstone aquifer, Nottingham, United Kingdom. *Hydrogeol. J.* 11, 205–216. doi:10.1007/s10040-002-0246-0
- Crump, B.C., Amaral-Zettler, L.A., Kling, G.W., 2012. Microbial diversity in arctic freshwaters is structured by inoculation of microbes from soils. *ISME J.* 6, 1629–1639. doi:10.1038/ismej.2012.9
- 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. doi:10.1016/j.scitotenv.2004.02.022
- Datry, T., Malard, F., Gibert, J., 2005. Response of invertebrate assemblages to increased groundwater recharge rates in a phreatic aquifer. *J. North Am. Benthol. Soc.* 24, 461–477. doi:10.1899/04-140.1
- Dechesne, M., 2002. Connaissance et modélisation du fonctionnement des bassins d’infiltration d’eaux de ruissellement urbain pour l’évaluation des performances techniques et environnementales sur le long terme. Thesis INSA Lyon, p. 277.
- Edgar, R.C., Haas, B.J., Clemente, J.C., Quince, C., Knight, R., 2011. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* 27, 2194–2200. doi:10.1093/bioinformatics/btr381
- 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. *Limnol. Oceanogr.* 48, 1608–1617. doi: 10.4319/lo.2003.48.4.1608

- Foulquier, A., 2009. *Écologie fonctionnelle dans les nappes phréatiques : liens entre flux de matière organique , activité et diversité biologiques*. Thesis University Lyon 1, p. 259.
- Foulquier, A., Malard, F., Mermillod-Blondin, F., Datry, T., Simon, L., Montuelle, B., Gibert, J., 2009. Vertical change in dissolved organic carbon and oxygen at the water table region of an aquifer recharged with stormwater: biological uptake or mixing? *Biogeochemistry* 99, 31–47. doi:10.1007/s10533-009-9388-7
- Foulquier, A., Simon, L., Gilbert, F., Fourel, F., Malard, F., Mermillod-Blondin, F., 2010. 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. *Freshw. Biol.* 55, 1560–1576. doi:10.1111/j.1365-2427.2010.02385.x
- Ginn, T.R., Wood, Brian D., Nelson, K.E., Scheibe, T.D., Murphy, E.M., Clement, P.T., 2002. Processes in microbial transport in the natural subsurface. *Adv. Water Resour.* 25, 1017–1042.
- Gómez, M.A., Hontoria, E., González-López, J., 2002. Effect of dissolved oxygen concentration on nitrate removal from groundwater using a denitrifying submerged filter. *J. Hazard. Mater.* 90, 267–278. doi:10.1016/S0304-3894(01)00353-3
- Goutaland, D., Winiarski, T., Dubé, J.-S., Bièvre, G., Buoncristiani, J.-F., Chouteau, M., Giroux, B., 2008. Hydrostratigraphic Characterization of Glaciofluvial Deposits Underlying an Infiltration Basin Using Ground Penetrating Radar. *Vadose Zo. J.* 7, 194–207. doi:10.2136/vzj2007.0003
- Grasshoff, K., Ehrhardt, M., Kremling, K., 1999. *Methods of Seawater Analysis*, third edition. Wiley-VCH, <http://dx.doi.org/10.1002/9783527613984>.
- Grebel, J.E., Mohanty, S.K., Torkelson, A.A., Boehm, A.B., Higgins, C.P., Maxwell, R.M., Nelson, K.L., Sedlak, D.L., 2013. Engineered Infiltration Systems for Urban Stormwater Reclamation. *Environ. Eng. Sci.* 30, 437–454. doi:10.1089/ees.2012.0312
- Griebler, C., Avramov, M., 2015. Groundwater ecosystem services : a review. *Freshw. Science.* 34, 355–367. doi:10.1086/679903.
- Hunt, W., Traver, R., Davis, A., Emerson, C., Collins, K., Stagge, J., 2010. Low Impact Development Practices: Designing to Infiltrate in Urban Environments. *Effects of Urbanization on Groundwater*: pp. 308–343. doi: 10.1061/9780784410783.ch12
- Huse, S.M., Welch, D.M., Morrison, H.G., Sogin, M.L., 2010. Ironing out the wrinkles in the rare biosphere through improved OTU clustering. *Environ. Microbiol.* 12, 1889–1898. doi:10.1111/j.1462-2920.2010.02193.x
- Kozich, J.J., Westcott, S.L., Baxter, N.T., Highlander, S.K., Schloss, P.D., 2013. Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the miseq illumina sequencing platform. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 5112–5120. doi:10.1128/AEM.01043-13

- Le Gall, J., Xavier, A.V, 1996. Anaerobes response to oxygen: the sulfate-reducing bacteria. *Anaerobe* 2, 1–9. doi:10.1006/anae.1996.0001
- Leibold, M.A., Holyoak, M., Mouquet, N., Amarasekare, P., Chase, J.M., Hoopes, M.F., Holt, R.D., Shurin, J.B., Law, R., Tilman, D., Loreau, M., Gonzalez, A., 2004. The metacommunity concept: A framework for multi-scale community ecology. *Ecol. Lett.* 7, 601–613. doi:10.1111/j.1461-0248.2004.00608.x
- Li, D., Sharp, J.O., Saikaly, P.E., Ali, S., Alidina, M., Alarawi, M.S., Keller, S., Hoppe-Jones, C., Drewes, J.E., 2012. Dissolved organic carbon influences microbial community composition and diversity in managed aquifer recharge systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 6819–6828. doi:10.1128/AEM.01223-12
- Li, X., Atwill, E.R., Antaki, E., Applegate, O., Bergamaschi, B., Bond, R.F., Chase, J., Ransom, K.M., Samuels, W., Watanabe, N., Harter, T., 2015. Fecal Indicator and Pathogenic Bacteria and Their Antibiotic Resistance in Alluvial Groundwater of an Irrigated Agricultural Region with Dairies. *J. Environ. Qual.* 44, 1435–1447. doi:10.2134/jeq2015.03.0139
- Marsalek, J., Chocat, B., 2002. International report: Stormwater management, in: *Water Science and Technology*. pp. 1–17.
- Martins, J.M.F., Majdalani, S., Vitorge, E., Desaunay, A., Navel, A., Guiné, V., Dañan, J.F., Vince, E., Denis, H., Gaudet, J.P., 2013. Role of macropore flow in the transport of *Escherichia coli* cells in undisturbed cores of a brown leached soil. *Environ. Sci. Process. Impacts.* 15, 347–356. doi:10.1039/c2em30586k
- Masciopinto, C., La Mantia, R., Chrysikopoulos, C. V., 2008. Fate and transport of pathogens in a fractured aquifer in the Salento area, Italy. *Water Resour. Res.* 44, 1–18. doi:10.1029/2006WR005643
- McMahon, P.B., Chapelle, F.H., 2008. Redox processes and water quality of selected principal aquifer systems. *Ground Water* 46, 259–271. doi:10.1111/j.1745-6584.2007.00385.x
- Mermillod-Blondin, F., Foulquier, A, Maazouzi, C., Navel, S., Negrutiu, Y., Vienney, A, Simon, L., Marmonier, P., 2013. Ecological assessment of groundwater trophic status by using artificial substrates to monitor biofilm growth and activity. *Ecol. Indic.* 25, 230–238. doi: 10.1016/j.ecolind.2012.09.026
- Mermillod-Blondin, F., Simon, L., Maazouzi, C., Foulquier, A., Delolme, C., Marmonier, P., 2015. Dynamics of dissolved organic carbon (DOC) through stormwater basins designed for groundwater recharge in urban area: Assessment of retention efficiency. *Water Res.* 81, 27–37. doi:10.1016/j.watres.2015.05.031
- Murphy, E.M., Ginn, T.R., 2000. Modeling microbial processes in porous media. *Hydrogeol. J.* 8, 142–158. doi:10.1007/s100409900043
- 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. *Sci. Total Environ.* 377, 334–348. doi:10.1016/j.scitotenv.2007.01.093

- Oksanen, J., Kindt, R., Legendre, P., O'Hara, B.V., 2007. The vegan package. Community ecology package, R package version 1. pp. 8–5.
- Pabich, W.J., Valiela, I., 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, 247–268. doi:10.1023/A:1011842918260
- Pang, L., 2009. Microbial removal rates in subsurface media estimated from published studies of field experiments and large intact soil cores. *J. Environ. Qual.* 38, 1531–1559. doi:10.2134/jeq2008.0379
- Pang, L., Close, M., Goltz, M., Noonan, M., Sinton, L., 2005. Filtration and transport of *Bacillus subtilis* spores and the F-RNA phage MS2 in a coarse alluvial gravel aquifer: Implications in the estimation of setback distances. *J. Contam. Hydrol.* 77, 165–194. doi:10.1016/j.jconhyd.2004.12.006
- Pang, L., Close, M., Goltz, M., Sinton, L., Davies, H., Hall, C., Stanton, G., 2004. Estimation of septic tank setback distances based on transport of *E. coli* and F-RNA phages. *Environ. Int.* 29, 907–921. doi:10.1016/S0160-4120(03)00054-0
- Pitt, R., Clark, S., Field, R., 1999. Groundwater contamination potential from stormwater infiltration practice. *Urban water.* 1, 217–236. doi: 10.1016/S1462-0758(99)00014-X
- Powelson, D.K., Mills, A.L., 1998. Water Saturation and Surfactant Effects on Bacterial Transport in Sand Columns. *Soil Sci.* 163, 694–704 doi:10.1097/00010694-199809000-00003
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., Glockner, F.O., 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 41, D590–D596. doi:10.1093/nar/gks1219
- Refsgaard, J.C., Christensen, T.H., Ammentorp, H.C., 1991. A model for oxygen transport and consumption in the unsaturated zone. *J. Hydrol.* 129, 349–369. doi:10.1016/0022-1694(91)90058-P
- Schäfer, A., Ustohal, P., Harms, H., Stauffer, F., Dracos, T., Zehnder, A.J.B., 1998. Transport of bacteria in unsaturated porous media. *J. Contam. Hydrol.* 33, 149–169. doi:10.1016/S0169-7722(98)00069-2
- Schloss, P.D., Gevers, D., Westcott, S.L., 2011. Reducing the effects of PCR amplification and sequencing artifacts on 16S rRNA-based studies. *PLoS One* 6, e27310. doi:10.1371/journal.pone.0027310
- Schloss, P.D., Westcott, S.L., 2011. Assessing and improving methods used in operational taxonomic unit-based approaches for 16S rRNA gene sequence analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 3219–3226. doi:10.1128/AEM.02810-10
- Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B., Lesniewski, R.A., Oakley, B.B., Parks, D.H., Robinson, C.J., Sahl, J.W., Stres, B., Thallinger, G.G., Van Horn, D.J., Weber, C.F., 2009. Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for



- describing and comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 7537–7541. doi:10.1128/AEM.01541-09
- Servais, P., Anzil, A., Ventresque, C., 1989. Simple method for determination of biodegradable dissolved organic carbon in water. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 2732–3734. doi:0099-2240/89/102732-03
- Servais, P., Billen, G., Hascoët, M.C., 1987. Determination of the biodegradable fraction of dissolved organic matter in waters. *Water Res.* 21, 445–450. doi:10.1016/0043-1354(87)90192-8
- Shabarova, T., Villiger, J., Morenkov, O., Niggemann, J., Dittmar, T., Pernthaler, J., 2014. Bacterial community structure and dissolved organic matter in repeatedly flooded subsurface karst water pools. *FEMS Microbiol. Ecol.* 89, 111–126. doi:10.1111/1574-6941.12339
- Stevik, T.K., Aa, K., Ausland, G., Hanssen, J.F., 2004. Retention and removal of pathogenic bacteria in wastewater percolating through porous media: A review. *Water Res.* 38, 1355–1367. doi:10.1016/j.watres.2003.12.024
- Tedoldi, D., Chebbo, G., Pierlot, D., Kovacs, Y., Gromaire, M.-C., 2016. Impact of runoff infiltration on contaminant accumulation and transport in the soil/filter media of sustainable urban drainage systems: A literature review. *Sci. Total Environ.* 569–570, 904–926. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.04.215
- Triska, F.J., Duff, J.H., Avanzino, R.J., 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. doi:10.1007/BF00007177
- Voisin, J., Cournoyer, B., Mermillod-Blondin, F., 2016. Assessment of artificial substrates for evaluating groundwater microbial quality. *Ecol. Indic.* 71, 577–586. doi:10.1016/j.ecolind.2016.07.035
- Wang, Q., 2007. Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 5261–5267. doi: 10.1128/aem.00062-07
- Winiarski, T., Bedell, J.P., Delolme, C., Perrodin, Y., 2006. The impact of stormwater on a soil profile in an infiltration basin. *Hydrogeol. J.* 14, 1244–1251. doi:10.1007/s10040-006-0073-9

## Conclusions du chapitre 1

Les principaux résultats concernant la physico-chimie montrent qu'il existe des transferts de nutriments de la surface vers la nappe mais que ceux-ci dépendent de l'épaisseur de la ZNS. Cette dernière a un effet significatif sur l'oxygène dissous ainsi que sur la dynamique des phosphates ( $\text{PO}_4^{3-}$ ). En effet, les nappes phréatiques dans les systèmes d'infiltration où la ZNS est peu épaisse présentent des concentrations en oxygène dissous très faibles et inférieures aux concentrations attendues par un simple modèle de mélange. À l'inverse, dans les systèmes d'infiltration où la ZNS est plus épaisse, les concentrations en oxygène dissous sont plus importantes, traduisant une ré-oxygénation des eaux lors de leur transfert dans la ZNS. La dynamique de l'oxygène dissous impacte clairement les processus anaérobies comme la libération des phosphates dans l'eau d'infiltration. En effet, les concentrations de phosphates retrouvées dans la nappe sont supérieures à celles attendues par le modèle de mélange dans le cas des sites peu profonds où de faibles teneurs en oxygène dissous sont mesurées dans les eaux d'infiltration. L'inverse est mesuré sur les sites profonds. Concernant le DOC et le BDOC, il n'y a pas d'effet significatif de l'épaisseur de la ZNS. Par contre, les concentrations en DOC et BDOC dans les nappes phréatiques sont inférieures à celles attendues par le modèle de mélange. Cela indique une rétention et/ou consommation de ces composés dans la zone non saturée.

La comparaison des communautés bactériennes indique des similarités plus fortes entre la surface et les eaux de nappes impactées dans le cas des sites peu profonds en comparaison avec les sites profonds. Cela traduit donc d'une manière globale que les transferts de bactéries sont influencés par l'épaisseur de la zone non saturée. Néanmoins, les analyses de similarité suggèrent que la proportion de bactéries transférées reste limitée car les communautés bactériennes retrouvées dans la nappe restent très distinctes des communautés retrouvées en surface. Ces résultats suggèrent dans tous les cas que la ZNS constitue un filtre efficace pour les bactéries sur les six sites.

La dispersion est un processus souvent prépondérant dans l'assemblage des communautés bactériennes. Dans notre étude, ce processus (que l'on peut considérer comme le transfert surface-nappe) semble jouer un rôle faible mais néanmoins significatif sur l'assemblage des communautés microbiennes des nappes phréatiques impactées lorsque la ZNS est peu épaisse. Il est intéressant de noter que la dispersion entre la surface et la nappe ne semble pas seulement être due à l'épaisseur du filtre constitué par la ZNS. En effet, la

présence d'écoulements préférentiels est un facteur qui influence la connectivité entre la surface et la nappe. Cette étude suggère également que la saturation en eau de la ZNS pourrait être un facteur clé dans le transfert des bactéries, la présence d'air dans la zone non saturée pouvant améliorer sa capacité de rétention des micro-organismes.

Les similarités entre les eaux de nappes non impactées et les eaux de nappes impactées sont globalement faibles. Ce résultat est surprenant du fait de la circulation de l'eau dans la nappe phréatique entre les piézomètres amont (non impactés) et aval (impactés). Etant donné la limitation des transferts entre la surface et la nappe pour les bassins avec des ZNS > 10m, nous pouvions nous attendre à une forte similarité entre la communauté bactérienne « amont » et la communauté « aval » de nappe pour chacun des sites avec ZNS épaisse. Il découle donc deux hypothèses de cette observation. La première hypothèse est que les bactéries observées dans la nappe impactée proviendraient des communautés de la ZNS et seraient « mobilisées » lors de l'infiltration des eaux pluviales. La seconde hypothèse est que les conditions physico-chimiques très particulières des nappes impactées auraient une influence plus importante sur la composition des communautés que les phénomènes de transferts.

Cette étude se base sur des prélèvements d'eau de nappe phréatique et des communautés microbiennes associées. Ces prélèvements montrent donc un instantané de la diversité bactérienne libre dans un milieu qui est très perturbé par l'infiltration des eaux pluviales et ne concernent pas spécifiquement les communautés bactériennes capables de se développer dans la nappe. En effet, des prélèvements d'eau peuvent considérer des bactéries libres transférées qui ne vont pas pouvoir s'installer durablement dans l'écosystème nappe. Cette stratégie présente donc des biais et il est difficile de conclure sur l'impact de facteurs abiotiques (e.g. concentration en nutriments) sur les communautés souterraines avec cette approche (pour tester l'hypothèse 2 décrite précédemment par exemple). De ce fait, il nous est apparu pertinent d'utiliser des substrats artificiels comme support de développement d'un biofilm et système d'échantillonnage passif afin de lever ces biais. Les tests et validation de ce système d'échantillonnage avec l'aide de substrats artificiels sont présentés dans le chapitre suivant.

# 3

## DEVELOPPEMENT D'UN SYSTEME D'ECHANTILLONNAGE PASSIF DES COMMUNAUTES MICROBIENNES DES NAPPES PHREATIQUES

Ce chapitre propose de tester et de valider un système d'échantillonnage passif utilisant des substrats artificiels en conditions de laboratoire afin de le déployer dans les nappes phréatiques in fine.

Les écosystèmes souterrains et en particulier les nappes phréatiques sont des milieux difficiles d'accès. L'échantillonnage des bactéries se fait généralement par le pompage des eaux souterraines par l'intermédiaire de piézomètres permettant l'accès à l'eau. Cependant, cette méthode présente des biais. En effet, seule la fraction de bactéries planctoniques libres dans l'eau est collectée. Or ceci n'est pas représentatif de la composante microbiologique souterraine qui est en majorité présente sous forme de biofilm attaché aux sédiments (Griebler and Lueders, 2009). Il est alors envisageable d'échantillonner les sédiments de la nappe phréatique, mais cela est techniquement difficile surtout pour les nappes profondes (Chapelle, 2001). Les nappes phréatiques sont considérées comme des milieux stables. Cependant, dans le cadre des systèmes d'infiltration des eaux pluviales, les nappes phréatiques sont impactées et présentent des variations importantes, notamment lorsque l'on regarde les paramètres physico-chimiques (Thèse Datry, 2003 ; Thèse Foulquier, 2009). Ainsi les prélèvements d'eau ponctuels montrent un « instantané » qui n'est sans doute pas représentatif de ce qui pourrait être observé sur une échelle de temps plus longue.

Pour faire face à ces biais, une autre approche dite passive (i.e. incubation de substrats artificiels colonisables par les micro-organismes) semble prometteuse pour l'étude des communautés microbiennes. Cette méthode repose sur la capacité des micro-organismes à coloniser une surface et se développer sous forme de biofilm. L'utilisation de substrats artificiels pour l'échantillonnage des bactéries dans les milieux hydriques n'est pas rare (Langmark *et al.*, 2004 ; Moss *et al.*, 2006) mais seules quelques études ont utilisé ce système dans les environnements souterrains (Claret, 1998a,b ; Williamson *et al.*, 2012). Par exemple, Mermillod-Blondin *et al.* (2013) ont mené une première étude pour évaluer l'état trophique des nappes phréatiques impactées par les recharges artificielles en eaux pluviales dans différents bassins d'infiltration du Grand Lyon en utilisant des billes de verre de 4 mm de diamètre comme substrat artificiel. Au vu des résultats encourageants de cette étude sur le lien entre la quantité de carbone organique dissous et la biomasse microbienne, il a semblé pertinent d'approfondir ces travaux en testant la capacité de substrats artificiels à piéger la diversité des communautés microbiennes. Une première étude préliminaire a été réalisée afin de tester l'influence de la taille des substrats (billes de verre) pour le développement du biofilm dans les eaux. Ces premiers résultats ont permis de montrer que des billes de 8 mm de diamètre étaient plus efficaces que les billes de 4 mm utilisées initialement par Mermillod-

Blondin et al. (2013) pour le développement microbien. Ce premier test a fait l'objet d'un article en français dans la revue « La houille blanche » qui, en tant qu'étude préliminaire, a été associée en annexe 2 du manuscrit de thèse.

Aussi, à la poursuite de ce travail, des expérimentations de laboratoire de plus grande ampleur ont été menées pour tester la capacité de trois substrats artificiels différents (i.e., billes de verre, billes d'argile et graviers) à piéger une diversité bactérienne qui soit représentative de la diversité présente dans les eaux testées. Trois types d'eaux ont été choisies (i.e. eaux usées, eaux pluviales en surface de bassin d'infiltration, eau de nappe phréatique impactée par les systèmes d'infiltration). Ces eaux présentent des conditions physico-chimiques et des communautés microbiennes très variées permettant d'évaluer la capacité des substrats à piéger les bactéries sur une large gamme de milieux aquatiques.

Les résultats de cette étude sont présentés sous la forme d'un article scientifique intitulé « Assessment of artificial substrates for evaluating groundwater microbial quality » publié dans la revue « Ecological Indicators ».

## Article 2

# ASSESSMENT OF ARTIFICIAL SUBSTRATES FOR EVALUATING GROUNDWATER MICROBIAL QUALITY

**Jérémy VOISIN<sup>1,2</sup>, Benoit COURNOYER<sup>2</sup>, Florian MERMILLOD-BLONDIN<sup>1</sup>**

- 1- Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, ENTPE, UMR5023, Écologie des Hydrosystèmes Naturels et Anthropisés, Villeurbanne, F-69622, France
- 2- Université Lyon 1, VetAgro Sup, UMR CNRS 5557, & UMR INRA 1418, Ecologie Microbienne, Research Team "Bacterial Opportunistic Pathogens and Environment", Marcy L'Etoile, F-69280, France

***Publié dans Ecological Indicators***

***Ecological Indicators 71 (2016) 577-586***

***<http://dx.doi.org/10.1016/j.ecolind.2016.07.035>***

## **ABSTRACT**

Protection of groundwater resources requires the development of reliable ecological indicators. Microorganisms involved in ecological services or being associated with particular hosts or habitats could be used for this purpose. Nevertheless, their tracking remains limited because of sampling issues, and a lack of devices for their long term monitoring. In the present study, three artificial substrates (glass and clay beads, and gravel particles) were tested in terms of efficacy at favoring bacterial growth, and at capturing bacterial diversity of waters (i.e., groundwater, surface water and wastewater). Total proteins, total carbohydrates, dehydrogenase and hydrolytic activities were used to monitor biofilm development on these artificial substrates. Fingerprinting analyses based on rrs (16S rRNA)- rrl (23S rRNA) spacer analyses (ARISA) and next generation sequencing (NGS) of partial rrs DNA segments (V5-V6) were used to compare operating taxonomic units (OTUs), and infer bacterial genera trapped on these substrates. Glass beads were found less efficient than the other two artificial substrates at increasing protein contents and microbial activities (hydrolytic and dehydrogenase activities). ARISA showed a discrimination of bacterial communities developing on artificial substrates that was matching water types. An incubation period of 7 days allowed a reliable assessment of bacterial diversity. From this incubation period, around 75% of water genera with more than four V5-V6 rrs DNA sequences detected in a water type were recovered from biofilms growing on artificial substrates. Based on relative abundances of genera, clay beads and gravel particles were more efficient than glass beads to capture and obtain bacterial communities matching those of the initial waters. Between 45–67% of similarities were found for these artificial substrates while it was between 36 and 43% for glass beads. This study demonstrated clay beads and gravel particles as being efficient tools for capturing bacterial diversity and monitoring bacterial growth. Overall, clay beads appeared the best choice for field monitoring because of the ease of their size standardization in comparison with gravel particles.

## **KEYWORDS**

Biochemical assays ; Bioindicators ; Microbial biofilms ; DNA fingerprinting ; Meta-taxogenomic ; 16S rRNA



## 1. INTRODUCTION

Groundwater is a major source of drinking and irrigation waters (Gibert, 2001) but is under threat due to intensive agriculture, industrial activities and urbanization (Griebler and Avramov, 2015). Protection of groundwater resources is recognized as a major challenge in industrial countries (EU Groundwater Directive 2006/118/EC). The development of a coherent and efficient protection strategy requires an extensive evaluation of groundwater quality (Danielopol et al., 2004; Griebler et al., 2010). To date, the assessment of groundwater resources has been based exclusively on chemical and hydrogeological parameters (e.g., Wendland et al., 2005) but several environmental agencies recognize the need for biological and ecological indicators of ecosystem quality attributes (e.g., ecosystem services: e.g., Korbelt and Hose, 2011; Schurig et al., 2014). In this context, microorganisms are recognized as pertinent indicators of groundwater ecosystem health and functioning (Burns and Ryder, 2001; Griebler and Lueders, 2009; Iribar et al., 2015; Paerl et al., 2003). For instance, several studies (Cho and Kim, 2000; Foulquier et al., 2011; Goldscheider et al., 2006; Griebler et al., 2006) demonstrated that microbial analyses (biomass, activity and diversity) could be efficient to detect organic matter enrichments in groundwater ecosystems.

Monitoring of microbial change can be a pertinent ecological indication of the quality of groundwater ecosystems (Griebler and Lueders 2009) but sampling issues have hindered its implementation. Indeed, in groundwater systems, bacterial biomass and activities have been shown to be related to bacterial communities attached to surfaces rather than free-living bacteria (Alfreider et al., 1997; Goldscheider et al., 2006; Griebler et al., 2002; Iribar et al., 2008). Thus, the sampling of groundwater and associated free-living bacteria is not considered reliable for groundwater ecosystem assessment. In addition, analyses of aquifer sediments obtained by pumping or coring are technically difficult and expensive, and remain a challenging task in deep alluvial aquifers (i.e. when the vadose zone thickness exceeds 10 m (Chapelle, 2001)). To circumvent these methodological issues, a growing number of studies used artificial substrates such as glass beads or gravel particles to assess microbial biomass, activities and diversity in groundwater aquifers (Claret, 1998; Iribar et al. 2015; Mermillod-Blondin et al., 2013; Williamson et al., 2012; Yu et al., 2014). Analysis of microorganisms attached to these artificial substrates gave promising hints on trophic conditions (e.g., Williamson et al., 2012) and water purification processes (e.g., Iribar et al., 2015). Despite these successful uses, the substrates (e.g., glass, sand, gravel) were deployed in the field

without strong knowledge on their efficacy at trapping microorganisms from these systems. Also, it is expected that significant differences in trapping efficacies among artificial substrates exist. For example, glass and natural sediment surfaces have contrasting properties such as roughness which can greatly impact the dynamics of microbial development at their surface (Gharechahi et al., 2012; Whitehead and Verran, 2009).

The aim of the present study was to evaluate and compare the abilities of three artificial substrates to act as efficient trapping and growing surfaces for aquatic microorganisms. Accordingly, two materials (i.e. glass and gravel), that had been used in previous studies in alluvial aquifers (Hartland et al., 2011; Iribar et al., 2015; Mermillod-Blondin et al., 2013; Williamson et al., 2012; Yu et al., 2014), and one material (i.e., clay), commonly applied for sampling stream microbial communities (e.g., Murdock and Dodds, 2007; Risse-Buhl et al., 2012; Tuchman and Stevenson, 1980), were tested. As local environmental conditions in groundwater generate different patterns of colonization and bacterial community structures (Chapelle, 2001; Ludvigsen et al., 1999; Shen et al., 2015), three artificial substrates (glass beads, clay beads and gravel particles) were exposed to three water types (groundwater, wastewater, and surface water) characterized by contrasting chemical (nutrient concentrations) and microbial assemblages. Biofilm development was then monitored by measuring microbial biomass and activity through time. Trapping efficiencies of the three artificial substrates and bacterial diversity analyses were performed by ARISA (automated ribosomal intergenic spacer analyses: Fisher and Triplett, 1999) and *rrs* (16S rDNA) meta-taxogenomics.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. Experimental design

A factorial experimental design was used to evaluate the abilities of the three artificial substrates (glass beads, clay beads and gravel particles) to capture microbial biomass and bacterial diversity from three tested waters (i.e. wastewater, surface water and groundwater). Glass beads (soda-lime glass, Carl Roth, Karlsruhe, Germany), gravel particles (natural carbonated Rhone river sediment obtained by manual sieving) and clay beads (expanded clay aggregates, Botanic®, Saint-Julien en Genevois, France) were selected to be spherical with a diameter of 8 mm and a calculated surface area of 50.27 mm<sup>2</sup>. This size was selected on the basis of previous experiments using glass beads (Voisin et al., 2015). The selection of a

diameter of 8 mm was verified for the two other artificial substrates (gravel particles and clay beads). Analyses of biofilm total proteins were performed on gravel particles and clay beads of four diameters (4, 6, 8 and 10 mm) and incubated in surface water during 28 days. These investigations confirmed biofilm development to be better on 8 mm spheres than smaller ones (Fig. S1). Similar to a previous study (Mermillod-Blondin et al., 2013), the glass beads used in this study were depolished to increase microbial adherence. All artificial substrates (glass beads, clay beads and gravel particles) were heated to 550°C to eliminate organic matter traces. In addition, the substrates were autoclaved at 120°C for 20 min directly before incubation.

Incubations of the beads and gravel particles were performed over 28 days at 15°C and in the dark. Nine aquaria (length x width x height: 500 x 150 x 500 mm) were used for the experiment with three replicated aquaria per water type (wastewater, surface water, groundwater). Each aquarium was filled with 20 L of tested water oxygenated by air bubbling and constantly renewed using a peristaltic pump to obtain a renewal time of one week for each aquarium. Artificial substrates were incubated in aquaria using small polypropylene bags (75 x 40 mm) with a mesh size of 3.4 mm, previously treated with ethanol (70 %). A total of 20 glass beads, clay beads and gravel particles were inserted per bag, and 5 bags per substrate were incubated per aquarium, for a total of 135 bags for the whole experiment (5 bags x 3 substrates x 9 aquaria). One bag per substrate was collected per aquarium to evaluate microbial dynamics depending on artificial substrate and water type five times during incubation (0, 7, 14, 21 and 28 days).

## 2.2. SEM observations

Beads and gravel particles were recovered for scanning electron microscopy (SEM) analyses after 7 days of incubation in the three waters. SEM analyses were realized at the Centre Technologique des Microstructures of University Lyon 1 (Villeurbanne, France) according to standard protocols (Pottu-Boumendil, 1989). Samples of artificial substrates were fixed with 2 % glutaraldehyde at a pH value of 8, washed in a buffer, and post-fixed with 0.5% osmium tetroxide. Fixed samples were then washed in distilled water and dehydrated progressively in acetone. Critical-point drying was then performed with CO<sub>2</sub> (Boyde and Franc, 1981). The samples were finally coated with gold-platinum. Observations were carried out on a FEG Hitachi S-800 SEM at an acceleration voltage of 10 kV. Comparisons were performed with sterile artificial substrates.

### 2.3. Roughness index of artificial substrates

The wetted layer technique developed by Harrod and Hall (1962) was used to calculate a roughness index for the three substrates. For each artificial substrate, 6 beads or gravel particles were dried (60°C for 48 h) and individually weighed. They were then individually dipped into a detergent solution (Enzypin) and weighed again to obtain the weight of the adhering detergent solution (for details on weighing procedure see Bergey, 2006). The weight of the adhering detergent solution on the beads and gravel particles was converted to area using a linear relationship between the weight of the detergent solution and the surface area of smooth tungsten beads. The index of roughness for each artificial substrate was then calculated as the ratio between the surface area of adhering detergent solution and the artificial substrate area (calculated by considering beads and gravel particles as spheres of 8 mm in diameter).

### 2.4. Physico-chemical characteristics of the tested waters

Electrical conductivity (EC) and pH (LF92, WTW<sup>TM</sup>, Weilheim, Germany) were monitored for the three waters. EC was 2.5-fold higher for the wastewater than the other waters while pH values were comparable (Table 1). Inorganic nutrients ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$ , and  $\text{PO}_4^{3-}$ ) were measured by standard colorimetric methods (Grasshoff et al., 1999) using an automatic analyzer (Easychem Plus, Systea, Anagni, Italia). Highest ammonium (more than 15-fold) and orthophosphate (more than 200-fold) concentrations were observed in the wastewater (Table 1). Nitrate concentrations were about 100-fold lower in wastewater than in surface water and groundwater. DOC (dissolved organic carbon) was measured with a multi N/C ® 3100 device (Analytik Jena, Jena, Germany) and these analyses showed an increasing DOC concentration from 1.1 mg/L in groundwater, and 5.0 mg/L in surface water, to 55.0 mg/L in wastewater (Table 1).

**Table 1:** Physico-chemical characteristics<sup>1</sup> of the waters used to grow biofilms on glass and clay beads, and on gravel particles.

Water	EC ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	pH	$\text{NH}_4^+$ ( $\mu\text{g}/\text{L}$ )	$\text{NO}_3^-$ ( $\text{mg}/\text{L}$ )	$\text{PO}_4^{3-}$ ( $\mu\text{g}/\text{L}$ )	DOC ( $\text{mg}/\text{L}$ )
Wastewater	1640 ( $\pm$ 341)	8.00 ( $\pm$ 0.13)	1830.0 ( $\pm$ 138.7)	0.36 ( $\pm$ 0.03)	2018.2 ( $\pm$ 470.9)	55.0 ( $\pm$ 15.6)
Surface water	652 ( $\pm$ 7)	8.30 ( $\pm$ 0.04)	121.7 ( $\pm$ 38.2)	38.36 ( $\pm$ 0.70)	8.8 ( $\pm$ 0.5)	5.0 ( $\pm$ 1.0)
Groundwater	613 ( $\pm$ 5)	8.40 ( $\pm$ 0.04)	40.0 ( $\pm$ 17.3)	33.72 ( $\pm$ 0.23)	10.1 ( $\pm$ 1.6)	1.1 ( $\pm$ 0.3)

1: Means  $\pm$  standard deviations are indicated; EC: electrical conductivity; DOC: dissolved organic carbon.

## 2.5. Microbial analysis

At five incubation time periods (0, 7, 14, 21 and 28 days), bags of beads and gravel particles were removed from each aquarium. Beads and gravel particles were rinsed three times with gentle mixing using 0.8 % NaCl, to release weakly attached cells before measuring total proteins and carbohydrates, hydrolytic and dehydrogenase activities, and extracting DNA for the DNA fingerprinting (ARISA) and *rrs* meta-taxogenomics analyses. Waters were also sampled from each aquarium at the five incubation time periods to perform ARISA analyses. Meta-taxogenomics analyses were done on waters collected after an incubation period of 7 days.

### 2.5.1 Microbial biomass

Microbial biomasses on beads and gravel particles were assessed using total protein and carbohydrate assays. Total proteins were measured using the Sigma Protein Assay Kit P-5656 (Sigma Diagnostics, St Louis, MO, USA) according to Peterson (1977). Five glass, clay beads or gravel particles were treated with 4 mL of a 50 % solution of Lowry's reagent for 20 min. A vigorous shaking was applied to improve the contact between proteins on the substrates and the reagent. Then, 0.5 mL of Folin reagent was added, followed by a 30 min color reaction.  $\text{OD}_{750}$  was measured using a spectrophotometer (ThermoSpectronic Aquamate, Cambridge, UK) and values were compared with a calibration curve performed with bovine serum albumin. Total proteins were expressed in  $\mu\text{g}$  of proteins per  $\text{cm}^2$  of glass, clay bead or gravel particle, after subtracting values measured from sterile substrates (day 0). Carbohydrates were measured on artificial substrates using the Dubois method (Dubois et al., 1956). Five glass, clay beads or gravel particles were mixed with 0.95 mL of a phenol solution (10%) and 3 mL of sulfuric acid (95%), and were incubated during 1h in the dark at

room temperature.  $OD_{490}$  was measured and total carbohydrate concentration was obtained from a calibration curve generated with glucose. Values were expressed in  $\mu\text{g}$  of carbohydrates per  $\text{cm}^2$  of glass, clay bead or gravel particle, after subtracting values measured from sterile substrates (day 0).

### 2.5.2. Microbial activity

Hydrolytic activity of biofilm was estimated using the fluorescein diacetate (FDA) hydrolysis method (Fontvieille et al., 1992). Five glass, clay beads or gravel particles 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 kept at  $15^\circ\text{C}$  for 1–3 h until a green fluorescein coloration appeared to ensure that enzymatic activity was not limited by FDA concentration. The reaction was stopped by freezing the sample after the addition of 3 ml of acetone according to Battin (1997). Fluorescein concentration was estimated from the absorbance of the filtered supernatant (0.45  $\mu\text{m}$ , HAWP, Millipore, Billerica, MA, U.S.A.) measured at 490 nm and hydrolytic activity was expressed in  $\mu\text{mol}$  of FDA hydrolyzed per hour per  $\text{cm}^2$  of glass, clay bead or gravel particle, after subtracting values measured from sterile substrates (day 0). 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). Five glass, clay beads or gravel particles were incubated in a 0.02% INT solution for 2 h at  $15^\circ\text{C}$  and the supernatant was then filtered on a nylon membrane (0.22  $\mu\text{m}$ , Millipore, Billerica, MA, U.S.A.). Extraction of INT-formazan was made in vials containing 5 ml of methanol. The INT-formazan was measured with a spectrophotometer adjusted at  $OD_{490}$ . The quantity of INT-formazan was expressed in  $\mu\text{mol}$  of INT-formazan produced per hour per  $\text{cm}^2$  of glass, clay bead or gravel particle, after subtracting values measured from sterile substrates (day 0).

### 2.5.3. Bacterial community structure

#### 2.5.3.1. DNA extraction

Microbial cells were detached from beads and gravel particles by shaking at 2500 rpm for 2 minutes in 10 mL of 0.8 % NaCl following classical procedures (e.g., Kinniment & Wimpenny, 1992; Parizzi et al., 2004). A 0.22  $\mu\text{m}$  filtration (polycarbonate filters) was performed to retrieve all cells and aggregates. For collected waters, 250 mL were filtered (0.22  $\mu\text{m}$  polycarbonate filters) per sample. Then, DNA was extracted from filters using the

FastDNA spin kit for soil (MP biomedical). The amount of extracted DNA was quantified by spectrophotometry using a Nanodrop ND1000 (Thermo Fisher Scientific, USA).

#### 2.5.3.2. ARISA

ARISA targets the Intergenic Transcribed Spacer (ITS) between the 16S (*rrs*) and the 23S rRNA (*rrl*) genes (Fisher and Triplett, 1999). Amplification was performed with primers ITSF (5'-GTCGTAACAAGGTAGCCGTA-3') and ITSReub (5'-GCCAAGGCATCCACC-3') (Cardinale et al., 2004). Primer ITSF was labeled with the dye 6-FAM on its 5' end. PCR reactions were carried out in 25  $\mu$ L reaction mixture using 10x DreamTaq Buffer (Thermoscientific bio), 0.5  $\mu$ M of each primer, 200  $\mu$ M of each dNTPs, 5% of DMSO and 2 U of DreamTaq DNA polymerase (Thermoscientific bio), and 20 ng of extracted DNA. PCR cycles were performed on a thermocycler (Veriti®, Applied Biosystems, California, USA) using the following program: 95°C for 3 min; 30 cycles consisting of 95°C for 1 min, 55°C for 1 min and 72°C for 2 min; and final elongation for 7 min at 72°C. Amplified fragments were separated by capillary electrophoresis on an 3730XL analyzer and using GeneScan™ 1200 LIZ® dye size standard (both from Applied Biosystems, Life technologies). Electrophoregrams were analyzed with the PeakScanner™ software v1.0 (Applied Biosystems, Life technologies). Only fragments above a threshold of 20 fluorescence units were considered. Primers ITSF and ITSReub were, respectively, complementary to positions 1423 to 1443 of *E. coli rrs* gene, and positions 38 to 23 *E. coli rrl* (Cardinale et al., 2004). Only DNA fragments from 265 to 1650 bp were considered. The Interactive binning algorithm developed as a R script (Ramette, 2009) was used to identify the best window size (WS=2) and the shift value (Sh=0.1) of all electrophoregrams. Then, the program binned the peaks from each frame and calculated the relative fluorescence intensity (RFI) of each combined peak by dividing its area by the sum of all peak areas obtained from the corresponding electrophoregram. All peaks with RFI values <0.09 % were removed from the analysis. From this analysis, a peak was considered reliable when it was obtained from at least two out of three replicates performed on the same DNA extract. A table of presence/absence of each peak (corresponding to OTU) for all samples was then built, and used to compute a Bray-Curtis dissimilarity matrix (Bray and Curtis, 1957).

#### 2.5.3.3. V5-V6 *rrs* meta-taxogenomics

According to ARISA results, an incubation of 7 days was found to match a period of stabilization of the bacterial communities developing on artificial substrates. V5-V6 *rrs* meta-



taxogenomics were thus performed on pooled DNA extracts from beads or gravel particles sampled from 7 day incubation periods, and from three aquaria per water type (for a total of 12 samples). The *rrs* DNA segments were sequenced by Illumina MiSeq technology (MrDNA company, Texas, USA) to generate 40,000 reads (i.e., 2 x 300-bp paired-end reads) per sample. Data processing was conducted using a pipeline inspired by standard operating procedure of Kozich et al. (2013) and realized with the MOTHUR software version 1.34 (Schloss et al., 2009). Raw sequences were discarded following 4 criteria: (1) read sizes shorter than 200 bp and longer than 400 pb; (2) reads containing homopolymers longer than 8 bp; (3) more than one sequence mismatch to barcode DNA tags and more than two mismatches with the forward sequencing primer; (4) reads containing ambiguous bases. Reads were then aligned against the SILVA database release 119 (Quast et al., 2013). Reads that could not be allocated to the V5-V6 area were deleted. A pre-cluster step was applied to reduce sequencing noise by clustering reads differing by only three bases (1 base every 100 bases) as recommended by Huse et al. (2010). Chimeric sequences were detected and removed using CHIMERA UCHIME (Edgar et al., 2011). Then, sequences were classified according to the SILVA database using a 80 % minimum bootstrap cutoff (Wang et al., 2007). Sequences that were classified as *Archaea*, *Eukaryota*, chloroplasts or mitochondria were deleted. DNA sequences were grouped into operational taxonomic units (OTUs) by a clustering at 97% similarity (Schloss and Westcott, 2011). The number of sequences per sample was finally made equal (i.e., n = 37,238) using a random resampling. Diversity analyses were realized at the genus level by assigning OTUs to genera. The efficacy of artificial substrates at trapping bacteria was estimated by computing the percentage of genera on glass, clay beads or gravel particles against their observed abundances (number of sequences) from the OTU water datasets. A Bray-Curtis dissimilarity matrix was also computed considering the relative abundances of genera on artificial substrates and tested waters.

## 2.6. Statistical analysis

The effects of artificial substrates, water types, and incubation periods (n=4: 7, 14, 21 and 28 days) on biofilm components (proteins and carbohydrates assays) and activities (FDA and INT assays) were tested using a three-way repeated measures analysis of variance (RM-ANOVA3) with “artificial substrates” and “water types” as main factors and time (n=4, days 7, 14, 21 and 28) as repeated factor. Data were log-transformed to satisfy the assumptions of homoscedasticity and normality. Results were considered as significant when  $\alpha < 0.05$ . Non-

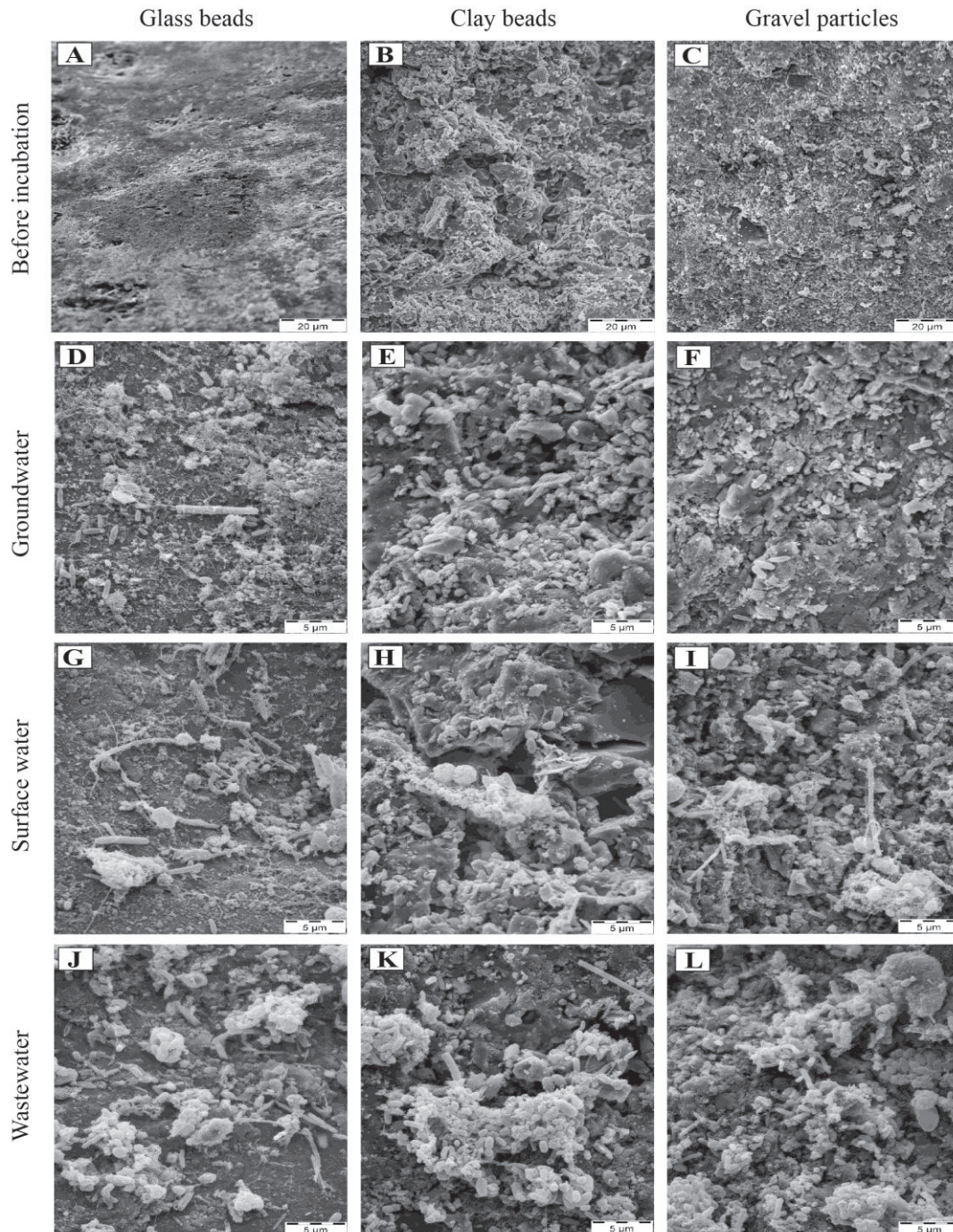


metric multidimensional scaling (NMDS) was computed from a Bray-Curtis dissimilarity matrix representing differences between ARISA profiles. The effects of “artificial substrate” and “water type” on bacterial community structures were tested using permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA; Anderson, 2001). Statistical tests were based on 999 permutations of the Bray-Curtis matrix and significance was accepted at  $\alpha < 0.05$ . Statistical tests were performed using R software (R Development Core Team 2008). Vegan R version (Oksanen et al., 2007) was used to perform NMDS and PERMANOVA.

### **3. RESULTS**

#### **3.1. Influence of treatments on trapped biofilm biomasses and activities**

Scanning electron microscopy analyses allowed comparing qualitatively surface roughness of the beads and gravel particles used in this study (Fig. 1). Glass beads were characterized by a smooth surface (Fig. 1A) whereas clay beads were irregular with large grooves and cracks (Fig. 1B). Surface roughness of gravel particles (Fig. 1C) was intermediate between those of glass and clay beads. The index of roughness measured for each substrate confirmed SEM observations. Roughness index of clay beads was the highest ( $1.76 \pm 0.18$ , mean  $\pm$  standard deviation,  $n=6$ ), followed by gravel particles ( $1.45 \pm 0.21$ ) and glass beads ( $1.24 \pm 0.07$ ).

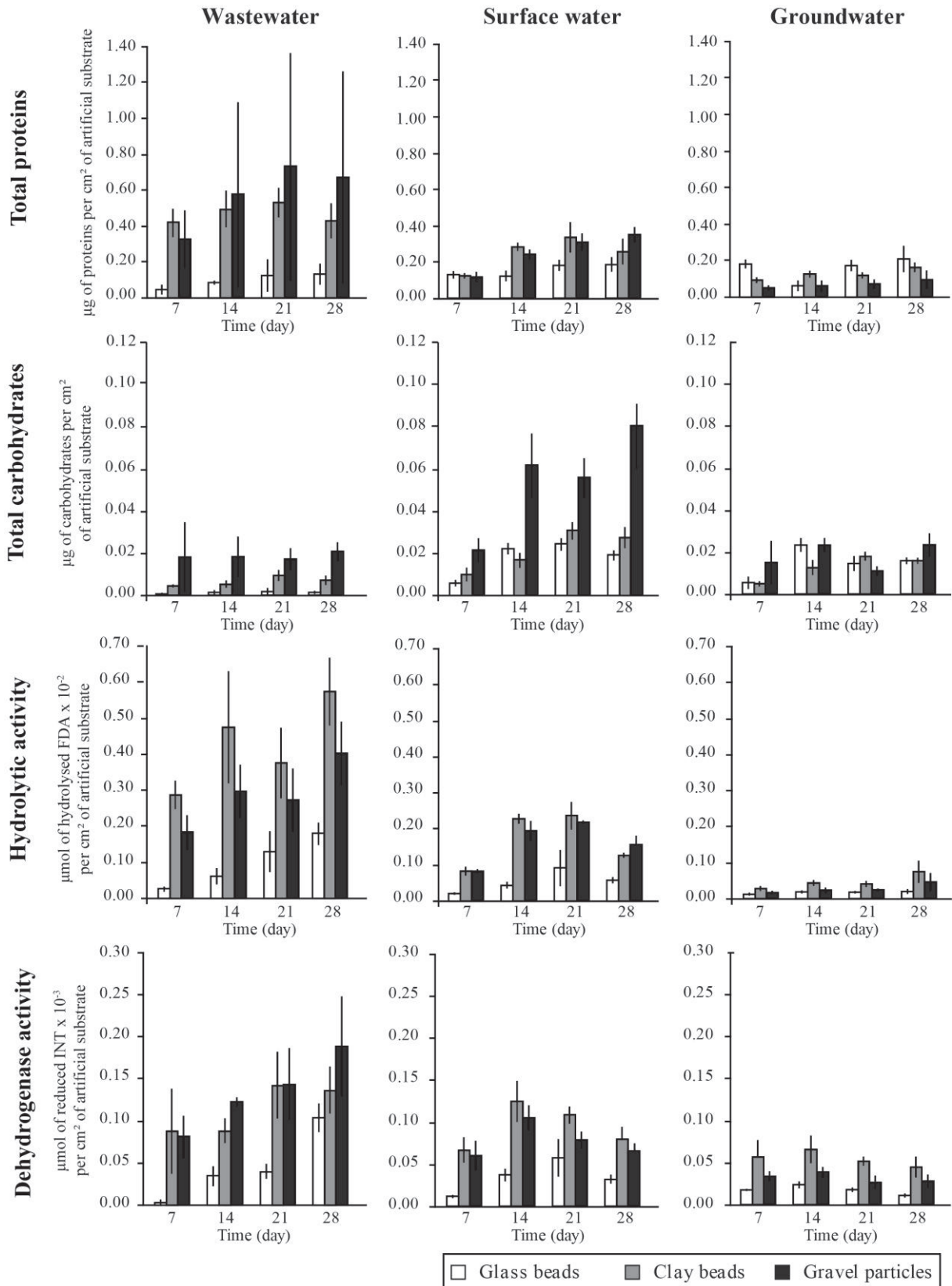


**Figure 1:** SEM pictures of the three substrates before (control) and after a 7 day incubation period in a water type. See Table 1 for a brief description of the water type. **A:** sterile glass bead; **B:** sterile clay bead; **C:** sterile gravel particle; **D:** Glass bead exposed to groundwater; **E:** Clay bead exposed to groundwater; **F:** Gravel particle exposed to groundwater; **G:** Glass bead exposed to surface water; **H:** Clay bead exposed to surface water; **I:** Gravel particle exposed to surface water; **J:** Glass bead exposed to wastewater; **K:** Clay bead exposed to wastewater; **L:** Gravel particle exposed to wastewater

There were significant differences in total proteins, hydrolytic activity and dehydrogenase activity among water types (Fig. 2; RM-ANOVA3, Water type effect,  $p < 0.01$ ). Highest enzymatic activities were obtained from beads and gravel particles incubated in wastewater, and the lowest from those incubated in groundwater. The same observations were made using total protein contents although this trend was less significant using glass beads (Fig. 2). SEM pictures suggested thicker biofilm on beads and gravel particles incubated in wastewater than groundwater (Fig. 1D to L). Interestingly, enzymatic activities and proteins contents matched differences in DOC concentrations between water types (Table 1) contrary to total carbohydrate contents. Indeed, highest carbohydrate values were obtained for surface water and not wastewater (Fig. 2).

Total protein content and activities measured on clay beads and gravel were not significantly different, but significantly greater than those on glass beads (Fig. 2, RM-ANOVA3, Substrate effect,  $p < 0.05$  for total protein content and  $p < 0.001$  for both activities). Total carbohydrate contents were higher on gravel particles than on the other substrates (Fig. 2, RM-ANOVA3, Substrate effect,  $p < 0.001$ ).

Biofilm variables (i.e., biofilm biomass and enzymatic activity) were significantly influenced by the incubation period (RM-ANOVA3, Time effect,  $p < 0.001$ ), and these changes were dependent upon water type (RM-ANOVA3, Water type x Time effect,  $p < 0.05$ ). Nevertheless, these changes were not associated with constant increases of biofilm biomass indicators and enzyme activities with time, whatever the substrate and water type (Fig. 2).



**Figure 2:** Total proteins and carbohydrates contents of biofilms and their matching hydrolytic and dehydrogenase activities measured during 7, 14, 21 and 28 days incubation periods in three water types (wastewater, surface water and groundwater). Biofilms were grown on glass and clay beads, and on gravel particles. Means and standard deviations ( $n = 3$  aquaria) are shown.

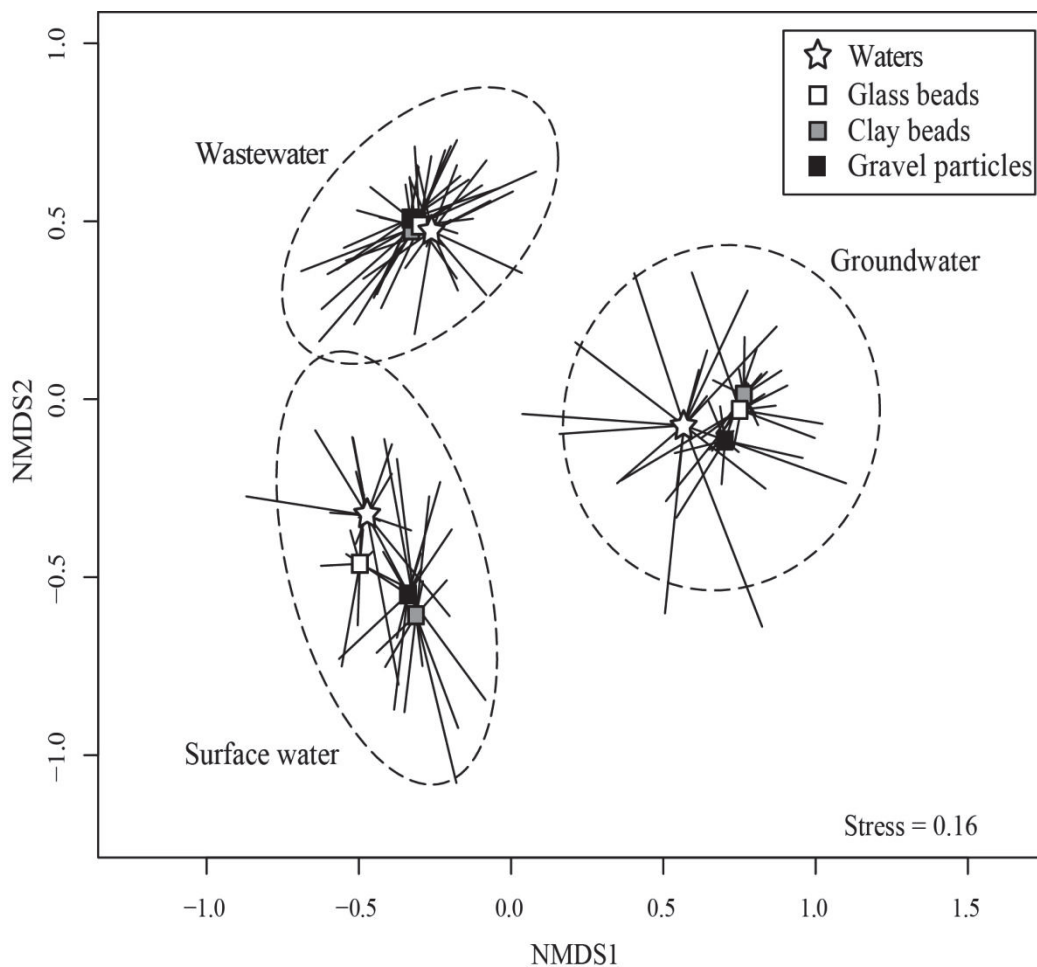


### 3.2. Artificial substrates and microbial community structures

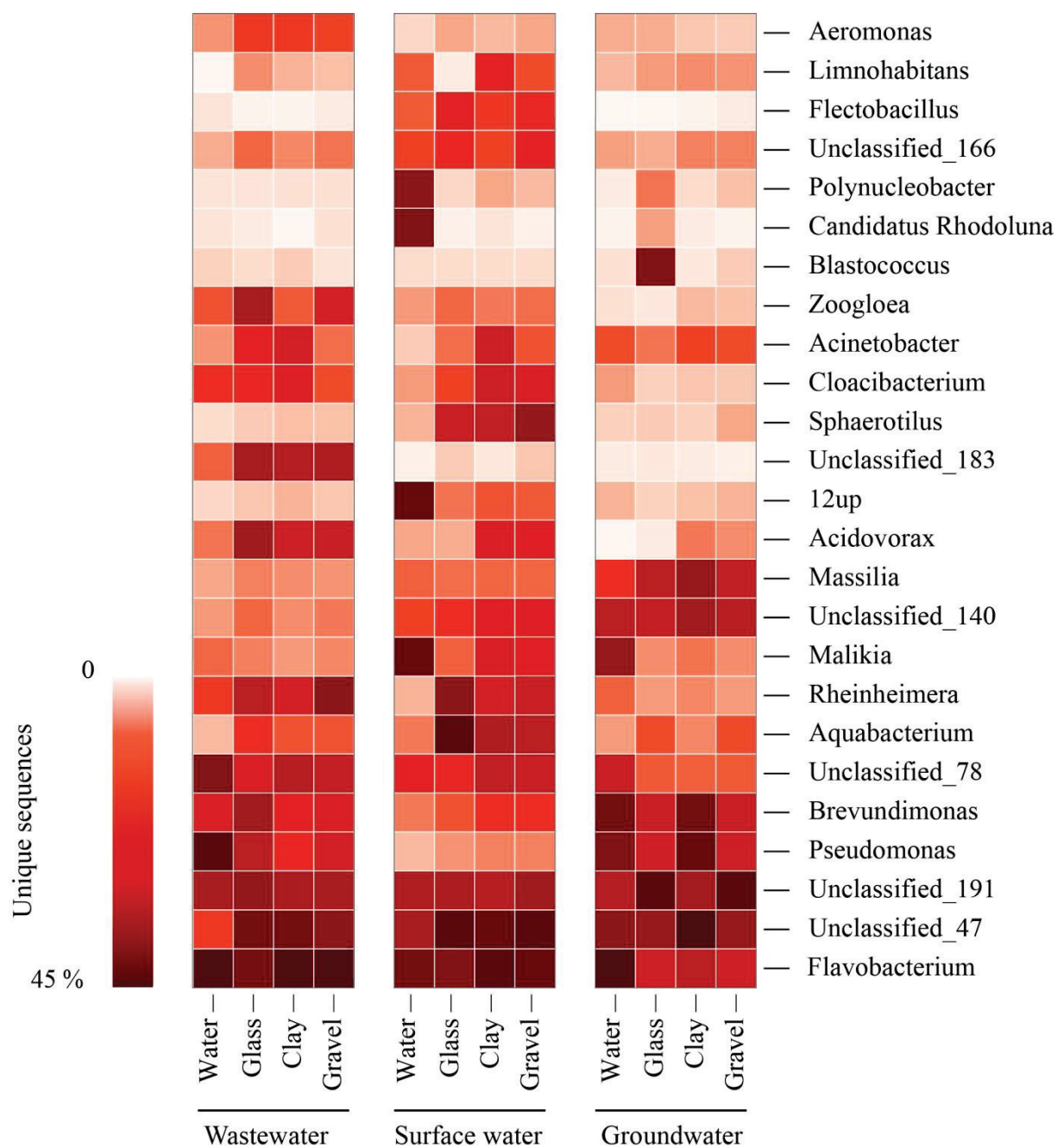
The ARISA dataset showed a total of 268 OTUs with an average number of 40 per sample. The NMDS ordination of ARISA community profiles clearly showed differences in structures according to water types (Fig. 3, PERMANOVA, water type effect,  $p < 0.001$ ). However, ARISA OTUs recorded from matching pairs of biofilm and water were not always in total agreement (PERMANOVA, pair-wise comparisons for ARISA community profiles obtained from artificial substrates and waters for each tested water type,  $p < 0.01$ ). In wastewater, ARISA structures inferred from biofilms developing on the three artificial substrates were not significantly different (PERMANOVA, Substrate pair-wise comparison,  $p > 0.56$ ). ARISA structures of biofilm developing on clay beads and gravel particles were also not significantly different (PERMANOVA, Substrate pair-wise comparison,  $p > 0.05$ ) both in groundwater and in surface water. However, they significantly diverged from ARISA structures of biofilm developing on glass beads (PERMANOVA, Substrate pair-wise comparisons,  $p < 0.05$ ) in these two water types.

Bacterial genera per water type and recovered from biofilms developing on beads and gravel particles, exposed to the three water types after a 7 day incubation period, were inferred from V5-V6 *rrs* DNA sequences (meta-taxogenomic) analyses. A total of 446,856 V5-V6 *rrs* sequences were generated representing 135,745 OTUs (identical sequences) that were allocated to 638 bacterial genera and 197 unclassified genera. More than 75% of genera that were recovered with at least four *rrs* sequences in a water type were captured by the three substrates (Fig. S2). All substrates captured the genera that had yielded 6, 13 and 9 sequences for wastewater, surface water and groundwater, respectively (Fig. S2). The efficacy of beads and gravel particles at capturing bacteria from a genus according to its relative abundance in tested water is shown in Fig. 4. The 25 most abundant genera are shown (representing 87% of the total sequences in the meta-taxogenomic dataset). Relative proportions of *rrs* sequences per genera were similar between artificial substrates and matching waters. Still, some genera increased (e.g. *Acidovorax*) or decreased (e.g. *Malikia*) in proportion on artificial substrates. For instance, genera such as *Polynucleobacter*, *Candidatus Rhodoluna* and *Blastococcus* exhibited higher proportions on glass beads than in groundwater whereas genera such as *Limnohabitans* did not develop on glass beads exposed to surface water (Fig. 4). Comparisons of relative abundances of genera showed the higher efficacy of clay beads and gravel particles than those of glass beads at capturing bacterial community structures of water types. As observed by ARISA, V5-V6 *rrs* structures inferred from wastewater and biofilms were most

similar for clay beads (67% of similarity) and gravel particles (64% of similarity). In comparison, glass beads gave the lowest recovery score (43% of similarity). V5-V6 *rrs* structures obtained from surface water showed 45%, 45% and 36% of similarities with those from biofilms on clay beads, gravel particles and glass beads, respectively. Those of groundwater showed 48%, 55% and 38% of similarities with those from biofilms of clay beads, gravel particles and glass beads, respectively.



**Figure 3:** NMDS illustrating the ordination of ARISA OTU profiles per water type and 7, 14, 21 and 28 days incubation periods of the biofilms growing on glass or clay beads, or gravel particles (stress value: 0.16). Symbols (i.e. stars and squares) correspond to the centers of gravity of ARISA OTU profiles obtained at the 4 incubation periods. Ellipses show the 95% confidence intervals.



**Figure 4:** Heatmap representing the percentages of *rrs* sequences allocated to the 25 most common genera recovered from the samples (waters and biofilms). A darker color corresponds to a higher number of sequences, and thus a higher presence of the corresponding genera in the dataset.

## 4. DISCUSSION

This study was performed with the aim of identifying a substrate which could allow trapping microorganisms that could inform us on groundwater ecological and sanitary

qualities. Meta-taxogenomic and ARISA analyses showed that the tested artificial substrates, glass or clay beads, or gravel particles, can favor biofilm formation and capture significant parts of the bacterial diversity found among waters. Interestingly, these substrates were found attaching cells from genera such as *Pseudomonas* and *Aeromonas* which can include hazardous species such as *P. aeruginosa* and *A. caviae*. According to our initial working hypothesis, some substrates were better than others at favoring biofilm development and capturing the most significant parts of the initial bacterial diversity of the tested waters. In particular, glass beads were less efficient than the other two substrates. These differences between substrates are likely due to the lower roughness of glass beads compared with clay beads and gravel particles as highlighted by roughness indices and SEM observations. The influence of roughness on biofilm development was reported in other studies (Garrett et al., 2008; Gharechahi et al., 2012; Percival and al., 1999; Whitehead and Verran, 2009). The greater roughness of clay beads and gravel particles likely increased adhesion of bacteria but could also have increased the total surface area (and habitats) available for this adhesion process. Although roughness was probably the most important property which could explain our results, other physico-chemical surface properties such as hydrophobicity might have influenced the adhesion of bacteria on substrates (e.g., Donlan 2002).

Our results showed that the three artificial substrates were able to capture most genera present in water. Nevertheless, the relative abundances of those genera differed between substrate types. The *rrs* meta-taxogenomic analyses showed that bacterial community structures on clay beads and gravel particles were more similar to those inferred from the tested waters (between 45 and 67% of similarity for the three waters) than those from glass beads (between 36 and 43% of similarity for the three waters). Thus, substrate type had some influence on the trapping efficacy. These results are different from those of Lee et al. (2014), Witt et al. (2011), Zhang et al. (2014) which reported no change in bacterial communities according to substrate type (e.g., glass slides, ceramic tiles or sediments). Still, Zhang et al. (2014) highlighted a significant influence of substrate type (i.e., Aluminium, PEEK, PVC, PTFE, stainless steel, titanium) on bacterial diversity in early stages of biofilm growth (first 3 days), but this effect decreased with the incubation period (from 3 to 6 days). This phenomenon was considered related to biofilm development and the formation of a layer favorable for the adhesion of bacteria on inert surfaces. In our study, this could explain the similar ARISA community structures obtained from biofilms developing on gravel particles and clay beads after 1 week. For glass beads in which biofilm development may be slower, greater differences between ARISA profiles were observed over time.



The influence of carbon concentration on biofilm growth was evident on clay beads and gravel particles but not on glass beads. Despite the promising results obtained from incubation of glass beads in groundwater (Mermillod-Blondin et al., 2013), our study highlighted some limitations of using this substrate for the assessment of aquatic trophic conditions. While wastewaters were expected to increase biofilm development more than oligotrophic groundwater, glass beads did not reveal any consistent differences in community activity and biomass among water types. In contrast, biofilm biomass was found increasing on gravel particles and clay beads according to the organic carbon status of the water types. Clay beads and gravel particles thus appeared more efficient substrates than glass beads for evaluating the incidence of potential nutrients on biofilm formation among aquatic ecosystems. It is also to be noted that an incubation period of 7 days was found sufficient to obtain reliable and reproducible biofilm development on clay beads and gravel particles from groundwater. Clay beads and gravel particles will thus allow investigating diversity changes in a week instead of 33 weeks as reported by Williamson et al. (2012); or 8 weeks for Mermillod-Blondin et al. (2013) or between 12 and 60 weeks according to Iribar et al. (2015). In terms of indicators of biofilm development, total protein contents and microbial activities (dehydrogenase and hydrolytic activities) were found to match better increases in biofilm density than total carbohydrate contents which are related to their EPS (exopolysaccharides) matrix. Carbohydrate contents were not positively related to the DOC concentrations measured in the tested waters, confirming previous studies performed on groundwater (Foulquier et al., 2011 and Mermillod-Blondin et al., 2013). As the EPS matrix and the associated carbohydrates can be impacted by a wide range of environmental factors including variable microbial community responses towards nutrient imbalance (Flemming and Wingender, 2010), carbohydrate content was probably less influenced by DOC concentrations than by other factors in the present experiment. Indeed, the higher total carbohydrate contents measured on gravel particles than glass and clay beads suggested that the nature of the substrate (beads and gravel particles) had a more important influence on EPS production than DOC concentrations.

## **5. CONCLUSION**

Biofilms developing on clay beads and gravel particles were found efficient to (1) evaluate the trophic status of groundwater ecosystems using simple protein and activity

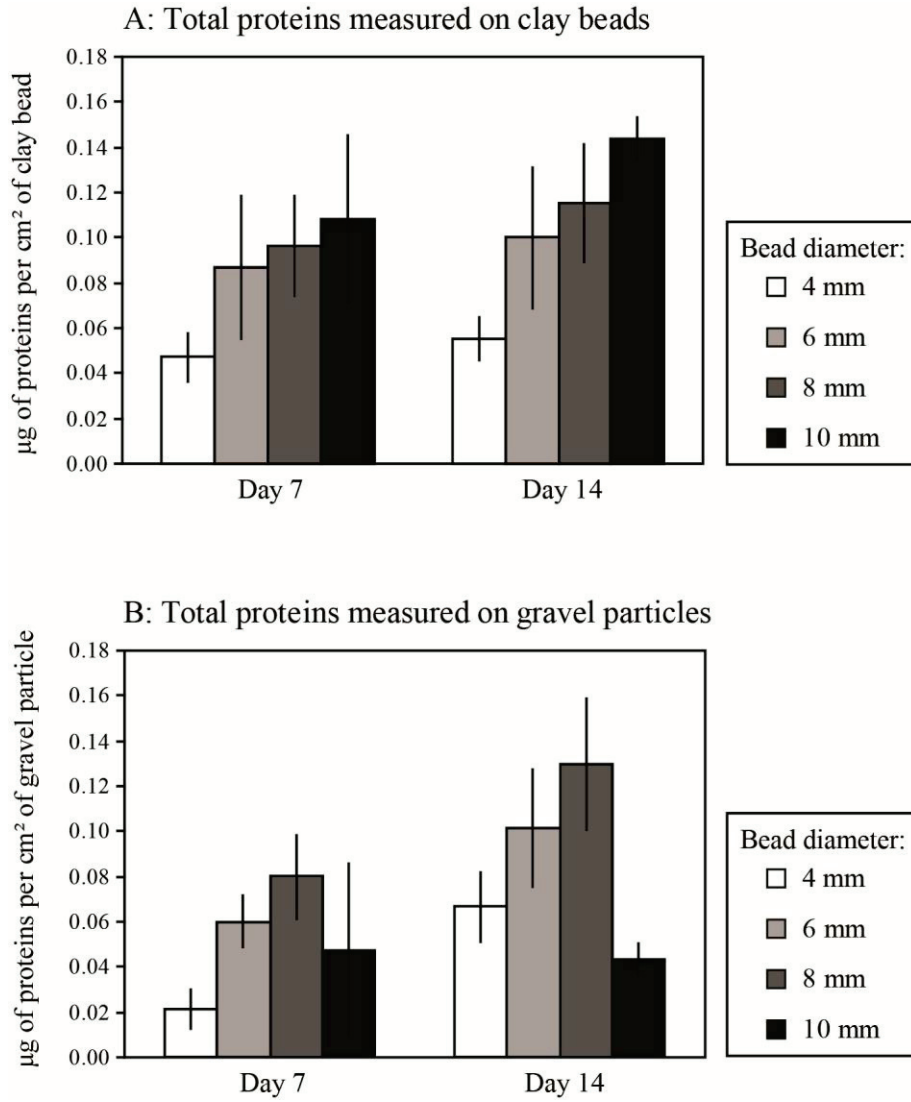
assays, and (2) track microbial groups that could be indicators of ecological quality changes. Several processes linked to species-sorting mechanisms and physiological preferences made obtaining a complete match between bacterial communities in waters and those developing on these substrates unrealistic (e.g., Besemer et al., 2007, 2012; Jones et al., 2007; Lee et al., 2014). As highlighted by contrasting developments of genera such as *Acidovorax* and *Malikia*, bacterial groups do not have the same abilities (e.g., EPS production, presence of appendices like fimbriae, flagella and adhesins) at colonizing a solid surface (Donlan, 2002). Despite these differences, biofilms on gravel particles and clay beads had communities overlapping those observed in the tested waters. These substrates can thus be considered efficient trapping systems enabling inferences on trophic status (Williamson et al., 2012), biogeochemical functioning (e.g., detection of microorganisms involved in denitrification: Iribar et al., 2015 and Yan et al., 2003) or biological contaminations of groundwater ecosystems (Griebler and Avramov, 2015). Nevertheless, clay beads showed greater advantages over gravel particles for such monitoring. Among others, these beads have standardized spherical shapes which allow a more precise assessment of the variables that could impact biofilm development. Therefore, we recommend the use of clay beads for field studies that aim at evaluating groundwater microbial quality and ecosystem health and functioning.

## 6. ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the *Rhône-Alpes* region for Jérémy Voisin's Ph. D grant. This study was partly funded by ANR 11 CESA 012 "Cabres" (<http://www.graie.org/cabres/>), ANR 08 CESA 022 "Invasion" projects, Anses project "pyo-eau" #2011/1/137 of the "Programme Environnement-Santé-Travail" (French Ministers in charge of ecological and environmental issues), and Lyon Metropole within the framework of the experimental observatory for urban hydrology (OTHU, <http://www.graie.org/othu/>). We also thank Margot Jacquy, Romain Marti, Laurence Pagès, Mathilde Pigneret, Laurent Simon and Félix Vallier for their support and advice during laboratory work and data analyses. We also wish to thank the referees for their constructive comments that improved the quality of the manuscript.

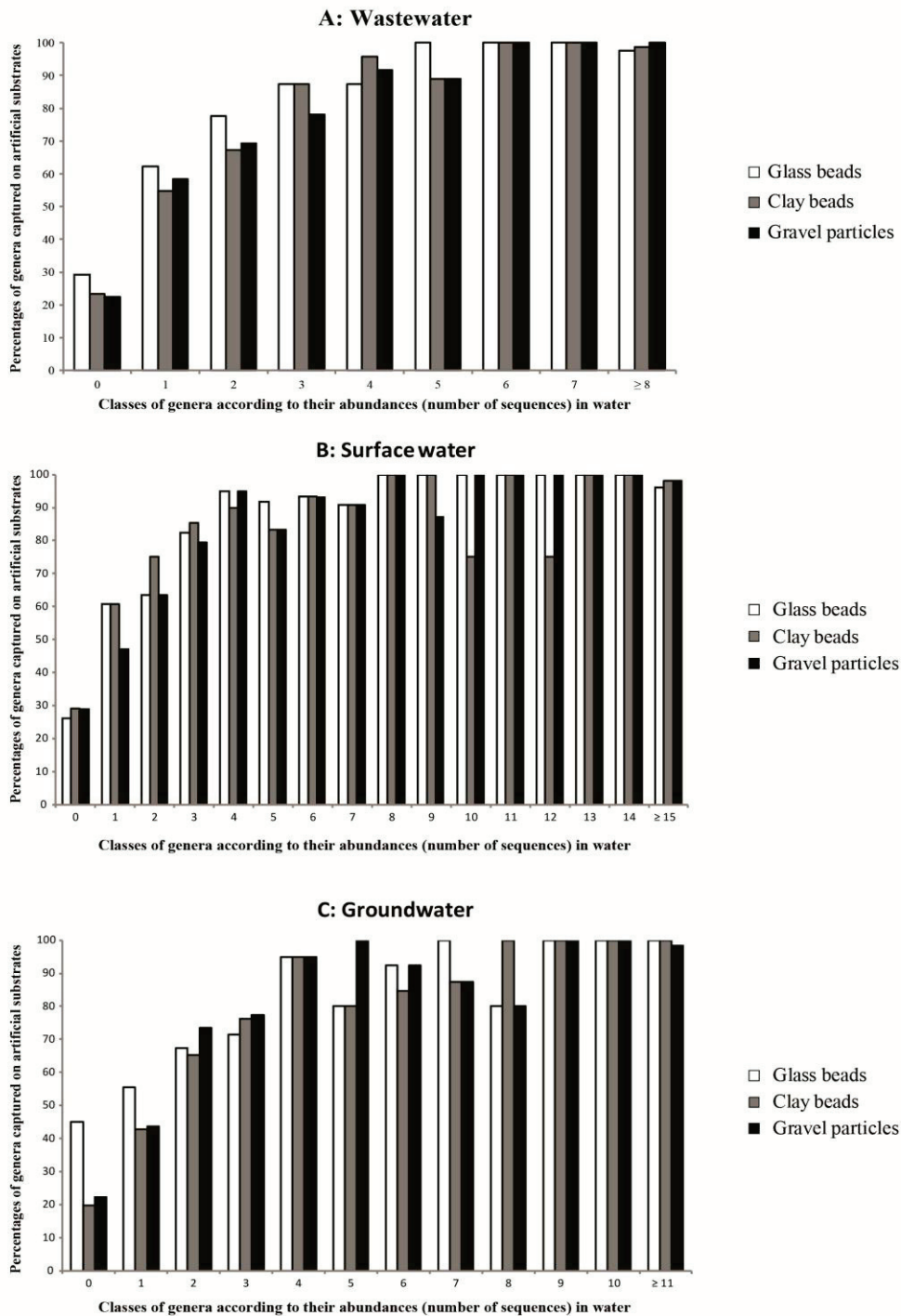
## 7. SUPPLEMENTARY MATERIALS

### Supplementary material 1



**SF1:** Biofilm total proteins measured on (A) clay beads and (B) gravels with diameters of 4, 6, 8 and 10 mm. Beads were incubated in surface water for periods of 7 and 14 days.

Supplementary material 2



**SF2:** Percentages of genera captured on artificial substrates according to their sequence abundances in (A) wastewater, (B) surface water and (C) groundwater. Data were obtained with *rrs* meta-taxonomic.

## 8. REFERENCES

- Alfreider, A., Krössbacher, M., Psenner, R., 1997. Groundwater samples do not reflect bacterial densities and activity in subsurface systems. *Water Res.* 31, 832-840. doi:10.1016/S0043-1354(96)00311-9
- Anderson, M.J., 2001. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecol.* 26, 32-46. doi:10.1111/j.1442-9993.2001.01070.pp.x
- Battin, T.J., 1997. Assessment of fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total esterase activity in natural stream sediment biofilms. *Sci. Total Environ.* 198, 51-60. doi:10.1016/S0048-9697(97)05441-7
- Bergey, E.A., 2006. Measuring the surface roughness of stream stones. *Hydrobiologia* 563, 247-252. Doi: 10.1007/s10750-006-0016-4.
- Besemer, K., Peter, H., Logue, J.B., Langenheder, S., Lindström, E.S., Tranvik, L.J., Battin, T.J., 2012. Unraveling assembly of stream biofilm communities. *ISME J.* 6, 1459-1468. doi:10.1038/ismej.2011.205
- Besemer, K., Singer, G., Limberger, R., Chlup, A.K., Hochedlinger, G., Hödl, I., Baranyi, C., Battin, T.J., 2007. Biophysical controls on community succession in stream biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 4966-4974. doi:10.1128/AEM.00588-07
- Bray, J.R., Curtis, J.T., 1957. An ordination of the upland forest communities of southern Wisconsin. *Ecol. Monogr.* 27, 325-349. doi:10.2307/1942268
- Burns, A., Ryder, D.S., 2001. Potential for biofilms as biological indicators in Australian riverine systems. *Ecol. Manag. Restor.* 2, 53-64. doi:10.1046/j.1442-8903.2001.00069.x
- Boyde, A., & Franc, F., 1981. Freeze-drying shrinkage of glutaraldehyde fixed liver. *J. microsc.* 122, 75-86. doi: 10.1111/j.1365-2818.1981.tb01244.x
- Cardinale, M., Brusetti, L., Quatrini, P., Borin, S., Puglia, A.M., Rizzi, A., Zanardini, E., Sorlini, C., Corselli, C., Daffonchio, D., 2004. Comparison of different primer sets for use in automated ribosomal intergenic spacer analysis of complex bacterial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 6147-6156. doi:10.1128/AEM.70.10.6147-6156-2004
- Chapelle, F.H., 2001. *Ground-water microbiology and geochemistry*, second edition. John Wiley & Sons
- Cho, J.C., Kim, S.J., 2000. Increase in bacterial community diversity in subsurface aquifers receiving livestock wastewater input. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 956-965. doi:10.1128/AEM.66.3.956-965.2000

- Claret, C., 1998. Hyporheic biofilm development on artificial substrata, as a tool for assessing trophic status of aquatic systems: first results. *Annls. Limnol.* 34, 119-128. doi: 10.1051/limn/1998011
- Danielopol, D.L., Gibert, J., Griebler, C., Gunatilaka, A., Hahn, H.J., Messana, G., Notenboom, J., Sket, B., 2004. Incorporating ecological perspectives in European groundwater management policy. *Environ. Conserv.* 31, 185-189. doi:10.1017/S0376892904001444
- Donlan, R.M., 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emer. Infect. Dis.* 8, 881-890. doi:10.3201/eid0809.020063
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28, 350-356. doi:10.1021/ac60111a017
- Edgar, R.C., Haas, B.J., Clemente, J.C., Quince, C., Knight, R., 2011. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* 27, 2194-2200. doi:10.1093/bioinformatics/btr381
- Fisher, M.M., Triplett, E.W., 1999. Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 4630-4636.
- Flemming, H.-C., Wingender, J., 2010. The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 623-633. doi:10.1038/nrmicro2415
- Fontvieille, D.A., Outaguerouine, A., Thevenot, D.R., 1992. Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of microbial activity in aquatic systems: Application to activated sludges. *Environ. Technol.* 13, 531-540. doi:10.1080/09593339209385181
- Foulquier, A., Mermillod-Blondin, F., Malard, F., Gibert, J., 2011. Response of sediment biofilm to increased dissolved organic carbon supply in groundwater artificially recharged with stormwater. *J. Soils Sediments* 11, 382-393. doi:10.1007/s11368-010-0323-2
- Garrett, T.R., Bhakoo, M., Zhang, Z., 2008. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Prog. Nat. Sci.* 18, 1049-1056. doi:10.1016/j.pnsc.2008.04.001
- Gharechahi, M., Moosavi, H., Forghani, M., 2012. Effect of surface roughness and materials composition on biofilm formation. *J. Biomater. Nanobiotechnol.* 3, 541-546. doi:10.4236/jbnb.2012.324056
- Gibert, J., 2001. Basic attributes of groundwater ecosystems. In: Griebler, C., Danielopol, D.L., Gibert, J., Nachtnebel, H.P., Notenboom, J. (Eds.), *Groundwater ecology: a tool for management of water resources*. Official Publication of the European Community, Luxembourg, pp.39-52.
- Goldscheider, N., Hunkeler, D., Rossi, P., 2006. Review: Microbial biocenoses in pristine aquifers and an assessment of investigative methods. *Hydrogeol. J.* 14, 926-941. doi:10.1007/s10040-005-0009-9

- Grasshoff K., Ehrhardt M., Kremling K., 1999. *Methods of seawater analysis*, third edition. Wiley-VCH. doi: 10.1002/9783527613984
- Griebler, C., Avramov, M., 2015. Groundwater ecosystem services: a review. *Freshw. Science*. 34, 355-367. doi:10.1086/679903.
- Griebler, C., Lueders, T., 2009. Microbial biodiversity in groundwater ecosystems. *Freshw. Biol.* 54, 649-677. doi:10.1111/j.1365-2427.2008.02013.x
- Griebler, C., Lueders, T., Liebich, J., 2006. Development of an aquifer DNA microarray for the biological assessment of groundwater ecosystems. In *European Groundwater Conference*, Vienna (pp. 22-23).
- 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. *Aquat. Microb. Ecol.* 28, 117-129. doi:10.3354/ame028117
- Griebler, C., Stein, H., Kellermann, C., Berkhoff, S., Brielmann, H., Schmidt, S., Selesi, D., Steube, C., Fuchs, A., Hahn, H.J., 2010. Ecological assessment of groundwater ecosystems - Vision or illusion? *Ecol. Eng.* 36, 1174-1190. doi:10.1016/j.ecoleng.2010.01.010
- Harrod, J.J., Hall, R.E., 1962. A method for determining the surface areas of various aquatic plants. *Hydrobiologia* 157, 85-87. doi: 10.1007/BF00046315.
- Hartland, A., Fenwick, G.D., Bury, S., 2011. Tracing sewage-derived organic matter into a shallow groundwater food web using stable isotope and fluorescence signatures. *Mar. Freshw. Res.* 62, 119-129. doi: 10.1071/MF10110
- Houri-Davignon, C., Relexans, J.-C., Etcheber, H., 1989. Measurement of actual electron transport system (ETS) activity in marine sediments by incubation with INT. *Environ. Technol. Letters* 10, 91-100. doi: 10.1080/09593338909384722
- Huse, S.M., Welch, D.M., Morrison, H.G., Sogin, M.L., 2010. Ironing out the wrinkles in the rare biosphere through improved OTU clustering. *Environ. Microbiol.* 12, 1889-1898. doi:10.1111/j.1462-2920.2010.02193.x
- Iribar, A., Hallin, S., Sánchez-Pérez, J.M., Enwall, K., Poulet, N., Garabétian, F., 2015. Potential denitrification rates are spatially linked to colonization patterns of nosZ genotypes in an alluvial wetland. *Ecol. Eng.* 80, 191-197. doi:10.1016/j.ecoleng.2015.02.002
- Iribar, A., Sánchez-Pérez, J.M., Lyautey, E., Garabétian, F., 2008. Differentiated free-living and sediment-attached bacterial community structure inside and outside denitrification hotspots in the river-groundwater interface. *Hydrobiologia* 598, 109-121. doi:10.1007/s10750-007-9143-9

- Jones, P.R., Cottrell, M.T., Kirchman, D.L., Dexter, S.C., 2007. Bacterial community structure of biofilms on artificial surfaces in an estuary. *Microb. Ecol.* 53, 153-162. doi:10.1007/s00248-006-9154-5
- Kinniment, S.L., Wimpenny, J.W., 1992. Measurements of the distribution of adenylate concentrations and adenylate energy charge across *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl. Env. Microbiol.* 58, 1629-1635.
- Korbel, K.L., Hose, G.C., 2011. A tiered framework for assessing groundwater ecosystem health. *Hydrobiologia* 661, 329-349. doi:10.1007/s10750-010-0541-z
- Kozich, J.J., Westcott, S.L., Baxter, N.T., Highlander, S.K., Schloss, P.D., 2013. Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq illumina sequencing platform. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 5112-5120. doi:10.1128/AEM.01043-13
- Lee, O.O., Wang, Y., Tian, R., Zhang, W., Shek, C.S., Bougouffa, S., Al-Suwailem, A., Batang, Z.B., Xu, W., Wang, G.C., Zhang, X., Lafi, F.F., Bajic, V.B., Qian, P.-Y., 2014. In situ environment rather than substrate type dictates microbial community structure of biofilms in a cold seep system. *Sci. Rep.* 4, 3587. doi:10.1038/srep03587
- Ludvigsen, L., Albrechtsen, H.J., Ringelberg, D.B., Ekelund, F., Christensen, T.H., 1999. Distribution and composition of microbial populations in a landfill leachate contaminated aquifer (Grindsted, Denmark). *Microb. Ecol.* 37, 197-207. doi:10.1007/s002489900143
- Mermillod-Blondin, F., Foulquier, A., Maazouzi, C., Navel, S., Negrutiu, Y., Vienney, A., Simon, L., Marmonier, P., 2013. Ecological assessment of groundwater trophic status by using artificial substrates to monitor biofilm growth and activity. *Ecol. Indic.* 25, 230-238. doi: 10.1016/j.ecolind.2012.09.026
- Murdock, J.N., Dodds, W.K., 2007. Linking benthic algal biomass to stream substratum topography. *J. Phycol.* 43, 449-460. doi:10.1111/j.1529-8817.2007.00357.x
- Oksanen, J., Kindt, R., Legendre, P., O'Hara, B., 2007. The vegan package. *Community ecology package*, R package version 1.8-5
- Paerl, H.W., Dyble, J., Moisander, P.H., Noble, R.T., Piehler, M.F., Pinckney, J.L., Steppe, T.F., Twomey, L., Valdes, L.M., 2003. Microbial indicators of aquatic ecosystem change: current applications to eutrophication studies. *FEMS Microbiol. Ecol.* 46, 233-246. doi:10.1016/S0168-6496(03)00200-9
- Parizzi, S.Q.F., Andrade, N.J., Silva, C.A.S., Soares, N.F.F., Silva, A.M.S, 2004. Bacterial adherence to different inert surfaces evaluated by epifluorescence microscopy and plate count method. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 47, 77-83. doi: /10.1590/S1516-89132004000100011



- Percival, S.L., Knapp, J.S., Wales, D.S., Edyvean, R.G.J., 1999. The effect of turbulent flow and surface roughness on biofilm formation in drinking water. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 22, 152-159. doi:10.1038/sj.jim.2900622
- Peterson, G.L., 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* 83, 346-356. doi:10.1016/0003-2697(77)90043-4
- Pottu-Boumendil, J., 1989. *Microscopie électronique: principes et méthodes de préparation*. Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale.
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., Glockner, F.O., 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 41, D590-D596. doi:10.1093/nar/gks1219
- Ramette, A., 2009. Quantitative community fingerprinting methods for estimating the abundance of operational taxonomic units in natural microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 2495-2505. doi:10.1128/AEM.02409-08
- Risse-Buhl, U., Trefzger, N., Seifert, A.-G., Schönborn, W., Gleixner, G., Küsel, K., 2012. Tracking the autochthonous carbon transfer in stream biofilm food webs. *FEMS Microbiol. Ecol.* 79, 118-131. doi:10.1111/j.1574-6941.2011.01202.x
- Schloss, P.D., Westcott, S.L., 2011. Assessing and improving methods used in operational taxonomic unit-based approaches for 16S rRNA gene sequence analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 3219-3226. doi:10.1128/AEM.02810-10
- Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B., Lesniewski, R.A., Oakley, B.B., Parks, D.H., Robinson, C.J., Sahl, J.W., Stres, B., Thallinger, G.G., Van Horn, D.J., Weber, C.F., 2009. Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 7537-7541. doi:10.1128/AEM.01541-09
- Schurig, C., Melo, V.A., Miltner, A., Kaestner, M., 2014. Characterisation of microbial activity in the framework of natural attenuation without groundwater monitoring wells?: A new direct-push probe. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21, 9002-9015. doi:10.1007/s11356-013-1685-y
- Shen, Y., Chapelle, F.H., Strom, E.W., Benner, R., 2015. Origins and bioavailability of dissolved organic matter in groundwater. *Biogeochemistry* 122, 61-78. doi:10.1007/s10533-014-0029-4
- Tuchman, M.L., Stevenson, R.J., 1980. Comparison of clay tile, sterilized rock, and natural substrate diatom communities in a small stream in Southeastern Michigan, USA. *Hydrobiologia* 75, 73-79. doi:10.1007/BF00006564

- Voisin, J., Cournoyer, B., Mermillod-Blondin, F., 2015. Utilisation de billes de verre comme substrats artificiels pour la caractérisation des communautés microbiennes dans les nappes phréatiques : mise au point méthodologique. *La Houille Blanche*. 4, 52-57. doi:10.1051/lhb/20150046
- Wang, Q., Garrity, G.M., Tiedje, J.M., Cole, J.R., 2007. Naïve bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 5261-5267. doi: 10.1128/AEM.00062-07
- Wendland, F., Hannappel, S., Kunkel, R., Schenk, R., Voigt, H.J., Wolter, R., 2005. A procedure to define natural groundwater conditions of groundwater bodies in Germany. *Water Sci. Technol.* 51, 249-257.
- Whitehead, K.A., Verran, J., 2009. The effect of substratum properties on the survival of attached microorganisms on inert surfaces. In: *Marine and Industrial Biofouling*. pp. 13-33. doi:10.1007/978-3-540-69796-1\_2
- Williamson, W.M., Close, M.E., Leonard, M.M., Webber, J.B., Lin, S., 2012. Groundwater biofilm dynamics grown in situ along a nutrient gradient. *Ground Water* 50, 690-703. doi:10.1111/j.1745-6584.2011.00904.x
- Witt, V., Wild, C., Uthicke, S., 2011. Effect of substrate type on bacterial community composition in biofilms from the Great Barrier Reef. *FEMS Microbiol. Lett.* 323, 188–195. doi:10.1111/j.1574-6968.2011.02374.x
- Yan, T., Fields, M.W., Wu, L., Zu, Y., Tiedje, J.M., Zhou, J., 2003. Molecular diversity and characterization of nitrite reductase gene fragments (*nirK* and *nirS*) from nitrate- and uranium-contaminated groundwater. *Environ. Microbiol.* 5, 13–24. doi:10.1046/j.1462-2920.2003.00393.x
- Yu, R., Smets, B.F., Gan, P., MacKay, A.A., & Graf, J., 2014. Seasonal and spatial variations in microbial activity at various phylogenetic resolutions at a groundwater–surface water interface. *Can. J. Microbiol.* 60, 277-286. doi: 10.1139/cjm-2014-0048
- Zhang, W.P., Wang, Y., Tian, R.M., Bougouffa, S., Yang, B., Cao, H.L., Zhang, G., Wong, Y.H., Xu, W., Batang, Z., Al-Suwailem, A., Zhang, X.X., Qian, P.-Y., 2014. Species sorting during biofilm assembly by artificial substrates deployed in a cold seep system. *Sci. Rep.* 4, 6647. doi:10.1038/srep06647

## Conclusions du chapitre 2

Les tests effectués révèlent clairement que les bactéries se développent mieux sur les billes d'argiles et les graviers que sur les billes de verre. En effet, les concentrations en protéines et carbohydrates mais aussi les activités microbiennes mesurées sont supérieures sur ces deux substrats pour toutes les eaux étudiées. Il n'est pas étonnant d'observer ces résultats du fait des propriétés de surface des substrats artificiels choisis et notamment de la rugosité qui est un paramètre important dans l'adhésion des bactéries sur une surface et donc le développement du biofilm. Concernant la composition des communautés microbiennes, il est très facile avec les trois types de substrats artificiels de discriminer des communautés provenant d'eaux très différentes. En effet les similarités entre les communautés des eaux testées et les communautés des biofilms développés sont suffisamment élevées. De plus, il a été montré qu'à partir du moment où les genres bactériens étaient représentés avec quatre séquences ou plus dans les eaux, il y avait environ 75 % de chances de retrouver ces genres dans le biofilm développé sur les substrats artificiels.

Avec l'ensemble des résultats obtenus, les billes d'argile ont été choisies comme substrats artificiels pour mener des études sur le terrain. En effet, ce dispositif est validé pour (1) évaluer la qualité trophique des nappes phréatiques en utilisant le développement du biofilm et (2) capturer une diversité représentative de celle qui est naturellement dans les eaux étudiées. L'utilisation de substrats artificiels dans le cadre d'expérimentations de terrain nous permet donc d'obtenir un échantillonnage qui présente moins de biais notamment sur la variabilité lorsque l'on est dans des systèmes très perturbés. Le déploiement de substrats artificiels nous ouvre également la porte pour étudier des relations entre énergie et productivité (développement de biofilm par exemple) ou encore étudier l'impact des processus de sélection sur le développement et l'assemblage des communautés bactériennes.

# 4

## INFLUENCE DU CARBONE ORGANIQUE DISSOUS SUR LE DEVELOPPEMENT DES BIOFILMS ET LA DIVERSITE DES COMMUNAUTES MICROBIENNES

Dans ce dernier chapitre, nous avons déployé les substrats artificiels « billes d'argile » afin de quantifier l'effet de la hausse de la concentration en matière organique dissoute (carbone organique dissous : DOC et carbone organique dissous biodégradable : BDOC) liée à l'infiltration des eaux pluviales sur le développement et la diversité des communautés bactériennes dans les nappes phréatiques.

Les systèmes d'infiltration des eaux pluviales augmentent significativement la connectivité hydrologique entre la surface et la nappe phréatique (Thèse Foulquier 2009). De ce fait, les concentrations en matière organique dissoute sont généralement supérieures dans les nappes phréatiques impactées par ces systèmes que dans les nappes témoins (Datry et al. 2004; Foulquier et al. 2010; Mermillod-Blondin et al. 2013). De précédents travaux ont montré que la hausse de DOC stimulait la croissance et les activités des communautés microbiennes souterraines (Foulquier et al. 2011, Landa et al. 2013, Mermillod-Blondin et al. 2013). Même s'il ne semble pas que la hauteur de la ZNS ait un impact sur la rétention/consommation de la matière organique dissoute (voir chapitre 1), des différences de concentrations sont présentes dans les nappes phréatiques en fonction de la hauteur de la ZNS. Nous avons donc voulu tester, dans un premier temps, si la hausse de DOC et BDOC et son impact sur le développement et les activités des bactéries développées sur les substrats artificiels (voir chapitre 2) étaient régulés par la hauteur de la ZNS.

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés aux impacts potentiels de l'augmentation de la matière organique dissoute disponible (BDOC) sur la diversité des communautés bactériennes. En effet, les relations entre énergie (nutriments disponibles) et diversité ont été largement étudiées chez les macro-organismes et ont montré des patrons variables pouvant aller d'une absence de réponse de la diversité à un gradient d'énergie jusqu'à une augmentation linéaire de la diversité biologique avec la disponibilité en énergie. Les théories écologiques associées à la relation énergie-diversité semblent s'appliquer également chez les micro-organismes malgré de nombreux débats au cours des dernières décennies (Fuhrman 2009). Etudier ces relations dans les systèmes d'infiltration des eaux pluviales nous est apparu pertinent car les nappes phréatiques sont des milieux oligotrophes et les communautés bactériennes intrinsèques sont susceptibles d'être très sensibles à des changements de concentrations en matière organique. Dans ces conditions, nous avons supposé une relation positive entre énergie et diversité dans nos écosystèmes souterrains. En outre, nous avons aussi cherché à déterminer si la concentration en matière organique dissoute pouvait jouer un rôle de sélection dans l'assemblage et la composition des communautés

microbiennes en favorisant certains groupes bactériens au détriment d'autres groupes présents dans la communauté.

Les résultats de cette étude sur les liens entre matière organique et micro-organismes dans les nappes soumises à l'infiltration d'eau pluviale sont présentés sous la forme d'un article scientifique intitulé « Biofilm development indicators and *rrs* next generation sequencing datasets evidence groundwater bacterial diversity changes driven by dissolved organic matter transferred from managed aquifer recharge systems » en préparation pour soumission dans la revue « FEMS Microbiology Ecology ».

## Article 3

# **BIOFILM DEVELOPMENT INDICATORS AND *RRS* NEXT GENERATION SEQUENCING DATASETS EVIDENCE GROUNDWATER BACTERIAL DIVERSITY CHANGES DRIVEN BY DISSOLVED ORGANIC MATTER TRANSFERRED FROM MANAGED AQUIFER RECHARGE SYSTEMS**

**Jérémy VOISIN<sup>1,2</sup>, Benoit COURNOYER<sup>2</sup>, Antonin VIENNEY<sup>1</sup>, Florian  
MERMILLOD-BLONDIN<sup>1</sup>**

1- Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, ENTPE, UMR5023, Écologie des  
Hydrosystèmes Naturels et Anthropisés, Villeurbanne, F-69622, France

2- Université Lyon 1, VetAgro Sup, UMR CNRS 5557, & UMR INRA 1418, Ecologie Microbienne,  
Research Team "Bacterial Opportunistic Pathogens and Environment", Marcy L'Etoile, F-69280,  
France

*En préparation pour soumission dans*

*FEMS Microbiology Ecology*

## ABSTRACT

Through infiltration of stormwater runoff from surface to groundwater, managed aquifer recharge (MAR) practices tend to increase concentrations of dissolved organic matter (DOM) in groundwaters. Nutrients and energy availability are known to drive biodiversity of ecosystems, and are likely to impact bacterial communities of groundwaters. Aims were to investigate relationships between energy availability (DOC and BDOC concentrations), bacterial growth parameters and species richness of biofilms developing among groundwaters impacted by stormwater runoff. Six MAR sites of the Lyon conurbation (France) were used in the experimental design. Clay beads were introduced through piezometers in non-impacted (control) and MAR impacted groundwaters. Beads were incubated over a 10 days-long rainy period. Total proteins, dehydrogenase and hydrolytic activities were used to assess biofilm development on these beads. Next generation sequencing (NGS) of partial *rrs* PCR products (V5-V6) obtained from biofilm DNA extracts were used to infer species richness and taxa. Groundwaters enriched in BDOC due to MAR practices matched significant bacterial community diversity changes (species richness). Positive relations between BDOC concentrations and indicators of biofilm development (biomass and enzymatic activities) on clay beads were observed. The number of *rrs* reads allocated to the *alpha-proteobacteria*, *beta-proteobacteria* and *Bacteroidetes* were also significantly and positively correlated to BDOC. The vadose zone thickness limited the enrichment of groundwater with DOM, and was also related to changes in bacterial richness, biomass and activities. Indeed, artificial recharge significantly stimulated the development of bacteria in MAR sites with a thin vadose zone (< 3 meters) whereas this effect was less important in MAR sites with a thick vadose (> 10 meters). To our knowledge, this is the first demonstration that VZT influences bacterial growth and richness in groundwaters through a control of DOM availability in MAR systems.

## KEYWORDS

Nutrient-driven diversity changes; vadose zone thickness; artificial aquifer recharge; bacterial communities; artificial substrates; next-generation sequencing



# 1. INTRODUCTION

Energy availability is recognized as a major driver of diversity changes among macro-organisms (Gaston 2000; Evans et al. 2005, 2006; Cusens et al. 2012; Entling et al. 2012). In ecology, the species-energy theory (Wright 1983, Evans et al. 2005) is considered as a universal law stating that species richness correlates positively with energy availability. Despite many debates, there is now strong evidence that such classical ecological theories can be applied to the understanding of microbial ecology patterns (Fuhrman, 2009). The recent development of DNA fingerprinting methods associated to high-throughput sequencing technologies now enable the production of sufficiently deep and accurate datasets for describing microbial communities and their changing state over time and space. Indeed, Smith (2007) reviewed 70 published studies and concluded that diversity-productivity patterns were similar in micro- and macro-organisms. Nonetheless, the shape of the diversity-productivity relationship was variable depending on the studied micro-organisms and environments. It has been principally reported positive, negative or humped-shape relationships for aquatic microbial communities (Smith, 2007). Despite these descriptions, studies are lacking on groundwater ecosystems.

Groundwater ecosystems are among the most stable and energy-limited environments on Earth because of the lack of photosynthesis and the low input of organic matter originating from surface ecosystems (Gibert 1994; Griebler and Lueders, 2009). Nonetheless, connectivity and DOM (dissolved organic matter) transfers between surfaces and subterranean systems can be enhanced by managed aquifer recharge (MAR) practices. In urban environments, these practices were developed to collect stormwater runoff and infiltrate them through porous media in order to recharge aquifers (Marsalek and Chocat, 2002; Hunt et al. 2010). MAR practices have been shown to increase DOM in groundwaters over the levels of those that were not impacted (Datry et al. 2004; Foulquier et al. 2010; Mermillod-Blondin et al. 2013). DOM is the main source of food for micro-organisms in groundwater ecosystems (Goldscheider et al. 2006), and its increase can lead to denser and more active microbial communities (Foulquier et al. 2011, Landa et al. 2013). For example, Mermillod-Blondin et al. (2013) showed that the growth, the esterase and dehydrogenase activities of biofilms were stimulated by DOM enrichment associated with managed aquifer recharge in an urban context. Nevertheless, the influence of DOM supplied by MAR systems on microbial diversity was not investigated.

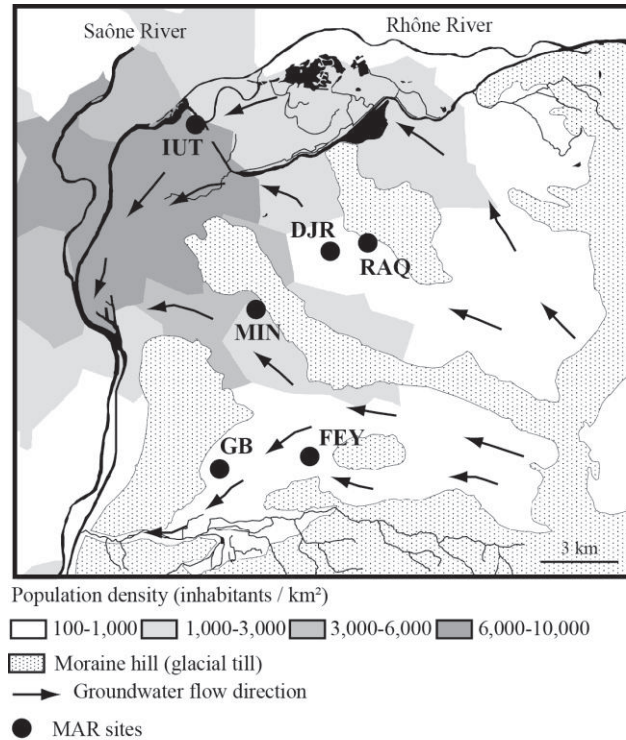
The aim of the present work was to evaluate bacterial diversity changes driven by DOM concentrations in groundwaters. A field experiment was conducted during a rainy period which impacted 6 MAR sites that were divided into two groups: (1) those with a thin vadose zone (< 3 m) and (2) those with a thick vadose zone (> 10 m). The vadose zone plays a key role on DOM retention during its transfer from surface to groundwater (Pabich et al. 2001; Shen et al. 2015). Selection of sites with different vadose zone thicknesses should lead to significant differences in DOM and potential energy availability (i.e., estimated by dissolved organic carbon -DOC- and biodegradable -DOC- concentrations) reaching the groundwater table. Artificial substrates (i.e., clay beads) were incubated in these MAR-impacted and non-impacted groundwaters. Clay beads were previously shown to be efficient artificial substrates that can allow reliable bacterial diversity analyses of groundwaters (Voisin et al. 2016). Microbial productivity and activities of the clay bead-induced biofilms could be monitored from biomass measurements (total proteins), and from esterase and dehydrogenase activities. Bacterial diversity was investigated through a next-generation sequencing (NGS) dataset of PCR amplified 16S rRNA gene segments generated from biofilm DNA extracts. According to Datry et al. (2005), we expected that DOM concentrations would be higher in MAR sites with a thin vadose zone in comparison with those with a thick vadose zone. Consequently, the hypothesis was that the influence of MAR practices on microbial biomass, activity and diversity should be highest in MAR sites with the thinnest vadose zone (< 3 m). This was confirmed, and allowed to further investigate correlations between DOM concentrations over the 6 sites and bacterial richness of the clay beads biofilms developing in groundwaters.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. Sites

Managed aquifer recharge (MAR) sites were located on the eastern aquifer of the Lyon metropolitan area, France (Fig. 1). This aquifer (catchment area: 314km<sup>2</sup>) consists of three corridors of highly permeable glacio-fluvial sediments (hydraulic conductivity 10<sup>-3</sup>-10<sup>-2</sup> m/s) separated by moraine hills which are much less permeable (hydraulic conductivity 10<sup>-5</sup>-10<sup>-8</sup> m/s) (Foulquier et al. 2009). The aquifer is artificially recharged using stormwater runoff and MAR systems. This compensates for the reduced recharge caused by the sealing of urban surfaces. Artificial infiltration represents at least 10% of the annual flux of groundwater which

was estimated at 69.1 million of m<sup>3</sup> (Foulquier et al. 2009). The MAR sites of this study were made of settling and infiltration basin that collected stormwaters from residential, commercial, and/or industrial areas.



**Figure 1:** Selected MAR sites feeding the eastern aquifer of the Lyon metropolitan area, France.

## 2.2. Experimental design

Six MAR sites were selected (Table 1): 3 with vadose zone thicknesses < 3 meters (IUT, Grange Blanche (GB) and Minerve (MIN) basins) and 3 with vadose zone thicknesses > 10 meters (Django Reinhardt (DJR), Raquin (RAQ) and Feyzin (FEY) basins). Each MAR site is equipped with two wells, one located in the aquifer zone impacted by artificial stormwater recharge and one in the non-impacted zone. Clay beads were incubated in these wells. These clay beads favor biofilm developments from groundwater microflora (Voisin et al. 2016), and enable a monitoring of parameters such as microbial productivity (total proteins), and esterase and dehydrogenase activities. Three independent bags containing clay beads were inserted in each well to have replicates. Incubation lasted 10 days during a rainy period in September 2015. For each MAR site, groundwaters (impacted and non-impacted) were also collected from the same wells but at three dates over the clay bead incubation period (Day 0, Day 5 and Day 10). Groundwaters were sampled using an immersed pump (PP36 inox, SDEC, Reignac-sur-Indre, France). The first 50 pumped liters were used to rinse

the sampling equipment and were discarded. The following liter was kept for the chemical analyses. All samples were collected and stored in pre-combusted glass bottles and brought back to the laboratory in an isotherm box at 4°C.

**Table 1:** Characteristics of the 6 MAR sites

MAR sites	Characteristics		
	Catchment area (ha)	Infiltration bed surface (m <sup>2</sup> )	Vadose zone thickness (m)
DJR	185	8750	11
FEY	315	2550	12
RAQ	26	285	17
MIN	165	4200	2
IUT	2.5	850	2.5
GB	300	3200	< 1

### 2.3. Water physico-chemistry

DOC (dissolved organic carbon) was determined using a carbon analyzer (multi N/C® 3100, Analytik Jena, Jena, Germany) based on thermocatalytic oxidation (850°C) of organic carbon and infrared detection of CO<sub>2</sub>, after removal of dissolved inorganic C with HCl. Biodegradable DOC (BDOC) was determined by the method of Servais et al. (1987, 1989) following Mermillod-Blondin et al. (2015). Water samples (100 mL) were filtered through a 0.2 µm polycarbonate membrane and incubated with a bacterial inoculum at 20°C for 30 days in the dark. The same bacterial inoculum was used in all incubated samples and consisted in a 1 mL suspension of autochthonous bacteria (collected from the 0.2 µm filters used previously for water sample filtration). At the start of the incubation, DOC concentration was measured on the inoculated solution filtered again through a 0.2 µm filter. After 30 days, the same procedure was followed to determine the remaining DOC concentration after incubation (assumed to represent the refractory dissolved organic carbon, RDOC). BDOC was then calculated as the difference in DOC concentrations before and after the 30 day incubation period.

### 2.4. Microbial analysis

#### 2.4.1 Microbial biomass

Microbial biomasses on clay beads were assessed from Lowry's total protein assays. Total proteins were measured using the Sigma Protein Assay Kit P-5656 (Sigma Diagnostics, St Louis, MO, USA) according to Peterson (1977). Five clay beads were treated with 4 mL of

a 50 % solution of Lowry's reagent for 20 min. A vigorous shaking was applied to improve the contact between proteins on the beads and the reagent. Then, 0.5 mL of Folin reagent was added, followed by a 30 min color reaction. OD<sub>750</sub> was measured using an Aquamate spectrophotometer (ThermoSpectronic, Cambridge, UK) and values were compared with a calibration curve performed with bovine serum albumin. Total proteins were expressed in µg of proteins per cm<sup>2</sup> of clay bead, after subtracting values measured from sterile substrates.

#### 2.4.2. Microbial activity

Hydrolytic activity of biofilm was estimated using the fluorescein diacetate (FDA) hydrolysis method (Fontvieille et al. 1992). Five clay beads 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 at 15°C for 1–3 h until a green fluorescein coloration appeared to ensure that enzymatic activity was not limited by FDA concentration. The reaction was stopped by freezing the sample after the addition of 3 ml of acetone (Battin, 1997). Fluorescein concentration was estimated from the absorbance of the filtered supernatant (0.45 µm, HAWP, Millipore, Billerica, MA, U.S.A.) measured at 490 nm and hydrolytic activity was expressed in µmol of FDA hydrolyzed per hour and per cm<sup>2</sup> of clay bead, after subtracting values measured from sterile substrates.

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). Five clay beads were incubated in a 0.02% INT solution for 2 h at 15°C and the supernatant was then filtered on a nylon membrane (0.22 µm, Millipore, Billerica, MA, U.S.A.). Extraction of INT-formazan was made in vials containing 5 ml of methanol. The INT-formazan was measured with a spectrophotometer adjusted at OD<sub>490</sub>. The quantity of INT-formazan was expressed in µmol of INT-formazan produced per hour and per cm<sup>2</sup> of clay bead, after subtracting values measured from sterile substrates.

#### 2.4.3. 16S rRNA gene bacterial community structures

##### 2.4.3.1. DNA extraction

DNA extraction from biofilms developed on clay beads was performed following Voisin et al. (2016). Microbial cells were detached from clay beads by shaking at 2500 rpm for 2 minutes in 10 mL of 0.8 % NaCl. A 0.22 µm filtration was performed to retrieve cells and aggregates. DNA was extracted from filters using the FastDNA spin kit for soil (MP biomedical). The amount of extracted DNA was quantified by spectrophotometry using a

Nanodrop ND1000 (Thermo Fisher Scientific, USA).

#### 2.4.3.2. V5-V6 analyses of *rrs* PCR products

Sequencing of the V5-V6 *rrs* DNA segments were performed at MrDNA (Shallowater, TX, USA) with the Illumina MiSeq technology. Primers 799F (5'-ACCMGGATTAGATACCCCKG-3') and 1193R (CRTCCMCACCTTCCTC) were used, and 20,000 reads (i.e. 2 x 300-bp paired-end reads) were generated per sample. NGS data processing was conducted using a pipeline inspired by standard operating procedure of Kozich et al. (2013) and realized with the MOTHUR software version 1.35.1 (Schloss et al. 2009). Raw sequences were discarded following 5 criteria: (1) read sizes shorter than 200 bp and longer than 400 pb; (2) reads containing homopolymers longer than 8 bp; (3) more than one sequence mismatch to barcode DNA tags and more than two mismatches with the forward sequencing primer; (4) reads containing ambiguous bases; (5) average sequencing quality score drops below 35 using a 50-bp sliding window (Schloss et al. 2011). Reads were then aligned against the SILVA database release 123 (Quast et al. 2013). Reads that could not be allocated to the V5-V6 area were deleted. A pre-cluster step was applied to reduce sequencing noise by clustering reads differing by only three bases (1 base every 100 bases) as recommended by Huse et al. (2010). Chimeric sequences were detected and removed using CHIMERA UCHIME (Edgar et al. 2011). DNA sequences were grouped into operational taxonomic units (OTUs) by a clustering at 97% similarity (Schloss and Westcott, 2011). Then, OTUs were classified according to the SILVA database using a 80 % minimum bootstrap cutoff (Wang et al. 2007). Sequences that were classified as *Archaea*, *Eukaryota*, chloroplasts or mitochondria were deleted.

#### 2.5. Data analysis

Alpha diversity of biofilm developed on clay beads was estimated using Chao 1 richness index (Chao 1984). Calculations were made with the package “fossil” on R software (R Development Core Team 2008). The effects of artificial recharge (i.e., infiltration) and VZT on DOM concentration, biofilm characteristics (i.e., proteins, FDA and INT assays) and diversity (i.e., Chao 1 index) were tested using a two-way analysis of variance (2-way ANOVA). Pairwise comparisons between artificial recharge and VZT were performed using Tukey’s HSD tests. Pearson’s correlations were computed to determine the relation between DOM (i.e., DOC and BDOC) and clay bead biofilm variables i.e. biomass, activities and genetic diversity. All statistical tests were performed using R software (R Development Core

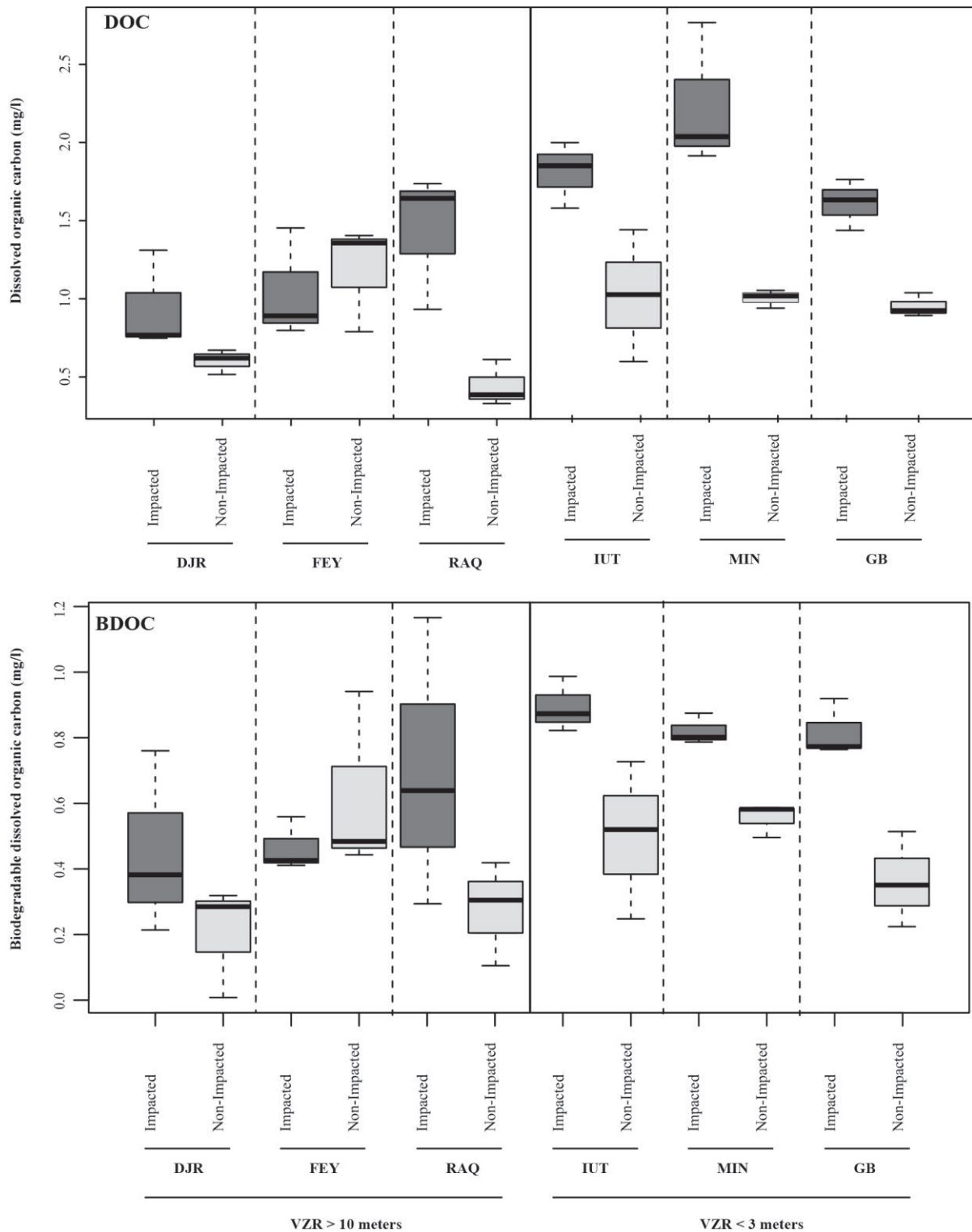


Team 2008) and considered as significant when  $\alpha < 0.05$ .

### 3. RESULTS

#### 3.1. DOM concentrations in groundwater of MAR sites

DOC and BDOC concentrations in groundwater averaged  $1.19 \pm 0.55$  mg/L and  $0.56 \pm 0.27$  mg/L, respectively. Both DOC and BDOC concentrations were significantly higher in impacted groundwaters than in non-impacted groundwaters (2-way ANOVA, recharge effect,  $p < 0.001$ ) with the exception of FEY site where DOC and BDOC concentrations were comparable or even higher in non-impacted groundwater than in impacted groundwater (Fig. 2). DOC concentrations in impacted groundwater averaged  $1.52 \pm 0.54$  mg/L whereas measured concentrations in non-impacted groundwater were  $0.87 \pm 0.33$  mg/L. The same pattern was observed for BDOC concentrations with higher values measured in impacted groundwater ( $0.69 \pm 0.26$  mg/L) in comparison with concentrations from non-impacted groundwater ( $0.42 \pm 0.22$  mg/L). Interestingly, the mean enrichment in DOM concentrations induced by groundwater recharge (impacted versus non-impacted groundwater) was more important in MAR sites with thin vadose zones (mean enrichment of 0.89 mg/L and 0.37 mg/L for DOC and BDOC, respectively) than in MAR sites with thick vadose zones (mean enrichment of 0.40 mg/L and 0.17 mg/L for DOC and BDOC, respectively). Consequently, DOC and BDOC concentrations in groundwaters were significantly higher in MAR site with a thin vadose zone than in MAR sites with a thick vadose zone (2-way ANOVA, vadose zone thickness effect,  $p < 0.01$ ).



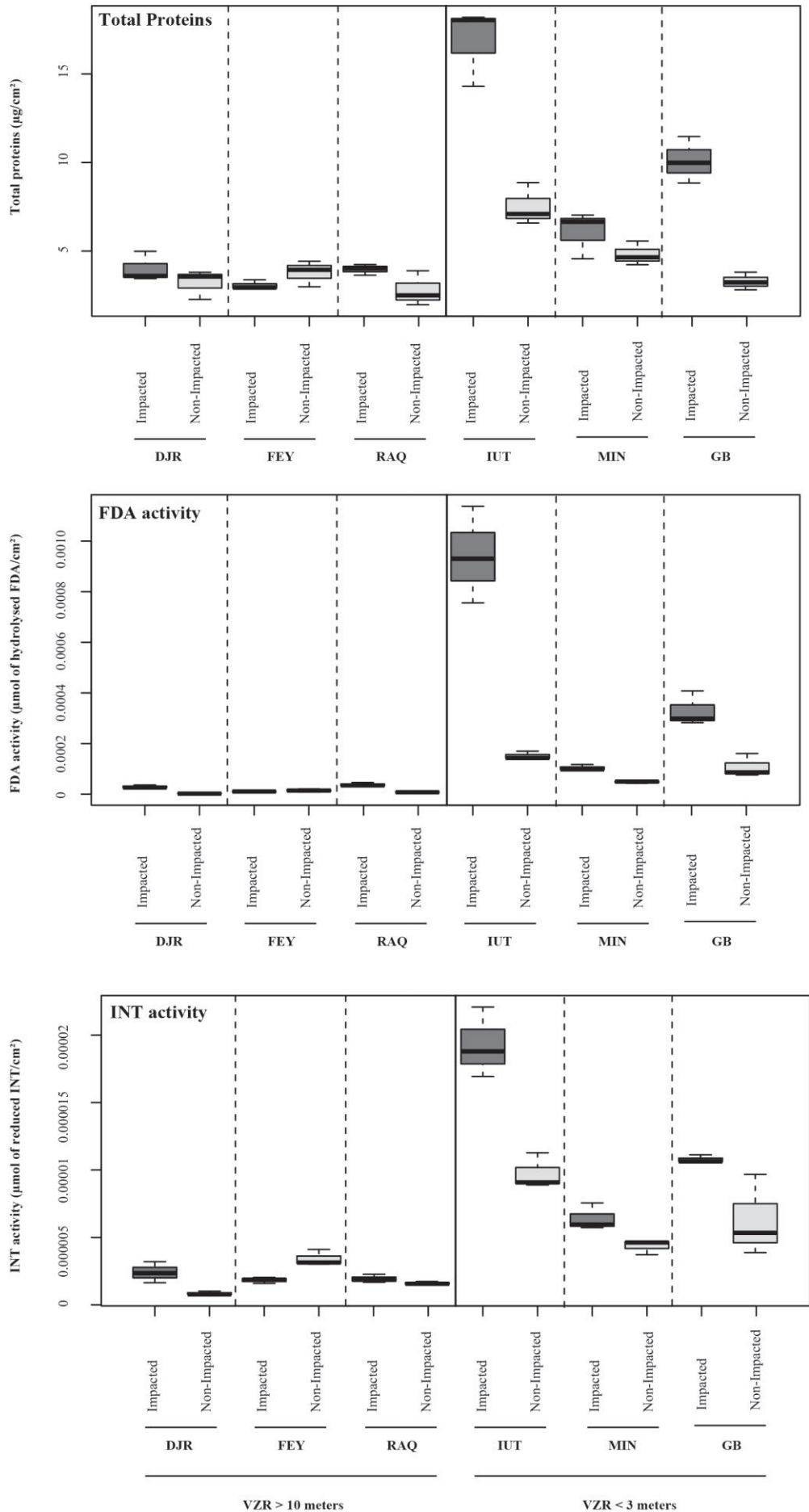
**Figure 2:** Concentrations of dissolved organic carbon (DOC) and biodegradable dissolved organic carbon (BDOC) in groundwaters impacted (dark gray) or non-impacted (light gray) by each MAR practices. Codes for the 6 sites: DJR: Django Reinhardt, FEY: Feyzin, RAQ: Raquin, IUT: IUT, MIN: Minerve and GB: Grange-Blanche). The MAR sites are displayed according to their vadose zone thicknesses: MAR sites with a thick VZT (> 10 meters) are on the left of the panel and MAR sites with a thin VZT (< 3 meters) are on the right of the panel.



### 3.2. Influence of groundwater recharge on biofilm biomass and activities

Biofilm growth was significantly influenced by artificial recharge of groundwater with stormwater runoff (2-way ANOVA, recharge effect,  $p < 0.001$ ). Indeed, total proteins measured on clay beads were significantly higher in biofilms developed in impacted groundwaters (mean total proteins:  $7.34 \pm 5.09$   $\mu\text{g}$  per  $\text{cm}^2$  of clay beads) than in biofilms from non-impacted groundwaters (mean total proteins:  $4.23 \pm 1.79$   $\mu\text{g}$  per  $\text{cm}^2$  of clay beads) (Fig. 3). The same patterns were observed for hydrolytic and dehydrogenase activities measured on biofilms (2-way ANOVA, recharge effect,  $p < 0.05$ ). In average, hydrolytic activity was more than 4-fold higher for biofilms developed in impacted groundwater compared to those developed in non-impacted groundwater. Groundwater recharge increased by more than 1.5-fold the dehydrogenase activity of biofilms over the activities obtained from non-impacted groundwaters (Fig. 3).

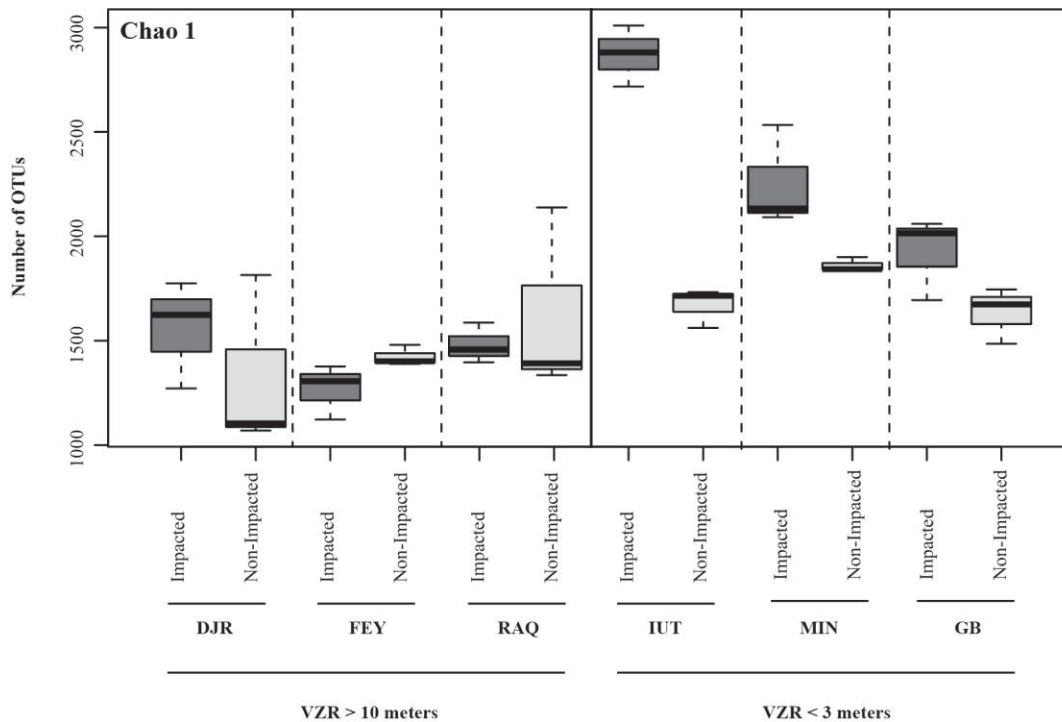
The influence of groundwater recharge on biofilm biomass and activities was more pronounced in MAR sites with thin vadose zones than in MAR sites with thick vadose zones (2-way ANOVA, “recharge x VZT” interaction,  $p < 0.05$  for the three variables). Indeed, biomass and activities were significantly stimulated by recharge in MAR sites with vadose zone thicknesses  $< 3$  m (Tukey HSD test,  $p < 0.01$  for the three variables) whereas no significant effect of recharge was detected in MAR sites with vadose zone thicknesses  $> 10$  m (Tukey HSD test,  $p = 0.99$  for the three variables).



**Figure 3:** Total proteins (i.e., proxy of biofilm biomass), hydrolytic (FDA) and dehydrogenase (INT) activities of biofilms developed on artificial substrates (clay beads) incubated in groundwaters impacted (dark gray) or non-impacted (light gray) by MAR practices. Codes for the 6 sites are: DJR: Django Reinhardt, FEY: Feyzin, RAQ: Raquin, IUT: IUT, MIN: Minerve and GB: Grange-Blanche. The MAR sites are displayed according to their VZ thicknesses: MAR sites with a thick VZT (> 10 meters) are on the left of the panel and MAR sites with a thin VZT (< 3 meters) are on the right of the panel.

### 3.3. Influence of groundwater recharge on biofilm *rrs* diversity indices

The Chao 1 diversity indices were computed from NGS V5-V6 DNA segments generated from the clay beads biofilm DNA extracts. These DNA reads were grouped into OTU when showing 3% or less divergence. Chao 1 considers the observed numbers of reads per OTU but makes a correction defining the likelihood of having missed OTUs based on the number of observed singletons and doubletons (OTU which is represented by one or two reads). Accordingly, the DNA extracts from MAR impacted groundwaters were found more diversified than biofilms from non-impacted ones (2-way ANOVA, recharge effect,  $p < 0.01$ ). Richness estimated by Chao 1 was  $1891 \pm 579$  OTUs in impacted groundwater and  $1590 \pm 282$  OTUs in non-impacted groundwaters (Fig. 4). The influence of groundwater recharge on OTU abundance thus depended upon vadose zone thickness (2-way ANOVA, “recharge x VZT” interaction,  $p < 0.01$ ). OTU increases were mainly observed in MAR sites with vadose zone thicknesses < 3 meters (mean increase of 626 OTUs), the other three sites with deeper vadose zones showed no clear changes in OTU abundances (mean decrease of 23 OTUs).



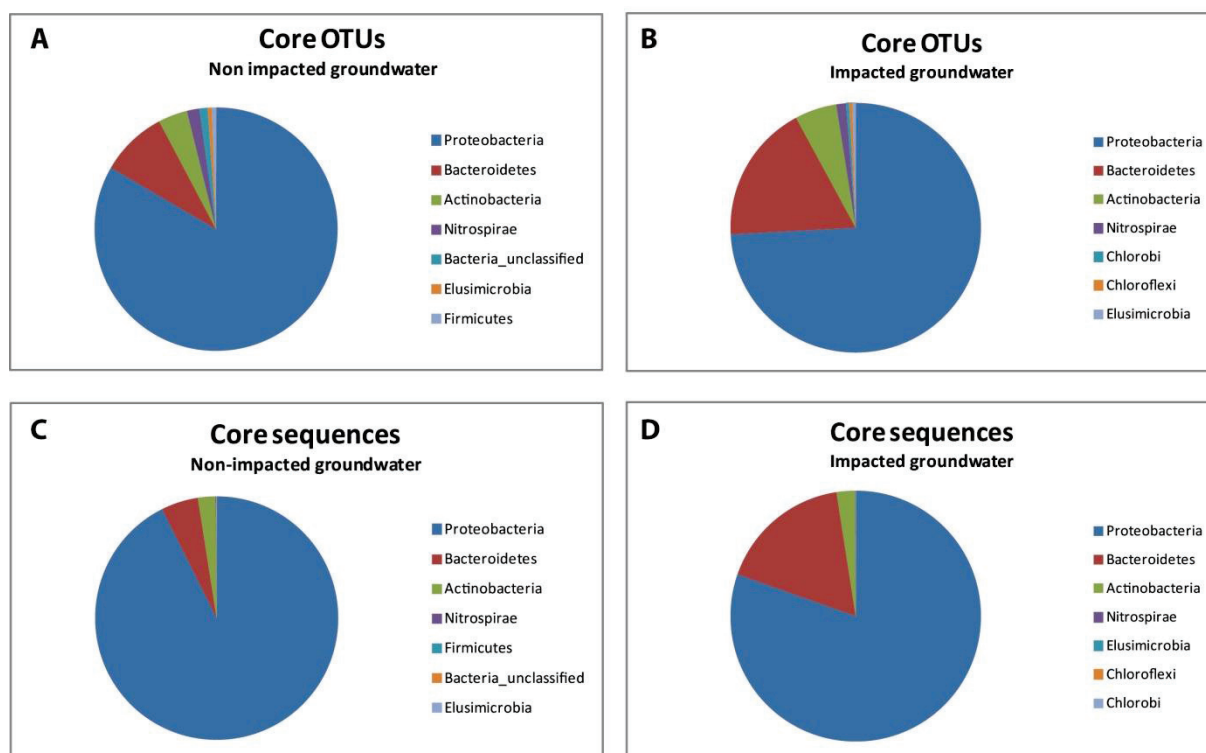
**Figure 4:** Chao1 diversity indices computed from the number of V5-V6 *rrs* reads per OTU that were obtained from clay beads biofilm DNA extracts. Biofilms had developed on clay beads that were incubated in MAR impacted (dark gray) or non-impacted (light gray) groundwaters over a 10 day period. Codes for the 6 sites are DJR: Django Reinhardt, FEY: Feyzin, RAQ: Raquin, IUT: IUT, MIN: Minerve and GB: Grange-Blanche. The MAR sites are displayed according to their vadose zone thicknesses (VZT): MAR sites with a thick VZT (> 10 meters) are on the left of the panel and MAR sites with a thin VZT (< 3 meters) are on the right.

### 3.4. Core *rrs* communities

Only 130 OTUs which corresponded to 1.38% of the total number of OTUs (i.e., 9435) were shared between the 36 groundwater samples. Nonetheless, these 130 OTUs represented 71.66% of all sequences. The largest groups of core OTUs were allocated to the following phyla: *Proteobacteria* (109 OTUs with 739,072 sequences), followed by *Bacteroidetes* (13 OTUs with 93,860 sequences), *Actinobacteria* (5 OTUs with 13,609 sequences) and *Nitrospirae* (3 OTUs with 414 sequences). *Proteobacteria* were mainly represented by *Gamma-Proteobacteria* (28 OTUs with 373,492 sequences), *Beta-Proteobacteria* (50 OTUs with 274,820 sequences) and *Alpha-Proteobacteria* (27 OTUs with 87,840 sequences).

Core communities of non-impacted groundwaters and impacted groundwaters were comparable with *Proteobacteria* being predominant according to number of OTUs and

sequence abundances (Fig. 5). *Proteobacteria* was followed by *Bacteroidetes*, and *Actinobacteria*. Other phyla such as *Nitrospirae* or *Elusimicrobia* were found in smaller proportions in both core communities. *Chlorobi* and *Chloroflexi* were only detected in core communities of impacted groundwaters, while *Firmicutes* were only found in core communities of non-impacted groundwaters. Except these rare phyla, the main difference between the core communities of impacted and non-impacted groundwaters was observed on the relative proportions of *Proteobacteria* and *Bacteroidetes*. In non-impacted groundwaters, 92.6 % of *Proteobacteria* and 4.9 % of *Bacteroidetes* considering the number of sequences were recorded, whereas 80.4 % of *Proteobacteria* and 17.1 % of *Bacteroidetes* were recorded among impacted groundwaters (Fig. 5).



**Figure 5:** Relative abundance of core phyla among clay bead biofilms which developed over a 10 day period among non-impacted (A and C) and impacted MAR groundwaters (B and D). Panels A and B indicate the OTU numbers per phylum, and, C and D, the number of reads per phylum.

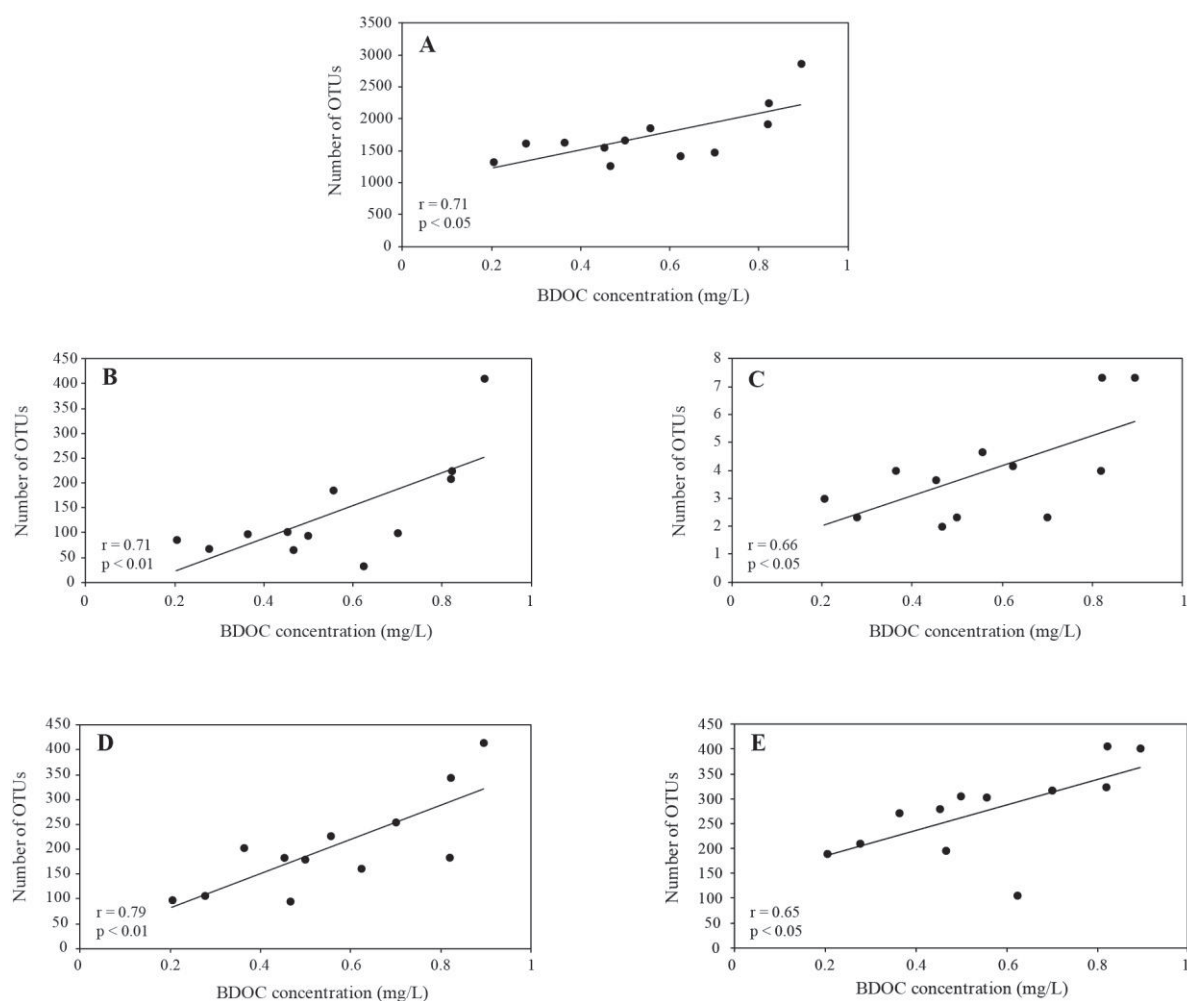
### 3.5. Relations between DOM and biofilm biomass, activities and diversity

Microbial biomass estimated from Lowry's total proteins estimations, and microbial activities estimated from FDA and INT were positively and significantly correlated with the concentrations of DOC and BDOC (table 2), with the exception of the relation between FDA activity and DOC that was not significant. Nevertheless, we found higher correlations of these

three microbial variables with BDOC than with DOC. A positive and significant correlation was detected between Chao 1 indices and BDOC ( $r = 0.71$ ;  $p < 0.05$ ) and between Chao 1 indices and DOC ( $r = 0.68$ ,  $p < 0.05$ ). When we considered the main bacterial phyla, a positive correlation was observed between the number of OTUs belonging to *Bacteroidetes* and BDOC ( $r = 0.71$ ;  $p < 0.01$ ) and between *Bacteroidetes* and DOC ( $r = 0.67$ ;  $p < 0.05$ ) (Fig. 6). The number of OTUs belonging to *Alpha-proteobacteria* and *Beta-proteobacteria* significantly increased with DOC ( $r = 0.81$ ;  $p < 0.01$  for *Alpha-proteobacteria* and  $r = 0.71$ ;  $p < 0.05$  for *Beta-proteobacteria*) and BDOC concentrations ( $r = 0.79$ ;  $p < 0.01$  for *Alpha-proteobacteria* and  $r = 0.65$ ;  $p < 0.05$  for *Beta-proteobacteria*) (Fig. 6). In the dataset, one other phyla, *Chlorobi*, showed a significant and positive correlation between OTU numbers and BDOC concentrations ( $r = 0.66$  and  $p < 0.05$ ) (Fig. 6).

**Table 2:** Pearson’s correlation coefficients between pairs of datasets produced in this study. DOC: dissolved organic carbon, BDOC: biodegradable organic carbon, FDA: Fluorescein diacetate (i.e., hydrolytic activity) and INT: 2-(p-iodophenyl)-3-(p-nitrophenyl)-5- phenyl tetrazolium chloride (i.e., dehydrogenase activity).

Variables	DOC	BDOC	Proteins	FDA	INT
BDOC	0.92***				
Proteins	0.65*	0.75**			
FDA	0.53	0.64*	0.97***		
INT	0.59*	0.70*	0.96***	0.95***	
Chao1	0.68*	0.71*	0.87***	0.86***	0.84***
* $p < 0.05$	** $p < 0.01$	*** $p < 0.001$			



**Figure 6:** Linear regression analyses of BDOC values against Chao 1 diversity indices and number of OTU among selected phyla. (A) Chao 1 diversity indices (number of OTUs), and number of OTU of (B) *Bacteroidetes*, (C) *Chlorobi*, (D) *Alpha-proteobacteria* and (E) *Beta-proteobacteria*. Pearson's r factors are indicated with their respective p-value.

#### 4. DISCUSSION

The influence of MAR practices on DOM enrichments of groundwaters and the relation with vadose zone thicknesses were investigated. The results confirmed the hypothesis that DOM enrichment of groundwaters decreases with VZT (Pabich 2001, Datry et al. 2006). Concentrations of total dissolved organic carbon (DOC) and biodegradable dissolved organic carbon (BDOC) were significantly higher in MAR-impacted than non-MAR-impacted groundwaters but mainly for MAR sites with thin vadose zones (< 3 m). This effect was not significant for MAR sites with a thick vadose zone (> 10 m). The influence of VZT on DOM reaching groundwater was thus linked to the DOM soil retention capacity. Biotic soil



components (microbial consumption of BDOC, Marschner and Kalbitz 2003, Li et al. 2013, Shen et al. 2015) and abiotic ones (sorption of DOM on clay particles, soil organic matter, or/and Fe and Al oxides/hydroxides, McKnight et al. 1992, Kalbitz et al. 2000, Saidy et al. 2013) are likely involved in this VZT-related effect. Consequently and following the regional chromatography model (Figure 8 in Shen et al. 2015), deeper is the VZ and more efficient is its ability at limiting groundwater contamination with DOM.

Based on groundwater samples from Cape Cod (USA), Pabich et al. (2001) calculated the following statistical relationship between VZT (in m) and DOC concentration (in mg/L) in groundwater:  $\text{DOC concentration} = \text{DOC concentration in surface water} * e^{-0.7 * \text{VZT}}$ . Applying the same relationship with a mean DOC concentration of 5 mg/L in runoff waters (See chapter 1), one would obtain concentrations ranging between 0.9 and 2.7 mg/L of DOC in groundwaters collected below MAR sites with vadose zones < 3 meters. Measured DOC concentrations at these sites were in this range (i.e., 1.6 – 2.3 mg/L). Nevertheless, higher concentrations in groundwaters at MAR sites could have been expected because of the strong hydrological connectivity between the surface and aquifer (Foulquier et al. 2011). Two mechanisms explain the observed trends at MAR sites: (1) the very efficient DOC retention of soil and VZ of MAR systems (Mermillod-Blondin et al. 2015) and (2) the more significant dilution of DOC from infiltrating waters by groundwaters (poor in DOC) below MAR systems (Foulquier et al. 2010). However, these two mechanisms were not efficient enough to limit significant DOC and BDOC enrichments of groundwater in MAR sites with thin VZ.

As most groundwater ecosystems experience strong carbon limitation that severely constrains microbial communities (Bengtsson 1989, Kazumi and Capone 1994, Baker et al. 2000, Goldscheider 2006), the biomass and activities of biofilm that grew on artificial substrates (clay beads) introduced in the aquifer were positively linked with DOC enrichment. The vadose zone thickness was also significantly related to the observed changes in the global microbial parameters that were measured. Artificial recharge significantly stimulated microorganisms for MAR sites with a thin vadose zone whereas it was not the case in MAR sites with a thick vadose. To our knowledge, the present study is the first to show that VZT influences microbial growth in groundwaters through its control over DOM availability in MAR systems. Indeed, Datry et al. (2005) demonstrated the influence of VZT on DOC concentration and groundwater invertebrates but they did not study the microbiota which mediates energy fluxes from DOM towards invertebrates (Cooney and Simon 2009). Foulquier et al. (2011) quantified bacterial abundance (i.e., DAPI staining counts and Lowry's

total proteins assays) and microbial activities (i.e., esterase and dehydrogenase activities) on sediments collected from three MAR systems with a thin VZ but they did not consider systems with thick VZ.

The scarcity of studies on microbial biofilms from deep alluvial aquifers (i.e., when the vadose zone thickness exceeds 10 m) results from technical difficulties and costs associated with pumping or coring for sediment collection (Chapelle, 2001). Thus, the use of artificial substrates (clay beads) appeared as an efficient strategy to compare biofilm growth development and activities among sites of contrasted VZT including deep aquifers. The positive and significant correlations obtained between microbial datasets from biofilms developing on clay beads and DOC and/or BDOC concentrations (Table 2) confirmed the efficacy of this approach for monitoring trophic conditions in groundwater ecosystems (Williamson et al. 2012, Mermillod-Blondin et al. 2013, Voisin et al. 2016). It is also worth noting that biofilms developing on clay beads were more positively correlated to the concentrations of biodegradable DOC (BDOC) than the total DOC.

The impact of MAR practices on the alpha-diversity (Chao 1 index) of bacterial communities of biofilms collected from artificial substrates (clay beads) was also related to the VZT. Indeed, Chao 1 index was significantly higher in groundwaters impacted by MAR practices than in the non-impacted ones for MAR sites with a thin VZ. In contrast, no significant effect of recharge was measured on OTU numbers in MAR sites with thick VZ. These V5-V6 *rrs* diversity results are thus coherent with measurements of DOM availability in groundwaters, and positive significant relations were obtained between Chao 1 indices and BDOC concentrations. Thus, the hypothesis of an increase in richness of bacterial “species” (inferred from OTU numbers) with the availability of nutrient (i.e., BDOC being the biodegradable fraction of DOC for bacteria) in groundwater ecosystems was validated. We also showed that biomass (concentrations of total proteins), activities (fluorescein diacetate (FDA) hydrolysis, INT-formazan reduction) and *rrs* genetic diversity of biofilms growing on clay beads (in groundwaters) were all correlated positively with BDOC concentrations. These results are in line with the “more individuals” hypothesis (Srivastava and Lawton, 1998) of the species–energy theory (Wright 1983, Cardinale et al. 2009) which indicates that resource availability positively influenced species richness by increasing population sizes and reducing the probability of extinction. Given the oligotrophic conditions encountered in groundwater environments, it is probable that increased BDOC concentrations below MAR systems would enable the maintenance of copiotrophic bacteria that were not adapted to live in the more

oligotrophic areas of aquifers (e.g., Fierer et al. 2007, Lever et al. 2015). As observed by Bienhold et al. (2012) in oligotrophic Arctic deep-sea sediments, nutrient enrichment in ecosystems experiencing strong nutrient limitations leads to a positive response of bacterial diversity.

These diversity changes were related to changes in the proportions of bacterial phyla among the core communities. The relative proportion of *Bacteroidetes* increased in the impacted groundwaters whereas those of *Proteobacteria* decreased (but they were still dominant). This observation would be consistent with an increase of copiotrophic bacteria with energy availability because members of the phylum *Bacteroidetes* are often abundant in nutrient-rich aquatic environments (e.g., Gomez-Pereira et al. 2010; Landa et al. 2013; Marti et al. 2017). Indeed, this phylum has been detected in most aquatic habitats (e.g., Alonso et al. 2007; Diez-vives et al. 2014; Schauer et al. 2010) but bacteria of this group which are known to degrade polymeric organic matter (Cottrell and Kirchman, 2000) are often associated with blooms of phytoplankton (e.g., Pinhassi et al. 2004; Teeling et al. 2012; Tada et al. 2011) and fecal contaminations (e. g. Marti et al. 2017). The relative increase in the number of reads of *Bacteroidetes* indicated a higher incidence of BDOC on their development in biofilms than the one of *Proteobacteria*. Despite these differences in the relative abundances of these phyla, their diversities in terms of OTU numbers showed positive linear relations with BDOC concentrations. As observed with the Chao 1 indices, these phyla responded positively to BDOC enrichment of groundwater. In comparison, several studies (Horner-Devine et al. 2003; Pommier et al. 2007; Bienhold et al. 2012) reported that the diversity of several bacterial taxa did not respond similarly to nutrient availability, five nutrient diversity patterns being obtained, including random, positive, negative, U-shaped and humped-shaped (Smith, 2007). In the present study, the fact that dominant bacterial groups increased in diversity with nutrient (BDOC) availability in groundwater environment might have resulted from the harsh trophic conditions encountered by micro-organisms in subterranean ecosystems (Chapelle and Lovley 1990). Relatively low BDOC concentrations (below 0.9 mg/L) were recorded. Li et al. (2013) showed that an increase in BDOC concentration from 0.5 mg/L to 1.1 mg/L reduced 16S rRNA gene bacterial diversity of biofilms developing in sediment columns (under laboratory conditions). Thus, we cannot exclude that a reduction of the diversity of some bacterial groups could occur through BDOC enrichments of the aquifer due to MAR practices (when exceeding 1.1 mg/L). Consequently, considering a wider range of BDOC concentrations than in the present study could reveal hump-shaped relationships between

bacterial diversity and nutrient availability in groundwater ecosystems.

## **6. ACKNOWLEDGMENTS**

The authors thank the Auvergne-Rhône-Alpes region for Jérémy Voisin's Ph.D grant. This work was supported by l'agence nationale de le recherche [ANR-16-CE32-0006 FROG] and Lyon Metropole within the framework of the experimental observatory for urban hydrology (OTHU, <http://www.graie.org/othu/>). We also thank Léa Dantony, Mathilde Pigneret and Felix Vallier for their support and advice during field and laboratory work.

## 7. REFERENCES

- Alonso C, Warnecke F, Amann R *et al.* High local and global diversity of Flavobacteria in marine plankton. *Environ Microbiol* 2007;**9**:1253–66.
- Baker MA, Valett HM, Dahm CN. Organic carbon supply and metabolism in a shallow groundwater ecosystem. *Ecology* 2000;**81**:3133–48.
- Battin TJ. Assessment of fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total esterase activity in natural stream sediment biofilms. *Sci Total Environ* 1997;**198**:51–60.
- Bengtsson G. Growth and metabolic flexibility in groundwater bacteria. *Microb Ecol* 1989;**18**:235–48.
- Bienhold C, Boetius A, Ramette A. The energy–diversity relationship of complex bacterial communities in Arctic deep-sea sediments. *ISME J* 2012;**6**:724–32.
- Cardinale BJ, Hillebrand H, Harpole WS *et al.* Separating the influence of resource 'availability' from resource 'imbalance' on productivity-diversity relationships. *Ecol Lett* 2009;**12**:475–87.
- Chao A. Nonparametric Estimation of the Number of Classes in a Population Author. *Scandinavian J Stat* 1984;**11**:265–70.
- Chapelle FH. *Groundwater Microbiology and Geochemistry*. Wiley Press, New York, 2001.
- Chapelle FH, Lovley DR. Rates of microbial metabolism in deep coastal plain aquifers. *Appl Environ Microbiol* 1990;**56**:1865–74.
- Cooney TJ, Simon KS. Influence of dissolved organic matter and invertebrates on the function of microbial films in groundwater. *Microb Ecol* 2009;**58**:599–610.
- Cottrell MT, Kirchman DL. Community composition of marine bacterioplankton determined by 16S rRNA gene clone libraries and fluorescence in situ hybridization. *Appl Environ Microbiol* 2000;**66**:5116–22.
- Cusens J, Wright SD, McBride PD *et al.* What is the form of the productivity-animal-species-richness relationship? a critical review and meta-analysis. *Ecology* 2012;**93**:2241–52.
- Datry T, Malard F, Gibert J. Dynamics of solutes and dissolved oxygen in shallow urban groundwater below a stormwater infiltration basin. *Sci Total Environ* 2004;**329**:215–29.
- Datry T, Malard F, Gibert J. Response of invertebrate assemblages to increased groundwater recharge rates in a phreatic aquifer. *J North Am Benthol Soc* 2005;**24**:461.
- Datry T, Malard F, Gibert J. Effect of artificial stormwater infiltration on urban groundwater ecosystems. *Sustainable Development of Urban Groundwater Systems*. 2006, 331–45.
- Díez-Vives C, Gasol JM, Acinas SG. Spatial and temporal variability among marine Bacteroidetes populations in the NW Mediterranean Sea. *Syst Appl Microbiol* 2014;**37**:68–78.
- Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC *et al.* UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* 2011;**27**:2194–200.
- Entling MH, Schweiger O, Bacher S *et al.* Species Richness-Environment Relationships of European Arthropods at Two Spatial Grains: Habitats and Countries. *PLoS One* 2012;**7**, DOI: 10.1371/journal.pone.0045875.
- Evans KL, James NA, Gaston KJ. Abundance, species richness and energy availability in the North American avifauna. *Glob Ecol Biogeogr* 2006;**15**:372–85.
- Evans KL, Warren PH, Gaston KJ. Species–energy relationships at the macroecological scale: a review of the

- mechanisms. *Biol Rev* 2005;**80**:1–25.
- Fierer N, Bradford MA, Jackson RB. Toward an ecological classification of soil bacteria. *Ecology* 2007;**88**:1354–64.
- Fontvieille DA, Outaguerouine A, Thevenot DR. Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of microbial activity in aquatic systems: Application to activated sludges. *Environ Technol* 1992;**13**:531–40.
- Foulquier A, Malard F, Mermillod-Blondin F *et al.* Vertical change in dissolved organic carbon and oxygen at the water table region of an aquifer recharged with stormwater: biological uptake or mixing? *Biogeochemistry* 2009;**99**:31–47.
- Foulquier A, Malard F, Mermillod-Blondin F *et al.* Surface Water Linkages Regulate Trophic Interactions in a Groundwater Food Web. *Ecosystems* 2011;**14**:1339–53.
- Foulquier A, Simon L, Gilbert F *et al.* 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. *Freshw Biol* 2010;**55**:1560–76.
- Fuhrman JA. Microbial community structure and its functional implications. *Nature* 2009;**459**:193–9.
- Gaston KJ. Global patterns in biodiversity. *Nature* 2000;**405**: 220-227.
- Gibert J, Danielopol DL, Stanford JA. *Groundwater ecology*. Academic Press, San Diego, California, USA, 1994
- Goldscheider N, Hunkeler D, Rossi P. Review: Microbial biocenoses in pristine aquifers and an assessment of investigative methods. *Hydrogeol J* 2006;**14**:926–41.
- Gómez-Pereira PR, Fuchs BM, Alonso C *et al.* Distinct flavobacterial communities in contrasting water masses of the north Atlantic Ocean. *ISME J* 2010;**4**:472–87.
- Griebler C, Lueders T. Microbial biodiversity in groundwater ecosystems. *Freshw Biol* 2009;**54**:649–77.
- Horner-Devine MC, Leibold MA, Smith VH *et al.* Bacterial diversity patterns along a gradient of primary productivity. *Ecol Lett* 2003;**6**:613–22.
- Houri-Davignon Relexans, Jean Claude and Etcheber, Henri C. Measurement of actual electron transport system (ETS) activity in marine sediments by incubation with INT. *Environ Technol* 1989;**10**:91–100.
- Hunt W, Traver R, Davis A *et al.* Low Impact Development Practices: Designing to Infiltrate in Urban Environments. In: Chang NB (Ed). *Effects of Urbanization on Groundwater*. American Society of Civil Engineers, 2010, 308–343.
- Huse SM, Welch DM, Morrison HG *et al.* Ironing out the wrinkles in the rare biosphere through improved OTU clustering. *Environ Microbiol* 2010;**12**:1889–98.
- Kalbitz K ;, Solinger S ;, Park J -h ; *et al.* Controls on the dynamics of dissolved organic matter in soils: a review. *Soil Sci* 2000;**165**:277–304.
- Kazumi J, Capone D. Heterotrophic microbial activity in shallow aquifer sediments of Long Island, New York. *Microb Ecol* 1994;**28**:19–37.
- Kozich JJ, Westcott SL, Baxter NT *et al.* Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the miseq illumina sequencing platform. *Appl Environ Microbiol* 2013;**79**:5112–20.

- Landa M, Cottrell MT, Kirchman DL *et al.* Changes in bacterial diversity in response to dissolved organic matter supply in a continuous culture experiment. *Aquat Microb Ecol* 2013;**69**:157–68.
- Lever MA, Rogers KL, Lloyd KG *et al.* Life under extreme energy limitation: A synthesis of laboratory- and field-based investigations. *FEMS Microbiol Rev* 2015;**39**:688–728.
- Li D, Alidina M, Ouf M *et al.* Microbial community evolution during simulated managed aquifer recharge in response to different biodegradable dissolved organic carbon (BDOC) concentrations. *Water Res* 2013;**47**:2421–30.
- Marsalek J, Chocat B. International report: Stormwater management. *Water Science and Technology*. Vol 46. 2002, 1–17.
- Marschner B, Kalbitz K. Controls of bioavailability and biodegradability of dissolved organic matter in soils. *Geoderma*. Vol 113. 2003, 211–35.
- Marti R, Ribun S, Aubin J-B *et al.* Human-driven microbiological contamination of benthic and hyporheic sediments of an intermittent peri-urban river assessed from MST and 16S rRNA genetic structure analyses. *Front Microbiol* 2017;**8**:19.
- McKnight DM, Bencaia KE, Zeiweger GW *et al.* Sorption of Dissolved Organic Carbon by hydrous Aluminum and Iron oxides occurring at the confluence of Deer Creek with the Snake River, Summit County, Colorado. *Environ Sci Technol* 1992;**26**:1388–96.
- Mermillod-Blondin F, Foulquier a, Maazouzi C *et al.* Ecological assessment of groundwater trophic status by using artificial substrates to monitor biofilm growth and activity. *Ecol Indic* 2013;**25**:230–8.
- Mermillod-Blondin F, Simon L, Maazouzi C *et al.* Dynamics of dissolved organic carbon (DOC) through stormwater basins designed for groundwater recharge in urban area: Assessment of retention efficiency. *Water Res* 2015;**81**:27–37.
- Pabich WJ, Valiela I, Hemond HF. Relationship between DOC concentration and vadose zone thickness and depth below water Pabich, W.J., Valiela, I., Hemond, H.F., 2001. Relationship between DOC concentration and vadose zone thickness and depth below water table in groundwater of Cape Cod, . *Biogeochemistry* 2001;**55**:247–68.
- Peterson GL. A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Anal Biochem* 1977;**83**:346–56.
- Pinhassi J, Sala MM, Havskum H *et al.* Changes in bacterioplankton composition under different phytoplankton regimens. *Appl Environ Microbiol* 2004;**70**:6753–66.
- Quast C, Pruesse E, Yilmaz P *et al.* The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res* 2013;**41**:D590–6.
- Saidy AR, Smernik RJ, Baldock JA *et al.* The sorption of organic carbon onto differing clay minerals in the presence and absence of hydrous iron oxide. *Geoderma* 2013;**209–210**:15–21.
- Schauer R, Bienhold C, Ramette A *et al.* Bacterial diversity and biogeography in deep-sea surface sediments of the South Atlantic Ocean. *Isme J* 2010;**4**:159–70.
- Schloss PD, Westcott SL. Assessing and improving methods used in operational taxonomic unit-based approaches for 16S rRNA gene sequence analysis. *Appl Environ Microbiol* 2011;**77**:3219–26.
- Servais P, Anzil A, Ventresque C. Simple method for determination of biodegradable dissolved organic carbon in water. *Appl Environ Microbiol* 1989;**55**:2732–4.



- Servais P, Billen G, Hascoët MC. Determination of the biodegradable fraction of dissolved organic matter in waters. *Water Res* 1987;**21**:445–50.
- Shen Y, Chapelle FH, Strom EW *et al.* Origins and bioavailability of dissolved organic matter in groundwater. *Biogeochemistry* 2015;**122**:61–78.
- Smith VH. Microbial diversity-productivity relationships in aquatic ecosystems. *FEMS Microbiol Ecol* 2007;**62**:181–6.
- Tada Y, Taniguchi A, Nagao I *et al.* Differing growth responses of major phylogenetic groups of marine bacteria to natural phytoplankton blooms in the Western North Pacific Ocean. *Appl Environ Microbiol* 2011;**77**:4055–65.
- Voisin J, Cournoyer B, Mermillod-Blondin F. Assessment of artificial substrates for evaluating groundwater microbial quality. *Ecol Indic* 2016;**71**:577–86.
- Wang Q. Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. *Appl Environ Microbiol* 2007;**73**:5261–7.
- Williamson WM, Close ME, Leonard MM *et al.* Groundwater Biofilm Dynamics Grown In Situ Along a Nutrient Gradient. *Ground Water* 2012;**50**:690–703.
- Wright DH. Species–energy theory: an extension of species-area theory. *Oikos* 1983;**41**:496–506.

### Conclusions du chapitre 3

En accord avec nos hypothèses de travail, les résultats montrent un effet significatif de l'augmentation de la concentration en carbone organique dissous sur le développement et les activités des bactéries dans les nappes phréatiques. De plus, ces travaux montrent clairement que l'épaisseur de la ZNS contrôle la quantité de carbone organique disponible dans la nappe et par effet cascade son impact sur les paramètres microbiens. En effet, l'impact des techniques d'infiltration des eaux pluviales sur le développement et les activités des bactéries est plus important dans le cas des sites où la ZNS est inférieure à 3 mètres que dans les sites où la ZNS est supérieures à 10 mètres.

La diversité est également influencée par l'augmentation des concentrations en carbone organique dissous. En effet, la richesse spécifique est plus importante dans les biofilms qui se sont développés dans les eaux de nappes impactées par l'infiltration des eaux pluviales. Cet effet est bien plus marqué dans le cas des sites peu profonds ( $ZNS < 3$  mètres) montrant également l'influence de l'épaisseur de la ZNS sur la disponibilité en énergie dans la nappe et son incidence sur la diversité bactérienne. Les augmentations de concentration en carbone organique dissous semblent également influencer la composition et l'assemblage des communautés bactériennes. En effet, les biofilms se développant dans les nappes phréatiques impactées par les systèmes d'infiltration des eaux pluviales ont des proportions plus importantes de bactéries appartenant au phylum *Bacteroidetes*, et mécaniquement des proportions plus faibles en *Proteobacteria*. De plus, les diversités en OTUs de certains phyla comme les *Bacteroidetes*, les *alpha* et *beta-proteobacteria* ou encore les *chlorobi* sont corrélées positivement à la concentration en BDOC. Ces résultats suggèrent que le BDOC est un facteur abiotique significatif dans le processus de sélection lors de l'assemblage des communautés microbiennes dans les nappes phréatiques.

# 5

## CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

## **5.1. Conclusions**

L'objectif général de ce travail de thèse était d'étudier l'impact des pratiques d'infiltration des eaux pluviales sur les communautés microbiennes, notamment au niveau de la diversité, une composante qui était jusqu'à présent peu étudiée dans ce contexte. A travers une approche de terrain basée sur l'étude de six sites de la région lyonnaise, nous avons pour objectifs dans un premier temps d'évaluer l'impact de ces pratiques sur le transfert de bactéries des bassins d'infiltration à la nappe phréatique et dans un second temps d'étudier les réponses des communautés bactériennes face à l'augmentation des ressources nutritives (à savoir le carbone organique dissous et le carbone organique dissous biodégradable).

La composition des communautés microbiennes peut être influencée par de nombreux facteurs dont certains sont de nature stochastique (e.g. phénomène de dispersion) et d'autres sont déterministes (e.g. phénomènes de sélection). Bien que les nappes phréatiques soient considérées comme des milieux relativement stables d'un point de vue physique et chimique, les communautés bactériennes dans ces écosystèmes sont soumises à ces mêmes types de processus. Cela est encore plus vrai lorsque les nappes phréatiques sont influencées par des perturbations telles que celles engendrées par les systèmes de recharge artificielle par des eaux pluviales.

Un modèle nul basé sur un transport similaire de l'eau et des bactéries voudrait que les communautés microbiennes des nappes phréatiques impactées par la recharge artificielle en eaux pluviales soient issues d'un mélange entre la communauté des eaux de nappes adjacentes qui sont non-impactées et celle des eaux d'infiltrations, principalement par des processus de dispersion. L'approche retenue pour valider ou non ce modèle a été de considérer la description des communautés par une approche de séquençage massif du gène *rrs* afin de calculer les similarités entre les communautés des trois compartiments étudiés (i.e. eaux de surface, eaux de nappe impactée et non-impactée) mais aussi les similarités entre la communauté théorique calculée selon le modèle nul et la communauté observée dans la nappe impactée. Les communautés théoriques issues du modèle nul ont de très faibles indices de similarité avec les communautés observées (entre 20 et 25% de moyenne). Les similarités entre les communautés des eaux de surface et celles des eaux de nappes impactées sont relativement faibles (inférieures à 40%). Ces résultats indiquent que les transferts surface-nappe sont limités et que la zone non saturée (ZNS) joue un rôle de filtre efficace sur les bactéries. Nous avons également mis en évidence que ces transferts étaient d'autant plus limités que la hauteur de la ZNS était épaisse. Considérant le modèle exposé précédemment,

ces résultats supposent donc que les communautés bactériennes des nappes impactées seraient plus influencées par la nappe environnante non-impactée. Or, de manière surprenante, cela n'est pas le cas car les similarités entre les communautés de ces deux compartiments sont également très faibles. De plus, la majorité des OTUs détectés dans la nappe phréatique impactée sont endémiques à ce compartiment. Il découle deux hypothèses de ces observations :

- (1) la majorité des bactéries qui constituent la communauté de la nappe impactée ne provient ni de la surface, ni de la nappe non impactée, mais de la ZNS. En effet, la communauté bactérienne de la ZNS serait différente de celle des eaux de surface et de celle de la nappe phréatique et les bactéries seraient « mobilisées » lors du passage des eaux d'infiltration avec un effet de masse suffisamment important pour constituer une communauté particulière dans la nappe impactée.
- (2) la part des processus abiotiques aurait une influence plus importante que l'effet de la dispersion entre les eaux non-impactées et impactées et entre eaux de surface et eaux impactées. Nous aurions donc le schéma suivant : les bactéries présentes dans la nappe impactée seraient issues d'un mélange des eaux non impactées et des eaux d'infiltration, mais les conditions abiotiques particulières engendrées par l'infiltration des eaux pluviales (baisse en conductivité électrique, enrichissement de la nappe en carbone organique dissous) conduiraient en un processus de sélection de certaines bactéries, d'où les faibles similarités observées entre les compartiments du système.

Même si ces deux hypothèses doivent jouer dans l'assemblage des communautés bactériennes des nappes impactées, la deuxième pourrait être la plus probable. En effet, l'infiltration des eaux pluviales entraîne des perturbations bien connues sur la physico-chimie des nappes phréatiques comme la baisse des concentrations en oxygène dissous ou encore des enrichissements en matière organique dissoute. Les tests menés dans le cadre de cette thèse sur l'influence de l'épaisseur de ZNS sur certains paramètres physico-chimiques ont toutefois démontré que les différences de concentrations en oxygène dissous ne pouvaient pas expliquer, à elles seules, les modifications de communautés observées dans la nappe impactée par l'infiltration. En effet, les eaux de nappes phréatiques dans le cas de sites où la ZNS est peu profonde (< 3 m) présentent des périodes d'anoxies et ont généralement des faibles concentrations en oxygène dissous alors que l'inverse est observé pour les sites profonds (ZNS > 10 m) où les eaux d'infiltration se rechargent en oxygène dissous lors de leur transfert. Malgré ces effets contraires sur l'oxygénation des eaux, les communautés

bactériennes dans la nappe impactée sont toujours très divergentes des communautés des eaux de surface et de la nappe non impactée quelle que soit l'épaisseur de la ZNS. Ceci tend à supposer que la modification des concentrations en oxygène dissous n'est pas l'unique variable responsable des changements de communauté. Une variable qui nous est apparue plus importante dans la structuration des communautés microbiennes concerne le carbone organique dissous (DOC) et notamment sa fraction biodégradable (BDOC). Même si nous avons confirmé que la majorité des composés organiques était retenue et/ou dégradée dans la ZNS, les concentrations en BDOC restaient significativement supérieures dans les nappes phréatiques impactées par les pratiques d'infiltration des eaux pluviales en comparaison avec les nappes non-impactées. Le BDOC étant considéré comme une ressource nutritive pour les bactéries et un élément limitant dans les nappes phréatiques étudiées, il pourrait donc être un facteur abiotique crucial dans l'assemblage des communautés.

Afin d'étudier cela, nous avons amélioré un système d'échantillonnage passif permettant d'étudier les communautés microbiennes capables de se développer sous forme de biofilms dans la nappe. L'utilisation de substrats artificiels semblait en effet pertinente pour étudier le développement des micro-organismes dans la nappe, l'approche traditionnelle par pompage d'eau donnant un éclairage sur les bactéries libres. L'idée était de pouvoir déployer sur site des substrats artificiels qui permettent à la fois d'avoir une évaluation du développement et de l'activité bactérienne à travers le suivi de développement du biofilm, mais aussi d'être capable d'échantillonner une communauté qui soit représentative de la communauté présente dans la nappe phréatique durant la durée de notre étude. A l'issue de ces travaux, le choix optimal répondant aux critères précédents s'est porté sur l'utilisation de billes d'argile comme substrat artificiel.

Comme supposé, la croissance et les activités bactériennes sur billes d'argile étaient significativement stimulées par la hausse des ressources nutritives dans les nappes phréatiques. De plus, cet effet était bien plus marqué dans le cas des sites où la ZNS était peu profonde (< 3 m) et constituait un filtre moins efficace qu'une ZNS > 10 m pour retenir la matière organique provenant de la surface. L'étude de la composition des communautés bactériennes a permis de confirmer les relations positives décrites dans la littérature sur les liens entre énergie et diversité (on entend ici par énergie la disponibilité des ressources carbonées pour les micro-organismes). En effet, la richesse spécifique des communautés qui se sont développées dans les nappes enrichies en BDOC du fait de la recharge en eaux pluviales était supérieure à celle des communautés de nappes non-impactées. Comme précédemment, l'épaisseur de la ZNS avait aussi une influence sur la diversité bactérienne en

contrôlant la concentration de BDOC retrouvée dans la nappe. Le BDOC avait également un effet sur la composition et l'assemblage des communautés bactériennes puisque les proportions de certains phyla étaient différentes (e.g. augmentation de la proportion des *Bacteroidetes* au détriment des *Proteobacteria* quand la concentration en BDOC augmentait).

Pour conclure, cette thèse constitue la première étude d'envergure visant à quantifier la réponse du compartiment microbien à des perturbations engendrées par l'infiltration des eaux pluviales en milieu urbain. Ces travaux mettent en lumière que ces pratiques ont un impact sur la composition des communautés microbiennes des nappes phréatiques. Plusieurs facteurs peuvent expliquer ces modifications de communautés. Les processus de dispersion ont un rôle sur la composition des communautés, mais ce rôle reste faible pour ce qui est des transferts entre les compartiments surface-nappe impactée et entre les compartiments nappe non impactée-nappe impactée. La dispersion entre la ZNS et la nappe impactée pourrait avoir un effet beaucoup plus important, mais l'étude actuelle ne permet pas de conclure dans ce sens. Les phénomènes de sélection par les conditions physico-chimiques particulières des nappes phréatiques impactées (e.g. enrichissement en BDOC) semblent jouer un rôle prépondérant dans l'assemblage des communautés qui supplante celui des processus stochastiques. En effet, les relations entre diversité bactérienne et disponibilité de la ressource nutritive carbonée suggèrent un effet majeur des changements trophiques engendrés par la recharge des nappes sur la microbiologie.



## **5.2. Perspectives**

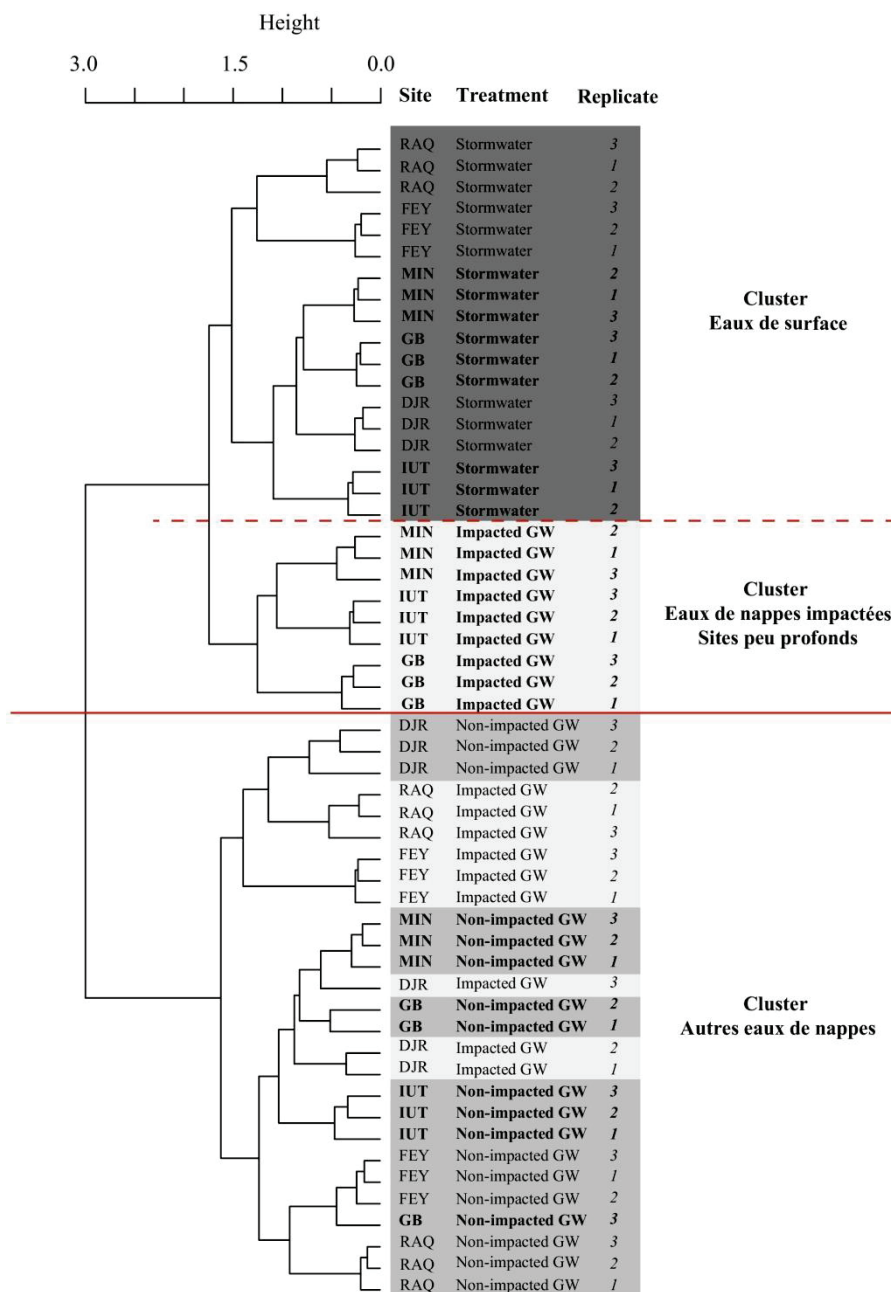
### **Tests complémentaires sur les performances des substrats artificiels**

Les expériences effectuées dans le cadre du test et du choix du substrat artificiel (cf. chapitre 3) se sont déroulées en laboratoire sous conditions contrôlées. Aucun test *in situ* de l'efficacité des substrats artificiels n'a été mis en place dans cette thèse. Cependant, les données obtenues dans le cadre de l'étude de terrain permettent une comparaison préliminaire de la diversité des communautés des eaux et celle des communautés présentes sur les substrats artificiels. En effet, les prélèvements d'eau et les incubations des substrats artificiels ont eu lieu en même temps (même période pluvieuse). Les analyses et dendrogrammes présentés en dans le chapitre 2 (figure 4) et dans la figure 5.1 (ci-dessous) ont été effectués de manière indépendante mais nous pouvons d'ores et déjà dégager quelques informations en comparant les deux dendrogrammes. A noter que l'analyse du premier dendrogramme (chapitre 2, figure 4) est faite à partir des prélèvements d'eau. Le deuxième dendrogramme (figure 5.1) a été réalisé à partir de l'analyse faite sur les substrats artificiels suivant la même procédure que le premier, présentée dans le chapitre 2.

Dans le chapitre 2, nous concluons que les eaux de nappes phréatiques impactées pour les sites peu profonds (i.e. IUT aval, GB aval et MIN aval) qui ont été prélevées au jour 10 étaient plus similaires, en termes d'OTU, à la composition observée pour les eaux de surface que celle des eaux de nappes non-impactées. Ces trois points se regroupent donc dans le cluster « eaux de surface ». Lorsque l'on regarde le dendrogramme obtenu à partir de l'analyse faite sur les substrats artificiels (figure 5.1) après 10 jours d'incubation des supports, les mêmes tendances sont observées. En effet, il y a un cluster « eaux de surface » bien distinct du cluster « eaux de nappes » et les échantillons correspondant aux sites peu profonds et dont les incubations ont été faites dans les eaux de nappes impactées sont plus similaires aux eaux de surfaces qu'aux autres eaux de nappes.

En résumé, les mêmes conclusions peuvent être tirées que ce soit par l'approche prélèvements d'eau ou l'approche substrats artificiels, ce qui semble conforter les résultats des expériences en laboratoire (chapitre 3) où il a été montré que les substrats artificiels capturaient une diversité représentative des eaux testées. Néanmoins, l'approche qui utilise les substrats artificiels donne des résultats qui présentent moins de variabilité car ils donnent une vision intégrée des communautés bactériennes dans le temps. Mais pour une analyse plus juste, il est

nécessaire de prendre en compte tous les échantillons en même temps dans l'analyse bioinformatique ce qui n'est pas le cas ici. Cette analyse sera faite prochainement afin d'effectuer une comparaison des communautés bactériennes des eaux de nappes phréatiques et celles des biofilms qui se sont développés sur les substrats artificiels dans des conditions naturelles.



**Figure 5.1 :** Dendrogramme basé sur une classification hiérarchique des échantillons de substrats artificiels, d'après les dissimilarités de Bray-Curtis

## Devenir des bactéries pathogènes dans les systèmes de recharge des nappes phréatiques

La présence de bactéries pathogènes dans les eaux de ruissellement est avérée. Par exemple, les concentrations en coliformes, entérocoques et autres indicateurs de contamination fécale comme les *E.coli* sont importantes dans les eaux ruisselant sur le bassin versant du site de Django Reinhardt (Chassieu, 69). La présence de *Pseudomonas aeruginosa* a également été détectée dans ces eaux avec notamment des formes pathogènes (Marti et al., com. pers.). L'ensemble de ces bactéries présentes dans les eaux pluviales vont donc se retrouver en grande concentration dans les bassins de rétention et d'infiltration. De ce fait, de nombreux travaux ont été menés sur les sédiments de ces bassins et en particulier celui de Django Reinhardt (Sébastien et al., 2014, Thèse Bernardin 2017, Marti et al, com. pers. et Vautrin et al., com. pers). La concentration des indicateurs de contaminations fécales sont significatives. Des pathogènes opportunistes comme *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas caviae* ou encore des actinobactéries tels que les *Nocardia cyricigeorgica* sont fréquemment retrouvées dans les campagnes d'échantillonnages (Thèse Bernardin 2017). Cependant, peu d'études se sont, pour le moment, intéressées au devenir de ces bactéries pathogènes dans les bassins de rétention/infiltration. La question sous-jacente est de savoir si un transfert vers la nappe phréatique est possible via l'infiltration des eaux pluviales. Même si mes travaux de thèse suggèrent un faible transfert surface-nappe vu à l'échelle de la communauté, ceci n'est peut-être pas le cas pour certains agents bactériens qui représentent un intérêt sanitaire. Les approches utilisées durant cette thèse ne permettaient pas de discriminer les espèces et inférer leur dangerosité. Des outils doivent être développés pour étudier les transferts d'agents pathogènes. Des approches de PCR quantitatives sont possibles mais les approches métagénomiques et de séquençages dédiées au suivi de certains groupes de risque semblent montrer un potentiel important. Pour illustrer, le gène *tpm* codant pour une Thiopurine méthyl-transférase présente un biais de répartition avec une occurrence plus élevée chez les bactéries pathogènes opportunistes comme les *Burkholderia du cepacia complexe*, les *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas caviae*, *Acinetobacter*, *Legionella pneumophila*, *Bordetella pertussis* ou bien encore les bactéries du genre *Vibrio*. Ce gène peut permettre une discrimination au niveau spécifique voire infra-spécifique (Cournoyer et al., com. pers.).

Cependant les concentrations attendues au sein des nappes phréatiques risquent d'être faibles par rapport aux autres taxons présents et la probabilité de ne pas les détecter par une approche classique d'échantillonnage actif des eaux est probable. L'idée est donc de mettre en application les substrats artificiels utilisés au cours de cette thèse car ils pourraient être un

support permettant l'attachement et la croissance de ces pathogènes au sein du biofilm développé, améliorant ainsi la détection de ces micro-organismes. Des analyses *tpm* seront effectuées sur l'ensemble des échantillons de terrain de cette thèse afin d'avoir une première idée de la prévalence de certaines formes pathogènes dans les nappes phréatiques.

### **Description des communautés microbiennes des nappes phréatiques impactées et non-impactées par temps sec**

Les travaux réalisés dans le chapitre 2 s'ouvrent sur deux hypothèses pouvant expliquer les similarités faibles entre les compartiments surface-nappe impactée et entre les compartiments nappe impactée-nappe non impactée. Nous faisons l'hypothèse que les communautés observées dans les nappes impactées étaient issues soit (1) d'un effet de transfert des bactéries de la ZNS lors de l'infiltration, soit (2) issues de la sélection des bactéries par les conditions physico-chimiques particulières suite à l'infiltration des eaux pluviales. Si la seconde hypothèse a fait l'objet des travaux du chapitre 4 avec notamment l'étude de l'enrichissement en matière organique dissoute sur les communautés microbiennes, accepter ou écarter la première hypothèse est plus difficile. En effet, il est compliqué de prélever des échantillons dans la ZNS. Néanmoins nous proposons une stratégie alternative qui pourrait nous éclairer sur cet effet de transfert des bactéries de la ZNS à la nappe phréatique.

L'idée est de déterminer les communautés microbiennes des nappes phréatiques lors d'une période de temps sec et de les comparer aux communautés des piézomètres témoins (i.e. non impactés par temps de pluie). Ceci devrait permettre de comparer les communautés bactériennes retrouvées en absence de transfert hydrique important et donc de lessivage des micro-organismes de la ZNS. Des enregistrements continus ainsi que des prélèvements trimestriels sont effectués depuis plusieurs années sur ces sites dans le cadre de l'observatoire de terrain en hydrologie urbaine (OTHU). Cela permet d'étudier la dynamique des paramètres physico-chimiques de ces nappes phréatiques. Il est observé que les concentrations de certaines variables comme le carbone organique dissous ont tendance à rester supérieures dans les nappes impactées que dans les nappes non-impactées (Foulquier et al., 2011), montrant un impact durable dans le temps de l'enrichissement en matière organique dissoute par les techniques de recharge en eaux pluviales. De ce fait, si les communautés bactériennes sont principalement impactées par les conditions physico-chimiques (hypothèse 1), alors elles

devraient rester différentes des eaux non-impactées même par temps sec. A l'inverse, si les communautés redeviennent « similaires » aux communautés témoins en période de temps sec, cela suggère que les effets de sélection par les conditions physico-chimiques seraient limités et qu'il serait plus probable que les différences observées lors d'un temps de pluie soient dues à des phénomènes de transfert de la ZNS vers la nappe.

### **Résistance et résilience des communautés bactériennes face à aux perturbations exercées par l'infiltration des eaux pluviales**

Dans les écosystèmes naturels, les perturbations peuvent altérer l'abondance et la diversité des espèces et ainsi influencer les cycles biogéochimiques, la production primaire ou d'autres processus écosystémiques clés (Swanson et al., 2011 ; Pulsford et al., 2016). Nous avons montré dans cette thèse que les perturbations engendrées par les pratiques d'infiltration des eaux pluviales entraînaient des changements sur les communautés bactériennes. Néanmoins, nos analyses se sont bornées à une période courte de 10 jours qui ne permet pas de tester de la répétabilité des phénomènes observés ni de la potentielle stabilité/instabilité des communautés collectées dans les nappes phréatiques. Aussi, il serait intéressant de quantifier la résistance (qui conférerait une stabilité) et la résilience (qui conférerait un retour à un état initial) des communautés bactériennes des nappes phréatiques soumise aux perturbations liées à la recharge des nappes par des eaux pluviales. Ceci est d'autant plus crucial que les organismes vivant dans des environnements constants (comme les nappes phréatiques) sont plus susceptibles d'être sensibles aux fluctuations environnementales (Hawkes et Keitt, 2015).

Pour étudier ces phénomènes de résistance et de résilience des communautés microbiennes, les substrats artificiels pourront être incubés in situ dans des piézomètres dits « non-impactés » (i.e. les contrôles) et « impactés ». Les substrats artificiels seraient tous déposés avant une perturbation pendant une période de temps sec conséquente (au moins trois semaines). Les premiers dispositifs seraient retirés juste avant un événement pluvieux afin de décrire la communauté bactérienne « avant perturbation ». Les substrats artificiels seraient ensuite retirés à différents temps pendant la perturbation (afin d'évaluer la résistance) et après la perturbation (évaluation de la résilience) jusqu'à une dizaine de jours. La dynamique des communautés bactériennes durant la perturbation pourra être effectuée par des analyses de méta-taxogénomiques du gène 16S comme cela a été réalisé au cours de mes travaux de thèse, puis des comparaisons seront effectuées par des analyses de dissimilarités classiques. Ces

investigations peuvent être complétées par des analyses d'expression de gènes clés de certains processus écosystémiques en utilisant de la PCR quantitative. Nous pouvons cibler, par exemple, des gènes impliqués dans la dégradation de composés organiques (*coxL*, *vanB*, *dddD*), dans la dénitrification (*narG*, *napA*, *nirS*, *nirK*, *nosZ*) ou encore dans la réduction des sulfates (*dsrAB*, *apsA*). Ces approches permettraient de coupler les approches de dynamique de communautés classiques avec des approches permettant d'étudier la réponse fonctionnelle des communautés aux perturbations.



## ANNEXES

### ANNEXE 1 : Vues aériennes des sites d'études

*Sites profonds (Zone non saturées supérieures à 10 mètres)*

#### 1 - Bassin de Django Reinhardt (DJR) - Chassieu





**2 - Bassin de chemin de Feyzin (FEY) - Mions**



**3 - Bassin de chemin de Raquin (RAQ) - Chassieu**





*Sites peu profonds (Zone non saturées inférieures à 3 mètres)*

**4 - Bassin de Minerve (MIN) - Saint Priest**

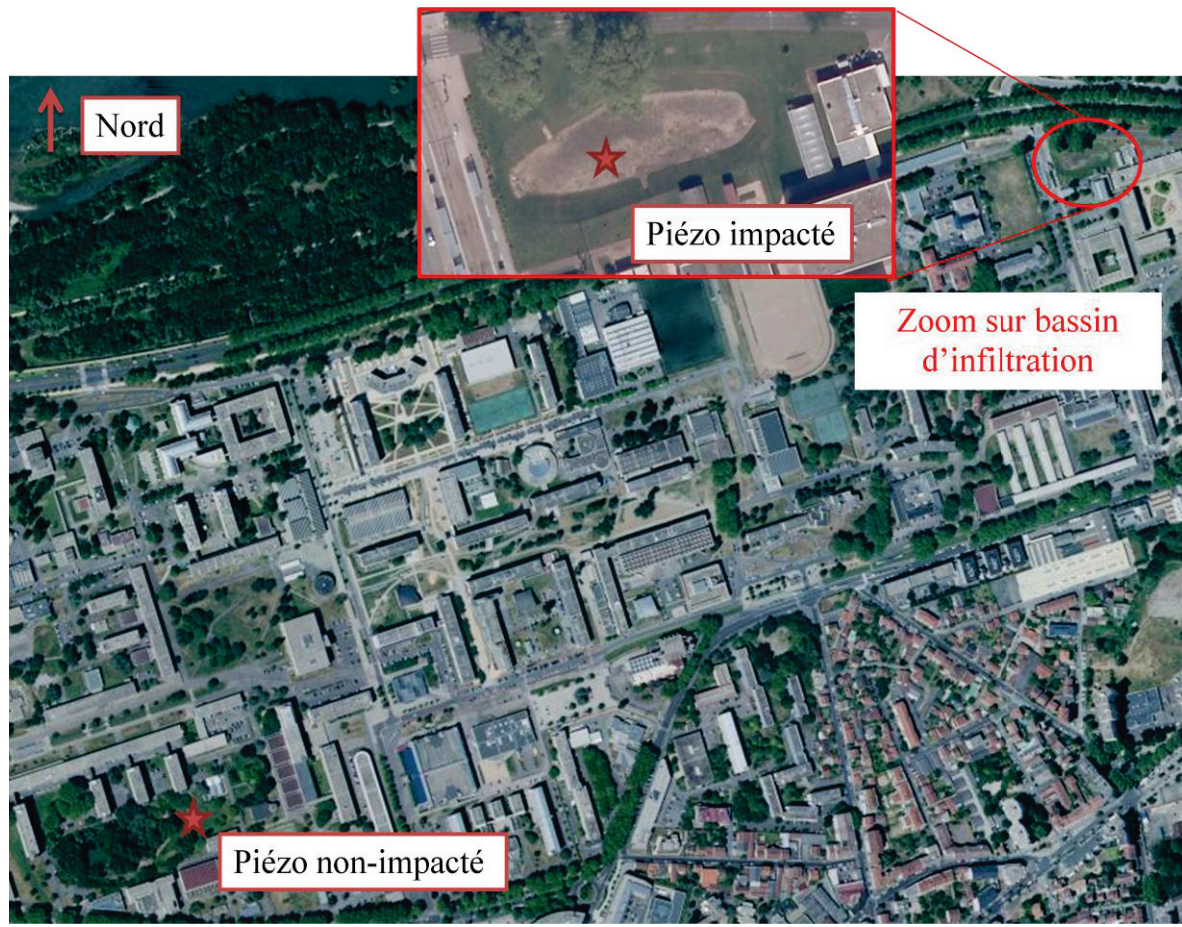


**5 - Bassin de Grange Blanche (GB) - Corbas**





## 6 - Bassin de l'IUT (IUT) – Villeurbanne



**Article 4**

**UTILISATION DE BILLES DE VERRE COMME SUBSTRATS  
ARTIFICIELS POUR LA CARACTERISATION DES  
COMMUNAUTES MICROBIENNES DANS LES NAPPES  
PHREATIQUES : MISE AU POINT METHODOLOGIQUE**

**Jérémy VOISIN<sup>1,2</sup>, Benoit COURNOYER<sup>2</sup>, Florian MERMILLOD-BLONDIN<sup>1</sup>**

- 1- Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, ENTPE, UMR5023, Écologie des Hydrosystèmes Naturels et Anthropisés, Villeurbanne, F-69622, France
- 2- Université Lyon 1, VetAgro Sup, UMR CNRS 5557, & UMR INRA 1418, Ecologie Microbienne, Research Team "Bacterial Opportunistic Pathogens and Environment", Marcy L'Etoile, F-69280, France

***Publié dans La Houille Blanche***

***La Houille Blanche n°4 (2015) 52-57***

***<http://dx.doi.org/10.1051/lhb/20150046>***

## **RESUME**

Dans un objectif d'étudier l'impact de l'infiltration des eaux pluviales en milieu urbain sur les eaux souterraines, il est nécessaire de développer des outils permettant d'évaluer la qualité microbiologique des nappes phréatiques. La difficulté majeure des études microbiologiques des nappes phréatiques réside dans l'échantillonnage des bactéries. Un système d'échantillonnage passif, par incubation de substrats artificiels dans la nappe, pourrait permettre d'obtenir une image plus fiable de la diversité des micro-organismes transitant dans ces systèmes. Le but de cette étude a été de tester l'efficacité d'un substrat artificiel, des billes de verre de différents diamètres (4, 6, 8 et 10 mm), pour le piégeage et le développement de biofilm dans deux eaux ayant des concentrations en bactéries et en nutriments contrastées. Les résultats montrent que les bactéries peuvent se développer sous forme d'un biofilm à la surface des billes de verre et que le type d'eau a une influence majeure sur l'échantillonnage passif. Ces premières expériences ont aussi permis de conclure qu'il est plus intéressant en terme de biomasse bactérienne d'utiliser dans le dispositif d'échantillonnage des billes d'un diamètre de 8 ou 10 mm plutôt que des billes d'un diamètre inférieur. En effet, les billes de grandes tailles semblent favoriser les échanges entre la surface des billes et le milieu environnant, favorisant la colonisation et la croissance microbienne.

## **MOTS CLEFS**

Biofilms ; Eaux urbaines ; Échantillonnage passif ; Nappes aquifères

## ABSTRACT

Groundwater is the principal source of drinking water for Europeans and its protection becomes a crucial challenge. This is especially the case in urban areas where stormwater management leads to artificial recharge of aquifers with waters contaminated during their runoff on impervious surfaces (i.e. roads, car parks). It appears necessary to assess the impact of these practices on groundwater quality, and especially on microbial groundwater quality which remains largely understudied in groundwater environments. However, the main challenge in microbial groundwater studies is to obtain representative samples of microorganisms. Passive sampling, consisting in the incubation of artificial substrates in piezometers appeared as a better solution than active sampling (i.e. collecting water or sediments directly). Active sampling of groundwater is often biased because bacteria attached to sediments (biofilms) cannot be collected. In this study, we used a method based on glass beads that were inserted in mesh bags and used as artificial substrates for biofilm growth. We aimed to compare four diameters of glass beads (4, 6, 8 and 10 mm) because they could play a key role on the exchanges between the bead surface and the surrounding aquatic environment. Large glass beads generated larger pore spaces than small glass beads, facilitating colonization by aquatic micro-organisms. The efficiency of glass beads of the four diameters at catching micro-organisms was tested on two waters characterized by contrasted microbial and nutrient concentrations. These investigations showed the tested water micro-organisms colonise and grow on the surface of glass beads. These results demonstrated that glass beads having diameters of 8-10 mm were more efficient for biofilm growth than smaller beads (4 and 6 mm). The type of water impacted biofilm growth on glass beads. Bacterial abundance and biomass recovered from passive samplers were dependent upon the initial bacterial concentrations of the waters. Further analyses will be required to define the selectivity and sensitivity of such artificial substrates.

# 1. INTRODUCTION

L'urbanisation a une influence majeure sur le cycle de l'eau, avec notamment une augmentation de l'imperméabilisation des sols et donc du ruissellement des eaux pluviales. Lors d'un épisode orageux, des méthodes dites alternatives de gestion des eaux pluviales ont été développées afin d'éviter les crues en ville et la saturation des stations d'épuration lorsque les espaces urbains sont drainés par des réseaux unitaires. Parmi elles, l'utilisation de bassins d'infiltration a été développée dans de nombreuses agglomérations dont la ville de Lyon. Ces bassins représentent l'exutoire final d'un réseau collectant les eaux qui ruissellent sur un bassin versant souvent urbain ou industrialisé. Les eaux accumulées dans ces bassins vont ensuite s'infiltrer jusqu'à la nappe phréatique et permettre ainsi une recharge en eau des aquifères. Si l'intérêt des bassins d'infiltration en terme hydrologique n'est plus à démontrer, leur impact potentiel sur la qualité biologique des nappes phréatiques reste peu étudié. L'évaluation de ces impacts paraît donc nécessaire sachant que les eaux de nappe phréatique constituent la principale source d'eau potable en Europe et que leur protection qualitative et quantitative est un enjeu majeur. De ce fait, la directive cadre sur l'eau du 23 octobre 2000 fixe l'objectif d'atteindre en 2015 le bon état des eaux superficielles et souterraines sur tout le territoire européen.

Une des principales difficultés dans l'étude des écosystèmes souterrains est le prélèvement d'échantillons représentatifs de la diversité microbienne. Il est possible d'utiliser une approche dite active consistant à prélever par pompage des eaux souterraines. Cependant cette méthode fournit des résultats limités car seule la fraction de bactéries planctoniques libres dans l'eau à un moment donné est collectée. Or, ceci n'est pas représentatif de la composante microbiologique souterraine qui est en majorité présente sous forme de biofilm attaché aux sédiments [Griebler and Lueders, 2008]. Il est alors envisageable d'échantillonner les sédiments de la nappe phréatique, mais cela est techniquement difficile surtout pour les nappes profondes [Chapelle, 2001]. Une autre approche dite passive (i.e. incubation de substrats artificiels colonisables par les micro-organismes) semble prometteuse pour l'étude des communautés microbiennes. Cette méthode repose sur la capacité des micro-organismes à coloniser une surface et se développer dans une matrice formant ainsi une pellicule : le biofilm. L'utilisation de substrats artificiels pour l'échantillonnage des bactéries dans les



milieux hydriques n'est pas rare [Langmark *et al.*, 2004 ; Moss *et al.*, 2006] mais seules quelques études ont utilisé ce système dans les environnements souterrains [Claret, 1998a,b ; Williamson *et al.*, 2012]. Mermillod-Blondin *et al.* [2013] ont mené une première étude pour évaluer l'état trophique des nappes phréatiques impactées par les recharges artificielles en eaux pluviales dans différents bassins d'infiltration du Grand Lyon en utilisant des billes de verre de 4 mm de diamètre comme substrat artificiel.

Au vu des résultats encourageants de cette étude sur le lien entre la quantité de carbone organique dissous (source de carbone pour les micro-organismes) et la biomasse microbienne, il a semblé pertinent d'approfondir ces travaux en testant la capacité de substrats artificiels à piéger la diversité des communautés microbiennes et plus particulièrement les bactéries représentant une préoccupation sanitaire telle que *Legionella pneumophila*, *Leptospira* spp., *Pseudomonas aeruginosa* qui peuvent être présentes dans les eaux de ruissellement. Ce travail est crucial afin de quantifier l'impact de l'infiltration des eaux pluviales sur la qualité biologique des nappes phréatiques. Dans un premier temps, il nous a semblé important de tester l'influence de la taille des billes de verre sur la colonisation par des micro-organismes présents dans des eaux de natures différentes. En effet, la taille des substrats et les espaces créés entre eux peuvent modifier les échanges entre la surface des billes et le milieu environnant, et affecter la formation du biofilm [Bott, 1993 ; Characklis and Marshall, 1990 ; Stoodley *et al.*, 1999]. Dans ce contexte, les premiers travaux présentés dans cet article visent à répondre aux questions suivantes : (1) le diamètre des billes de verre est-il important pour le développement du biofilm ? (2) quelle est la cinétique de formation du biofilm sur ces substrats artificiels ? (3) trouve-t-on des différences de colonisation des billes à partir de bactéries provenant d'eaux différentes ?

## **2. MATERIELS ET METHODES**

### 2.1. Mise en place du dispositif expérimental

Afin d'effectuer la mise au point méthodologique de notre outil d'échantillonnage, deux eaux ayant des conditions trophiques et des charges bactériennes différentes ont été utilisées dans cette expérience (table 1). Des eaux usées provenant d'un réseau unitaire sur le site du déversoir d'orage de Grézieu-la-Varenne (69) ont été prélevées en décembre 2013 par

temps sec. La deuxième eau a été prélevée en février 2014 à la surface du bassin d'infiltration de Django Reinhardt (Chassieu, 69), au niveau du régulateur assurant la jonction entre le bassin de rétention et le bassin d'infiltration, par temps sec également. Le choix de ces eaux repose sur la présence avérée d'une diversité bactérienne importante avec notamment des micro-organismes pathogènes. Ces eaux ont été amenées au laboratoire et conditionnées dans des aquariums, avec agitation et oxygénation constante à une température de 15°C et à l'obscurité tout au long de l'expérience. Des billes de verre ensachées de différents diamètres (4, 6, 8 et 10 mm) ont été incubées pendant 10 jours dans les aquariums. Le verre a été choisi afin d'avoir un support inerte pour ne pas influencer la colonisation et le développement des micro-organismes. Les billes de verre ont été préalablement autoclavées afin de s'assurer d'une absence de bactéries sur les supports au début de l'expérimentation (ceci a été vérifié par les mesures effectuées au jour 0, voir ci-dessous).

**Table 1 :** Paramètres physico-chimiques et dénombrements bactériens des eaux au jour 0

Données physico-chimiques et microbiologiques	Eaux usées	Eau surface bassin
EC ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	1133 (+/- 3)	580 (+/- 1)
pH	8,39 (+/- 0,07)	8,22 (+/- 0,02)
OD (mg/L)	6,45 (+/- 0,48)	9,01 (+/- 0,08)
$\text{NH}_4^+$ (mg/L)	33,02 (+/- 0,41)	$0,92 \cdot 10^{-3}$ (+/- $0,91 \cdot 10^{-3}$ )
$\text{NO}_3^-$ (mg/L)	18,21 (+/- 0,65)	7,51 (+/- 0,71)
$\text{PO}_4^{3-}$ ( $\mu\text{g}/\text{L}$ )	134 (+/- 40,3)	154 (+/- 5,5)
COD (mg/L)	71,36 (+/- 0,47)	3,67 (+/- 0,10)
Hétérotrophes (UFC/mL)	$1,23 \cdot 10^6$ (+/- $2,08 \cdot 10^5$ )	$4,17 \cdot 10^4$ (+/- $1,26 \cdot 10^4$ )
Coliformes thermotolérants (UFC/mL)	$2,67 \cdot 10^5$ (+/- $3,11 \cdot 10^4$ )	$2,70 \cdot 10^2$ (+/- $3,97 \cdot 10^1$ )
<i>E.coli</i> (UFC/mL)	$4,47 \cdot 10^4$ (+/- $1,60 \cdot 10^4$ )	18,3 (+/- 5,77)
<i>Pseudomonas</i> et apparentés (UFC/mL)	$3,73 \cdot 10^2$ (+/- $3,12 \cdot 10^2$ )	15,0 (+/- 26,0)

EC : conductivité électrique, OD : oxygène dissous, COD : Carbone organique dissous. Pour tous les paramètres : moyenne (+/- déviation standard) pour n = 3 réplicats.

## 2.2. Analyses microbiologiques

Les analyses microbiologiques ont été menées sur 5 temps (0, 2, 4, 7 et 10 jours). A chaque temps, trois sacs de billes par diamètre testé ont été collectés afin de disposer de réplicats de mesures nécessaires au traitement statistique des résultats. Pour chaque analyse,

les billes ont été préalablement lavées 3 fois dans du chlorure de sodium 0,8 % afin de supprimer les micro-organismes libres (non fixés aux billes).

### 2.2.1. Dénombrement bactérien

Après rinçage, le biofilm microbien présent sur la surface des billes de verre a été décroché dans 10 mL de chlorure de sodium à 0,8 % en utilisant un agitateur de type vortex pendant une minute à 2500 tours/minute. Le surnageant a été prélevé et différentes dilutions ont été étalées sur milieu gélosé. Chaque dilution a été répétée 3 fois. La flore totale hétérotrophe a été estimée en réalisant le dénombrement des colonies (UFC : unité formant colonie) sur gélose Trypticase Soja diluée au 10<sup>ème</sup> à 28°C pendant 48 heures. Les bactéries appartenant au genre des *Pseudomonas* et apparentés ont été dénombrées en utilisant le milieu *Pseudomonas* Agar Base supplémenté en cétrimide et en acide nalidixique à 37°C pendant 48 heures. Enfin, le milieu de culture Compass Ecc Agar a été utilisé pour estimer le nombre de bactéries coliformes thermotolérantes (i.e. ayant pour origine le tractus digestif des animaux) et le nombre d'*Escherichia coli*, avec une incubation à 42°C pendant 24 heures. Ces dénombrements ont également été réalisés au jour 0 sur les deux types d'eaux afin d'estimer le nombre initial de bactéries pour chacun de nos groupes cibles.

### 2.2.2. Estimation de la biomasse du biofilm

Afin d'estimer la biomasse du biofilm, un dosage des protéines a été effectué directement sur les billes de verre rincées, selon la méthode de Lowry simplifiée [Peterson, 1977]. Les billes de verre ont été traitées avec une solution de Lowry 50 % pendant 20 minutes, puis avec le réactif de Folin pendant 30 minutes à l'obscurité. L'absorbance a ensuite été mesurée à 750 nm et la quantité de protéines a été estimée en reportant la valeur d'absorbance sur une courbe de calibration réalisée avec différentes concentrations d'albumine de sérum bovin (BSA).

## 2.3. Analyses physico-chimiques

Des analyses physico-chimiques ont été effectuées sur les eaux à différents temps (0, 2, 4, 7 et 10 jours). La température, la conductivité, le pH (LF92, WTW<sup>TM</sup>, Weilheim, Germany) et l'oxygène dissous (HQ20, HACH<sup>TM</sup>, Dusseldorf, Germany) ont été mesurés. Les concentrations en nutriments inorganiques (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> et PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) ont été dosées en réalisant des méthodes colorimétriques [Grasshoff *et al.*, 2009] avec un analyseur séquentiel

(Easychem plus, Systea, Anagni, Italia). Le carbone organique dissous (COD) a été mesuré en utilisant un analyseur de carbone (multi N/C 3100, Analytik Jena, Jena, Germany).

#### 2.4. Analyses statistiques

Pour chacune des eaux testées, des analyses de variance à 2 facteurs (ANOVA 2) ont été effectuées afin de tester l'effet du temps et du diamètre des billes sur le nombre d'hétérotrophes et la biomasse (quantité de protéines). En cas d'effets significatifs pour les ANOVA 2, des comparaisons une à une ont été réalisées à l'aide de tests post-hoc HSD (Honest Significant Difference) de Tukey. Pour toutes les variables, la normalité a été vérifiée par un test de Shapiro-Wilk et l'homoscédasticité a été testée par un test de Bartlett. Dans le cas où les conditions n'étaient pas réunies, les données ont été transformées en Log. Les analyses ont été réalisées avec le logiciel R v.2.14.0 [R Development Core Team, 2008].

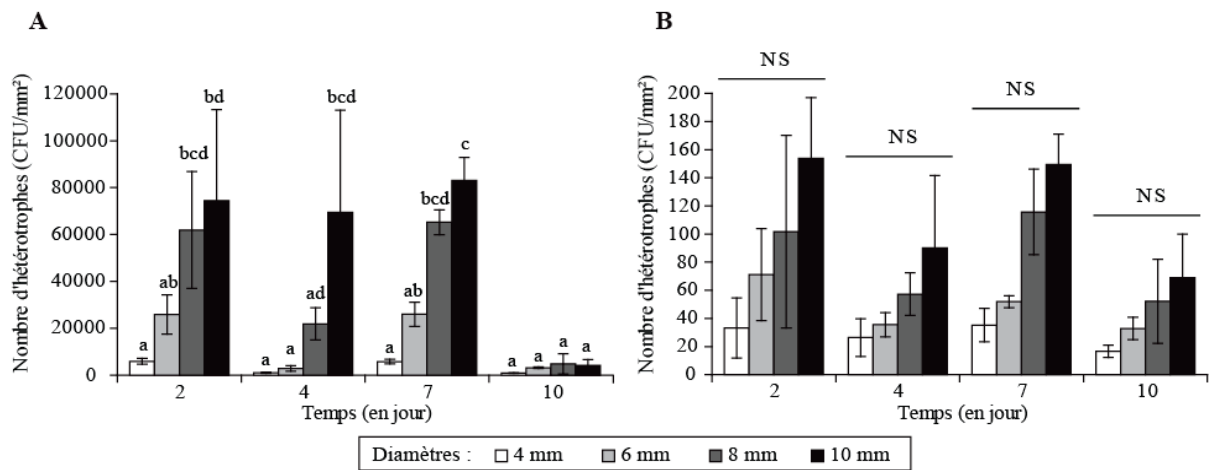
### **3. RESULTATS ET DISCUSSION**

#### 3.1. Effet du diamètre des billes de verre sur la formation du biofilm

Pour les eaux usées, les analyses révèlent que le diamètre des billes de verre a un effet significatif sur le nombre de bactéries cultivables et la biomasse du biofilm (ANOVA 2, effet diamètre,  $p < 0,001$ ). En effet, le nombre de bactéries est d'autant plus important que les billes sont grosses (figure 1A). Cela est notamment valable pour les eaux usées où le nombre de bactéries est significativement plus élevé sur les billes de diamètre 10 mm que sur les billes de diamètre 4 mm pour les jours 2, 4 et 7. Ces résultats montrent que plus le diamètre des billes est élevé, plus le nombre de bactéries est élevé pour une même surface. En accord avec l'hypothèse initiale, cela peut s'expliquer par la disposition des billes dans le sachet. En effet, plus leur diamètre est grand, plus la circulation de l'eau dans les pores est supposée élevée ce qui entraînerait une hausse de la colonisation de la surface du substrat par les micro-organismes et une hausse des échanges bactéries-nutriments favorisant une plus forte croissance du biofilm. En termes de biomasse, en utilisant un dosage des protéines comme proxy, les résultats montrent qu'au jour 2, les billes de diamètre 10 mm fixent une biomasse microbienne significativement supérieure aux autres diamètres, confirmant ainsi les résultats

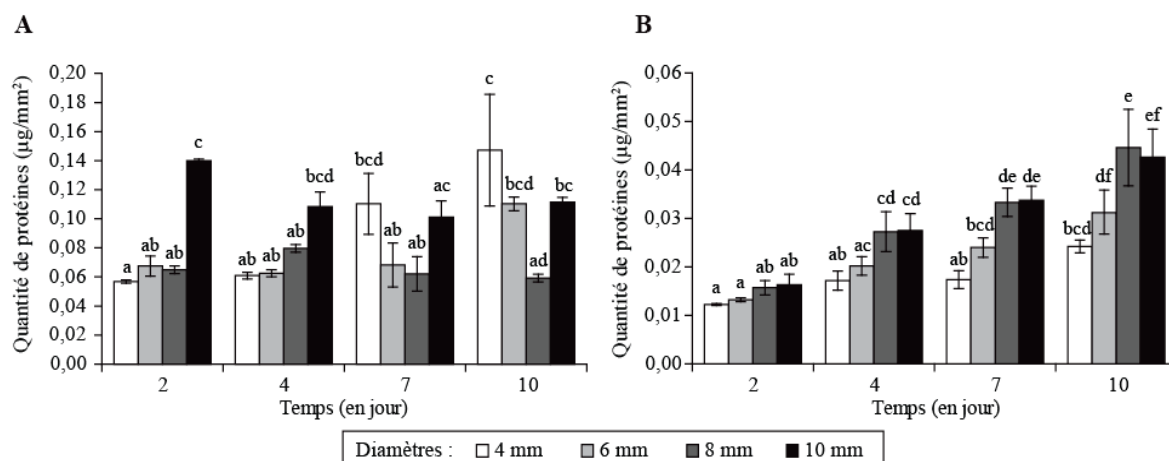
des dénombrements. Cependant, cet effet diamètre n'est plus observé pour les jours 4 et 7 (figure 2A).

L'influence du diamètre des billes sur le développement du biofilm est moins claire pour les eaux du bassin d'infiltration (figures 1B et 2B). En effet, la même tendance que pour les eaux usées est observable graphiquement pour le dénombrement des hétérotrophes, mais celle-ci n'est pas supportée par les tests statistiques (ANOVA 2, effet diamètre,  $p > 0.05$ ). Ces résultats sont à interpréter prudemment du fait des écarts-types élevés et donc d'une puissance statistique probablement faible (figure 1B). Cependant, lorsqu'on regarde la biomasse du biofilm, l'effet diamètre est significatif (ANOVA 2, effet diamètre,  $p < 0,001$ ). En effet, pour les jours 4, 7 et 10, la quantité de protéines par  $\text{mm}^2$  est significativement supérieure pour les diamètres de 8 et 10 mm que pour les billes de diamètre 4 mm (figure 2B).



**Figure 1 :** Dénombrement des hétérotrophes pour les 4 diamètres de billes testés.

En (A): Dénombrement dans les biofilms après incubation dans les eaux usées. En (B): Dénombrement dans les biofilms après incubations dans les eaux du bassin d'infiltration de Django Reinhardt. Les lettres indiquent les différences significatives entre les barres ( $p < 0,05$ , test HSD de Tukey). Deux barres avec la même lettre ne sont pas significativement différentes. NS signifie non significativement différent ( $p > 0,05$ ). Les valeurs obtenues au jour 0 sur les supports étant très faibles (après autoclavage des supports), elles n'ont pas été représentées sur les graphiques.



**Figure 2 :** Dosage des protéines pour les 4 diamètres de billes testés.

En (A): Dosage dans les biofilms après incubation dans les eaux usées. En (B): Dosage dans les biofilms après incubation dans les eaux du bassin d'infiltration de Django Reinhardt. Les lettres indiquent les différences significatives entre les barres ( $p < 0,05$ , test HSD de Tukey). Deux barres avec la même lettre ne sont pas significativement différentes. Les valeurs obtenues au jour 0 sur les supports étant très faibles (après autoclavage des supports), elles n'ont pas été représentées sur les graphiques.

### 3.2. Cinétique de formation du biofilm sur les billes de verre

En comparant les dénombrements réalisés sur les billes de verre issues des eaux usées aux jours 2, 4 et 7, on n'observe pas de différence significative et cela quel que soit le diamètre (figure 1A). Ces observations sont également valables pour les billes de verre incubées dans les eaux du bassin d'infiltration où les différences ne sont pas significatives entre les différents jours pour chaque diamètre (figure 1B, ANOVA 2, effet temps,  $p > 0,05$ ). Le biofilm se forme donc rapidement (entre le jour 0 et le jour 2) et la quantité de cellules cultivables ne semble pas augmenter par la suite. Il semblerait donc que l'ensemble des bactéries se soient fixées et développées sur les supports au bout de 2 jours, et que les laisser plus longtemps n'aurait pas d'incidence en terme de nombre de bactéries cultivables dans le biofilm. Ces résultats sont cohérents avec ceux du dosage des protéines pour les deux types d'eau (figure 2). Cependant, une diminution significative du nombre de bactéries cultivables dans le biofilm est observée au jour 10 dans les eaux usées (figure 1A). Cette décroissance n'est pourtant pas observée lors du dosage des protéines. Cela pourrait s'expliquer par un changement d'état physiologique des bactéries formant le biofilm. Ces bactéries seraient soit mortes soit dans un état non cultivable (VBNC). Des travaux ont montrés que certaines

bactéries pouvaient suite à un stress rester viables mais perdre leur capacité à croître sur un milieu de culture [Xu *et al.*, 1982 ; Roszak et Colwell, 1987 ; Olivier et Wanucha, 1989]. Dans notre cas, ce passage à l'état VBNC pourrait être induit par un stress lié à la température. En effet, les incubations ont été réalisées à 15°C pendant plusieurs jours, alors que les bactéries majoritairement présentes dans les eaux usées proviennent du tractus digestif humain et sont donc adaptées à une température de 37°C.

Ces résultats nous montrent que même si les eaux sont faiblement chargées en micro-organismes, la colonisation des billes est très rapide et le nombre de bactéries ne semble pas augmenter dans le temps. Cela nous indique qu'il n'est pas forcément nécessaire de réaliser des incubations *in situ* de longue durée, comme ce fut le cas lors de l'expérimentation de Mermillod-Blondin *et al.* [2013]. La perte de cultivabilité pourrait être un frein lors de l'étude *in situ*. Des approches moléculaires ou des techniques de cytométrie en flux, pourraient permettre de s'affranchir des étapes de culture bactérienne.

### 3.3. Effet des eaux sur la formation du biofilm sur billes de verre

Les eaux usées du site de Grézieu-la-Varenne sont très chargées en micro-organismes contrairement aux eaux prélevées dans le bassin d'infiltration de Django Reinhardt (table 1). On trouve ainsi  $1,23 \cdot 10^6$  UFC/mL hétérotrophes cultivables dans les eaux usées contre  $4,17 \cdot 10^4$  UFC/mL dans les eaux de Django Reinhardt. Cette tendance est également observable pour les autres groupes bactériens dénombrés, que ce soit pour les coliformes thermotolérants, les *E.coli* ou les *Pseudomonas* et genres apparentés. Ces concentrations supérieures de micro-organismes dans les eaux usées vont influencer la colonisation et le développement des bactéries sur la surface des billes de verre. En effet, on retrouve bien plus de bactéries sur les billes ayant été incubées dans les eaux usées (i.e. en moyenne  $2,85 \cdot 10^4$  UFC/mm<sup>2</sup> pour les hétérotrophes) que celles incubées dans les eaux du bassin d'infiltration où l'on retrouve en moyenne 58 UFC/mm<sup>2</sup> (figure 1). Ces observations sont également valables pour les autres groupes ciblés, où environ  $10^2$  UFC/mm<sup>2</sup> d'*E.coli* et de *Pseudomonas* et apparentés sont présentes dans le biofilm formé à partir des eaux usées, alors que ces micro-organismes sont quasiment indétectables dans les biofilms issus des eaux de bassin d'infiltration (nombre d'UFC inférieur à 1 par mm<sup>2</sup>, données non montrées). Lorsque l'on regarde la quantité de protéines par unité de surface, les mêmes conclusions sont obtenues. On retrouve une biomasse en moyenne 3 fois plus importante sur les billes de verre issues des eaux usées que sur celles des eaux du bassin d'infiltration (figure 2). Ces résultats sont sans



doute dus au nombre plus élevé de micro-organismes dans les eaux usées, permettant ainsi une colonisation plus importante de la surface disponible. De plus, les caractéristiques physico-chimiques des eaux peuvent également expliquer ces observations. En effet, les valeurs de nutriments organiques sont environ 20 fois supérieures dans les eaux usées, avec 71,36 (+/- 0,47) mg/L de carbone organique dissous au jour 0 alors qu'il n'y a que 3,67 (+/- 0,10) mg/L dans les eaux du bassin de Django Reinhardt (table 1). Cela se traduit donc par une quantité de substrats bien plus importante dans les eaux usées, permettant sans doute une plus forte croissance des micro-organismes.

Ces résultats nous indiquent que ce dispositif d'échantillonnage passif est efficace pour détecter des bactéries mais permet une capture des micro-organismes proportionnelle aux concentrations mesurées dans le milieu.

#### 4. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Ces premiers résultats nous indiquent que le dispositif de substrats artificiels est pertinent comme outil d'échantillonnage passif. En effet, on observe bien une biomasse et la présence de bactéries cultivables sur les supports et cela à partir de 2 jours, qu'ils soient incubés dans des eaux fortement chargées en micro-organismes ou non. Afin d'être le plus efficace possible, il apparaît nécessaire d'utiliser dans le dispositif des billes ayant un diamètre de 8 à 10 mm afin d'avoir un biofilm plus abondant. Pour compléter les données d'effectifs, il pourrait être intéressant d'utiliser de la cytométrie en flux en utilisant des colorations permettant de discriminer les cellules viables des cellules mortes [Boulos *et al.*, 1999]. D'autres substrats inertes (i.e. graviers et billes d'argile) seront testés et comparés entre eux. Des expériences viseront à déterminer la diversité microbienne présente sur les substrats, en fonction du type de matériel, du diamètre ainsi que des caractéristiques chimiques et microbiologiques des eaux d'incubation. Enfin, des tests de sensibilité pour certaines bactéries d'intérêt seront réalisés afin d'évaluer la capacité des substrats à capter ces bactéries et déterminer les concentrations seuils pour lesquelles les substrats artificiels ne seraient plus efficaces. L'ensemble de ces résultats devrait permettre de faire un choix de substrat artificiel judicieux pour les expérimentations de terrain visant à déterminer l'impact des systèmes de recharge en eaux pluviales sur la communauté microbienne et le transfert de bactéries représentant une préoccupation sanitaire dans les nappes phréatiques.

## 5. REMERCIEMENTS

La thèse de J. Voisin est soutenue par une allocation doctorale de recherche financée par la région Rhône-Alpes. Ce travail est réalisé dans le cadre du dispositif Observatoire de Terrain en Hydrologie Urbain (OTHU). Les auteurs remercient Bruno Tilly (UMR 5557), Félix Vallier et Laurent Simon (UMR 5023) pour leur soutien technique.

## 6. RÉFÉRENCES

Boulos L., Prévost M., Barbeau B., Coallier J., Desjardins R. (1999). - LIVE/DEAD<sup>®</sup> BacLight<sup>™</sup>: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *J. Microbiol. Methods*, **37**: 77-86.

Bott, T.R. (1993). - Aspects of biofilm formation and destruction. *Corros. Rev.*, **11(1-2)**: 1-24.

Chapelle, F. (2001). - *Ground-water microbiology and geochemistry*. John Wiley & Sons.

Characklis W.G., Marshall K.C. (1990). - *Biofilms*. John Wiley & Sons.

Claret, C. (1998a). - Hyporheic biofilm development on artificial substrata, as a tool for assessing trophic status of aquatic systems: first results. *Annls. Limnol.*, **34(2)**: 119-128.

Claret, C. (1998b). - A method based on artificial substrates to monitor hyporheic biofilm development. *Internat. Rev. Hydrobiol.*, **83(2)**: 135-143.

Grasshoff K., Ehrhardt M., Kremling K. (2009). - *Methods of Seawater Analysis, third edition*. Wiley-VCH.

Griebler C., Lueders T. (2008). - Microbial biodiversity in groundwater ecosystems. *Freshwater Biology*, **54**: 649-677.

Langmark J., Storey M.V., Ashbolt N.J., Stenstrom T.A. (2004). - Artificial groundwater treatment: biofilm activity and organic carbon removal performance. *Water Research*, **38(3)**: 740-748.

Mermillod-Blondin F., Foulquier A., Maazouzi C., Navel S., Negrutiu Y., Vienney A., Simon L., Marmonier P. (2013). - Ecological assessment of groundwater trophic status by using artificial substrates to monitor biofilm growth and activity. *Ecological Indicators*, **25**: 230-238.

Moss J.A., Nocker A., Lepo J.E., Snyder R.A. (2006). - Stability and change in estuarine biofilm bacterial community diversity. *Appl. Environ. Microbiol.*, **72(9)**: 5679-5688.

Oliver J.D., Wanucha D. (1989). - Survival of *Vibrio vulnificus* at reduced temperature and elevated nutrient. *J. Food Saf*, **10**: 79-86.

Peterson G.L. (1977). - A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry*, **83(2)**: 346-356.

R Development Core Team. (2008). – R: A language and environment for statistical computing. <http://www.R-project.org>.

Rozsak D.B., Colwell R.R. (1987). - Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiol. Rev*, **51(3)**: 365-379.

Stoodley P., Dodds I., Boyle J.D., Lappin-Scott H.M. (1999). - Influence of hydrodynamics and nutrients on biofilm structure. *J. Appl. Microbiol. Symp. Suppl*, **85(28)**: 19S-28S.

Williamson W.M., Close M.E., Leonard M.M., Webber J.B., Lin S. (2012). - Groundwater biofilm dynamics grown in situ along a nutrient gradient. *Ground Water*, **50(5)**: 690-703.

Xu H.S., Roberts N., Singelton F.L., Attwell R.W., Grimes D.J., Colwell R.R. (1982). - Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. *Microb. Ecol*, **8(4)**: 313-323.

## REFERENCES

### A

Abel C.D.T., Sharma S.K., Mersha S.A., Kennedy M.D. 2014. Influence of intermittent infiltration of primary effluent on removal of suspended solids, bulk organic matter, nitrogen and pathogens indicators in a simulated managed aquifer recharge system. *Ecol. Eng.* 64, 100–107.

Achtman M., Wagner M. 2008. Microbial diversity and the genetic nature of microbial species. *Nature Reviews Microbiology.* 6, 431-440.

Alfreider A., Krössbacher M., Psenner R. 1997. Groundwater samples do not reflect bacterial densities and activity in subsurface systems. *Water Res.* 31, 832-840.

Allan JD. 1995. *Stream ecology-Structure and function of running waters.* Chapman and Hall, London, pp 388

Allison S.D., Martiny J.B. 2008. Resistance, resilience, and redundancy in microbial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 105, 11512-11519.

Alonso C, Warnecke F, Amann R *et al.* 2007. High local and global diversity of Flavobacteria in marine plankton. *Environ Microbiol.* 9, 1253–1266.

Anderson M.J. 2001. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecol.* 26, 32–46.

Arnaud E., Best A., Parker B.L., Aravena R., Dunfield K. 2015. Transport of Escherichia coli through a Thick Vadose Zone. *J. Environ. Qual.* 44, 1424–1434.

### B

Baker MA, Valett HM, Dahm CN. 2000. Organic carbon supply and metabolism in a shallow groundwater ecosystem. *Ecology.* 81, 3133–3148.

- Bartram A.K., Jiang X., Lynch M.D., Masella A.P., Nicol G.W., Dushoff J., et al. 2014. Exploring links between pH and bacterial community composition in soils from the Craibstone experimental farm. *FEMS Microbiol. Ecol.* 87, 403–415.
- Batiot C., Emblanch C., Blavoux B. 2003. Total Organic Carbon (TOC) and magnesium (Mg<sup>2+</sup>): two complementary tracers of residence time in karstic systems. *Comptes Rendus Geoscience.* 335, 205-214.
- Battin T.J. 1997. Assessment of fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total esterase activity in natural stream sediment biofilms. *Sci. Total Environ.* 198, 51-60.
- Bengtsson G. 1989. Growth and metabolic flexibility in groundwater bacteria. *Microb Ecol.* 18, 235–248.
- Ben Slimene E., Lassabatere L., Winiarski T., Gourdon R., Naturels H. 2015. Modeling Water Infiltration and Solute Transfer in a Heterogeneous Vadose Zone as a Function of Entering Flow Rates. *Journal of Water Resource and Protection.* 7, 1017-1028.
- Bergey E.A. 2006. Measuring the surface roughness of stream stones. *Hydrobiologia.* 563, 247-252.
- Berla BM, Saha R, Immethun CM, Maranas CD, Moon TS, Pakrasi HB. 2013. Synthetic biology of cyanobacteria: unique challenges and opportunities. *Front. Microbiol.* 4:246
- Besemer K., Moeseneder M.M., Arrieta J.M., Herndl G.J., Peduzzi P. 2005. Complexity of bacterial communities in a river-floodplain system (Danube, Austria). *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 609-620.
- Besemer K., Peter H., Logue J.B., Langenheder S., Lindström E.S., Tranvik L.J., Battin T.J. 2012. Unraveling assembly of stream biofilm communities. *ISME J.* 6, 1459-1468.
- Besemer K., Singer G., Limberger R., Chlup A.K., Hochedlinger G., Hödl I., Baranyi C., Battin T.J. 2007. Biophysical controls on community succession in stream biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 4966-4974.
- Bienhold C, Boetius A, Ramette A. 2012. The energy–diversity relationship of complex bacterial communities in Arctic deep-sea sediments. *ISME J.* 6, 724–732.

Borchardt M.A., Bradbury K.R., Gotkowitz M.B., Cherry J.A., Parker B.L. 2007. Human enteric viruses in groundwater from a confined bedrock aquifer. *Environ. Sci. Technol.* 41, 6606–6612.

Bott T.R. 1993. Aspects of biofilm formation and destruction. *Corros. Rev.* 11, 1-24.

Boulos L., Prévost M., Barbeau B., Coallier J., Desjardins R. 1999. LIVE/DEAD<sup>®</sup> BacLight<sup>™</sup>: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *J. Microbiol. Methods.* 37, 77-86.

Boulton A.J. 2005. Chances and challenges in the conservation of groundwaters and their dependent ecosystems. *Aquatic Conservation: marine and freshwater ecosystems.* 15, 319-323.

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.

Boyde A., Franc F. 1981. Freeze-drying shrinkage of glutaraldehyde fixed liver. *J. microsc.* 122, 75-86.

Bray J.R., Curtis J.T. 1957. An ordination of the upland forest communities of southern Wisconsin. *Ecol. Monogr.* 27, 325-349.

Burns A., Ryder D.S. 2001. Potential for biofilms as biological indicators in Australian riverine systems. *Ecol. Manag. Restor.* 2, 53-64.

## C

Canadell J., Jackson R.B., Ehleringer J.B., Mooney H.A., Sala O.E., Schulze E.D. 1996. Maximum rooting depth of vegetation types at the global scale. *Oecologia.* 108, 583-595.

Cardinale M., Brusetti L., Quatrini P., Borin S., Puglia A.M., Rizzi A., Zanardini E., Sorlini C., Corselli C., Daffonchio D. 2004. Comparison of different primer sets for use in automated ribosomal intergenic spacer analysis of complex bacterial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 6147-6156.

- Cardinale BJ, Hillebrand H, Harpole WS *et al.* 2009. Separating the influence of resource 'availability' from resource 'imbalance' on productivity-diversity relationships. *Ecol Lett.* 12, 475–487.
- Caruso T., Chan Y., Lacap D.C., Lau M.C., McKay C.P., Pointing S.B. 2011. Stochastic and deterministic processes interact in the assembly of desert microbial communities on a global scale. *The ISME journal.* 5, 1406-1413.
- Chao A. 1984. Nonparametric Estimation of the Number of Classes in a Population Author. *Scandinavian J Stat.* 11, 265–270.
- Chapelle FH. *Groundwater Microbiology and Geochemistry.* Wiley Press, New York, 2001.
- Chapelle FH, Lovley DR. 1990. Rates of microbial metabolism in deep coastal plain aquifers. *Appl Environ Microbiol.* 56, 1865–1874.
- Chapin F.S., Schulze E.D., Mooney H.A. 1992. Biodiversity and ecosystem processes. *Trends in Ecology & Evolution* 4, 107-108.
- Characklis W.G., Marshall K.C. 1990. *Biofilms.* John Wiley & Sons.
- Chase J.M. 2007. Drought mediates the importance of stochastic community assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 104, 17430-17434.
- Chase J.M. 2014. Spatial scale resolves the niche versus neutral theory debate. *Journal of vegetation science.* 25, 319-322.
- Chase JM, Leibold MA. 2003. *Ecological Niches: Linking Classical and Contemporary Approaches.* University of Chicago Press: Chicago, IL, USA.
- Chase J.M., Myers J.A. 2011. Disentangling the importance of ecological niches from stochastic processes across scales. *Philosophical transactions of the Royal Society B: Biological sciences.* 366, 2351-2363.
- Cho J.C., Kim S.J., 2000. Increase in bacterial community diversity in subsurface aquifers receiving livestock wastewater input. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 956-965.
- Chocat B. 1997. *Encyclopédie de l'hydrologie urbaine et de l'assainissement.* Editions Tech & Doc Lavoisier (Paris).



- Chow C.E.T., Kim D.Y., Sachdeva R., Caron D.A., Fuhrman J.A. 2014. Top-down controls on bacterial community structure: microbial network analysis of bacteria, T4-like viruses and protists. *The ISME journal*. 8, 816-829.
- Claret C. 1998a. Hyporheic biofilm development on artificial substrata, as a tool for assessing trophic status of aquatic systems: first results. *Annl. Limnol.* 34, 119-128.
- Claret C. 1998b. A method based on artificial substrates to monitor hyporheic biofilm development. *Internat. Rev. Hydrobiol.* 83, 135-143.
- Cooney TJ, Simon KS. 2009. Influence of dissolved organic matter and invertebrates on the function of microbial films in groundwater. *Microb Ecol.* 58, 599–610.
- Cornell H.V., Harrison S.P. 2014. What are species pools and when are they important? *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. 45, 45-67.
- Cottrell MT, Kirchman DL. 2000. Community composition of marine bacterioplankton determined by 16S rRNA gene clone libraries and fluorescence in situ hybridization. *Appl Environ Microbiol.* 66, 5116–5122.
- Cram J.A., Parada A.E., Fuhrman J.A. 2016. Dilution reveals how viral lysis and grazing shape microbial communities. *Limnology and Oceanography*. 61, 889-905
- Cronin A.A., Taylor R.G., Powell K.L., Barrett M.H., Trowsdale S.A., Lerner D.N. 2003. Temporal variations in the depth-specific hydrochemistry and sewage-related microbiology of an urban sandstone aquifer, Nottingham, United Kingdom. *Hydrogeol. J.* 11, 205–216.
- Crump B.C., Amaral-Zettler L.A., Kling G.W. 2012. Microbial diversity in arctic freshwaters is structured by inoculation of microbes from soils. *The ISME journal*. 6, 1629-1639.
- Cusens J, Wright SD, McBride PD *et al.* 2012. What is the form of the productivity-animal-species-richness relationship? a critical review and meta-analysis. *Ecology*. 93, 2241–2252.

## D

Daily G.C. 1997. Introduction: what are ecosystem services? Pages 1–10 in G. C. Daily (editor). *Nature's services: societal dependence on natural ecosystems*. Island Press, Washington, DC.

Danielopol D.L., Gibert J., Griebler C., Gunatilaka A., Hahn H.J., Messana G., Notenboom J., Sket B., 2004. Incorporating ecological perspectives in European groundwater management policy. *Environ. Conserv.* 31, 185-189.

Danielopol D.L., Pospisil P., Rouch R. 2000. Biodiversity in groundwater: a large-scale view. *Trends in Ecology & Evolution*. 15, 223-224.

Datry T. 2003. Urbanisation et qualité des nappes phréatiques : réponse des écosystèmes aquatiques souterrains aux pratiques d'infiltration d'eau pluviale. Thèse Université Lyon 1.

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. North Am. Benthol. Soc.* 24, 461–477.

Datry T., Malard F., Gibert J. 2006. Effect of artificial stormwater infiltration on urban groundwater ecosystems. In: Tellam J.H., Rivett M.O., Israfilov R.G., Herringshaw L.G. (eds) *Urban Groundwater Management and Sustainability*. NATO Science Series (IV: Earth and Environmental Sciences), vol 74. Springer, Dordrecht.

Dechesne M., 2002. Connaissance et modélisation du fonctionnement des bassins d'infiltration d'eaux de ruissellement urbain pour l'évaluation des performances techniques et environnementales sur le long terme. Thèse INSA Lyon, p. 277.

Díaz E., Jiménez J.I., Nogales J. 2013. Aerobic degradation of aromatic compounds. *Current opinion in biotechnology*. 24, 431-442.

Didham R.K., Norton D.A. 2006. When are alternative stable states more likely to occur?. *Oikos*. 113, 357-362.

Didham R.K., Watts C.H., Norton D.A. 2005. Are systems with strong underlying abiotic regimes more likely to exhibit alternative stable states?. *Oikos*. 110, 409-416.

Díez-Vives C., Gasol JM., Acinas SG. 2014. Spatial and temporal variability among marine Bacteroidetes populations in the NW Mediterranean Sea. *Syst Appl Microbiol.* 37, 68–78.

Donlan R.M. 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emer. Infect. Dis.* 8, 881-890.

Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28, 350-356.

## E

Edgar R.C., Haas B.J., Clemente J.C., Quince C., Knight R. 2011. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics.* 27, 2194–2200.

Edwards J., Johnson C., Santos-Medellín C., Lurie E., Podishetty N. K., Bhatnagar S., Sundaresan V. 2015. Structure, variation, and assembly of the root-associated microbiomes of rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 112, E911-E920.

Edwards K.J., Rutenberg A.D. 2001. Microbial response to surface microtopography: the role of metabolism in localized mineral dissolution. *Chemical Geology.* 180, 19-32.

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.

Eisenlord S.D., Zak D.R., Upchurch R.A. 2012. Dispersal limitation and the assembly of soil Actinobacteria communities in a long-term chronosequence. *Ecology and evolution.* 2, 538-549.

Entling MH, Schweiger O, Bacher S *et al.* 2012. Species Richness-Environment Relationships of European Arthropods at Two Spatial Grains: Habitats and Countries. *PLoS One.* 7, e45875.

Evans KL, James NA, Gaston KJ. 2006. Abundance, species richness and energy availability in the North American avifauna. *Glob Ecol Biogeogr.* 15, 372–385.

Evans KL, Warren PH, Gaston KJ. 2005. Species–energy relationships at the macroecological scale: a review of the mechanisms. *Biol Rev.* 80, 1–25.

## F

- Fahy A., Lethbridge G., Earle R., Ball A.S., Timmis K.N., McGenity T.J. 2005. Effects of long-term benzene pollution on bacterial diversity and community structure in groundwater. *Environmental Microbiology*. 7, 1192-1199.
- Fazi S., Amalfitano S., Piccini C., Zoppini A., Puddu A., Pernthaler J. 2008. Colonization of overlying water by bacteria from dry river sediments. *Environmental Microbiology*. 10, 2760-2772.
- Ferrenberg S., O'Neill S.P., Knelman J.E., Todd B., Duggan S., Bradley D., Cleveland C.C. 2013. Changes in assembly processes in soil bacterial communities following a wildfire disturbance. *The ISME journal*. 7, 1102-1111.
- Field C.B., Behrenfeld M.J., Randerson J.T., Falkowski P.G. 1998. Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components. *Science*, 281, 237–240
- Fierer N, Bradford MA, Jackson RB. 2007. Toward an ecological classification of soil bacteria. *Ecology*. 88, 1354–1364.
- 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. *Limnol. Oceanogr.* 48, 1608–1617.
- Fisher M.M., Triplett E.W. 1999. Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 4630-4636.
- Flemming H.C., Wingender J. 2010. The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 623-633.
- Foght J. 2008. Anaerobic biodegradation of aromatic hydrocarbons: pathways and prospects. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*. 15, 93-120.
- Fontvieille D.A., Outaguerouine A., Thevenot D.R. 1992. Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of microbial activity in aquatic systems: Application to activated sludges. *Environ. Technol.* 13, 531-540.
- Foulquier A. 2009. Écologie fonctionnelle dans les nappes phréatiques : liens entre flux de matière organique, activité et diversité biologiques. Thèse Université Lyon 1, p. 259.

Foulquier A., Malard F., Mermillod-Blondin F., Datry T., Simon L., Montuelle B., Gibert J. 2009. Vertical change in dissolved organic carbon and oxygen at the water table region of an aquifer recharged with stormwater: biological uptake or mixing? *Biogeochemistry*. 99, 31–47.

Foulquier A, Malard F, Mermillod-Blondin F *et al.* 2011. Surface Water Linkages Regulate Trophic Interactions in a Groundwater Food Web. *Ecosystems*. 14, 1339–53.

Foulquier A., Mermillod-Blondin F., Malard F., Gibert J. 2011. Response of sediment biofilm to increased dissolved organic carbon supply in groundwater artificially recharged with stormwater. *J. Soils Sediments*. 11, 382-393.

Foulquier A., Simon L., Gilbert F., Fourel F., Malard F., Mermillod-Blondin F. 2010. 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. *Freshw. Biol.* 55, 1560–1576.

Freeman C., Lock M.A. 1995. The biofilm polysaccharide matrix: a buffer against changing organic substrate supply?. *Limnology and Oceanography*. 40, 273-278.

Fuhrman JA. 2009. Microbial community structure and its functional implications. *Nature*. 459, 193–9.

## G

Garrett T.R., Bhakoo M., Zhang Z. 2008. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Prog. Nat. Sci.* 18, 1049-1056.

Gaston KJ. 2000. Global patterns in biodiversity. *Nature*. 405, 220-227.

Gharechahi M., Moosavi H., Forghani M. 2012. Effect of surface roughness and materials composition on biofilm formation. *J. Biomater. Nanobiotechnol.* 3, 541-546.

Gibert J. 2001. Basic attributes of groundwater ecosystems. In: Griebler C., Danielopol D.L., Gibert J., Nachtnebel H.P., Notenboom J. (Eds.) *Groundwater ecology: a tool for management of water resources*. Official Publication of the European Community, Luxembourg, pp.39-52.

Gibert J, Danielopol DL, Stanford JA. 1994. *Groundwater ecology*. Academic Press, San Diego, California, USA.

Gieg L.M., Fowler S.J., Berdugo-Clavijo C. 2014. Syntrophic biodegradation of hydrocarbon contaminants. *Current opinion in biotechnology*. 27, 21-29.

Giller PS., Hillebrand H., Berninger U.G., O’Gessner M., Hawkins S., Inchausti P., J Morin P. 2004. Biodiversity effects on ecosystem functioning: emerging issues and their experimental test in aquatic environments. *Oikos*. 104, 423-436.

Giller P.S., O'Donovan G. 2002. Biodiversity and ecosystem function: Do species matter?. In *Biology and environment: proceedings of the Royal Irish Academy*. Royal Irish Academy. pp. 129-139

Ginn T.R., Wood B.D., Nelson K.E., Scheibe T.D., Murphy E.M., Clement P.T. 2002. Processes in microbial transport in the natural subsurface. *Adv. Water Resour.* 25, 1017–1042.

Glenn T.C. 2011. Field guide to next-generation DNA sequencers. *Molecular ecology resources*. 11, 759-769.

Goberna M., Navarro-Cano J.A., Valiente-Banuet A., García C., Verdú M. 2014. Abiotic stress tolerance and competition-related traits underlie phylogenetic clustering in soil bacterial communities. *Ecology letters*. 17, 1191-1201.

Goldscheider N., Hunkeler D., Rossi P. 2006. Review: Microbial biocenoses in pristine aquifers and an assessment of investigative methods. *Hydrogeol. J.* 14, 926-941.

Gómez M.A., Hontoria E., González-López J. 2002. Effect of dissolved oxygen concentration on nitrate removal from groundwater using a denitrifying submerged filter. *J. Hazard. Mater.* 90, 267–278.

Gómez-Pereira PR, Fuchs BM, Alonso C *et al.* 2010. Distinct flavobacterial communities in contrasting water masses of the north Atlantic Ocean. *ISME J.* 4, 472–87.

Goutaland D., Winiarski T., Dubé J.S., Bièvre G., Buoncristiani J.F., Chouteau M., Giroux B., 2008. Hydrostratigraphic Characterization of Glaciofluvial Deposits Underlying an Infiltration Basin Using Ground Penetrating Radar. *Vadose Zo. J.* 7, 194–207.

Grasshoff K., Ehrhardt M., Kremling K. 1999. *Methods of Seawater Analysis, third edition*. Wiley-VCH.

Grebel J.E., Mohanty S.K., Torkelson A.A., Boehm A.B., Higgins C.P., Maxwell R.M., Nelson K.L., Sedlak D.L. 2013. Engineered Infiltration Systems for Urban Stormwater Reclamation. *Environ. Eng. Sci.* 30, 437–454.

Griebler C., Avramov M. 2015. Groundwater ecosystem services: a review. *Freshw. Science*. 34, 355–367.

Griebler C., Lueders T. 2009. Microbial biodiversity in groundwater ecosystems. *Freshw. Biol.* 54, 649-677.

Griebler C., Lueders T., Liebich J. 2006. Development of an aquifer DNA microarray for the biological assessment of groundwater ecosystems. In *European Groundwater Conference*, Vienna, pp. 22-23.

Griebler C., Malard F., Lefébure, T. 2014. Current developments in groundwater ecology - from biodiversity to ecosystem function and services. *Current opinion in biotechnology*. 27, 159-167.

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. *Aquat. Microb. Ecol.* 28, 117-129.

Griebler C., Stein H., Kellermann C., Berkhoff S., Brielmann H., Schmidt S., Selesi D., Steube C., Fuchs A., Hahn H.J. 2010. Ecological assessment of groundwater ecosystems - Vision or illusion? *Ecol. Eng.* 36, 1174-1190.

Grösbacher M., Spicher C., Bayer A., Obst M., Karwautz C., Pilloni, G., Griebler C. 2016. Organic contamination versus mineral properties: competing selective forces shaping bacterial community assembly in aquifer sediments. *Aquatic Microbial Ecology*. 76, 243-255.

## H

Harrod J.J., Hall R.E. 1962. A method for determining the surface areas of various aquatic plants. *Hydrobiologia*. 157, 85-87.



- Harshey R.M. 2003. Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal. *Annual Reviews in Microbiology*. 57, 249-273.
- Hartland A., Fenwick G.D., Bury S. 2011. Tracing sewage-derived organic matter into a shallow groundwater food web using stable isotope and fluorescence signatures. *Mar. Freshw. Res.* 62, 119-129.
- Hathaway J.M., Hunt W.F. 2011. Evaluation of first flush for indicator bacteria and total suspended solids in urban stormwater runoff. *Water, Air, & Soil Pollution*. 217, 135-147.
- Hawkes C.V., Keitt T.H. 2015. Resilience vs. historical contingency in microbial responses to environmental change. *Ecology letters*. 18, 612-625.
- Heider J. 2007. Adding handles to unhandy substrates: anaerobic hydrocarbon activation mechanisms. *Current opinion in chemical biology*. 11, 188-194.
- Heino J., Melo A.S., Siqueira T., Soininen J., Valanko S., Bini L.M. 2015. Metacommunity organisation, spatial extent and dispersal in aquatic systems: patterns, processes and prospects. *Freshwater Biology*. 60, 845-869.
- Hendrickx B., Dejonghe W., Boëne W., Brennerova M., Cernik M., Lederer T., Diels L. 2005. Dynamics of an oligotrophic bacterial aquifer community during contact with a groundwater plume contaminated with benzene, toluene, ethylbenzene, and xylenes: an in situ mesocosm study. *Applied and Environmental Microbiology*. 71, 3815-3825.
- Hendry P. 2006. Extremophiles: there's more to life. *Environmental Chemistry*. 3, 75-76.
- Hemme C.L., Tu Q., Qin Y., Gao W., Deng Y., Nostrand J.D.V., Fields M.W. 2015. Comparative metagenomics reveals impact of contaminants on groundwater microbiomes. *Frontiers in microbiology*. 6, 1205.
- Herman J.S., Culver D.C., Salzman J. 2001. Groundwater ecosystems and the service of water purification. *Stan. Env'tl. LJ*. 20, 479.
- Hibbing M.E., Fuqua C., Parsek M.R., Peterson S B. 2010. Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nature Reviews Microbiology*. 8, 15-25.

- Hooper D.U., Chapin F.S., Ewel J.J., Hector A., Inchausti P., Lavorel S., Schmid B. 2005. Effects of biodiversity on ecosystem functioning: a consensus of current knowledge. *Ecological monographs*. 75, 3-35.
- Horner-Devine MC, Leibold MA, Smith VH *et al.* 2003. Bacterial diversity patterns along a gradient of primary productivity. *Ecol Lett*. 6, 613–622.
- Houri-Davignon C., Relexans J.C., Etcheber H. 1989. Measurement of actual electron transport system (ETS) activity in marine sediments by incubation with INT. *Environ. Technol. Letters*. 10, 91-100.
- Hu W., Zhang Q., Tian T., Li D., Cheng G., Mu J., Feng H. 2015. Relative Roles of Deterministic and Stochastic Processes in Driving the Vertical Distribution of Bacterial Communities in a Permafrost Core from the Qinghai-Tibet Plateau, China. *PloS one*. 10, e0145747.
- Hubbell SP. 2001. *The Unified Neutral Theory of Biodiversity and Biogeography*. Princeton University Press. Princeton, NJ, USA.
- Hug L.A., Thomas B.C., Brown C.T., Frischkorn K.R., Williams K.H., Tringe S.G., Banfield J.F. 2015. Aquifer environment selects for microbial species cohorts in sediment and groundwater. *The ISME journal*. 9, 1846-1856.
- Humphreys W.F. 2006. Aquifers: the ultimate groundwater-dependent ecosystems. *Australian Journal of Botany*. 54, 115-132.
- Hunt W., Traver R., Davis A., Emerson C., Collins K., Stagge J. 2010. Low Impact Development Practices: Designing to Infiltrate in Urban Environments. In Chang N.B. (eds) *Effects of Urbanization on Groundwater*, pp. 308–343.
- Huse S.M., Welch D.M., Morrison H.G., Sogin M.L. 2010. Ironing out the wrinkles in the rare biosphere through improved OTU clustering. *Environ. Microbiol*. 12, 1889–1898.

## I

Ino K., Konno U., Kouduka M., Hirota A., Togo, Y.S. Fukuda, A., Iwatsuki T. 2016. Deep microbial life in high-quality granitic groundwater from geochemically and geographically distinct underground boreholes. *Environmental microbiology reports*. 8, 285-294.

Iribar A., Hallin S., Sánchez-Pérez J.M., Enwall K., Poulet N., Garabétian F. 2015. Potential denitrification rates are spatially linked to colonization patterns of *nosZ* genotypes in an alluvial wetland. *Ecol. Eng.* 80, 191-197.

Iribar A., Sánchez-Pérez J.M., Lyautey E., Garabétian F. 2008. Differentiated free-living and sediment-attached bacterial community structure inside and outside denitrification hotspots in the river-groundwater interface. *Hydrobiologia*. 598, 109-121.

## J

Jeon C.O., Madsen E.L. 2013. In situ microbial metabolism of aromatic-hydrocarbon environmental pollutants. *Current opinion in biotechnology*. 24, 474-481.

Jiang L., Patel S.N. 2008. Community assembly in the presence of disturbance: a microcosm experiment. *Ecology*. 89, 1931-1940.

Jones P.R., Cottrell M.T., Kirchman D.L., Dexter S.C. 2007. Bacterial community structure of biofilms on artificial surfaces in an estuary. *Microb. Ecol.* 53, 153-162.

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 JH, *et al.* 2000. Controls on the dynamics of dissolved organic matter in soils: a review. *Soil Sci.* 165, 277–304.

- Kazumi J, Capone D. 1994. Heterotrophic microbial activity in shallow aquifer sediments of Long Island, New York. *Microb Ecol.* 28, 19–37.
- Kemper K.E., Mestre E., Amore L. 2003. Management of the Guarani aquifer system: Moving towards the future. *Water International.* 28, 185-200.
- Kim J.M., Roh A.S., Choi S.C., Kim E.J., Choi M.T., Ahn B. K., Lee S.A. 2016. Soil pH and electrical conductivity are key edaphic factors shaping bacterial communities of greenhouse soils in Korea. *Journal of Microbiology.* 54, 838-845.
- Kinniment S.L., Wimpenny J.W. 1992. Measurements of the distribution of adenylate concentrations and adenylate energy charge across *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl. Env. Microbiol.* 58, 1629-1635.
- Koeppel A.F., Wu M. 2014. Species matter: the role of competition in the assembly of congeneric bacteria. *The ISME journal.* 8, 531-540.
- Kolvenbach B.A., Helbling D.E., Kohler H.P.E., Corvini P.F. 2014. Emerging chemicals and the evolution of biodegradation capacities and pathways in bacteria. *Current opinion in biotechnology.* 27, 8-14.
- Konopka A. 2009. What is microbial community ecology?. *The ISME journal.* 3, 1223-1230.
- Korbel K.L., Hose G.C. 2011. A tiered framework for assessing groundwater ecosystem health. *Hydrobiologia.* 661, 329-349.
- Köster M., Dahlke S., Meyer-Reil L.A. 2005. Microbial colonization and activity in relation to organic carbon in sediments of hypertrophic coastal waters (Nordrügensche Bodden, Southern Baltic Sea). *Aquatic microbial ecology.* 39, 69-83.
- Kozich J.J., Westcott S.L., Baxter N.T., Highlander S.K., Schloss P.D. 2013. Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the miseq illumina sequencing platform. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 5112–5120.
- Kremen C. 2005. Managing ecosystem services: what do we need to know about their ecology?. *Ecology letters.* 8, 468-479.

## L

- Landa M, Cottrell MT, Kirchman DL *et al.* 2013. Changes in bacterial diversity in response to dissolved organic matter supply in a continuous culture experiment. *Aquat Microb Ecol.* 69, 157–168.
- Langmark J., Storey M.V., Ashbolt N.J., Stenstrom T.A. 2004. Artificial groundwater treatment: biofilm activity and organic carbon removal performance. *Water Research*, 38: 740-748.
- Lankau E.W., Hong P.Y., Mackie R.I. 2012. Ecological drift and local exposures drive enteric bacterial community differences within species of Galapagos iguanas. *Molecular ecology.* 21, 1779-1788.
- Lautenschlager K., Boon N., Wang Y., Egli T., Hammes F. 2010. Overnight stagnation of drinking water in household taps induces microbial growth and changes in community composition. *Water research.* 44, 4868-4877.
- Lee O.O., Wang Y., Tian R., Zhang W., Shek C.S., Bougouffa S., Al-Suwailem A., Batang Z.B., Xu W., Wang G.C., Zhang X., Lafi F.F., Bajic V.B., Qian P.Y. 2014. In situ environment rather than substrate type dictates microbial community structure of biofilms in a cold seep system. *Sci. Rep.* 4, 3587.
- Le Gall J., Xavier A.V. 1996. Anaerobes response to oxygen: the sulfate-reducing bacteria. *Anaerobe.* 2, 1–9.
- Leibold M.A., Holyoak M., Mouquet N., Amarasekare P., Chase J.M., Hoopes M.F., Loreau M. 2004. The metacommunity concept: a framework for multi-scale community ecology. *Ecology letters.* 7, 601-613.
- Lever MA, Rogers KL, Lloyd KG *et al.* 2015. Life under extreme energy limitation: A synthesis of laboratory- and field-based investigations. *FEMS Microbiol Rev.* 39, 688–728.
- Li D, Alidina M, Ouf M *et al.* 2013. Microbial community evolution during simulated managed aquifer recharge in response to different biodegradable dissolved organic carbon (BDOC) concentrations. *Water Res.* 47, 2421–2430.

- Li X., Atwill E.R., Antaki E., Applegate O., Bergamaschi B., Bond R.F., Chase J., Ransom K.M., Samuels W., Watanabe N., Harter T. 2015. Fecal Indicator and Pathogenic Bacteria and Their Antibiotic Resistance in Alluvial Groundwater of an Irrigated Agricultural Region with Dairies. *J. Environ. Qual.* 44, 1435–1447.
- Li D., Sharp J.O., Saikaly P.E., Ali S., Alidina M., Alarawi M.S., Drewes J.E. 2012. Dissolved organic carbon influences microbial community composition and diversity in managed aquifer recharge systems. *Applied and environmental microbiology.* 78, 6819-6828.
- Lindström E.S., Östman Ö. 2011. The importance of dispersal for bacterial community composition and functioning. *PloS one.* 6, e25883.
- Litchman E. 2010. Invisible invaders: non-pathogenic invasive microbes in aquatic and terrestrial ecosystems. *Ecology Letters.* 13, 1560-1572.
- Lo C.C. 2010. Effect of pesticides on soil microbial community. *Journal of Environmental Science and Health Part B.* 45, 348-359.
- Longnecker K., Wilson M.J., Sherr E.B., Sherr B.F. 2010. Effect of top-down control on cell-specific activity and diversity of active marine bacterioplankton. *Aquatic Microbial Ecology.* 58, 153-165.
- Loreau M., Naeem S., Inchausti P., Bengtsson J., Grime J.P., Hector A., Tilman D. 2001. Biodiversity and ecosystem functioning: current knowledge and future challenges. *Science.* 294, 804-808.
- Ludvigsen L., Albrechtsen H.J., Ringelberg D.B., Ekelund F., Christensen T.H. 1999. Distribution and composition of microbial populations in a landfill leachate contaminated aquifer (Grindsted, Denmark). *Microb. Ecol.* 37, 197-207.
- Lundberg D.S., Lebeis S.L., Paredes S.H., Yourstone S., Gehring J., Malfatti S., Edgar, R.C. 2012. Defining the core *Arabidopsis thaliana* root microbiome. *Nature.* 488, 86-90.

## M

- Makepeace D.K., Smith D.W., Stanley S.J. 1995. Urban stormwater quality: summary of contaminant data. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology.* 25, 93-139.

- Mardis E.R. 2008. Next-generation DNA sequencing methods. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 9, 387-402.
- Marmonier P., Vervier P., Giber J., Dole-Olivier M.J. 1993. Biodiversity in ground waters. *Trends in Ecology & Evolution.* 8, 392-395.
- Marsalek J., Chocat B. 2002. International report: Stormwater management, in: *Water Science and Technology.* pp. 1–17.
- Marschner B, Kalbitz K. 2003. Controls of bioavailability and biodegradability of dissolved organic matter in soils. *Geoderma.* 113, 211–35.
- Marschner P., Crowley D., Yang C.H. 2004. Development of specific rhizosphere bacterial communities in relation to plant species, nutrition and soil type. *Plant and soil.* 261, 199-208.
- Marti R, Ribun S, Aubin J-B *et al.* 2017. Human-driven microbiological contamination of benthic and hyporheic sediments of an intermittent peri-urban river assessed from MST and 16S rRNA genetic structure analyses. *Front Microbiol.* 8, 19.
- Martins J.M.F., Majdalani S., Vitorge E., Desaunay A., Navel A., Guiné V., Dañan J.F., Vince E., Denis H., Gaudet J.P. 2013. Role of macropore flow in the transport of *Escherichia coli* cells in undisturbed cores of a brown leached soil. *Environ. Sci. Process. Impacts.* 15, 347–356.
- Martiny J. B.H., Bohannan B. J., Brown J.H., Colwell R.K., Fuhrman J.A., Green J.L., Morin P.J. 2006. Microbial biogeography: putting microorganisms on the map. *Nature Reviews Microbiology.* 4, 102-112.
- Masciopinto C., La Mantia R., Chrysikopoulos C.V. 2008. Fate and transport of pathogens in a fractured aquifer in the Salento area, Italy. *Water Resour. Res.* 44, 1–18.
- Mauffret A., Baran N., Joulain C. 2017. Effect of pesticides and metabolites on groundwater bacterial community. *Science of The Total Environment.* 576, 879-887.
- McMahon P.B., Chapelle F.H. 2008. Redox processes and water quality of selected principal aquifer systems. *Ground Water.* 46, 259–271.



McKnight DM, Bencaia KE, Zeiweger GW *et al.* 1992. Sorption of Dissolved Organic Carbon by hydrous Aluminum and Iron oxides occurring at the confluence of Deer Creek with the Snake River, Summit County, Colorado. *Environ Sci Technol.* 26, 1388–1396.

Mermillod-Blondin F., Foulquier A, Maazouzi C., Navel S., Negrutiu Y., Vienney A, Simon L., Marmonier P. 2013. Ecological assessment of groundwater trophic status by using artificial substrates to monitor biofilm growth and activity. *Ecol. Indic.* 25, 230–238.

Mermillod-Blondin F., Simon L., Maazouzi C., Foulquier A., Delolme C., Marmonier P. 2015. Dynamics of dissolved organic carbon (DOC) through stormwater basins designed for groundwater recharge in urban area: Assessment of retention efficiency. *Water Res.* 81, 27–37.

Moss J.A., Nocker A., Lepo J.E., Snyder R.A. 2006. Stability and change in estuarine biofilm bacterial community diversity. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 5679-5688.

Murdock J.N., Dodds W.K. 2007. Linking benthic algal biomass to stream substratum topography. *J. Phycol.* 43, 449-460.

Murphy E.M., Ginn T.R. 2000. Modeling microbial processes in porous media. *Hydrogeol. J.* 8, 142–158.

Murray B.R., Hose G.C., Eamus D., Licari D. 2006. Valuation of groundwater-dependent ecosystems: a functional methodology incorporating ecosystem services. *Australian Journal of Botany.* 54, 221-229.

## N

Naeem S., Chapin F.S., Costanza R., Ehrlich P.R., Golley F.B., Hooper D.U., Symstad A.J. 1999. Biodiversity and ecosystem functioning: maintaining natural life support processes. *Issues in ecology.* 4.

Nemergut D.R., Schmidt S.K., Fukami T., O'Neill S.P., Bilinski T.M., Stanish L.F., Ferrenberg S. 2013. Patterns and processes of microbial community assembly. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 77, 342-356.

Nimmo D.G., Mac Nally R., Cunningham S.C., Haslem A., Bennett A.F. 2015. Vive la résistance: reviving resistance for 21st century conservation. *Trends in ecology & evolution*. 30, 516-523.

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. *Sci. Total Environ*. 377, 334–348.

## O

Ofițeru I.D., Lunn M., Curtis T.P., Wells G.F., Criddle C.S., Francis C.A., Sloan W.T. 2010. Combined niche and neutral effects in a microbial wastewater treatment community. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 107, 15345-15350.

Oksanen J., Kindt R., Legendre P., O'Hara B.V. 2007. The vegan package. Community ecology package, R package version 1. pp. 8–5.

Oliver J.D., Wanucha D. 1989. Survival of *Vibrio vulnificus* at reduced temperature and elevated nutrient. *J. Food Saf.* 10: 79-86.

## P

Pabich W.J., Valiela I., 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, 247–268.

Paerl H.W., Dyble J., Moisander P.H., Noble R.T., Piehler M.F., Pinckney J.L., Steppe T.F., Twomey L., Valdes L.M. 2003. Microbial indicators of aquatic ecosystem change: current applications to eutrophication studies. *FEMS Microbiol. Ecol.* 46, 233-246.

Pang L. 2009. Microbial removal rates in subsurface media estimated from published studies of field experiments and large intact soil cores. *J. Environ. Qual.* 38, 1531–1559.

- Pang L., Close M., Goltz M., Noonan M., Sinton L. 2005. Filtration and transport of *Bacillus subtilis* spores and the F-RNA phage MS2 in a coarse alluvial gravel aquifer: Implications in the estimation of setback distances. *J. Contam. Hydrol.* 77, 165–194.
- Pang L., Close M., Goltz M., Sinton L., Davies H., Hall C., Stanton G. 2004. Estimation of septic tank setback distances based on transport of *E. coli* and F-RNA phages. *Environ. Int.* 29, 907–921.
- Papke R.T., Gogarten J.P. 2012. How bacterial lineages emerge. *Science.* 336, 45-46.
- Parizzi S.Q.F., Andrade N.J., Silva C.A.S., Soares N.F.F., Silva A.M.S. 2004. Bacterial adherence to different inert surfaces evaluated by epifluorescence microscopy and plate count method. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 47, 77-83.
- Parker J. K., McIntyre D., Noble R.T. 2010. Characterizing fecal contamination in stormwater runoff in coastal North Carolina, USA. *Water research.* 44, 4186-4194.
- Paver S., Kent A. 2016. Direct and context-dependent effects of light, temperature, and phytoplankton shape bacterial community composition. *bioRxiv*, 091967.
- Peiffer J.A., Spor A., Koren O., Jin Z., Tringe S.G., Dangl J.L., Ley R.E. 2013. Diversity and heritability of the maize rhizosphere microbiome under field conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 110, 6548-6553.
- Percival S.L., Knapp J.S., Wales D.S., Edyvean R.G.J. 1999. The effect of turbulent flow and surface roughness on biofilm formation in drinking water. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 22, 152-159.
- Peterson G.L. 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* 83, 346-356.
- Philippot L., Raaijmakers J.M., Lemanceau P., Van Der Putten W.H. 2013. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nature Reviews Microbiology.* 11, 789-799.
- Pinhassi J, Sala MM, Havskum H *et al.* 2004. Changes in bacterioplankton composition under different phytoplankton regimens. *Appl Environ Microbiol.* 70, 6753–6766.
- Pitt R., Clark S., Field R. 1999. Groundwater contamination potential from stormwater infiltration practice. *Urban water.* 1, 217–236.

Pottu-Boumendil J. 1989. Microscopie électronique: principes et méthodes de préparation. Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale.

Powelson D.K., Mills A.L. 1998. Water Saturation and Surfactant Effects on Bacterial Transport in Sand Columns. *Soil Sci.* 163, 694–704.

Pringle C.M. 2001. Hydrologic connectivity and the management of biological reserves: a global perspective. *Ecological Applications.* 11, 981-998.

Pulsford S.A., Lindenmayer D.B., Driscoll D.A. 2016. A succession of theories: purging redundancy from disturbance theory. *Biological Reviews.* 91, 148-167.

## Q

Quast C., Pruesse E., Yilmaz P., Gerken J., Schweer T., Yarza P., Peplies J., Glockner F.O., 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 41, D590–D596.

## R

R Development Core Team. 2008. R: A language and environment for statistical computing. <http://www.R-project.org>.

Ramette A. 2009. Quantitative community fingerprinting methods for estimating the abundance of operational taxonomic units in natural microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 2495-2505.

Refsgaard J.C., Christensen T.H., Ammentorp H.C. 1991. A model for oxygen transport and consumption in the unsaturated zone. *J. Hydrol.* 129, 349–369.

Risse-Buhl U., Trefzger N., Seifert A.G., Schönborn W., Gleixner G., Küsel K. 2012. Tracking the autochthonous carbon transfer in stream biofilm food webs. *FEMS Microbiol. Ecol.* 79, 118-131.

Rivett M.O., Smith J.W.N., Buss S.R., Morgan P. 2007. Nitrate occurrence and attenuation in the major aquifers of England and Wales. *Quarterly Journal of Engineering Geology and Hydrogeology*. 40, 335-352.

Röling W.F.M., Van Breukelen B.M., Braster M., Lin B., Van Verselvel H.W. 2001. Relationship between microbial community structure and hydrochemistry in a landfill leachatepolluted aquifer. *Applied Environmental Microbiology*. 67, 4619-4629.

Roszak D.B., Colwell R.R. 1987. Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiol. Rev.* 51, 365-379.

Rousk J., Baath E., Brookes P.C., Lauber C.L., Lozupone C., Caporaso J.G., et al. 2010. Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. *ISME J.* 4 1340–1351.

Rui J., Li J., Wang S., An J., Liu W.T., Lin Q., Li X. 2015. Responses of bacterial communities to simulated climate changes in alpine meadow soil of the Qinghai-Tibet Plateau. *Applied and environmental microbiology*. 81, 6070-6077.

## S

Saidy AR, Smernik RJ, Baldock JA *et al.* 2013. The sorption of organic carbon onto differing clay minerals in the presence and absence of hydrous iron oxide. *Geoderma*. 209–210, 15–21.

Samanta SK, Singh OV, Jain RK. 2002. Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. *Trends in biotechnology*. 20, 243-248.

Sampat P. 2000. Deep trouble—the hidden threat of groundwater pollution. *World Watch Paper 154*. Worldwatch Institute, Washington, DC.

Sarkar A., Paul D., Kazy S.K., Sar P. 2016. Molecular analysis of microbial community in arsenic-rich groundwater of Kolsor, West Bengal. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*. 51, 229-239.

Sauer E.P., VandeWalle J.L., Bootsma M.J., McLellan S.L. 2011. Detection of the human specific *Bacteroides* genetic marker provides evidence of widespread sewage contamination of stormwater in the urban environment. *Water research*. 45, 4081-4091.

- Schäfer A., Ustohal P., Harms H., Stauffer F., Dracos T., Zehnder A.J.B. 1998. Transport of bacteria in unsaturated porous media. *J. Contam. Hydrol.* 33, 149–169.
- Schauer R, Bienhold C, Ramette A *et al.* 2010. Bacterial diversity and biogeography in deep-sea surface sediments of the South Atlantic Ocean. *Isme J.* 4, 159–170.
- Schloss P.D., Gevers D., Westcott S.L. 2011. Reducing the effects of PCR amplification and sequencing artifacts on 16S rRNA-based studies. *PLoS One.* 6, e27310.
- Schloss P.D., Westcott S.L. 2011. Assessing and improving methods used in operational taxonomic unit-based approaches for 16S rRNA gene sequence analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 3219–3226.
- Schloss P.D., Westcott S.L., Ryabin T., Hall J.R., Hartmann M., Hollister E.B., Lesniewski R.A., Oakley B.B., Parks D.H., Robinson C.J., Sahl J.W., Stres B., Thallinger G.G., Van Horn D.J., Weber C.F. 2009. Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 7537–7541.
- Schurig C., Melo V.A., Miltner A., Kaestner M. 2014. Characterisation of microbial activity in the framework of natural attenuation without groundwater monitoring wells?: A new direct-push probe. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21, 9002-9015.
- Schwartz M.W., Brigham C.A., Hoeksema J.D., Lyons K.G., Mills M.H., Van Mantgem P.J. 2000. Linking biodiversity to ecosystem function: implications for conservation ecology. *Oecologia.* 122, 297-305.
- Sébastien C., Barraud S., Ribun S., Zoropogui A., Blaha D., Becouze-Lareure C., Cournoyer, B. 2014. Accumulated sediments in a detention basin: chemical and microbial hazard assessment linked to hydrological processes. *Environmental Science and Pollution Research.* 21, 5367-5378.
- Servais P., Anzil A., Ventresque C. 1989. Simple method for determination of biodegradable dissolved organic carbon in water. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 2732–3734.
- Servais P., Billen G., Hascoët M.C. 1987. Determination of the biodegradable fraction of dissolved organic matter in waters. *Water Res.* 21, 445–450.

- Shabarova T., Villiger J., Morenkov O., Niggemann J., Dittmar T., Pernthaler J. 2014. Bacterial community structure and dissolved organic matter in repeatedly flooded subsurface karst water pools. *FEMS microbiology ecology*. 89, 111-126
- Shabarova T., Widmer F., Pernthaler J. 2013. Mass effects meet species sorting: transformations of microbial assemblages in epiphreatic subsurface karst water pools. *Environmental microbiology*. 15, 2476-2488.
- Shen Y., Chapelle F.H., Strom E.W. Benner R. 2015. Origins and bioavailability of dissolved organic matter in groundwater. *Biogeochemistry*. 122, 61-78.
- Shendure J., Ji H. (2008). Next-generation DNA sequencing. *Nature biotechnology*. 26, 1135-1145.
- Sidhu J.P.S., Ahmed W., Gernjak W., Aryal R., McCarthy D., Palmer A., Toze S. 2013. Sewage pollution in urban stormwater runoff as evident from the widespread presence of multiple microbial and chemical source tracking markers. *Science of the Total Environment*. 463, 488-496.
- Šimek K., Pernthaler J., Weinbauer M.G., Hornák K., Dolan J.R., Nedoma J., 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.
- Smith VH. 2007. Microbial diversity-productivity relationships in aquatic ecosystems. *FEMS Microbiol Ecol*. 62, 181–186.
- Stegen J.C., Lin X., Konopka A.E., Fredrickson J.K. 2012. Stochastic and deterministic assembly processes in subsurface microbial communities. *The ISME journal*. 6, 1653-1664.
- Stevik T.K., Aa K., Ausland G., Hanssen J.F. 2004. Retention and removal of pathogenic bacteria in wastewater percolating through porous media: A review. *Water Res*. 38, 1355–1367.
- Stewart E.J. 2012. Growing unculturable bacteria. *Journal of bacteriology*. 194, 4151-4160.
- Stoodley P., Dodds I., Boyle J.D., Lappin-Scott H.M. 1999. Influence of hydrodynamics and nutrients on biofilm structure. *J. Appl. Microbiol. Symp. Suppl*. 85, 19S-28S.



Swanson M.E., Franklin J.F., Beschta R.L., Crisafulli C.M., DellaSala D.A., Hutto R.L., Swanson F.J. 2011. The forgotten stage of forest succession: early-successional ecosystems on forest sites. *Frontiers in Ecology and the Environment*. 9, 117-125.

## T

Tada Y, Taniguchi A, Nagao I *et al.* 2011. Differing growth responses of major phylogenetic groups of marine bacteria to natural phytoplankton blooms in the Western North Pacific Ocean. *Appl Environ Microbiol.* 77, 4055–4065.

Tedoldi D., Chebbo G., Pierlot D., Kovacs Y., Gromaire M.C. 2016. Impact of runoff infiltration on contaminant accumulation and transport in the soil/filter media of sustainable urban drainage systems: A literature review. *Sci. Total Environ.* 569–570, 904–926.

Tilman D., Isbell F., Cowles J.M. 2014. Biodiversity and ecosystem functioning. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. 45, 471-493.

Trevors JT. 2002. The subsurface origin of microbial life on the Earth. *Research in Microbiology*. 153, 487-491.

Triska F.J., Duff J.H., Avanzino R.J. 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.

Tuchman M.L., Stevenson R.J. 1980. Comparison of clay tile, sterilized rock, and natural substrate diatom communities in a small stream in Southeastern Michigan, USA. *Hydrobiologia*. 75, 73-79.

Tufenkji N., Ryan J., Elimelech M. 2002. The Promise of Bank Filtration: A simple technology may inexpensively clean up poor raw quality surface water. *Environmental Science & Technology*. 11, 2002.

## V

Van der Meer J.R. 2006. Environmental pollution promotes selection of microbial degradation pathways. *Frontiers in Ecology and the Environment*. 4, 35-42.

Vellend M. 2010. Conceptual synthesis in community ecology. *The Quarterly review of biology*. 85, 183-206.

Vulliet E., Tournier M., Vauchez A., Wiest L., Baudot R., Lafay F., Cren-Olivé C. 2014. Survey regarding the occurrence of selected organic micropollutants in the groundwaters of overseas departments. *Environmental Science and Pollution Research*. 21, 7512-7521.

## W

Walker B.H. 1992. Biodiversity and ecological redundancy. *Conservation biology*. 6, 18-23.

Wall Freckman D., Blackburn T.H., Brussaard L., Hutchings P., Palmer M.A., Snelgrove P.V. 1997. Linking biodiversity and ecosystem functioning of soils and sediments. *Ambio*. 26, 556-562.

Wang Q. 2007. Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 5261–5267.

Wendland F., Hannappel S., Kunkel R., Schenk R., Voigt H.J., Wolter R. 2005. A procedure to define natural groundwater conditions of groundwater bodies in Germany. *Water Sci. Technol.* 51, 249-257.

Whitehead K.A., Verran J. 2009. The effect of substratum properties on the survival of attached microorganisms on inert surfaces. In: *Marine and Industrial Biofouling*. pp. 13-33.

Whitman W.B., Coleman D.C., Wiebe W.J. 1998. Prokaryotes: the unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 95, 6578-6583.

Williamson W.M., Close M.E., Leonard M.M., Webber J.B., Lin S. 2012. Groundwater biofilm dynamics grown in situ along a nutrient gradient. *Ground Water*. 50, 690-703.

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

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

Witt V., Wild C., Uthicke S. 2011. Effect of substrate type on bacterial community composition in biofilms from the Great Barrier Reef. *FEMS Microbiol. Lett.* 323, 188–195.

Woese C.R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiological reviews*. 51, 221.

Wright DH. 1983. Species–energy theory: an extension of species-area theory. *Oikos*. 41, 496–506.

## X

Xu H.S., Roberts N., Singleton F.L., Attwell R.W., Grimes D.J., Colwell R.R. 1982. Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. *Microb. Ecol.* 8, 313-323.

## Y

Yan T., Fields M.W., Wu L., Zu Y., Tiedje J.M., Zhou J. 2003. Molecular diversity and characterization of nitrite reductase gene fragments (*nirK* and *nirS*) from nitrate- and uranium-contaminated groundwater. *Environ. Microbiol.* 5, 13–24.

Yu R., Smets B.F., Gan P., MacKay A.A., Graf J. 2014. Seasonal and spatial variations in microbial activity at various phylogenetic resolutions at a groundwater–surface water interface. *Can. J. Microbiol.* 60, 277-286.

## Z

Zhang W.P., Wang Y., Tian R.M., Bougouffa S., Yang B., Cao H.L., Zhang G., Wong Y.H., Xu W., Batang Z., Al-Suwailem A., Zhang X.X., Qian P.Y. 2014. Species sorting during biofilm assembly by artificial substrates deployed in a cold seep system. *Sci. Rep.* 4, 6647.

Zhou J., Deng Y., Zhang P., Xue K., Liang Y., Van Nostrand J. D., Hazen T.C. 2014. Stochasticity, succession, and environmental perturbations in a fluidic ecosystem. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 111, E836-E845.

Zogg G. P., Zak D.R., Ringelberg D.B., White D.C., MacDonald N.W., Pregitzer K.S. 1997. Compositional and functional shifts in microbial communities due to soil warming. *Soil Science Society of America Journal.* 61, 475-481.