



HAL
open science

Rôle du compartiment biologique dans les processus de colmatage et décolmatage de bassins d'infiltration

Morgane Bouvarot Gette-Bouvarot

► **To cite this version:**

Morgane Bouvarot Gette-Bouvarot. Rôle du compartiment biologique dans les processus de colmatage et décolmatage de bassins d'infiltration. Ingénierie de l'environnement. École Nationale des Travaux Publics de l'État [ENTPE], 2014. Français. NNT : 2014ENTP0011 . tel-01625171

HAL Id: tel-01625171

<https://theses.hal.science/tel-01625171v1>

Submitted on 27 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.

Thèse

Pour obtenir le grade de
Docteur de l'université de Lyon

Spécialité
Sciences de l'Environnement

Présentée par
Morgane GETTE-BOUVAROT

Rôle du compartiment biologique dans les processus de colmatage et décolmatage de bassins d'infiltration

École doctorale
Chimie de Lyon (Chimie, Procédés, Environnement)

Thèse soutenue publiquement le **16 octobre 2014**, devant le jury
composé de :

M. Bernard MONTUELLE,
Directeur de Recherche, INRA, CARRETEL, Rapporteur

M. Yves COQUET,
Professeur Université d'Orléans, ISTO, Rapporteur

Mme Agnès RICHAUME
Professeur Université de Lyon, IG2E, Examinatrice

Mme Anne PERRISSIN,
Grand Lyon, Examinatrice

M. Frédéric MORAND
VEOLIA, Examineur

Mme Laurence VOLATIER,
Chargée de recherche, LEHNA, ENTPE, Directrice de thèse

M. Florian MERMILLOD-BLONDIN,
Chargé de Recherche, LEHNA, CNRS, Directeur de thèse

Mme Cécile DELOLME,
IDTPE, LEHNA, ENTPE, Directrice de thèse

À mon grand-père...

INSA Direction de la Recherche - Ecoles Doctorales 2014

Sigle	Ecole doctorale	Responsable
CHIMIE	CHIMIE DE LYON	Jean Marc LANCELIN
	INSA de Lyon : R.Gourdon	Université de Lyon – Collège Doctoral Bât ESCPE - 43 bd du 11 novembre 1918 69622 VILLEURBANNE Cedex Tél : 04.72.43 13 95 directeur@edchimie-lyon.fr
E.E.A.	ELECTRONIQUE, ELECTROTECHNIQUE, AUTOMATIQUE	Gérard SCORLETTI
	Secrétariat : M.C. HAVGOUDOUKIAN eea@ec-lyon.fr	Ecole Centrale de Lyon 36 avenue Guy de Collongue 69134 ECULLY Tél : 04 72 18 60 97 - Fax : 04 78 43 37 17 Gerard.scorletti@ec-lyon.fr
E2M2	EVOLUTION, ECOSYSTEME, MICROBIOLOGIE, MODELISATION	Gudrun BORNETTE
	INSA de Lyon : H.Charles	CNRS UMR 5023 LEHNA Université Claude Bernard Lyon 1 Bât Forel - 43 bd du 11 novembre 1918 69622 VILLEURBANNE Cedex Tél : 06.07.53.89.13 e2m2@univ-lyon1.fr
EDISS	INTERDISCIPLINAIRE SCIENCES-SANTE	Emmanuelle CANET-SOULAS
	INSA de Lyon : M. LAGARDE	INSERM U1060, CarMeN lab, Univ. Lyon 1 Bâtiment IMBL - 11 avenue Jean Capelle INSA 696621 Villeurbanne Tél : 04.72.68.49.09 Fax :04 72 68 49 16 Emmanuelle.canet@univ-lyon1.fr
INFOMATHS	INFORMATIQUE ET MATHEMATIQUES	Mme Sylvie CALABRETTO
	Secrétariat : Renée EL MELHEM	LIRIS – INSA de Lyon Bat Blaise Pascal - 7 avenue Jean Capelle 69622 VILLEURBANNE Cedex Tél : 04.72. 43. 80. 46 Fax 04 72 43 16 87 Sylvie.calabretto@insa-lyon.fr
Matériaux	MATERIAUX DE LYON	Pr. Jean-Yves BUFFIERE
	Secrétariat : M. LABOUNE PM : 71.70 - Fax : 87.12 Bat. Saint Exupéry Ed.materiaux@insa-lyon.fr	INSA de Lyon Mateis - Bâtiment Antoine de Saint-Exupéry 7 avenue Jean Capelle 69621 VILLEURBANNE cedex Tel : 04 72 43 83 18 - Fax : 04 72 43 85 28 Jean-yves.buffiere@insa-lyon.fr
MEGA	MECANIQUE, ENERGETIQUE, GENIE CIVIL, ACOUSTIQUE	Pr. Philippe BOISSE
	Secrétariat : M. LABOUNE PM : 71.70 - Fax : 87.12 Bat. Saint Exupéry mega@insa-lyon.fr	INSA de Lyon Laboratoire LamCoS - Bâtiment Jacquard 25 bis avenue Jean Capelle 69621 VILLEURBANNE Cedex Tél :04.72.43.71.70 - Fax : 04 72 43 72 37 Philippe.boisse@insa-lyon.fr
ScSo	ScSo*	Isabelle VON BUELTZINGLOEWEN
	Secrétariat: Viviane POLSINELLI - Brigitte INSA de Lyon : J.Y. TOUSSAINT	Université Lyon 2 86 rue Pasteur 69365 LYON Cedex 07 Tél : 04.78.77.23.86 Fax : 04.37.28.04.48 viviane.polsinelli@univ-lyon2.fr

*ScSo : Histoire, Géographie, Aménagement, Urbanisme, Archéologie, Science politique, Sociologie, Anthropologie

Cette thèse a été réalisée au sein de l'UMR CNRS 5023, Laboratoire d'Ecologie des Hydrosystèmes Naturels et Anthropisés (LEHNA), dans l'équipe « Impacts des Polluants sur les Ecosystèmes » localisée à l'Ecole Nationale des Travaux Publics de l'Etat (ENTPE). Elle a débuté en octobre 2011 sous la codirection de Laurence Volatier, Cécile Delolme (LEHNA, équipe IPE, ENTPE) et Florian Mermillod-Blondin (LEHNA, équipe E3S, Université Lyon 1).

Cette thèse a été financée par le Ministère de l'Ecologie, du Développement Durable et de l'Energie (MEDDE). Le soutien technique et financier des expérimentations a été assuré à parts égales entre le Grand-Lyon et VEOLIA.

REMERCIEMENTS

La thèse est, paraît-il, un travail solitaire... ces trois années ont pourtant été l'occasion de nombreuses rencontres et échanges, et je tiens à exprimer ma reconnaissance à toutes les personnes qui m'ont aidée et soutenue pendant ce travail de recherche.

En premier lieu, je tiens à remercier mes directeurs de thèse, *Laurence Volatier, Florian Mermillod-Blondin et Cécile Delolme* pour la confiance qu'ils m'ont accordée en acceptant d'encadrer ce travail doctoral, pour toutes les heures consacrées à diriger cette étude, que ce soit sur le terrain, lors des multiples relectures, ou bien simplement pour leurs conseils et explications précieuses tout au long des ces 3 années. En particulier, un grand merci pour votre disponibilité, vos qualités humaines d'écoute et de compréhension tout au long de ce travail, et ceci malgré ma « tête en bois » !

Mes remerciements vont également à *Yves Coquet et Bernard Montuelle* pour avoir accepté la fonction de rapporteurs de ce travail, malgré des délais très courts et des emplois du temps déjà très chargés. Un grand merci également à *Agnès Richaume* pour avoir accepté de participer au jury de cette thèse.

Merci au Grand Lyon et à Veolia pour le soutien technique et financier des expérimentations. Mon travail de recherche sur le terrain a été particulièrement facilité par l'accueil et la disponibilité des membres de Veolia, et je tiens particulièrement à exprimer ma reconnaissance à *Bertrand Perrin, Gilles Regnier et Thierry Degueurce*, qui ont toujours été très disponibles et à l'écoute. C'est grâce à vous si les expériences se sont déroulées dans les meilleures conditions, merci pour tout (et aussi pour les pots de miel !!). Merci à toute l'équipe du poste de commande et les gardes qui ont toujours été à l'écoute de nos contraintes. Merci à *Sébastien* pour son aide sur le terrain. Merci enfin à *Frédéric Morand* et à *Anne Perissin* pour leur soutien tout au long de ce travail, et pour avoir accepté de participer au jury de cette thèse.

Merci aux membres de l'entreprise « *Payet* » qui se sont montrés très disponibles et réactifs face à nos contraintes pour la conception du matériel de terrain.

J'exprime toute ma gratitude à l'ensemble de l'équipe, tous les amis qui m'ont aidée de manière bénévole pendant ces trois années, que ce soit sur le terrain, au laboratoire ou simplement en partageant un café. En particulier :

Merci à l'équipe des doctorants, *Fred, Guigui, Dodo, Pauline, Adriana, Artur, Dieuseul, Erij* pour les soirées 405, les après-midi « Citadelle », les midis « belote » et tous ces moments de bonne humeur partagés ensemble... Je vais la finir « maintenant » cette thèse !! Merci également aux anciens, *Yannis, Anne-Sophie, Muriel, Aude, Rafael, Le Bihn*, avec qui j'ai partagé quelques semaines, mois ou année et qui m'ont toujours encouragée. Une pensée particulière pour *Marine*, que je remercie pour ces 4 années passées ensemble à l'ENTPE.

Un grand merci à *Marc, Thérèse, Vanessa, Xavier, Lydie, Felix, Margot* et tous les membres des équipes techniques que j'ai croisés pendant ces trois années. En particulier un immense merci à notre râleur national pour toutes les heures passées sur le terrain, sur terre ou dans l'eau, sous le soleil ou sous la pluie, merci pour toutes tes inventions qui ont souvent sauvé une manip ; ainsi qu'à Thérèse et Vanessa pour leur aide précieuse au laboratoire, surtout quand, un peu perdue avec les travaux, je ne retrouvais rien !!

Tous mes remerciements vont également à *Laurent Lassabatere*, pour son aide inestimable pour toute la partie « infiltration » de cette thèse, sa disponibilité, son écoute et sa bonne humeur (je ne dis pas merci pour les bonbons parce que je n'aime pas ça, mais au nom du laboratoire, merci pour toutes les sucreries !!). Merci à *Damien Lemoine* pour sa « caution végétale », et surtout pour les heures passées à récolter les plantes ou bien juste à faire déborder des tubes à essai ☺. Merci à *Jean-Philippe Bedell*, d'être lui aussi venu se tremper sur le terrain, de m'avoir apporté de nombreux conseils pendant ces trois années. Merci à *Laurent Simon* pour son aide au laboratoire E3S et sa disponibilité.

Merci à *Yves Perrodin* de m'avoir accueillie dans d'aussi bonnes conditions humaines et matérielles, et merci à *Alicia Naveros* d'avoir supporté mes intrusions répétées et désespérées dans son bureau, et m'avoir toujours apportée son aide dans la paperasse administrative, avec le sourire !

Et merci à tous ceux que j'ai pu oubliés, les autres membres du laboratoire que j'ai croisés pendant ces trois ans, merci pour votre accueil et votre bonne humeur !

Mes remerciements vont également aux stagiaires qui ont travaillé de près ou de loin autour de mon travail de thèse. Ainsi, un grand merci à *Laura* pour son travail et son implication dans les expérimentations, et surtout pour ses répliques qui resteront cultes. Merci à *Yann* et *Alexandre* pour leur travail appliqué sur les données de la dernière expérience.

Enfin, ma reconnaissance va à tous ceux qui ont plus particulièrement assuré le soutien affectif de ce travail doctoral, *mes amis et ma famille*. Un merci particulier à mon cher et tendre qui m'a supportée pendant ces 3 ans, avec parfois, il faut l'avouer, beaucoup de patience ! Merci à *mes parents, grands-parents et à mon frère*, qui m'ont toujours soutenue dans mon travail et ont su me reconforter dans les moments de doute, malgré parfois certaines incompréhensions ... non Clément, je ne suis pas pêcheuse d'escargots !! Merci à ma maman d'être venue se mouiller avec moi sur le terrain ! Merci également à toute ma *belle famille* qui m'a toujours entourée et soutenue.

En résumé, un grand MERCI à tous ceux qui ont contribué à la réussite de ce travail !

Communications & Travaux associés

Article paru dans une revue internationale avec comité de lecture

Gette-Bouvarot M., Mermillod-Blondin F., Angulo-Jaramillo R., Delolme C., Lemoine D., Lassabatère L., Loizeau S., Volatier L. (2014). *Coupling hydraulic and biological measurements highlights the key influence of algal biofilm on infiltration basin performance*. *Ecohydrology* 7(3), pp 950-964.

Article soumis dans une revue internationale avec comité de lecture

Gette-Bouvarot M., Mermillod-Blondin F., Lemoine D., Delolme, C. Danjean, M., Etienne, L., Volatier L. (under review). *The potential of allelopathic macrophytes to control benthic biofilm growth – a mesocosm approach*. Soumis dans le journal *Ecological Engineering*.

Communication orale dans un congrès international ou national

Gette-Bouvarot M., Etienne L., Lemoine D., Mermillod-Blondin F., Delolme C., Volatier L. (2013). *Effets de plusieurs macrophytes allélopathiques sur des biofilms benthiques issus de bassins d'infiltration : essais en mésocosmes*. Rencontres Interdisciplinaires Doctorales de l'Aménagement Durable (RIDA²D 2013), 12 février 2013, Vaulx-en-Velin, France.

Communications affichées dans un congrès international

Gette-Bouvarot M., Mermillod-Blondin F., Angulo-Jaramillo R., Delolme, C., Lassabatère L., Volatier L. (2013). *Influence of algal biofilm on performance of infiltration basins designed for groundwater recharge*. HydroEco 2013, 4th International Multidisciplinary Conference on Hydrology and Ecology, 13-16 mai 2013, Rennes, France.

Gette-Bouvarot M., Mermillod-Blondin F., Lassabatère, L., Lemoine, D., Delolme, C., Volatier L. (2014) *Ecological approach to control bioclogging: an original field study coupling infiltration and biological measurements*. EGU 2014, European Geosciences Union, 28 avril – 2 mai 2014, Vienne, Autriche.

Rapports d'activité

Angulo-Jaramillo R., Lassabatère L., Winiarski T., Bouvarot M., Volatier L, Mermillod-Blondin F., Marmonier P., Delolme C. (2011). *Caractérisation hydrodynamique locale de la couche de surface des bassins d'infiltration 3.1, 3.2, 5.1 et 5.2 du champ captant de Crépieux-Charmy (Rhône) à l'aide de la méthode Beerkan*. Rapport d'étude, 47 p.

Bouvarot-Gette M. (2011). *Analyse pigmentaire par HPLC des communautés phototrophes développées dans la couche superficielle des sédiments de bassins d'infiltration*. Note de Synthèse, 12 p.

Bouvarot-Gette M. (2012). *Présentation du projet de thèse 2011-2014 – Rôle du compartiment biologique dans les processus de colmatage et de décolmatage des bassins d'infiltration*. Note de Synthèse, 10 p.

Volatier, L., Mermillod-Blondin, F., Gette-Bouvarot, M., Lemoine, D., Lassabatère, L., Angulo-Jaramillo, R., Winiarski, T., Marmonier, P., Delolme, C. (2014) *Rôle du compartiment biologique dans les processus de colmatage et de décolmatage des bassins d'infiltration de Crépieux-Charmy*. Rapport d'étude, 36 p.

Encadrement d'un stage de Master 2

Etienne L. (2012). *Effets de macrophytes allélopathiques sur les biofilms benthiques de bassins d'infiltration : essais en mésocosmes*. Rapport de Master, Science de l'Environnement Industriel et Urbain, Université de Lyon, 69 p.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	1
I. Contexte de l'étude	3
II. Objectifs de la thèse	8
III. Organisation du document.....	9
CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE.....	11
I. Les bassins d'infiltration	13
I.1 Fonctionnement.....	13
I.1.1 Capacités « auto-épuratrices ».....	13
I.1.2 Capacités d'infiltration	17
I.2 Quel modèle pour le support d'infiltration ?.....	19
I.3 Propriétés physiques des milieux poreux.....	21
I.3.1 Texture	21
I.3.2 Structure	23
I.4 Propriétés hydrodynamiques des milieux poreux	27
I.4.1 L'eau dans les milieux poreux	27
I.4.2 l'infiltration dans les milieux poreux	29
I.5 Les mécanismes de colmatage des milieux poreux supports de l'infiltration	31
I.5.1 Les processus physiques.....	32
I.5.2 Les processus chimiques	32
I.4.3 Les processus biologiques	33
II. Les biofilms, description et rôle dans le colmatage des bassins d'infiltration	35
II.1 Qu'est ce qu'un biofilm ?	35
II.1.1 Les micro-organismes.....	37
II.1.2 La matrice polymérique	37
II.2. La structure de biofilms phototrophes.....	40
II.3 Facteurs influençant les biofilms phototrophes	42
II.3.1 La lumière	43
II.3.2 Les nutriments	45

II.3.3 La température	46
II.4 Propriétés des biofilms phototrophes.....	46
II.4.1 Rôle écologique.....	46
II.4.2 Capacités cohésives et stabilisation du substrat	49
II.5 Les biofilms phototrophes, des acteurs du colmatage ?	50
III. Ingénierie écologique : Les macro-organismes comme acteurs potentiels du décolmatage ?.	52
Partie 1 : les macrophytes allélopathiques	53
III.1 Pourquoi s'intéresser aux macrophytes ?	53
III.2 Les relations de compétition entre macrophytes et microphytes.....	54
III.2.1 Compétition pour la lumière	54
III.2.2 Compétition pour les nutriments	55
III.3 L'allélopathie	57
III.3.1 Définition	57
III.3.2 L'allélopathie en milieu aquatique	58
III.3.3 Les différents mécanismes d'émission des substances allélopathiques.....	59
III.3.4 Les différents modes d'action des composés allélopathiques	60
III.3.5 Quelle influence des macrophytes allélopathique sur les biofilms développés dans les bassins d'infiltration ?	61
Partie 2 : les invertébrés benthiques	63
III.4 Pourquoi s'intéresser aux macro-invertébrés ?.....	63
III.5 Les invertébrés brouteurs, consommateurs de biofilm.....	65
III.6 Les invertébrés bioturbateurs, ingénieurs des écosystèmes	66
III.6.1 Définition de la bioturbation	66
III.6.2 Influence sur les propriétés de la matrice sédimentaire	67
IV. Bilan & Problématique.....	70
CHAPITRE 2 : APPROCHE EXPERIMENTALE.....	73
I. Présentation du site d'étude et des échelles d'observation	75
I.1. Présentation du site d'étude	75
I.1.1 Description et historique du site	75
I.1.2 Pourquoi ce site ?.....	78
I.1.3 Les « contraintes » liées au site.....	79
I.2 Echelle d'observation	81

II. Choix expérimentaux	82
II.1 Expérience 1 : Interactions Biofilm - Support d'infiltration - Colmatage	83
II.1.1 Stratégie d'échantillonnage et mesures réalisées	83
II.1.3 Détail des mesures d'infiltration	86
II.2 Expérience 2 : interactions macrophytes – biofilm benthique	89
II.2.1 une approche en « mésocosmes »	89
II.2.2 Sélection des macrophytes	90
II.2.3 Système expérimental.....	95
II.2.4 Plan expérimental	98
II.2.5 stratégie d'échantillonnage et mesures réalisées	99
II.3 Expérience 3 : Interactions Biofilm – macro-organismes et conséquences sur l'infiltration	100
II.3.1 Une approche en encagements <i>in situ</i>	100
II.3.2 Sélection des traitements	100
II.3.3 Design expérimental	104
II.3.4 Stratégie d'échantillonnage et mesures réalisées	106
II.3.5 Détail des mesures d'infiltration :	106

CHAPITRE 3 : RESULTATS & DISCUSSION.....109

I. Biofilm et colmatage des bassins d'infiltration (article 1)	111
II. Macrophytes allélopathiques : influence sur les biofilms benthiques (article 2)	144
III. Interactions biofilms – macro-organismes et conséquences sur l'infiltration (article 3)	177

SYNTHESE & PERSPECTIVES203

I. Synthèse	205
I.1 Quel rôle du biofilm phototrophe sur les processus de colmatage des bassins d'infiltration ?	205
I.2 Quelle influence des macrophytes allélopathiques sur la composante phototrophe des biofilms benthiques ?	208
I.3 Des processus écologiques au service du décolmatage des bassins d'infiltration ?	211
II. Perspectives	215
II.1 les perspectives à court terme	215
II.1.1 Caractériser les propriétés du sédiment	215
II.1.2 Réaliser des expérimentations complémentaires	216
II.2 Les perspectives à long terme	218

II.2.1 Suivre la colonisation d'un bassin depuis un état initial « après raclage »	218
II.2.2 Examiner la diversité des communautés microbiennes	219
II.2.3 Déterminer la qualité des eaux infiltrées avec et sans traitement	219
BIBLIOGRAPHIE.....	221
ANNEXES.....	247
I. Communications affichées	248
II. Tableaux de données	251
II.1 Expérience 1	251
II.2 Expérience 2	253
II.3 Expérience 3	255
III. Analyse pigmentaire par HPLC	259

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figures

<i>Figure 1 : Conséquences de l'urbanisation sur l'importance relative de l'infiltration et du ruissellement, d'après Wikhydro (2013).....</i>	<i>4</i>
<i>Figure 2 : Exemple de techniques alternatives, d'après CAUE27 (2014) et Grand Lyon (2008).....</i>	<i>5</i>
<i>Figure 3 : schéma d'un bassin d'infiltration</i>	<i>13</i>
<i>Figure 4 : Séquences redox des réactions de dégradation de la matière organique, d'après Kristensen (2000), modifié par Nogaro (2007).....</i>	<i>16</i>
<i>Figure 5 : Triangle des textures de Tavernier et Maréchal (Richer de Forges et al., 2008; USDA, 2014)</i>	<i>22</i>
<i>Figure 6 : Différents types de pores, d'après de Marsily (1986).....</i>	<i>25</i>
<i>Figure 7 : Connexions entre pores dans un milieu poreux, les particules sont ici assimilées à des sphères (Lominé, 2007)</i>	<i>25</i>
<i>Figure 8 : Exemple d'arrangement de particules (d'après le ©Jardin botanique de Montreal (2014))..</i>	<i>27</i>
<i>Figure 9 : Illustrations de biofilms développés dans différentes conditions et systèmes.....</i>	<i>36</i>
<i>Figure 10 : Zoom sur la matrice polymérique du biofilm et ses composantes</i>	<i>38</i>
<i>Figure 11 : Images au microscope SEM de la matrice polysaccharidique, d'après ©Bacteria-world (2014).....</i>	<i>39</i>
<i>Figure 12 : Plusieurs biofilms développés dans des bassins d'infiltration lyonnais (source : LEHNA/IPE)</i>	<i>41</i>
<i>Figure 13: Observation de micro-algues benthiques de sédiments de bassins d'infiltration. Images obtenues par microscopie en lumière blanche, grossissement 10³.....</i>	<i>42</i>
<i>Figure 14 : Les mécanismes de la photosynthèse, d'après Moore et Clark (1995).....</i>	<i>48</i>
<i>Figure 15 : Images au microscope SEM (a) des particules d'argiles piégées dans la matrice EPS secrétées par des bactéries (Mineralogical Society of America, 2014), (b) un biofilm bactérien qui lie des billes de verre entre elles (Bio-Pro, 2011).</i>	<i>50</i>
<i>Figure 16 : Illustration de macrophytes (Conseil général des Landes, 2009)</i>	<i>53</i>
<i>Figure 17 : Diagramme conceptuel des interactions majeures concernant les plantes en milieux aquatiques, A= Allelopathie, C = Compétition, H = « Herbivory », modifié d'après Gopal et Goel (1993).</i>	<i>54</i>
<i>Figure 18 : Utilisation des sources d'éléments nutritifs dans la colonne d'eau et dans les sédiments par les communautés phototrophes : (macrophytes et algues épiphytiques associées, micro-algues benthiques et phytoplancton). L'importance relative d'une source de nutriments est indiquée par une ligne plus ou moins pleine. Modifié d'après Sand-Jensen et Borum (1991).</i>	<i>56</i>

Figure 19 : Photo de macro-invertébrés benthiques illustrant la diversité des espèces rencontrées (Kouri et de Graaf, 2013).....	63
Figure 20 : Les différents modes de bioturbation : (A) les biodiffuseurs, (B) les convoyeurs vers le haut, (C) les convoyeurs vers le bas et (D) les régénérateurs, d'après Kristensen et al. (2012).....	68
Figure 21 : Schéma récapitulatif du rôle des organismes bioturbateurs sur les propriétés des sédiments, d'après Gilbert (2003).	69
Figure 22 : Schéma fonctionnel résumant les interactions étudiées dans le cadre de ce travail.....	71
Figure 23 : Localisation (en haut) et schématisation (en bas) du site d'étude, Source : GoogleMap et Loizeau (2013), respectivement.....	76
Figure 24 : (A) Schéma du dôme hydraulique formé sous les bassins, modifié d'après (Bouwer, 2002), (B) mise en situation sur le site.....	77
Figure 25 : Photos du raclage d'un bassin : pendant l'opération (A), le substrat raclé (B), et un bassin avant (C) et après (D) raclage. Photos LEHNA et VEOLIA.....	78
Figure 26 : Les limites du site Natura 2000 de Miribel-Jonage, d'après le DOCOB de 2009.....	80
Figure 27 ; Représentation schématique des méthodes et approches complémentaires utilisées en écotoxicologie pour les études environnementales, d'après Caquet, et al., 1996.....	81
Figure 28 : Les trois expériences réalisées	82
Figure 29 : structuration verticale d'une des carottes prélevées	84
Figure 30 : Vidange et découpage des carottes, Photos LEHNA	84
Figure 31 : Stratégie d'échantillonnage d'un bassin	85
Figure 32 : Photos des essais Beerkan, photos LEHNA.....	87
Figure 33 : Photos de <i>Vallisneria spiralis</i> (Corolla et Kupper, 2014).....	92
Figure 34 : Photos de <i>Ceratophyllum demersum</i> (Corolla et al., 2014).....	93
Figure 35 : Photos de <i>Berula Erecta</i> , LEHNA et Bostelmann (2000).....	93
Figure 36 : Photos de <i>Chara globularis</i> (Corolla et Rochefort, 2012)	94
Figure 37 : Les bacs d'acclimatation avec de gauche à droite, <i>C. demersum</i> , <i>B. erecta</i> et <i>V. spiralis</i> ...	95
Figure 38 : Photo d'une coupe dans le substrat des bassins, VEOLIA.....	95
Figure 39 : Préparation des mésocosmes : introduction des sédiments colonisés	96
Figure 40: Présentation du dispositif expérimental	97
Figure 41 : Le pré-bassin (à gauche) et le remplissage des bacs (à droite)	97
Figure 42 : Photos de <i>Viviparus viviparus</i> (Kupfer et Corolla, 2014)	101
Figure 43: Photos de <i>Limnodrilus hoffmeisteri</i> , LEHNA et Island Creek (2014)	102
Figure 44 : Schéma de l'activité de bioturbation, G. Nogaro et F. Mermillod-Blondin.....	102
Figure 45 : Présentation du système expérimental – (A) les traitements, (B) les encagements immergés, (C) les encagements après la fin de l'expérience, le bassin vidé.....	104
Figure 46 : Les encagements de (A) <i>V. spiralis</i> , (B) Ombrage, (C) <i>V. viviparus</i> et (D) <i>L. hoffmeisteri</i> ...105	105
Figure 47 : Les mesures d'infiltration sur le terrain.....	107

<i>Figure 48 : Illustration de l'effet seuil de la biomasse algale sur le réseau poral</i>	207
<i>Figure 49 : Exemple de traitement d'image CT scan avec le logiciel ImageJ, l'épaisseur du biofilm apparait clairement après traitement (en vert).</i>	216

Tableaux

<i>Tableau 1 : Classification des particules, d'après Wentworth (1922).</i>	21
<i>Tableau 2: Classification des tailles de pores (Soil Society of America, 1997).</i>	24
<i>Tableau 3 : Facteurs influençant le développement des biofilms, d'après Wimpenny et al. (2000)</i>	43
<i>Tableau 4 : Comparaison des macrophytes en fonctions des critères de sélection (Sculthorpe, 1967; Hu et Hong, 2008).</i>	91
<i>Tableau 5 : Planning de l'expérience 2.</i>	98

Introduction



I. Contexte de l'étude

En 1992, la conférence de Dublin définissait l'eau douce comme *une ressource fragile et non renouvelable, indispensable à la vie, au développement et à l'environnement*. La santé ainsi que toutes les activités humaines dépendent de sa disponibilité en qualité et quantité suffisante. La même année, le sommet planète Terre de Rio de Janeiro ajoutait *la nécessité de préserver les fonctions hydrologiques, biologiques et chimiques des écosystèmes, en adaptant les activités humaines à la capacité limite de la nature*. Aussi, la protection de la ressource en eau est-elle aujourd'hui un enjeu majeur nécessitant une réflexion interdisciplinaire, en particulier dans les zones urbaines densément peuplées où les besoins sont élevés, les sources de pollutions nombreuses, et les espaces naturels restreints.

L'anthropisation des territoires affectent la qualité et la quantité des ressources en eau de différentes manières :

- D'une part, en augmentant les charges en polluants des hydrosystèmes de surface. En effet, les eaux pluviales lessivent des sols urbains fortement chargés en contaminants organiques tels que les PCB et HAP¹, ou inorganiques tels que les métaux lourds (Göbel *et al.*, 2007; El-Mufleh *et al.*, 2014). Les eaux qui drainent des sols agricoles assimilent des teneurs importantes en azote et phosphore qui peuvent perturber ou modifier la biocénose. En l'absence de systèmes particuliers de collecte, et/ou de traitement, ces eaux s'écoulent le plus souvent dans le milieu naturel. Elles peuvent en plus altérer la qualité des eaux souterraines, du fait de leur connectivité avec les eaux de surface, par infiltration dans les sols.

- D'autre part, en imperméabilisant les surfaces du fait de l'étalement urbain. L'urbanisation entraîne donc une diminution de l'infiltration avec pour conséquences (i) une sous-alimentation des nappes phréatiques, (ii) une augmentation des flux qui favorise l'apparition de pics d'écoulement et accroît les risques d'inondation en centre ville, où les réseaux ne suffisent plus à évacuer les apports en cas de forts épisodes pluvieux [Figure 1].

¹ Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques et PolyChloroBiphényles

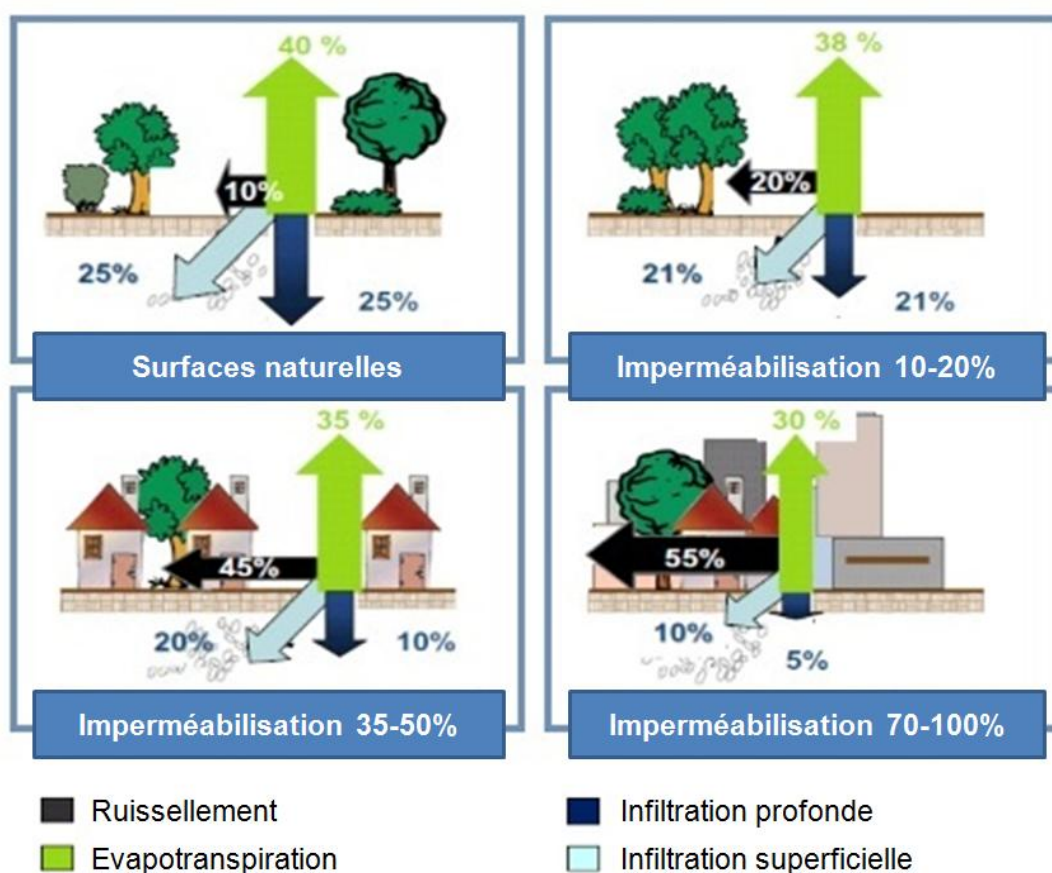


Figure 1 : Conséquences de l'urbanisation sur l'importance relative de l'infiltration et du ruissellement, d'après Wikhydro (2013)

Face à ces constats, des techniques dites « alternatives » (sous-entendu alternatives au tout-tuyau) ont été développées pour agir en amont des systèmes de récupération classiques et améliorer la gestion de l'eau en milieu urbain. Ces techniques peuvent être classées en plusieurs groupes dont les fonctions se complètent (Certu, 1998; Eriksson *et al.*, 2007; Le Coustumer, 2008) :

- les systèmes de stockage (bassins ou étangs de rétention, marais artificiels, réservoirs, toitures, chaussées drainantes) : Ce sont des ouvrages de nature et de dimensions très variables mais avec un objectif commun : retenir les eaux lors de forts épisodes pluvieux pour les évacuer ensuite à débit régulé vers un exutoire [Figure 2a,d,e],
- les systèmes de récupération (bandes filtrantes, noues, rigoles) : ce sont des dispositifs végétalisés (enherbés) en pentes douces, qui permettent de recueillir

ou déplacer les eaux tout en assurant un prétraitement par filtration/décantation [Figure 2b,f],

- les systèmes d'infiltration (puits, tranchées et bassins d'infiltration) : ce sont des milieux artificiels conçus pour infiltrer d'importants volumes d'eau de surface tout en assurant la rétention et la dégradation de potentiels polluants. Ils peuvent se décliner sous différentes tailles : des ouvrages de faibles dimensions lorsqu'ils sont situés à la source du ruissellement, ou de très grandes dimensions lorsqu'ils servent d'exutoire [Figure 2a,c].



Figure 2 : Exemple de techniques alternatives, d'après CAUE27 (2014) et Grand Lyon (2008) un bassin de rétention/infiltration des eaux pluviales (a), des chemins pour les eaux pluviales intégrés dans les espaces verts (b), un bassin d'infiltration conçu pour la recharge des nappes (c), une toiture végétalisée (d), un stationnement perméable (e) et une noue (f).

Parmi toutes ces techniques alternatives, les **bassins d'infiltration** sont tout particulièrement répandus car ils répondent à des enjeux aussi bien qualitatifs que quantitatifs dans la préservation de la ressource en eau ; et jouent ainsi un rôle important dans la gestion intégrée de l'eau (Durham *et al.*, 2002). Ils assurent en effet diverses fonctions telles que la récupération des eaux pluviales permettant de limiter le ruissellement, ou la recharge des nappes phréatiques permettant de maintenir la

productivité des captages en période d'étiage. De plus, ils peuvent servir de supports à d'autres fonctions (espaces verts, terrain de sport, etc.), et font, à ce titre, partie intégrante des nouveaux paysages urbains. Ils sont pour toutes ces raisons recommandés par le guide « *collectivités locales et ruissellement pluvial* » édité par le Ministère de l'Environnement en 2006.

Toutefois, ces ouvrages récents présentent des limites en termes opérationnels, du fait de la méconnaissance de leur fonctionnement sur le long terme et de l'entretien nécessaire pour assurer leur viabilité et leur durabilité (Knowles *et al.*, 2011). En effet, les exploitants de bassins d'infiltration font face aujourd'hui à des problématiques importantes liées au **colmatage** progressif des ouvrages, et ceci quelle que soit leur fonction. Le colmatage affecte en effet l'ensemble des performances des bassins (Dechesne *et al.*, 2004) : il peut modifier les capacités auto-épuratrices des systèmes (Pitt *et al.*, 1999) et entraîner une diminution des quantités d'eau infiltrée, réduisant ainsi l'ensemble des bénéfices liés à la recharge des nappes ou à l'évacuation des eaux pluviales. Il apparaît donc aujourd'hui nécessaire de mieux appréhender les facteurs expliquant le colmatage des bassins, ceci dans le but de préserver la ressource en eau, et d'optimiser la gestion des ouvrages au regard de critères environnementaux et économiques. Les premiers visent le respect des exigences environnementales relatives à l'accessibilité à l'eau potable, les seconds la réduction des coûts inhérents à l'entretien des systèmes d'infiltration.

Pourquoi s'intéresser au compartiment biologique ?

Le colmatage des bassins d'infiltration soulève de nombreux enjeux à la fois environnementaux et économiques, et potentiellement sanitaires. La couche superficielle des bassins, support de l'infiltration, est un milieu complexe car résultant de divers apports : sa composition résulte non seulement des particules et solutés provenant du lessivage des sols mais également des processus physiques, chimiques et/ou biologiques ayant lieu dans les bassins tant au niveau de la colonne d'eau qu'au sein des sédiments superficiels. Si les mécanismes physiques et chimiques de rétention des particules sont bien compris et peuvent être en partie palliés *via* par exemple des prétraitements par décantation, le développement biologique est lui intrinsèque à l'ouvrage.

Dans les bassins d'infiltration, le compartiment biologique compte plusieurs composantes pouvant influencer sur les propriétés hydrauliques :

- (i) La couverture biologique, ou **biofilm**, développée au niveau de la couche superficielle du support d'infiltration, à l'interface avec l'eau. Elle a généralement un effet négatif sur les performances hydrauliques des ouvrages, car elle peut former un tapis dense qui va empêcher l'eau de s'infiltrer, en plus de favoriser la rétention des particules fines au niveau de la couche superficielle. Ce terme sera défini plus longuement dans le premier chapitre de ce manuscrit.
- (ii) Les plantes aquatiques, ou **macrophytes**, qui prennent racines dans le support d'infiltration. Elles peuvent potentiellement réduire le colmatage, par des mécanismes physiques liés à leur réseau racinaire, mais aussi parce qu'elles sont en compétition avec le biofilm et sont susceptibles de limiter son développement *via* divers mécanismes qui seront détaillés dans le premier chapitre.
- (iii) Enfin les **invertébrés benthiques**², des macro-organismes qui peuvent à la fois modifier la structure physique du support d'infiltration et agir sur la disponibilité des ressources pour les autres espèces. Ils peuvent également interagir avec le biofilm par voie trophiques. Ces mécanismes seront précisés dans le premier chapitre également.

Enfin, si la présence du biofilm peut affecter les performances hydrauliques des ouvrages, les macro-organismes tels que plantes et invertébrés sont susceptibles d'agir positivement sur les capacités d'infiltration. Aussi, la problématique de la dégradation des propriétés hydrauliques nécessite une approche **pluridisciplinaire**, prenant en compte les interactions existant entre les composantes biotiques et abiotiques de ces systèmes.

² Le benthos décrit l'ensemble des organismes vivant au niveau des interfaces sédimentaires. Le terme « benthique » signifie donc ici « vivant à l'interface eau/couche superficielle des bassins ».

II. Objectifs de la thèse

Ce travail de thèse porte sur l'influence du compartiment biologique sur les capacités d'infiltration des bassins, et se décline en deux grands objectifs :

1. Mieux comprendre comment le biofilm agit sur le colmatage. Autrement dit, il s'agit de mieux appréhender le fonctionnement de l'interface eau / support d'infiltration en nous intéressant conjointement à l'état du biofilm de surface et aux capacités d'infiltration associées.

2. Etudier les interactions entre composantes biotiques et abiotiques pour limiter, voire réduire le colmatage des ouvrages en utilisant les principes de l'ingénierie écologique. Autrement dit, cette seconde partie consiste à étudier puis utiliser les interactions naturelles existant entre macro-organismes et biofilm afin de développer des solutions innovantes et durables pour maintenir les performances des ouvrages d'infiltration.

L'ingénierie écologique consiste à utiliser « *des populations, des communautés ou des écosystèmes dans le but de modifier une ou plusieurs dynamiques biotiques ou physico-chimiques de l'environnement dans un sens réputé favorable à la société et compatible avec le maintien des équilibres écologiques et du potentiel adaptatif de l'environnement* » (ONEMA, 2010). Chocat (2013) dans son guide *L'ingénierie écologique adaptée aux milieux aquatiques* explique qu'il s'agit de s'appuyer sur des pratiques de gestion et/ou de conception inspirées de processus fonctionnels biotiques ou abiotiques gouvernant les systèmes écologiques. Dans le cadre de ce travail, il s'agit de mettre au point des « outils biologiques » pour maximiser un service écosystémique et mieux gérer la problématique du colmatage des ouvrages. L'ingénierie écologique est ainsi une problématique fondamentalement pluridisciplinaire et interdisciplinaire, qui relie la recherche fondamentale à la recherche appliquée.

III. Organisation du document

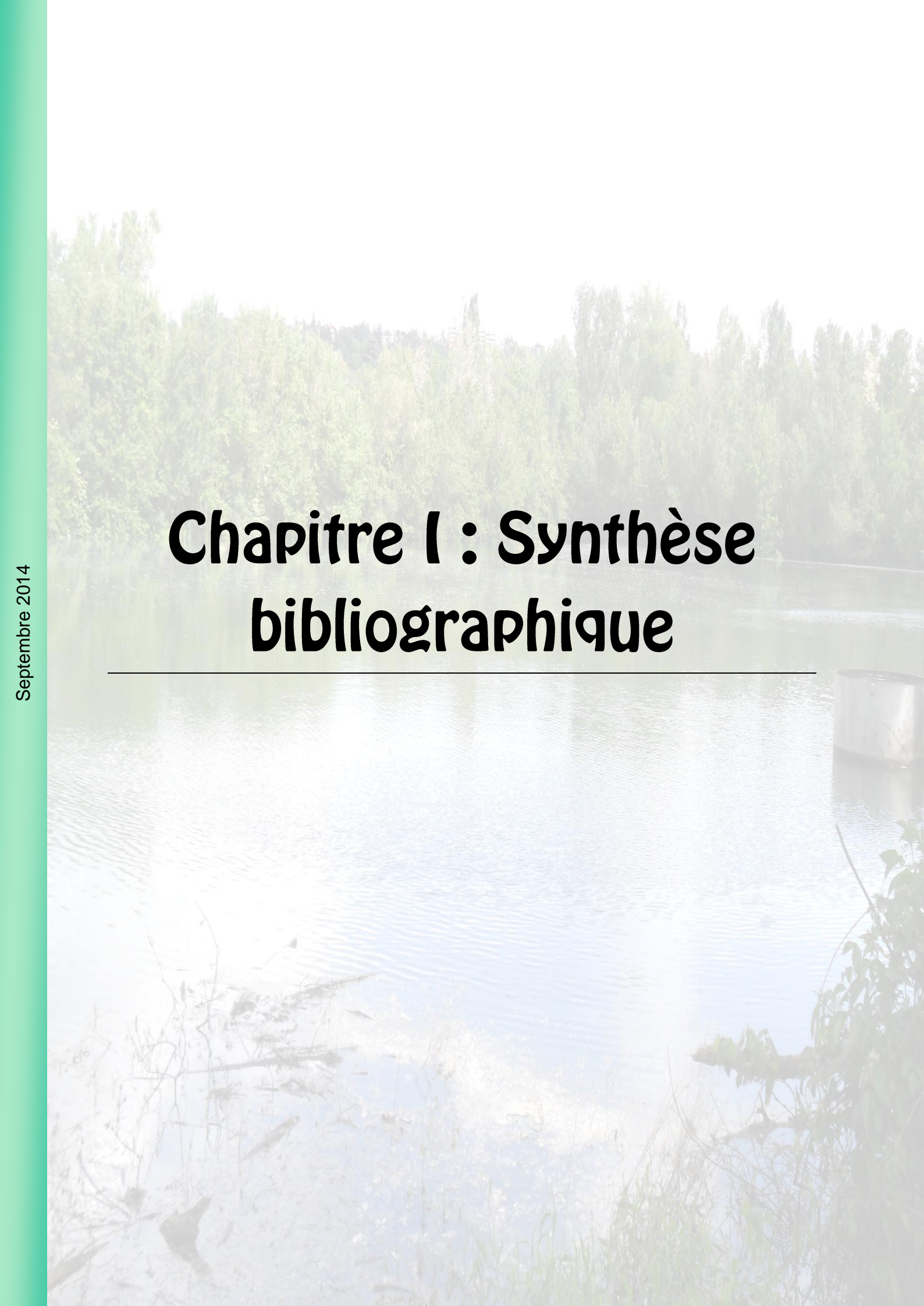
Pour répondre à ces deux grands objectifs, le présent document s'organise de la manière suivante :

- Le premier chapitre sera consacré à une synthèse bibliographique qui permettra de redéfinir et décrire plus précisément les différents termes du sujet. Cet état de l'art des connaissances m'amènera à dégager les principales questions qui guideront ce travail de thèse.

J'exploiterai les conclusions obtenues dans ce chapitre pour déterminer l'approche expérimentale à mettre en place pour étudier les interactions entre biofilms, macro-organismes et propriétés hydrauliques des ouvrages d'infiltration, et pour identifier des propriétés susceptibles de guider l'interprétation des résultats.

- Le second chapitre présentera le volet expérimental de l'étude. Cette partie vise à justifier et présenter le choix des différentes stratégies expérimentales utilisées et présentera les trois expériences réalisées dans le cadre de cette thèse.
- Le troisième chapitre exposera en trois parties les résultats inhérents à ce travail, chacune sous la forme d'un article faisant l'objet d'une publication parue ou à paraître. Les protocoles expérimentaux développés et utilisés dans le cadre de ce travail de thèse y figureront.

Enfin, je conclurai ce travail et discuterai des perspectives à lui donner.



Chapitre I : Synthèse bibliographique

I. Les bassins d'infiltration

I.1 Fonctionnement

Les bassins d'infiltration sont des ouvrages artificiels implantés sur un sol « naturel », soit par excavation, soit *via* la construction de digues, sol sur lequel est généralement importé un substrat servant de support d'infiltration [Figure 3]. Ce substrat est le plus souvent un sable calibré qui assure à la fois une bonne oxygénation permettant d'optimiser les processus de dégradation de la matière organique entrante, et une infiltration homogène sur tout l'ouvrage. En effet, le fonctionnement des bassins repose sur deux principaux facteurs, leurs capacités d'épuration et d'infiltration.

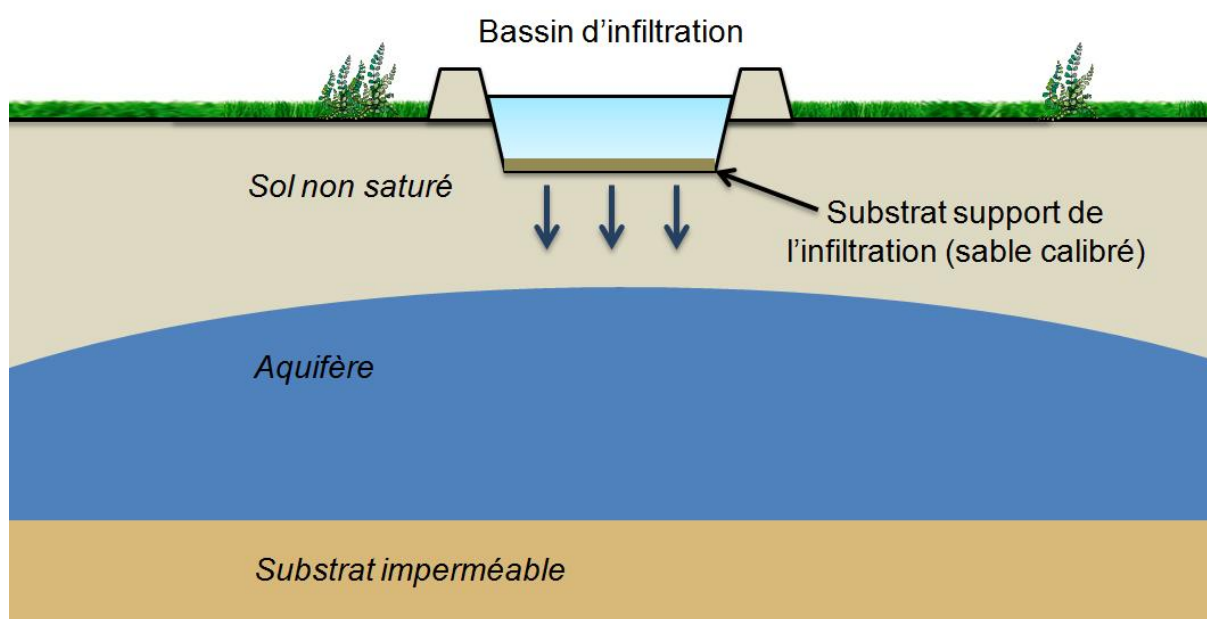


Figure 3 : schéma d'un bassin d'infiltration

I.1.1 Capacités « auto-épuratrices »

Les bassins profitent de différentes propriétés du substrat support de l'infiltration qui présente un pouvoir de rétention et / ou de transformation vis-à-vis des divers contaminants rencontrés dans les eaux qui s'infiltrent. Ces derniers peuvent être organiques ou inorganiques, et se présenter sous différentes formes : particulaire, colloïdale ou dissoute ; relevant de mécanismes de rétention et de transformation différents (Chocat, 1997). Nous détaillons ici les principaux mécanismes :

(i) La rétention par filtration mécanique : le substrat agit en premier lieu comme un filtre permettant de retenir en surface les matières en suspension (MES) et les contaminants associés véhiculés par l'eau qui tendent à sédimenter sous l'effet de la gravité. Les particules les plus grossières sont interceptées et capturées à la surface, et la filtration conduit à la création d'une couche de particules de plus en plus fines surplombant le sable calibré, évitant leur transfert vers les couches inférieures. Ce mécanisme physique de piégeage des particules dépend surtout de la taille et de l'arrangement initial des particules du substrat (Gougoussis-Delpy, 1982). Cette filtration mécanique affecte surtout les particules de plus grandes tailles ($>30 \mu\text{m}$) alors que les particules $< 30 \mu\text{m}$ sont plutôt soumises à une filtration physico-chimique (Le Coustumer, 2008).

(ii) La rétention par des mécanismes physico-chimiques : des mécanismes chimiques comprenant la sorption et la précipitation viennent s'ajouter aux mécanismes physiques dans la rétention des particules :

- *L'adsorption* est un phénomène de surface par lequel des particules, colloïdes ou solutés se fixent sur une surface solide selon divers processus (liaison électrostatique, complexation de surface (Sigg *et al.*, 2000)). La couche superficielle des bassins d'infiltration, en partie formée par sédimentation, possède de fortes capacités d'adsorption, qui favorise la rétention de certains composés qu'ils soient sous forme colloïdale, particulaire ou dissoute. L'adsorption concerne en particulier les solutés sous forme de cations ou dans une moindre mesure les anions, notamment les cations métalliques (Serpaud *et al.*, 1994), mais aussi certaines bactéries ou virus (Stevik *et al.*, 2004; Chabaud *et al.*, 2006). Ce mécanisme dépend de nombreux facteurs, notamment de la taille et la composition physico-chimique du substrat. La taille des particules détermine les surfaces de contact avec les matières en suspension provenant de la colonne d'eau. Les grains les plus petits vont augmenter les opportunités de contact et ainsi favoriser la fixation des composés par adsorption (Pundsack *et al.*, 2001). La composition physico-chimique joue également un rôle majeur car c'est elle qui détermine l'affinité des matières en suspension et composés dissous avec les particules du substrat (Sigg *et al.*, 2000). A titre d'exemple, l'immobilisation et l'élimination du phosphore sous forme d'ions orthophosphates (PO_4^{3-}) ou la

rétenion de la matière organique dépendent de la disponibilité des "sites de sorption" qui sont généralement fournis par des argiles ou des composés organiques. Enfin, la vitesse d'infiltration détermine les flux donc les temps de contact avec le substrat (Brissaud et al., 1989). Si le liquide percole trop rapidement, le temps de contact n'est pas suffisant, alors que ce paramètre favorise les échanges entre surfaces et donc la rétenion des matières en suspension par adsorption (Stevik et al., 2004).

- *La précipitation* est le passage d'une espèce de l'état dissous à l'état solide, qui peut avoir lieu entre espèces dissoutes ou entre un soluté et une surface solide dans la colonne d'eau ou dans l'eau interstitielle du support. La formation de précipités insolubles est l'un des principaux mécanismes par lesquels les métaux lourds sont éliminés de l'eau (Matagi et al., 1998). Ce mécanisme dépend de la concentration et du produit de solubilité de l'espèce, des conditions redox et du pH : une augmentation du pH favorise en général la précipitation, les espèces métalliques précipitant sous forme d'hydroxydes.

(iii) *Les processus microbiens* : Ils assurent notamment la dégradation des composés organiques, et la transformation de certains composés inorganiques, tels que les composés azotés, par des réactions d'oxydation ou de réduction.

- *La dégradation des composés organiques* : la matière organique retenue par les différents processus que nous venons d'exposer est ensuite dégradée par oxydation sous l'action des micro-organismes qui se développent à l'interface eau /substrat d'infiltration sous la forme d'une couverture biologique, ou biofilm³ (Lin et al., 2008). La minéralisation de la matière organique est assurée en conditions aérobies par les communautés microbiennes hétérotrophes (Nogaro et al., 2007; Chen et al., 2009). Elle consiste en une série de réactions dépendantes des conditions physico-chimiques, notamment de la disponibilité des composés oxydés utilisés comme accepteurs d'électrons (Jorgensen, 1982; Lovley et Philips, 1986; Kristensen, 2000). L'ordre d'utilisation de ces accepteurs d'électrons est déterminée par l'énergie libre libérée par les réactions d'oxydation [Figure 4],

³ La partie suivante de ce chapitre sera consacrée à la définition plus précise de ce terme.

l'oxydant qui conduit à la plus grande libération d'énergie étant utilisé en premier (Chapelle, 1993).

- *La transformation des composés azotés* : les activités humaines sont sources d'une grande quantité d'azote inorganique que l'on retrouve sous forme d'ion ammonium (NH₄⁺) ou nitrate (NO₃⁻) dans les eaux d'infiltration. L'ammonium, fixé par les processus détaillé auparavant, peut être transformé en nitrate *via* l'activité de nitrification, c'est à dire l'oxydation de l'ammonium (NH₄⁺) en nitrates (NO₃⁻) par les micro-organismes. Les réactions impliquées dans la nitrification nécessitent beaucoup d'oxygène et se produisent donc dans les premiers centimètres du substrat. Les nitrates quant-à-eux peuvent être transformés en azote gazeux *via* l'activité de dénitrification, c'est-à-dire la réduction des nitrates en azote gazeux (N₂). Elle se produit en l'absence d'oxygène et est réalisée par des bactéries hétérotrophes « aérobies facultatives » qui utilisent l'oxygène des nitrates comme accepteurs d'électrons (Chabaud, 2007).

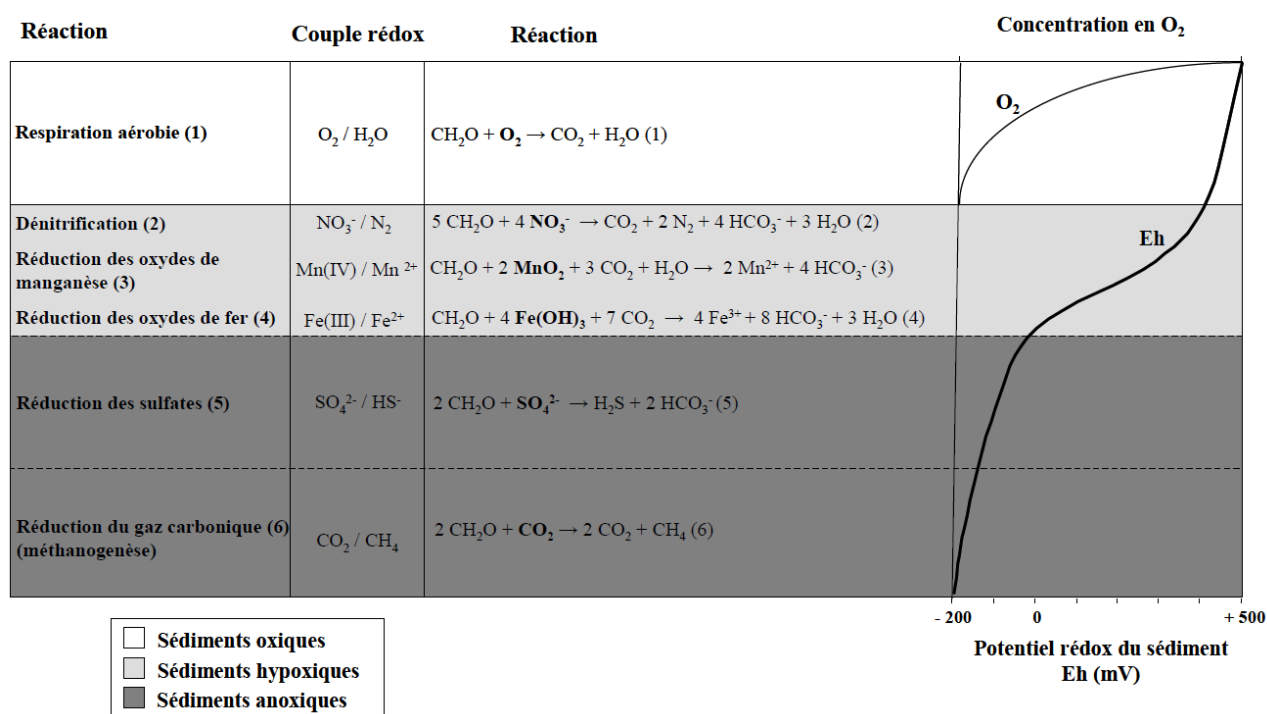


Figure 4 : Séquences redox des réactions de dégradation de la matière organique, d'après Kristensen (2000), modifié par Nogaro (2007)

Ainsi, les processus microbiens dépendent des conditions redox (Schmidt et al., 2007), et une épuration complète d'azote sous forme d'ammonium (avec transformation en N₂) nécessite à la fois des conditions aérobies pour la nitrification et des conditions

anaérobies pour la dénitrification. Au sein des bassins d'infiltration, ces conditions peuvent être obtenues puisqu'il existe une zone de surface oxygénée et des micro-environnements anaérobies en profondeur du substrat (Revesbech *et al.*, 1988; Jensen *et al.*, 1994). La température de l'eau est également un paramètre important car elle affecte la production, l'abondance et l'activité des bactéries participant à la dégradation de la matière organique (Maeng *et al.*, 2010). La vitesse d'écoulement est également un paramètre important puisqu'elle détermine le temps de contact entre l'eau qui s'infiltré et les communautés microbiennes (Van Cuyk *et al.*, 2001). En revanche, l'épaisseur du substrat ne joue pas un rôle primordial, car la littérature montre que les processus épuratoires ont lieu principalement dans les premiers centimètres des supports d'infiltration, avec un maximum de 10-15 cm lorsqu'il s'agit d'effluents très chargés. C'est le cas par exemple pour des bassins d'infiltration conçus pour le traitement secondaire des eaux usées (Siegrist, 1987; Stevik *et al.*, 1999). Enfin, toujours concernant l'épuration, un autre facteur intervient lors du dimensionnement des ouvrages : « l'épaisseur » de la zone non-saturée, aussi appelée zone vadose, qui s'établit entre le fond du bassin et l'aquifère sous-jacente [cf. Figure 3]. La charge appliquée au système doit en effet assurer une hauteur suffisante de cette zone pour permettre l'oxydation de la matière organique entrante. A titre d'indication, la réglementation française impose une hauteur minimum de 1 m.

I.1.2 Capacités d'infiltration

Les capacités d'infiltration des bassins reposent à la fois sur les propriétés de la couche superficielle support de l'infiltration, et du sol sous-jacent. Tous les environnements hydrogéologiques ne sont pas favorables aux techniques d'infiltration : les sols à faible ou à trop forte perméabilité ne sont pas adaptés (Brissaud *et al.*, 1989). Les capacités d'infiltration des bassins dépendent des propriétés hydrodynamiques des sols support et notamment de leur conductivité hydraulique à saturation⁴ (K_s), qui doit être comprise entre 10^{-6} et 10^{-2} m.s⁻¹ (Azzout *et al.*, 1994). Pour une conductivité très élevée (supérieure à 10^{-2} m.s⁻¹) des précautions s'imposent car elle peut conduire à des transferts non

⁴ Les différents paramètres présentés ici (conductivité hydraulique, porosité, etc.) seront décrits plus précisément par la suite.

maitrisés, c'est-à-dire trop rapides pour permettre de garantir les processus auto-épuration décrits précédemment (Barraud *et al.*, 2006). La conductivité hydraulique est un paramètre hydrodynamique influencé par de nombreux facteurs (Platzer et Mauch, 1997; Le Coustumer, 2008) :

- *L'architecture du réseau poral*, c'est-à-dire la taille et la connectivité entre les pores, les espaces vides inter particules du support d'infiltration. Ce paramètre sera développé plus longuement par la suite.
- *la charge en matières en suspension dans l'eau entrante*, qui dépend de la nature et de l'occupation des sols lessivés (couvertures végétales, activités humaines, etc.) du relief du bassin versant, et du climat (Laak, 1976; Jenssen et Siegrist, 1990) et peut se traduire par un colmatage du sol
- *les propriétés physiques de l'eau entrante*, et notamment sa *densité* et sa *viscosité*, cette dernière étant fonction de la température ; plus il fait froid, plus la viscosité de l'eau augmente, donc plus l'infiltration diminue,
- *le degré de saturation en eau du support d'infiltration* qui détermine l'activation de la porosité et donc la conductivité hydraulique, en prenant en compte les phénomènes d'hystérèse déterminants pendant les *cycles de sollicitation*, c'est-à-dire des changements dans les conditions de saturation du sol entre les différentes phases d'infiltration (Greskowiak *et al.*, 2005).

Finalement, il faut noter que le colmatage s'avère initialement bénéfique pour les performances de l'ouvrage, (i) en rendant l'infiltration plus homogène et (ii) en améliorant l'épuration puisqu'il augmente le temps de contact avec le substrat, favorisant ainsi la filtration et les processus de dégradation des charges entrantes (Gougoussis-Delpy, 1982; Stevik *et al.*, 1999; Van Cuyk *et al.*, 2001). Cependant, sur le long terme, il a des conséquences dommageables sur les performances des bassins. En effet, lorsque le colmatage devient trop important, l'épaisseur de la zone oxygène est progressivement réduite jusqu'à provoquer une anoxie du système (Nogaro et Mermillod-Blondin, 2009), qui affecte fortement ses capacités auto-épuration en inhibant notamment les processus microbiens aérobie qui sont les plus efficaces dans la dégradation des charges organiques entrantes (Bali *et al.*, 2010; Navel *et al.*, 2011). Par ailleurs, le colmatage

entraîne une diminution des quantités d'eau infiltrée, réduisant ainsi l'ensemble des bénéfices liés à la recharge des nappes ou à l'évacuation des eaux pluviales.

En définitive, assurer le bon fonctionnement des bassins revient à assurer un équilibre durable en limitant l'accumulation de matière (MES, couverture biologique) au niveau de la couche superficielle, ceci afin de conserver les performances d'épuration et d'infiltration. Du fait de la complexité des interactions entre les différentes variables impliquées dans les performances des ouvrages, la conception, le dimensionnement et la gestion des bassins d'infiltration ne sont pas toujours bien définis : les systèmes reposent souvent sur des considérations empiriques et sont surdimensionnés afin de limiter l'épaisseur de la couche colmatante. Pourtant, malgré ce surdimensionnement, le colmatage devient souvent trop important au bout de quelques mois ou années d'exploitation, et nécessite la mise en place d'opérations lourdes de décolmatage, consistant à retirer tout ou partie du substrat colmaté. Si ces opérations de maintenance permettent de retrouver les performances hydrauliques de l'ouvrage pour quelque temps, elles suppriment également la totalité de la couverture biologique, affectant alors certains des processus épuratoires (Knowles *et al.*, 2011), sans oublier les quantités importantes de matériaux à gérer. C'est pourquoi il est nécessaire d'optimiser les systèmes d'infiltration, et pour cela, améliorer la compréhension des mécanismes de colmatage, trop longtemps traités comme une "boîte noire", est aujourd'hui indispensable.

I.2 Quel modèle pour le support d'infiltration ?

Avant d'aborder les mécanismes du colmatage, il convient dans un premier temps de décrire plus précisément la couche superficielle des bassins, support de l'infiltration. Cette couche de plusieurs centimètres d'épaisseur est en effet une matrice complexe résultant de la construction et du mode de fonctionnement de l'ouvrage, elle est par conséquent composée de matières très diverses :

- du sol naturel sur lequel est construit l'ouvrage ;
- des matériaux importés lors de la construction pour faciliter l'infiltration et le traitement des eaux, le plus souvent du sable calibré ;

- des particules minérales et organiques provenant des surfaces érodées/lessivées par l'eau qui s'infiltré ;
- de la matière organique résultant des apports de la végétation se développant autour/dans les ouvrages, et du développement biologique intrinsèque au bassin.

Le support d'infiltration est donc un assemblage plus ou moins hétérogène de l'ensemble de ces particules solides (organiques et minérales), et d'espaces inter-particulaires remplis d'air et/ou d'eau. Il peut ainsi être qualifié de **milieu poreux**.

Ce support, de plusieurs centimètres d'épaisseur, est ainsi issu du mélange complexe entre les matières en suspension dans l'eau d'infiltration qui sédimentent, le sable calibré importé et le sol sous-jacent. Il possède toutefois un grand nombre des caractéristiques **d'un sol** (Duchaufour, 1995): c'est une interface, il est triphasique (solide/liquide/air), c'est une matrice poreuse à travers laquelle l'eau s'écoule sous l'effet de la gravité, il peut subir des variations de teneur en eau, se structurer par agrégation, il abrite de la faune et est le support de croissance de végétaux. Cependant, ce support d'infiltration, issu de la superposition d'une couche provenant de mécanismes de sédimentation sur un support solide (sable et sol), évolue rapidement, en quelques mois ou années d'exploitation des ouvrages, alors qu'il faut plusieurs milliers d'années dans le cas d'un sol « naturel ». Aussi est-il difficile de trancher entre les termes « **sol** » et « **sédiment** ».

La dénomination de cette couche est un problème récurrent puisqu'on retrouve différents termes dans la littérature : certains auteurs parlent effectivement de sol (Lin *et al.*, 2008; Arye *et al.*, 2011), alors que d'autres sont plus général en évoquant uniquement le « milieu d'infiltration » (Brissaud *et al.*, 1989) ou la « couche de surface » qu'ils opposent au « milieu sous-jacent » (Dechesne *et al.*, 2004). D'autres ont choisi d'adopter un terme plus précis, comme « technosol » lorsqu'il s'agit de qualifier des matrices soumises à des apports urbains fortement anthropisés (Badin *et al.*, 2009a). Le terme employé correspond finalement à la discipline par laquelle les auteurs abordent leur étude, et que l'important est de l'explicitier au départ. Dans le cadre de cette thèse aux composantes multidisciplinaires (microbiologie, hydrologie, hydrogéologie, écologie), il est difficile de qualifier la couche superficielle des bassins par un terme unique. Ainsi, pour la décrire, nous utiliserons indifféremment les notions de « **support d'infiltration** »,

« milieux poreux » ou de « sédiments ». Le premier terme est très général, le second permet d'insister sur les caractéristiques physiques du milieu, le troisième permet d'insister à la fois sur la dynamique et les mécanismes de formation de la couche superficielle, *via* l'accumulation de particules en suspension. Le terme « sol » sera quant-à-lui utilisé pour décrire le milieu sous-jacent.

I.3 Propriétés physiques des milieux poreux

Le support d'infiltration est avant tout un milieu poreux. Deux paramètres clés permettent de le caractériser : sa texture et sa structure. Ces paramètres vont conditionner l'ensemble de ses propriétés physico-chimiques et hydrauliques, en particulier ses propriétés de conduction hydrodynamiques (Hillel, 1998).

I.3.1 Texture

La texture, ou granulométrie correspond à la répartition quantitative des différentes particules par catégorie de taille, indépendamment de la nature, de la composition physico-chimiques ou de l'organisation des minéraux (Duchaufour, 1995). La plupart du temps, ces particules sont assimilées à des sphères, leur taille correspond donc à leur diamètre équivalent. Leur classification est précisée dans le Tableau 1.

Millimeters (mm)	Micrometers (μm)	Phi (ϕ)	Wentworth size class	Rock type
4096		-12.0	Boulder	Conglomerate/ Breccia
256		-8.0	Cobble	
64		-6.0	Pebble	
4		-2.0	Granule	
2.00		-1.0		
1.00		0.0	Very coarse sand	Sandstone
1/2	0.50	1.0	Coarse sand	
1/4	0.25	2.0	Medium sand	
1/8	0.125	3.0	Fine sand	
1/16	0.0625	4.0	Very fine sand	
1/32	0.031	5.0	Coarse silt	Siltstone
1/64	0.0156	6.0	Medium silt	
1/128	0.0078	7.0	Fine silt	
1/256	0.0039	8.0	Very fine silt	
0.00006	0.06	14.0	Clay	Claystone

Tableau 1 : Classification des particules, d'après Wentworth (1922).

La fraction fine (< 3.9 µm) est communément et improprement appelée "argile" car elle comporte également d'autres minéraux. A partir des différents pourcentages de chacune des classes de particules, on peut définir précisément la texture du milieu poreux, et donc certaines de ses propriétés. Le triangle des textures [Figure 5] est alors communément utilisé.

Concernant les différentes classes de particules, il faut noter que chaque classe possède des propriétés physico-chimiques qui diffèrent. A titre d'exemple, les sables ont des surfaces spécifiques et des activités physico-chimiques relativement réduites, mais les textures sableuses sont particulièrement adaptées pour l'infiltration car fortement perméables. En revanche, les milieux de texture argileuse possèdent une réactivité chimique importante, avec de larges surfaces spécifiques pour l'adsorption de certains composés. En revanche, ils possèdent de mauvaises propriétés conductrices car ils sont peu perméables, et très mal aérés.

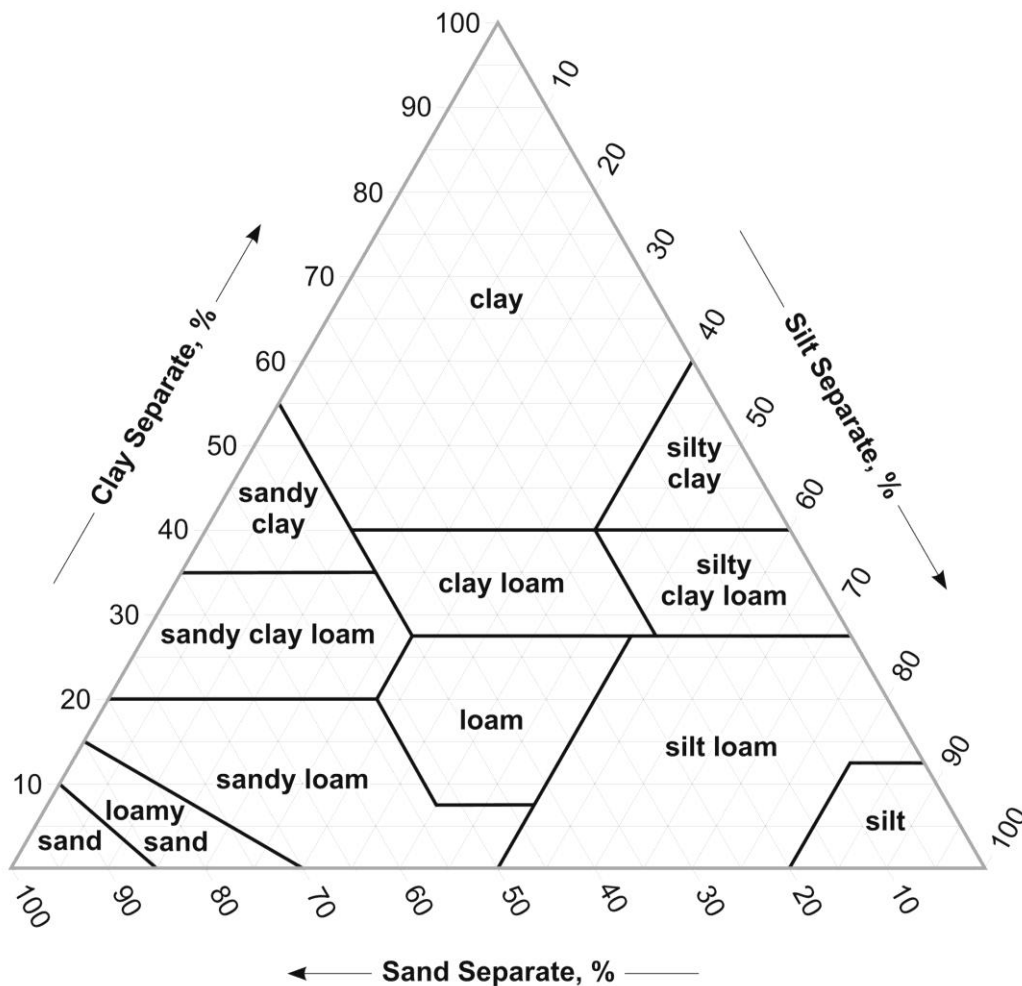


Figure 5 : Triangle des textures de Tavernier et Maréchal (Richer de Forges et al., 2008; USDA, 2014)

I.3.2 Structure

La structure correspond à l'arrangement de ces particules solides et des vides dans l'espace. Elle prend en compte à la fois la porosité et la connectivité entre les pores (Miyazaki *et al.*, 1993; Hillel, 1998). Contrairement à la texture, c'est un critère dynamique qui décrit plusieurs propriétés physiques du milieu poreux, telles que l'aération, ou les capacités conductrices (Kay et Angers, 2000).

Le mode d'organisation des particules découle en large partie de la distribution granulométrique du milieu puisque le remplissage de l'espace et la proportion de vides varient selon la proportion de particules fines par rapport aux particules grossières. Il dépend aussi de la nature des constituants, notamment leur composition minéralogique car la structuration résulte de différents processus (physico-chimiques, biologiques, mécaniques, etc.) faisant intervenir par exemple les propriétés des argiles. Texture et nature des constituants vont donc conditionner la **porosité** et la stabilité du milieu (Kay et Angers, 2000).

Toutefois, indépendamment de ces deux paramètres, la structure d'un milieu poreux répond également à des variations naturelles de température, d'apports en eau, de matière organique ou de croissance végétale, et à des variations artificielles comme la compaction mécanique, ou encore les conditions hydriques. Tous ces paramètres agissent notamment sur **l'agrégation**.

I.3.2.1 Porosité

Les pores correspondent aux vides au sein du milieu poreux, c'est-à-dire aux espaces entre les particules pouvant être remplis par de l'air et/ou de l'eau (Baver, 1963) C'est la granulométrie et l'agencement des particules qui vont déterminer la forme et la continuité du réseau poral, autrement dit *la taille des pores* et la *connectivité entre les pores* (Kay et Angers, 2000). Les processus d'écoulement s'opèrent à travers les porosités du milieu et dépendent donc de ces deux paramètres :

(i) La taille des pores : Selon leur taille, les pores ont différentes propriétés concernant les transferts/rétentions d'eau (Kay et Angers, 2000). Dans la littérature (Thomasson, 1978; Kay et Angers, 2000), ces tailles sont généralement regroupées par classe [Tableau 2, ci-après].

Classe	diamètres équivalents des particules
Macropores	> 75 μm
Mesopores	30 - 75 μm
Micropores	5 - 30 μm
Ultramicropores	0,1 - 5 μm
Cryptopores	< 0,1 μm

Tableau 2: Classification des tailles de pores (Soil Society of America, 1997)

En pratique, on distingue plutôt 3 classes selon leur comportement hydraulique :

- Les pores > 30 μm . Ils ont une influence majeure sur les propriétés conductrices du milieu (White, 1985), et sur son aération (Thomasson, 1978). En effet, ils correspondent à une « porosité de drainage » où les écoulements ont lieu rapidement. Ils se forment de différentes manières : lors du retrait de l'eau dans le milieu (dessiccation), par l'apparition de fissures, par la formation d'agrégats ou encore par l'activité biologique, notamment la bioturbation ou le développement des réseaux racinaires des plantes (White, 1985).
- Les pores < 30 μm . Ils sont décrits comme pores de « stockage », dans lesquels l'eau est retenue par capillarité. On parle de « porosité capillaire ». Les écoulements y sont très lents, et sont peu influencés par la teneur en eau du milieu. En revanche, ils sont fortement influencés par la teneur en matière organique, qui est en règle général corrélée positivement avec la porosité (White, 1985; Nemes *et al.*, 2005).

Remarque : ces pores servent d'habitats à de nombreux micro-organismes et à la meiofaune, et représentent également les stocks d'eau préférentiellement utilisés par les plantes (da Silva et Kay, 1997).

- Enfin, les pores < 0.1 μm . Ils restent le plus souvent remplis, et sont peu influencés par les variations de teneurs en eau ou en matière organique.

(ii) **La connectivité entre les pores.** Elle correspond à la continuité du réseau poral, autrement dit au nombre de connexion entre les pores. Cette continuité dépend du degré d'ouverture des pores (de Marsily, 1986) : on distingue les pores fermés, les pores ouverts en cul de sac, c'est-à-dire non communiquant à une extrémité, et les pores complètement communicants [Figure 6].

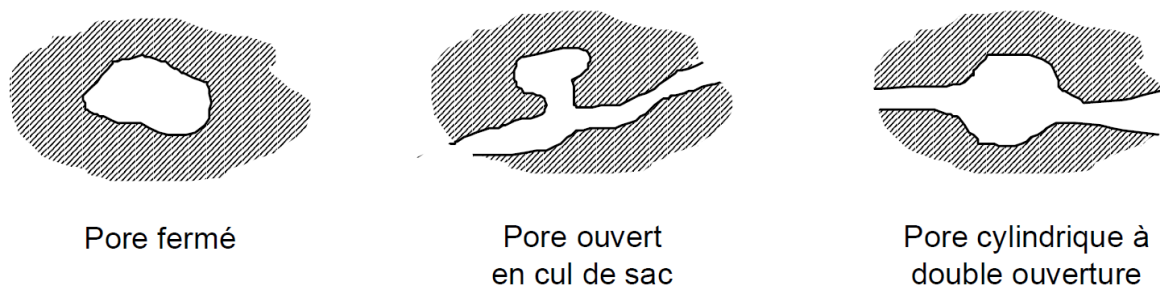


Figure 6 : Différents types de pores, d'après de Marsily (1986)

Selon la répartition de ces différents types de pores, le réseau est plus ou moins bien connecté [Figure 7]. Les processus d'écoulement dépendent également de la tortuosité du réseau poral, sa propriété à posséder de nombreuses courbes, à être « tordu ». Autrement dit, si on considère un fluide s'écoulant au sein d'un milieu poreux, la tortuosité du milieu est le caractère non rectiligne de la trajectoire qu'il a à parcourir.

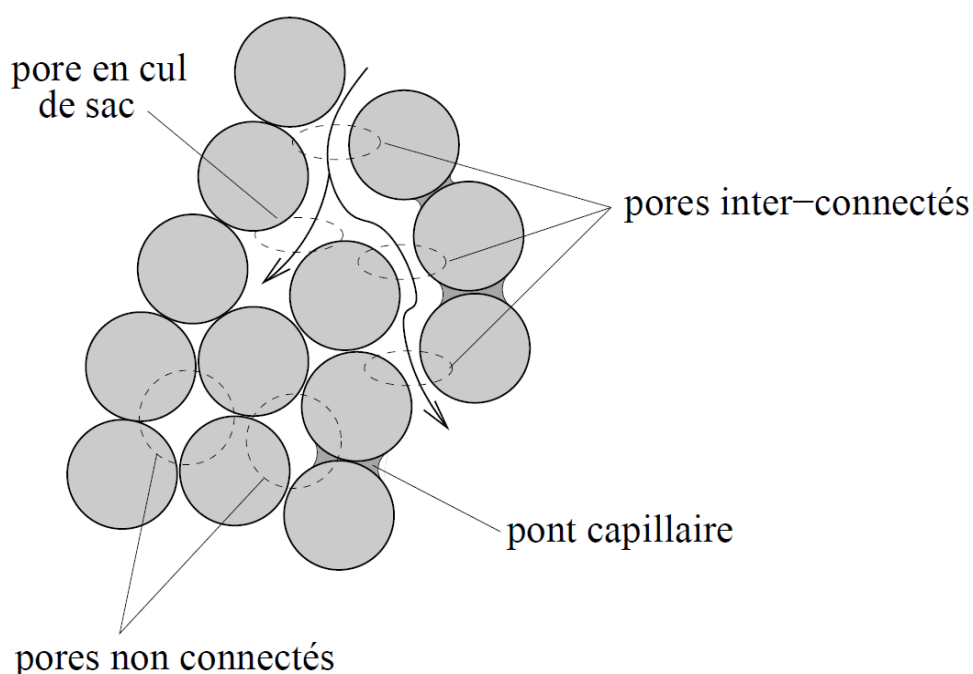


Figure 7 : Connexions entre pores dans un milieu poreux, les particules sont ici assimilées à des sphères (Lominé, 2007)

1.3.2.2 Agrégation

Un agrégat peut être défini comme un groupe de particules se formant naturellement, dans lequel les forces de maintien des particules entre elles sont beaucoup plus fortes que les forces entre les agrégats adjacents (Martin *et al.*, 1955). Autrement dit, c'est un

ensemble de particules qui forme une unité structurale stable (Kay et Angers, 2000), que l'on peut considérer comme une « particule plus grossière » [voir Figure 8].

Plusieurs facteurs agissent sur l'agrégation, tels que l'action de la faune ou des micro-organismes, le réseau racinaire des plantes, ainsi que certaines variables environnementales comme les conditions hydriques (Six *et al.*, 2004). Martin *et al.* (1955) ont proposé plusieurs mécanismes qualitatifs pouvant se combiner et agir sur l'agrégation :

- les organismes créant des liaisons entre les particules du milieu ;
- le matériel organique gélatineux encapsulant les particules et pouvant les maintenir ensemble *via* une action de cimentation ;
- les particules d'argile elles-mêmes qui se collent entre elles et peuvent également piéger d'autres particules telles que les grains de sable.

Tisdall et Oades (1982) ont complété ces premiers concepts en proposant une hiérarchisation qualitative de l'agrégation constituant la théorie actuelle, complétée par Six *et al.* (2004). Pour résumer, cette théorie explique les interactions entre la matière organique du sol et la formation d'agrégat par l'action de différents types « d'agents collants » (correspondant au matériel organique gélatineux de Martin *et al.* (1955)) qui agissent à différents niveaux hiérarchiques de l'agrégation. Aussi, deux types d'agrégats sont obtenus selon leur manière de se former : (i) les particules libres et les agrégats de taille $< 20 \mu\text{m}$ s'assemblent pour former des micro-agrégats (20 - 250 μm) ; (ii) ces derniers s'assemblent à leur tour pour former des macro-agrégats ($> 250 \mu\text{m}$). La taille et la forme des agrégats ont une grande influence sur la porosité (Martin *et al.*, 1955), donc sur les propriétés conductrices. Un milieu caractérisé par de nombreux macro-agrégats présentera par exemple une forte proportion de macropores (Dexter *et al.*, 1982).

La Figure 8 ci-après est un exemple de milieu poreux et d'arrangement complexe des différentes particules. Elle illustre l'ensemble des éléments structurels décrits dans cette partie : différentes classes de particules (argiles, limons, sable), macro et microporosités et agrégats.

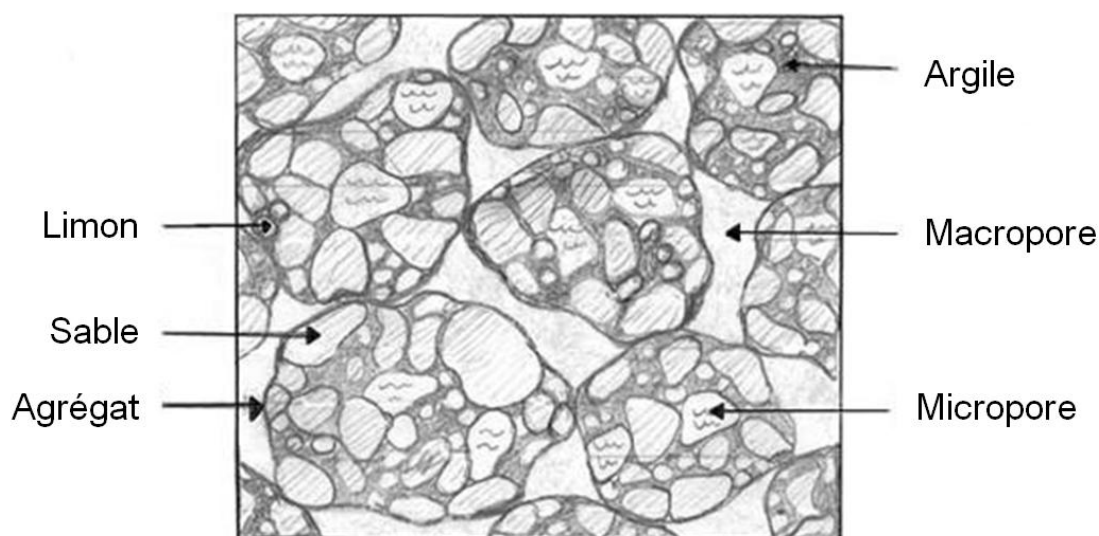


Figure 8 : Exemple d'arrangement de particules (d'après le ©Jardin botanique de Montreal (2014))

Le compartiment biologique joue un rôle important sur la structure, puisqu'il contribue d'une part à la formation d'agrégats organo-minéraux grâce aux mucilages qui servent d'agents stabilisant ; et d'autre part à des modifications structurales sous l'effet des macro-organismes qui créent des pores reconnaissables par des formes cylindriques et des surfaces courbes lisses. (racines, bioturbation) (Oades, 1993). Ces mécanismes seront développés dans les deuxième et troisième parties de ce chapitre.

I.4 Propriétés hydrodynamiques des milieux poreux

I.4.1 L'eau dans les milieux poreux

Les milieux poreux comprennent une phase solide (particules), une phase liquide (eau interstitielle) et une phase gazeuse. Le volume inter-particulaire occupé par les phases gazeuse et liquide sont appelés vides du milieu et occupent une certaine fraction volumique. Cette fraction est la porosité du milieu, elle peut être déduite de la masse volumique sèche et de la masse volumique apparente selon la formule suivante :

$$n = 1 - \frac{\rho_d}{\rho_s} \quad (\text{Eq. 1})$$

Où :

- La masse volumique spécifique (ρ_s) est définie comme la masse totale par unité de volume du milieu poreux. Elle est prise en moyenne comme 2650 kg.m⁻³ (2.65 g.cm⁻³) pour des milieux sableux (Hillel, 1998).

- La masse volumique sèche (ρ_d) est la masse de la phase solide par unité de volume :

$$\rho_d = \frac{m_s}{V_t} \quad (\text{Eq. 2})$$

La quantité de vides occupés par l'eau est caractérisée par la teneur en eau, massique ou volumique :

- La teneur en eau massique (w) correspond à la masse d'eau par unité de masse du milieu :

$$w = \frac{m_e}{m_t} \quad (\text{Eq. 3})$$

- La teneur en eau volumique (θ) correspond au volume d'eau par unité de volume :

$$\theta = \frac{V_e}{V_t} \quad (\text{Eq. 4})$$

L'eau occupe plus ou moins de vides selon son état énergétique. L'état énergétique, ou potentiel total de l'eau, se décompose en énergie potentielle, gravitaire et cinétique due à la vitesse de déplacement du liquide. Cette dernière, généralement faible dans les sols, est négligeable devant le terme d'énergie potentielle et gravitaire. On considère donc que ce terme suffit à décrire l'état énergétique de l'eau dans le milieu poreux, et on parle plus simplement de **potentiel hydrique** (ϕ_e). Le mouvement de l'eau dans la zone non-saturée est ainsi dû à la différence de potentiel total comprenant le potentiel hydrique et gravitaire. Le mouvement se produit dans la direction du point de plus haut potentiel vers le point de potentiel plus bas et est régi par l'équation de Darcy (Hillel, 1998).

Le potentiel hydrique prend en compte plusieurs composante : le potentiel matriciel, composé des forces capillaires et des forces d'adsorption ; le potentiel de pression, qui prend en compte la pression d'air, ou la pression hydrostatique des régions saturées du milieu poreux ; et le potentiel osmotique, déterminé par les différences en concentrations chimiques dans le milieu. L'ensemble du potentiel matriciel et du potentiel de pression est connu dans la pratique comme potentiel capillaire. La composante osmotique est quant-à-elle négligée dans le cadre de cette étude.

Rapporté par unité de poids d'eau, le potentiel hydrique donne la **charge hydraulique**, ou **pression d'eau** (h) du milieu :

$$h = \frac{\varphi_e}{g \cdot \rho_e} \quad (\text{Eq. 5})$$

Où ρ_e (g.m^{-3}) est la masse volumique de l'eau et g l'accélération de la pesanteur (m.s^{-2}). La charge hydraulique h s'exprime en m.

I.4.2 l'infiltration dans les milieux poreux

Les **capacités d'infiltration** d'un milieu poreux sont décrites par sa **perméabilité** (k), c'est à dire son aptitude à se laisser traverser par un fluide sous l'effet d'un gradient de pression. Plus un milieu est perméable plus le fluide s'écoulera vite. La **conductivité hydraulique** (K), ou coefficient de perméabilité, correspond au produit de la perméabilité avec plusieurs paramètres intrinsèques au milieu :

$$K = \frac{k \cdot \rho \cdot g}{\mu} \quad (\text{Eq. 6})$$

Où k est la perméabilité du milieu (m^2) ; ρ , la masse volumique du fluide (kg.m^{-3}) ; g , l'accélération de la pesanteur (m.s^{-2}) ; et μ , la viscosité dynamique du fluide ($\text{kg.m}^{-1}.\text{s}^{-1}$). L'unité de K est donc le m.s^{-1} .

La perméabilité est un paramètre hydrodynamique, qui dépend à la fois de la granulométrie et de la structure du milieu poreux, mais également de son degré de saturation en eau. La taille, la tortuosité et la continuité entre les pores agissent en effet sur les propriétés hydrauliques du milieu ; une porosité élevée favorise *a priori* la perméabilité. Cependant, seule compte la porosité fonctionnelle. En effet, beaucoup de pores correspondent à beaucoup de vides, mais sans connexion il n'y aura pas pour autant une perméabilité élevée [Cf Figure 7]. Par ailleurs la taille des pores conditionne aussi la perméabilité, des pores de petites tailles se traduisant par des perméabilités faibles, et vice-versa. C'est pourquoi on parle souvent de **porosité efficace ou de pore « hydrauliquement fonctionnel »** (ξ_m) pour décrire la porosité utile aux écoulements, quantifié par une taille caractéristique.

La conductivité hydraulique (comme la perméabilité) est une fonction strictement croissante du taux de saturation en eau du milieu: lorsque la teneur en eau augmente, le nombre de pores en eau augmente également, et plus de pores participent à l'écoulement. Lorsque le milieu est saturé, la teneur en eau et la conductivité hydraulique sont maximum. On parle alors de **teneur en eau à saturation (θ_s)** et de **conductivité hydraulique à saturation (K_s)**.

En conditions non saturées, l'eau n'occupe qu'une partie des vides et une fraction s'écoule tandis qu'une fraction reste liée aux particules du sol par capillarité (Haverkamp *et al.*, 2006). **La sorptivité capillaire (S)** traduit la capacité du sol à absorber l'eau par capillarité. Cette variable est également fonction de la teneur en eau (θ) (Haverkamp *et al.*, 2006).

Les processus d'écoulement non saturé sont en général difficiles à décrire quantitativement du fait des variations de l'état et de la teneur en eau du milieu pendant l'écoulement. Ces variations impliquent des relations complexes entre la teneur en eau, la capillarité et la conductivité (Hillel, 1998). Aussi, différents modèles mathématiques ont été développés pour déterminer et représenter les propriétés hydrodynamiques d'un milieu. Ces dernières sont décrites par les courbes caractéristiques **$h(\theta)$ et $K(\theta)$** , respectivement la courbe de rétention en eau et la courbe de conductivité hydraulique.

1.4.2.1 La courbe de rétention en eau $h(\theta)$

Dans un sol, la teneur en eau et la pression de l'eau varient simultanément. Aussi, cette relation $h(\theta)$ est très importante pour la description hydrodynamique de la phase liquide. Elle exprime les variations d'intensité des forces capillaires et d'adsorption en fonction de la teneur en eau. Les forces de capillarité et d'adsorption dépendent respectivement de la géométrie du réseau poral et de la surface spécifique des particules constituant le milieu poreux. Néanmoins, cette courbe n'est pas unique et peut montrer un comportement hystérétique, dépendant des infiltrations et exfiltrations (Haverkamp *et al.*, 2002).

Différentes expressions mathématiques ont été développées pour représenter la courbe $h(\theta)$. L'un des jeux d'équation utilisées dans la littérature est l'équation de

van Genuchten (1980) avec la condition de Burdine (1953) pour la courbe de rétention d'eau (Equations 7 et 7a) :

$$\frac{\theta - \theta_r}{\theta_s - \theta_r} = \left(1 + \left(\frac{h}{h_g} \right)^n \right)^{-m} \quad (\text{Eq. 7})$$

$$m = 1 - \frac{2}{n} \quad (\text{Eq. 7a})$$

Où h est la pression d'eau dans le milieu poreux ; h_g est le paramètre de normalisation en pression de van Genuchten; θ_r et θ_s sont respectivement les teneurs volumiques en eau résiduelle et à saturation ; m et n sont des paramètres de forme liés par la relation 7a. La teneur en eau résiduelle θ_r est généralement très faible et considérée nulle. La teneur en eau à saturation est souvent très légèrement inférieure à la porosité totale du milieu et peut dans certains cas atteindre cette porosité totale.

1.4.2.2 La courbe de conductivité hydraulique $K(\theta)$

Plusieurs modèles ont été développés pour déterminer la conductivité hydraulique relative d'un milieu poreux, le modèle de conductivité hydraulique relative de Burdine, combiné avec la courbe de rétention de van Genuchten permet d'obtenir une expression de conductivité hydraulique utilisée couramment : la relation de Brooks et Corey (1964) pour la courbe de conductivité hydraulique :

$$\frac{K(\theta)}{K_s} = \left(\frac{\theta - \theta_r}{\theta_s - \theta_r} \right)^\eta \quad (\text{Eq. 8})$$

Où θ_r et θ_s sont respectivement les teneurs volumiques en eau résiduelle et à saturation, K_s est la conductivité hydraulique à saturation et η est un paramètre de forme.

1.5 Les mécanismes de colmatage des milieux poreux supports de l'infiltration

Le colmatage induit et se définit comme une diminution de la perméabilité. Dans le cas des ouvrages d'infiltration, il résulte de mécanismes complexes, combinant des processus à la fois physiques, chimiques et biologiques (Baveye *et al.*, 1998).

I.5.1 Les processus physiques

Plus la granulométrie du support d'infiltration est petite, plus le milieu est capable de retenir les matières en suspension présentes dans l'eau qui s'infiltré. Ces particules sont piégées par des mécanismes physiques de filtration dans des pores de la matrice sédimentaire. Les particules les plus grossières s'accumulent superficiellement, les particules plus fines peuvent pénétrer plus profondément (Schälchli, 1992; Skolasińska, 2006; Lu *et al.*, 2011). Ainsi, le colmatage est dû en premier lieu à ce dépôt de particules en surface et dans les interstices du milieu (Schälchli, 1992; Langergraber *et al.*, 2003).

Si ce phénomène de sédimentation est naturel, il est amplifié dans les systèmes d'infiltration, car l'eau entrante y est souvent chargée de matières en suspension et le courant « vertical » favorise le transfert et le dépôt des particules. Il a par exemple été clairement montré que les bassins conçus pour la gestion des eaux pluviales étaient hydrauliquement impactés par l'accumulation de particules fines à la surface des sédiments (Winiarski *et al.*, 2006; Hatt *et al.*, 2008; Nogaro et Mermillod-Blondin, 2009).

I.5.2 Les processus chimiques

La géométrie des pores peut-être influencée par certaines propriétés chimiques des particules solides composant le milieu poreux, ou de l'eau qui s'infiltré. Le pH, le potentiel redox, de même que la composition minéralogique de la phase solide, ses caractéristiques de surface, et les réactions chimiques qui en découlent affectent la forme et la stabilité des pores et peuvent donc influencer la perméabilité du milieu (Baveye *et al.*, 1998).

Ces réactions chimiques comprennent la formation de précipités et l'adsorption de composés par la matrice solide du support d'infiltration (Knowles *et al.*, 2011). La précipitation des carbonates, par exemple, peut provoquer une cimentation des particules composant le support d'infiltration et ainsi diminuer sa perméabilité (Schuh, 1990; Heilweil et Watt, 2011). Elle est généralement causée par une augmentation du pH de l'eau, résultant de la consommation de bicarbonate liée à l'activité photosynthétique des algues se développant dans les bassins (Schuh, 1990). Dans le cas de bassins alimentés avec des eaux ayant lessivé des surfaces fortement anthropisées, on observe

également d'autres phénomènes de précipitations. On peut citer par exemple des précipités d'hydroxydes ferriques lorsque les conditions sont très oxydantes (Nivala et al., 2007) ou la précipitation de sulfures de fer, réaction d'origine microbienne, due à la réduction des sulfates en sulfures par les bactéries sulfato-réductrices en conditions anaérobies (Chabaud, 2007). De tels effluents sont également source de nombreux composés qui peuvent s'adsorber sur des particules du milieu poreux. A titre d'exemple, Les particules solides sous forme colloïdale possèdent généralement une grande surface spécifique pour l'adsorption des contaminants ; aussi elles jouent un rôle très important dans le piégeage et le transport de contaminants (McCarthy et Zachara, 1989; Grolimund et Borkovec, 2001). Les colloïdes proviennent principalement de la matrice support de l'infiltration (Baumann *et al.*, 2002), et leur mobilisation varie en fonction des paramètres initiaux du milieu (teneur en eau, force ionique, pH, débit) et de la taille des particules colloïdales mobilisées (Harmand *et al.*, 1996; Grolimund et Borkovec, 1999). Les colloïdes ne sédimentent pas par eux-mêmes mais peuvent se regrouper en agrégats (Sigg *et al.*, 2000) qui, eux, sédimentent et participent physiquement au colmatage.

I.4.3 Les processus biologiques

A ces processus physico-chimiques se cumulent des phénomènes biologiques, liés d'une part à l'accumulation des particules organiques apportées par l'eau d'infiltration, et d'autre part au développement intrinsèque d'un biofilm à l'interface eau-sédiment (Nguyen, 2001; Thullner *et al.*, 2002b; Mauclaire *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2009). Si initialement, la réduction du taux d'infiltration s'explique principalement par des mécanismes physiques de filtration des matières en suspension, sur le long terme, la croissance biologique sous la forme d'un biofilm peut devenir la cause dominante (Oberdorfer et Peterson, 1985; Wu *et al.*, 1997; Rinck-Pfeiffer *et al.*, 2000; Langergraber *et al.*, 2003). Les mécanismes de colmatage liés à la présence du biofilm seront développés dans la partie suivante.

Bien entendu, tous ces mécanismes interagissent entre eux et conduisent à la formation d'une couche colmatante au niveau du support d'infiltration (Baveye *et al.*, 1998; Bouwer, 2002; Knowles *et al.*, 2011). Cette couche est généralement fine, inférieure à 1 cm

dans le cas des systèmes alimentés avec une eau « propre », c'est-à-dire non issue du traitement des eaux usées ou du drainage de sols très pollués (Bouwer, 2002). C'est le cas par exemple des ouvrages conçus pour la recharge des nappes phréatiques. Elle peut atteindre plusieurs centimètres dans le cas de systèmes conçus pour le traitement secondaires des eaux usées, et alimentés avec des eaux très chargées (Siegrist, 1987) .

Enfin, bien que les mécanismes de colmatage des ouvrages d'infiltration aient été largement étudiés ces dernières années (Schuh, 1990; Baveye *et al.*, 1998; Rinck-Pfeiffer *et al.*, 2000; Bouwer, 2002; Le Coustumer, 2008; Knowles *et al.*, 2011; Lu *et al.*, 2011; Pavelic *et al.*, 2011); il apparaît difficile de distinguer la contribution exacte de chacun dans la réduction de perméabilité des supports d'infiltration, en particulier celle du compartiment biologique. En effet, les mécanismes de colmatage de surface sont décrits assez finement pour des processus purement physiques ou géochimiques, avec de nombreuses études (Herzig *et al.*, 1970; Reddi *et al.*, 2000; Hajra *et al.*, 2002; Van Der Lee *et al.*, 2003) concernant les mécanismes de filtration de particules (homogènes, non réactives et évolutives), mais les verrous scientifiques restent importants pour comprendre la contribution du compartiment biologique, notamment des biofilms, dans ces mécanismes.

II. Les biofilms, description et rôle dans le colmatage des bassins d'infiltration

II.1 Qu'est ce qu'un biofilm ?

Le terme biofilm décrit une matrice biologique constituée par un assemblage de cellules microbiennes et de polymères adhérent à une surface nommée **substrat**, au niveau d'une **interface**. Cette forme est le mode de développement préférentiel des micro-organismes dans l'environnement par rapport aux cellules individuelles dispersées (Costerton *et al.*, 1995; Flemming *et al.*, 2000; Flemming et Wingender, 2010). En effet, cette stratégie de développement leur permet d'une part de se protéger des stress inhérents à leur milieu, et d'autre part de faciliter les échanges et les interactions entre les organismes au sein de la structure (Jefferson, 2004; Flemming et Wingender, 2010; Smirnova *et al.*, 2010). Les stress peuvent par exemple être liés à des prédateurs (bactériophages) ou des agents biocides (Davies, 2003), à certaines forces physiques de cisaillement ou d'arrachement, ou à des changements brutaux des conditions environnementales, comme par exemple la dessiccation dans le cas d'un biofilm normalement immergé (Donlan et Costerton, 2002; Flemming et Wingender, 2010).

Les biofilms sont des structures ubiquistes, car retrouvées dans tous les environnements, même les plus extrêmes comme les déserts ou les montagnes (Gorbushina, 2007), au niveau d'interfaces de différentes natures : solide-air, liquide-air, liquide-liquide ou encore solide-liquide, et sur une multitude de supports tels que les sols, les roches, les réseaux de distribution, le matériel médical (prothèses, cathéters, etc.) et industriel, et même sur des substrats organiques comme le corps humain (Costerton, 1995; Wimpenny *et al.*, 2000; Filloux et Vallet, 2003; Hall-Stoodley *et al.*, 2004). Ils sont associés à des enjeux sanitaires et sociétaux importants puisqu'ils interviennent dans des domaines aussi variés que la médecine, l'industrie ou l'accès à l'eau potable [Figure 9].

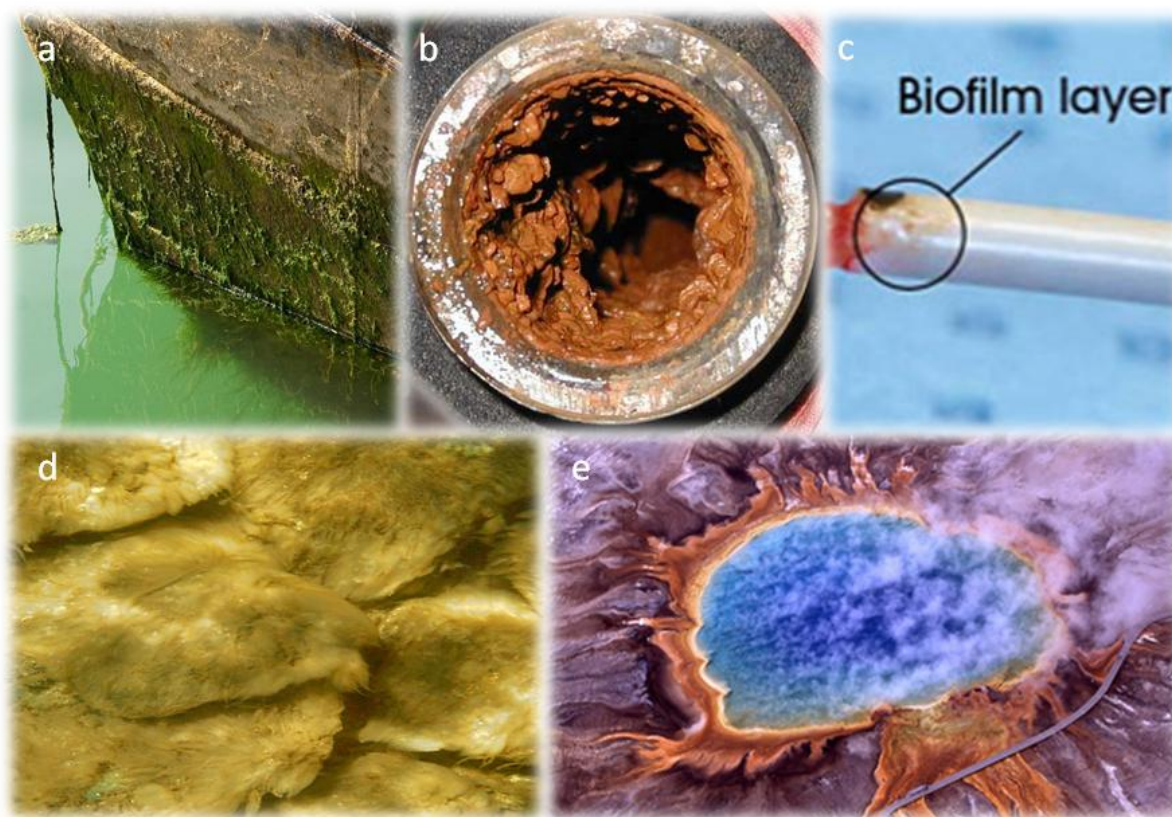


Figure 9 : Illustrations de biofilms développés dans différentes conditions et systèmes

Biofilm développé : (a) sur la coque d'un bateau (Twain, 2013), (b) dans un réseau de distribution d'eau potable (University of Alaska, 2014), (c) sur un cathéter médical (CathMatters, 2014), (d) dans un cours d'eau (Klamath Water Quality, 2012) et (e) sur les surfaces en contact avec une source d'eau chaude (NPS Photo, 2001).

Aussi, le terme « biofilm » est employé de manière générique et désigne des structures très hétérogènes, variant d'une organisation planaire (monocouche de cellules), à des architectures tridimensionnelles complexes de dimensions macroscopiques (Wimpenny *et al.*, 2000). Le type de structure dépend notamment des micro-organismes présents, de la nature du substrat et des conditions environnementales. A titre d'exemple, une étude a montré que dans des conditions d'écoulement laminaire, la structure d'un biofilm immergé était fragmentée, composée de groupes de cellules plus ou moins circulaires séparés par des vides, alors que le même biofilm placé en conditions d'écoulement turbulent présentait une structure en banderoles allongées (Stoodley *et al.*, 1999). Face à l'hétérogénéité des structures existantes, il faut retenir que les biofilms sont toujours organisés autour de deux composantes principales : **les micro-organismes** qui les composent d'une part, et **la matrice polymérique** dans laquelle ils vivent d'autre part (Characklis et Marshall, 1990).

II.1.1 Les micro-organismes

Les biofilms environnementaux sont composé d'une ou plusieurs espèces de micro-organismes. Ces derniers sont très variés; ils peuvent être unicellulaires ou pluricellulaires, et appartenir à différents niveaux trophiques, notamment (Wetzel, 1983; Lock, 1993) :

- des producteurs primaires comprenant notamment des organismes phototrophes eucaryotes (« micro-algues ») et des phototrophes procaryotes (cyanobactéries),
- des décomposeurs, organismes hétérotrophes tels que les bactéries ou les champignons.

Du fait de la présence de ces différents niveaux trophiques, cet ensemble formé par les organismes enchevêtrés dans une matrice confère aux biofilms un statut de microcosme fonctionnel, siège d'intenses interactions mono et plurispécifiques, et d'une importante communication entre les différentes cellules (Flemming et Wingender, 2010). Les micro-organismes y entretiennent entre eux des relations bénéfiques et/ou compétitives. Ces propriétés ont amené certains généticiens à comparer les biofilms à des « organismes multicellulaires » (Pratt et Kolter, 1999).

Les biofilms peuvent par ailleurs abriter de manière transitoire des macro-organismes tels que des larves d'insectes ou des vers oligochètes.

II.1.2 La matrice polymérique

La matrice est un matériel extracellulaire sécrété par les organismes eux-mêmes. Elle peut représenter plus de 90% en masse de la globalité du biofilm (Flemming et Wingender, 2010). Elle est majoritairement composée d'eau, à laquelle s'ajoutent des exopolymères, c'est-à-dire des polysaccharides, des protéines, des acides nucléiques, ainsi que du matériel détritique et des particules minérales en proportions variables (Kostel *et al.*, 1999; Flemming, 2011).

La Figure 10 illustre les différentes composantes de la matrice et l'organisation du biofilm sur son substrat.

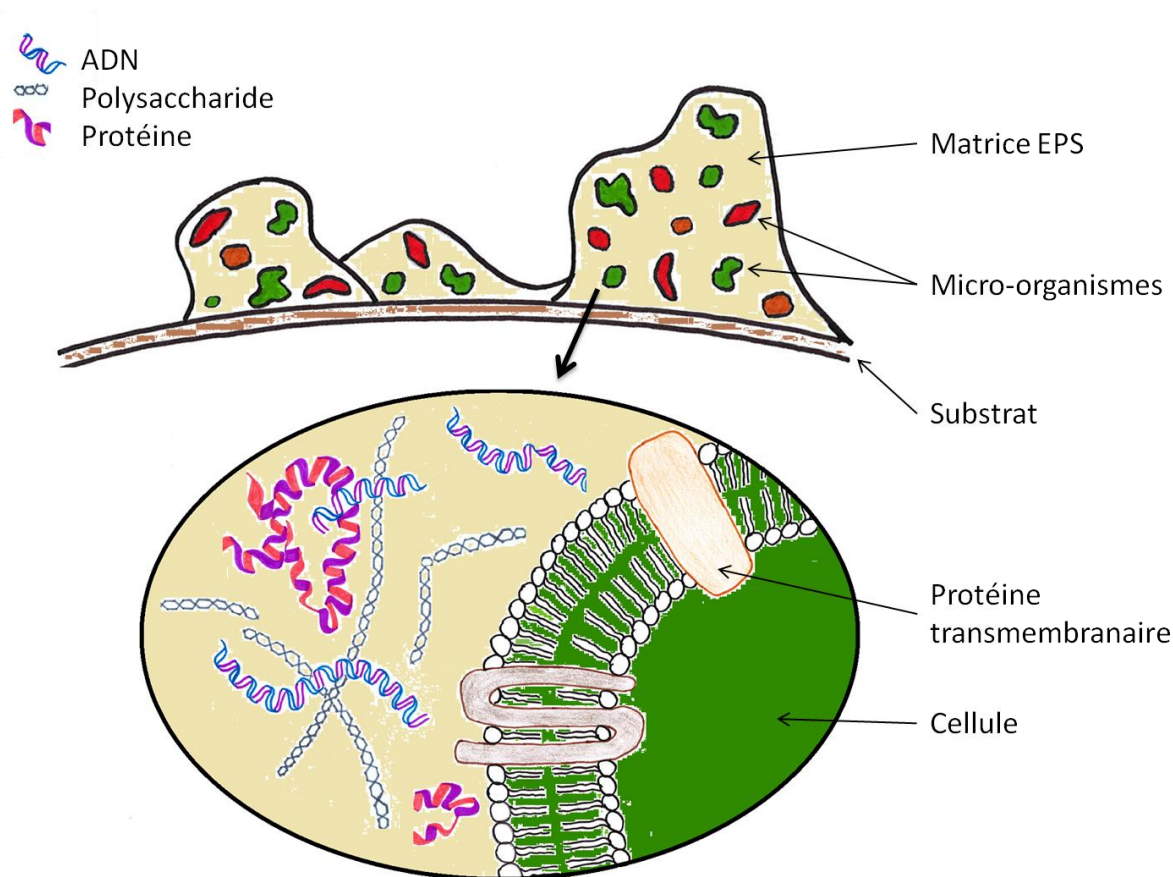


Figure 10 : Zoom sur la matrice polymérique du biofilm et ses composantes

Les exopolymères ou « Extracellular Polymeric Substances » (EPS) sont des macromolécules de masse moléculaire élevée, sécrétées par les cellules microbiennes (Decho et Lopez, 1993). Ce sont pour la plupart des polysaccharides, qui contribuent au conditionnement de la surface à coloniser ce qui facilite l'adhésion des cellules pionnières (bactéries). Ils ont par la suite deux fonctions : l'accrochage de nouveaux micro-organismes et la cohésion de l'ensemble. Ils forment ainsi le squelette de l'architecture tridimensionnelle du biofilm (Flemming et Wingender, 2010).

Les EPS se présentent sous deux formes (Vandevivere et Baveye, 1992; Decho et Lopez, 1993) :

- Des EPS intimement associés à la surface des cellules du biofilm et formant une enveloppe appelée « capsule » [Figure 11]
- Des EPS sécrétés dans la matrice et entourant les cellules de manière plus grossière formant un « slime », sorte de « filament gluant » qui assure la cohésion entre les différentes cellules.

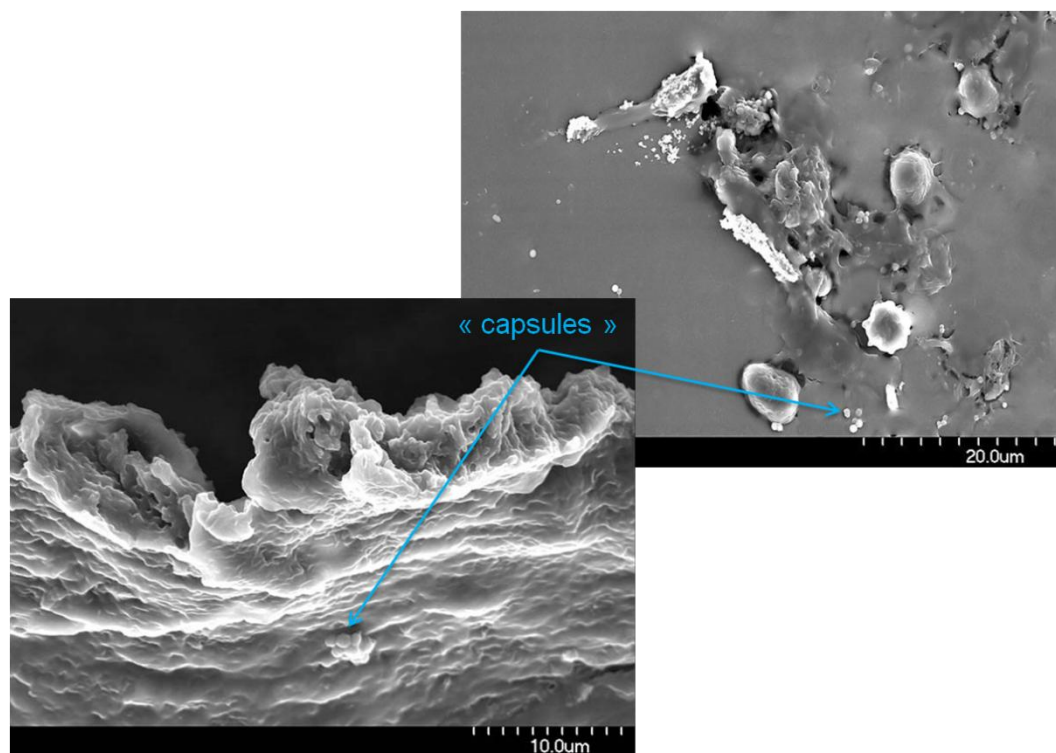


Figure 11 : Images au microscope SEM de la matrice polysaccharidique, d'après ©Bacteria-world (2014)

En plus d'assurer sa cohésion, la composition de la matrice EPS détermine de nombreuses propriétés du biofilm comme sa résistance aux forces de cisaillement ou aux frottements, son élasticité ou ses capacités de sorption (Zhang et Bishop, 2003). En effet, la matrice représente un microenvironnement spécifique pour l'adsorption de différents types de matières organiques, grâce notamment aux exopolymères qui contiennent de nombreux ligands pouvant piéger les composés organiques (Decho et Lopez, 1993; Delolme *et al.*, 2011; Causse *et al.*, 2013). Cette adsorption fournit un réservoir de nutriments qui peuvent être hydrolysés en monomères sous l'action d'enzymes et assimilés par les cellules microbiennes de la matrice. Certains cations métalliques peuvent également être adsorbés, le piégeage ou le relargage d'éléments étant alors régulé par des phénomènes de surface (complexation) ou des échanges ioniques entre la colonne d'eau et la matrice polymérique (Fein *et al.*, 2001; Causse, 2009). Enfin, la matrice agit également comme un centre de recyclage en maintenant l'ensemble des composants des cellules lysées disponibles, ce qui concentre les nutriments et évite toute carence (Flemming et Wingender, 2010).

Au-delà de leurs différences structurelles, les biofilm peuvent également présenter des hétérogénéités considérables en termes d'environnements physico-chimiques. (Zhang *et*

al., 1998; Okabe *et al.*, 1999). En effet une grande variété de conditions micro-environnementales se créent au sein de la matrice du fait des gradients imposés par l'épaisseur du biofilm (oxygène, lumière), qui sont autant d'habitats différents pour les micro-organismes. A titre d'exemple, on peut retrouver à la fois des zones aérobie et anaérobie.

II.2. La structure de biofilms phototrophes

Dans les écosystèmes aquatiques, les micro-organismes s'agrègent sur des supports de nature organique comme les macrophytes, ou minérale comme les sédiments, créant une interface entre le substrat et la colonne d'eau (Costerton, 1995; Salant, 2011). Lorsque les conditions de lumière et nutriments sont réunies, les biofilms développés sont alors constitués d'une forte composante photo-autotrophe, qui leur confère une coloration variant du vert au brun et un aspect plus ou moins filamenteux.

Dans le cas des milieux lotiques (cours d'eau), les communautés fixées sur les galets sont communément désignées sous le terme de « périphyton » (Graham, 1990; McCormick et Stevenson, 1991; Biggs *et al.*, 1998). Elles dépendent de la stabilité du substrat et sont fortement influencées par les conditions d'écoulement et les forces de cisaillement en découlant (Jowett et Biggs, 1997; Biggs *et al.*, 2005). Néanmoins, ces paramètres hydrodynamiques n'interviennent pas dans le cas des systèmes lenticques. Pour ces derniers, les biofilms exposés à la lumière sont plutôt qualifiés de « algal mat » dans la littérature (Katznelson, 1989; Stolz, 2000; Noffke *et al.*, 2003; Roeselers *et al.*, 2008; Serôdio *et al.*, 2009), car ils se présentent sous la forme d'une couverture biologique dense et stratifiée : la couche superficielle est dominée par les organismes phototrophes, puis l'intensité lumineuse décroît avec la profondeur créant un gradient lumineux qui restreint les photo-autotrophes dans les couches intermédiaires. Plus en profondeur dans le milieu sous-jacent, le biofilm se compose d'organismes hétérotrophes (Roeselers *et al.*, 2008). Aussi, les gradients verticaux de lumière, conditions redox et chimiques qui s'établissent sont responsables de cette stratification des communautés microbiennes.

Dans les bassins d'infiltration, les communautés microbiennes forment souvent de telles couvertures biologiques où les composantes phototrophes sont clairement présentes

[Figure 12]. Aussi, je parlerai dans la suite de ce document de **biofilm phototrophe** ou **biofilm algal**, ou encore de **biofilm benthique**. Les deux premiers termes rappellent la forte composante algale et le dernier permet d'insister sur la notion d'interface entre colonne d'eau et sédiment.

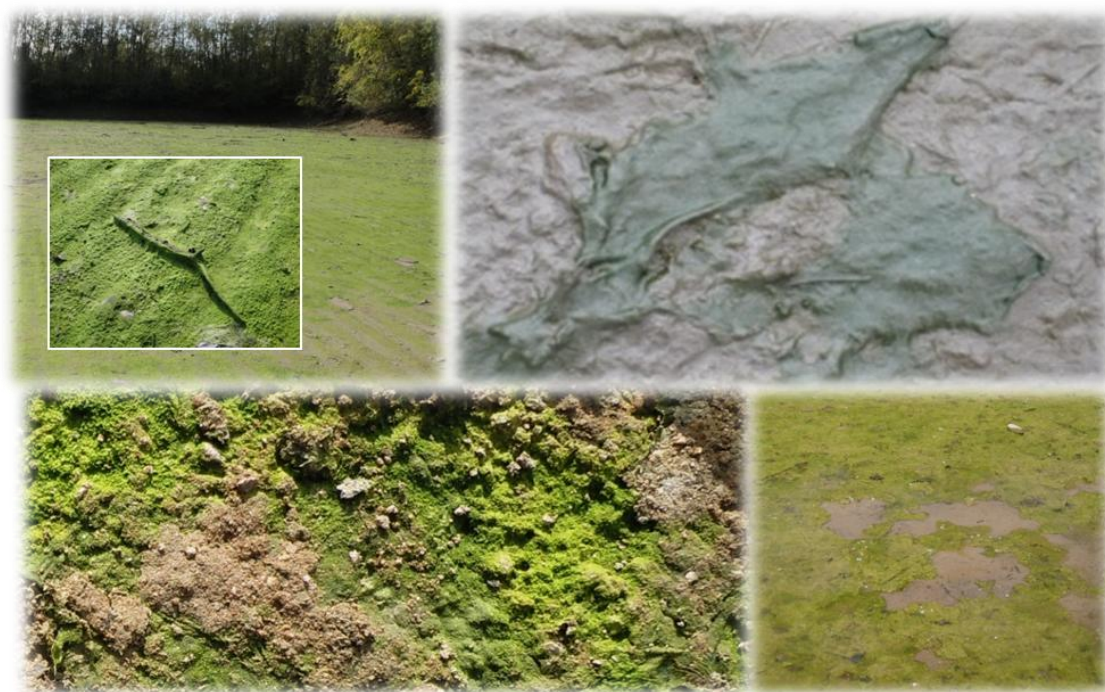


Figure 12 : Plusieurs biofilms développés dans des bassins d'infiltration lyonnais (source : LEHNA/IPE)

Globalement, les bactéries dominent en nombre dans de tels biofilms. Toutefois, si on ne s'intéresse qu'aux communautés phototrophes développées dans les milieux lenticques, elles sont généralement dominées par les bacillariophytes, plus communément appelées diatomées, les chlorophytes ou algues vertes, ainsi que par les cyanophytes ou cyanobactéries (Goldsborough et Robinson, 1996). Ces dernières étaient autrefois désignées sous le terme d'algues bleues-vertes car longtemps assimilées à des algues d'un point de vue fonctionnel, mais ce sont en réalité des procaryotes photosynthétiques qui appartiennent au domaine des bactéries. Les algues vertes sont le plus souvent représentées sous forme filamenteuse dans les biofilms benthiques (Goldsborough et Robinson, 1996). Enfin, on peut également y retrouver occasionnellement des algues vertes sous forme unicellulaire, des algues rouges ou rhodophytes, des algues dorées ou chrysophytes, ou encore des cryptophytes, des euglènes ou des dinophytes (Goldsborough et Robinson, 1996; Lowe, 1996). Ces différents organismes peuvent être présents sous forme uni ou pluricellulaires, mobiles ou fixés (Roeselers *et al.*, 2008). La

Figure 13 illustre quelques une des espèces algales observées dans des sédiments de bassins d'infiltration.

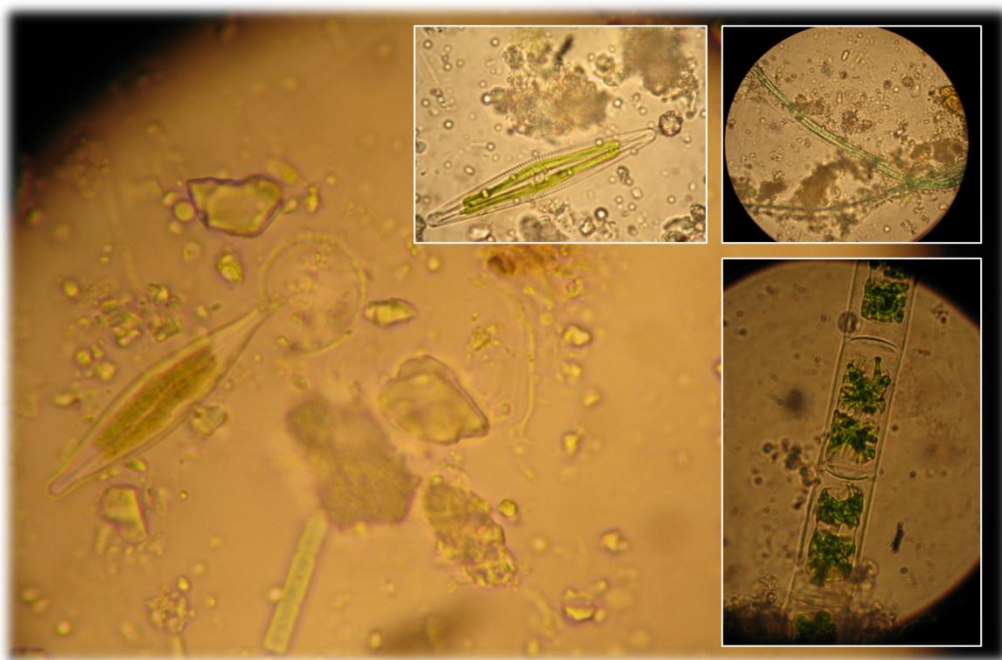


Figure 13: Observation de micro-algues benthiques de sédiments de bassins d'infiltration. Images obtenues par microscopie en lumière blanche, grossissement 10^3 .

II.3 Facteurs influençant les biofilms phototrophes

Le développement des biofilms est un processus séquentiel complexe qui fait intervenir de nombreux mécanismes physiques, chimiques et biologiques. La première étape est le conditionnement du substrat à coloniser par les organismes « pionniers », qui s'attachent à la surface à l'aide d'appendices générateurs de mouvements. D'autres organismes viennent ensuite s'associer jusqu'à former un assemblage stable (O'Toole et Kolter, 1998; Filloux et Vallet, 2003). Je ne détaillerai pas plus longuement les étapes de la formation d'un biofilm, mais retiendrai simplement qu'elles sont gouvernées par de nombreux facteurs (Ahimou *et al.*, 2007), recensés dans le Tableau 3 ci-après.

Traits biologiques des espèces composant le biofilm	<p>Génotype et phénotype spécifiques de l'organisme</p> <p>Expression des gènes codant pour les propriétés de surface</p> <p>Formation des EPS</p> <p>Dynamique de développement des organismes (taux de croissance spécifique, période de latence, affinité avec le substrat, etc.)</p>
------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Facteurs physico-chimiques	Type d'interface de colonisation Composition et rugosité du substrat Disponibilité des nutriments Température, pH, Taux d'humidité, Pression Demande et disponibilité en oxygène
Processus stochastiques	Colonisation initiale : attachement/détachement Changement aléatoires dans les facteurs biotiques et abiotiques
Phénomènes déterministes	Interactions spécifiques entre les organismes : Compétition, neutralisme, coopération et prédation
Procédés mécaniques	Cisaillement dû aux conditions d'écoulement, abrasion, etc.
Import-export	Ajout ou retrait d'un composant dans la structure du biofilm, comme des particules minérales de sable ou d'argile, des composés détritiques, etc. Décollement de la biomasse Libération de cellules individuelles
Changements temporels	Changement périodique de l'environnement biotique, diurne ou annuel (implique des changements de lumière, température, pH)

Tableau 3 : Facteurs influençant le développement des biofilms, d'après Wimpenny et al. (2000)

Dans le cas des biofilms phototrophes, les principaux facteurs environnementaux conditionnant le développement des organismes sont la lumière, la disponibilité des nutriments et la température, auxquels s'ajoutent des interactions avec les autres organismes telles que la prédation ou la compétition (Stevenson *et al.*, 1996). Ces interactions seront plus longuement évoquées dans la partie suivante concernant les macro-organismes. La stabilité du substrat est ici secondaire puisque le support de colonisation est stable, et les forces de cisaillement liées au courant sont quasi inexistantes dans les systèmes lotiques.

II.3.1 La lumière

Certainement le facteur le plus important dans le cas des biofilms phototrophes, elle constitue une ressource indispensable qui permet la présence du compartiment algal au sein du biofilm. Hill (1996) parle d'ailleurs de variable fondamentale pour les

phototrophes benthiques. L'augmentation de l'éclairement entraîne une stimulation de la production primaire. Cette relation entre l'intensité lumineuse et la photosynthèse ne suit pas une relation linéaire mais se caractérise par une corrélation positive pour des gammes d'intensité lumineuse comprises entre 40 et 400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}\text{PAR}^5$, et par un effet inhibiteur dans le cas d'une trop forte intensité lumineuse, généralement pour des valeurs $> 600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}\text{PAR}$ (Hill, 1996).

Les changements quantitatifs ou qualitatifs de lumière dus aux variations environnementales représentent les variables les plus déterminantes dans la croissance, la physiologie et la structure des communautés algales benthiques. Ces variations peuvent avoir des causes multiples (Hill, 1996; Findlay et Watling, 1998) :

- « l'auto-ombrage » dû aux communautés elles-mêmes, compressées entre-elles,
- le couvert végétal, et notamment les macrophytes, terrestres ou aquatiques,
- l'atténuation lumineuse et l'effet filtre (changement de longueur d'onde) par la colonne d'eau, liés à la profondeur d'immersion du substrat colonisé,
- l'atténuation lumineuse au sein de la colonne d'eau, liée au phytoplancton et aux particules solides en suspension (turbidité),
- les variations saisonnières.

La lumière est donc une composante clé dans la structuration des communautés benthiques et dans les interactions entre les différents phototrophes. Elle conditionne le caractère de producteur primaire des biofilms phototrophes et confère ainsi des impacts sur l'ensemble du réseau trophique (Dodds *et al.*, 1996a; Hill, 1996). Par ailleurs, Roeselers *et al.* (2007) ont suggéré que l'influence de l'intensité lumineuse était plus importante durant la phase initiale du développement du biofilm. Ils ont en effet observé, que sous de fortes intensités lumineuses, les espèces colonisatrices sont majoritairement des algues. Enfin, il faut noter que dans le cas des biofilms benthiques, la lumière doit être considérée à deux échelles : le gradient lumineux décroissant avec la profondeur de la colonne d'eau, et au sein du sédiment (Goldsborough et Robinson, 1996). En effet l'auto-ombrage dû à la stratification verticale des biofilms phototrophes semble jouer un rôle important dans la répartition des espèces algales. A titre d'exemple,

⁵ PAR : de l'anglais, Photosynthetically Active Radiation

dans la partie superficielle recevant le plus fort taux de lumière, ce sont généralement les algues vertes filamenteuses qui prospèrent (Hill, 1996).

II.3.2 Les nutriments

Les nutriments organiques et inorganiques (C, N, P) sont indispensables au développement des biofilms mixtes, c'est-à-dire des biofilms comprenant non seulement une composante autotrophe vis-à-vis du carbone mais également une composante hétérotrophe vis-à-vis de ce même élément. Ainsi, si le biofilm peut exister même en l'absence de lumière, en adaptant sa composition à un comportement hétérotrophe, les éléments nutritifs sont eux indispensables à son développement.

Le carbone est l'élément majeur de tous les constituants du vivant : glucides, lipides, protides, acides nucléiques, etc. Si la composante autotrophe du biofilm peut utiliser le carbone inorganique présent dans l'eau (CO₂ dissous), la disponibilité en carbone sous forme organique est un facteur clé pour la croissance de sa composante hétérotrophe. Stoodley *et al.* (1999) ont par exemple montré qu'en augmentant d'un facteur 10 les apports en carbone organique sous forme de glucose chez un biofilm déjà établi, les micro-communautés passaient d'une structure de fines « bandelettes » à de larges monticules.

Les éléments nutritifs inorganiques comme l'ammonium, les nitrates, phosphates et silicates sont nécessaires à l'ensemble des micro-organismes du biofilm (autotrophes et hétérotrophes) et servent à leur croissance et au bon fonctionnement des mécanismes cellulaires. Les principales composantes de ces mécanismes sont les protéines, en particulier les enzymes, composées en grande partie d'azote (issu des nitrates). Ainsi, une limitation de cet élément peut affecter un certain nombre de processus cellulaires comme la photosynthèse ou la synthèse des protéines (Berges *et al.*, 1996). Le phosphore (issu des phosphates) est essentiel à la croissance cellulaire puisqu'il est l'un des principaux constituants de diverses molécules comme les lipides, composantes essentielles des membranes cellulaires. Il est également impliqué dans le transfert de l'énergie et le métabolisme cellulaire, ainsi que dans la photosynthèse (Iglesias *et al.*, 1993). Enfin, les silicates sont utilisés par les diatomées pour la construction de leur squelette externe siliceux (Lippemeier *et al.*, 1999). Ainsi, dans un environnement

caractérisé par de fortes concentrations en nutriments et en l'absence d'autres contraintes, le biofilm tend à devenir plus épais et plus dense par rapport à un environnement pauvre en nutriments (Characklis et Marshall, 1990).

II.3.3 La température

Concernant les différences verticales de température dans la colonne d'eau, ces effets sur la croissance microbiennes peuvent être importants, notamment dans les lacs, mais dans le cadre des ouvrages d'infiltration, généralement peu profonds (<2m), ces effets sont considérés comme négligeables (Goldsborough et Robinson, 1996). En revanche, les bassins sont sujets aux variations journalières et saisonnières de température pour les mêmes raisons. Ce paramètre va principalement influencer la croissance du biofilm puisqu'il agit sur les cinétiques des réactions biochimiques, notamment les activités enzymatiques incluant la dégradation de la matière organique (Stevenson et al., 1996). Il peut aussi influencer sur la richesse spécifique des communautés : il a été montré que la richesse spécifique du biofilm était réduite pour des températures supérieures à 30°C. (DeNicola, 1996).

II.4 Propriétés des biofilms phototrophes

Les biofilms benthiques phototrophes possèdent de nombreuses propriétés qui dépendent des communautés microbiennes présentes, de la structure de la matrice polymérique et des conditions physico-chimiques du milieu (Sutherland, 2001). Ils jouent notamment un rôle essentiel dans les cycles biogéochimiques, les échanges entre colonne d'eau et sédiments et la stabilisation du substrat sur lequel ils se développent (Stevenson et al., 1996; Kostel et al., 1999; Battin et al., 2003).

II.4.1 Rôle écologique

II.4.1.1 Participation aux cycles biogéochimiques

Par définition, le cycle d'un élément implique son transfert parmi différentes composantes de communautés et compartiments d'un écosystème. Ces cycles ont lieu à différentes échelles spatiales et temporelles, et sont très dépendants des communautés en place. Les micro-communautés ont un rôle majeur sur le recyclage des éléments

(exemple de la minéralisation de la matière organique, nitrification dans le cycle de l'azote) et interagissent ensuite avec des macro-communautés pour lesquelles les taux de recyclage sont plus faibles (Wetzel, 1996). Les biofilms benthiques sont à la base des cycles de la plupart des éléments : ils oxydent, réduisent, incorporent, dégradent, et participent ainsi au recyclage des éléments carbone (C), azote (N), phosphore (P), soufre (S), fer (Fe), etc. (Briandet *et al.*, 2012). Dans l'environnement, la plupart de ces transformations sont des réactions catalysées par des enzymes microbiennes qui réduisent les composés sous formes polymérisées très peu assimilables tels quels par les organismes. Aussi, pour que les polymères organiques de hauts poids moléculaires puissent être métabolisés par les cellules bactériennes et algales du biofilms, leur taille doit préalablement être réduite par des processus de dégradation. (Chróst, 1991).

II.4.1.2 Le cas du cycle du carbone, zoom sur les mécanismes de la photosynthèse

Le carbone est assimilé par les organismes photo-autotrophes sous forme de CO₂ (ou carbonates, dans l'eau) puis incorporé dans leur biomasse. L'utilisation des autotrophes par les hétérotrophes à des fins trophiques permet le transfert du C d'un niveau à l'autre des chaînes alimentaires. Le C retourne à l'état minéral durant toute la vie des êtres vivants (échanges gazeux ou respiratoires) et à leur mort. La présence du C alternativement sous forme minérale et organique, de même que les échanges entre les différents réservoirs permettent de définir un cycle biogéochimique du C. Les micro-organismes y ont un rôle prépondérant puisque ce cycle est conditionné par les activités de production primaire et de respiration donc par les composantes algales et bactériennes dans le cas des biofilms phototrophes (Vymazal, 1995; Stevenson *et al.*, 1996).

La production primaire désigne la production de matière organique *via* la photosynthèse par des organismes photo-autotrophes c'est à dire les algues et les cyanobactéries pour les biofilms phototrophes. La photosynthèse se déroule en 2 phases (Hill, 1996; Bryant et Frigaard, 2006; Blankenship, 2014) :

- (i) *La phase lumineuse ou phase « claire »,* consiste en la conversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique. La lumière est tout d'abord captée par une « antenne » constituée de pigments chlorophylliens et canalisées jusqu'à des

protéines appelées centres réactionnels. Chez les algues, ces protéines se trouvent dans la membrane des thylakoïdes, des structures incluses dans les chloroplastes [Figure 14], tandis que chez les bactéries photo-autotrophes, elles se situent dans la membrane plasmique. Ces protéines captent l'énergie lumineuse et l'utilisent pour exciter les électrons de l'eau, électrons qui servent à leur tour à produire une enzyme réductrice, la NADPH (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate réduit), et un intermédiaire énergétique, l'ATP (Adénosine Triphosphate). L'antenne captant l'énergie lumineuse et le centre réactionnel associé forment un photosystème. Il existe deux photosystèmes qui interviennent successivement dans la synthèse de la NADPH et de l'ATP lors de la phase claire : les photosystèmes I et II (PSI et PSII), le PSII intervenant avant le PSI.

- (ii) (ii) *la phase de fixation du CO₂ ou phase « sombre »* consiste en la conversion du dioxyde de carbone en glucides à travers des processus de fixation résultant de réactions d'oxydoréduction endothermiques, qui ont besoin d'une part d'électrons pour réduire le CO₂ en sucres et d'autre part d'énergie pour rendre ces réactions thermodynamiquement favorables.

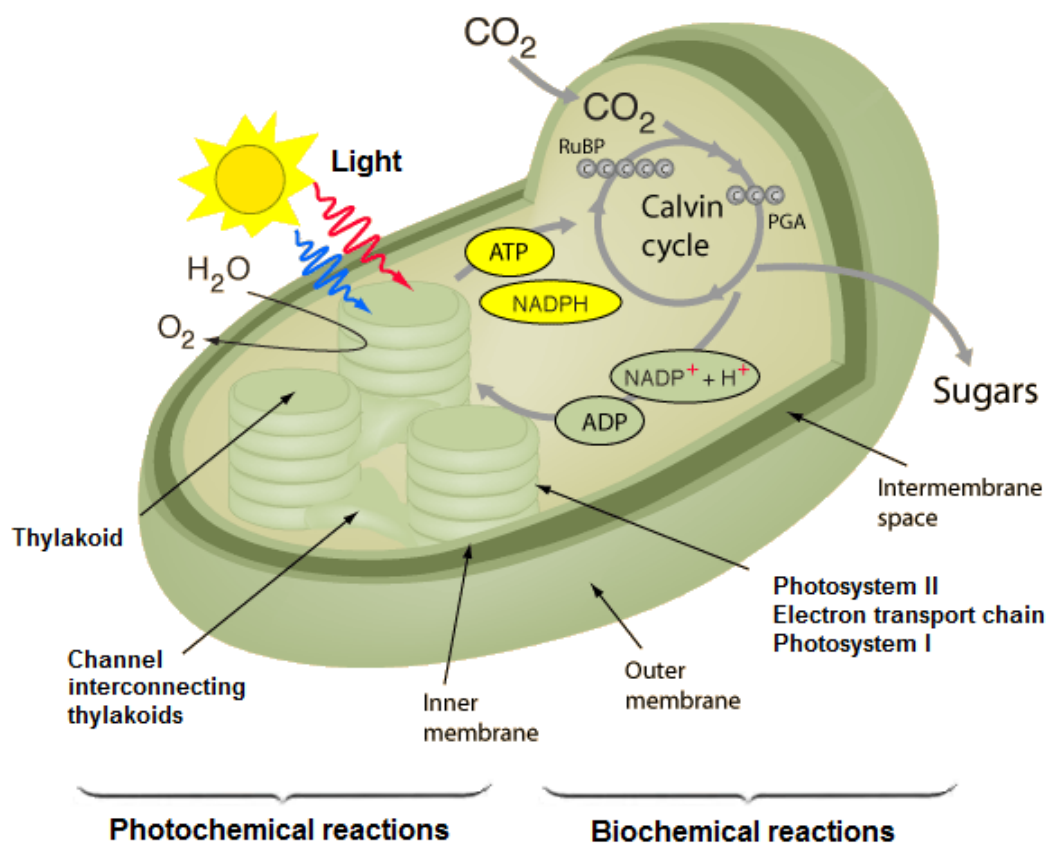


Figure 14 : Les mécanismes de la photosynthèse, d'après Moore et Clark (1995)

Finalement, l'équation globale de la photosynthèse peut s'écrire :



II.4.1.3 Echanges à l'interface sédimentaire et au sein du biofilm

Plus le biofilm est « jeune », plus il échange avec la colonne d'eau. Une forme de vie plus autonome devient ensuite possible grâce aux mécanismes de recyclage interne des nutriments. En effet, la diffusion des nutriments est régulée par des gradients internes de concentrations, liés aux activités des micro-organismes. Les communautés microbiennes d'algues et de bactéries développent des processus mutualistes qui accélère le recyclage du carbone et des substances nutritives au sein du biofilm (Wetzel, 1996). Par exemple, dans les biofilms algaux, il a été montré qu'une inhibition de la photosynthèse résultait en une réduction immédiate du taux de production des bactéries hétérotrophes de 46% . Ainsi la production bactérienne peut être fortement couplée à l'activité photosynthétique, et inversement, les produits du métabolisme bactérien peuvent contribuer à la photosynthèse et la croissance des algues.

II.4.2 Capacités cohésives et stabilisation du substrat

Au sein de la matrice polymérique, les colonies microbiennes sont reliées par des canaux aqueux qui forment un réseau de circulation permettant, d'une part d'acheminer l'oxygène et les nutriments dans les régions enfouies du biofilm, et d'autre part d'évacuer les déchets (Filloux et Vallet, 2003). Battin *et al.* (2003) ont montré que la viscosité du biofilm due à ces canaux aqueux a une influence importante sur la rétention des particules biologiques et sur la structure du substrat. La matrice EPS produite par les biofilms possède ainsi des propriétés cohésives, clairement montrées par plusieurs auteurs, qui la qualifient de « collante », (Salant, 2011) voire de « glue » (Flemming *et al.*, 2000).

En effet, les exopolymères secrétées par les micro-organismes créent une sorte de gel (Yan *et al.*, 2009), capable de piéger des organismes ainsi que d'autres éléments comme des particules minérales [Figure 15,a]. C'est l'élément clé dans la formation d'agrégats (Flemming *et al.*, 2000), l'un des principaux éléments de structure des sédiments. La présence de la matrice EPS est ainsi considérée comme la base de l'intégrité et de la

stabilité du biofilm, et participe également à la stabilisation des particules du substrat (Stal, 2010) [Figure 15,b].

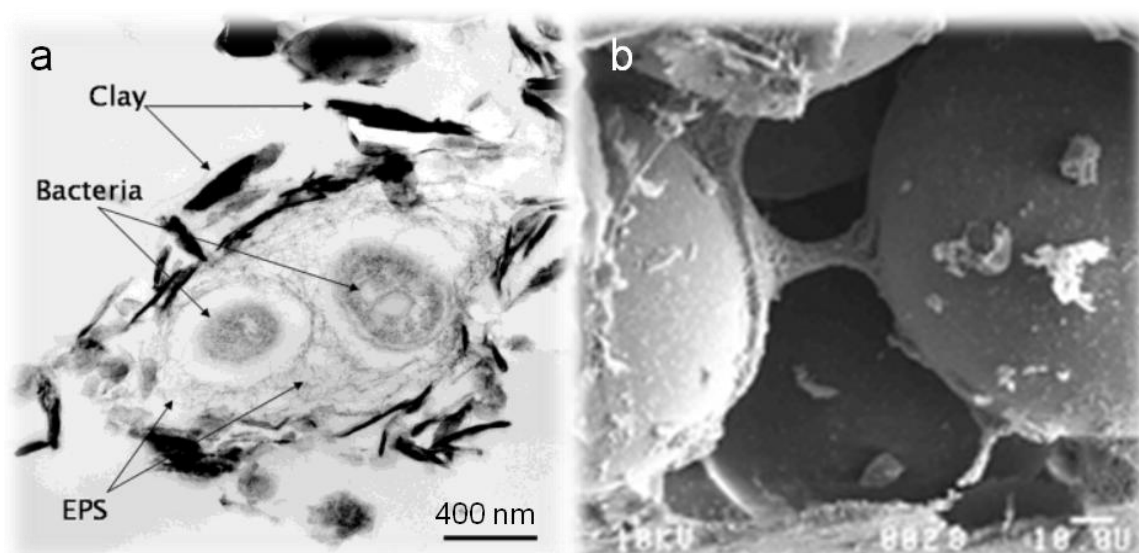


Figure 15 : Images au microscope SEM (a) des particules d'argiles piégées dans la matrice EPS secrétées par des bactéries (Mineralogical Society of America, 2014), (b) un biofilm bactérien qui lie des billes de verre entre elles (Bio-Pro, 2011).

II.5 Les biofilms phototrophes, des acteurs du colmatage ?

Le lien entre biofilm et colmatage est un sujet complexe ; d'un côté, tous les auteurs s'accordent sur le fait que l'accumulation de particules en suspension, organiques ou minérales, contribue fortement au colmatage des milieux poreux par des mécanismes physiques (Zhao *et al.*, 2009). En revanche, l'effet de la croissance du biofilm divise : pour certains, c'est un facteur de colmatage secondaire (Suliman *et al.*, 2006; Shen *et al.*, 2010) ; au contraire, d'autres démontrent que le développement d'un biofilm entraîne une diminution notable de la conductivité hydraulique dans des colonnes de sable (Sanchez de Lozada *et al.*, 1994), dans des milieux poreux (Baveye *et al.*, 1998), dans des systèmes d'irrigation (Yan *et al.*, 2009) ou dans d'autres systèmes comme des interstices entre plaques de verre (Hill et Sleep, 2002). Il peut même devenir la première cause du colmatage sur le long terme d'après Oberdorfer et Peterson (1985).

Les mécanismes de colmatage biologique des milieux poreux incluent deux processus (Vandevivere et Baveye, 1992; Baveye *et al.*, 1998; Bouwer, 2002; Mauclair *et al.*, 2004) :

- Le développement des micro-organismes au sein du milieu qui viennent réduire la taille des pores voire complètement les obstruer.
- Le développement d'un tapis biologique colmatant à l'interface eau/milieu poreux.

De nombreuses études sur le lien entre développement biologique et diminution des capacités d'infiltration ont été menées à l'échelle du laboratoire, dans des colonnes remplies de billes de verre (Cunningham *et al.*, 1991; Thullner *et al.*, 2002a; Kim *et al.*, 2010) ou de sable (Taylor et Jaffé, 1990; Vandevivere et Baveye, 1992) dans lesquelles étaient inoculées diverses suspensions de cultures bactériennes. Ces travaux portaient essentiellement sur des communautés bactériennes hétérotrophes, dont la complexité structurelle et fonctionnelle différait largement de biofilms « naturels ». En comparaison, les études évaluant l'influence des biofilms développés en conditions naturelles sur les processus de colmatage sont rares (Battin et Sengschmitt, 1999; Ibisch *et al.*, 2009), bien que le bio-colmatage puisse y être significatif. Par exemple, dans des systèmes tels que les ouvrages d'infiltration, le phénomène de colmatage biologique peut être très important puisque les contraintes hydrauliques s'opposant à l'épaississement du biofilm sont très limitées. Il est aussi important de noter que les rares études s'intéressant au colmatage dans des écosystèmes naturels ne distinguent pas les effets relatifs des processus physiques, chimiques et biologiques sur ce colmatage (Battin *et al.*, 2003)

Il apparait donc nécessaire de mieux appréhender le rôle de biofilms mixtes développés en conditions naturelles (composés de bactéries et d'algues), sur le colmatage, indépendamment des autres processus physiques et chimiques, notamment en identifiant leurs effets sur les propriétés du milieu poreux support de l'infiltration (texture, structure).

III. Ingénierie écologique : Les macro-organismes comme acteurs potentiels du décolmatage ?

Comme expliqué dans l'introduction de ce travail, l'ingénierie écologique renvoie à des champs scientifiques et techniques extrêmement diversifié, et consiste à utiliser des interactions existantes au sein des écosystèmes naturels pour développer des pratiques d'aménagement et de gestion permettant de minimiser les impacts anthropiques sur l'environnement. Dans notre cas, il s'agit de mettre au point des outils biologiques pour empêcher, ou du moins retarder le colmatage des bassins d'infiltration.

Dans les environnements aquatiques, les macro-organismes tels que les plantes ou les invertébrés sont capables à la fois d'agir sur la structure physique du substrat sur lequel ils se développent, mais aussi d'interagir avec l'ensemble du compartiment biologique, notamment les composantes bactériennes et algales du biofilm. Ce sont donc des outils possibles pour lutter contre le colmatage.

Partie 1 : les macrophytes allélopathiques

III.1 Pourquoi s'intéresser aux macrophytes ?

Les végétaux visibles à l'œil nu se développant dans les milieux aquatiques, incluant les plantes aquatiques vasculaires, les mousses ou les macro-algues, sont couramment appelées macrophytes [Figure 16]. Les macrophytes sont des composantes indispensables des écosystèmes aquatiques puisqu'ils y assurent de nombreuses fonctions (Brix, 1997; Vymazal, 2013) : ils stabilisent le substrat sur lequel ils se développent, et préviennent l'érosion grâce à leur réseau racinaire, ils favorisent les processus physiques de filtration des particules en suspension et réduisent leur resuspension, ils participent à certains processus biogéochimiques notamment *via* la consommation de nutriments ou le transfert d'oxygène, enfin, ils représentent des surfaces à coloniser pour les micro-organismes et des niches écologiques pour la faune, notamment certains invertébrés aquatiques.



Figure 16 : Illustration de macrophytes (Conseil général des Landes, 2009)

Si la croissance de macrophytes n'a pas une influence directe sur la conductivité hydraulique des systèmes, leur métabolisme ainsi que les interactions avec les autres organismes peuvent influencer sur le colmatage des milieux supports de leur développement (Brix, 1994). En effet, d'une part les réseaux racinaires des macrophytes créent des macroporosités au sein des sédiments, favorisant les écoulements (White, 1985) ; d'autre part, de nombreuses études (Gopal et Goel, 1993; Jasser, 1995; Stanley *et al.*, 2003; Rojo *et al.*, 2013) montrent une influence des plantes sur les communautés

microbiennes (benthiques, phytoplanctoniques ou épiphytiques⁶), qui peut prendre la forme de compétition pour la lumière et / ou l'accès aux nutriments ou être causée par des mécanismes allélopathiques ; ces différents mécanismes étant développés dans la suite de cette partie. Ainsi, par compétition ou allélopathie, les macrophytes interagissent avec l'ensemble du compartiment biologique (Figure 17) et peuvent potentiellement réduire le biocolmatage.

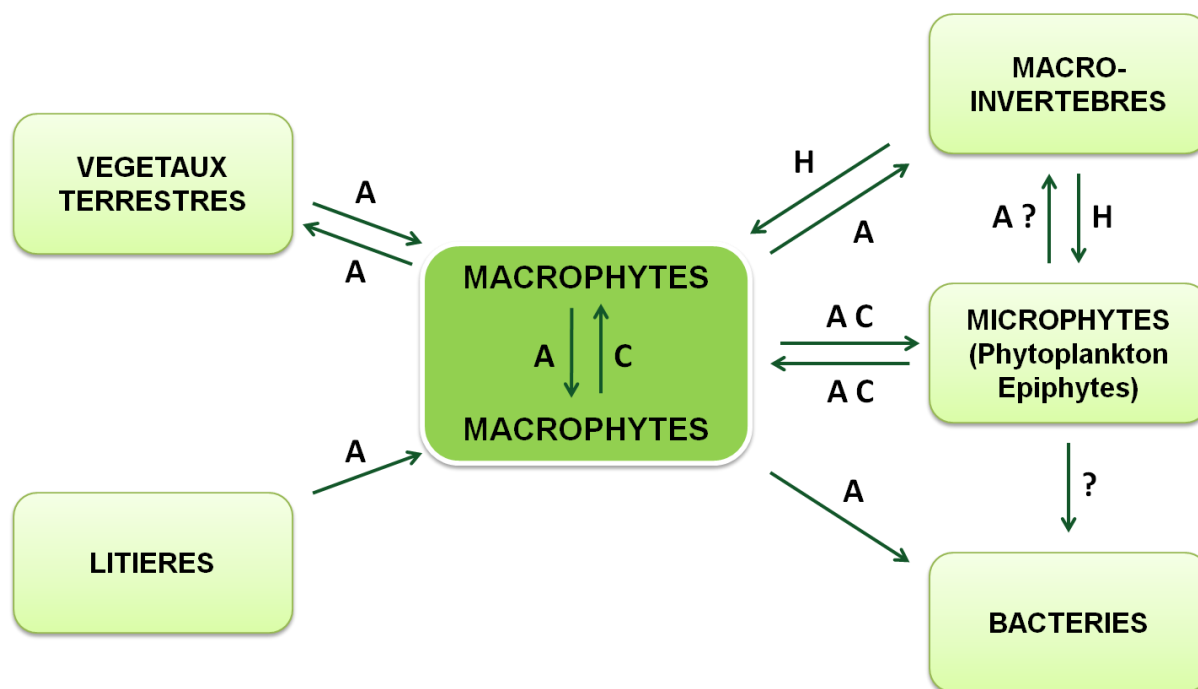


Figure 17 : Diagramme conceptuel des interactions majeures concernant les plantes en milieux aquatiques, A= Allelopathie, C = Compétition, H = « Herbivory », modifié d'après Gopal et Goel (1993).

III.2 Les relations de compétition entre macrophytes et microphytes

III.2.1 Compétition pour la lumière

Les macrophytes immergés vivent généralement dans des environnements confinés aux quelques mètres supérieurs de la colonne d'eau et sont très sensibles aux changements des conditions de lumière. Ainsi, la compétition pour la lumière est probablement le facteur le plus important pour l'équilibre entre les communautés phototrophes dans les milieux aquatiques (Sand-Jensen et Borum, 1991; Stevenson, 1997). Les algues vivant

⁶ Les épiphytes désignent les communautés microbiennes se développant à la surface des végétaux.

sous forme planctonique on un avantage car ce sont les premières atteintes par la lumière et elles font donc de l'ombre aux autres communautés phototrophes. De même, les épiphytes ont un avantage par rapport aux plantes sur lesquels ils se développent (Sand-Jensen, 1990). Aussi, la présence de phytoplancton peut limiter à la fois la croissance des macrophytes et des phototrophes benthiques. Cela étant, cette compétition est réciproque, et les macrophytes peuvent aussi produire de l'ombrage limitant la croissance des algues, que ce soit sous forme planctonique, ou benthique. Ce processus est spécialement efficace dans les eaux peu profondes (Sand-Jensen et Borum, 1991), comme dans le cas des ouvrages d'infiltration. Aussi, les macrophytes peuvent limiter la croissance de la composante algale des biofilms phototrophes benthiques *via* l'ombrage produit par leurs parties aériennes (Sturt *et al.*, 2011).

III.2.2 Compétition pour les nutriments

Les plantes aquatiques ont besoin de nutriments inorganiques pour leur croissance et leur reproduction. La disponibilité en nutriments est généralement beaucoup plus faible dans la colonne d'eau que dans les sédiments, qui sont le siège du recyclage d'éléments nutritifs *via* la minéralisation de la matière organique stockée dans la matrice sédimentaire (Brix, 1997).. Les réservoirs d'éléments nutritifs dans l'eau et les sédiments sont toutefois interconnectés [Figure 18].

Les macrophytes enracinés peuvent exploiter les deux types de réservoirs d'éléments nutritifs, les contributions relatives de l'eau libre et de la partie sédimentaire dépendant de l'élément nutritif limitant et de sa concentration, du stade de développement de la plante, ainsi que de la capacité de transport à travers les feuilles et les racines de la plante (Sand-Jensen et Borum, 1991). Dans les lacs oligotrophes, par exemple, le phosphore provient majoritairement des sédiments et est donc puisé *via* les racines, alors que dans des cours d'eau riches en nutriments, les macrophytes se maintiennent même après que leurs racines aient été retirées (Carignan et Kalff, 1982; Norgaard, 1989). Les besoins des macrophytes en azote et en phosphore par unité de carbone et de temps sont considérablement inférieurs à ceux des micro-algues, elles semblent donc favorisées par rapport à ces dernières, mais le phytoplancton est en général un meilleur concurrent que les macrophytes pour des niveaux élevés de nutriments du fait de son taux rapide de croissance, des ratios surface / volume plus importants, des couches limites de diffusion

plus minces et de leur capacité à se positionner favorablement dans l'environnement lumineux (Sand-Jensen et Borum, 1991).

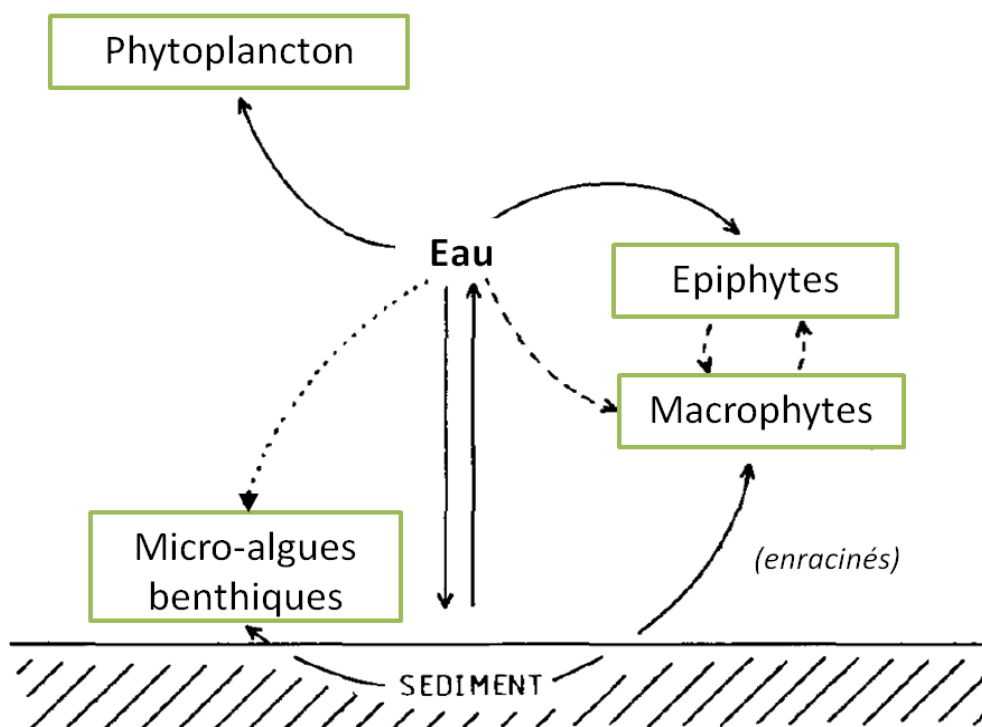


Figure 18 : Utilisation des sources d'éléments nutritifs dans la colonne d'eau et dans les sédiments par les communautés phototrophes : (macrophytes et algues épiphytiques associées, micro-algues benthiques et phytoplancton). L'importance relative d'une source de nutriments est indiquée par une ligne plus ou moins pleine. Modifié d'après Sand-Jensen et Borum (1991).

Dans l'ensemble, la limitation de croissance et de développement de la biomasse liée à une carence en éléments nutritifs est moins importante pour les macrophytes enracinés que pour le phytoplancton. Cette affirmation est soutenue par le développement et la domination de denses peuplements de macrophytes dans les lacs oligotrophes peu profonds et les régions côtières associés à de très faibles biomasses de phytoplancton (Wetzel, 1983). Les micro-algues épiphytes qui utilisent principalement les ressources en nutriments dans la colonne d'eau [Figure 18] ont une biomasse très sensible aux variations de nutriments. A l'inverse, les micro-algues benthiques utilisent principalement les éléments nutritifs provenant des sédiments et peuvent influencer la diffusion de nutriments inorganiques entre les sédiments et la colonne d'eau. Elles peuvent ainsi convertir ou immobiliser plusieurs éléments dissous (fer, manganèse, phosphate, ammonium) et réduire les flux à l'interface sédimentaire (Sand-Jensen et

Borum, 1991). Les macrophytes enracinés, en stabilisant le sédiment, réduisent également la diffusion de nutriments inorganiques entre le sédiment et la colonne d'eau. Ces processus soulignent la concurrence pour les éléments nutritifs et les relations négatives entre le phytoplancton, les algues benthiques et les macrophytes enracinés. De plus, l'association épiphyte-macrophytes exploite le même pool d'éléments nutritifs de l'eau. Cela étant, comme suggéré par Carpenter et Lodge (1986), les macrophytes enracinés peuvent également favoriser la croissance des micro-algues en libérant des nutriments dans la colonne d'eau suite à leur sénescence. Ils ajoutent cependant que la décomposition des macrophytes a lieu principalement à la fin de l'année, lorsque la croissance du phytoplancton est plutôt régulée par la lumière.

III.3 L'allélopathie

III.3.1 Définition

Molisch (1937) a inventé le terme « allélopathie » pour désigner les interactions biochimiques entre tous les types de plantes, y compris les micro-organismes. Concrètement, l'allélopathie désigne le transfert de composés chimiques à travers l'environnement d'un organisme « source » vers un organisme « cible », pouvant avoir des conséquences néfastes ou bénéfiques, directes ou indirectes sur l'organisme « cible » (Rice, 1984). Ces composés peuvent être de nature organiques ou minérale ; dans ce dernier cas, on parle d'allélopathie élémentaire (Morris *et al.*, 2009).

Ce mécanisme joue un rôle crucial dans l'établissement des dynamiques de populations et dans la distribution des espèces au sein d'un écosystème (Rice, 1984). En effet, les interactions exercées entre deux ou plusieurs espèces peuvent entraîner des transformations au cours de leur évolution car l'effet des substances allélopathiques est un facteur de sélection des espèces (Macías *et al.*, 2008). En situation de stress et/ou de compétition la sécrétion de substances allélopathiques est favorisée : d'une part, les organismes sources peuvent augmenter leur production, d'autre part, les organismes cibles y sont plus sensibles (Reigosa *et al.*, 1999). Ainsi, que ce soit en situation non perturbée ou en situation de stress, l'allélopathie est un facteur influant sur l'abondance et la diversité des espèces présentes dans un milieu.

III.3.2 L'allélopathie en milieu aquatique

Même si la majorité des travaux traitant d'allélopathie concernent les écosystèmes terrestres, des interactions allélopathiques sont également susceptibles de se produire dans les écosystèmes aquatiques (Rice, 1984). Gross (2003) explique que tous les producteurs primaires aquatiques (cyanobactéries, micro/macro-algues, angiospermes, etc.) sont capables de produire et de relarguer dans l'environnement des substances allélopathiques. Ces interactions sont extrêmement nombreuses et jouent un rôle important dans la structure et la dynamique des communautés aquatiques (Gopal et Goel, 1993; Gross *et al.*, 2007).

Les composés allélopathiques sécrétés en milieu aquatique doivent présenter diverses caractéristiques pour être efficaces. Par exemple, la polarité de l'eau les oblige à un certain degré d'hydrophobicité pour rester dans leur zone d'effet. Des composés aux caractéristiques différentes (hydrophiles ou lipophiles) peuvent avoir des effets synergiques et/ou agir contre des cibles différentes (Macías *et al.*, 2008). Les composés hydrophiles par exemple, agiront plutôt contre les espèces micro-algales vivant sous une forme planctonique (au sein de la colonne d'eau), alors que les composés lipophiles auront plutôt un effet sur les espèces épiphytiques. Il existe plusieurs grandes familles de composés (Macías *et al.*, 2008), dont les plus courants sont les acides gras (saturés ou insaturés) et les composés phénoliques (Gross *et al.*, 1996). Les premiers sont intéressants car ils possèdent à la fois un groupe hydrophile et un groupe hydrophobe, les seconds sont les composés les plus souvent décrits comme algicides produits par les organismes aquatiques. Il existe également de nombreux autres composés pouvant avoir des effets allélopathiques : les oligopeptides, les polyéthers, les polysaccharides ou encore le bromoforme, la lyngbyatoxine, l'élément soufre.

Dans le cadre de ce travail, je me suis plus particulièrement intéressée aux interactions allélopathiques générées par les macrophytes contre des micro-organismes. Les macrophytes étant en compétition avec tous les autres producteurs primaires, l'allélopathie peut en effet se révéler une stratégie efficace contre les autres phototrophes. Dans la littérature, les effets des macrophytes ont ainsi été démontrés non seulement sur des espèces micro-algales planctoniques, mais également sur des composantes

bactériennes de biofilms épiphytiques (Gopal et Goel, 1993; Erhard et Gross, 2006). De fait, je suis en mesure de m'interroger sur l'influence possible des macrophytes allélopathiques sur les composantes algale et bactérienne des biofilms benthiques.

III.3.3 Les différents mécanismes d'émission des substances allélopathiques

Il existe 3 mécanismes d'émission de substances allélopathiques : (i) lors de la décomposition de parties de la plante (ii) l'émission *via* les racines ou (iii) *via* les parties aériennes de la plante (Maillet, 1998; Inderjit et Duke, 2003). Pour augmenter la concentration en substances allélopathiques dans leur environnement, les organismes « sources » ont recours à :

- L'hyper accumulation : c'est le transport actif d'une substance d'une partie vers une autre de la plante, où sa concentration peut alors devenir supérieure à la normale. Les substances allélopathiques sont ensuite libérées lors de la décomposition des tissus morts.
- La sécrétion d'exsudats racinaires : elle peut augmenter la concentration en substances allélopathiques (ainsi que la disponibilité en éléments nutritifs) dans les zones à proximité des racines.
- L'excrétion de substances volatiles ou hydrosolubles par les parties aériennes de la plantes qui seront alors lessivées sous l'action de la pluie pour les plantes émergées, et directement par la colonne d'eau pour les plantes immergées.

Dans le cas des systèmes aquatiques, les mécanismes sont comparables (Gross, 2003; Erhard, 2006). Dans ces milieux, les composés allélopathiques ont des caractéristiques de transport et de concentrations efficaces différentes selon la zone dans laquelle ils sont libérés. Par exemple, dans la zone pélagique, lorsque les composés sont libérés dans la colonne d'eau, leur dilution apparaît comme un obstacle à la quantification des interactions allélopathiques. En revanche, au niveau de la zone benthique, la proximité des organismes limite cet effet « dilution » par réduction de la distance entre les individus. Aussi, une accumulation très localisée de certains composés peut permettre d'atteindre des concentrations efficaces et de quantifier des effets. C'est également le cas

des interactions entre les macrophytes et leurs épiphytes où les différentes cellules impliquées sont en contact direct les unes avec les autres (Erhard et Gross, 2006).

III.3.4 Les différents modes d'action des composés allélopathiques

Hu et Hong (2008) décrivent les différents modes d'action des substances allélopathiques libérées par les macrophytes sur des algues d'eau douce. Ils recensent 4 principaux processus :

- (i) *Destruction de la structure cellulaire de l'algue.* Une étude a par exemple montré que certains composés allélopathiques de *Phragmites communis* détruisent la paroi cellulaire de l'espèce *Chlorella pyrenoidosa*. En effet, le taux d'acides gras insaturés de la membrane des algues exposées à ce végétal était supérieur après exposition (Li et Hu, 2005). Cette augmentation engendre directement une altération de la structure des parois cellulaires et, par conséquent, des transports membranaires.
- (ii) *Impact sur la respiration.* Pollio *et al.* (1993) ont montré que la respiration cellulaire est endommagée par certaines substances allélopathiques. La baisse du taux phosphore/oxygène pourrait être à l'origine du découplage de la phosphorylation oxydative⁷ ce qui causerait une diminution de la respiration. Ce résultat a également été observés par Li et Hu (2005).
- (ii) *Impact sur la photosynthèse.* Des atteintes au processus photosynthétique des cellules algales sont possibles. Elles concernent les réactions photochimiques ou le cycle de Calvin. Li et Hu (2005) ont montré que les substances allélopathiques sécrétées par *Phragmites communis* altéreraient la structure de la membrane des thylakoides qui contiennent les pigments photosynthétiques ; cette altération se traduit par une modification des activités photosynthétiques. Par ailleurs, Leu *et al.* (2002) indiquent qu'un composé allélochimique secrété par *Myriophyllum spicatum* (l'eugeniin) inhibe le processus de transfert d'électrons entre l'accepteur

⁷ Phosphorylation oxydative : mode de synthèse de l'ATP qui est alimenté par les réactions d'oxydoréduction transférant des électrons depuis des nutriments jusqu'à du dioxygène ou à un autre accepteur dans la respiration cellulaire.

et le donneur dans le PSII⁸. De nombreuses espèces de macrophytes sont reconnues pour leur capacité à modifier les processus photosynthétiques des algues.

- (iv) *Impact sur les activités enzymatiques microbiennes.* De nombreux composés allélopathiques peuvent affecter les activités des algues unicellulaires. Du fait de l'action spécifique des substances allélopathiques, certaines activités enzymatiques peuvent être inhibées ou activées. Nakai *et al.* (2000) ont par exemple mis en évidence une inhibition de l'activité phosphatase alcaline de cellules algales en présence d'eugeniin (composé allélopathique sécrété par *Myriophyllum spicatum*). Par ailleurs, Li et Hu (2005) ont également reporté que les composés allélochimiques sécrétés par *Phragmites communis* pouvaient réduire l'activité de défense de la cellule contre les radicaux libres, ce qui peut engendrer sa mort.

De façon plus globale, Gross (2003) explique que les substances allélopathiques aquatiques agissent le plus souvent sur les activités enzymatiques et les processus photosynthétiques.

III.3.5 Quelle influence des macrophytes allélopathique sur les biofilms développés dans les bassins d'infiltration ?

III.3.5.1 Macrophytes et phytoplancton

Plusieurs études (Körner et Nicklisch, 2002; Erhard et Gross, 2006; Mulderij *et al.*, 2006; Švanys *et al.*, 2013) ont montré les effets inhibiteurs de macrophytes sur des micro-algues planctoniques. Gopal et Goel (1993) ont par exemple observé qu'une croissance dense de macrophytes réduisait notablement la concentration des espèces vivant sous forme planctonique, notamment celle des algues filamenteuses, et qu'au contraire la mort de ces mêmes macrophytes engendrait un bloom algal rapide. Zhu *et al.* (2010) ont réalisé une étude sur l'influence des mécanismes allélopathiques du macrophyte *Myriophyllum spicatum* sur des cyanobactéries (*Microcystis aeruginosa*) et des chlorophytes (*Selenastrum*

⁸ Photosystème II (Cf Figure 14). L'une des deux unités photoréceptrices de la membrane thylakoïdienne du chloroplaste, son centre réactionnel est constitué de deux molécules de chlorophylle *a* P₆₈₀.

capricornutum), et montré que *M. aeruginosa* semblait affectée par la coexistence avec *M. spicatum*.

III.3.5.2 Macrophytes et epiphyton

Le caractère des interactions entre les macrophytes et leurs epiphytes est très controversé, comme l'explique Gopal et Goel (1993), plusieurs études ont montré que la diversité et le fonctionnement des communautés épiphytiques sont influencés par le type de macrophyte. De plus, les epiphytes semblent moins sensibles aux composés allélopathiques que les cellules sous forme planctoniques (Hilt, 2006). En 2006, l'étude d'Erhard et Gross a tout de même montré que des substances extraites des macrophytes *Elodea canadensis* et *Elodea nuttallii* avaient un effet allélopathique sur un biofilm épiphytique, réduisant notamment l'abondance de certaines espèces de cyanobactéries. De plus, plusieurs macrophytes ont aussi montré des effets antibactériens contre des composantes bactériennes des épiphytes (Gopal et Goel, 1993) ou des coccoïdes (Gross *et al.*, 1996).

III.3.5.3 Macrophytes et biofilms benthiques ?

Il apparait que les plantes aquatiques sont susceptibles de réduire l'abondance de certaine composantes du biofilm épiphytique comme les cyanobactéries ou les diatomées. Or, les biofilms phototrophes développés dans les bassins d'infiltration sont composés de communautés complexes de micro-organismes comportant à la fois des composantes algales et bactériennes. Les micro-organismes sont explicitement mentionnés dans la définition initiale de l'allélopathie par Molisch (1937). Si les interactions allélopathiques entre bactéries et microphytes sont peu connues, celles entre bactéries et macrophytes est avéré ; de nombreux exsudats de macrophytes présentent en effet une activité allélopathique antibactérienne (Gopal et Goel, 1993). Finalement, l'effet des macrophytes sur le biofilm benthique n'est pas directement mis en évidence mais leurs effets sur les communautés qui le composent (algues, bactéries) sont clairement avérés.

Partie 2 : les invertébrés benthiques

III.4 Pourquoi s'intéresser aux macro-invertébrés ?

Les macro-invertébrés benthiques sont des organismes de taille supérieure à 0.25 mm (Dinet *et al.* 1985) vivant dans les fonds des cours d'eau, des lacs ou des mers. Ce sont principalement des crustacés, des mollusques, des vers ou des insectes [Figure 19], ces derniers étant présents dans l'eau sous des formes différentes en fonction de leur cycle biologique (larve, nymphe ou adulte). La diversité des macro-invertébrés benthiques dans un habitat donné est largement dépendante du couple substrat / vitesse du courant, les substrats pouvant être des galets, des macrophytes, des racines des arbres des ripisylves⁹ ou encore des sédiments. A ce titre, certains macro-invertébrés tels que des vers oligochètes ou des larves de chironomes font partie intégrante du compartiment biologique des bassins d'infiltration..



Figure 19 : Photo de macro-invertébrés benthiques illustrant la diversité des espèces rencontrées (Kouri et de Graaf, 2013)

⁹ La ripisylve désigne les formations linéaires de végétation (arbres, buissons, herbacés) qui s'étalent sur les rives inondables d'un cours d'eau.

Devant la diversité des macro-invertébrés, le concept de groupe fonctionnel (groupe d'espèces ayant des effets similaires sur une fonction écosystémique (Chapin *et al.*, 1992) a été développé afin d'aborder les liens entre diversité/abondance des invertébrés et fonction de l'écosystème (Wallace et Webster, 1996). C'est pourquoi, en écologie aquatique, on aborde souvent la question de la classification des macro-invertébrés d'un point de vue fonctionnel plutôt que phylogénétique, c'est-à-dire basée sur des effets communs d'ordre biogéochimiques et interspécifiques (Gerino *et al.*, 2003). Cette classification repose dans un premier temps sur les groupes trophiques (Wallace et Webster, 1996). En effet, les invertébrés benthiques ont des régimes alimentaires très variés : bactéries, détritus, algues, micro et macro-benthos, et interagissent donc avec l'ensemble des composantes des écosystèmes benthiques. Selon la classification proposée par Cummins et Klug (1979), on peut différencier cinq grands groupes : Les « *racleurs* », c'est-à-dire les organismes adaptés pour brouter ou racler le substrat pour obtenir leur nourriture ; les « *déchiqueteurs* », qui peuvent broyer ou fragmenter de grands morceaux de tissus de plantes en décompositions, les « *collecteurs* », qui se nourrissent principalement des particules fines organiques qui se déposent sur le substrat, correspondant à des débris animaux et végétaux, les « *filtreurs* » qui filtrent les particules en suspension dans l'eau pour se nourrir, et les « *prédateurs* » qui se nourrissent de tissus animaux (zooplancton et autres macro-invertébrés).

Les invertébrés ont différentes actions sur leur environnement à travers ces actions trophiques; mais ils peuvent aussi être classifiés en fonction de leurs actions de bioturbation dans l'environnement (voir ci-dessous, partie III.6). Dans le cadre de cette étude, je me suis intéressée aux fonctions pouvant potentiellement influencer sur le niveau de colmatage des sédiments :

- d'une part les invertébrés benthiques ont un rôle important, voire essentiel dans les dynamiques des communautés microbiennes, avec une action trophique directe (consommation des micro-organismes par les invertébrés brouteurs par exemple). Ils sont ainsi capables de **contrôler la biomasse du biofilm** et de limiter ses effets négatifs sur les performances des bassins d'infiltration.

- D'autre part, certains invertébrés comme les bioturbateurs sont susceptibles de **modifier la structure physique** de l'environnement dans lequel ils évoluent. Ils sont pour cela qualifiés d'« *ingénieurs de l'écosystème* » (Jones *et al.*, 1994). Cette propriété peut directement influencer les propriétés hydrodynamiques du milieu.

Ces deux types d'invertébrés sont décrits plus longuement dans les paragraphes suivants.

III.5 Les invertébrés brouteurs, consommateurs de biofilm

Parmi les facteurs pouvant contrôler la biomasse des biofilms phototrophes, l'effet du broutage, c'est-à-dire la réduction de la biomasse du biofilm par des invertébrés benthiques herbivores, a été très longuement étudié dans la littérature pour tous les types d'habitats aquatiques (Lamberti *et al.*, 1995; Sommer, 2000; Hillebrand, 2009; Sturt *et al.*, 2011). Le broutage peut avoir des effets à la fois sur la biomasse, la diversité ou sur la production primaire des algues benthiques (Steinman, 1996). Ces effets peuvent être positifs ou négatifs et dépendent du type d'invertébré, des espèces algales, des concentrations en éléments nutritifs dans le milieu, des conditions d'éclairement, ainsi que du type de substrat (Feminella et Hawkins, 1995; Haglund et Hillebrand, 2005). Cela étant, l'effet le plus souvent observé sous l'action d'invertébrés herbivores est une réduction de la biomasse algale, mise en évidence pour une grande variété d'espèces (Steinman, 1996). Les travaux de Hillebrand (2009), qui réalise une comparaison entre plus de 800 études dans tous les types de milieux aquatiques, ont ainsi montré que la présence de brouteurs pouvait en moyenne réduire la biomasse algale de 59%, avec des extrêmes allant jusqu'à 99%. Ces travaux montrent également que parmi les producteurs primaires, ce sont les algues benthiques qui sont les plus sensibles à l'activité de broutage.

Les invertébrés « brouteurs » appartiennent à différents groupes, les plus étudiés étant les gastéropodes, les larves de trichoptères, d'éphéméroptères et certains décapodes, amphipodes et isopodes. D'après Hillebrand (2009), la plupart des groupes d'invertébrés consommateurs de biofilm ont un impact significatif sur la biomasse du biofilm, exceptés les larves de diptères. Bien entendu, la biomasse des brouteurs a un effet important sur

la biomasse du biofilm consommée, avec une augmentation de la consommation lorsque la biomasse des brouteurs augmente (Feminella et Hawkins, 1995). Toutefois, à l'échelle du laboratoire, plusieurs études montrent que l'ampleur des effets diminue lorsque l'on atteint une très grande biomasse de brouteurs. Ainsi, le surpeuplement peut conduire à une pression de pâturage réduit, ce qui est probablement lié à la concurrence intra ou interspécifique (Ruesink, 2000).

En résumé, les invertébrés consommant les algues benthiques pourraient fortement limiter la croissance du biofilm phototrophe qui se forme à l'interface eau/sédiment dans les bassins d'infiltration et ainsi améliorer les capacités d'infiltration.

III.6 Les invertébrés bioturbateurs, ingénieurs des écosystèmes

III.6.1 Définition de la bioturbation

Le terme bioturbation est fréquemment utilisé dans la littérature scientifique et recouvrent tous les processus possibles par lesquels des organismes affectent le substrat dans ou sur lequel ils vivent. Dans le cas des milieux aquatiques, la bioturbation peut être définie comme l'ensemble des activités produites par les organismes, comprenant tous les processus de transports - c'est à dire à la fois le remaniement des particules solides et les courants d'eau à travers les terriers - qui affectent directement ou indirectement les matrices sédimentaires (Kristensen *et al.*, 2012). Les **mouvements de particules solides** peuvent être liés à l'enfouissement des organismes et le creusement de terriers ou de galeries à différentes profondeurs dans le sédiment, ainsi qu'aux activités d'alimentation, à l'ingestion de sédiment et la production de pelotes fécales à la surface ou à différents niveaux dans le sédiment. **Les mouvements d'eau** sont quant-à-eux liés à la ventilation et la bioirrigation des terriers qui crée des courants à l'intérieur des terriers et galeries pour apporter les composés dissous (oxygène et nutriments) nécessaires aux organismes pour respirer et se nourrir, ainsi qu'à la formation de sillons créés par le déplacement des organismes à la surface ou à l'intérieur du sédiment (Nogaro, 2007; Kristensen *et al.*, 2012).

L'ensemble des activités de bioturbation des invertébrés benthiques dans les sédiments ont pour conséquences des flux de particules, d'eau et de matières dissoutes, qui peuvent influencer les propriétés physiques, chimiques et biologiques des sédiments (Krantzberg, 1985)

III.6.2 Influence sur les propriétés de la matrice sédimentaire

III.6.2.1 Influence sur les propriétés physiques et conséquences sur l'infiltration.

Les macro-invertébrés bioturbateurs sont susceptibles de modifier la structure physique de la matrice sédimentaire en remaniant le sédiment et/ou en creusant des tubes et des terriers, ce qui affecte la répartition granulométrique verticale et la porosité du milieu, tout comme les flux de ressources (O₂ et éléments nutritifs) et les conditions rédox (Nogaro et Mermillod-Blondin, 2009). Les transports de particules et de solutés dépendent du mode de bioturbation [Figure 20]. Aussi, selon le type de remaniement du sédiment, de structures construites et de ventilation des terriers, la bioturbation affecte différemment la structure physique, les activités microbiennes et les processus biogéochimiques (Mermillod-Blondin et Rosenberg, 2006). Par exemple, les convoyeurs sont à l'origine d'un reclassement granulométrique des particules : ils ingèrent la composante détritique liée aux particules d'argile et de limons des sédiments, et rejettent ensuite des pelotes fécales en surface ; entraînant une diminution des particules fines dans la zone d'ingestion et une augmentation en surface, ce qui modifie la texture du sédiment. C'est le cas des vers tubificidés en eau douce (McCall et Fisher, 1980).

Les fécès produits par les organismes bioturbateurs sont souvent agglomérés par du mucus, ce qui génère des particules de taille supérieure et augmente la porosité de la couche superficielle, et conjointement, les flux à travers l'interface par simple diffusion. De plus, les pelotes ne sont pas liées entre elles, ce qui réduit la compacité et la cohésion du sédiment par rapport à un sédiment « non-bioturbé », ce qui facilite sa remise en suspension (McCall et Fisher, 1980). D'autre part, les réseaux de galeries creusés par les vers tubificidés dans le sédiment créent également des macroporosité, ce qui modifie la structure de la matrice sédimentaire. Dans le cadre de cette étude, l'intérêt de l'activité de bioturbation repose en partie sur ces propriétés. En effet, c'est dans les macro-

porosités du milieu que les écoulements ont lieu préférentiellement (White, 1985), aussi l'activité de bioturbation peut limiter le colmatage des milieux en créant des chemins d'écoulement pour l'eau. Ce résultat a déjà été observé en laboratoire, sur des colonnes de sédiment fin (Nogaro *et al.*, 2006; Mermillod-Blondin *et al.*, 2007), mais à notre connaissance, aucune étude n'a encore mis en évidence de tels effets sur le terrain.

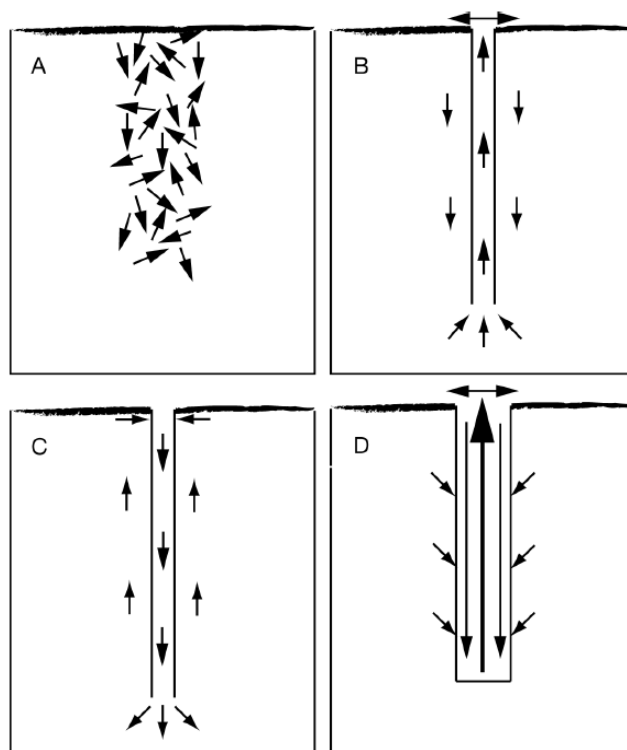


Figure 20 : Les différents modes de bioturbation : (A) les biodiffuseurs, (B) les convoyeurs vers le haut, (C) les convoyeurs vers le bas et (D) les régénérateurs, d'après Kristensen *et al.* (2012).

III.6.2.1 Influence sur les propriétés chimiques et conséquences sur les communautés microbiennes

L'influence de la bioturbation sur les propriétés chimiques des sédiments comme la concentration en oxygène, le potentiel rédox, le pH et les concentrations en matière organique et en nutriments a été longuement étudiée dans la littérature scientifique (Davis, 1974; Krantzberg, 1985; Gilbert, 2003; Mermillod-blondin *et al.*, 2005b). L'activité de bioturbation peut notamment créer une alternance entre zones oxiques et anoxiques ou augmenter l'épaisseur de la zone aérobie avec le creusement et la ventilation des terriers et galeries, ce qui peut stimuler la minéralisation de la matière organique (Krantzberg, 1985; Kristensen, 2000). Les bioturbateurs benthiques peuvent également modifier la répartition verticale de la matière organique en provoquant l'enfouissement

de certains oxydes situés en surface vers les couches sédimentaires inférieures, ou inversement (Gilbert, 2003). Les échanges d'éléments nutritifs à l'interface sédimentaire peuvent également être stimulés en présence de faune. Mermillod-blondin *et al.* (2005b) ont par exemple mesuré une augmentation du relargage et de NH_4^+ , NO_3^- , PO_4^{3-} et de carbone organique dissous par des sédiments en présence de vers tubificidés. Il est également reconnu que l'activité benthique, et plus particulièrement la bio-irrigation, a un effet stimulateur à la fois sur le processus de dégradation de la matière organique et les activités microbiennes impliquées dans le cycle de l'azote (Gilbert, 2003). Ainsi, la bioturbation modifie les conditions physico-chimiques et les cycles biogéochimiques au sein des sédiments, et influence donc les processus d'adsorption et de précipitation. De même, l'activité de la faune benthique, c'est-à-dire le broutage à la surface des sédiments, les remaniements structurels, tout comme la ventilation des terriers qui stimulent la pénétration d' O_2 et les flux de nutriments dans les sédiments, peut influencer les activités microbiennes, de manière positive ou négative [Figure 21].

Les effets de la bioturbation sur les différentes propriétés du sédiment sont résumés dans la Figure 21 ci-dessous :

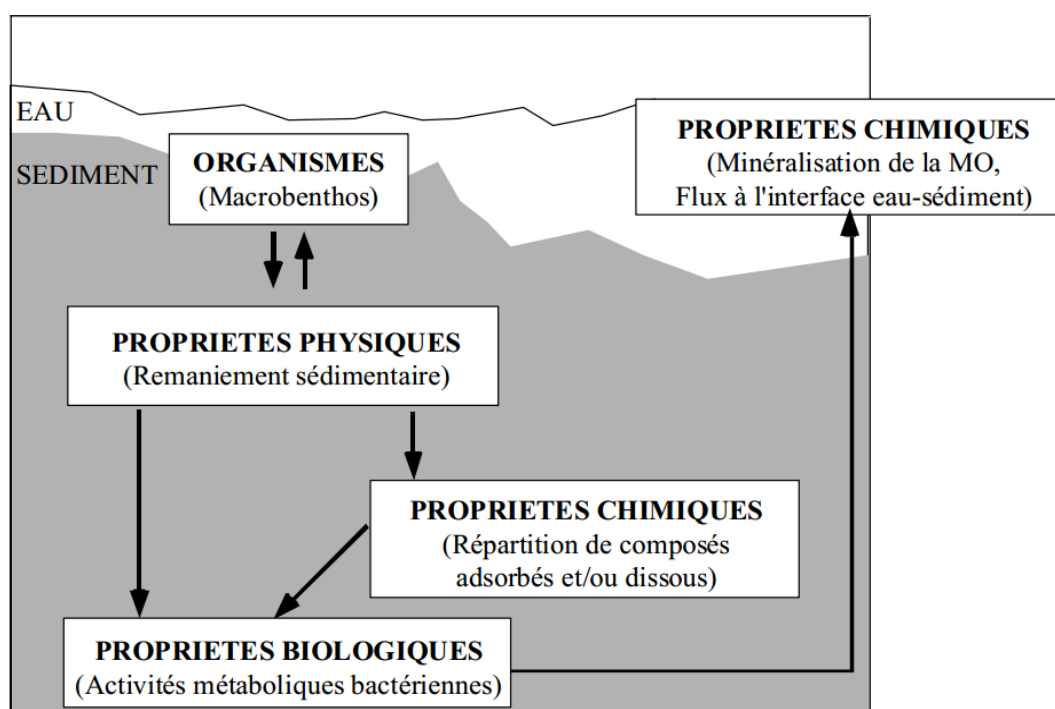


Figure 21 : Schéma récapitulatif du rôle des organismes bioturbateurs sur les propriétés des sédiments, d'après Gilbert (2003).

IV. Bilan & Problématique

L'étude bibliographique souligne le manque de connaissances sur l'effet des biofilms complexes développés en conditions naturelles sur les processus de colmatage des supports d'infiltration. Ainsi, le 1^{er} objectif de thèse visant à déterminer les variables biologiques les plus déterminantes dans les processus de colmatage se décline en plusieurs sous-questions :

- (i) Quelles variables structurelles et/ou fonctionnelles liées au biofilm influent sur les propriétés physiques du support d'infiltration (texture, structure)?
- (ii) Quelles sont les conséquences sur les paramètres hydrodynamiques (porosité efficace, perméabilité) ?

D'un point de vue scientifique, ce premier point permettra de mieux caractériser les communautés microbiennes autotrophes et hétérotrophes qui composent les biofilms développés dans des bassins d'infiltration, et de préciser les interactions biofilm – support d'infiltration - colmatage.

La littérature scientifique montre un effet des macro-organismes sur certaines composantes des biofilms benthiques, ainsi que sur les propriétés physiques des supports sur lesquels ils se développent. Le 2^{ème} objectif de thèse vise à déterminer dans quelles mesures l'introduction de ces organismes dans des ouvrages d'infiltration pourrait limiter le développement du biofilm d'une part, et la dégradation des performances hydrauliques d'autre part. Il se décline en plusieurs questions :

- (iii) Les macrophytes et macro-invertébrés benthiques peuvent-ils limiter le développement des biofilms benthiques ?
- (iv) Si oui, quel(s) paramètre(s) structurel(s) et/ou fonctionnel(s) du biofilm affectent-ils ?
- (v) Quelles sont les conséquences sur les paramètres hydrodynamiques du milieu support d'infiltration ?

D'un point de vue fondamental, ce deuxième volet permettra d'améliorer les connaissances sur les interactions biofilm-plantes et biofilm-invertébrés en milieu benthique. D'un point de vue appliqué, il peut apporter des solutions opérationnelles durables en termes de gestion des ouvrages d'infiltration pour le maintien des performances hydrauliques et environnementales.

En résumé, ce travail de thèse vise à étudier des interactions au sein du compartiment biologique et entre le compartiment biologique et le support sur lequel il se développe, et les conséquences de ces interactions sur l'infiltration. Les différentes questions présentées se déclinent dans le schéma fonctionnel suivant (Figure 22).

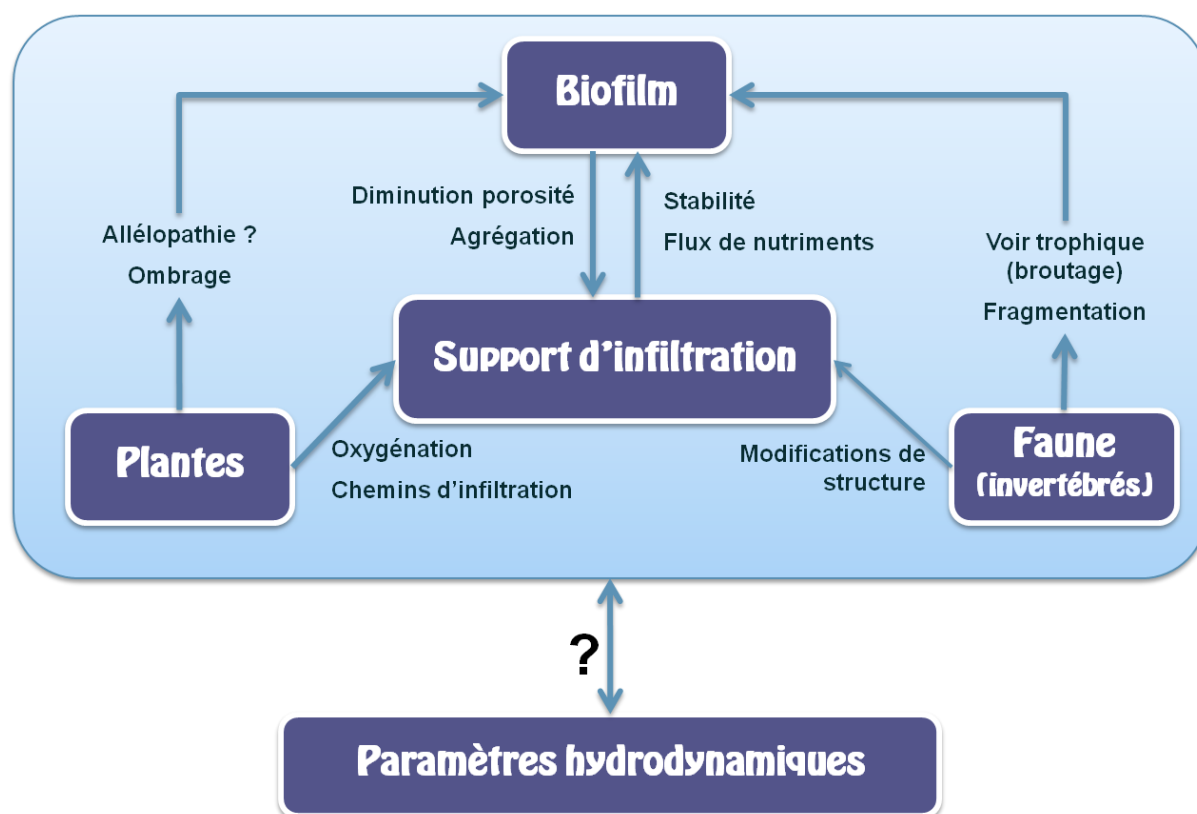


Figure 22 : Schéma fonctionnel résumant les interactions étudiées dans le cadre de ce travail

A hand is holding a vertical glass test tube. The background is a blurred green landscape with trees and foliage. The text is centered over the test tube.

Chapitre 2 : Approche expérimentale

I. Présentation du site d'étude et des échelles d'observation

Les différents mécanismes entrant en jeu dans les processus de colmatage sont le plus souvent abordés à l'échelle du laboratoire ; les études de terrain sont rares et se concentrent sur le fonctionnement hydrodynamique global des bassins d'infiltration (Schuh, 1990; Loizeau, 2013). Ainsi, l'approche expérimentale retenue pour caractériser l'effet du compartiment biologique sur les paramètres hydrodynamiques des ouvrages d'infiltration est une approche de terrain à l'échelle d'un ouvrage, ce qui permet à la fois d'étudier des biofilms développés en conditions naturelles et leurs effets sur les propriétés physiques des sédiments, et d'effectuer des mesures d'infiltration en conditions réelles d'exploitation.

I.1. Présentation du site d'étude

I.1.1 Description et historique du site

Le site choisi est le champ captant d'eau potable de Crépieux-Charmy, géré par le Grand-Lyon et exploité par Veolia. Situé au Nord-Est de l'agglomération lyonnaise [Figure 23], il représente la première ressource en eau potable du Grand Lyon. Son alimentation est préférentiellement assurée par la nappe alluviale du Rhône, l'eau est captée sur un territoire préservé d'une superficie de 375 hectares. Le captage est dimensionné pour produire jusqu'à 600 000 m³ d'eau par jour, pour les besoins des 350 000 abonnés de l'agglomération, représentant environ 1.2 million d'habitants. Ainsi, alimentant en eau potable plus de 95% de la population de l'agglomération, la pérennité du champ captant de Crépieux-Charmy revêt une importance cruciale à l'échelle du bassin de vie Lyonnais.

Du fait des enjeux majeurs associés à cette ressource, 12 bassins d'infiltration ont été mis en place sur le site entre 1989 et 2006. Ces ouvrages avaient pour objectif initial de protéger la nappe de toute source de pollution, accidentelle ou chronique, provenant du Rhône circulant au Nord du champ captant, par la création d'une barrière hydraulique empêchant les transferts de polluants du Rhône vers les puits de prélèvement [Figure

24]. A l'heure actuelle, ces bassins ont aussi un rôle très significatif de recharge de l'aquifère sous-jacent (Loizeau, 2013). Les bassins d'infiltration ont été implantés en deux phases sur le site : entre 1989 et 1992 (bassins 1 à 4), puis entre 2004-2006 (bassins 5 et 6). Pour faciliter les opérations de maintenance, les bassins sont compartimentés en paire de bassins, fonctionnant indépendamment (Figure 23, exemple des bassins 3.1 et 3.2).

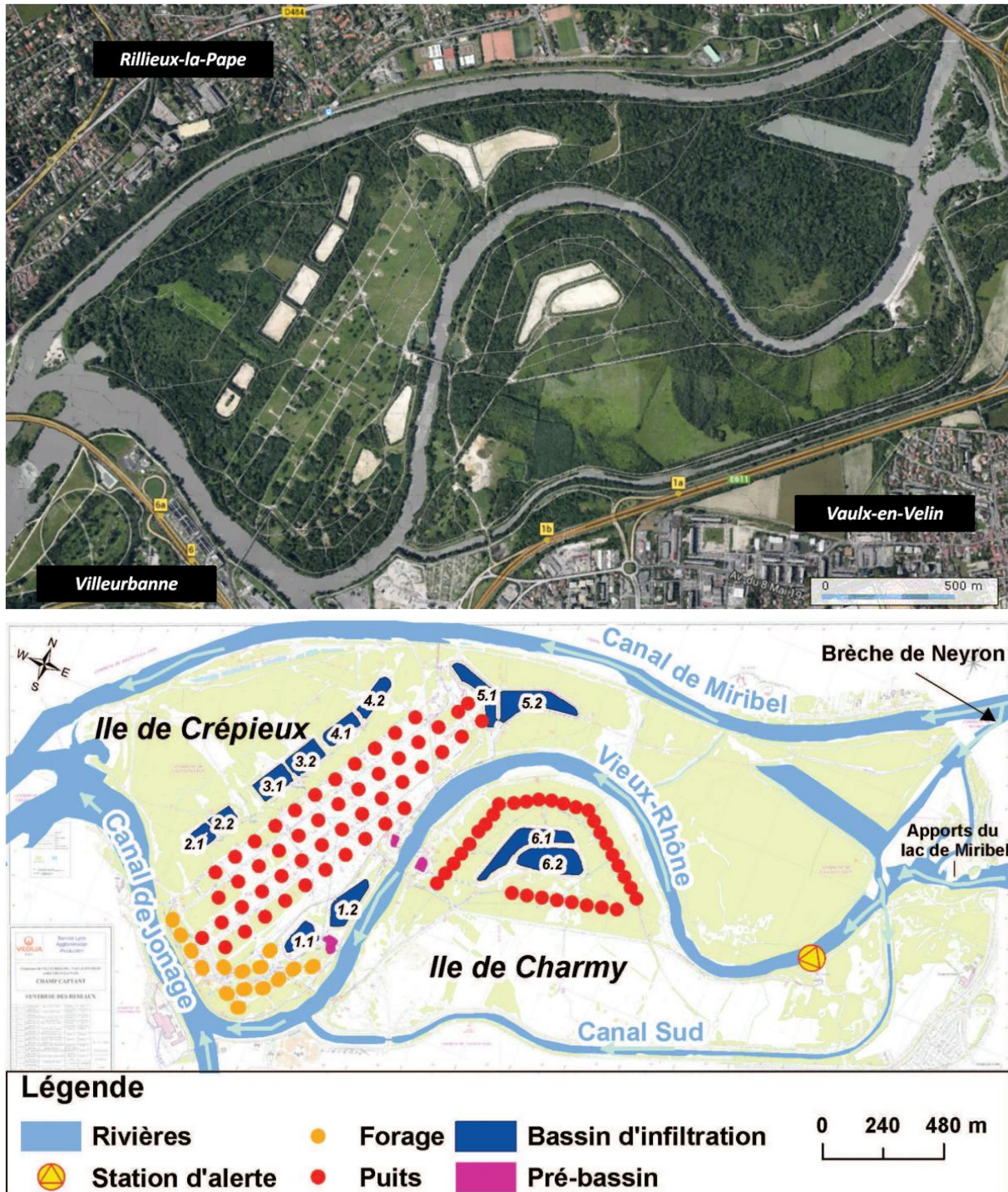


Figure 23 : Localisation (en haut) et schématisation (en bas) du site d'étude, Source : GoogleMap et Loizeau (2013), respectivement.

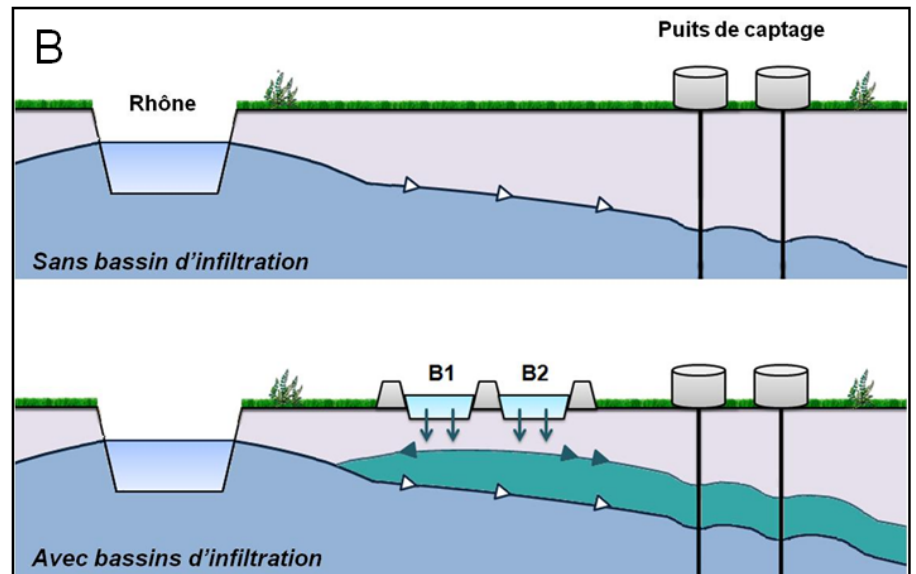
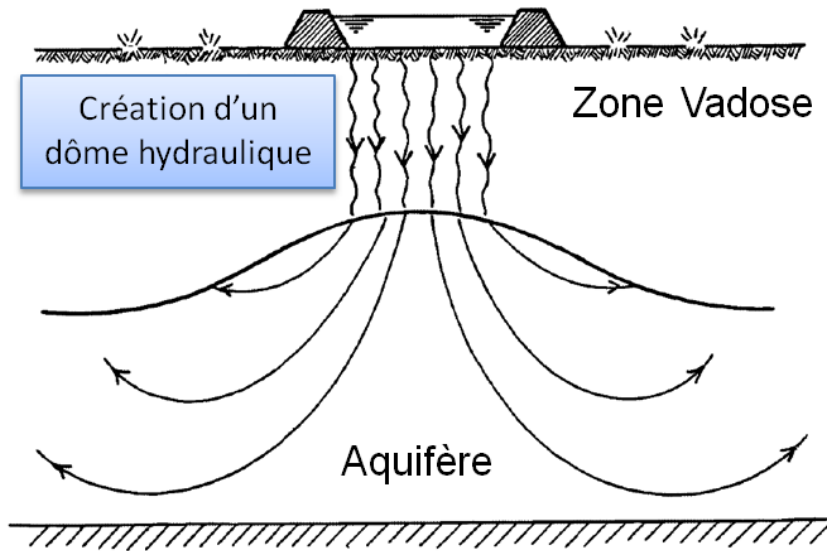


Figure 24 : (A) Schéma du dôme hydraulique formé sous les bassins, modifié d'après (Bouwer, 2002), (B) mise en situation sur le site

Les bassins sont alimentés à partir d'eau pompée dans le « Vieux Rhône », un ancien bras du Rhône situé au Sud du champ captant, et préalablement stockée dans des pré-bassins qui assurent une décantation des matières en suspension –MES [en violet sur la Figure 23]. La qualité de l'eau du Vieux Rhône avant recharge est analysée en permanence au niveau d'une station d'alerte. En cas de trop forte turbidité (concentration en matière en suspension > 50 NTU) ou de détection de polluants, l'alimentation est immédiatement stoppée.

Du fait du colmatage de la couche superficielle des bassins d'infiltration, leur efficacité s'altère au cours du temps et des opérations de « décolmatage » consistant à retirer tout

ou partie du substrat colmaté ont donc régulièrement lieu [Figure 25]. Pour rappel, ce substrat correspond au mélange du sable calibré importé dans les bassins, des matières en suspension dans l'eau d'infiltration qui ont sédimenté et de la matière organique issue du développement biologique intrinsèque au bassin.

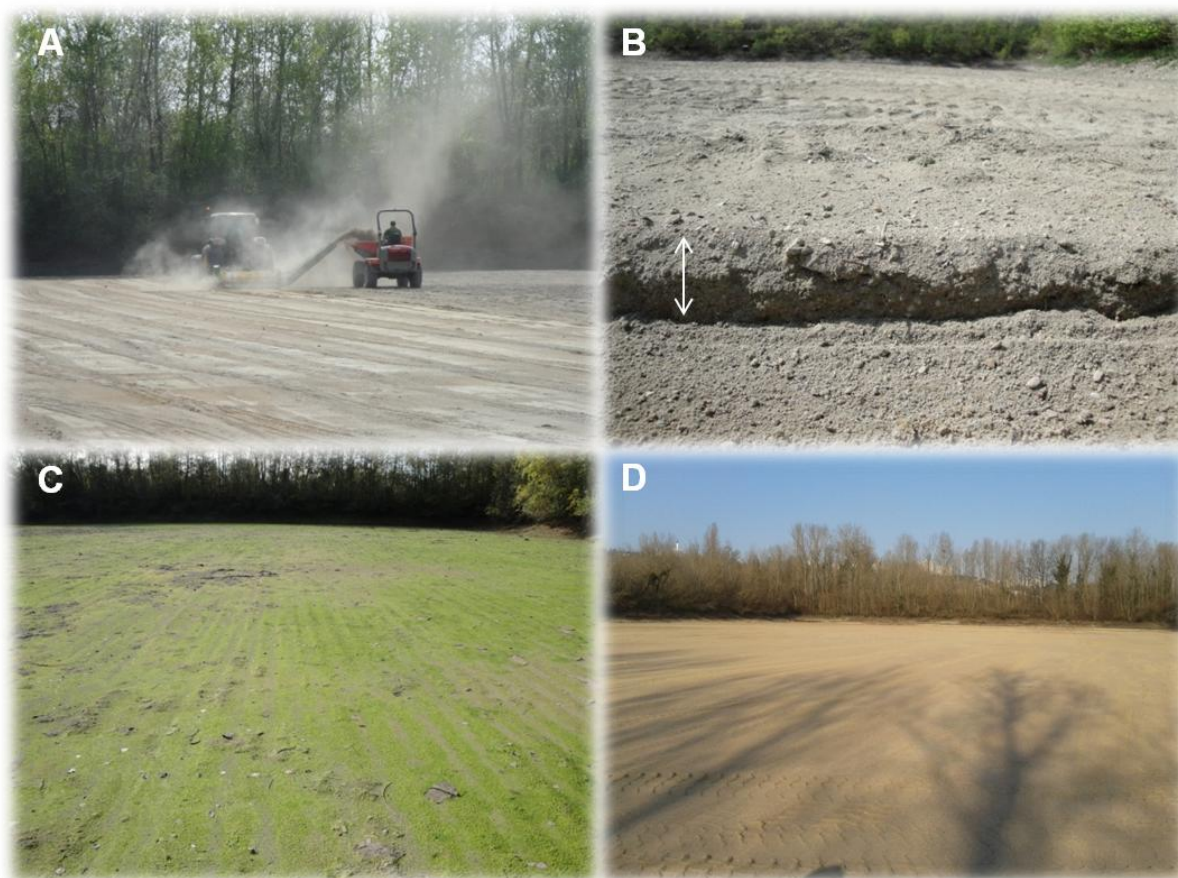


Figure 25 : Photos du raclage d'un bassin : pendant l'opération (A), le substrat raclé (B), et un bassin avant (C) et après (D) raclage. Photos LEHNA et VEOLIA.

I.1.2 Pourquoi ce site ?

Tout d'abord, des observations visuelles ainsi que des analyses ont clairement révélé un développement important des biofilms phototrophes dans les bassins du site à l'interface eau/sédiment [Figure 25, C et Figure 38],.

D'un point de vue expérimental, la présence sur un même site de 12 bassins d'infiltration présentant des niveaux de colmatage et de colonisation contrastés offre un panel de conditions qui permet de décrire le biofilm et le support d'infiltration dans des états différents. Les bassins fonctionnant par deux, chaque paire de bassins présentent des

situations identiques en termes de granulométrie du sable utilisé comme substrat, année de mise en eau, conditions climatiques, apports de la végétation environnantes ; ce qui offre la possibilité d'observer les effets de l'exploitation, c'est-à-dire des cycles de sollicitations et des durées de mise en eau, indépendamment de ces facteurs.

Par ailleurs, du fait de leur vocation à protéger un champ de captage, les bassins du site sont alimentés avec une eau non chargée en contaminants contrairement à des bassins d'eau pluviale alimentés avec des eaux ayant lessivées des sols fortement anthropisés. En conséquence, le facteur « pollution / stress chimique » n'intervient pas, ce qui permet d'étudier le biofilm indépendamment des interactions classiquement observées entre contaminants organiques et inorganiques et dynamiques des communautés microbiennes (Winiarski *et al.*, 2006; Badin *et al.*, 2011).

D'un point de vue pratique et du fait des conditions d'exploitation, il est possible de contrôler la hauteur d'eau dans les bassins, ce qui permet de réaliser les expérimentations dans des conditions optimales. Enfin, d'un point de vue opérationnel, les exploitants du site faisant face à des problèmes importants liés au colmatage (problème de gestion et coûts des opérations de décolmatage), cette étude peut donc leur apporter des éléments pour mieux comprendre le fonctionnement des bassins.

I.1.3 Les « contraintes » liées au site

Le champ captant de Crépieux-Charmy est reconnu pour sa richesse environnementale et fait partie du périmètre de l'espace Natura 2000 de Miribel-Jonage nommé « Pelouses, milieux alluviaux et aquatiques de l'île de Miribel-Jonage » [Figure 26]. Il est de plus identifié comme Zone Naturelle d'Intérêt Ecologique, Floristique et Faunistique (ZNIEFF), Espace Naturel Sensible, Zone Humide Remarquable, et fait également l'objet d'un Arrêté préfectoral de protection de biotope (APPB). A ce titre, le site d'étude est un espace naturel identifié pour la rareté ou la fragilité des espèces animales ou végétales qu'il abrite, et de leurs habitats. Dans ce contexte, un « document d'objectif » (DOCOB) définit, entre autres, les orientations de gestion pour maintenir les le milieu naturel et les habitats en bon état ; il fait notamment état du contrôle des espèces invasives. C'est pourquoi, dans le cadre de nos expérimentations, le choix des **d'espèces autochtones** et adaptées au site est primordial pour respecter les contraintes fixées par ce document.

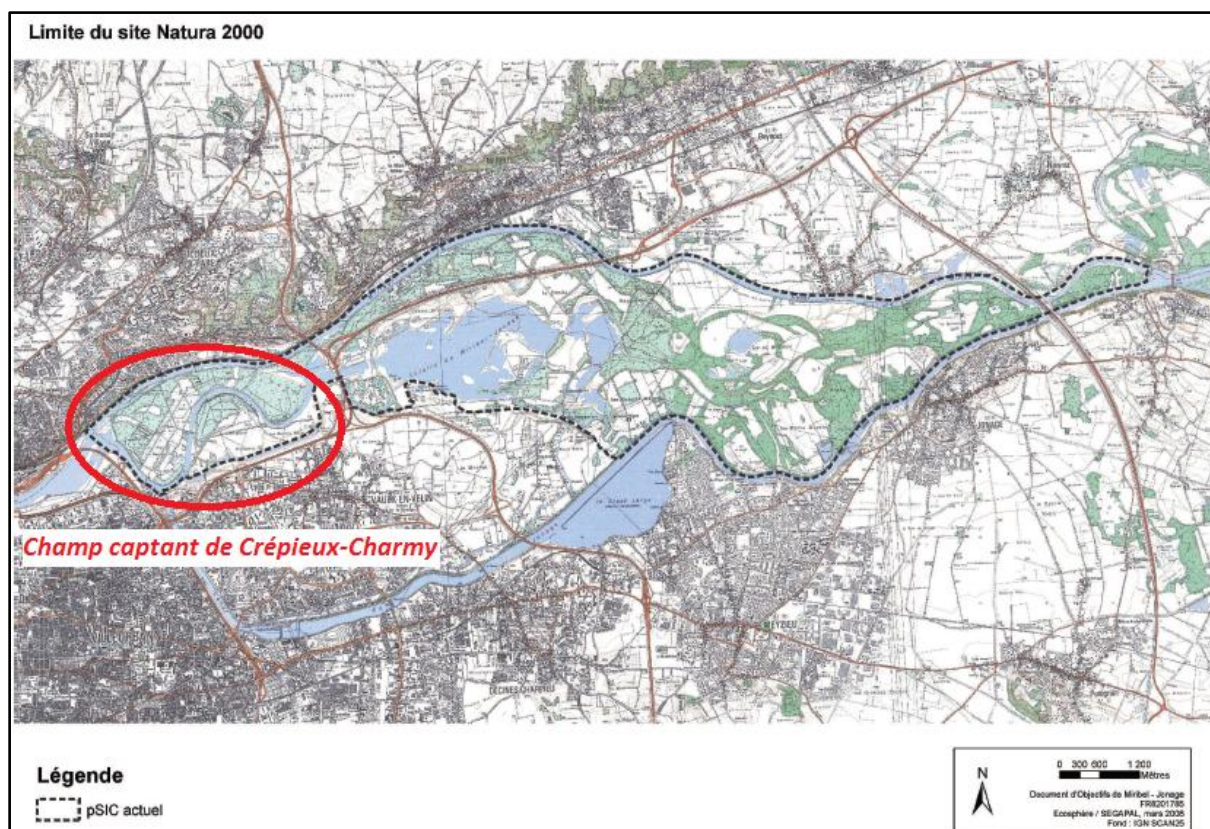


Figure 26 : Les limites du site Natura 2000 de Miribel-Jonage, d'après le DOCOB de 2009

La deuxième contrainte est liée au mode d'alimentation des bassins. Etant donné que leur alimentation est coupée en cas de trop forte turbidité ou de détection de polluants, les expérimentations sont dépendantes de ces paramètres. A titre d'exemple, en 2012 ont eu lieu « les chasses du Rhône » c'est-à-dire une opération permettant d'évacuer les sédiments accumulés en amont de la retenue suisse de Verbois. Cette vidange a libéré plusieurs million de m³ de sédiments qui sont arrivés sur le Haut-Rhône français, et empêché l'utilisation des bassins pendant plusieurs semaines. Par ailleurs, une crue du Rhône qui a eu lieu fin 2012 a emporté une partie de la station d'alerte. Par la suite, sans moyen de détection des polluants et par précaution, l'alimentation des bassins a été stoppée jusqu'à la fin des réparations, donc pendant plusieurs mois.

Ces différentes contraintes ont du être prises en compte dans l'organisation des expérimentations.

I.2 Echelle d'observation

Pour étudier les effets du compartiment biologique sur les caractéristiques du support d'infiltration, différentes échelles d'expérimentation sont possibles : des essais de laboratoire permettant de travailler en conditions contrôlées et des essais de terrain plus réalistes car permettant de tenir compte de l'ensemble des facteurs naturels influant potentiellement sur la réponse des organismes testés (Geffard *et al.*, 2010). Selon les objectifs recherchés, chaque échelle d'expérimentation présente des avantages et des inconvénients [Figure 27]. Les essais de laboratoire permettent d'étudier de façon simplifiée des mécanismes expliquant l'effet de paramètres contrôlés sur le biofilm et sont plus reproductibles mais leur manque de réalisme peut être critiqué. Inversement, les essais de terrain tendent vers des situations plus réalistes mais conduisent à considérer des interactions et des effets plus complexes à interpréter du fait de la multiplicité des facteurs intervenant et des difficultés éventuelles à isoler l'effet des différents facteurs (Caquet *et al.*, 1996).

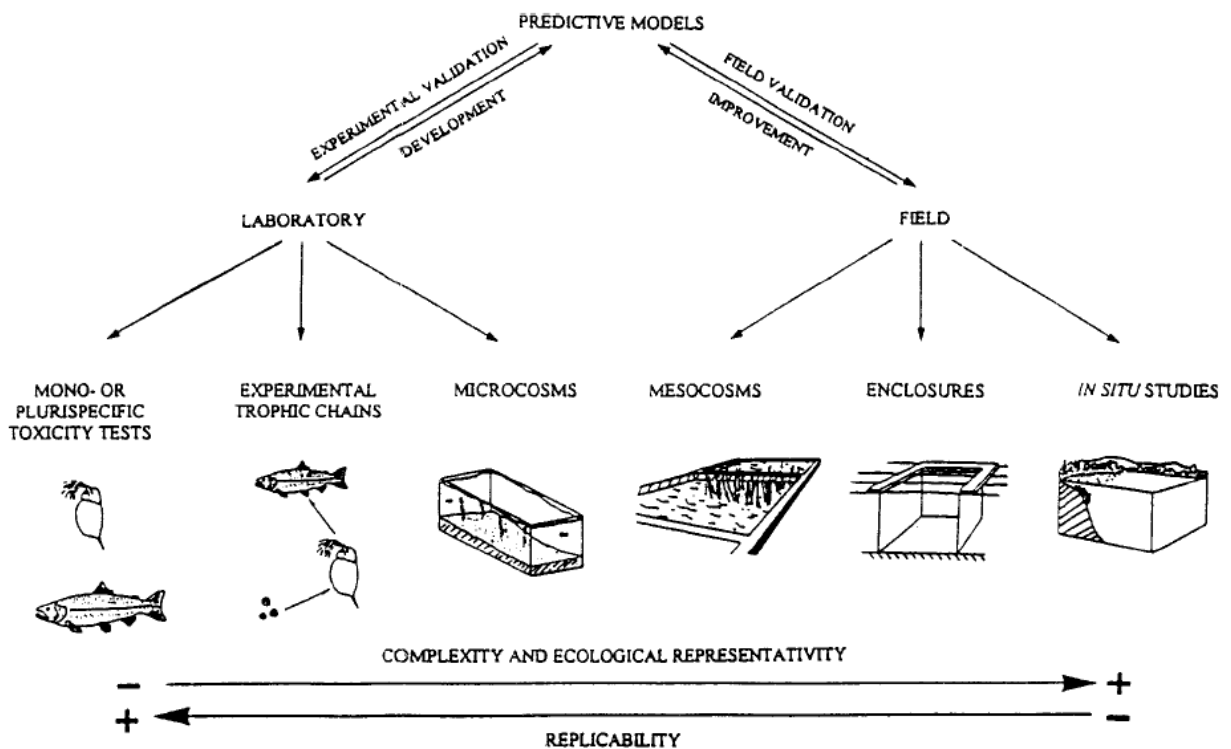


Figure 27 ; Représentation schématique des méthodes et approches complémentaires utilisées en écotoxicologie pour les études environnementales, d'après Caquet, et al., 1996.

II. Choix expérimentaux

Dans le cadre de ce travail de thèse, j'ai réalisé trois expériences à différentes échelles en fonction des objectifs et des contraintes liées au site d'étude ; ceci en sachant que c'est la complémentarité des approches qui permet de répondre aux objectifs de l'étude :

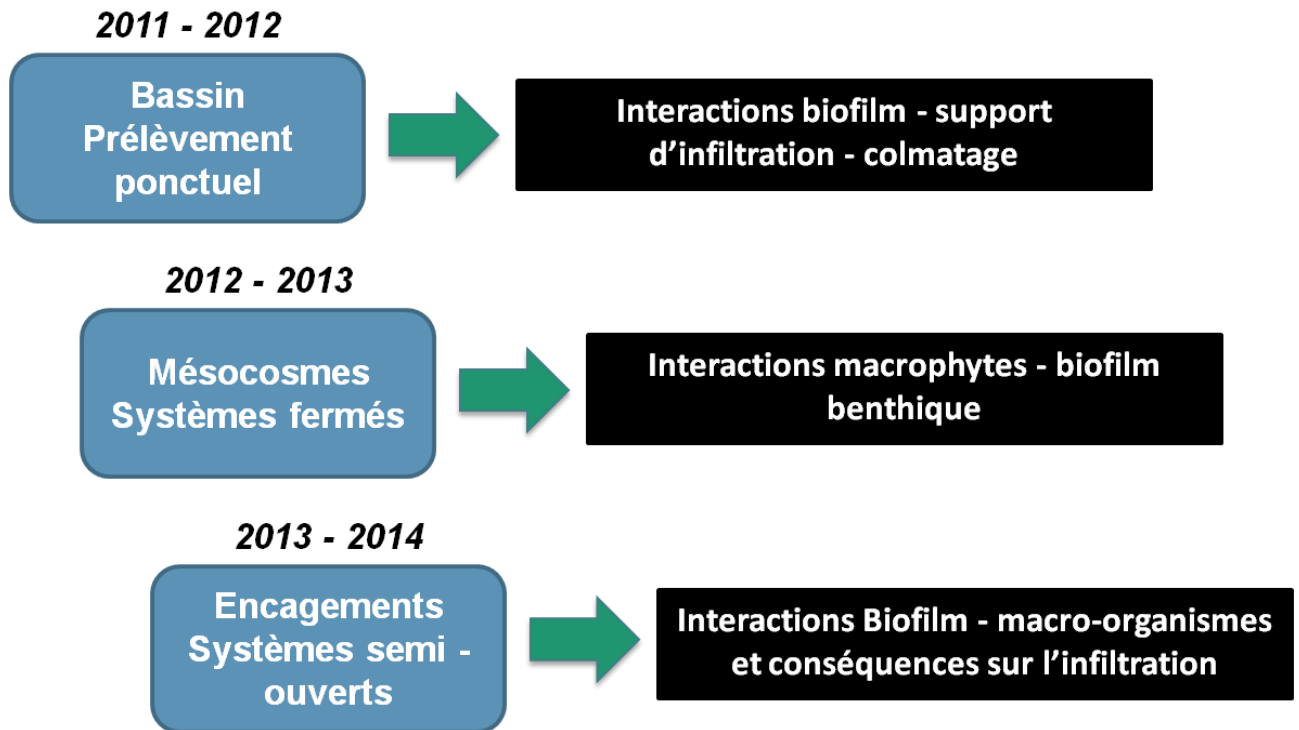


Figure 28 : Les trois expériences réalisées

La suite de cette partie détaille chacune des expérimentations réalisées en précisant les choix expérimentaux et les variables mesurées.

L'ensemble des protocoles correspondant sera détaillé dans la partie suivante, présentée sous forme d'article. Les méthodes de traitement (statistiques) des données sont également présentées dans les articles.

Les tableaux de résultats bruts de chacune des expériences sont quant-à-eux fournis en annexe.

II.1 Expérience 1 : Interactions Biofilm - Support d'infiltration - Colmatage

Afin d'étudier ces interactions, j'ai adopté une approche de terrain, en m'intéressant à plusieurs bassins d'infiltration caractérisés par des capacités d'infiltration contrastées. Dans ce contexte, une campagne de prélèvements ponctuels dans deux bassins jumelés, les 5.1 et 5.2 [Figure 23] a eu lieu à l'automne 2010. Cette approche permet en effet de comparer 2 bassins dont les caractéristiques initiales étaient identiques mais qui présentaient des capacités d'infiltration contrastées après plusieurs années d'exploitation.

II.1.1 Stratégie d'échantillonnage et mesures réalisées

Des prélèvements ont été réalisés par carottage au niveau de l'interface eau/sédiments. Ce choix d'un prélèvement ponctuel sous forme de carottes permet de préserver la structure verticale des sédiments et de déterminer leurs caractéristiques en fonction de la profondeur. En effet, l'étude bibliographique a mis en évidence la structuration verticale des biofilms phototrophes, ce qui a été confirmé lors de la campagne de prélèvements.

Une observation visuelle a permis de distinguer clairement 3 couches dans les carottes [Figure 38 et Figure 29] :

- une couche superficielle d'une épaisseur d'environ un à deux centimètres, avec développement d'un biofilm mixte (hétérotrophe/phototrophe) en surface,
- en dessous, une couche de sédiments plus fins, de couleur grisâtre, d'environ quatre à six centimètres d'épaisseur selon les bassins,
- enfin, une couche plus épaisse (entre 10 et 20 centimètres) de sable grossier dans le fond, avec présence de graviers.

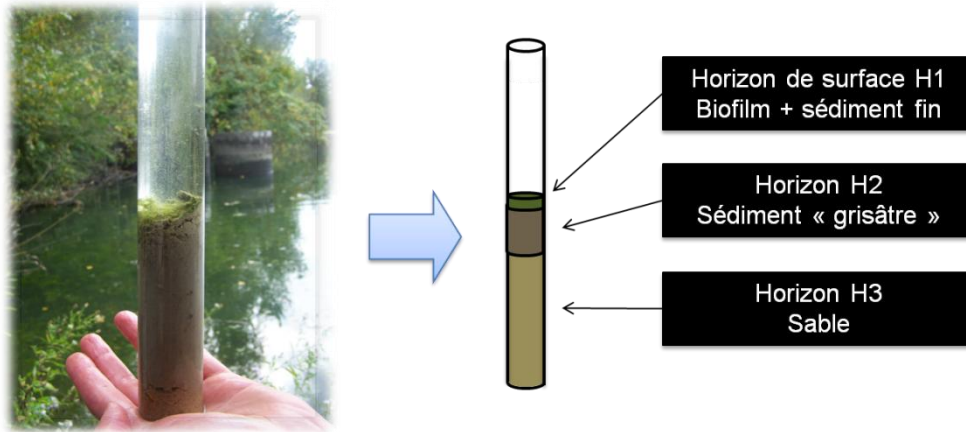


Figure 29 : structuration verticale d'une des carottes prélevées

Dans chaque bassin, des carottes ont été prélevées dans 3 zones différentes [Figure 31]. L'eau surnageante a été retirée en inclinant légèrement le tube en plexiglas. La structure verticale des sédiments a ensuite été conservée en poussant délicatement le contenu de la carotte par le fond et en découpant à la limite de chaque horizon [Figure 30].

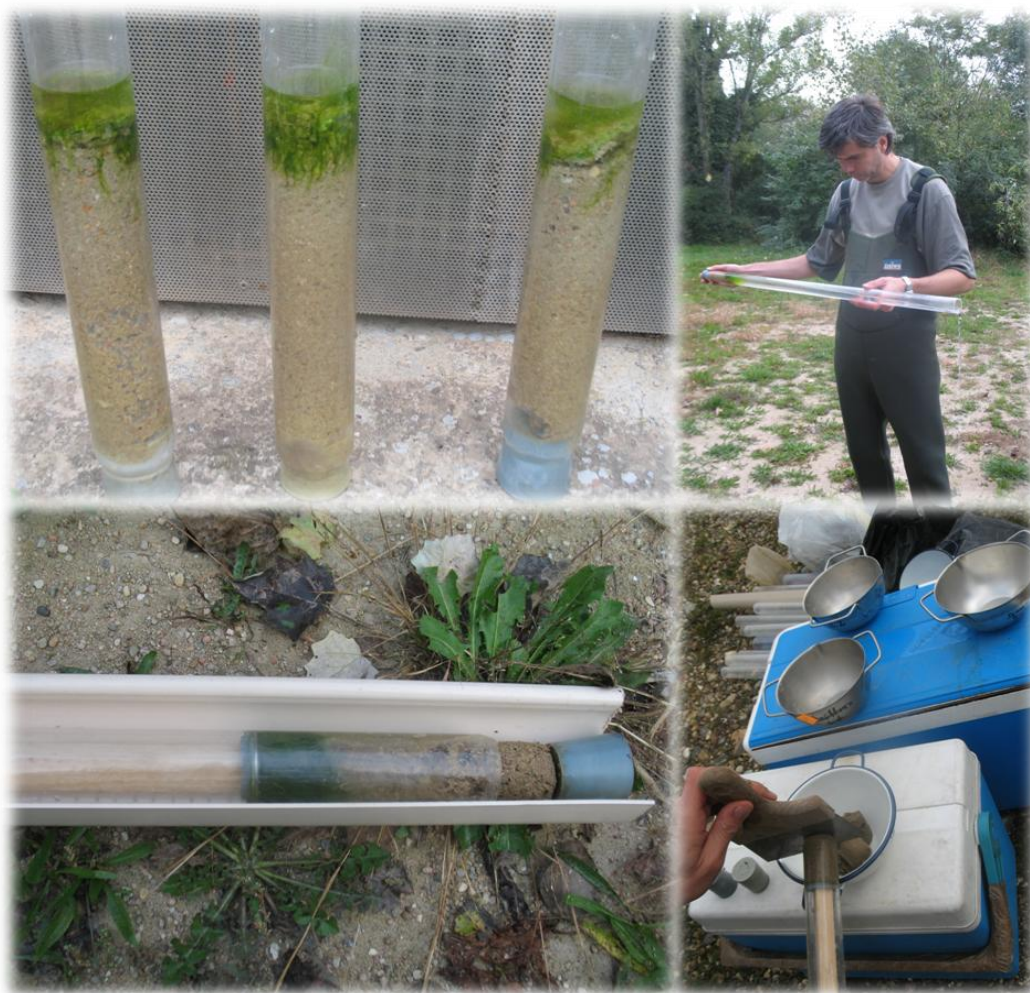


Figure 30 : Vidange et découpage des carottes, Photos LEHNA

Pour chaque zone, les trois carottes prélevées ont été regroupées pour construire des échantillons composites. Lors de cette étape, les 3 horizons ont été séparés afin d'obtenir 3 réplicats pour chaque horizon et par bassin [Figure 31].

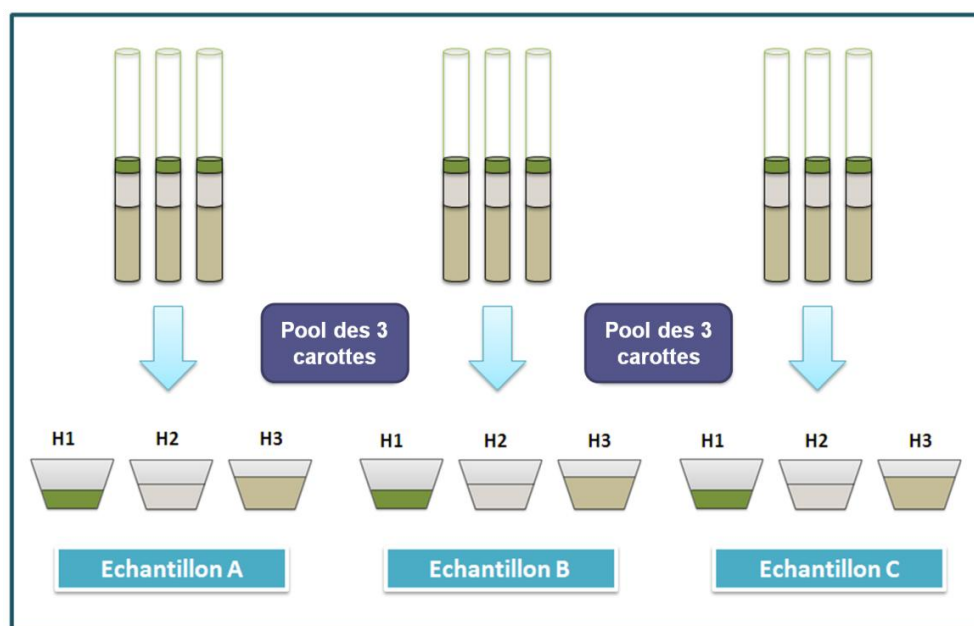


Figure 31 : Stratégie d'échantillonnage d'un bassin

Les sédiments prélevés ont été caractérisés par la mesure de variables physiques, chimiques et biologiques, couplée à des mesures évaluant le niveau de colmatage dans les bassins. J'ai choisi de tester des variables reflétant :

- La *structure et la texture des sédiments*, caractérisées par une mesure de la granulométrie des échantillons, et de leur niveau d'agrégation. **Cette mesure a été réalisée avant et après suppression de la composante organique pour déterminer le rôle du biofilm sur la texture et la structure des sédiments.**
- L'*état structurel et fonctionnel du biofilm*, caractérisé par des mesures permettant d'estimer d'une part la biomasse totale de même que la contribution des composantes algale et bactérienne ; et d'autre part les activités enzymatiques liées aux activités de respiration et de décomposition globale. Par ailleurs, ces analyses ont été complétées par des *mesures physico-chimiques* permettant d'estimer les quantités d'éléments majeurs (carbone, azote et phosphore, fer, etc.). L'absence de contaminants organiques (PCB, HAP) et inorganiques (métaux lourds) a également été vérifiée.

- La *capacité d'infiltration* des bassins, évaluée par des mesures d'infiltration réalisées *in situ*, **avec et sans couverture biologique**, selon la méthode « Beerkan », puis traité numériquement grâce à l'algorithme « BEST » (voir paragraphe ci-après).

II.1.3 Détail des mesures d'infiltration

II.1.3.1 Mesures *in situ* selon la méthode « Beekan »

La méthode Beerkan s'appuie sur la théorie de l'infiltration de l'eau dans les sols et permet d'estimer les propriétés hydrodynamiques effectives d'un milieu en vue d'une modélisation hydrologique des transferts à différentes échelles. Cette méthode est intéressante dans le sens où elle permet une détermination spatialisée précise des propriétés hydrodynamiques des sols, ceci en un temps réduit sur le terrain, facilitant la réplicabilité des essais (Braud *et al.*, 2005; Lassabatere *et al.*, 2006).

Les essais ont été réalisés dans les deux bassins d'infiltration étudiés, dans les zones où ont été prélevées les carottes, juste après la vidange des bassins mais avant assèchement du biofilm. En pratique, les mesures ont été réalisées *via* un anneau d'infiltration, c'est à dire un cylindre en acier de diamètre connu, $r_d = 65$ mm, enfoncé de quelques millimètres dans le sol, à la main, pour assurer l'étanchéité entre l'anneau et le sol [Figure 32]. L'anneau est biseauté à sa base afin d'une part de s'affranchir d'éventuelles fuites latérales d'eau, et d'autre part de détériorer le moins possible la surface étudiée, et notamment le tapis biologique.

Des volumes d'eau connus sont versés successivement dans l'anneau; le versement d'un nouveau volume se faisant immédiatement après l'infiltration complète du précédent. La méthode Beerkan se base, entre autres, sur la condition de charge hydraulique constante et nulle à la surface d'infiltration ; aussi, la lame d'eau créée par chaque volume d'eau ajouté dans le cylindre doit rester suffisamment faible (entre 3 et 5 mm). Le temps d'infiltration de chaque volume d'eau est relevé et une fois le régime permanent atteint, l'essai est achevé.

Cet essai fournit un ensemble de points expérimentaux correspondant au cumul des volumes d'eau infiltrés dans l'anneau en fonction du temps, qui, divisés par la surface de

l'anneau utilisé, permettent de définir la courbe d'infiltration cumulée. Si l'essai est mené à son terme, cette dernière comprend une partie correspondant au régime transitoire suivi d'une autre partie correspondant au régime permanent (taux d'infiltration permanent).

Outre les données directement liées à l'infiltration de l'eau (temps et volumes d'eau successifs), l'exploitation de l'essai d'infiltration selon la méthode Beerkan nécessite l'acquisition d'un jeu de données complémentaires : la texture du sol, la masse volumique sèche du sol, la teneur volumique en eau initiale près de l'emplacement de l'essai, et la teneur volumique en eau finale de la surface d'infiltration concernée.



Figure 32 : Photos des essais Beerkan, photos LEHNA.

Afin de mieux comprendre l'effet de la couche superficielle où se développe le biofilm phototrophe (horizon 1, Figure 29), ces essais ont été effectués dans un premier temps en conditions normales, avec le tapis algal non perturbé, puis l'horizon de surface a été retiré avant d'effectuer une seconde mesure sur le sol sous-jacent.

II.1.3.2 Estimation des paramètres hydrodynamiques par l'algorithme BEST

L'algorithme « BEST » (Beerkan Estimation of Soil Transfer parameters), décrit dans Lassabatere *et al.* (2006) et Lassabatere *et al.* (2013), a été développé pour estimer les propriétés hydrodynamiques de sols non saturés à l'aide d'une analyse inverse de la distribution granulométrique et de la courbe d'infiltration cumulative obtenue par le procédé Beerkan. Cette méthode emploie des techniques non-linéaires d'inversion des paramètres à partir des données expérimentales (granulométrie ou texture et courbe

cumulée d'infiltration). Les fonctions hydrauliques caractéristiques (à savoir $h(\theta)$ et $K(\theta)$) sont présupposées en termes de formulations analytiques (équations 7 et 8), et leurs paramètres sont déterminés par optimisation d'un modèle en minimisant les différences entre les données observées et les données simulées. Cette méthodologie est fréquemment employée pour des expériences de terrain (Lassabatere *et al.*, 2010; Yilmaz *et al.*, 2010).

Pour un milieu supposé homogène, sur la base de l'équation de van Genuchten (Equation 7) avec la condition de Burdine (Equation 7a) pour la courbe de rétention d'eau $h(\theta)$ et l'équation de Brooks et Corey (Equation 8) pour la courbe de conductivité hydraulique $K(\theta)$, la méthode Beerkan permet d'acquérir les cinq paramètres caractéristiques :

- (i) les deux paramètres de forme, n (ou m) et η , ils dépendent essentiellement de la texture du sol et sont déduits du traitement de la granulométrie ;
- (ii) la teneur en eau à saturation (θ_s), estimée par la mesure de masse volumique sèche et du calcul relatif de la porosité ;
- (iii) les deux paramètres d'échelle restant, K_s et h_g , ils dépendent essentiellement de la structure et sont estimés à partir de la courbe d'infiltration cumulée.

Les cinq paramètres à optimiser dépendent donc de la texture et de la structure du sol, et leur estimation est réalisée par l'analyse de la courbe expérimentale d'infiltration cumulée, des données granulométriques et de l'évolution de l'infiltration $I(t)$. L'estimation des différents paramètres est détaillée dans le rapport d'Angulo (2011).

II.2 Expérience 2 : interactions macrophytes – biofilm benthique

L'étude bibliographique a montré que le développement de micro-organismes sous forme épiphytique et phytoplanctonique pouvait être contrôlé par des effets allélopathiques ; aussi, cette deuxième expérience vise à étudier les effets de plusieurs macrophytes allélopathiques sur un biofilm benthique développé dans un bassin du site d'étude pour vérifier si de tels effets sont également observés dans nos conditions d'expérimentation.

II.2.1 une approche en « mésocosmes »

Pour évaluer les effets allélopathiques de plantes aquatiques sur le développement des biofilms des sédiments de bassin d'infiltration, différentes échelles d'expérimentation sont possibles comme l'illustre le paragraphe précédent. Dans le cadre de cette étude, Je souhaitais utiliser les biofilms colonisant les bassins d'infiltration de Crépieux-Charmy afin de prendre en compte la complexité des communautés microbiennes se développant en conditions naturelles. Nous avons donc opté pour une échelle d'expérimentation partiellement contrôlée afin de pouvoir répliquer nos traitements et maîtriser certains facteurs : une approche en mésocosmes placés « sur site ».

Utilisés depuis les années 1970 en écotoxicologie, les mésocosmes sont des systèmes expérimentaux délimités, plus ou moins clos qui constituent des échelles intermédiaires entre le laboratoire et la complexité du monde réel (Odum, 1984). Diverses classifications basées sur la taille ont été proposées pour distinguer les différentes catégories de cosmes (Bloesch *et al.*, 1988). Ces distinctions apparaissent en réalité peu utiles et controversées (Perceval *et al.*, 2009) ; on préfère aujourd'hui désigner les mésocosmes comme des systèmes artificiels placés en conditions environnementales naturelles et possédant à la fois assez de complexité et de stabilité pour être qualifiés d'autonomes (Caquet *et al.*, 1996). La définition de Petersen *et al.* (1999), qui décrit un mésocosme comme un écosystème expérimental clos, est intéressante à plusieurs titres : l'utilisation du terme « écosystème » met l'accent sur les 'interactions entre un ensemble d'espèces vivantes et un milieu physique ; l'introduction du terme « expérimental » montre que l'auteur n'a pas pour ambition la reproduction plus ou moins réduite d'un écosystème naturel ;

enfin, le terme « clos » rappelle la limite spatiale de ces systèmes expérimentaux où les échanges s'exerçant avec les écosystèmes (terrestre, aquatiques et souterrains) sont exclus.

Les études de terrain sont rarement capable de discerner la contribution d'un facteur lors d'un effet global répondant à de nombreux facteurs (Pusey *et al.*, 1994) ; les systèmes partiellement contrôlés comme les mésocosmes offrent ainsi une passerelle, un moyen d'examiner l'effet d'un facteur en particulier. L'utilisation ce type de système soulève majoritairement deux questions : le réalisme et la répliquabilité (Kosinsky, 1989), mais ces questions concernent principalement les études en rivières, qui possèdent des écoulements différents, et des substrat variables (galets, sédiments, ripisylve). Or ici, nous nous intéressons à des bassins d'infiltration qui présentent donc des propriétés d'écoulement et un substrat relativement stable, la mise en place de mésocosmes semble donc particulièrement adaptée. Elle permet de maîtriser partiellement les conditions expérimentales et finalement d'améliorer la description des relations entre causes et effets (Geffard *et al.*, 2010) Ce choix est également pertinent car il permet de réduire l'influence des facteurs liés à la variabilité spatiale des biofilms et d'éviter la dissémination des plantes aquatiques dans le milieu, une des contraintes liée au site d'étude .

II.2.2 Sélection des macrophytes

Suite à l'étude bibliographique et devant les contraintes associées au site d'étude, les macrophytes ont été sélectionnées selon plusieurs critères : (i) un caractère allélopathique reconnu dans la bibliographie ; (ii) un effet « ombrage » potentiellement important pouvant limiter le développement de la composante phototrophe des biofilms ; (iii) un réseau racinaire susceptibles de modifier la structure du sédiment, (iv) un caractère autochtones pour respecter l'espace Natura 2000.

Le Tableau 4 ci-après compare les principaux macrophytes rencontrées en région Rhône-Alpes, au regard de ces critères de sélection et de leur potentielle « adaptabilité » au site d'étude.

Macrophytes	Présence sur le site Natura 2000	Système racinaire	Conditions de vie	Micro-algues inhibées par allélopathie
<i>Potamogeton sp</i>	Oui	Rhizome avec de nombreuses racines adventives	Eaux calmes, peu profondes	Cyanobactéries (<i>Microcystis aeruginosa</i>), algues vertes (<i>Chlorella pyrenoidosa</i>)
<i>Elodea canadensis</i>	Non et invasive	Racines adventives sur les tiges	Cours d'eaux lents, mais adaptation à d'autres milieux possible	Cyanobactéries, algues vertes, diatomées (<i>Nitzschia palea</i>)
<i>Ceratophyllum demersum</i>	Non	Aucun	Cours d'eaux lents, milieux stagnants	Cyanobactéries, diatomées, algues vertes
<i>Vallisneria spiralis</i>	Non	Système racinaire fasciculé dense	Eaux calmes, peu profondes, claires	Cyanobactérie (<i>Microcystis aeruginosa</i>)
<i>Myriophyllum spicatum</i>	Non et invasif	Racines adventives nombreuses sur les tiges	Cours d'eau lents, milieux stagnants	Cyanobactéries, algues vertes
<i>Chara globularis</i>	Oui	Rhizoïdes formés par les cellules nodales de la base de la plante	Milieux stagnants oligotrophes	Cyanobactéries, algues vertes, diatomées
<i>Hippuris vulgaris</i>	Non	Rhizome avec de nombreuses racines adventives	Cours d'eau lents, milieux stagnants	Cyanobactérie (<i>Anabaena variabilis</i>)
<i>Berula erecta</i>	Non	Système racinaire fasciculé dense	Cours d'eau lents, milieux stagnants	Diatomées (<i>Nitzschia palea</i>)

Tableau 4 : Comparaison des macrophytes en fonctions des critères de sélection (Sculthorpe, 1967; Hu et Hong, 2008)

Comme expliqué précédemment, les enjeux relatifs aux milieux naturels du site d'étude sont très importants, c'est pourquoi le caractère non invasif des plantes sélectionnées pour l'expérimentation a été notre premier critère de choix. Ainsi, les élodées et les myriophylles, très invasifs et non autochtones, n'ont pas été retenus. Le caractère allélopathique, l'ombrage potentiel et le type d'enracinement m'ont finalement conduit à sélectionner les espèces suivantes :

- *Vallisneria spiralis* L.



Figure 33 : Photos de *Vallisneria spiralis* (Corolla et Kupper, 2014)

La Vallisnérie est une plante aquatique entièrement immergée dont la hauteur varie de 30 cm à 1 m. Elle possède de longues feuilles en ruban regroupées en rosette sur le stolon. Son système racinaire est aussi développé autour du stolon [Figure 33]. C'est une plante vivace et pérenne rencontrée surtout en plaine, elle préfère les cours d'eau à courant lent ou les lacs. On la trouve dans les zones peu profondes et bien éclairées (Corolla et Kupper, 2014). Xian *et al.* (2006) ont montré que les composés allélopathiques extraits des vallisnéries avaient un effet algicide sur *Microcystis aeruginosa*, une cyanobactérie d'eau douce très commune en France, potentiellement présente dans les biofilms aquatiques naturels.

- *Ceratophyllum demersum* L.

Ceratophyllum demersum est une plante aquatique strictement immergée. Elle peut être fixée ou flottante. Elle se développe préférentiellement dans des cours d'eau à faible courant ou dans les milieux stagnants, dans les zones où la lumière est la plus intense. Les racines sont absentes et remplacées par des rhizoïdes qui apparaissent sur les tiges et permettent à la plante de se fixer (Corolla *et al.*, 2014).



Figure 34 : Photos de *Ceratophyllum demersum* (Corolla et al., 2014)

Le caractère allélopathiques de *Ceratophyllum demersum* envers plusieurs micro-algues est reconnu et a été beaucoup étudié (Wium-Andersen et al., 1983; Körner et Nicklisch, 2002; Gross et al., 2003). Hu et Hong (2008) expliquent que ce macrophyte peut produire des composés sulfurés capables d'inhiber la croissance d'espèces phytoplanctoniques. Cette inhibition de croissance peut s'expliquer par une inhibition de l'activité photosynthétique des micro-algues, liée à une altération des processus de fixation du carbone ou de l'activité du photosystème II.

- *Berula erecta* (Huds) Coville



Figure 35 : Photos de *Berula Erecta*, LEHNA et Bostelmann (2000)

Berula erecta une plante semi-aquatique, aux tiges creuses, poussant sous l'eau et capables de se redresser jusqu'à un mètre de hauteur. Comme souvent chez les plantes aquatiques, les feuilles submergées ont une forme différente des feuilles aériennes [Figure 35]. L'enracinement de la plante est robuste et relativement profond. Ses habitats sont les eaux peu profondes, sur des substrats plutôt calcaires. Elle est souvent retrouvée

en bordure de cours d'eau, d'étangs et de zones humides plus ou moins permanentes. C'est une espèce relativement abondante en France. La revue de Hu et Hong (2008) montre que *Berula erecta* est capable d'inhiber la photosynthèse de la diatomée *Nitzschia palea* via des mécanismes allélopathiques.

- *Chara globularis* L.



Figure 36 : Photos de *Chara globularis* (Corolla et Rochefort, 2012)

Les Characées sont des macro-algues de 10 à 30 cm, se développant dans les eaux douces ou très légèrement saumâtres. Elles sont répandues dans les lacs et étangs, ou dans les anciens méandres de cours d'eau. Elles forment des herbiers souvent mono-spécifiques et denses [Figure 36]. Elles supportent mal la concurrence des autres plantes et occupent donc des niches écologiques non colonisées par les macrophytes angiospermes. Les Characées n'ont pas de racines et sont fixées par des rhizoïdes qui ne pénètrent pas profondément dans le sédiment (Corolla et Rochefort, 2012). Berger et Schagerl (2004) ont montré que *Chara globularis* pouvait inhiber la croissance de cyanobactéries par des effets allélopathique ; et l'étude de Van Donk et Van de Bund (2002) associe les characées à une forte inhibition des algues phytoplanctoniques.

Le choix de ces 4 espèces est, de plus, pertinent au regard de leurs capacités à tolérer une large gamme de caractéristiques physico-chimiques et de leur représentativité dans les écosystèmes rhônalpins. Les plantes utilisées pour l'expérience ont d'ailleurs été prélevées dans des îlons du Rhône (bras secondaires plus ou moins déconnectés) et acclimatées pendant plusieurs semaines au sédiment des bassins dans des bacs de 250 L disposés sur le site, avant leur introduction dans les mésocosmes [Figure 37].

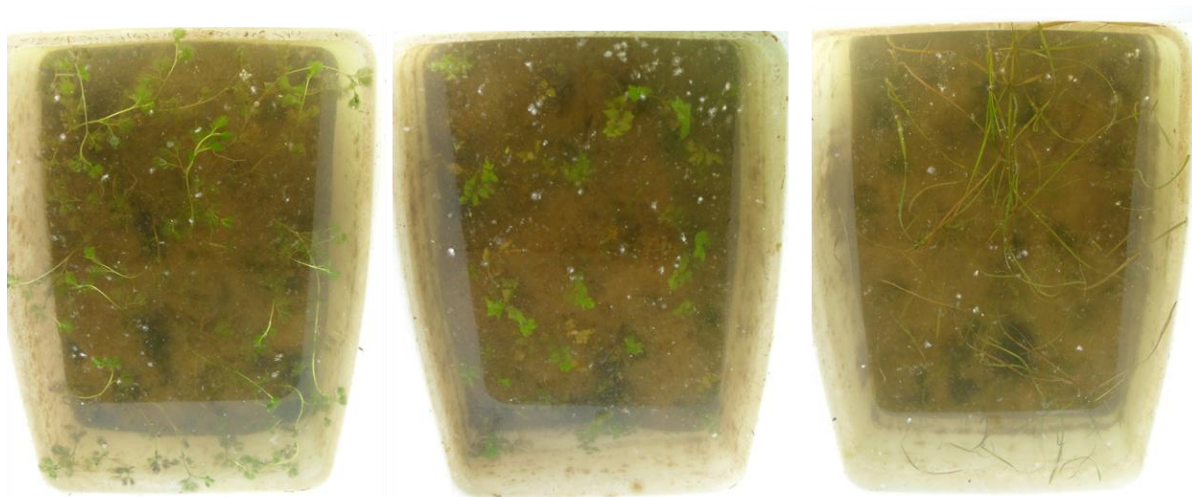


Figure 37 : Les bacs d'acclimatation avec de gauche à droite, *C. demersum*, *B. erecta* et *V. spiralis*

II.2.3 Système expérimental

Les mésocosmes sont des bacs en plastique de 40 L de dimensions 39.5 x 34 x 29.3 cm. Ils ont été remplis avec la couche superficielle des sédiments prélevés dans un des bassins du champ captant, le 3.1 [Figure 23], en veillant à conserver leur structure verticale. Pour ce faire, les prélèvements de sédiment ont été effectués juste après la vidange du bassin, c'est-à-dire avant l'assèchement des biofilms mais en période d'exondation. Pour rappel, Le substrat des bassins d'infiltration présentent trois couches distinctes [Figure 38 et Figure 29], la hauteur prélevée pour le remplissage des bacs correspondait aux deux premiers horizons (biofilm phototrophe + sédiments de couleur « grisâtres », influencés par les particules fines).



Figure 38 : Photo d'une coupe dans le substrat des bassins, VEOLIA.

Dans un premier temps, le fond des bacs a été rempli avec environ 5 cm de sédiments provenant de l'horizon 2. Puis la couche superficielle, qui présentait un biofilm phototrophe dense sous forme de couverture biologique, a été prélevée avec une pelle plate comme on peut le voir sur la Figure 39. Cette couche, non destructurée, comprend l'horizon 1 colonisé par les phototrophes et une partie de l'horizon 2. Elle a ensuite été délicatement disposée dans les bacs.

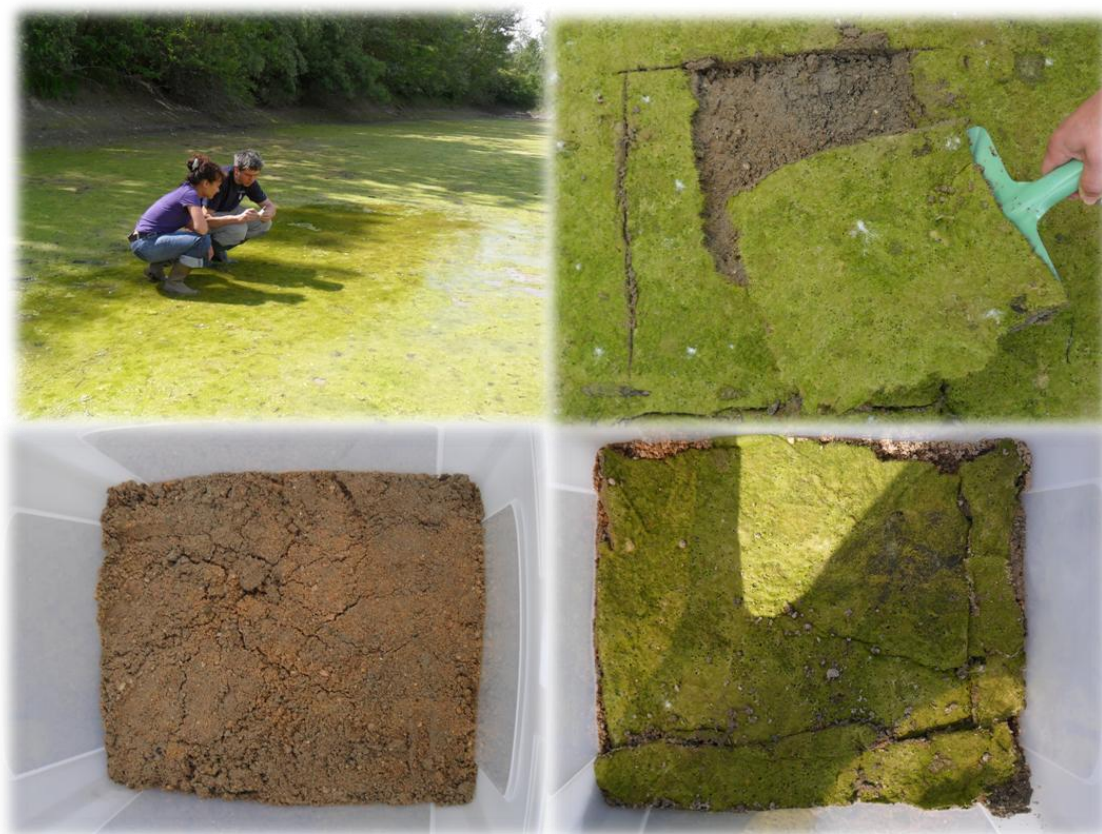


Figure 39 : Préparation des mésocosmes : introduction des sédiments colonisés

Après introduction des sédiments les mésocosmes ont été placés sur le site, à proximité d'un des pré-bassins. Les bacs ont été orientés est/ouest, et disposés selon deux rangées afin que leurs conditions d'exposition à la lumière soient les plus comparables possibles [Figure 40]. Les bacs ont été disposés dans un endroit ombragé pour éviter toute exposition directe au soleil, ceci pour que l'eau ne chauffe pas trop et que les plantes ne subissent pas de photo inhibition. Les bacs ont été protégés au moyen de canisses situées à 1.80 m du sol. Les canisses utilisées sont en bambou fendu, leur taux d'occultation est de 90 %. Les bacs ont également été protégés des introductions d'insectes et des débris

végétaux par des moustiquaires blanches en plastique imputrescible de maille 1.2 * 1.2 mm permettant le passage de la lumière.



Figure 40: Présentation du dispositif expérimental

Les bacs ont été remplis avec l'eau du pré-bassin. Cette source d'alimentation a été choisie car c'est la source d'alimentation des bassins, ce qui permet de se placer au plus près des conditions réelles d'exploitation [Figure 41]. Par ailleurs, cette eau contient suffisamment de nutriments pour permettre le maintien du biofilm au cours de l'expérience et, *a priori*, des plantes dont le caractère oligotrophe est évoqué dans la bibliographie. De plus, étant alimenté par le Vieux Rhône, le pré-bassin contient toujours de l'eau contrairement aux bassins d'infiltration dont l'alimentation avait été stoppée pendant cette expérience, du fait des chasses du Rhône.



Figure 41 : Le pré-bassin (à gauche) et le remplissage des bacs (à droite)

II.2.4 Plan expérimental

Le schéma expérimental défini comporte 5 traitements : 4 traitements « tests » correspondant aux 4 espèces de plantes sélectionnées et 1 traitement « témoin » ne comportant aucune plante. Les « tests » ont fait l'objet de 4 réplicats et les « témoins » ont fait l'objet de 6 réplicats, pour un total de 22 mésocosmes. La localisation de chaque traitement et des témoins a été déterminée de façon aléatoire parmi les bacs installés.

L'expérimentation a débuté 9 jours après l'installation et le remplissage des mésocosmes, un temps laissé pour que les systèmes se stabilisent, notamment du fait des sédiments remis en suspension lors du remplissage. Trois ou quatre individus de chaque espèce de macrophytes ont été introduits par mésocosme, selon leur taille, de manière à obtenir une biomasse équivalente dans chaque bac, correspondant au temps t_0 de l'expérience [Tableau 5].

Durée d'exposition (jours)	Temps	Opérations
	$t_0 - 21$ j	Acclimatation des plantes
	$t_0 - 10$ j	Remplissage des mésocosmes : eau + sédiments
0	$t_0 - 1$ j	Introduction des plantes acclimatées
1	t_0	Caractérisation : colonne d'eau / plantes / sédiments / biofilms
7	t_1	Caractérisation : colonne d'eau / plantes
13	t_2	Caractérisation : colonne d'eau / plantes
21	t_3	Caractérisation : colonne d'eau / plantes
28	t_5	Caractérisation : colonne d'eau / plantes
36	t_5	Caractérisation : colonne d'eau / plantes
41	t_f	Caractérisation : colonne d'eau / plantes / sédiments / biofilms

Tableau 5 : Planning de l'expérience 2.

La durée des essais a été fixée à 6 semaines. Il s'agit d'un compromis entre une durée minimale permettant l'adaptation des plantes et leur croissance et une durée maximale limitant une altération du biofilm liée à un plus faible apport de cellules immigrantes. Durant l'expérience, un tiers de l'eau des bacs a été renouvelé de façon hebdomadaire afin d'éviter de trop fortes élévations de température et de garantir un minimum d'apport en nutriments pour les plantes et le biofilm. Ce volume se veut par ailleurs

raisonnable pour éviter tout choc thermique ou physique (effets « splash ») risquant d'entraîner un stress physiologique des plantes et du biofilm et/ou une déstructuration des sédiments par brassage de l'eau.

II.2.5 stratégie d'échantillonnage et mesures réalisées

Deux types de prélèvements ont été effectués au cours de l'expérience : en début (t_0) et en fin d'essais (t_f) d'une part, et de manière hebdomadaire d'autre part. Les suivis à t_0 et à t_f sont des suivis approfondis, ayant pour objectif une mesure de variables physiques, chimiques et biologiques reflétant l'état des biofilms, des plantes et des caractéristiques physico-chimiques de l'eau. Le suivi hebdomadaire a pour but de déterminer les caractéristiques physico-chimiques de l'eau ainsi que l'état physiologique des plantes.

Les prélèvements de sédiments ont été effectués au moyen d'une seringue coupée (\varnothing 23 mm) permettant de collecter précisément la couche superficielle (0-1 cm). Cette méthode permet ainsi de connaître exactement la surface et la hauteur, donc le volume de sédiments prélevé. Quatre prélèvements ont aléatoirement été collectés dans chaque bac à t_0 et t_f . Ces quatre prélèvements ont ensuite été regroupés dans un bol et homogénéisés à la spatule afin de constituer un échantillon composite à partir duquel 4 sous-échantillons ont été préparés pour les *mesures biologiques* ($C_{\text{organique}}$ et N_{total} , activités enzymatiques, biomasse totale, algale et bactérienne). A t_f , toute la composante algale de la colonne d'eau a également été récupérée à l'aide d'un filtre.

Les échantillons d'eau des bacs et du pré-bassin ont été prélevés de manière hebdomadaire au moyen d'un filtre-seringue pour mesurer l'évolution des *concentrations en nutriments* (ammonium, nitrates et orthophosphates).

Enfin, des prélèvements ont été réalisés de manière hebdomadaire sur les plantes et le biofilm pour un suivi de leur *état physiologique*.

II.3 Expérience 3 : Interactions Biofilm – macro-organismes et conséquences sur l’infiltration

Cette dernière expérience vise à évaluer l’influence de facteurs biotiques (introduction de macro-organismes) et abiotiques (ombrage) sur les biofilms benthiques d’une part, et sur les capacités d’infiltration d’autre part. Elle reprend donc toutes les composantes étudiées dans le cadre de cette thèse.

II.3.1 Une approche en engagements *in situ*

La partie précédente expliquait l’intérêt des systèmes expérimentaux clos, qui permettent de limiter les biais en contrôlant certains facteurs. Les mésocosmes sont donc une solution intéressante pour étudier des interactions entre organismes ; en revanche, ils ne permettent pas de déterminer les effets de ces interactions sur la perméabilité. Aussi, pour cette dernière expérience, nous avons choisi de nous placer à une échelle intermédiaire entre les mésocosmes fermés et l’étude *in situ* [Figure 27] avec des engagements placés directement dans un bassin. En plus de se placer au plus près des conditions d’exploitation des bassins, ces systèmes semi-ouverts permettent de réaliser des mesures d’infiltration tout en contrôlant certains facteurs, comme la densité des organismes introduits.

Cette expérience a été réalisée à l’automne 2013, après que les travaux sur la station d’alerte aient été terminés pour que les bassins soient alimentés. Après avoir inspecté les différents bassins, nous avons choisi le bassin 4.2 qui présentait un état « intermédiaire », c’est-à-dire :

- (i) Qu’aucune opération de décolmatage n’avait eu lieu dans l’année
- (ii) Qu’un biofilm se développait clairement à l’interface eau/sédiment
- (iii) Que les relevés effectués par l’exploitant (Veolia) indiquaient un niveau de colmatage moyen intermédiaire comparé aux autres bassins du site.

II.3.2 Sélection des traitements

Les macro-organismes testés consistaient en 2 macrophytes et 2 invertébrés. Concernant les macrophytes, elles ont été sélectionnées au regard des résultats obtenus lors de l’expérience en mésocosmes. Deux espèces ont en effet montré un effet inhibiteur sur le

biofilm lors de cette expérience : *Vallisneria spiralis* L. et *Chara globularis* L. Ce sont donc ces deux espèces qui ont été choisies pour l'expérience en engagements in situ.

Concernant les invertébrés utilisés, l'étude bibliographique a mis en avant l'intérêt de deux groupes : les consommateurs de biofilm et les bioturbateurs. Deux espèces correspondant à ces groupes ont donc été sélectionnées selon différents critères :

- (i) Des espèces supportant un engagement immergé ; aussi, tous les insectes étaient à proscrire puisque seul leur stade larvaire est aquatique.
- (ii) Des espèces non pulmonées, c'est-à-dire qui n'ont pas besoin de remonter à la surface pour respirer (c'est par exemple le cas des limnées).
- (iii) Des espèces autochtones et non-invasives, toujours dans l'objectif de respecter l'espace Natura 2000.

Face à ces différentes contraintes, les espèces suivantes ont finalement été choisies :

- *Le gastéropode Viviparus viviparus (Linnaeus, 1758)*



Figure 42 : Photos de *Viviparus viviparus* (Kupfer et Corolla, 2014)

Les *Viviparus viviparus* sont des gastéropodes mesurant de 2 à 4 cm de hauteur, pour 2 à 3 cm de largeur à l'âge adulte. Leur coquille épaisse est de couleur jaune à brun verdâtre avec trois lignes plus foncées, et spiralée à enroulement dextre - ouverture à droite de l'axe médian lorsque la coquille est tenue verticalement, pointe en haut et ouverture vers soi. Ces animaux vivent sur différents supports (rocheux, sableux, ou organiques), dans des cours d'eau à débit lent ou parfois dans des bassins d'eau stagnante. On les retrouve partout en France - notamment dans les lônes du Rhône en région lyonnaise - exceptées dans les régions méditerranéennes (Kupfer et Corolla, 2014).

Ces gastéropodes sont herbivores –détritivores et se procurent leur nourriture à la fois par broutage et par filtration (Hockelmann et Pusch, 2000). Ils se nourrissent principalement de détritus si c'est la source de nourriture la plus abondante, qui peuvent constituer jusqu'à 90% des aliments ingérés (Jakubik, 2009). En revanche, si les algues sont abondantes, et c'est le cas dans les bassins étués, les *V. viviparus* se comportent en brouteurs et consomment principalement des algues vertes et des diatomées (Liess et Kahlert, 2007; Jakubik, 2009). Leur rôle de brouteur, leur caractère autochtone ainsi que leur grande taille facilitant leur encagement font des *V. viviparus* des candidats idéaux pour être utilisés dans le cadre de notre étude.

- *L'oligochète Limnodrilus hoffmeisteri* (Claparède, 1862)



Figure 43: Photos de *Limnodrilus hoffmeisteri*, LEHNA et Island Creek (2014)

Les *Limnodrilus hoffmeisteri* sont des oligochètes aquatiques d'environ 15-35 mm de longueur pour un diamètre d'une fraction de millimètre, appartenant à la famille des tubificidés. Ils vivent dans tous les habitats d'eau douce avec un faible courant. Ils possèdent une tête simple de forme conique et un long corps cylindrique composé de nombreux segments. Les segments présentent 4 faisceaux de soies, qu'ils utilisent pour se déplacer ou s'enfouir dans les 10 premiers centimètres de sédiment [Figure 44]. Ces vers apparaissent le plus souvent de couleur rouge, en raison d'un pigment respiratoire, l'hémoglobine (Island Creek, 2014).

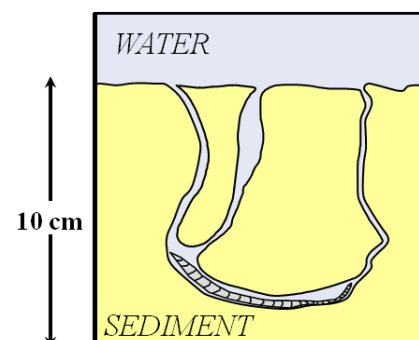


Figure 44 : Schéma de l'activité de bioturbation, G. Nogaro et F. Mermillod-Blondin

Dans de précédentes études menées au laboratoire, ces vers tubificidés ont montré une activité de bioturbation susceptible de modifier la structure des sédiments et de limiter le colmatage (Nogaro *et al.*, 2006) ; ainsi que des effets sur la redistribution des particules, la décomposition de la matière organique, les flux de nutriments et les activités microbiennes (Mermillod-Blondin *et al.*, 2001). Ils sont donc tout indiqués pour être des acteurs performants à une échelle plus réaliste.

Les deux macrophytes ainsi que les gastéropodes ont été prélevés dans des lônes du Rhône tandis que les vers provenaient d'un élevage (Grebil Père & Fils S.A., Arry, France). Comme pour l'expérience précédente, tous les organismes ont été acclimatés aux sédiments du bassin 15 jours avant leur introduction dans les encagements.

Le traitement ombrage

L'étude bibliographique a mis en évidence l'importance de la ressource lumineuse pour les biofilms phototrophes ; aussi, un cinquième traitement visant à limiter la croissance de la composante phototrophe des biofilms a été mis en place. Ce traitement devait permettre le passage de l'eau pour que l'infiltration puisse avoir lieu en conditions normales, tout en limitant le passage de la lumière. Nous avons opté pour la mise en place de plaque en inox perforé atténuant la lumière à 10% de sa valeur initiale.

II.3.3 Design expérimental

Les encagements consistaient en des cylindres en inox de 30 cm de diamètre pour une hauteur de 14 cm ; enfoncés d'environ 11 cm dans les sédiments du bassin 4.2. Un total de 36 encagements a été installé dans le bassin. Pour chacun des 5 traitements présentés précédemment, six cages (= 6 réplicats) ont été sélectionnées aléatoirement, les 6 cages restantes servant de réplicats « témoin » permettant de contrôler l'évolution des différents paramètres sans application d'un traitement particulier [Figure 45].

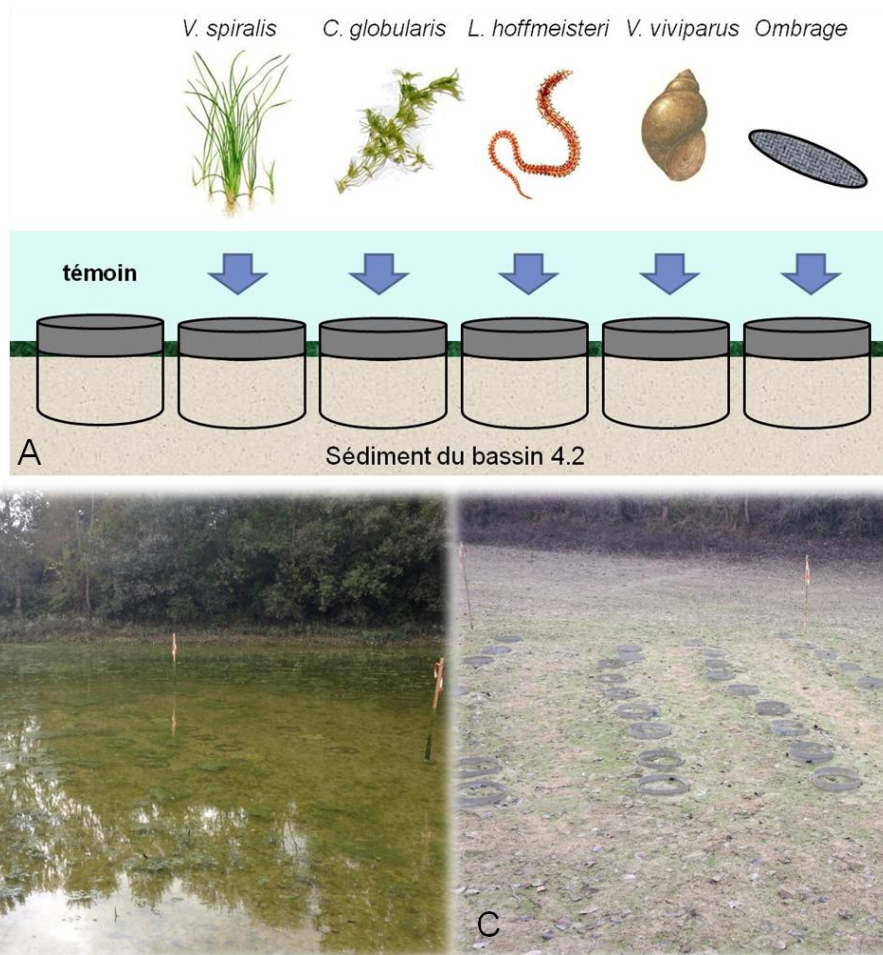


Figure 45 : Présentation du système expérimental – (A) les traitements, (B) les encagements immergés, (C) les encagements après la fin de l'expérience, le bassin vidé.

Pour éviter la fuite des gastéropodes, des filets blancs de maille 0.5 cm ont été installés au sommet des encagements correspondants aux traitements *Viviparus viviparus* [Figure 46]. Les mêmes filets ont été placés sur 3 encagements témoins afin de mesurer l'effet possible des filets sur le biofilm et le colmatage. Sinon, aucun filet n'a été mis en place

sur les trois encagements témoin restant, ceux avec macrophytes et vers tubificidés, ces derniers restant dans les premiers centimètres de sédiment.

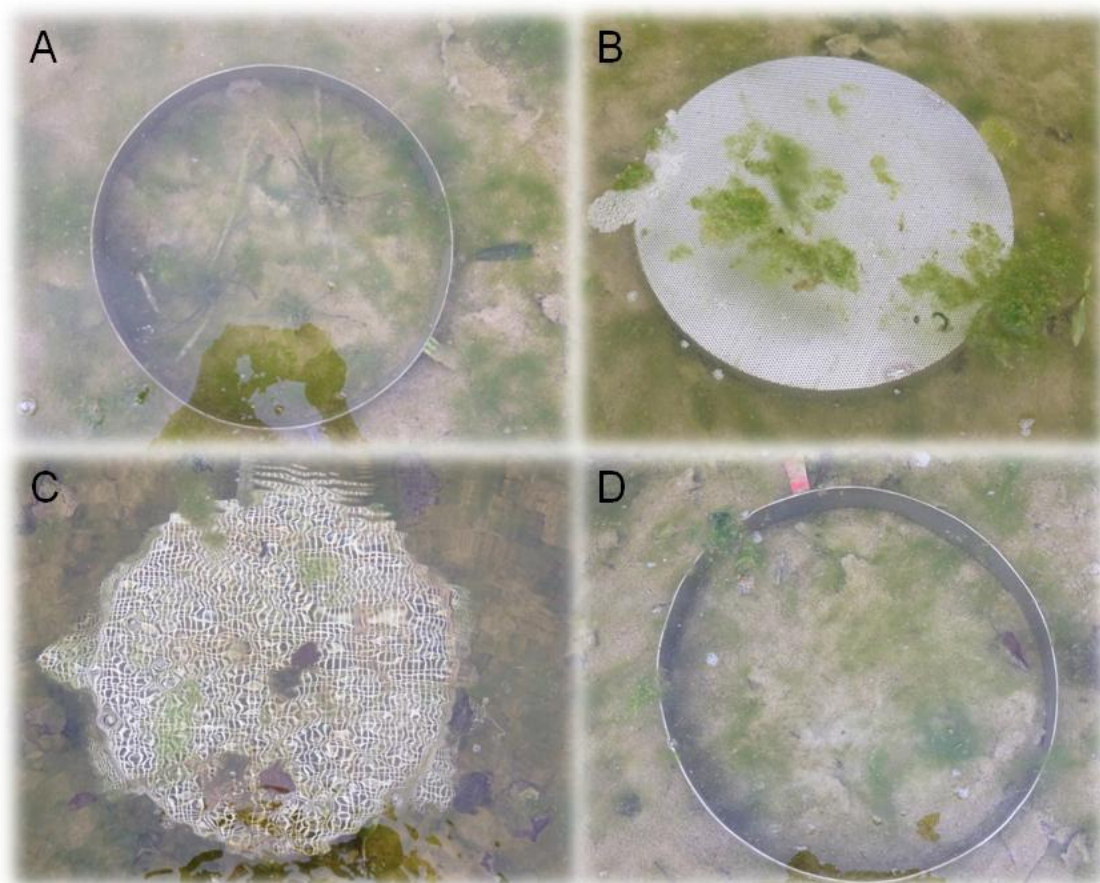


Figure 46 : Les encagements de (A) *V. spiralis*, (B) Ombrage, (C) *V. viviparus* et (D) *L. hoffmeisteri*

Le temps t_0 correspond à la mise en place des traitements, le 1^{er} octobre 2013. Les 6 répliqués de chaque traitement ont été aléatoirement répartis parmi les 36 encagements installées dans le bassin. Les systèmes ont ensuite été laissés dans le bassin pendant une durée de 38 jours, le temps final étant le 7 novembre 2013.

Durant l'expérience, les characées (*Chara globularis*) ont montré une mauvaise acclimatation et ont rapidement périclité dans les encagements. Aussi, les **traitements associés à cette espèce ne seront pas pris en compte dans la partie résultats & discussion de ce manuscrit.**

II.3.4 Stratégie d'échantillonnage et mesures réalisées

Comme pour l'expérience précédente, des prélèvements ont été effectués dans l'ensemble des encagements en début (t_0) et en fin d'essais (t_f) au moyen d'une seringue coupée (\varnothing 23 mm) permettant de collecter précisément la couche superficielle (0-1 cm). Dix prélèvements ont aléatoirement été collectés dans chaque encagement à t_0 et t_f puis regroupés et homogénéisés. Les sédiments ainsi collectés ont été caractérisés par des *mesures biologiques* (teneurs en protéines, activités enzymatiques, biomasse totale, algale et bactérienne), complétées par les teneurs en $C_{organique}$, N_{total} ; et des *mesures physiques* (granulométrie avant et après passage aux ultrasons). Des prélèvements de plantes et de biofilm ont également été réalisés pour un suivi de leur activité et efficacité photosynthétique, reflétant leur *état physiologique*.

Les échantillons d'eau ont été prélevés de manière hebdomadaire dans le bassin pour mesurer l'évolution du *carbone organique dissous*, des *concentrations en nutriments* (ammonium, nitrates et orthophosphates) et des *paramètres physico-chimiques* (pH, température, oxygène dissous, conductivité électrique) susceptibles d'influencer le développement biologique.

Des *mesures d'infiltration* ont été réalisées à t_0 et t_f en utilisant la « falling head method » (Rodgers et Mulqueen, 2006; Pedescoll *et al.*, 2009; Pedescoll *et al.*, 2011) qui consiste à réaliser des essais d'infiltration à charge variable sur un milieu saturé en eau et avec présence d'une colonne d'eau. En effet, nous avons la volonté de travailler sur un bassin en eau, notamment pour que le biofilm ne subissent aucun stress lié à des assecs.

II.3.5 Détail des mesures d'infiltration :

Un tube gradué (\varnothing 5 cm, h 100 cm) a été inséré à une profondeur d'environ 5 mm dans le sédiment pour assurer l'étanchéité du contact entre tube et sédiment, et éviter toute perte latérale. De l'eau a ensuite été versée dans le tube jusqu'à atteindre le bord supérieur, au temps zéro de la mesure. Pour chaque centimètre parcouru par l'eau, les temps successifs ont été enregistrés [Figure 47] afin d'obtenir un jeu de données permettant de tracer une courbe d'infiltration $I(t)$. Cette mesure a été répétée 5 fois

dans chaque encagement à t_0 et t_r , pour obtenir un total de 300 essais (5 essais x 30 encagements x 2 temps).



Figure 47 : Les mesures d'infiltration sur le terrain

Afin de limiter la durée des manipulations, l'essai a été interrompu avant que la hauteur d'eau dans la colonne soit parvenue à son point d'équilibre. En effet, une modélisation numérique a permis de montrer que l'exploitation des essais ne nécessite pas de connaître le temps d'atteinte de l'équilibre (voir Elaphos (2014)). Cette modélisation a montré que la caractérisation d'un milieu **saturé** par un essai d'infiltration à charge variable revient à résoudre un problème à un seul degré de liberté, aussi, seul un paramètre peut être déterminé lors de l'essai d'infiltration. Nous avons choisi d'utiliser

les résultats des essais d'infiltration pour déterminer K_s . Quant-à la teneur en eau à saturation θ_s , des études de sensibilité ont montré que sa valeur n'exerçait aucune influence sur les résultats obtenus.

Suite à la mise au point de la méthode de traitement de ces données (Elaphos, 2014), toutes les données ont été traitées comme suit :

1. Les données ont en premier lieu été normalisées

$$h^* = \frac{h - h_0}{h_{ini} - h_0} \quad (\text{Eq. 9})$$

Avec h , la pression de surface dans le tube, h_{ini} , la pression de surface à $t = t_0$ (hauteur d'eau dans le tube), et h_0 , la pression de surface à l'équilibre (hauteur d'eau dans le bassin au moment de l'essai).

2. Ensuite K_s est estimée comme proportionnelle à l'évolution des hauteurs d'eau normalisée en fonction du temps (Elaphos, 2014)

$$K_s \sim \frac{\ln(h^*(t))}{t} \quad (\text{Eq. 10})$$

Le coefficient de proportionnalité, *a priori* inconnu, ne dépend que de la géométrie du problème (Elaphos, 2014). Il peut être estimé numériquement, mais il n'est pas indispensable si seule des comparaisons de conductivité hydraulique nous intéresse. Par ailleurs, Cette estimation fournit la conductivité hydraulique équivalente du système, notamment en cas de stratification. Cette conductivité hydraulique est plus représentative de la couche de plus faible conductivité (Miyazaki, 1988)



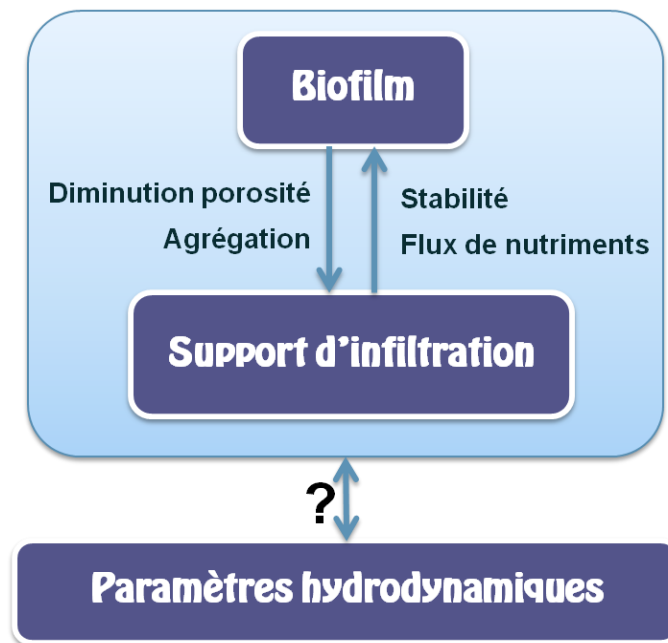
Chapitre 3 : Résultats & Discussion

Cette partie se présente sous la forme d'articles, paru ou à paraître, chacun correspondant à une des expérimentations réalisées.

I. Biofilm et colmatage des bassins d'infiltration (article 1)

Cet article présente les protocoles et résultats de la première expérience et vise à répondre aux questions suivantes :

- Quelles variables structurelles et/ou fonctionnelles liées au biofilm influent sur les propriétés physiques du support d'infiltration (texture, structure)?
- Quelles conséquences sur les paramètres hydrodynamiques (porosité efficace, perméabilité) ?



Cet article a été publié dans le journal « Ecohydrology » :

Gette-Bouvarot, M., Mermillod-Blondin, F., Angulo-Jaramillo, R., Delolme, C., Lemoine, D., Lassabatere, L., Loizeau, S. and Volatier, L., 2014. "Coupling hydraulic and biological measurements highlights the key influence of algal biofilm on infiltration basin performance." *Ecohydrology* 7(3): 950-964.

Coupling hydraulic and biological measurements highlights the key influence of algal biofilm on infiltration basin performance

Morgane Gette-Bouvarot¹, Florian Mermillod-Blondin¹, Rafael Angulo-Jaramillo¹, Cécile Delolme¹, Damien Lemoine¹, Laurent Lassabatere¹, Sébastien Loizeau^{2,3}, Laurence Volatier¹

¹ UMR5023 LEHNA, Université de Lyon, CNRS, INRA, Université Claude Bernard Lyon 1, ENTPE, F-69518, Vaulx-en-Velin, France; Campus de La Doua, F-69622 Villeurbanne, France.

² UMR5564 LTHE, Université de Grenoble, CNRS, INPG, IRD, UJF, F-38041, Grenoble, France

³ Veolia Environment Research and Innovation, F-92500 Rueil Malmaison, France

Abstract

Infiltration basins are increasingly used in urban areas for flood protection, groundwater recharge and stormwater disposal. However, their operation is often affected by clogging, leading to degraded infiltration. The aim of this work was to evaluate the respective influences of sediment deposition and biofilm biomass on the deterioration of hydraulic performances in two infiltration basins used for groundwater recharge. Samples were collected by coring in the two basins. Grain size distribution (with and without organic matter), bacterial and algal biomasses and microbial activity were measured at three depths from the soil surface (0-1 cm, 2-3 cm, 10-14 cm). In parallel, *in situ* single-ring infiltration tests were performed before and after removal of the top layer (0-1 cm). The results showed considerably reduced permeability due to clogging of the top sedimentary layer in the two basins. The highest reduction of permeability was measured in the basin colonized by the largest algal biomass. The proportions of fine mineral particles (<63 μm) were comparable in the two basins and could not explain their differences in saturated hydraulic conductivities. In addition, the relationships between biological and hydraulic parameters highlighted a threshold effect of algal biomass on the structure of the pore network, possibly explaining the decrease in infiltration. This original link between hydraulic and microbial characteristics suggests that algal biofilm growth had a major impact on the hydraulic performance of the infiltration basins.

Keywords: Algae, Biofilm, Beerkan infiltration, Clogging, Infiltration basin, Hydraulically functional pore size, Particle size distribution, Saturated hydraulic conductivity.

1. Introduction

Infiltration basins are used worldwide for groundwater recharge, wastewater treatment, stormwater disposal and/or for setting up hydraulic barriers against the intrusion of undesired water in aquifers (Brissaud *et al.*, 1989; Bardin *et al.*, 2002). However, the suitability of infiltration basins is often altered by clogging processes that reduce their hydraulic performances (Hoffmann et Gunkel, 2011). Clogging of infiltration systems leads to a decrease in infiltration rates (Bouwer, 2002) and may in turn affect the quality of infiltrated waters (Dechesne *et al.*, 2004). Indeed, clogging can induce anoxia in pore water (Nogaro et Mermillod-Blondin, 2009), and then alter water purification by inhibiting aerobic microbial processes (Bali *et al.*, 2010; Navel *et al.*, 2011). Clogging is usually explained by the combined and overlapping effects of chemical, physical and biological processes (Baveye *et al.*, 1998). In infiltration basins, these processes include the accumulation of fine suspended solids at the water - infiltration medium interface (Okubo et Matsumoto, 1979; Langergraber *et al.*, 2003), chemical precipitations and adsorption mechanisms (Schuh, 1990; Knowles *et al.*, 2011), as well as bioclogging due to microbial growth and deposition of organic matter (Nguyen, 2001; Thullner *et al.*, 2002b; Mauclaire *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2009).

Chemical processes can contribute to clogging, but the deposition and accumulation of suspended solids have been recognized as the primary cause of clogging in most sedimentary environments (Oberdorfer et Peterson, 1985; Schälchli, 1992; Langergraber *et al.*, 2003). The fine particles suspended in the infiltrating water are trapped by mechanical sieving in the porous sedimentary matrix. The pore spaces of the top sediment layer become progressively filled with fine particles (Schälchli, 1992; Skolasińska, 2006). For example, it has been clearly demonstrated that stormwater infiltration systems are hydraulically impacted by the accumulation of fine particles at the sediment surface (Winiarski *et al.*, 2006; Hatt *et al.*, 2008; Nogaro et Mermillod-Blondin, 2009).

Although the reduction of porosity is primarily caused by the capture of sediments, the growth of micro-organisms as a biofilm around the trapped sediment can ultimately clog the pores by biomass accumulation. Several studies (Katznelson, 1989; Baveye *et al.*, 1998; Zhao *et al.*, 2009) have demonstrated that biofilms can alter permeability by filling pores and/or creating a clogging mat at the sediment surface. Biofilm refers to microbial cells embedded in a self-produced matrix of hydrated extracellular polymeric substances -EPS-

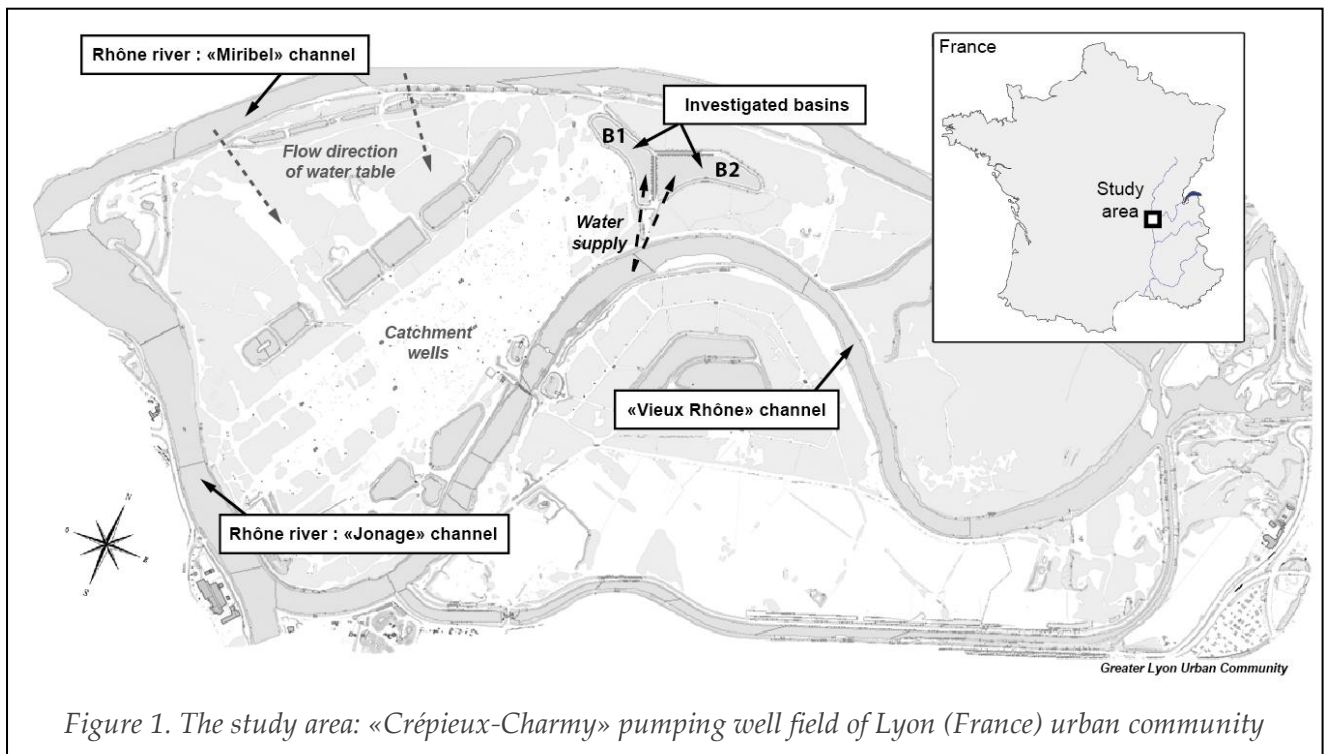
that play a crucial role in the initial attachment of cells to solid surfaces, cohesiveness, and in biofilm thickness (Flemming et Wingender, 2010). Biofilm growth has been identified as a major cause of bioclogging in lab-scale column reactors filled with synthetic glass beads (Cunningham *et al.*, 1991; Thullner *et al.*, 2002a; Kim *et al.*, 2010), or sand (Taylor et Jaffé, 1990; Vandevivere et Baveye, 1992; Wu *et al.*, 1997). These previous observations were essentially made on bacterial biofilms grown under laboratory conditions. However, naturally occurring biofilms that are mixed autotrophic/heterotrophic assemblages exhibit different structures and properties. Studies assessing the influence of biofilms on the clogging process in natural systems remain scarce (Battin et Sengschmitt, 1999; Ibisch *et al.*, 2009) despite the fact that the effects of bio-clogging can be considerable. For instance, Ibisch *et al.* (2009) pointed out the impact of biofilm on the hydraulic properties, with a negative relationship between biofilm biomass and infiltration rate explaining up to 95% of the infiltration variability in riverbed sediments. Nevertheless, these studies did not try to distinguish the respective effects of sedimentation and biofilm growth on clogging mechanisms.

Sediment particle deposition and biofilm growth have been recognized as key factors explaining clogging and decreased permeability in porous media, but these two factors were rarely studied jointly to evaluate their respective contributions. The aim of the present study is to fill this gap by evaluating the links between hydraulic properties and related physicochemical and biological variables measured within infiltration basins designed for groundwater recharge. We studied two basins built at the same time, supplied with the same water, but subjected to contrasting infiltrated volumes per unit area. We expected that the sedimentary top layer of the basin which received the highest amount of water would be subject to a greater decrease in permeability due to differences in sediment deposition and/or biofilm growth between basins. In order to assess the respective influences of physical and biological processes on the hydraulic performances of the infiltration surface, our field experiment coupled physical (particle size distribution) and biological (organic matter content, algal biomass, bacterial abundances and microbial activity) characterizations of the water-sediment interface with *in situ* measurements of hydraulic properties (saturated hydraulic conductivities and hydraulically functional pore size).

2. Materials & Methods

Site description

The infiltration basins were located in the pumping well field of “Crépieux-Charmy” (Figure 1) which provides drinking water for the Lyon metropolitan area. It is the largest well field in Europe (375 hectares, 1,280,000 inhabitants supplied). Several infiltration basins have been excavated on the site to create a hydraulic barrier against pollution events from the Rhone River and to improve aquifer recharge. The basins are fed with surface water from the “Vieux Rhone channel” (Figure 1) only when water turbidity is low (< 50 NTU) to prevent excessive fine particle loads. We focused on two infiltration basins (B1 and B2) built at the same time (April 2008) and supplied with the same water (see Table I for chemical characteristics). The residence time of water in the basins generally does not exceed 48h, and at study time, basins were maintained under flood conditions for 6 months.



The basins were built by excavation in natural soils after which they were partially filled with a layer of calibrated sand about 20 cm thick and characterized by specific saturated hydraulic conductivity, K_s , high enough to ensure the infiltration of large volumes and retain contaminants and organic matter carried by incoming water. The reference values of K_s provided by the site manager at 20°C were 876 mm h⁻¹ for B1 and 434 mm h⁻¹ for B2.

Concentrations of major chemical components were measured in the sand layers of the two basins. Those measurements showed concentration ranges between 140-220 g kg⁻¹ Dry Mass (DM) for Ca, 2.2-4.0 g kg⁻¹DM for Al, 1.6-3.0 g kg⁻¹DM for Mg, 0.5-1.6 g kg⁻¹DM for K, 4.9-6.2 g kg⁻¹DM for Fe, and 1.1-2.6 g kg⁻¹DM for S. Pollutant analyses revealed no significant contaminations of the sandy layers in either basins (heavy metals concentrations < 70 g kg⁻¹DM, and concentrations of Polychlorinated Biphenyls (PCBs) were below the quantification limits (0.2 mg kg⁻¹DM for each PCB). These values were consistent with the geochemical characteristics of carbonated Rhone sediments (Schürch et Vuataz, 2000; Février, 2001). For operational reasons, greater volumes of water were infiltrated per year in B2 in comparison with B1 when we started experimentations, as B2 has been more often supplied (Table I, total infiltrated water volumes of 165 m³m⁻²year⁻¹ for B1 and 216 m³m⁻²year⁻¹ for B2).

Table I: Characteristics of the basins studied between 2008 and 2010. Mean concentrations of nutrients and TOC were calculated from data collected in the "Vieux Rhône channel" (n=12)

	Surface (m ²)	Infiltrated volumes (m ³ year ⁻¹)	Total infiltration depth (m ³ m ⁻² year ⁻¹)	Characteristics of infiltrated water (mean ± S.D.)			
				NH ₄ ⁺ (µg L ⁻¹)	NO ₃ ⁻ (mg L ⁻¹)	PO ₄ ³⁻ (µg L ⁻¹)	TOC (mg L ⁻¹)
B1	16 512	2 729 268	165	23 ± 34	0.87 ± 0.22	9.1 ± 3.9	1.49 ± 0.32
B2	24 780	5 349 147	216				

Sampling

Undisturbed samples were collected by coring on 20 October 2010 from homogeneous areas located at the center of the basins. The water level in the basins was 30-50 cm during coring. In each infiltration basin, cores (70 mm in diameter, 180 mm in depth) were randomly collected from 3 areas. Three cores were collected per area to obtain enough material for physical (particle size distribution), chemical (total organic carbon, total nitrogen) and biological (protein content, algal biomass, bacterial abundances and hydrolytic activity of the biofilm) measurements. Each core was sliced into three parts: 0-1 cm (H1), 2-3 cm (H2) and 10-14 cm (H3). Layer H1 corresponded to the sedimentary layer accumulated at the surface of the basin and colonized by algae, while layers H2 and H3 were rather sandy layers, partly amended with particles carried by infiltrating water. For each area, the three

replicated cores were pooled to obtain one sample per depth (H1, H2 and H3). The resulting 18 samples (2 basins x 3 depth layers x 3 replicates/areas) were then brought to the laboratory within 4 hours of collection in an isotherm box at 4°C.

In situ infiltration measurements and data collection

Tension disc and pressure ring infiltrometers (Perroux et White, 1988) offer an easy and fast means of estimating the hydraulic properties of porous media, based on infiltration measurements performed at the surface (Šimůnek et van Genuchten, 1997; Angulo-Jaramillo *et al.*, 2000; Jacques *et al.*, 2002). We decided to use the Beerkan method which consists in analyzing infiltration data from a simple ring at zero pressure head (Braud *et al.*, 2005) using the BEST (Beerkan Estimation of Soil Transfer parameters) algorithm (Lassabatere *et al.*, 2006). This method has proven to be inexpensive and quite robust for estimating soil hydraulic properties, even at the scale of an infiltration basin (Cannavo *et al.*, 2010; Lassabatere *et al.*, 2010). The Beerkan 3D axisymmetric infiltration method was used with a simple annular ring (Braud *et al.*, 2005; Lassabatere *et al.*, 2006). Measurements were performed one week after core collection, once the basins were totally drained (absence of water column in the basin). Infiltration tests were performed in the same areas where the sediment cores had been collected. As advised by many authors (Haverkamp *et al.*, 2006), we verified that initial water content was lower than 25% of the water content at saturation. Indeed, hydraulic characterization through water infiltration experiments is more confident if these are performed under dry initial conditions (Haverkamp *et al.*, 2006). We also verified that the duration of the drainage phase did not disturb the mat by producing cracks at the surface. Water infiltration tests were then performed where the mat appeared homogeneous and uniform to avoid any disturbance of the tests due to preferential flow paths.

A 65 mm-radius cylinder was inserted to a depth of about 5 mm to avoid lateral water loss. A fixed volume of water was poured into the cylinder at time zero, and the time required for the infiltration of this known volume of water was measured. When the first volume had infiltrated completely, a second known volume of water was added to the cylinder and the time required for its infiltration was added to the previous time. This procedure was repeated until apparent steady state was reached, i.e. two identical consecutive infiltration times. The cumulative infiltration was then recorded. Afterwards, the top layer of the infiltration surface (H1: 0-1 cm) was removed at another location within the same area (to

obtain similar initial conditions) and water infiltration was measured again following the same procedure after placing the cylinder on the underlying sandy soil (H2). Therefore two infiltration data sets were obtained with and without the top layer for each area of the basins where the cores were collected. BEST algorithm was used to determine the parameters describing soil hydraulic properties (Lassabatere *et al.*, 2006; Mubarak *et al.*, 2009). This specific algorithm determines characteristic hydraulic curves that take into account the van Genuchten equation for the water retention curve, $h(\theta)$, (Eq. 1, a) with the Burdine condition (Eq. 1, b) and the relationship of Brooks and Corey (Eq. 2) for the hydraulic conductivity curve, $K(\theta)$, (Burdine, 1953; Brooks et Corey, 1964; van Genuchten, 1980):

$$\frac{\theta - \theta_r}{\theta_s - \theta_r} = \left(1 + \left(\frac{h}{h_g} \right)^n \right)^{-m} \quad (\text{Eq. 1, a})$$

$$m = 1 - \frac{2}{n} \quad (\text{Eq. 1, b})$$

$$\frac{K(\theta)}{K_s} = \left(\frac{\theta - \theta_r}{\theta_s - \theta_r} \right)^\eta \quad (\text{Eq. 2})$$

where θ_r and θ_s are the residual and saturated volumetric water content [$\text{L}^3 \text{L}^{-3}$], respectively; n and m are shape parameters, and h_g is the scale parameter [L] of the water retention curve $h(\theta)$, K_s is the saturated hydraulic conductivity [L T^{-1}] and η is the shape parameter of relationship $K(\theta)$. θ_r is usually very low and was thus considered to be zero. The hydraulic properties were thus represented using five parameters: θ_s , n , h_g , K_s , η . In line with Haverkamp *et al.* (1996), shape parameters n and η were assumed to mainly depend on soil texture, while θ_s , h_g and K_s were assumed to mainly depend on soil structure. The BEST algorithm estimates shape parameters from particle size distribution by classical pedotransfer functions. It estimates θ_s as total soil porosity, previously derived from dry bulk density measurement considering a solid particles density of 2.65 g cm^{-3} . Finally, BEST derives saturated hydraulic conductivity and sorptivity S ($\text{L T}^{-0.5}$) by modeling the 3D infiltrations performed at zero water pressure head (i.e. Beerkan infiltration method), the scale parameter for water pressure head, h_g , being directly retrieved from the estimations of sorptivity and hydraulic conductivity. Typically, in BEST method, two degrees of freedom

are used to model water infiltration experiments: (i) sorptivity that rules the convexity of water cumulative infiltration and (ii) hydraulic conductivity that rules mainly the asymptotic slope at the end of the experiments (Yilmaz *et al.*, 2010) The reader can refer to the study of Lassabatere *et al.* (2006) for more details regarding the fitting procedure, and of Lassabatere *et al.* (2009) regarding the validity of the analytical expressions used to estimate scale parameters.

The capillary length (α_h) was estimated from sorptivity (S) and the other hydraulic parameters according to Haverkamp *et al.* (2006):

$$\alpha_h = \frac{S^2}{c_p (\theta_s - \theta_0) \left[1 - \left(\frac{\theta_0}{\theta_s} \right)^\eta \right] K_s} \quad (\text{Eq. 3})$$

where θ_0 is the initial water content and c_p is a function of the shape parameters for the van Genuchten water retention equation (see Haverkamp *et al.* (2006), Lassabatere *et al.* (2006)). The relationship between the capillary length and the mean characteristic dimension of hydraulically functional pore size, ξ_m , is known to be (Mubarak *et al.*, 2009):

$$\xi_m = \frac{\sigma}{g \rho_w \alpha_h} \quad (\text{Eq. 4})$$

where σ is the surface tension of water [MT^{-2}], ρ_w is the density of water [M L^{-3}] and g is gravitational acceleration [L T^{-2}]; α_h and ξ_m units are [L]. ξ_m is a parameter that represents the hydraulically functional mean pore size, relative to an effective porosity and corresponds to the mean radius of pores actives in flow (Yilmaz *et al.*, 2013). This effective parameter accounts for the average pore size and the connectivity between the pores.

Estimating the uncertainties embedded in the measurement of K_s is challenging since K_s is highly variable and is also scale dependent (Sobieraj *et al.*, 2004; Bormann et Klaassen, 2008). Indeed, a variation of 10-fold of the values obtained for K_s is quite commonly observed between replicates (Smith *et al.*, 2002). The K_s value is specially dependent on the measurement method as shown by Mohanty *et al.* (1994) and Fodor *et al.* (2011). These authors found that the estimated errors in measuring K_s were $\pm 1 \times 10^{1.3} \text{ cm d}^{-1}$ by applying

different methods (double ring, tension disc and mini disc infiltrometers and two other laboratory methods).

The proposed values for hydraulic parameters were estimated from BEST exploitation of water experiments. Yet, these values do not account for anisotropy and steep vertical gradients in the upper layer. At surface, deposition mechanisms and biological development may lead to a strong anisotropy and then to a gap between the horizontal and vertical components of the hydraulic conductivity tensor. It is assumed herein that the trends concern the vertical component of hydraulic conductivity since Beerkan experiments measure vertical water infiltration at the surface. Moreover, Yilmaz et al. (2013) demonstrated that the inversion of water infiltration data in layered media lead to parameters related to the less permeable layer. It is then assumed that the values for hydraulic parameters and mainly h_g , K_s and ξ_m corresponded to the less permeable layer which was H1 layer in our experiment.

Analyses of particle size distribution

Volumetric grain size proportions in the samples were measured by laser diffractometry (Malvern Mastersizer 2000G) on particles ranging between 0.02 μm and 2000 μm . Prior to the analyses, each sample was wet-sieved with tap water at 1600 μm . Three measurements per sample were carried out after ultrasound treatment (50-60 Hz, 2 min, to eliminate non-stable particle aggregation (Badin *et al.*, 2009b)). In the second step, we removed the organic material from the samples in order to eliminate any organic contribution to the particle size distribution curves. Organic matter was removed by treatment with sodium hypochlorite, according to Anderson (1963) and Kaiser *et al.* (2002): eight grams of each sample were oxidized for 16 h at room temperature with 20 mL of 6% (wt/wt) NaOCl adjusted to pH 8.5 with concentrated HCl. After oxidation, the samples were centrifuged at 3000 rpm for 15 min and washed with ultrapure H₂O. This oxidation/washing cycle was repeated three times. At the end of the last oxidation, two additional washes were performed with 0.5M NaCl to remove remaining oxides. Analyses of total organic carbon after treatment with NaOCl confirmed the efficiency of organic matter removal (between 80 and 90% of organic carbon was eliminated).

Analyses of quantitative and qualitative variables associated with biofilm

The mass water content of each sample was obtained by measuring differences between the wet and dry masses of samples. Dry mass was obtained after drying 10 g of fresh samples at 105°C for 24 h (NF X31-102).

Total organic carbon (TOC) and total nitrogen (TN) were determined on each sample to evaluate the biofilm organic production in the basins. TOC and TN were measured by high-temperature combustion of pre-acidified dry samples and subsequent measurement of CO₂ and N₂ by thermal conductometry using an elemental analyzer (FlashEA, Thermo Electron Corporation).

The biofilm biomass was assessed by measuring total protein content (micro-organisms and EPS proteins) in wet material according to the micro-Lowry method (Lowry *et al.*, 1951) modified by Peterson (Peterson, 1977), using the Sigma Protein Assay Kit (P 5656 Sigma Diagnostics, St Louis, MO, U.S.A.). The samples (1 g fresh weight) were treated with 2 mL of a 50% solution of Lowry reagent for 20 min at 15°C. Vigorous shaking was applied after the Lowry solution was added to improve contact between the proteins and the reagent. After incubation with the Lowry reagent, 0.5 mL of Folin reagent was added followed by a coloration reaction lasting 30 min in the dark. The 750-nm absorbance of the filtered supernatant (0.45 µm, Millipore) was measured and reported to a protein mass thanks to a calibration curve determined with bovine serum albumin. Total proteins were expressed as mg of protein per gram of dry matter.

The algal biomass was determined by measuring chlorophyll-*a* content according to the SCOR-UNESCO method (Unesco, 1966). Prior to analyses, the samples were stored at -20°C. Chlorophyll-*a* was extracted from 2.5 g of fresh material with 90% acetone. Extraction was performed in the dark at 4 °C for 3 hours with frequent agitation. Afterwards, the extracts were centrifuged for 10 min at 4000 rpm. Absorbance of the extract was measured at wavelengths of 750 nm, 663 nm, 645 nm, 630 nm, 430 nm and 410 nm (PerkinElmer instruments, lambda 25UV/VIS). Chlorophyll-*a* concentration was then deducted with the SCOR-UNESCO equation and expressed in µg per g of dry matter.

The bacterial component of the biofilms was evaluated by measuring the abundances of intact and damaged cells by direct microscopy counts after staining with the fluorochromes of BacLight Kit for bacterial viability (Invitrogen). The day of sampling, a suspension was prepared with 5 g of fresh material mixed with 11.7 mL of a NaCl solution (0.8% m v⁻¹) that was previously filtered at 0.22 µm and autoclaved. The suspension was then fixed with formaldehyde with a final concentration of 2%. Prior to analyses, the suspension was sonicated for 5 min in order to separate bacteria from organic matter and mineral particles. Afterwards, the sonicated suspension was diluted to obtain a cell density suitable for counting (between 20 and 100 bacteria per field). In parallel, a blank with the NaCl solution was prepared to verify that no contamination occurred during sample processing. Staining was obtained by adding in diluted suspension a volume of 500 µL of Syto9 and Pi, previously dissolved in 10 mL of the solution of NaCl. Incubation was performed for 20 min in the dark at room temperature. The suspension was then filtered on a black filter (porosity 0.22 µm, Millipore isopore GTPB) for microscopy reading. Bacterial counts were done under an epifluorescence microscope (Zeiss axioskop), with excitation of fluorochromes under blue light (446 nm - 500 nm), showing green for intact cells and red for damaged cells. Thirty fields were counted per filter and bacterial cell numbers were reported per g of dry matter. Damaged bacterial cells were reported as percentages of total bacterial cell numbers.

We determined the hydrolytic activity of the biofilm by the fluorescein diacetate (FDA) hydrolysis method (Jorgensen *et al.*, 1992). FDA presents some advantages as it is hydrolyzed by several groups of enzymes, such as non specific esterases, lipases, and proteases involved in the decomposition of organic matter (Schnurer et Rosswall, 1982). Therefore, its hydrolysis is a good indicator of overall metabolic activity in biofilms (Battin, 1997). For this analysis, samples (1 g fresh weight) were placed in 3 ml of a pH 7.6 phosphate buffer solution with 0.15 ml of 4.8 mM FDA solution. Incubation was maintained for 1–3 h until the fluorescein turned green, ensuring that FDA concentration was not limiting enzymatic activity. The reaction was stopped by freezing the sample after the addition of 4.5 ml of a solution of HgCl₂ (400 mg l⁻¹). Fluorescein concentration was estimated from the absorbance of the filtered supernatant (0.45 µm, Millipore) measured at 490 nm and expressed as µmol of FDA hydrolyzed per hour and per gram of dry matter.

Statistical analyses

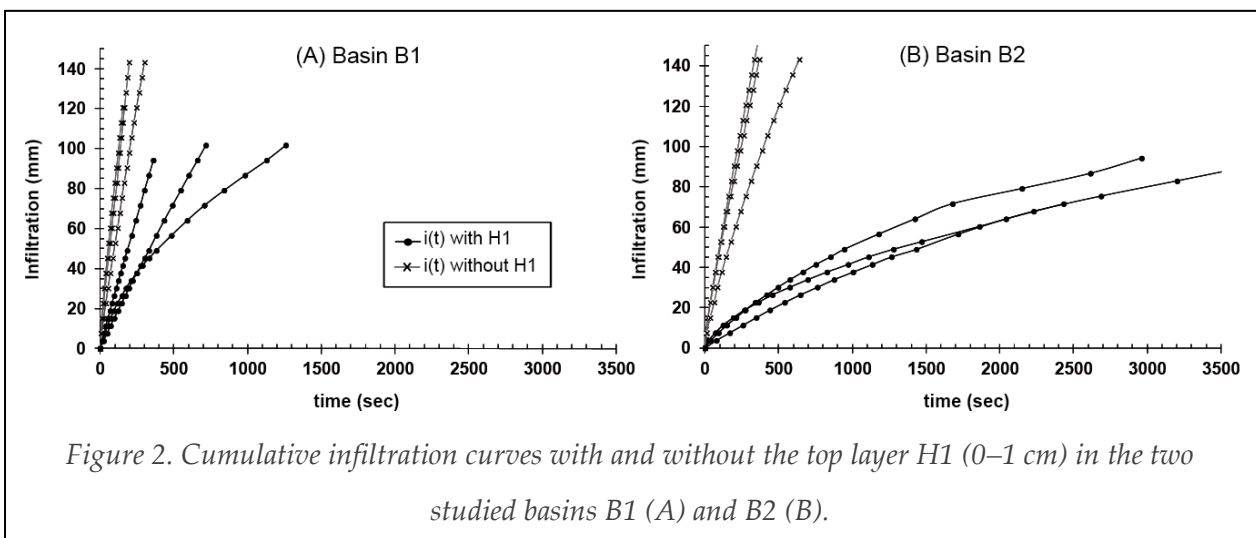
For the infiltration measurements (saturated hydraulic conductivity and mean hydraulically functional pore size), the lack of homoscedasticity prevented us from using parametric tests. Therefore non-parametric Kruskal-Wallis tests were performed to test the differences between the basins with and without H1. Pairwise comparisons were performed with U-Mann-Whitney tests.

Two-way analyses of variance (ANOVA) were used to test the effect of depth (H1, H2 and H3) and basin (B1 and B2) on physical, chemical and biological variables. Post hoc Tukey's tests were performed to determine whether significant pairwise differences occurred between depths and/or basins. The normality and the homoscedasticity of the residues were verified using the Shapiro-Wilk test and the Levene test, respectively. When necessary, the data were log transformed as a first step.

Pearson correlation coefficients (r) were calculated to determine the linear relationships between variables. Three levels of significance were considered: *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$. All statistical analyses were performed using Statistica© (StatSoft, inc) software. Significance for all statistical tests was accepted at $\alpha < 0.05$.

3. Results

Hydraulic characterization of the two basins



Cumulative infiltrations are shown in Figure 2. The BEST algorithm led to accurate fits of the cumulative water infiltrations with Normalized Root Mean Square Errors (NRMSE) lower than 5% for all cases, and the hydraulic parameters could be estimated in all cases. For clarity, only saturated hydraulic conductivities and hydraulically functional pore sizes are detailed in Table II. Before removing the top layer H1 (0-1 cm), the infiltration curves were very different between B1 and B2 (Figure 2), with curves having lower slopes in B2 than in B1. Despite high variability, the mean estimated saturated hydraulic conductivity (K_s) was significantly lower in B2 than in B1 (U-Mann-Whitney test, $p < 0.05$), and the mean hydraulically functional pore size (ξ_m) tended to be smaller in B2 than in B1 (U-Mann-Whitney test, $p = 0.126$). In basin B2, ξ_m (0.026 mm) was characteristic of a small pore network and in agreement with the particle size distribution of the matrix (fine material, Figure 3A). On the contrary, there was a clear discrepancy between the large value of ξ_m (0.48 mm) and the particle size distribution of the matrix (fine material) for basin B1. This result was characteristic of a network of well-connected macropores.

The removal of H1 increased the steady state fluxes for the two basins and led to comparable mean saturated hydraulic conductivities and mean effective pore radii for B1 and B2 (U-Mann-Whitney test, $p > 0.05$). The comparison of K_s before and after the removal of H1 in each basin showed a strong increase in infiltration in the two basins, especially in B2 (K_s multiplied by 2 in B1 and multiplied by 60 in B2, Table II). The removal of H1 had contrasting influences on ξ_m in the two basins: it fell by around 4-fold in B1 while it rose by around 4-fold in B2.

Table II: hydraulic parameters estimated in the two basins (B1, B2) with the BEST-algorithm (n=3)

		Saturated hydraulic conductivities K_s (mm h ⁻¹)	Hydraulically functional pore sizes ξ_m (mm)
B1	with H1	353 ± 371	0.480 ± 0.501
	without H1	734 ± 716	0.120 ± 0.040
B2	with H1	8.39 ± 5.90	0.026 ± 0.021
	without H1	504 ± 310	0.120 ± 0.060

Particles size distribution

Before the removal of organic matter (Figure 3A), particle size distributions were significantly different among depths (Table III, for percentages of particles < 63 μm). The sediments collected from layer H1 (0-1 cm) presented multimodal distributions for the two basins, with two main modes: a first mode around 30 μm and a second mode around 450 μm . In contrast, the samples collected in layer H3 were systematically characterized by a unimodal distribution (around 450 μm). The H2 samples also presented a unimodal grain size distribution but the accumulation of fine particles detected in B2 produced a second mode (distribution between 5-70 μm). We also measured a significant difference in grain size distribution between basins (Table III). Indeed, the quantity of particles < 63 μm (corresponding to the limit of silt and clay) in layer H1 was significantly greater in basin B2 than in basin B1. In contrast, no significant differences in volumetric proportions of fine particles were measured between B1 and B2 in H2 and in H3 layers.

The significant differences in grain size distributions observed between basins were eliminated after the removal of organic matter (Figure 3B). This was especially the case for the fine granulometric fractions (< 63 μm) in layer H1. We also detected considerable increases in the percentages of fine particles after the removal of organic matter in layer H1 of B1 (+ 44.1% of fine particles in the distribution) and B2 (+17.4%).

Biological characterization of the two basins

Variations of biological variables between depth and basins are shown on Figure 4. Total organic carbon (TOC) and total nitrogen (TN) contents decreased significantly with depth (Table III), and comparable decreases with depth were also observed for most biological variables (total proteins, chlorophyll-*a*, hydrolytic activity and bacterial cell abundance). The only exception was the percentage of damaged bacterial cells that increased in H3 (Figure 4F). As a consequence of these clear vertical profiles, most variables were linearly and positively correlated with the exception of the percentage of damaged bacterial cells (Table IV).

The hydrolytic activity and the concentrations of TOC, TN, total proteins and chlorophyll-*a* were significantly higher in B2 (Table III). These significant differences between basins were mainly linked to the first sediment layer H1 which was more colonized by a phototrophic

biofilm in B2 than in B1. In contrast, we did not detect any significant difference in bacterial cell abundances and the percentage of damaged bacterial cells between the H1 samples collected from B1 and B2 (Figure 4, Table III).

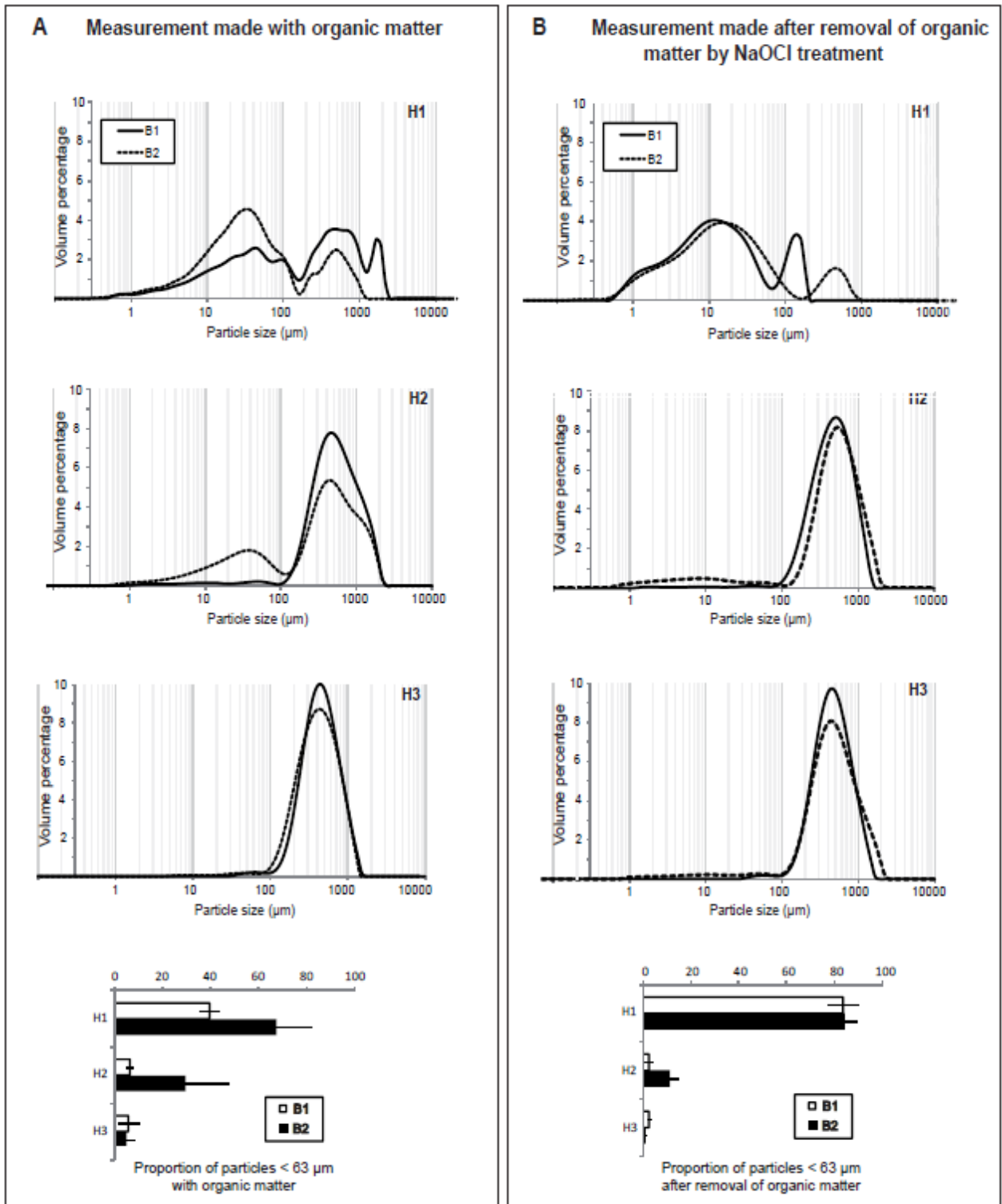


Figure 3. Mean particle size distribution (up) and mean vertical distribution of particles < 63 μm (bottom) (n = 3) for layers H1: 0–1 cm, H2: 2–3 cm and H3: 10–14 cm; after 2 min ultrasonication (50–60 Hz) for the two basins (B1 and B2). Measurement made before (A) and after (B) removal of organic matter.

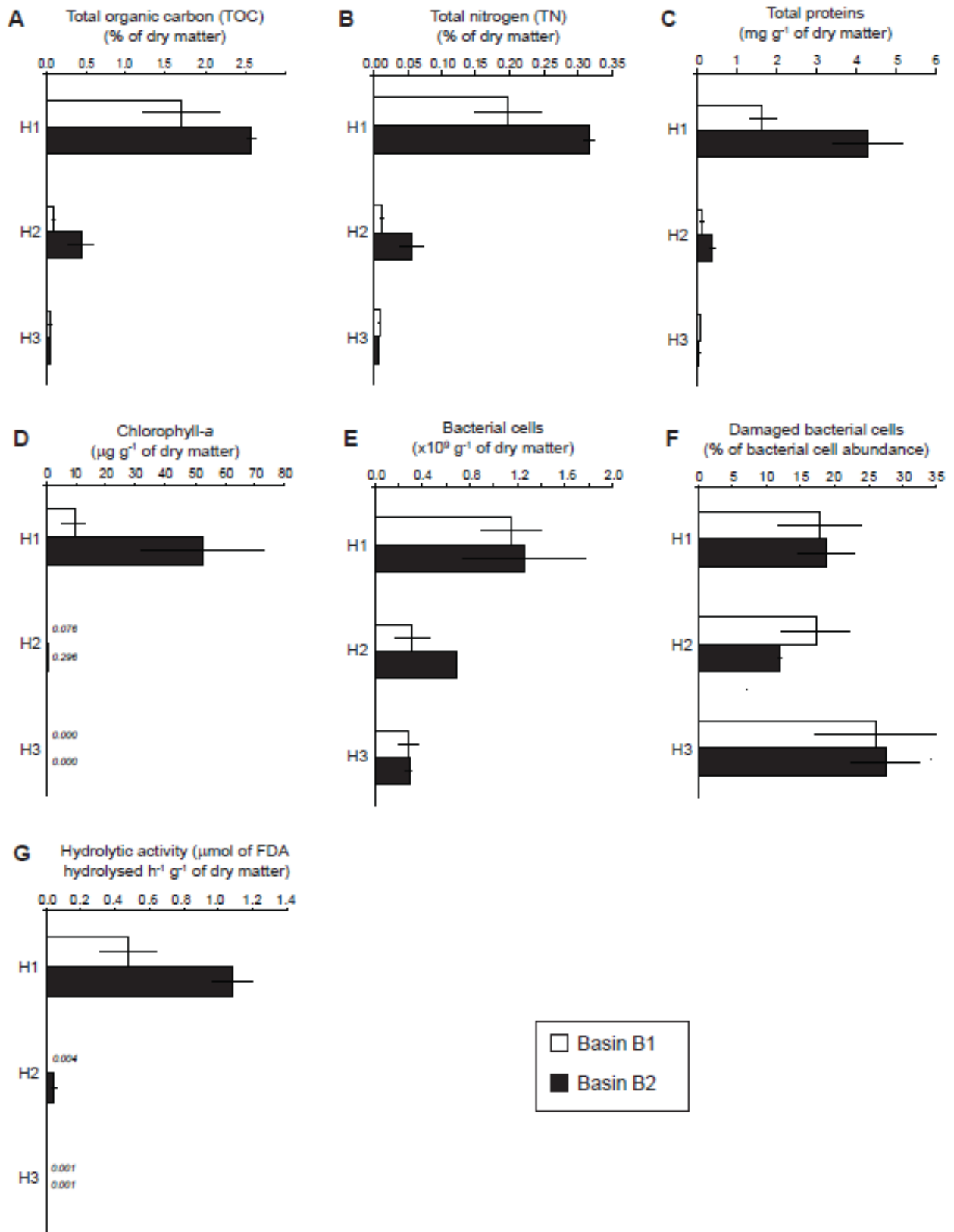


Figure 4. Vertical distribution of total organic carbon (A), total nitrogen (B), total proteins (C), chlorophyll-a (D), bacterial cell abundance (E), percentage of damaged bacterial cells (F) and hydrolytic activity (G) measured on layers H1: 0–1 cm, H2: 2–3 cm and H3: 10–14 cm.

4. Discussion

The hypothesis concerning the link between the quantity of water received by a basin per unit of surface and its clogging status was clearly supported by our results. The hydraulic conductivity of basin B2, which received 30% more water than B1, was 50-fold lower (Tables I, II). For the two basins, the measurements of hydraulic conductivity with and without H1 demonstrated that the hydraulic performances of the infiltration surface and underlying sandy layers were largely governed by the permeability of the 0-1 cm sedimentary layer. Indeed, the removal of H1 led to 2-fold and 60-fold increases of the mean saturated hydraulic conductivity (K_s) of B1 and B2, respectively. Analyses of cores demonstrated that clogging resulted from both physical and biological processes. The volumetric fraction of fine particles ($< 63 \mu\text{m}$), algal biomass and bacterial abundance were significantly higher in H1 than in deeper sandy layers (H2 and H3) in the two basins. Therefore, our results were consistent with studies performed on sand filtration systems (Okubo et Matsumoto, 1979; Ragusa *et al.*, 2004; Mermillod-Blondin *et al.*, 2005a; Mauclaire *et al.*, 2006) showing that the top sedimentary layer acted as an efficient physical filter and constituted a hot spot of biological activity.

The comparison of the properties of H1 (particle size distributions, biofilm characteristics) between the two basins allowed us to evaluate the respective contributions of fine sediment accumulation and biofilm development on clogging processes occurring within this top layer. According to our assumption, the infiltration basin receiving the highest volume of water per unit area (B2) was characterized by a larger biomass (5-fold more chlorophyll-a, 2.5-fold more proteins and 1.5-fold more COT) and activity (2-fold more hydrolytic activity) in its top H1 layer. However, the volumetric fraction of accumulated fine inorganic particles ($< 63 \mu\text{m}$) was similar in the top H1 layer of the two basins (around 84%), and was therefore not influenced by the difference in the volume of water received per unit area between the two basins (30%). Thus, the lower infiltration rate measured in B2 did not appear to be related to mineral clogging. This conclusion was not surprising because the two infiltration basins are never supplied with turbid water ($> 50 \text{ NTU}$). Taking this condition into account led to the conclusion that the large difference in mean estimated saturated hydraulic conductivities between B1 (mean estimated $K_s = 353 \text{ mm h}^{-1}$) and B2 (mean estimated $K_s = 8.39 \text{ mm h}^{-1}$) was strongly related to the presence of biomass. Biomass could be related to

both biofilm growth and particulate organic matter accumulation. In the case of infiltration systems designed for secondary wastewater treatment, the contribution of accumulated organic particles to the process of clogging is generally greater than biofilm growth (Siegrist, 1987). However, in the studied infiltration basins, the organic load of incoming water is very low (see Table I), and did not exceed the rate of $25 \text{ gCOD m}^{-2} \text{ day}^{-1}$ proposed by Platzer et Mauch (1997) for prevention of clogging by organic depositions. In addition, *in situ* observations showed dense algal mat on the surface sediment in B2. These observations supported the conclusion that the higher clogging measured in the basin B2 was much more related to biofilm development than deposition of particulate organic matter. This conclusion is consistent with the study of Ragusa et al. (1994), showing a significant reduction of hydraulic conductivity to less than 20% of its initial value as a result of algal and bacterial growth on the soil surface in lab-scale columns.

In the present study, the quantification of both algal biomass and bacterial abundances demonstrated that the difference in biofilm biomass measured in the top layer H1 of the two basins was associated with algal growth. Indeed, the chlorophyll-*a* contents measured in H1 were around 5-fold higher in B2 than in B1 (Figure 4D) while bacterial abundances were comparable (Figure 4E). This result was also in line with Ragusa *et al.* (1994) who found dissimilar growth patterns in algae and bacteria with a gradually increase of algae, in relation with soil hydraulic conductivity. Thus the occurrence of phototrophic organisms developed at the surface probably had a major influence on infiltration processes. However, it is noteworthy that a 5-fold difference in algal biomass led to a 60-fold difference in hydraulic conductivity between the basins, so the variation of porosity and water retention due to algae resulted in a strong nonlinear decrease in hydraulic conductivity. These inconsistent ratios could have resulted from a threshold effect of algae on hydraulic properties, meaning that a given amount of algae may be needed to affect the pore network. Below this threshold (as in B1), pore connectivity would be enough to maintain a certain level of permeability. To assess this predicted effect, we expressed hydraulic parameters (saturated hydraulic conductivity K_s and hydraulically functional pore size ξ_m) as a function of a variable (chlorophyll-*a* concentration) related to algal biomass (Figure 5A and B). For low values of chlorophyll-*a* ($< 1 \mu\text{g g}^{-1} \text{ DM}$, corresponding to the measurement performed on H2), the saturated hydraulic conductivity K_s did not vary predictably with the amount of algae (Figure 5A). In contrast, we found a negative relationship between K_s and the amount

of algae when chlorophyll-*a* concentration exceeded 5 $\mu\text{g g}^{-1}$ of dry matter. The following relationship is proposed tentatively to fit the decrease of K_s as a function of chlorophyll-*a* (Figure 5A):

$$\log\left(\frac{K_s}{K_{s,0}}\right) = \alpha_1 \log\left(\frac{Ch_a}{Ch_{a,0}}\right) + \beta_1 \quad (\text{Eq. 5})$$

where Ch_a stands for chlorophyll-*a*, $Ch_{a,0}$ and $K_{s,0}$ are normalization parameters set at 1 $\mu\text{g g}^{-1}$ DM and 1 mm h^{-1} , respectively, α_1 and β_1 are constant parameters. The best fit between modeled and measured data was obtained with $\alpha_1 = -1.891$ and $\beta_1 = 4.013$ (Figure 5A) and corresponded to a regression coefficient of 0.877. Since algal biomass was closely related to the total organic content in the basins studied (Table IV, Pearson's r of 0.84*** between COT and Ch_a content), our results were consistent with the negative relationship between saturated hydraulic conductivity and biomass obtained by Ibisch *et al.* (2009) in river sediment.

The variation of hydraulically functional pore size ξ_m as a function of the concentration of Ch_a revealed that the predicted threshold effect even occurred on the pore network. Changes in this parameter can be described as follows: (i) firstly, there was no clear variation of ξ_m with algal biomass for low ch_a concentrations ($< 1 \mu\text{g g}^{-1}$ DM). (ii) Then, for ch_a values ranging between 4 and 9 $\mu\text{g g}^{-1}$ of dry matter, ξ_m reached a maximal value ξ_m^* of about 1.03 mm for a Ch_a concentration of about 5 $\mu\text{g g}^{-1}$ of dry matter. The increase of ξ_m values for a Ch_a concentration of 5 $\mu\text{g g}^{-1}$ DM compared to lower Ch_a contents could be explained by the rearrangement of the pore network by aggregation with the algal biomass. To our knowledge, this change of porosity due to biofilm-induced aggregation has not yet been studied in sediments. However, several studies in soil sciences have shown such kind of structure rearrangement due to organic material that can produce aggregation and increase porosity (Nemes *et al.*, 2005). Therefore algal biomass probably contributed to the creation of a pore network characterized by well-connected macropores. The value of ξ_m^* actually corresponded to the Ch_a concentration beyond which the reduction of average pore size due to algal biomass exceeded the increase of pore size by aggregation. In the present study, the Ch_a value related to ξ_m^* corresponded to a saturated hydraulic conductivity K_s of approximately 750 mm h^{-1} . (iii) Finally, beyond this threshold, ξ_m decreased sharply with Ch_a

concentration: The following equation is tentatively proposed to fit this decrease (Figure 5B):

$$\log\left(\frac{\xi_m}{\xi_{m,0}}\right) = \alpha_2 \log\left(\frac{Ch_a}{Ch_{a,0}}\right) + \beta_2 \quad (\text{Eq. 6})$$

where index 0 stands for normalization procedure, $\xi_{m,0} = 1 \text{ mm}$, and α_2 and β_2 are constant parameters. By taking $\alpha_2 = -1.53$ and $\beta_2 = 0.8044$, the fitting curve suggested (Figure 5B) is obtained, with a regression coefficient of 0.724. This decrease can be explained by the fact that algal biomass gradually clogs the pores, resulting in a reduction of the mean porosity of the medium. Consequently, water transfers take place only through the micropores of the infiltration medium.

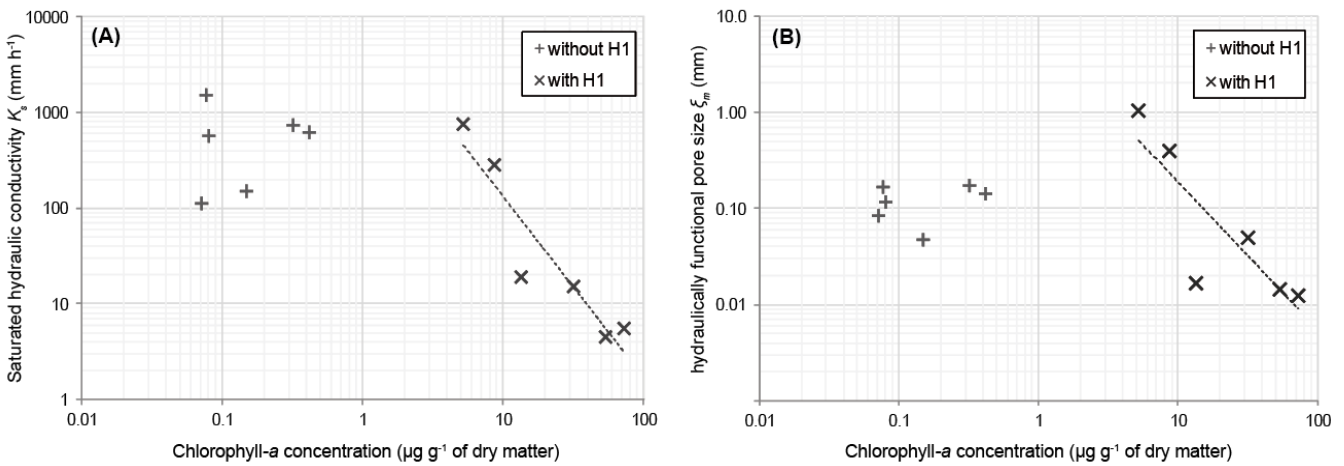


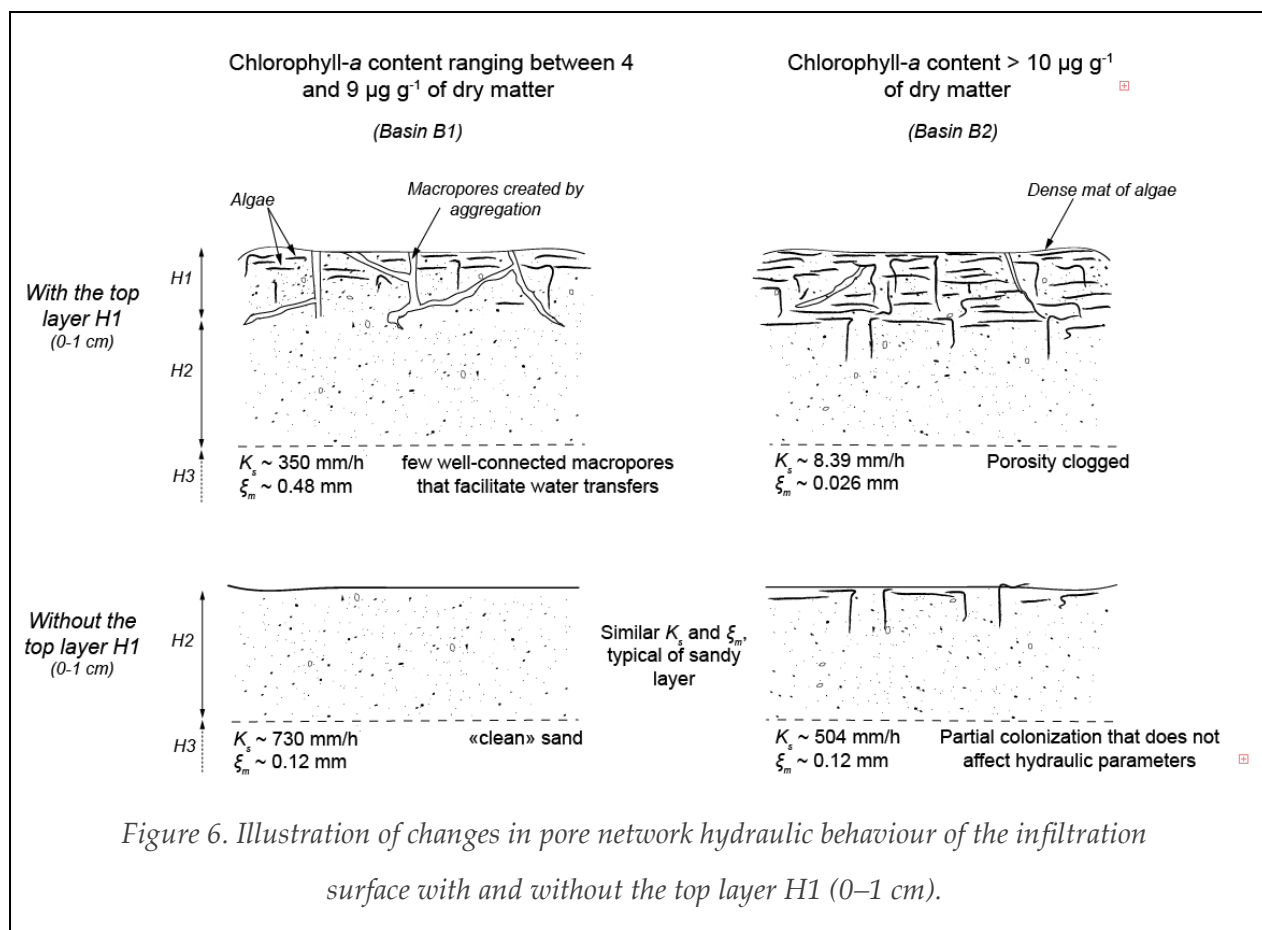
Figure 5. Evolution of hydraulic parameters as a function of algal biomass for the two basins combined – (A) evolution of the saturated hydraulic conductivity as a function of chlorophyll-a content and (B) evolution of the hydraulically functional pore size as a function of chlorophyll-a content.

Our relationship between ξ_m and Ch_a appeared very useful for elucidating processes occurring in the infiltration medium. Interestingly, they explained the two opposing effects of organic matter on hydraulic properties already described in soils: either permeability is enhanced by improving soil aggregation and increasing porosity, or it is reduced by the inhibition of water flow caused by organic matter and the subsequent decrease in the quantity of free flowing water (Nemes *et al.*, 2005; Rawls *et al.*, 2005). However, these two expressions could not be generalized to other porous media, particularly those with a different pore size distribution. In addition, the model requires validation by additional

well-controlled experiments carried out in the laboratory, since: (i) the density of the solid particles must be determined more accurately, and (ii) field estimations are subject to considerable spatial heterogeneity regarding hydraulic properties and biofilm distribution, which can partially mask the phenomena observed. For instance, further experiments along a gradient of algal biomass could be performed to clearly determine this probable threshold effect.

The two different phenomena explaining the variation of ξ_m with algal biomass seemed to occur in the basins studied: the biofilm developed in the 0-1 cm layer (H1) apparently increased ξ_m in B1 and decreased it in B2. Indeed, our results showed a high hydraulically functional pore size ξ_m before the removal of the top layer in basin B1. The measured value of 0.48 mm is typical of an infiltration medium with small pores and few well-connected macropores. After the removal of H1, ξ_m decreased and became characteristic of a "clean" sandy medium, with small well-connected pores. We may therefore conclude on the presence of macropores in the top layer of the basin B1 (see Figure 6). Thus organic matter could have favored aggregation in this basin, leading to a bimodal pore size distribution with small pores within the matrix and large pores between aggregates. This assumption of aggregation mechanism was supported by our grain size analyzes showing that the mean size of particles was smaller after the removal of the organic material (Figures 3). Therefore organic matter associated with biofilm probably trapped part of the fine particles and formed sonication-resistant aggregates. This interpretation is consistent with the conclusions of Graham (1990), who highlighted that silt particles can be trapped in the structural biofilm matrix and on the mucilaginous surface of algae. It also agrees with the study on stormwater infiltration basins by Badin *et al.* (2008), which showed that elementary particles could be embedded in sticky (very condensed) organic matter and form microaggregates (10-160 μm in size) stable under sonication. In basin B1, we presume that the aggregation-induced porosity would have favored water flow, explaining the low influence of H1 on saturated hydraulic conductivity. Conversely, ξ_m was very low in basin B2 before the removal of H1 (20-times lower compared with B1), and was indicative of a porous medium characterized by very small pores and few connections. Consequently, an increase of the algal biomass could have affected the pore network by reducing the pore size and/or filling connections between the pores in layer H1 of B2. This is consistent with previous lab-scale experiments which highlighted that biofilm growth and thickness can alter pore structure

by filling the entire pore space of the medium, causing drastic change in hydraulic properties. Water circulation occurred then through the biomass matrix itself (Taylor et Jaffé, 1990). Similarly, in our study, the dense layer of sediment associated with algae presented low porosity and exhibited reduced capacity to conduct flows, explaining the strong negative influence of layer H1 on the saturated hydraulic conductivity measured in B2. This assumption is also consistent with the study of Thullner (2010), highlighting that the ability of microorganisms to build up a required amount of biomass was the main biological feature explaining the clogging of a porous media by biofilms. Once the top surface layer had been removed in both basins, the medium exhibited the characteristics of a sand with comparable hydraulic properties that were measured in basins B2 and B1 (Table II). The two antagonistic effects of biomass on the hydraulic properties of a porous medium revealed by this study are summarized in Figure 6. Finally, the first centimeter of sediment constitutes both a hot spot for biological activity and a layer controlling the efficient permeability of calibrated sand deposited at the bottom of the basins.



Conclusion

The aim of this study was to determine the relative influence of sediment deposition and biofilm growth in processes involved in the degradation of the hydraulic properties of infiltration basins designed for groundwater recharge. We identified a combined effect due to biofilm and the sedimentation of fine particles in the upper sedimentary layer (0-1 cm). We also demonstrated the specific contribution of phototrophic biomass which seems to play a key role in clogging when it reaches a certain density. In the literature, the significant contribution of algae on the clogging process has rarely been demonstrated (Ragusa *et al.*, 1994; Battin et Sengschmitt, 1999; Ibisch *et al.*, 2009) and most studies reported the effect of bacterial biomass (cells and secreted exopolymers) on permeability reduction in porous media (Vandevivere et Baveye, 1992; Thullner *et al.*, 2002a; Mauclaire *et al.*, 2004). For instance, Vandevivere et Baveye (1992) showed that the production of exopolymers by bacteria in a sand column may drastically reduce hydraulic conductivity by increasing frictional resistance at the solid-liquid interface and/or by decreasing the effective porosity of the media. However, this type of study performed at laboratory-scale was only representative of unlighted heterotrophic systems (subterranean systems like soils, porous aquifers) where the biomass of phototrophs was null or low. In most shallow aquatic ecosystems (rivers, ponds, shallow lakes, coastal zones), water-sediment interfaces are colonized by complex communities of micro-organisms including both phototrophs and heterotrophs. The present study was therefore representative of conditions encountered in multiple environments although it can be noted that the constant nutrient supply and the solar exposure encountered at the surface of the basins probably favored the growth of phototrophic organisms. This conclusion suggests that the contribution of algal biofilm on soil structure and hydraulic exchanges in sedimentary habitats has been underestimated in ecosystem studies. As ecological processes occurring in sediments (e.g., organic matter processing, nutrient consumption) are largely governed by hydraulic exchanges at the water-sediment interface (Navel *et al.*, 2011), biofilms can play a crucial role in water purification processes by affecting the hydraulic properties of surface sediments. However, more experiments are needed to quantify the impact of biofilm-driven loss of hydraulic conductivity on the performance of water purification of sand infiltration systems. Ongoing research aimed at developing techniques to maintain the permeability of the infiltration surface will also be the subject of further papers and promote the development of suitable

practices to reduce clogging and its negative effects on the hydraulic performances of infiltration systems.

Acknowledgements

The authors would like to thank Laurent Simon, Felix Vallier and Marc Danjean for their very efficient technical assistance during the experiments. This research received financial and technical support from the Greater-Lyon Urban Community and Veolia-Water.

References

- Anderson, J. U. 1963. An improved pretreatment for mineralogical analysis of samples containing organic matter. *New Mexico State University Agricultural Experiment Station*. **172**: 380-388.
- Angulo-Jaramillo, R., Vandervaere, J. P., Roulier, S., Thony, J. L., Gaudet, J. P. and Vauclin, M. 2000. Field measurement of soil surface hydraulic properties by disc and ring infiltrometers : A review and recent developments. *Soil and Tillage Research* **55**: 1-29.
- Badin, A. L., Faure, P., Bedell, J. P. and Delolme, C. 2008. Distribution of organic pollutants and natural organic matter in urban storm water sediments as a function of grain size. *Science of the Total Environment* **403**(1-3): 178-187.
- Badin, A. L., Méderel, G., Béchet, B., Borschneck, D. and Delolme, C. 2009. Study of the aggregation of the surface layer of Technosols from stormwater infiltration basins using grain size analyses with laser diffractometry. *Geoderma* **153**(1-2): 163-171.
- Bali, M., Gueddari, M. and Boukchina, R. 2010. Treatment of secondary wastewater effluents by infiltration percolation. *Desalination* **258**(1-3): 1-4.
- Bardin, J. P., Barraud, S., Alfakih, E. and Dechesne, M. 2002. *Performance assessment of stormwater infiltration strategies: A multi-indicator approach*. Global Solutions for Urban Drainage.
- Battin, T. J. 1997. Assessment of fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total esterase activity in natural stream sediment biofilms. *Science of the Total Environment* **198**(1): 51-60.
- Battin, T. J. and Sengschmitt, D. 1999. Linking sediment biofilms, hydrodynamics, and river bed clogging: Evidence from a large river. *Microbial Ecology* **37**(3): 185-196.
- Baveye, P., Vandevivere, P., Hoyle, B. L., DeLeo, P. C. and de Lozada, D. S. 1998. Environmental impact and mechanisms of the biological clogging of saturated soils and aquifer materials. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* **28**(2): 123-191. DOI: 10.1080/10643389891254197.
- Bormann, H. and Klaassen, K. 2008. Seasonal and land use dependent variability of soil hydraulic and soil hydrological properties of two Northern German soils. *Geoderma* **145**: 295-302. DOI: 10.1016/j.geoderma.2008.03.017.
- Bouwer, H. 2002. Artificial recharge of groundwater: Hydrogeology and engineering. *Hydrogeology Journal* **10**(1): 121-142.
- Braud, I., De Condappa, D., Soria, J. M., Haverkamp, R., Angulo-Jaramillo, R., Galle, S. and Vauclin, M. 2005. Use of scaled forms of the infiltration equation for the estimation of

- unsaturated soil hydraulic properties (the Beerkan method). *European Journal of Soil Science* **56**(3): 361-374.
- Brissaud, F., Lefevre, F., Joseph, C., Alamy, Z. and Landreau, A. 1989. *Waste water, infiltration-percolation for aquifer recharge or water re-use*. Benidorm Symposium.
- Brooks, R. H. and Corey, C. T. 1964. Hydraulic properties of porous media. *Colorado State University, Fort Collins - Hydrol. paper*. **vol 3**.
- Burdine, N. T. 1953. Relative permeability calculations from pore size distribution data. *Transactions of the American Institute of Mining and Metallurgical Engineers* **198**: 71-77.
- Cannavo, P., Vidal-Beaudet, L., Béchet, B., Lassabatere, L. and Charpentier, S. 2010. Spatial distribution of sediments and transfer properties in soils in a stormwater infiltration basin. *Journal of Soils and Sediments* **10**(8): 1499-1509.
- Cunningham, A. B., Characklis, W. G., Abedeen, F. and Crawford, D. 1991. Influence of biofilm accumulation on porous media hydrodynamics. *Environmental Science and Technology* **25**(7): 1305-1311.
- Dechesne, M., Barraud, S. and Bardin, J. P. 2004. Indicators for hydraulic and pollution retention assessment of stormwater infiltration basins. *Journal of Environmental Management* **71**(4): 371-380.
- Février, L. 2001. *Transfert d'un mélange Zn-Cu-Pb dans un dépôt fluvioglacière carbonaté - approche en colonnes de laboratoire*. Chimie de Lyon (Chimie, Procédés, Environnement), Université Lyon 1.
- Flemming, H. C. and Wingender, J. 2010. The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology* **8**(9): 623-633.
- Fodor, N., Sandor, N., Orfanus, T., Lichner, L. and Rajkai, K. 2011. Evaluation method dependency of measured saturated hydraulic conductivity. *Geoderma* **165**: 60-68.
- Graham, A. A. 1990. Siltation of stone-surface periphyton in rivers by clay-sized particles from low concentrations in suspension. *Hydrobiologia* **199**(2): 107-115. DOI: 10.1007/bf00005603.
- Hatt, B. E., Fletcher, T. D. and Deletic, A. 2008. Hydraulic and pollutant removal performance of fine media stormwater filtration systems. *Environmental Science and Technology* **42**(7): 2535-2541.
- Haverkamp, R., Arrûe, J. L., Vandervaere, J. P., Braud, I., Boulet, G., Laurent, J. P., Taha, A., Ross, P. J. and Angulo-Jaramillo, R. 1996. Hydrological and thermal behavior of the vadose zone in the area of Barrax and Tomelloso (Spain) : Experimental study, analysis and Modeling. Project UE. N° EV5C-CT 92 00 90.
- Haverkamp, R., Debionne, S., Viallet, P., Angulo-Jaramillo, R. and De Condappa, D. 2006. Soil properties and moisture movement in the unsaturated zone. IN *The handbook of groundwater engineers*. J. W. Delleur, CRC: 6.1-6.59.
- Hoffmann, A. and Gunkel, G. 2011. Bank filtration in the sandy littoral zone of Lake Tegel (Berlin): Structure and dynamics of the biological active filter zone and clogging processes. *Limnologica - Ecology and Management of Inland Waters* **41**(1): 10-19.
- Ibisch, R. B., Seydell, I. and Borchardt, D. 2009. Influence of periphyton biomass dynamics on biological colmation processes in the hyporheic zone of a gravel bed river (River Lahn, Germany). *Advances in Limnology* **61**: 87-104.
- Jacques, D., Mohanty, B. P. and Feyen, J. 2002. Comparison of alternative methods for deriving hydraulic properties and scaling factors from single-disc tension infiltrometer measurements. *Water Resources Research* **38**(7): 1120.
- Jorgensen, P. E., Eriksen, T. and Jensen, B. K. 1992. Estimation of viable biomass in wastewater and activated sludge by determination of ATP, oxygen utilization rate and FDA hydrolysis. *Water Research* **26**(11): 1495-1501.

- Kaiser, K., Eusterhues, K., Rumpel, C., Guggenberger, G. and Kögel-Knabner, I. 2002. Stabilization of organic matter by soil minerals - Investigations of density and particle-size fractions from two acid forest soils. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* **165**(4): 451-459.
- Katznelson, R. 1989. Clogging of groundwater recharge basins by cyanobacterial mats. *FEMS Microbiology Ecology* **62**(4): 231-242.
- Kim, J.-W., Choi, H. and Pachepsky, Y. A. 2010. Biofilm morphology as related to the porous media clogging. *Water Research* **44**(4): 1193-1201.
- Knowles, P., Dotro, G., Nivala, J. and García, J. 2011. Clogging in subsurface-flow treatment wetlands: Occurrence and contributing factors. *Ecological Engineering* **37**(2): 99-112.
- Langergraber, G., Haberl, R., Laber, J. and Pressl, A. 2003. Evaluation of substrate clogging processes in vertical flow constructed wetlands. *Water Science and Technology* **48**(5): 25-34.
- Lassabatere, L., Angulo-Jaramillo, R., Goutaland, D., Letellier, L., Gaudet, J. P., Winiarski, T. and Delolme, C. 2010. Effect of the settlement of sediments on water infiltration in two urban infiltration basins. *Geoderma* **156**(3-4): 316-325.
- Lassabatere, L., Angulo-Jaramillo, R., Soria-Ugalde, J. M., Šimůnek, J. and Haverkamp, R. 2009. Numerical evaluation of a set of analytical infiltration equations. *Water Resources Research* **45**: W12415.
- Lassabatere, L., Angulo-Jaramillo, R., Soria Ugalde, J. M., Cuenca, R., Braud, I. and Haverkamp, R. 2006. Beerkan estimation of soil transfer parameters through infiltration experiments - BEST. *Soil Science Society of America Journal* **70**(2): 521-532.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* **193**(1): 265-275.
- Mauclaire, L., Schürmann, A. and Mermillod-blondin, F. 2006. Influence of hydraulic conductivity on communities of microorganisms and invertebrates in porous media: A case study in drinking water slow sand filters. *Aquatic Sciences* **68**(1): 100-108.
- Mauclaire, L., Schürmann, A., Thullner, M., Gammeter, S. and Zeyer, J. 2004. Sand filtration in a water treatment plant: Biological parameters responsible for clogging. *Journal of Water Supply: Research and Technology - AQUA* **53**(2): 93-108.
- Mermillod-Blondin, F., Mauclaire, L. and Montuelle, B. 2005. Use of slow filtration columns to assess oxygen respiration, consumption of dissolved organic carbon, nitrogen transformations, and microbial parameters in hyporheic sediments. *Water Research* **39**(9): 1687-1698.
- Mohanty, B. P., Ankeny, M. D., Horton, R. and Kanwar, R. S. 1994. Spatial analysis of hydraulic conductivity measured using disc infiltrometers. *Water Resources Research* **30**: 2489-2498.
- Mubarak, I., Mailhol, J. C., Angulo-Jaramillo, R., Ruelle, P., Boivin, P. and Khaledian, M. 2009. Temporal variability in soil hydraulic properties under drip irrigation. *Geoderma* **150**(1-2): 158-165.
- Navel, S., Mermillod-Blondin, F., Montuelle, B., Chauvet, E., Simon, L. and Marmonier, P. 2011. Water-sediment exchanges control microbial processes associated with leaf litter degradation in the hyporheic zone: a microcosm study. *Microbial Ecology* **61**(4): 968-979.
- Nemes, A., Rawls, W. J. and Pachepsky, Y. A. 2005. Influence of organic matter on the estimation of saturated hydraulic conductivity. *Soil Science Society of America Journal* **69**(4): 1330-1337.
- Nguyen, L. 2001. Accumulation of organic matter fractions in a gravel-bed constructed wetland. *44*: 281-287.
- Nogaro, G. and Mermillod-Blondin, F. 2009. Stormwater sediment and bioturbation influences on hydraulic functioning, biogeochemical processes, and pollutant dynamics in laboratory infiltration systems. *Environmental Science and Technology* **43**(10): 3632-3638.

- Oberdorfer, J. A. and Peterson, F. L. 1985. Waste-water injection: Geochemical and biogeochemical clogging processes. *Ground Water* **23**(6): 753-761.
- Okubo, T. and Matsumoto, J. 1979. Effect of infiltration rate on biological clogging and water quality changes during artificial recharge. *Water Resources Research* **15**(6): 1536-1542.
- Perroux, K. M. and White, I. 1988. Designs for disc permeameters. *Soil Science Society Of America Journal* **52**(5): 1205-1215.
- 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.
- Platzer, C. and Mauch, K. 1997. Soil clogging in vertical flow reed beds - mechanisms, parameters, consequences and.....solutions? *Water Science and Technology* **35**(5): 175-181. DOI: 10.1016/s0273-1223(97)00066-8.
- Ragusa, S. R., de Zoysa, D. S. and Rengasamy, P. 1994. The effect of microorganisms, salinity and turbidity on hydraulic conductivity of irrigation channel soil. *Irrigation Science* **15**(4): 159-166.
- Ragusa, S. R., McNevin, D., Qasem, S. and Mitchell, C. 2004. Indicators of biofilm development and activity in constructed wetlands microcosms. *Water Research* **38**(12): 2865-2873.
- Rawls, W. J., Nemes, A. and Pachepsky, Y. A. 2005. Effects of soil organic matter on soil hydraulic properties. IN *Development of Pedotransfer Functions in Soil Hydrology*. Y. A. Pachepsky and W. J. Rawls. Amsterdam, Elsevier: 95-114.
- Schälchli, U. 1992. The clogging of coarse gravel river beds by fine sediment. *Hydrobiologia* **235-236**(1): 189-197.
- Schnurer, J. and Rosswall, T. 1982. Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter. *Applied and Environmental Microbiology* **43**(6): 1256-1261.
- Schuh, W. M. 1990. Seasonal variation of clogging of an artificial recharge basin in a northern climate. *Journal of Hydrology* **121**(1-4): 193-215.
- Schürch, M. and Vuataz, F. D. 2000. Groundwater components in the alluvial aquifer of the alpine Rhone River valley, Bois de Finges area, Wallis Canton, Switzerland. *Hydrogeology Journal* **8**(5): 549-563.
- Siegrist, R. L. 1987. Soil clogging during subsurface wastewater infiltration as affected by effluent composition and loading rate. *Journal of Environmental Quality* **16**(2): 181-187.
- Šimůnek, J. and van Genuchten, M. T. 1997. Estimating unsaturated soil hydraulic properties from multiple tension disc infiltrometer data. *Soil Science* **162**(6): 383-398.
- Skolasińska, K. 2006. Clogging microstructures in the vadose zone - Laboratory and field studies. *Hydrogeology Journal* **14**(6): 1005-1017.
- Smith, E., R. Smettem, J., Broadbridge, P. and Woolhiser, D. A. 2002. *Infiltration theory for hydrologic applications*. Washington, D. C., Water Resour. Monogr. Ser. 15, AGU: 212 pages.
- Sobieraj, J. A., Elsenbeer, H. and G., C. 2004. Scale dependency in spatial patterns of saturated hydraulic conductivity. *Catena* **55**: 49-77. DOI: 10.1016/s0341-8162(03)00090-0.
- Taylor, S. W. and Jaffé, P. R. 1990. Biofilm growth and the related changes in the physical properties of a porous medium. 1. Experimental investigation. *Water Resources Research* **26**(9): 2153-2159.
- Thullner, M. 2010. Comparison of bioclogging effects in saturated porous media within one- and two-dimensional flow systems. *Ecological Engineering* **36**(2): 176-196.
- Thullner, M., Mauclaire, L., Schroth, M. H., Kinzelbach, W. and Zeyer, J. 2002a. Interaction between water flow and spatial distribution of microbial growth in a two-dimensional flow field in saturated porous media. *Journal of Contaminant Hydrology* **58**(3-4): 169-189.

- Thullner, M., Zeyer, J. and Kinzelbach, W. 2002b. Influence of microbial growth on hydraulic properties of pore networks. *Transport in Porous Media* **49**(1): 99-122.
- UNESCO. 1966. Determination of photosynthetic pigments in seawater. *Report SCOR-UNESCO. Working paper 17, Monographs on oceanographic methodology.*
- van Genuchten, M. T. 1980. Closed-form equation for predicting the hydraulic conductivity of unsaturated soils *Soil Science Society of America Journal* **44**(5): 892-898.
- Vandevivere, P. and Baveye, P. 1992. Effect of bacterial extracellular polymers on the saturated hydraulic conductivity of sand columns. *Applied and Environmental Microbiology* **58**(5): 1690-1698.
- Winiarski, T., Bedell, J. P., Delolme, C. and Perrodin, Y. 2006. The impact of stormwater on a soil profile in an infiltration basin. *Hydrogeology Journal* **14**(7): 1244-1251.
- Wu, J., Gui, S., Stahl, P. and Zhang, R. 1997. Experimental study on the reduction of soil hydraulic conductivity by enhanced biomass growth. *Soil Science* **162**(10): 741-748.
- Yilmaz, D., Lassabatere, L., Angulo-Jaramillo, R., Deneele, D. and Legret, M. 2010. Hydrodynamic Characterization of Basic Oxygen Furnace Slag through an Adapted BEST Method. *Vadose Zone Journal* **9**(1): 107-116.
- Yilmaz, D., Lassabatere, L., Deneele, D., Angulo-Jaramillo, R. and Legret, M. 2013. Influence of carbonation on the microstructure and hydraulic properties of a basic oxygen furnace slag. *Vadose Zone Journal* **12**(2): 9-15. DOI: 10.2136/vzj2012.0121.
- Zhao, L., Zhu, W. and Tong, W. 2009. Clogging processes caused by biofilm growth and organic particle accumulation in lab-scale vertical flow constructed wetlands. *Journal of Environmental Sciences* **21**(6): 750-757.

Table III: ANOVA results for the effects of basin and depth on percentages of particles < 63 μm before ($P < 63 \mu\text{m}$) and after NaOCl treatment ($P_{\text{treat}} < 63 \mu\text{m}$), on concentrations of total (TOC), total nitrogen (TN), proteins, chlorophyll-*a* (Ch_a), on hydrolytic activity (FDA), and on abundances of bacteria (BA) and damaged bacteria (DBA). d.f.: degrees of freedom for each tested effect

Effect	d.f.	$P < 63 \mu\text{m}$		$P_{\text{treat}} < 63 \mu\text{m}$		TOC		TN		Proteins	
		<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
Basin	1	7.57	0.019	3.44	0.83	17.90	< 0.01	29.64	< 0.001	39.16	< 0.001
Depth	2	27.96	< 0.001	1316.4	< 0.001	187.74	< 0.001	254.77	< 0.001	523.05	< 0.001
Basin x Depth	2	2.31	0.145	4.60	0.028	6.87	0.010	12.67	< 0.01	20.67	< 0.001
Error	12										

Table III (continued)

Effect	d.f.	Ch_a		FDA		BA		DBA	
		<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
Basin	1	13.19	< 0.01	32.83	< 0.001	4.70	0.051	0.13	0.726
Depth	2	26.10	< 0.001	181.28	< 0.001	33.40	< 0.001	7.45	< 0.01
Basin x Depth	2	13.00	< 0.001	26.63	< 0.001	3.38	0.064	0.66	0.533
Error	12								

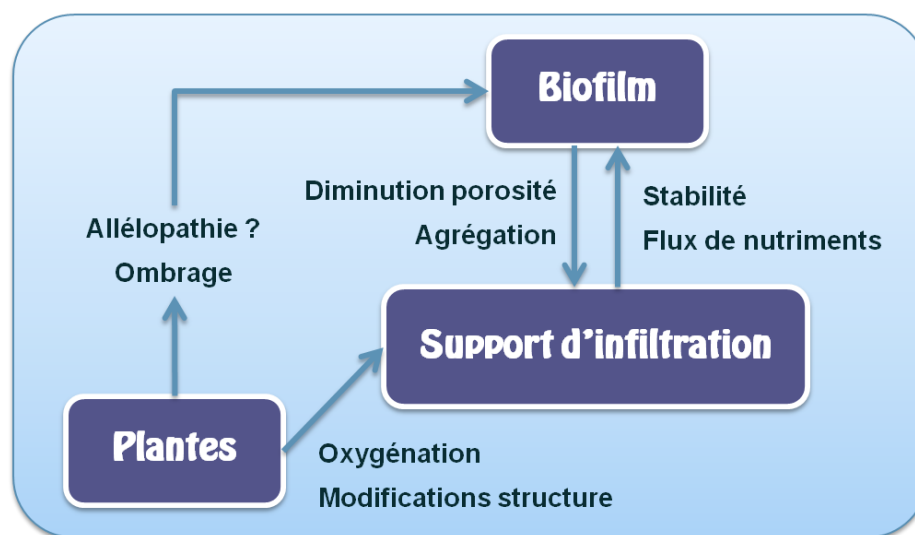
Table IV: Correlation coefficients (Pearson's r) between variables associated with biofilms: proteins, hydrolytic activity (FDA), total organic carbon (TOC), total nitrogen (TN), chlorophyll- a (Ch $_a$), abundances of bacteria (BA) and damaged bacteria (DBA (n=18 for each correlation tested))

	Proteins	FDA	TOC	TN	Ch $_a$	BA
Proteins						
FDA	0.895***					
TOC	0.949***	0.932***				
TN	0.951***	0.943***	0.999***			
Ch $_a$	0.756***	0.920***	0.840***	0.850***		
BA	0.912***	0.714***	0.847***	0.846***	0.532	
DBA	-0.404	-0.150	-0.256	-0.25	-0.160	-0.493*

II. Macrophytes allélopathiques : influence sur les biofilms benthiques (article 2)

Cet article présente les protocoles et résultats de la seconde expérience et vise à répondre aux questions suivantes :

- (i) Les macrophytes peuvent-elles limiter, voire réduire le développement des biofilms benthiques ?
- (ii) Si oui, quel(s) paramètre(s) structurel(s) et/ou fonctionnel(s) du biofilm affectent-elles ?



Cet article a été soumis dans le journal « *Ecological Engineering* » en mai 2014 et est actuellement en review.

The potential of allelopathic macrophytes to control benthic biofilm growth – a mesocosm approach

Morgane GETTE-BOUVAROT, Florian MERMILLOD-BLONDIN, Damien LEMOINE, Cécile DELOLME, Marc Danjean, Laura ETIENNE, Laurence VOLATIER

Université de Lyon, LEHNA UMR5023 Ecologie des Hydrosystèmes Naturels et Anthropisés, Université Lyon 1, ENTPE, CNRS, INRA, Campus de Vaulx-en-Velin, 3 rue Maurice Audin, Vaulx-en-Velin, F-69518, France

Abstract

Outdoor infiltration systems can be subject to rapid clogging by the combined and overlapping processes of pore occlusion by fine particles and the development of biofilm at the water-sediment interface. Macrophytes may be an efficient way of controlling biofilm development in these systems, as some of them release active compounds capable of inhibiting the growth of microorganisms (microalgae, bacteria). However, there is no proof of such an effect on benthic biofilm. Therefore the aim of this study is to fill this gap in knowledge by evaluating the role of several macrophytes on biofilms originating from infiltration systems. Four species of allelopathic aquatic macrophytes common in European floodplains were selected: *Vallisneria spiralis* (L.), *Berula Erecta* (Huds.) Coville, *Ceratophyllum demersum* (L.) and *Chara globularis* (L.). They were introduced in outdoor mesocosms filled with sediments from an infiltration basin designed for groundwater recharge (Lyon, France). Monitoring was carried out for six weeks, with sampling of the 0-1 cm layer in each mesocosm at the beginning and end of the experiment. Our results revealed a significant loss of biofilm algal biomass for *Vallisneria spiralis* and *Chara globularis* treatments. Measurements also showed an inhibitory effect of *Chara globularis* on the development of algae in the water column. These results demonstrate that the allelopathic activities of certain macrophytes could potentially prevent the excessive development of benthic biofilms in infiltration systems.

Keywords: Biofilm, Algae, Macrophytes, Allelopathy, Clogging.

Corresponding author: F. Mermillod-Blondin - Univ Lyon1, CNRS, UMR 5023 - LEHNA, Bât. Forel, F-69622 VILLEURBANNE Cedex FRANCE Tel.: +33 4 72 43 13 64; fax: +33 4 72 43 15 23. E-mail address: mermillo@univ-lyon1.fr.

1. Introduction

The development of biofilm in porous media can alter the hydraulic conductivity of sediment by reducing pore space and creating a biological mat at the water-sediment interface (Zhao *et al.*, 2009; Thullner, 2010). This phenomenon has been observed in infiltration systems designed for flood protection, groundwater recharge and/or stormwater disposal (Baveye *et al.*, 1998; Bouwer, 2002; Langergraber *et al.*, 2003). As the lifetime of these systems is largely dependent on their hydraulic performance, the reduction of sediment permeability is a major operational and maintenance issue associated with infiltration basin management (Knowles *et al.*, 2011). Infiltration systems are commonly built using sand as an infiltration medium as this substrate is more efficient for treating water than substrates of larger particle size, such as gravel or cobbles (Dodds *et al.*, 1996b). However, the small particle size of sand favors the retention of suspended particles and offers a high specific area available for biofilm establishment (Knowles *et al.*, 2011). Consequently, sandy infiltration media are progressively subject to clogging by the combined and overlapping processes of pore occlusion by fine particles and excessive biofilm growth (Platzer et Mauch, 1997; Baveye *et al.*, 1998; Langergraber *et al.*, 2003). In a previous study (Gette-Bouvarot *et al.*, 2014a), we pointed out that the phototrophic component of benthic biofilms (i.e., algae, cyanobacteria) could reduce the saturated hydraulic conductivity of infiltration basins by up to 60-fold. Consequently, controlling the biofilm growth at the water/sediment interface appears crucial to improve the long-term performance of infiltration basins.

Our intention in the present study was to search for an ecological process to regulate benthic biofilm development by exploring the allelopathic properties of submerged macrophytes. Allelopathy was first defined by Molisch (1937) as biochemical interactions (inter or intra specific) between plants and between plants and microorganisms. Accordingly, the effects can be either stimulatory or inhibitory; however, most studies have reported negative interactions between primary producers (Nakai *et al.*, 1999; Gross, 2003; Hilt, 2006). In aquatic environments, light is one of the most important factors for the development of submerged macrophytes (Sand-Jensen, 1990). Thus, shading by phytoplankton or epiphytes can significantly alter their growth. Consequently, the release of allelopathically inhibitory active compounds is an adaptive

trait developed by macrophytes in their competition for light with other primary producers (Gopal et Goel, 1993; Gross, 2003). Nutrient availability is another important factor influencing allelopathic effects due to competition between primary producers (Gross, 2003).

Allelopathic effects of submerged macrophytes on phytoplankton and epiphytes have been studied widely (Gopal et Goel, 1993; Erhard et Gross, 2006; Hilt, 2006; Mulderij *et al.*, 2006; Gross *et al.*, 2007; Hu et Hong, 2008). The studies of Gross (2003) and Hu et Hong (2008) reported that allelopathic compounds could alter the cell structure or affect the photosynthesis, respiration and/or enzymatic activities of target organisms through the metabolic pathway. For instance, Körner et Nicklisch (2002) showed that several macrophytes could alter photosystem II of planktonic algae. In particular, it has been recognized that lipophilic extracts of *Myriophyllum spicatum* can alter the photosynthetic activity of cyanobacteria and other photoautotrophs (Leu *et al.*, 2002), this plant can also inhibit the alkaline phosphatase activity of filamentous cyanobacteria by releasing hydrolysable polyphenol substances (Gross *et al.*, 1996). In addition to allelopathic inhibition of primary producers, some macrophytes also exhibit antibacterial activity, for instance against the bacterial components of epiphytes (Gopal et Goel, 1993) and against coccoids (Gross *et al.*, 1996). In the light of these observations, it is probable that allopathic macrophytes can alter the development of both the bacterial and microalgal components of benthic biofilm. However, to our knowledge, no study has yet demonstrated such interactions.

The aim of this work is to assess the ability of certain macrophytes to limit the growth of benthic biofilms developing in infiltration systems. We selected four aquatic macrophyte species common in European floodplains (Bornette *et al.*, 2001) *Vallisneria spiralis* (L.), *Berula erecta* (Huds.) Coville, *Ceratophyllum demersum* (L.) and *Chara globularis* (L.). These four species are known for their allelopathic effects on freshwater algae composing benthic biofilms (Hu et Hong, 2008). They were introduced in outdoor mesocosms that offer a reasonable compromise, as they allow investigations of ecological interactions (Pusey *et al.*, 1994), while providing replicability under partially controlled conditions (Caquet *et al.*, 1996). Mesocosms consisted of stagnant freshwater systems, with a layer of sediment covered by a natural biofilm collected in an infiltration basin. We expected

to observe a negative influence of the macrophytes on the structural and/or functional state of biofilms, due to allelopathic effects and shading. Biomarkers of growth and photosynthetic efficiency were measured on macrophytes to assess their ability to grow in sediment from an infiltration system during a 6-week experiment. Then, the effects of the macrophytes on biofilm were evaluated with measurements of total organic carbon, chlorophyll-*a* content, chlorophyll fluorescence and microbial enzymatic activities. According to our predictions, mesocosms containing macrophytes would present a lower biofilm biomass, and/or reduced activities in comparison to plant-free controls.

2. Materials & Methods

2.1 Experimental conditions

2.1.1 Location

The outdoor mesocosms were set up in the “Crépieux-Charmy” pumping well field (375 hectares, 1 280 000 inhabitants supplied) near Lyon (France), from May 2012 to July 2012. Several infiltration basins are used on this site for aquifer recharge and supplied with surface water from an old main branch of the Rhone River. However, the hydraulic performances of these basins were considerably affected by dense algal biofilm that had developed at the interface between the water column and the infiltration media (see Gette-Bouvarot *et al.* (2014a) for more details).

2.1.2 Mesocosms

Outdoor static mesocosms (Figure 1) consisting of clear food grade plastic aquariums (39.5cm x 34cm x 29.3cm) filled with a 7 cm thick sediment layer, covered by a water column of 25 cm (approximate volume of 30L). The sediment used in the mesocosms was taken from an infiltration basin densely colonized by algal biofilm. It consisted of a mixture of sand (medium particle size of 450 μm), fine silt particles (medium size of 30 μm , representing around 50% of the particles in volume) and organic matter (content of around 3-4%), covered by biofilm mats (Gette-Bouvarot *et al.*, 2014a). The mats were carefully sampled to avoid any disturbance and then deposited on the water sediment interface of the mesocosms to re-create the vertical structure present in basins. The mesocosms were supplied with the natural and non-filtered water used to feed the

infiltration basins. During the experiment, the water was partly (1/3) renewed in each mesocosm every week to maintain a nutrient supply more or less equivalent to that observed in the infiltration basin. The mesocosms were installed in a shaded area and fencing reeds were suspended over the experimental area to prevent excessive water warming, guarantee comparable light exposure, and prevent photo-inhibition of the macrophytes, i.e. $390 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR (Photosynthetic Active Radiation) at the saturation level measured for the species (Lemoine *et al.*, 2012). In addition, each mesocosm was covered with a white net (1.2 x 1.2mm) to minimize the introduction of insects and debris. Finally, the incident light intensity at the mesocosm surface was reduced to about 13% of sunlight value. Mesocosms were allowed to settle for one week before introducing the macrophytes (stabilization).

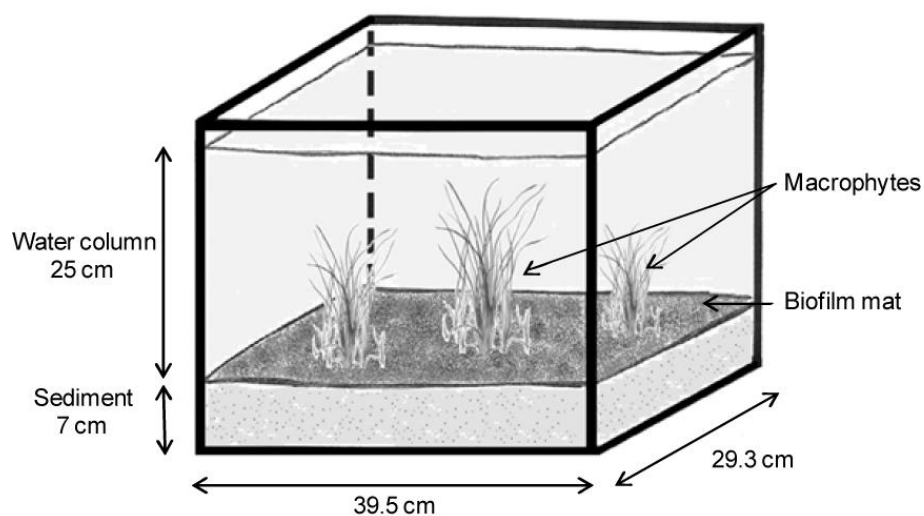


FIGURE 1: Mesocosm design

2.1.3 Macrophytes

The four species (*Vallisneria spiralis* (L.), *Berula erecta* (Huds.) Coville, *Ceratophyllum demersum* (L.) and *Chara globularis* (L.)) were selected for their ubiquity (Bornette *et al.*, 2001), their potential ecological tolerance of stagnant oligotrophic environments corresponding to the conditions of infiltration basins, and their potential negative allelopathic effects on freshwater algae composing the benthic biofilms (Table I). The four macrophytes were collected in oligotrophic cut off channels of the Rhone River, in close proximity to the study site and placed in 250L tanks that served as aquatic nurseries to obtain plants with homogenous physiological states. Prior to their

introduction in mesocosms, the macrophytes were washed and controlled to remove any organisms which might be present.

2.1.4 Experimental design

A total of 20 mesocosms were set-up to reproduce 5 treatments and four replicates per treatment, with a random treatment distribution between mesocosms: (1) plant-free controls, (2) *V. spiralis*, (3) *B. erecta*, (4) *C. demersum* and (5) *C. globularis*. For each species, four individuals were randomly introduced per mesocosm. The experiment was conducted for 6 weeks between May and July 2012. Table II provides the experimental schedule and the main measurements performed during the experiment on the water column, macrophytes and sediment biofilm. Time t_0 corresponded to the introduction of the macrophytes in the mesocosms (24 May 2012) and time t_f to the end of the experiment (4 July 2012).

Table II : Time table of the experiment

Date	05-03	05-15	05-24	05-31	06-07	06-14	06-21	06-29	07-04
Time			t_0	t_1	t_2	t_3	t_4	t_5	t_f
Macrophyte acclimation	■	■							
Mesocosm preparation		■							
Macrophyte introduction			■						
Measurements on macrophytes			■						■
Measurements on sedimentary biofilm			■						■
Measurements in water column			■	■	■	■	■	■	■
Water renewal (1/3 of volume)				■	■	■	■	■	

Table I : Allelopathy and characteristics of chosen aquatic macrophytes

Species	Characteristics (Sculthorpe, 1967)	Known microorganisms inhibited according to the review of Hu et Hong (2008)
<i>Ceratophyllum demersum</i> (L.)	Fine substrates (sandy or silty) Does not form roots, attached with rhizoids Long and free-floating stems with numerous side shoots, Can form a dense subsurface canopy (shading)	A variety of diatoms (including <i>Nitzschia palea</i>), green algae (including <i>Chlorella pyrenoidosa</i>) and cyanobacteria (including <i>Microcystis aeruginosa</i>)
<i>Vallisneria spiralis</i> (L.)	Fine substrates (silty) and slow-flow water areas Dense fasciculate root system with multitude of small roots Stolon at the base, Narrow and linear leaves organized in ramets	Cyanobacteria (<i>Microcystis aeruginosa</i>)
<i>Chara globularis</i> (L.)	Sandy, organic rich and less-oxygenated substrates Does not form roots, attached with rhizoids Macroalgae with a stem-like and leaf-like structure (giant cells forming a main axis with dimorphic branches).	A variety of diatoms (including <i>Nitzschia palea</i>), green algae (including <i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Scenedesmus acutus</i> and <i>Selenastrum carpicornutum</i>) and cyanobacteria
<i>Berula erecta</i> (Huds.) Coville	Muddy or coarse substrate Dense fasciculate root system Stolons at the base, hollow stems, leaves with several narrow to rounded leaflets	Diatom (<i>Nitzschia palea</i>)

2.2 Water column measurements

Measurements in the water column were conducted weekly to monitor environmental conditions (temperature, pH, electric conductivity, dissolved oxygen, nutrient concentrations and light conditions) that could influence the development of biofilm and/or macrophytes during the experiment (see Table II). A volume of 100 mL of water was collected weekly from each mesocosm and filtered (0.7 μ m, Whatman GF/F, Maidstone, UK). The filters were kept in a coolbox in the field and then stored at -20°C for 2 weeks prior to chlorophyll-*a* analysis. The filtered water was stored at 4°C for subsequent analysis of nutrients (NH₄⁺, NO₃⁻ and PO₄³⁻).

2.2.1 Physicochemical parameters

Temperature, pH, electric conductivity and dissolved oxygen were measured *in situ* with a HQ40D multiparameter probe (HACH). Nutrient concentrations (NO₃⁻, NH₄⁺, and PO₄³⁻) in the filtered water were determined using standard colorimetric methods with an automatic analyzer (EasyChem Plus, Syssta). The light condition in the mesocosms was assessed by measuring the light intensity at the air-water and the water-sediment interfaces of each mesocosm using an LI-193 underwater spherical quantum sensor (Licor, Lincoln, NE, USA). The percentage of light reaching the sediment surface compared to the light intensity reaching the water surface was calculated to determine the light penetration in each mesocosm, which is a proxy of water transparency.

2.2.2 Phototrophic development in the water column

Phytoplankton biomass was estimated by pigment analysis (chlorophyll-*a*). The frozen filters were cut into small slices and immersed in 5 mL of 90% acetone. Samples were immersed in an ice bath to avoid overheating during sonication (3x 5s, ultrasonic probe, 20 kHz) and stored for 2 h at 4°C in the dark. After incubation, the extracts were centrifuged (4°C, 4000 rpm, 20 min) and chlorophyll-*a* absorbance was measured spectrophotometrically according to the Scor-Unesco method (Unesco, 1966). The concentration of Chl_a was then expressed in μ g of Chl_a per L of water column. During the experiment, the development of filamentous algae was observed visually in the water column of the mesocosms. To evaluate their biomass, they were collected at t_f in each mesocosm using filter paper. Filamentous algae were weighed the day of sampling

and after 48 h of drying at 90°C to determine their wet and dry masses per mesocosm. In parallel, a fresh sub-sample was collected per mesocosm to determine the Chl a concentration (as described above) per wet mass of filamentous algae. Using the ratio between wet and dry masses of filamentous algae, the biomass was expressed in mg of Chl a per mesocosm.

2.3 Measurements on macrophytes

The growth of macrophytes during the experiment was determined by measuring their fresh and dry masses at t_0 and t_f . For each species, it was obtained by measuring the differences between the dried masses (90°C, 48h) of macrophytes collected in the mesocosms at t_f and those of macrophyte batches of comparable size to those introduced in the mesocosms at t_0 . We also performed measurements at t_0 and t_f on vegetative multiplication modalities (the number of stems and leaves for *B. erecta*, the number of ramets for *V. spiralis*, the stem length for *C. demersum* and the thallus volume for *C. globularis*, determined with pictures taken at t_0 and t_f).

The photosynthetic efficiency of macrophytes was also assessed at t_0 and t_f . Macrophyte samples were collected in each mesocosm using scissors and stored in a coolbox for transport to the laboratory. Chlorophyll fluorescence was measured *in vivo* using a pulse amplitude modulation fluorometer (model PAM 210, Hansatech instrument). After dark acclimation of 20 min, the minimum fluorescence (F_0) was obtained upon excitation with a weak measuring beam from a pulse light-emitting diode. The maximum fluorescence yield (F_m) was determined after exposure to a saturating pulse of white light to close all reaction centers. The maximum quantum efficiency F_v/F_m ($= (F_m - F_0)/F_m$), representing the maximal efficiency of the photo-system II (PSII), was used as an indicator of photosynthetic efficiency. This ratio is between 0 and a maximum value of 0.84 (<0.85) and provides a quick and useful estimate of light reaction activity and photosynthetic rate (Maxwell et Johnson, 2000; Ibaraki et Murakami, 2007).

2.4 Measurements on sediments and biofilm

At t_0 and t_f , 4 samples of sediment from the 0-1 cm layer were randomly collected from each mesocosm using a cut syringe (\varnothing 23 mm). These 4 samples were pooled and

homogenized to form a composite sample for each mesocosm. They were stored in a cool box during transport to the laboratory within 4 hours.

2.4.1 Organic matter

Total organic carbon (TOC) and total nitrogen (TN) of the 0-1 cm sedimentary layer were measured as an estimator of the sedimentary biofilm biomass (Gette-Bouvarot *et al.*, 2014a). TOC and TN were determined by high-temperature combustion of pre-acidified dry samples (60°C, 48h) and subsequent measurement of CO₂ and N₂ by thermal conductometry using an elemental analyzer (FlashEA, Thermo Electron Corporation).

2.4.2 Nutrient concentrations in porewater

The concentrations of nutrients (NO₃⁻, NH₄⁺, and PO₄³⁻) in pore water were estimated at the end of the experiment (t_i) for each mesocosm. This analysis allowed us to evaluate the nutrient availability in the system and the potential role of plants in nutrient dynamics. For each mesocosm, 5 g of wet sediment was centrifuged at 4000 rpm for 20 minutes to separate the pore water from the sediment. Nutrient analysis was performed on the supernatant with an automatic analyzer (EasyChem Plus, Syssta) following standard colorimetric methods.

2.4.3 Algal and bacterial components of the biofilm

The phototrophic biomass of the sediment biofilm was assessed by measuring Chl a content in the sediment samples. As with the measures performed on the phytoplankton, Chl a content was assessed by spectrophotometry using the SCOR-UNESCO method. The results were expressed in µg per g of dry matter. The bacterial cell number and membrane integrity were evaluated by direct microscopy counts after incubation of the sediment with the fluorochromes of the BacLight™ kit for bacterial Viability (Invitrogen). A suspension was prepared with 5g of sediment mixed with 10 mL of a NaCl solution (0.8% m v-1) previously filtered at 0.22 µM and autoclaved. Prior to analyses, the suspension was sonicated (ultrasound bath, 5 min, 45 kHz). A blank with the NaCl solution was prepared to verify that no bacterial contamination had occurred during sample processing. Staining was obtained by adding in diluted suspension a volume of 500 µL of Syto9 and Pi, previously dissolved in 10 mL of the NaCl solution. Incubation was performed for 20 min in the dark at room temperature. The suspension

was then filtered on a black filter (porosity 0.22 μM , Wathman Nuclepore®) for microscopy reading. Bacterial counts were done under an epifluorescence microscope (Zeiss axioskop), with excitation of fluorochromes under blue light (446 nm-500 nm). Bacteria with membrane integrity were colored green and bacteria with altered membrane were colored red. Thirty fields were counted per filter with a cell density suitable for counting (30-300 bacteria per field). Bacterial cell numbers were reported per g of dry matter. Damaged bacterial cells were reported as percentages of total bacterial cell numbers.

2.4.4 Biofilm activities

The functional state of the biofilm was assessed by measuring hydrolytic and alkaline phosphatase activities, and chlorophyll fluorescence on sediment samples. The hydrolytic activity of the biofilm was assessed by the fluorescein diacetate (FDA) hydrolysis method (Jorgensen et al., 1992). FDA presents some advantages as it is hydrolyzed by several groups of enzymes involved in the decomposition of organic matter (Schnurer et Rosswall, 1982). Therefore, its hydrolysis is a good indicator of overall metabolic activity in biofilms (Battin, 1997). Samples (0.5 g fresh weight) were placed in 3 mL of a pH 7.6 phosphate buffer solution with 0.15 mL of 4.8 mM FDA solution. Incubation was maintained for 30 min until the fluorescein turned green, ensuring that FDA concentration did not limit enzymatic activity. The reaction was stopped by freezing the samples at -20°C after the addition of 3 mL of mercuric chloride solution (200 mg L^{-1}). Fluorescein concentration was estimated from the absorbance of the filtered supernatant ($0.45 \mu\text{m}$, Millipore) measured at 490 nm and expressed as μmol of FDA hydrolyzed per hour and per gram of dry matter. Alkaline phosphatase activity (EC3.1.3.1-2) was measured using methylumbelliferyl phosphate (MUF-P, Sigma-Aldrich), according to Romaní et Sabater (1999): 1g fresh weight was incubated in the dark at room temperature for 60 min with regular stirring after the addition of 4 mL of autoclaved and filtered water from the aquifer, 2 mL of a buffer solution of Tris/HCl at pH 8.3, and 0.9 mL of a 2 mM solution of MUP (the final concentration was the MUP saturating concentration for our samples). Degradation of the MUP generated methylumbelliferone (MUF), a fluorescent product which was assayed by fluorescence (excitation: 355 nm - emission: 460 nm), and then expressed as μmol per hour and per

gram of dry matter. Blanks and controls were prepared in parallel to correct non-enzymatic hydrolysis of the substrates and the fluorescence products. Measurement of chlorophyll fluorescence was used to determine the quality of the biofilm photosynthetic activity, and thus its physiological state. This measurement was performed the day of sampling, on samples stored 20 min in the dark at room temperature with the Chlorophyll fluorometer, (model PAM 210, Hansatech instrument) used to analyze the photosynthetic activity of macrophytes (see above). This analysis was used to obtain the maximal photosynthesis efficiency of the sediment biofilm (Maxwell et Johnson, 2000; Ibaraki et Murakami, 2007).

2.5 Data analysis

For the physicochemical, microbial and plant variables, measured at different times during the experiment, we tested treatments and time effects using a repeated measures analyses of variance (RM-ANOVA) with treatment (plant-free controls, *V. spiralis*, *B. erecta*, *C. demersum* and *C. globularis*) as fixed factor and time as repeated factor. The “treatment*time” interaction tested whether the treatments had contrasting influences on the evolution of the measured variables during the course of the experiment. If significance was detected, post hoc Tukey’s HSD tests were performed to determine whether significant pairwise differences occurred between the start and the end of the experiment for each treatment. For filamentous algae, bacterial abundances and percentages of intact bacteria which were assessed at one date (t_i), the difference between treatments was determined using one-way analyses of variance (ANOVA) followed by Tukey’s HSD tests. For all the variables, the normality and the homoscedasticity of the residues were tested using the Shapiro-Wilk test and the Levene test, respectively. When necessary, the data were log transformed as a first step. All the statistical analyses were performed using Statistica® V10 (StatSoft, inc) software. Significance for statistical tests was accepted at $\alpha < 0.05$.

Table III: Repeated measures analysis of variance (RM-ANOVA) results for the effects of treatment as fixed factor and time as repeated factor, and their interaction.

Water column parameters were measured each week (7 times), other parameters were measured at t_0 and t_f only (see Table II).

		Treatment		Time		Time * Treatment	
		<i>F</i> (4, 17)	<i>p</i>	<i>F</i> (6, 102)	<i>p</i>	<i>F</i> (24, 102)	<i>p</i>
Water column	<i>P-PO₄³⁻</i>	1.37	0.28	1.18	0.32	1.35	0.15
	<i>N-NH₄⁺</i>	1.58	0.22	11.64	< 0.05	1.73	< 0.05
	<i>N-NO₃²⁻</i>	2.18	0.11	58.28	< 0.05	1.41	0.12
	<i>pH</i>	1.07	0.41	20.39	< 0.05	1.31	0.19
	<i>Conductivity</i>	1.72	0.19	67.06	< 0.05	0.90	0.60
	<i>Dissolved oxygen</i>	0.60	0.66	39.75	< 0.05	1.18	0.27
	<i>Temperature</i>	2.22	0.11	740.55	< 0.05	1.62	0.051
	<i>Phytoplankton</i>	0.35	0.84	1.25	0.29	1.10	0.36
	<i>Vertical light attenuation</i>	<i>F</i> (4, 15)	<i>p</i>	<i>F</i> (1, 15)	<i>p</i>	<i>F</i> (4, 15)	<i>p</i>
		1.74	0.19	13.57	< 0.05	1.07	0.40
Macrophytes	<i>Biomass</i>	<i>F</i> (3, 11)	<i>p</i>	<i>F</i> (1, 11)	<i>p</i>	<i>F</i> (3, 11)	<i>p</i>
		8.73	< 0.05	6.62	< 0.05	21.3127	< 0.05
	<i>Max photosynthetic efficiency</i>	6.48	< 0.05	2.93	0.12	1.39	0.30
Sediment biofilm	<i>Total organic carbon</i>	<i>F</i> (4, 15)	<i>p</i>	<i>F</i> (1, 15)	<i>p</i>	<i>F</i> (4, 15)	<i>p</i>
		0.61	0.66	29.22	< 0.05	2.40	0.096
	<i>Nitrogen</i>	0.52	0.72	21.30	< 0.05	1.61	0.22
	<i>Chla</i>	1.16	< 0.05	46.72	< 0.05	3.08	< 0.05
	<i>Max photosynthetic efficiency</i>	3.28	< 0.05	0.024	0.88	5.30	< 0.05
	<i>Phosphatase alkaline activity</i>	0.27	0.89	9.34	< 0.05	1.87	0.17
	<i>Hydrolytic activity</i>	0.74	0.58	1.19	0.29	1.27	0.32

3. Results

3.1 Abiotic conditions

pH in the mesocosm water column increased globally during the experiment, from 9.3 ± 0.2 at t_0 to 10.1 ± 0.4 at t_f . We also measured an increase of dissolved oxygen concentration from $10.6 \pm 1.1 \text{ mg L}^{-1}$ to $15.2 \pm 2.5 \text{ mg L}^{-1}$ between t_0 and t_f . The electric conductivity fluctuated during the experimental period: it increased between t_0 and t_1 (first week) from 199 ± 20 to $284 \pm 37 \text{ }\mu\text{S cm}^{-1}$, and then gradually decreased until $149 \pm 14 \text{ }\mu\text{S cm}^{-1}$ at the end of the experiment (t_f). Temporal variations in water temperature ranged from 17.4 ± 0.3 to $24.3 \pm 0.4^\circ\text{C}$ during the experiment. Despite these temporal variations, no significant differences in pH, dissolved oxygen concentration, electric conductivity and temperature were detected during the experimental period between treatments (plant-free controls, *V. spiralis*, *B. erecta*, *C. demersum* and *C. globularis*).

Nutrient concentrations (NO_3^- , NH_4^+ , and PO_4^{3-}) in the water column decreased during the experiment for all the treatments, and presented similar patterns in all the mesocosms (Table III, RM-ANOVA, comparison between treatments, $p > 0.05$). The concentrations of P- PO_4^{3-} ($8.20 \pm 2.90 \text{ }\mu\text{g L}^{-1}$), N- NO_3^- ($77.3 \pm 34.9 \text{ }\mu\text{g L}^{-1}$) and N- NH_4^+ ($13.1 \pm 10.7 \text{ }\mu\text{g L}^{-1}$) measured were relatively low. In comparison, nutrient concentrations measured in pore water at t_f were considerably higher with mean concentrations of P- PO_4^{3-} ($285 \pm 238 \text{ }\mu\text{g L}^{-1}$), N- NO_3^- ($207 \pm 66 \text{ }\mu\text{g L}^{-1}$) and N- NH_4^+ ($238 \pm 114 \text{ }\mu\text{g L}^{-1}$) that were respectively 35, 3 and 18 times higher than those measured in the water column. As observed for the chemical analysis of the water column, nutrient concentrations in the pore water were comparable for the five treatments (Table III, comparison between treatments, $p > 0.05$).

Light values in the mesocosms (at the sediment surface) ranged from 20 to $130 \text{ }\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ during the experiment. Light penetration in the mesocosms decreased globally between t_0 and t_f , but presented large variations between and within them (Figure 2A), leading to the absence of significant difference between treatments (Table III). Visual observations showed that this vertical light attenuation was probably associated with algal development (both phytoplankton and filamentous algae) in the water column

(Figure 2B). Phytoplankton concentration was relatively low with values of Chla $< 5 \mu\text{g L}^{-1}$ in the mesocosms throughout the experiment, and no difference was detected either between treatments or over time (Table III). In contrast, filamentous algae in the water column presented strong growth for all the treatments (Figure 2B). Despite a significant increase in all the treatments, filamentous algae content at t_f was significantly lower in the mesocosms colonized by *C. globularis* in comparison with the four other treatments (Tukey's HSD tests, $p < 0.05$). The content of filamentous algae in the treatment with *B. erecta* also tended to be lower at t_f than in the control treatment, but no significant difference was detected (Figure 2B).

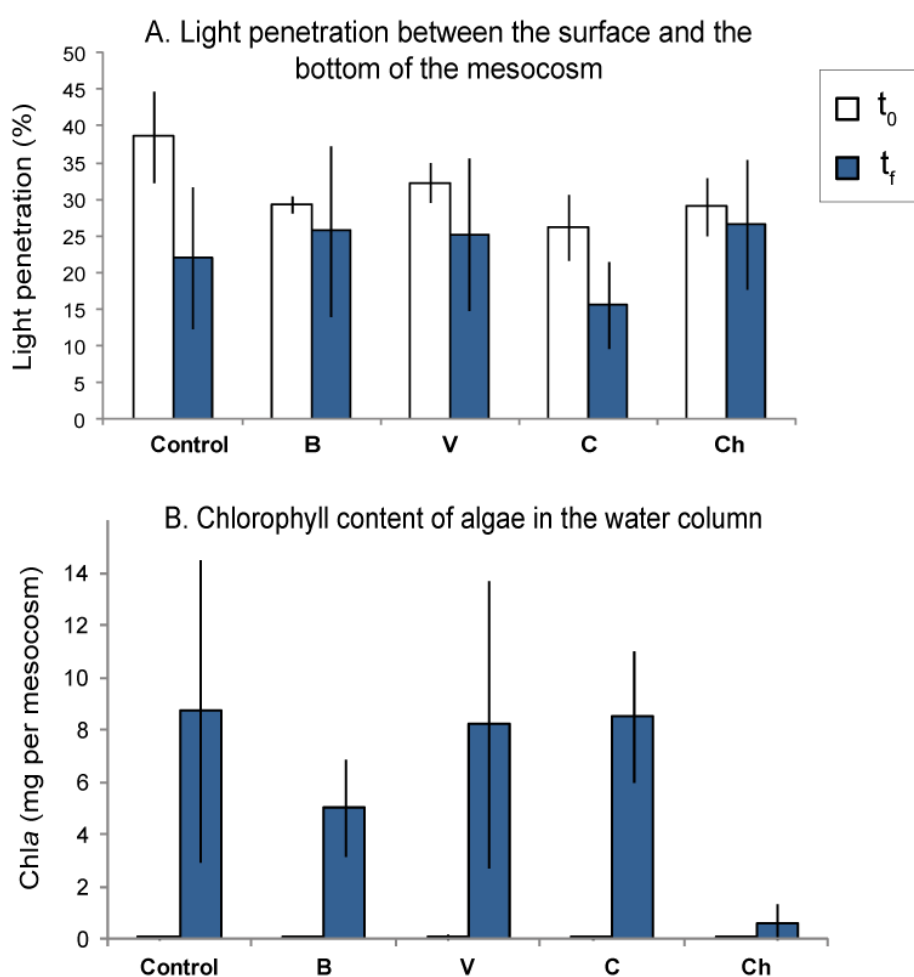


FIGURE 2: Light penetration in the mesocosms (A) and chlorophyll-a content in the water column, including both phytoplankton and filamentous algae (B) between t_0 and t_f for mesocosms colonized by *Berula erecta* (B), *Vallisneria spiralis* (V) *Ceratophyllum demersum* (C), *Chara globularis* (Ch) and control.

3.2 Growth and photosynthetic efficiency of macrophytes

Macrophytes exhibited different abilities to grow under our experimental conditions (Figure 3A, Table III, interaction “time” and “treatment” for macrophyte biomass). Significant growth of *V. spiralis* was observed since biomass multiplied by around 2.1 between t_0 and t_t , and the average number of runners increased almost 10-fold. *C. globularis* followed the same trends (biomass multiplied by around 2.3, and the volume occupied multiplied by around 5). In contrast, *B. erecta* presented a loss of biomass and the leaf area decreased by about 70% between t_0 and t_t . The biomass and stem length of *C. demersum* were comparable between t_0 and t_t .

At t_0 , the maximal photosynthetic efficiencies of the macrophytes were comparable between treatments (Figure 3B). On the contrary, at t_t , the average maximal fluorescence ratio of *V. spiralis* increased to the maximum theoretical value of 0.84 (Maxwell et Johnson, 2000) for each replicate whereas it decreased for *B. erecta* and *C. demersum*, and remained stable for *C. globularis* (Tukey's HSD tests only detected a significant difference between *V. spiralis* and *B. erecta* treatments at t_t). All these observations were consistent with biomass changes and showed that *V. spiralis* and *C. globularis* acclimatized well whereas *B. erecta* coped poorly with the conditions occurring in the mesocosms.

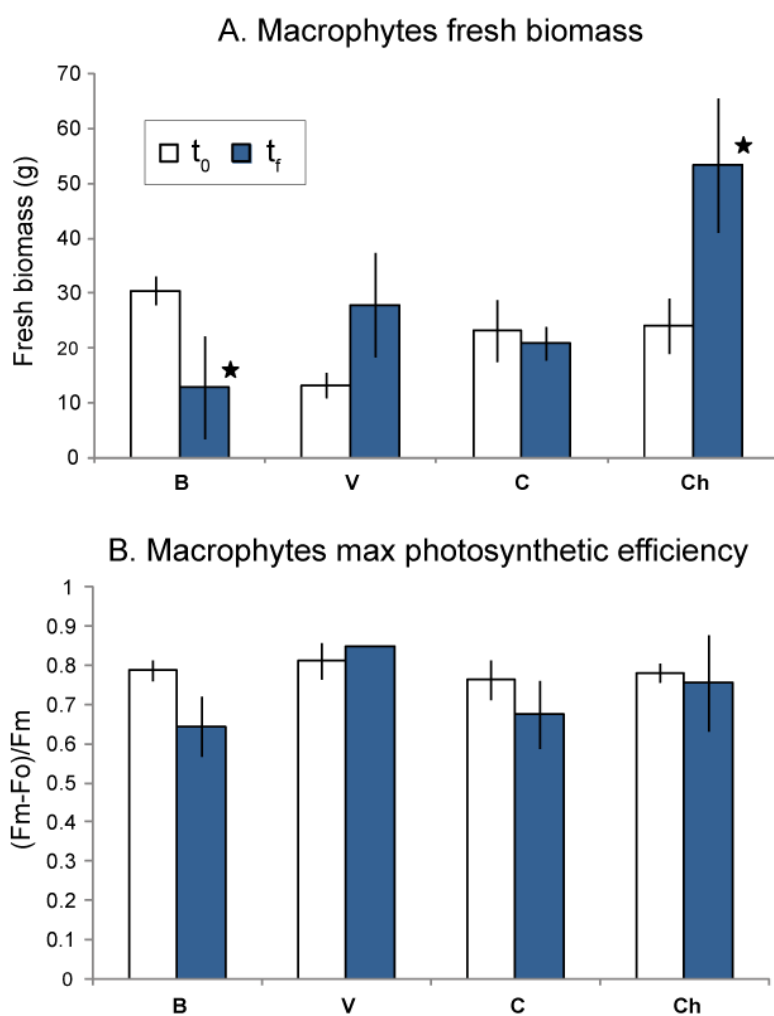


FIGURE 3: Biomass and maximal photosynthetic efficiency between t_0 and t_f for the 4 macrophytes: *Berula erecta* (B), *Vallisneria spiralis* (V) *Ceratophyllum demersum* (C) and *chara globularis* (Ch). Significant differences for a treatment between t_0 and t_f (Tukey's HSD tests) are indicated with a star on the bar charts.

3.3 State of sediment biofilm

Sediment biofilm was characterized before and after the 6-week experimental period with the exception of bacterial abundance which was assessed only at the end of the experiment. The initial characteristics of the biofilm were comparable in all the mesocosms (Figure 4, treatment effect at t_0 , $p > 0.05$).

After 6 weeks exposure to macrophytes, total organic carbon (TOC) decreased in all the sediment samples (Figure 4A, Table III). Tukey's HSD tests indicated significant decreases of TOC during the experiment for *V. spiralis* and *C. globularis* treatments ($p < 0.05$). In contrast, total organic carbon remained constant in the control mesocosms. Chlorophyll-*a* content (representing the phototrophic biomass) decreased in all the mesocosms during the experiment but this decrease was higher (73%) and significant for *V. spiralis* and *C. globularis* treatments (Figure 4B – Tukey's HSD tests; $p < 0.05$). At the end of the experiment, the total numbers of bacterial cells in *B. erecta*, *C. demersum* and the control mesocosms were comparable (Figure 4C, $4.5 \cdot 10^9$ cells per g of dry matter, Tukey's HSD tests $p > 0.05$). In contrast, the total number of bacterial cells tended to be lower in *V. spiralis* and *C. globularis* treatments than in the controls, although Tukey's HSD tests did not conclude in significant differences. Most bacteria (between 75 and 86% of the total bacterial cells) were intact (cells with membrane integrity) without significant differences in percentages of intact/damaged bacteria between treatments (ANOVA, $p > 0.05$). We detected no difference between treatments for microbial phosphatase and hydrolytic enzymatic activities (Figure 4D and 4E, Table III; $p > 0.05$). Hydrolytic activity remained constant over time while phosphatase decreased globally in all the treatments without significant differences in decrease between them (Table III, interaction "time" x "treatment", Tukey's HSD tests, $p > 0.05$). Chlorophyll fluorescence measurements showed that the maximum photosynthetic efficiency of the sediment biofilm (Figure 4F) decreased significantly between t_0 and t_f in the treatment with *V. spiralis*, while it remained comparable between t_0 and t_f in the other treatments (Table III, significant interaction "time" x "treatment"). At the end of the experiment, the maximum photosynthetic efficiency of the biofilm associated with *V. spiralis* was also significantly lower than in the other treatments with plants ($p < 0.05$) and tended to be significantly lower than in plant-free control ($p = 0.056$).

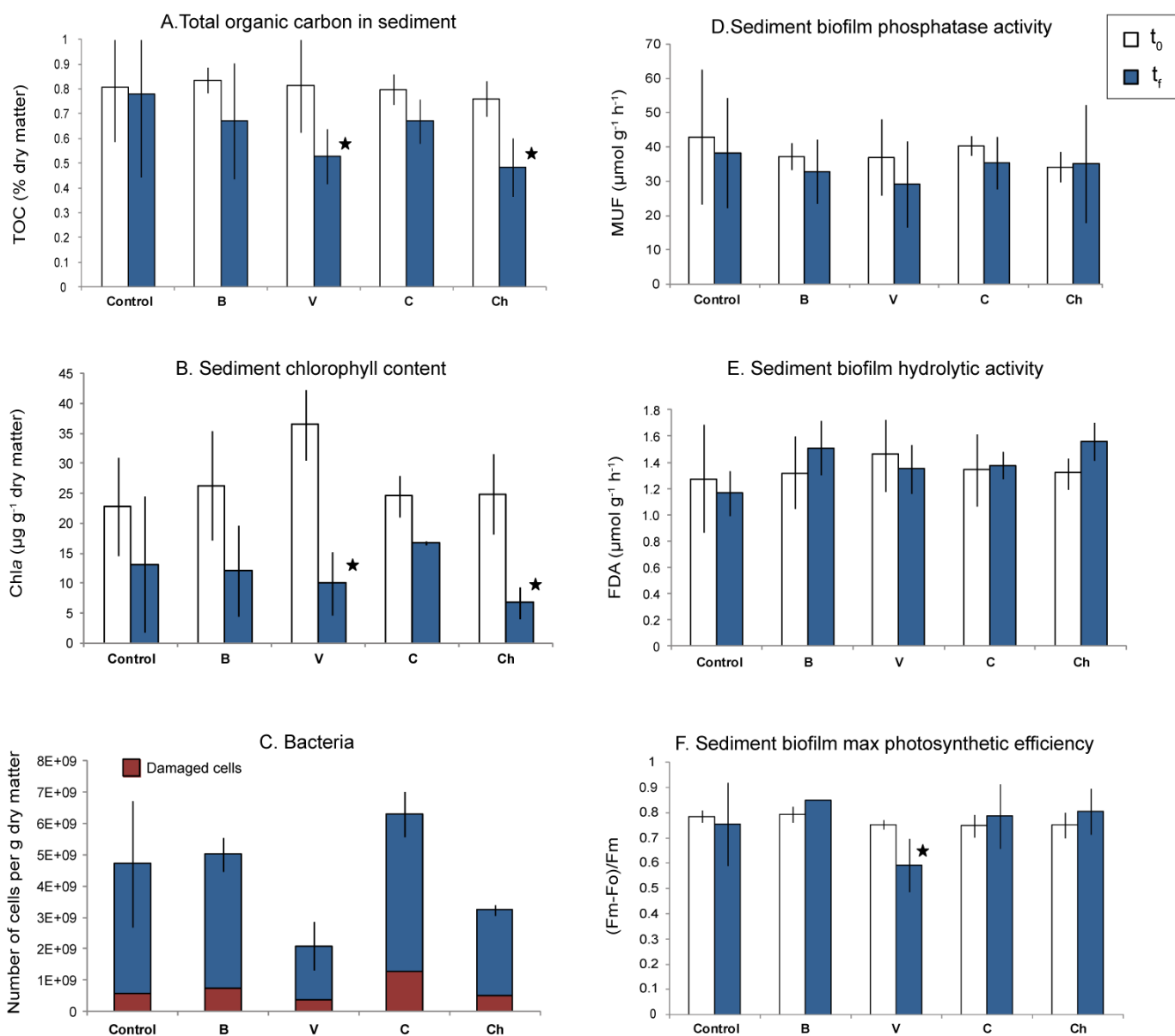


FIGURE 4: Biofilm structure and function between t_0 and t_f in mesocosms without plant (Control) or colonized by *Berula erecta* (B), *Vallisneria spiralis* (V) *Ceratophyllum demersum* (C) or *Chara globularis* (Ch). Figure C presents the total number of bacteria (including viable and damaged cells), related to measurements carried out only at t_f . For each treatment, significant differences between t_0 and t_f (Tukey's HSD tests) are indicated with a star on the bar charts.

4. Discussion

4.1 Ability of macrophytes to grow under our experimental conditions

The growths of the four species differed considerably under our experimental conditions: *V. spiralis* and *C. globularis* increased their mean fresh biomass by 100% during the course of the experiment while *C. demersum* did not grow significantly and *B. erecta* lost 70% of its biomass. In spite of a marked temporal evolution of physicochemical parameters, our results showed that the entire experiment was performed under comparable abiotic conditions for all the treatments. Thus all the plants benefited from the same environmental conditions for development. In addition, the nutrient concentrations (NO_3^- , PO_4^{3-} et NH_4^+) measured in the interstitial water were theoretically sufficient to maintain the growth of the selected species which are known to grow easily under oligotrophic conditions (Bornette *et al.*, 2001; Lemoine *et al.*, 2012). Despite this selection, we recorded a marked senescence of *B. erecta* during the experiment (reduction of biomass and chlorophyll fluorescence, which is an indicator of plant physiological state). This observation could be explained by the fact that *B. erecta* has a developed root network, intolerant to hypoxia. Indeed, this species can survive only in sediments sufficiently oxygenated through groundwater flows (Paal *et al.*, 2007). However, our mesocosm systems undergo little renewal and the relatively high NH_4^+ concentrations measured in the interstitial water during the experiment pointed towards hypoxic conditions in the sediment (Navel *et al.*, 2011) that *B. erecta* was unable to tolerate. It is noteworthy that *C. demersum* also presented a slight decrease in its photosynthetic efficiency and a lack of growth during the experiment (Figures 3A and 3B), indicating the relatively poor acclimation of this species to the experimental conditions in comparison with *C. globularis* and *V. spiralis*.

4.2 Effects of macrophytes on biofilm biomass

In relation to the capacity of plants to grow in our experimental systems, only species whose development was significant (i.e. *V. spiralis* and *C. globularis*) reduced significantly the biomass of the benthic biofilm during the experiment. Indeed, total organic carbon,

the indicator of the global biomass of the benthic biofilm, fell significantly during the experiment in the mesocosms associated with these two species, whereas it remained constant in the controls without plants. This result may be explained by the fact that macrophytes can promote the oxygenation of the substrate in which they live *via* root aeration (Lemoine et al., 2012), thereby favoring the decomposition of organic matter in sediments by microorganisms (Mermillod-Blondin et Lemoine, 2010). Nonetheless, this process of stimulating the organic matter decomposition by root re-oxygenation does not appear likely in our study because (1) *C. globularis* does not have any roots and (2) the loss of biomass observed for the *V. spiralis* and *C. globularis* treatments was mostly related to the reduction of the algal biomass of the biofilm. Indeed, the presence of these two species reduced sediment chlorophyll-*a* content between t_0 and t_f , by 73%, whereas this reduction was only 42% for the control treatments without plants (Figure 4B). Furthermore, the decreases recorded for *C. demersum* and *B. erecta* (32% and 52% respectively) were lower and comparable to those observed in the controls. The fact that these latter two plants did not grow, and even lost biomass during the experiment, appears to explain why they had no effect on the biofilm, in spite of effects being demonstrated for these two species on several microalgae included in biofilm composition (Hu et Hong, 2008).

In addition, the biomass loss of the benthic biofilm in the mesocosms associated with *V. spiralis* and *C. globularis* was also apparently linked with a loss in bacterial biomass, which for these treatments was on average half that of the others (Figure 4C). However, it would be premature to conclude on a direct effect of these two species on the bacterial component of biofilms as these differences could simply be due to a reduction of algal exudates. Indeed, it has been shown in the laboratory and in different natural environments (intertidal sediments, lakes, streams, etc.) that exudates originating from photosynthetically active algal cells were a major source of autochthonous organic carbon, easily assimilated by heterotrophic bacteria (Iturriaga et Hoppe, 1977; Cole, 1982; Haack et McFeters, 1982; Goto *et al.*, 2001). Therefore, a reduction in bacterial numbers may also be explained by the inhibition of heterotrophic bacterial growth in response to the reduction of primary production. Finally, our results permit concluding on the inhibitive effect of the *V. spiralis* and *C. globularis* treatments on the algal component of

benthic biofilm, to which is associated either directly or indirectly an effect on its bacterial component.

In addition to the effects measured on benthic biofilm, *C. globularis* was also capable to limit algal growth in the water column since the mesocosms associated with this treatment presented 5 to 10 times less algal development than that of the other treatments, with and without plants (Figure 2B). Regarding this point, our results concur with those of the study performed by Van Donk et Van de Bund (2002) which showed that *Characaea* can have an inhibitive effect on certain freshwater phytoplanktonic green algae. Moreover, a large number of studies have shown that the presence of *Characaea* is often linked to low phytoplanktonic biomass (Gopal et Goel, 1993; Barko et James, 1997; Van Donk et Van de Bund, 2002). Thus, in addition to an effect on the algal component of sediment biofilm, we can conclude on the effect of *C. globularis* on algae growing in the water column.

4.3 Mechanism by which plants inhibit biofilm development

The interactions between plants and microorganisms in aquatic environments are complex as they depend on numerous factors. In the literature (Sand-Jensen et Borum, 1991; Jasser, 1995; Scheffer, 1999; Rojo *et al.*, 2013), the authors explain that the influence of macrophytes on algal communities depends on several mechanisms including the competitions for light and/or for nutrients, and the excretion of allelopathic compounds. In addition, Scheffer (1999) and Rojo *et al.* (2013) mentioned the indirect effects of submersed macrophytes on algal biomass by enhancing grazing, since the presence of plants provides ecological niches for many grazers. Our experimental approach in mesocosms permitted controlling some of these factors, including indirect effects such as grazing. We took care not to introduce invertebrates into the mesocosms during the experiment, by rinsing the plants beforehand, and by installing mosquito nets to prevent natural inputs. We also ensured similar lighting conditions between systems in order to compare reductions of light (light penetration) in each mesocosm. Since the competition for light is certainly the most important factor for the distribution of phototrophic organisms (Sand-Jensen et Borum, 1991), shade could be expected as a main factor explaining the reduction of the algal biomass of the benthic biofilm for the *V. spiralis* and *C. globularis* treatments. However, the lowest reductions of light penetration between to

and t_f (10-20%) were measured on the treatments associated with the strongest effects on the benthic biofilm. On the contrary, the control treatment characterized by the largest biomass of benthic biofilm at the end of the experiment presented the highest reduction of light (42%) between t_0 and t_f (Figure 2B). This strong attenuation mainly appears to be linked to algal development in the water column. To sum up, the fact that the macrophytes that had the strongest effect on the benthic biofilm were associated with the lowest reduction of luminosity proves that the effect of shade was not the main mechanism by which *C. globularis* and *V. spiralis* acted on the algal component of the benthic biofilm. In conclusion, the inhibiting effect of these two species can certainly be explained by allelopathic effects.

4.4 Allelopathy of selected macrophytes

All the species selected could produce allelopathic effects, with differences in order of magnitude, depending on macrophyte species, target organisms and environmental conditions (Körner et Nicklisch, 2002; Gross *et al.*, 2007; Hu et Hong, 2008; Xiao *et al.*, 2009). The inhibition of planktonic and epiphytic algae by the release of allelopathic algicidal compounds by *C. globularis* has already been highlighted several times in the literature (Wium-Andersen *et al.*, 1982; Van Donk et Van de Bund, 2002; Mulderij *et al.*, 2003; Berger et Schagerl, 2004). For example, Wium-Andersen *et al.* (1982) showed that two compounds excreted by *C. globularis* (4-methylthio-1,2-dithiolane and 5-methylthio-1,2,3-trithiane) could reduce the growth of epiphyte diatoms and the phytoplanktonic fraction. *C. demersum* is also recognized as a very allelopathically active species (Körner et Nicklisch, 2002), although it did not appear to exert an effect in our experiment. However, *V. spiralis* has been given much less attention and, to our knowledge, only Xian *et al.* (2006) identified an inhibitive effect on planktonic cyanobacteria. This study also showed less marked inhibitive effects of extracts of *V. spiralis* compared to extracts of *C. demersum* on cyanobacteria. Our results differed somewhat since *V. spiralis* exerted a stronger effect than *C. demersum* on benthic biofilm in our mesocosms. In addition to the experimental conditions, the targeted inhibition of certain components of the biofilm by the presence of *C. demersum* may explain why there was no reduction of total algal biomass in the mesocosms associated with this species in our study. Indeed, Jasser (1995) showed that the presence of single individuals or extracts of *C. demersum* led to a

decrease of cyanobacteria biomass without however affecting the total algal biomass supported by green algae. Also, specific measures would certainly have detected a change in the composition of algal communities in the mesocosms associated with *C. demersum*. Lastly, regarding *B. erecta*, although the mesocosms associated with this species did not show any effect on the benthic biofilm, this species tended to reduce the algal development in the water column in comparison with the control, *C. demersum* and *V. spiralis* treatments. It is possible to associate this trend to an indirect effect due to the senescence of *B. erecta*, and the associated release of inhibiting compounds for algae in sediments and/or in the water column. This inhibitory effect has been already observed during the litter decomposition of certain terrestrial species (Jobidon *et al.*, 1989; Nothrup *et al.*, 1995).

4.5 State of photosystem II

From a functional viewpoint, our results indicated an effect of *V. spiralis* on the maximum photosynthetic efficiency of the sediment biofilm, since the fluorescence values recorded for the biofilm associated with this plant were significantly lower than those of the other treatments at t_f (Figure 4F). The inhibition of the photosystem II activity has been attributed to an allelopathic effect in many studies (Leu *et al.*, 2002; Gross, 2003; Zhu *et al.*, 2010). It is therefore possible to attribute the reduction of the photosynthetic efficiency of biofilm to an allelopathic effect of *V. spiralis* on the photosystem II activity of the algae composing the benthic biofilm. Moreover, an additional analysis in linear regression indicates that the quantum yield of biofilm was negatively and significantly correlated to the quantum yield of the associated macrophyte ($R = -0.48$; $p < 0.05$). This correlation suggests that the better the physiological condition of the macrophyte, the stronger its inhibitive effect on the sediment biofilm. This interpretation concurs well with our plant growth results which indicate a close link between the capacity of plants to acclimatize in mesocosms and their action on benthic biofilm.

4.6 Enzymatic activities

In spite of the reduction of the biomass of the benthic biofilm for two of the four species studied, no effect was observed for hydrolytic enzymatic and alkaline phosphatase

activities between t_0 and t_f , whatever the treatment considered (Figures 4D and 4E). However, the inhibition of enzymatic activities, especially that of alkaline phosphatase, is a mode of action of a large number of allelopathic compounds (Nakai *et al.*, 2000; Gross, 2003). The absence of link between the loss of biofilm biomass during the experiment and its activity appears to stem from a physiological modification of the biofilm, as the cells composing the biofilm were on average more active at the end of the experiment. It is possible that the benthic biofilm benefited from the degeneration of a part of its algal component and the release of macromolecules during the lysis of algal cells to increase its hydrolytic enzymatic potential per cell / biomass (Middelboe *et al.*, 1995). Furthermore, alkaline phosphatase activity is not only dependent on allelopathic effects since it is largely regulated by the availability of phosphorous in ionic form, PO_4^{3-} (Chróst, 1991). Indeed, Chróst et Overbeck (1987) showed that alkaline phosphatase activity (APA) was highest for P- PO_4^{3-} concentrations lower than $10 \mu\text{g L}^{-1}$. Moreover, under phosphorous limiting conditions the proportion of bacteria presenting phosphatase activity tended to increase as much as photosynthesis decreased, as explained by Espeland et Wetzel (2001). Under our experimental conditions, the low concentrations of P- PO_4^{3-} (average of $8.2 \mu\text{g L}^{-1}$) probably stimulated APA, masking a potential allelopathic effect of plants on this activity. The last explanation that can be proposed for the stability of enzymatic activities during the course of the experiment is the conservation of enzymes in the biofilm matrix and the maintenance of enzymatic activities despite the degradation of the cells (Thompson et Sinsabaugh, 2000). For example, the enzymes ensuring extracellular phosphatase activity can be released into the medium during the degradation of the cell to which they were bound, and maintain a high level of activity for several days (Jansson *et al.*, 1988). Thus enzymatic activities depend on many factors with positive or negative effects that can counteract, explaining the maintenance of activities during the experiment despite a significant reduction of algal biomass.

5. Conclusion

The objective of this study was to evaluate whether the presence of macrophytes could inhibit the growth of benthic biofilms developing in infiltration systems, through

allelopathic and shade effects. Our results permitted to confirm literature data showing an effect of *Chara globularis* (L.) on planktonic algae (Van Donk et Van de Bund, 2002), with in addition significant effects of this species on the structure of the benthic biofilm. We also highlighted the effects of *Vallisneria spiralis* (L.), a species hitherto little studied. Our measures clearly revealed that this species had an inhibitive effect on the global structure of sediment biofilm, especially on its algal biomass, undoubtedly linked to effects on photosystem II. To our knowledge, these results are the first to reveal the allelopathic effects of macrophytes on the algal component of benthic biofilms. Regarding the bacterial component, our measures did not allow dissociating direct effects from indirect ones, thereby pointing towards the need to better understand algal-bacterial relations in future experiments.

Furthermore, during our experiment, only two of the four plants were able to develop and affect the development of benthic biofilm, but this does not mean that *Berula erecta* (Huds) Coville and *Ceratophyllum demersum* (L.) have no effect on biofilm under other environmental conditions. *Ceratophyllum demersum* (L.) is recognized as being an active allelopathic species in the literature (Gross *et al.*, 2003; Hilt et Gross, 2008), with in particular inhibitive effects on cyanobacteria (Jasser, 1995; Xian *et al.*, 2005). Our measures, performed on global variables, did not lead to such observations but, to better target the effects, it would be interesting to complete our results with specific measures on the composition of algal communities.

Finally, our results confirm the existence of ecological relationships between allelopathic macrophytes and benthic biofilm in a partially controlled environment at intermediate experimental scale. This work shows the potential influence of aquatic plants on benthic microbial communities in photic aquatic ecosystems (alluvial plains, shallow lakes, wetlands, etc.). These results must nonetheless be validated at a more realistic scale by carrying out *in situ* tests to verify these allelopathic potentialities structuring benthic communities, with the objective to develop simple techniques for improving the management of artificial structures such as infiltration systems and artificial wetlands. Indeed, on the one hand macrophytes appear capable of limiting the growth of certain algal species and especially cyanobacteria. Such effect could be of great interest in infiltration systems intended to recharge aquifers and for water treatment since the

production of toxins by some species represents a risk for health. On the other hand it will be possible to use macrophytes to limit clogging in structures, as they can reduce biofilm density at the water-sediment interface, while maintaining enzymatic activities capable of degrading organic loads. The latter point is of great interest regarding the quality of infiltrated water. Thus, the new step will be to test, under operational conditions (in infiltration basins), the influence of plants on the hydraulic conductivity in sediments and also on the quality of the infiltrated water.

6. Acknowledgements

The authors would like to thank Lydie Bayle, Felix Vallier and Laurent Simon for their very efficient technical assistance during the experiments. This research received financial and technical support from the Greater-Lyon Urban Community and Veolia Water.

7. References

- Barko, J. W. and James, W. F., 1997. Effect of submersed aquatic macrophytes on nutrients dynamics, sedimentation and resuspension. IN The structuring role of submerged macrophytes in lakes. E. Jeppensen, M. Sondergaard, M. Sondergaard and K. Christoffersen, Ecological studies vol. 131. New York : Springer pp. 197-214.
- Battin, T. J., 1997. "Assessment of fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total esterase activity in natural stream sediment biofilms." *Science of the Total Environment* 198(1): 51-60.
- Baveye, P., Vandevivere, P., Hoyle, B. L., DeLeo, P. C. and de Lozada, D. S., 1998. "Environmental impact and mechanisms of the biological clogging of saturated soils and aquifer materials." *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 28(2): 123-191. 10.1080/10643389891254197.
- Berger, J. and Schagerl, M., 2004. "Allelopathic activity of Characeae." *Biologia - Section Botany* 59(1): 9-15.
- Bornette, G., Piegay, H., Citterio, A., Amoros, C. and Godreau, V., 2001. "Aquatic plant diversity in four river floodplains: A comparison at two hierarchical levels." *Biodiversity and Conservation* 10(10): 1683-1701.
- Bouwer, H., 2002. "Artificial recharge of groundwater: Hydrogeology and engineering." *Hydrogeology Journal* 10(1): 121-142.
- Caquet, T., Lagadic, L., Jonot, O., Baturo, W., Kilanda, M., Simon, P., Le Bras, S., Echaubard, M. and Ramade, F., 1996. "Outdoor experimental ponds (mesocosms) designed for long-term ecotoxicological studies in aquatic environment." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 34(2): 125-133.

- Chróst, R. J., 1991. Environmental Control of the Synthesis and Activity of Aquatic Microbial Ectoenzymes. IN *Microbial Enzymes in Aquatic Environments*. R. Chróst, Springer New York pp. 29-59. 10.1007/978-1-4612-3090-8_3.
- Chróst, R. J. and Overbeck, J., 1987. "Kinetics of Alkaline Phosphatase Activity and Phosphorus Availability for Phytoplankton and Bacterioplankton in Lake Plüßsee (North German Eutrophic Lake)." *Microbial Ecology* 13: 229-248.
- Cole, J. J., 1982. "Interactions between bacteria and algae in aquatic ecosystems." *Annual review of ecology and systematics*. Volume 13: 291-314.
- Dodds, W. K., Randel, C. A. and Edler, C. C., 1996. "Microcosms for aquifer research: application to colonization of various sized particles by ground-water microorganisms." *Ground Water* 34(4): 756-759.
- Erhard, D. and Gross, E. M., 2006. "Allelopathic activity of *Elodea canadensis* and *Elodea nuttallii* against epiphytes and phytoplankton." *Aquatic Botany* 85(3): 203-211. 10.1016/j.aquabot.2006.04.002.
- Espeland, E. M. and Wetzel, R. G., 2001. "Effects of photosynthesis on bacterial phosphatase production in biofilms." *Microbial Ecology* 42(3): 328-337.
- Gette-Bouvarot, M., Mermillod-Blondin, F., Angulo-Jaramillo, R., Delolme, C., Lemoine, D., Lassabatere, L., Loizeau, S. and Volatier, L., 2013. "Coupling hydraulic and biological measurements highlights the key influence of algal biofilm on infiltration basin performance." *Ecohydrology*.
- Gopal, B. and Goel, U., 1993. "Competition and allelopathy in aquatic plant communities." *The Botanical Review* 59(3): 155-210. 10.1007/bf02856599.
- Goto, N., Mitamura, O. and Terai, H., 2001. "Biodegradation of photosynthetically produced extracellular organic carbon from intertidal benthic algae." *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 257(1): 73-86.
- Gross, E. M., 2003. "Allelopathy of aquatic autotrophs." *Critical Reviews in Plant Sciences* 22(3-4): 313-339.
- Gross, E. M., Erhard, D. and Iványi, E., 2003. "Allelopathic activity of *Ceratophyllum demersum* L. and *Najas marina* ssp. *intermedia* (Wolfgang) Casper." *Hydrobiologia* 506-509: 583-589.
- Gross, E. M., Hilt, S., Lombardo, P. and Mulderij, G., 2007. "Searching for allelopathic effects of submerged macrophytes on phytoplankton - State of the art and open questions." *Hydrobiologia* 584(1): 77-88. 10.1007/s10750-007-0591-z.
- Gross, E. M., Meyer, H. and Schilling, G., 1996. "Release and ecological impact of algicidal hydrolysable polyphenols in *Myriophyllum spicatum*." *Phytochemistry* 41(1): 133-138.
- Haack, T. and McFeters, G., 1982. "Nutritional relationships among microorganisms in an epilithic biofilm community." *Microbial Ecology* 8(2): 115-126. 10.1007/bf02010445.
- Hilt, S., 2006. "Allelopathic inhibition of epiphytes by submerged macrophytes." *Aquatic Botany* 85(3): 252-256.
- Hilt, S. and Gross, E. M., 2008. "Can allelopathically active submerged macrophytes stabilise clear-water states in shallow lakes?" *Basic and Applied Ecology* 9(4): 422-432.

- Hu, H. and Hong, Y., 2008. "Algal-bloom control by allelopathy of aquatic macrophytes - A review." *Frontiers of Environmental Science and Engineering in China* 2(4): 421-438.
- Ibaraki, Y. and Murakami, J., 2007. "Distributon of chlorophyll fluorescence parameter Fv/Fm within individual plants under various stress conditions." *Acta Hort. (ISHS)* 761: 255-260.
- Iturriaga, R. and Hoppe, H. G., 1977. "Observations of Heterotrophic Activity on Photoassimilated Organic Matter." *Marine Biology* 40: 101-108.
- Jansson, M., Olsson, H. and Pettersson, K., 1988. Phosphatases; Origin, Characteristics and Function in Lakes. IN *Phosphorus in Freshwater Ecosystems*. G. Persson and M. Jansson, Springer Netherlands. 48 pp. 157-175. 10.1007/978-94-009-3109-1_10.
- Jasser, I., 1995. "The influence of macrophytes on a phytoplankton community in experimental conditions." *Hydrobiologia* 306(1): 21-32.
- Jobidon, R., Thibault, J. R. and Fortin, J. A., 1989. "Phytotoxic effect of barley, oat and wheat mulches in eastern Québec forest plantations. 1. Effects on red raspberry (*Rubus idaeus* L.)." *Forest Ecology and Management*, 29: 277-294.
- Jorgensen, P. E., Eriksen, T. and Jensen, B. K., 1992. "Estimation of viable biomass in wastewater and activated sludge by determination of ATP, oxygen utilization rate and FDA hydrolysis." *Water Research* 26(11): 1495-1501.
- Knowles, P., Dotro, G., Nivala, J. and García, J., 2011. "Clogging in subsurface-flow treatment wetlands: Occurrence and contributing factors." *Ecological Engineering* 37(2): 99-112.
- Körner, S. and Nicklisch, A., 2002. "Allelopathic growth inhibition of selected phytoplankton species by submerged macrophytes." *Journal of Phycology* 38(5): 862-871.
- Langergraber, G., Haberl, R., Laber, J. and Pressl, A., 2003. "Evaluation of substrate clogging processes in vertical flow constructed wetlands." *Water Science and Technology* 48(5): 25-34.
- Lemoine, D. G., Mermillod-Blondin, F., Barrat-Segretain, M. H., Massé, C. and Malet, E., 2012. "The ability of aquatic macrophytes to increase root porosity and radial oxygen loss determines their resistance to sediment anoxia." *Aquatic Ecology* 46(2): 191-200.
- Leu, E., Krieger-Liszkay, A., Goussias, C. and Gross, E. M., 2002. "Polyphenolic allelochemicals from the aquatic angiosperm *Myriophyllum spicatum* inhibit photosystem II." *Plant Physiology* 130(4): 2011-2018.
- Maxwell, K. and Johnson, G. N., 2000. "Chlorophyll fluorescence - a practical guide." *Journal of Experimental Botany* 51(345): 659-668.
- Mermillod-Blondin, F. and Lemoine, D. G., 2010. "Ecosystem engineering by tubificid worms stimulates macrophyte growth in poorly oxygenated wetland sediments." *Functional Ecology* 24(2): 444-453.
- Middelboe, M., Sondergaard, M., Letarte, Y. and Borch, N. H., 1995. "Attached and free-living bacteria: Production and polymer hydrolysis during a diatom bloom." *Microbial Ecology* 29(3): 231-248.
- Molisch, H., 1937. *Der Einfluss einer Pflanze auf die andere - Allelopathie*. Fischer, Jena, Germany.

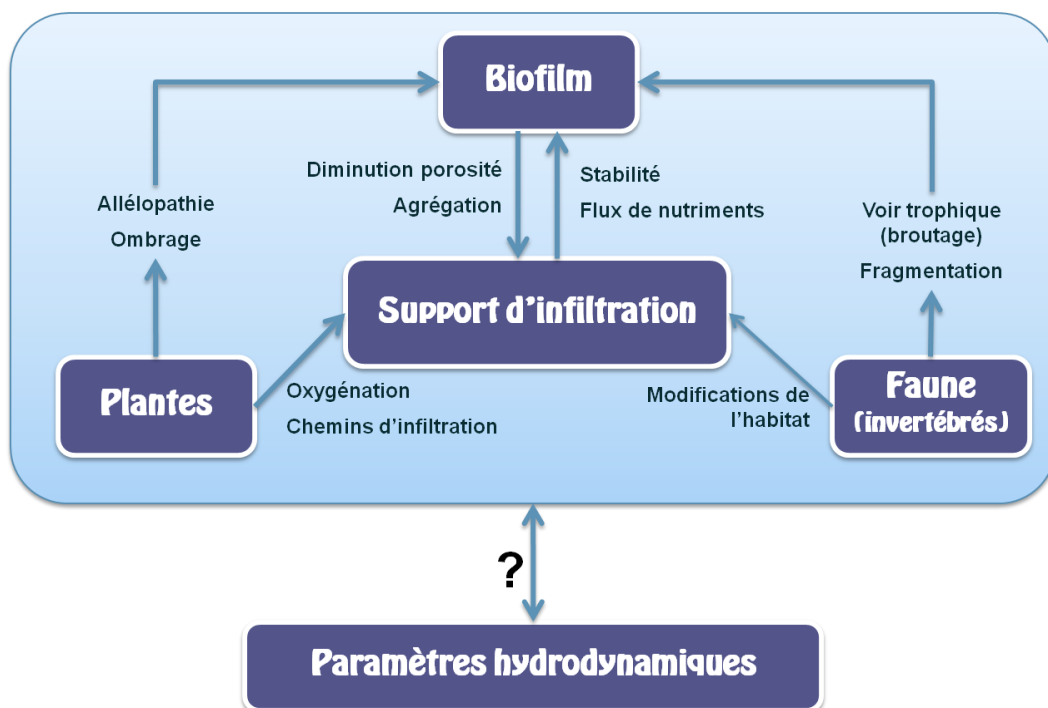
- Mulderij, G., Smolders, A. J. P. and Van Donk, E., 2006. "Allelopathic effect of the aquatic macrophyte, *Stratiotes aloides*, on natural phytoplankton." *Freshwater Biology* 51(3): 554-561.
- Mulderij, G., Van Donk, E. and Roelofs, J. G. M., 2003. "Differential sensitivity of green algae to allelopathic substances from *Chara*." *Hydrobiologia* 491: 261–271.
- Nakai, S., Inoue, Y., Hosomi, M. and Murakami, A., 1999. Growth inhibition of blue-green algae by allelopathic effects of macrophytes. 39: 47-53.
- Nakai, S., Inoue, Y., Hosomi, M. and Murakami, A., 2000. "Myriophyllum spicatum-released allelopathic polyphenols inhibiting growth of blue-green algae *Microcystis aeruginosa*." *Water Research* 34(11): 3026-3032.
- Navel, S., Mermillod-Blondin, F., Montuelle, B., Chauvet, E., Simon, L. and Marmonier, P., 2011. "Water-sediment exchanges control microbial processes associated with leaf litter degradation in the hyporheic zone: a microcosm study." *Microbial Ecology* 61(4): 968-979.
- Nothrup, R. R., Yu, Z., R.A., D. and Vogt, K. A., 1995. "Polyphenol control of nitrogen release from pine litter." *Nature* 377: 227-229.
- Paal, J., Trei, T. and Viik, M., 2007. "Vegetation of Estonian watercourse, III. Drainage basins of the Moonsund sea, the Gulf of Riga and Saaremaa island." *Ann. Bot. Fennici* 44: 321-344.
- Platzer, C. and Mauch, K., 1997. "Soil clogging in vertical flow reed beds - mechanisms, parameters, consequences and.....solutions?" *Water Science and Technology* 35(5): 175-181. 10.1016/s0273-1223(97)00066-8.
- Pusey, B. J., Arthington, A. H. and Flanders, T. J., 1994. "An outdoor replicated artificial stream system: Design, operating conditions, and initial invertebrate colonization." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 27(2): 177-191.
- Rojo, C., Segura, M. and Rodrigo, M. A., 2013. "The allelopathic capacity of submerged macrophytes shapes the microalgal assemblages from a recently restored coastal wetland." *Ecological Engineering* 58(0): 149-155.
- Romaní, A. M. and Sabater, S., 1999. "Effect of primary producers on the heterotrophic metabolism of a stream biofilm." *Freshwater Biology* 41(4): 729-736.
- Sand-Jensen, K., 1990. "Epiphyte shading: Its role in resulting depth distribution of submerged aquatic macrophytes." *Folia Geobotanica et Phytotaxonomica* 25(3): 315-320.
- Sand-Jensen, K. and Borum, J., 1991. "Interactions among phytoplankton, periphyton, and macrophytes in temperate freshwaters and estuaries." *Aquatic Botany* 41(1-3): 137-175.
- Scheffer, M., 1999. "The effect of aquatic vegetation on turbidity; how important are the filter feeders?" *Hydrobiologia* 408-409: 307-316.
- Schnurer, J. and Rosswall, T., 1982. "Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter." *Applied and Environmental Microbiology* 43(6): 1256-1261.
- Sculthorpe, C. D., 1967. The Biology of Aquatic Vascular Plants. London, Edward Arnold (reprinted 1985 - Koeltz Scientific Books): 610 pages.

- Thompson, A. J. and Sinsabaugh, R. L., 2000. "Matric and particulate phosphatase and aminopeptidase activity in limnetic biofilms." *Aquatic Microbial Ecology* 21: 151-159.
- Thullner, M., 2010. "Comparison of bioclogging effects in saturated porous media within one- and two-dimensional flow systems." *Ecological Engineering* 36(2): 176-196.
- Unesco, 1966. Determination of photosynthetic pigments in seawater. Report Scor-Unesco. Working paper 17, Monographs on oceanographic methodology.
- Van Donk, E. and Van de Bund, W. J., 2002. "Impact of submerged macrophytes including charophytes on phyto- and zooplankton communities: Allelopathy versus other mechanisms." *Aquatic Botany* 72(3-4): 261-274. 10.1016/s0304-3770(01)00205-4.
- Wium-Andersen, S., Anthoni, U., Christophersen, C. and Houen, G., 1982. "Allelopathic effects on phytoplankton by substances isolated from aquatic macrophytes (Charales)." *Oikos* 39(2): 187-190.
- Xian, Q., Chen, H., Liu, H., Zou, H. and Yin, D., 2006. "Isolation and identification of antialgal compounds from the leaves of *Vallisneria spiralis* L. by activity-guided fractionation." *Environmental Science and Pollution Research* 13(4): 233-237.
- Xian, Q., Chen, H., Qu, L., Zou, H. and Yin, D., 2005. "Allelopathic potential of aqueous extracts of submerged macrophytes against algal growth." *Allelopathy Journal* 15(1): 95-104.
- Xiao, X., Lou, L. P., Li, H. and Chen, Y. X., 2009. "Algal control ability of allelopathically active submerged macrophytes: A review." *Chinese Journal of Applied Ecology* 20(3): 705-712.
- Zhao, L., Zhu, W. and Tong, W., 2009. "Clogging processes caused by biofilm growth and organic particle accumulation in lab-scale vertical flow constructed wetlands." *Journal of Environmental Sciences* 21(6): 750-757.
- Zhu, J., Liu, B., Wang, J., Gao, Y. and Wu, Z., 2010. "Study on the mechanism of allelopathic influence on cyanobacteria and chlorophytes by submerged macrophyte (*Myriophyllum spicatum*) and its secretion." *Aquatic Toxicology* 98(2): 196-203.

III. Interactions biofilms – macro-organismes et conséquences sur l'infiltration (article 3)

Cet article présente les protocoles et résultats de la première expérience et vise à répondre aux questions suivantes :

- (i) Quels effets des traitements biotiques (introduction de macro-organismes) et abiotique (ombrage) ont-ils sur le développement des biofilms benthiques phototrophes en conditions naturelles ?
- (ii) Quelles conséquences sur les paramètres hydrodynamiques du milieu support d'infiltration ?



L'ingénierie écologique comme solution au colmatage biologique des ouvrages d'infiltration ? Une étude expérimentale de terrain couplant mesures biologiques et mesures d'infiltration.

Morgane GETTE-BOUVAROT, Florian MERMILLOD-BLONDIN, Laurent LASSABATERE, Damien LEMOINE, Cécile DELOLME, Laurent SIMON, Laurence VOLATIER

UMR5023 LEHNA, Université de Lyon, CNRS, INRA, Université Claude Bernard Lyon 1, ENTPE, rue Maurice Audin, F-69518, Vaulx-en-Velin, France.

Les systèmes d'infiltration sont de plus en plus utilisés dans les zones urbaines, à plusieurs fins telles que la prévention des inondations ou la recharge des nappes souterraines. Cependant, leur fonctionnement est souvent affecté par le colmatage qui conduit à une diminution des capacités d'infiltration et à une altération potentielle de la qualité des eaux infiltrées. Dans une précédente étude, nous avons montré que la biomasse phototrophe de biofilms développés au niveau de la couche superficielle des systèmes d'infiltration peut considérablement réduire sa perméabilité. Par conséquent, il apparaît crucial de contrôler la croissance et la densité du biofilm pour maintenir les performances des supports d'infiltration. La présente étude vise à tester les effets de différents facteurs biotiques (broutage, bioturbation, allélopathie) et abiotique (ombrage) sur le développement du biofilm et sur les propriétés hydrauliques associées, ceci dans un bassin d'infiltration dédié à la recharge de l'aquifère.

Trente encagements benthiques ont été mis en place *in situ* pour tester les effets des 4 traitements et d'un contrôle sur le biofilm développé à l'interface eau/sédiment du bassin. Un échantillonnage de la couche superficielle (0-1 cm) a été réalisé dans chaque encagement au début et la fin de l'expérience, d'une durée de 38 jours. Nous avons couplé une caractérisation biologique des sédiments (matière organique, biomasse algale, abondances bactériennes, activités enzymatiques microbiennes, efficacité photosynthétique) avec des mesures de conductivité hydraulique *in situ* via la « falling head method ». Nos résultats ont montré que certains traitements pourraient réguler la croissance du biofilm benthique et améliorer le taux d'infiltration. Ainsi, les encagements contenant des gastéropodes *V. viviparus* d'une part et le macrophyte *V. spiralis* d'autre part ont montré un maintien, voire une augmentation de perméabilité, alors que cette dernière a fortement diminué dans les encagements témoin au cours de l'expérience. Ces résultats sont très prometteurs pour le développement futur de procédés écologiques pour prévenir le colmatage dans les systèmes dédiés à l'infiltration. À notre connaissance, cette étude est la première à mettre en évidence un tel potentiel dans des conditions de terrain.

Mots clés : Bassins d'infiltration, Colmatage, Ingénierie écologique, Biofilm phototrophe, Broutage, Macrophytes, Bioturbation.

I. Introduction

Les bassins d'infiltration sont des ouvrages artificiels conçus pour infiltrer d'importants volumes d'eaux de surface dans des sols ou des dépôts sédimentaires tout en permettant la rétention de potentiels polluants et la biodégradation de leur charge organique. D'un point de vue économique et environnemental, ils représentent une alternative intéressante au système classique du tout réseau. De fait, ils sont de plus en plus utilisés en milieux urbains où la réduction des eaux de ruissellement d'une part, et la recharge des nappes phréatiques d'autre part, sont clairement devenues des priorités pour promouvoir une gestion intégrée de l'eau. Toutefois, le fonctionnement des bassins d'infiltration est régulièrement affecté par des problèmes de colmatage qui conduisent à une diminution des capacités d'infiltration et à une altération potentielle de la qualité des eaux infiltrées (Langergraber *et al.*, 2003; Dechesne *et al.*, 2004). Aussi, la prévention de ce risque devient-elle un enjeu majeur pour garantir la viabilité et la pérennité de ces ouvrages.

Le colmatage des bassins d'infiltration peut-être lié au développement biologique sous forme de biofilm, qui entraîne une diminution de la perméabilité du support d'infiltration suite à une réduction de la porosité et/ou à la formation d'un tapis colmatant à l'interface eau/sédiment. (Baveye *et al.*, 1998; Thullner *et al.*, 2002b; Mauclair *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2009; Knowles *et al.*, 2011). Les biofilms qui se développent dans les bassins d'infiltration sont des assemblages microbiens composés d'organismes unicellulaires et/ou pluricellulaires, qui appartiennent à différents niveaux trophiques : des producteurs primaires (algues, cyanobactéries) et des organismes hétérotrophes (bactéries) (Wood et Bassett, 1975; Katznelson, 1989; Goldsborough et Robinson, 1996; Kostel *et al.*, 1999). La présence du biofilm est nécessaire dans les bassins car il joue un rôle primordial dans les processus épuratoires des eaux infiltrées (Stevik *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2009) ; en revanche, sa biomasse ne doit pas devenir trop abondante pour garantir les performances hydrauliques des ouvrages. Dans une précédente étude, nous avons mis en évidence l'importance des biofilms phototrophes, développés au niveau de la couche superficielle des systèmes d'infiltration ; dans les processus de colmatage ; avec un effet seuil de la biomasse algale sur les propriétés hydrodynamiques des sédiments

(Gette-Bouvarot *et al.*, 2014a) Au vu de ces observations, il apparaît nécessaire de proposer des solutions permettant de limiter la croissance et la densité des biofilms phototrophes développés à l'interface eau/sédiment.

La biomasse des biofilms est contrôlée par des facteurs biotiques et abiotiques conduisant à des processus d'accrétion et/ou de perte. La croissance, donc l'épaississement, des biofilms est ainsi favorisée par l'accessibilité à la lumière et aux nutriments alors qu'elle est peut être limitée par des interactions biotiques telles que le broutage, la bioturbation, la compétition ou l'allélopathie. L'effet du broutage est clairement déterminant sur les caractéristiques des biofilms benthiques et de nombreuses études mettent en avant une réduction significative de la composante algale en présence d'invertébrés herbivores (Feminella et Hawkins, 1995; Steinman, 1996). Selon la synthèse bibliographique de Hillebrand (2009), cette réduction est en moyenne de 59% et peut atteindre jusqu'à 99%. Quant à l'activité de la faune bioturbatrice, celle-ci tend à remanier les sédiments par la création de sillons et de galeries, ce qui entraîne non seulement une destruction du biofilm, donc des pertes par détachement, mais également une augmentation de la porosité des sédiments donc de leur perméabilité (Nogaro *et al.*, 2006; Nogaro *et al.*, 2009), ainsi que des modifications des flux de nutriments et des processus microbiens (Wallace et Webster, 1996; Nogaro *et al.*, 2008). Les relations de compétition pour l'accès à la lumière, aux nutriments et à l'espace concernent les interactions entre les micro-organismes au sein du biofilm (Cole, 1982; Romaní et Sabater, 1999) de même que les interactions avec les organisme extérieurs au biofilm, notamment le phytoplancton et les macrophytes (Sand-Jensen et Borum, 1991). Les interactions entre les phototrophes comprennent également les processus allélopathiques, c'est-à-dire la libération de composés par un organisme « source », pouvant inhiber la structure ou l'activité d'un organisme « cible » (Van Donk et Van de Bund, 2002; Gross, 2003). Nous avons ainsi montré dans une précédente étude que certaines macrophytes pouvaient diminuer significativement la biomasse de la composante phototrophe de biofilms benthiques *via* des effets allélopathiques (Gette-Bouvarot *et al.*, 2014b).

L'objectif de ce travail est de tester les effets de facteurs biotiques (broutage, bioturbation, allélopathie) et abiotique (ombrage) sur la croissance et le fonctionnement

de biofilms, d'une part, et sur la conductivité hydraulique du support d'infiltration d'autre part. Ces différentes conditions expérimentales ont été mises en œuvre *via* des encagements implantés in situ. Cinq traitements ont été testés : (i) un invertébré agissant comme brouteur : le gastéropode *Viviparus viviparus* (Hockelmann et Pusch, 2000; Liess et Kahlert, 2007; Jakubik, 2009) ; (ii) un invertébré bioturbateur, susceptible de modifier les flux de nutriments ainsi que la structure du sédiment : le ver tubificidé *Limnodrilus hoffmeisteri* (Mermillod-Blondin *et al.*, 2001; Mermillod-Blondin *et al.*, 2003) ; (iii) un macrophyte susceptible d'inhiber la croissance du biofilm *via* une activité allélopathique : *Vallisneria spiralis* L. (Gette-Bouvarot *et al.*, 2014b) ; (iv) un ombrage pour limiter le développement de la composante phototrophe du biofilm (Stevenson, 1997), et (v) un traitement « contrôle » permettant de suivre l'évolution du système au cours de l'expérience d'une durée de 38 jours. En début et en fin d'essai, les sédiments ont été caractérisés (matière organique, sucres, protéines, biomasse algale, abondances bactériennes, activités enzymatiques microbiennes et efficacité de la photosynthèse) et le niveau de colmatage évalué par une estimation de la conductivité hydraulique à saturation *via* des tests d'infiltration. Concrètement, nous supposons qu'un ou plusieurs des traitements réalisés pourraient réguler la croissance du biofilm, et ainsi améliorer l'infiltration. Cette étude permet ainsi d'une part de mieux appréhender les interactions existant entre les différentes composantes du compartiment biologique des sédiments et, d'autre part, d'ouvrir des perspectives en termes de gestion des ouvrages d'infiltration.

II. Matériels & Méthodes

II.1 Design expérimental

Site d'étude : le site retenu est le champ captant de Crépieux-Charmy situé au Nord-Est de l'agglomération lyonnaise et destiné à la production d'eau potable : c'est le plus grand champ de captage en Europe (375 hectares, 1 280 000 habitants alimentés). La nappe alluviale y est réalimentée à partir d'eau pompée dans un ancien bras du Rhône et infiltrée au niveau de plusieurs bassins d'infiltration. Nous avons sélectionné l'un des bassins du site qui présentait un niveau de colmatage biologique intermédiaire pour tester les effets des traitements présentés, la conductivité hydraulique à saturation moyenne mesurée dans le bassin lors de nos essais étant de $4.5 \cdot 10^{-6} \text{ m s}^{-1}$ contre $3.5 \cdot 10^{-5} \text{ m s}^{-1}$ lors de la mise en place du support en 2009, donc sans biofilm.

Prélèvements et préparation des organismes : Des individus de *Viviparus viviparus* (taille $> 1 \text{ cm}$) et de *Vallisneria spiralis* ont été prélevés dans une lône du Rhône en amont du site d'étude. Les vers tubificidés provenaient d'un élevage (Grebil Père & Fils, Arry, France) et ont été déterminés par Michel Creuzé des Châtelliers (UMR CNRS 5023, LEHNA). L'ensemble des organismes a été acclimaté aux conditions expérimentales pendant les 15 jours précédents le début de l'expérience dans des bacs (250L) remplis de sédiments (10 cm) et d'eau provenant des bassins. Pour chacune des espèces, 6 lots de biomasses équivalentes ont ensuite été réalisés pour être introduits dans les encagements, correspondant à une densité d'environ $100 \text{ individus m}^{-2}$ pour *Viviparus viviparus* et *Vallisneria spiralis* et de $12\,000 \text{ individus m}^{-2}$ pour *Limnodrilus hoffmeisteri*, ceci pour simuler des densités réalistes de terrain (Martinet *et al.*, 1993; Liess et Kahlert, 2007).

Description des encagements : les encagements consistaient en des cylindres en acier inoxydable (316L) d'un diamètre de 30 cm et d'une hauteur de 14 cm, enfoncés d'environ 11 cm dans le sédiment du bassin d'étude [Figure 1a et 1b]. Ces systèmes ont été disposés au centre du bassin, afin d'éviter les apports dus à la végétation et les effets de bord liés aux conditions limites pour les mesures d'infiltration. Pour éviter la fuite des gastéropodes, des filets blancs d'une maille de 0.5 cm ont été fixés à la surface des cylindres en inox, ainsi que sur 3 des 6 encagements correspondant aux traitement

contrôles pour vérifier l'absence d'effet lié à ce dispositif. Des disques en inox perforé de maille 0.05 mm permettant le passage de l'eau mais réduisant la lumière à 10% de sa valeur initiale ont été installés sur les encagements correspondants au traitement « ombrage » [Figure 1c].

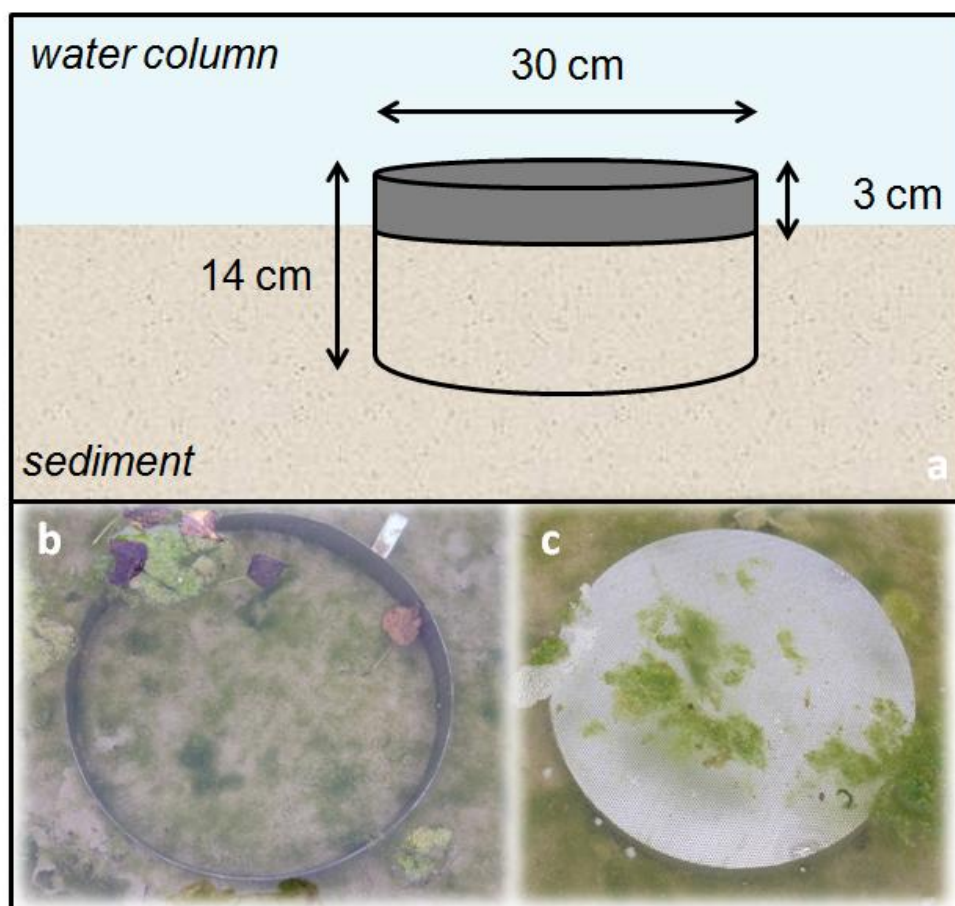


Figure 1 : design des encagements : schéma d'un encagement (a), photo d'un traitement contrôle (b), photo d'un traitement ombrage (c)

Déroulement de l'expérience : le temps t_0 correspond à la mise en place des traitements, le 1^{er} octobre 2013. Les 6 répliqués de chaque traitement ont été aléatoirement répartis parmi les 30 encagements installés dans le bassin. Les systèmes ont ensuite été laissés dans le bassin pendant une durée de 38 jours, le temps final étant le 7 novembre 2013. Pendant l'expérimentation, la hauteur d'eau dans le bassin a fluctué entre 20 et 180 cm, ce qui correspondait aux conditions de fonctionnement habituelles.

II.2 Mesures d'infiltration « falling head method »

Mesures in situ : Des mesures d'infiltration ont été réalisées dans chacun des encagements mis en place dans le bassin en eau, au début et à la fin de l'expérience, selon la « falling head method » (Rodgers et Mulqueen, 2006; Pedescoll *et al.*, 2009; Pedescoll *et al.*, 2011). La hauteur d'eau dans le bassin a été systématiquement enregistrée avant chaque essai et était comprise entre 20 et 50 cm. Un tube gradué (\varnothing 5 cm, h 100 cm) a été inséré à une profondeur d'environ 5 mm dans le sédiment pour assurer l'étanchéité du contact entre tube et sédiment, et éviter toute perte latérale. De l'eau a ensuite été versée dans le tube jusqu'à atteindre le bord supérieur, au temps zéro de la mesure. Pour chaque centimètre parcouru par l'eau, les temps successifs ont été enregistrés afin d'obtenir un jeu de données permettant de tracer une courbe d'infiltration $I(t)$. Cette mesure a été répétée 5 fois dans chaque encagement à t_0 et t_f , pour obtenir un total de 300 essais (5 essais x 30 encagements x 2 temps).

Estimation de la valeur de la conductivité hydraulique à saturation (K_s) : La procédure suivante de normalisation a été réalisée afin de s'affranchir des conditions expérimentales :

$$h^* = \frac{h - h_0}{h_{ini} - h_0} \quad (1)$$

Avec h , la pression de surface dans le tube, h_{ini} , pression de surface à $t = t_0$ (hauteur d'eau dans le tube), et h_0 , la pression de surface à l'équilibre (hauteur d'eau dans le bassin au moment de l'essai). Sur la base des travaux de Pedescoll *et al.* (2009) et de l'équation (1), une étude numérique démontre que la conductivité hydraulique à saturation peut être dérivée de l'évolution temporelle de h^* :

$$K_s = F \frac{\ln(h^*(t))}{t} \quad (2)$$

Où F est un facteur dépendant uniquement de la géométrie du dispositif expérimental. Dans ce contexte, La pente p obtenue par régression linéaire sur $\ln(h^*)=f(t)$ permet alors

d'estimer le coefficient K_s pour chaque essai réalisé. Etant donnée la variabilité des conditions initiales de perméabilité dans les différents encagements, les résultats seront exprimés par le ratio entre l'infiltration mesurée à t_f et t_0 dans chaque encagement, c'est-à-dire par un taux d'évolution de K_s .

II.3 Mesures réalisées sur la colonne d'eau

Afin de détecter tout changement des conditions abiotiques pouvant influencer le développement des communautés microbiennes du biofilm, le pH, la température, la conductivité et l'oxygénation de la colonne d'eau ont été mesurés de manière hebdomadaire au moyen d'une sonde multiparamétrique HQ40D (HACH). Des échantillons d'eau du bassin ont également été prélevés de manière hebdomadaire au moyen d'une seringue et un volume d'eau de 40 mL a été filtré à 0.7 μm (filtre Whatman GF/F, Maidstone, U.K.) directement sur le site. L'eau filtrée a été stockée à 4 °C pour le dosage ultérieur de la concentration en nutriments (NO_3^- , NH_4^+ et PO_4^{3-}). Ces mesures ont été réalisées à l'aide de méthodes colorimétriques classiques par un analyseur automate Easychem plus (Systea, Anagni, Italia). Le carbone organique dissous a été déterminé à partir d'échantillon pré-acidifiés et bullés à l' O_2 pour supprimer le carbone inorganique. La mesure a été effectuée par oxydation thermocatalytique (850°C) et détection infrarouge du CO_2 dégagé, à l'aide d'un analyseur de carbone Analytik Jena multi/NC® 3100.

II.4 Caractérisation des sédiments

Echantillonnage: La couche superficielle (0-1 cm) de sédiments a été échantillonnée pour chaque encagement à t_0 et t_f au moyen d'une seringue coupée (diamètre 23 mm). 10 prélèvements ont été aléatoirement réalisés dans chaque encagement puis regroupés et homogénéisés afin de constituer un échantillon représentatif. Des sous-échantillons destinés aux mesures de biomasse algale et physico-chimiques ont été stockés en glacière avant congélation au laboratoire dans les 4 heures. Des échantillons de plantes et de biofilm ont également été prélevés à t_0 et t_f à l'aide de ciseaux et d'une pince à épiler, puis stockés à l'obscurité et à température ambiante jusqu'au laboratoire où des mesures de fluorescence chlorophyllienne ont été effectuées le jour même.

Caractérisation physique : afin de déterminer si les variations du taux d'infiltration étaient dues au biofilm et non à des processus physiques liés à l'accumulation de particules fines, nous avons réalisé des mesures de granulométrie à l'aide d'un granulomètre laser (Mastersizer 2000). La répartition granulométrique a été mesurée pour chaque encagement, sur les sédiments provenant de la couche 0-1 cm, présentant une granulométrie < 2000 μm . Une mesure de bruit de fond a été systématiquement réalisée avant le passage de chaque échantillon, et une première mesure a été réalisée sur trois prises d'essai pour déterminer la texture, c'est à dire la répartition granulométrique du sédiment. Deux minutes d'ultrasons ont ensuite été appliquées à puissance maximale (50-60 Hz) pour éclater les agrégats des sédiments étudiés et ainsi déterminer le niveau d'agrégation.

Caractérisation biologique : Pour chaque encagement, environ 10g de sédiments humides ont été placés pendant 48h dans une étuve à 100°C, puis pesés. Le ratio entre la masse humide et la masse sèche a été utilisé pour exprimer l'ensemble des variables biologiques par gramme de sédiment sec. La biomasse du biofilm développé au niveau de la couche superficielle (0-1 cm) des sédiments a été caractérisée de manière globale à t_0 et t_f par des mesures de carbone organique total (COT), d'azote total (NT), et de teneurs en protéines. Le COT et le NT ont été déterminés à l'aide d'un analyseur élémentaire (FlashEA, Thermo Electron Corporation) sur des échantillons pré-acidifiés. Les teneurs en protéines ont été mesurées selon la méthode de Lowry *et al.* (1951). La contribution des composantes algales et bactériennes a également été évaluée à t_0 et t_f . Brièvement, la biomasse algale a été estimée par un dosage de chlorophylle-*a* réalisé par spectrophotométrie selon la méthode de SCOR-UNESCO (NF T 90-117) et une mesure de l'abondance des cellules bactériennes intactes et altérées a été réalisée par dénombrement à l'aide du kit [®]BacLight. Les protocoles détaillés de ces mesures sont précisés dans Gette-Bouvarot *et al.* (2014a). L'activité du biofilm a également été évaluée par une mesure d'activité enzymatique, réalisée par incubation des sédiments en présence d'un substrat spécifique puis par dosage d'un produit issu de la réaction enzymatique. Cette mesure a été réalisée le jour du prélèvement à partir de sous-échantillons conservés à l'obscurité et à température ambiante jusqu'au laboratoire. L'hydrolyse du FDA [3', 6'-diacetylfluorescein] a été utilisée pour mesurer l'activité hydrolytique du biofilm qui

permet une estimation de l'activité globale des organismes intervenant dans la décomposition de la matière organique (Battin, 1997). Pour ce faire, 0,5 g de sédiments humides ont été laissés à incubation, à l'obscurité, à température ambiante et sous agitation, après ajout de 3 mL d'une solution de tampon phosphate à pH 7,6 et 0,1 mL d'une solution de FDA à 4,8 mmol/L. L'incubation a été maintenue jusqu'à ce que la fluorescéine ait viré au vert, en s'assurant que la concentration de la FDA n'était pas limitante. La réaction a été stoppée par congélation des échantillons à -20 °C, après addition de 3 ml d'une solution de chlorure mercurique (200 mg L⁻¹). La fluorescéine a alors été dosée par spectrophotométrie à 490 nm à partir du surnageant filtré (0,45 µm, Millipore), et exprimée en µmoles de FDA hydrolysée par heure et par gramme de matière sèche. Enfin, l'activité et l'efficacité photosynthétiques du biofilm ont été mesurées pour estimer l'état physiologique du compartiment phototrophe. La mesure de fluorescence chlorophyllienne permet de juger de la qualité de l'activité photosynthétique du biofilm et donc de son état physiologique. Cette mesure a été effectuée en laboratoire sur des échantillons conservés 4h à l'obscurité, à température ambiante, à l'aide d'un Chlorophyll fluorometer, modèle PAM 210 (Hansatech instrument). Ces valeurs ont été mesurées à t_0 et à t_f .

II.5 Présentation et traitement des données

Les conditions initiales de perméabilité étant très contrastées entre les réplicats d'un même traitement, nous avons choisi de présenter les résultats sous la forme d'un ratio entre t_0 et t_f . L'utilisation de ce ratio permet également d'estimer le niveau de colmatage indépendamment des conditions expérimentales puisque le facteur géométrique F lié au dispositif expérimental se simplifie (voir équation (2)). Des analyses de variances (ANOVA) ont été réalisées pour évaluer la significativité des effets observés. Etant donné la présentation des résultats d'infiltration, l'effet « traitement » a été évalué avec une ANOVA simple. Concernant les variables caractérisant les sédiments, les résultats seront présentés sous forme classique d'histogrammes présentant les valeurs moyennes obtenues à t_0 et à t_f . Les mêmes variables ayant été mesurées à deux temps différents (t_0 et t_f), nous avons opté pour une ANOVA à mesures répétées. Ces analyses permettent une évaluation des effets combinés « temps * traitement » et des effets des facteurs « temps » et « traitement » considérés isolément. Lorsque des effets significatifs étaient

détectés, des tests post-hoc de Tukey ont ensuite été appliqués pour réaliser des comparaisons des moyennes deux à deux. Pour l'ensemble des analyses, le seuil de significativité considéré était $\alpha = 0,05$. Le traitement statistique a été réalisé avec le logiciel Statistica (version 10, Copyright 1984-2011, StatSoft Inc.).

III. Résultats

Aucun effet lié aux filets installés sur la moitié des contrôles n'a été observé. Il est donc possible de considérer les 6 contrôles dans les analyses et de comparer directement le traitement *V. viviparus* (avec filets) avec les 4 autres traitements. Les mesures réalisées dans la colonne d'eau montraient des teneurs moyennes en COD ($4.0 \pm 1.1 \text{ mg L}^{-1}$), en PO_4^{3-} ($12.6 \pm 3.67 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$), en NO_3^- ($338 \pm 71 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) et en NH_4^+ ($16.7 \pm 15.2 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) constituant une source de nutriments suffisante pour le maintien des plantes et du biofilm au cours de l'expérience.

Evolution de l'infiltration : Pour l'ensemble des traitements, K_s était comprise entre $8.0 \cdot 10^{-7}$ et $5.0 \cdot 10^{-4} \text{ m s}^{-1}$, avec une moyenne de $5.7 \cdot 10^{-5} \text{ m s}^{-1}$ à t_0 et de $2.25 \cdot 10^{-5} \text{ m s}^{-1}$ à t_f . La figure 2A présente l'évolution de l'infiltration au cours de l'expérience pour l'ensemble des traitements (exprimée en %). Le taux d'infiltration a globalement diminué au cours du temps dans les traitements contrôle, ombrage et *L. hoffmeisteri* avec une évolution comparable entre les vers tubificidés et les contrôles (Test post-hoc de Tukey, $p > 0.05$), tandis que les encagements associés aux gastéropodes et macrophytes ont vu leur infiltration maintenue, voire légèrement améliorée au cours du temps. L'infiltration est d'ailleurs significativement plus élevée dans ces traitements que dans les contrôles ($p < 0.05$). Enfin, le traitement ombrage semble avoir également limité la diminution d'infiltration, même si aucun effet significatif n'a été détecté ($p = 0.013$ pour la comparaison avec les contrôles).

Etant donnée la variabilité entre les réplicats d'un même traitement, en particulier pour *V. viviparus*, nous avons voulu vérifier l'effet des conditions initiales de perméabilité sur l'évolution de la conductivité hydraulique à saturation. Contrairement aux autres traitements, les encagements associés à *V. viviparus* montraient une évolution différente selon les conditions initiales d'infiltration (Figure 2B). Ainsi, pour une conductivité

hydraulique à saturation initiale $K_s > 10^5 \text{ m s}^{-1}$, les encagements de *V. viviparus* présentaient une diminution de l'infiltration d'environ 70%, comparable aux contrôles, tandis que pour les encagements présentant un K_s initial $< 10^5 \text{ m s}^{-1}$, les *V. viviparus* ont fortement amélioré la perméabilité (environ 150 %).

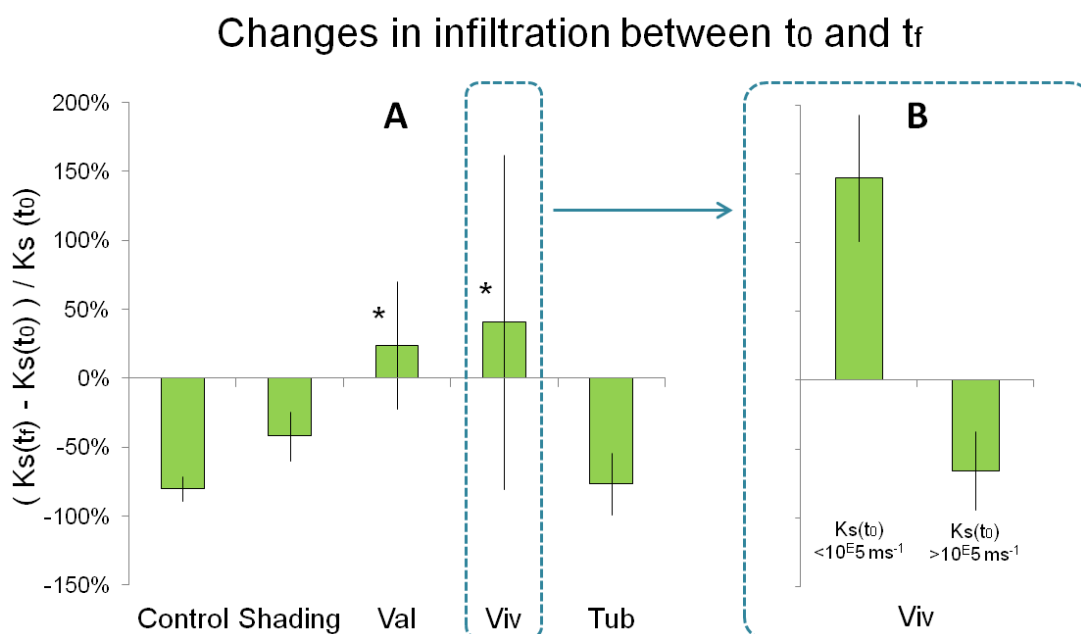


Figure 2 : Changements de la conductivité hydraulique à saturation (K_s) entre le début et la fin de l'expérience exprimés en pourcentage, (A) pour les traitements contrôle (Control), ombrage (Shading), *V. spiralis* (Val), *V. viviparus* (Viv) et *L. hoffmeisteri* (Tub) ($n=6$), les traitements significativement différents des contrôles sont indiqués par une *; (B) Pour le traitement *V. viviparus*, en fonction des conditions initiales d'infiltration ($n=3$).

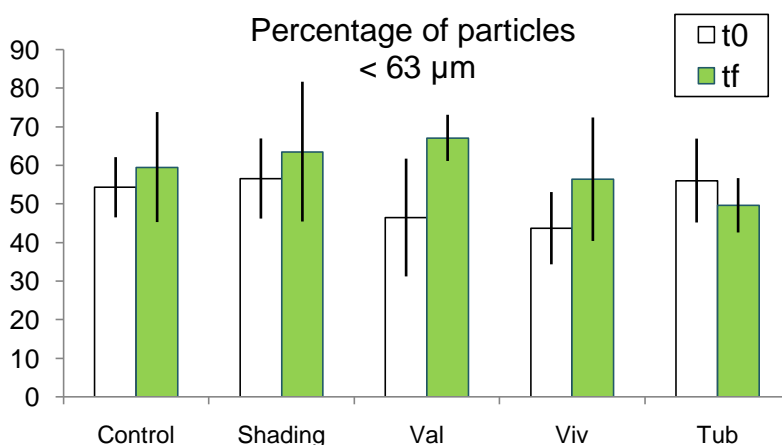


Figure 3 : Proportion de particules fines dans la couche superficielle (0-1 cm) à t_0 et t_f pour les traitements contrôle (Control), ombrage (Shading), *V. spiralis* (Val), *V. viviparus* (Viv) et *L. hoffmeisteri* (Tub), ($n=6$).

Caractérisation physique des sédiments : nous avons choisi d'assimiler les particules fines aux particules de diamètre $< 63 \mu\text{m}$, valeur correspondant à la limite des argiles et limons (Figure 3). Les quantités de particules fines n'ont montré aucune différence significative entre traitement à t_f , que ce soit avant ou après ultrasons. Une légère augmentation a été observée dans tous les traitements entre t_0 et t_f , sauf pour *L. hoffmeisteri*, mais aucune n'est significative (Anova Temps x Traitements, $p > 0.05$).

Caractérisation biologique des sédiments : La teneur en carbone organique totale a diminué au cours du temps de manière significative, ceci pour l'ensemble des traitements excepté les contrôles (Figure 4A). Nos résultats ont mis en évidence une chute significative de la teneur en chlorophylle-*a* entre t_0 et t_f pour le traitement *V. viviparus* (Figure 4C, Anova Temps x Traitement, Test post-hoc de Tukey, $p < 0.05$). La même tendance a été retrouvée pour les protéines même si aucun effet significatif n'a été détecté (Figure 4B, Anova Temps x Traitement, $p > 0.05$). Enfin, aucune différence n'a été détectée dans les abondances bactériennes, que ce soit au cours du temps ou entre traitements (Figure 4D).

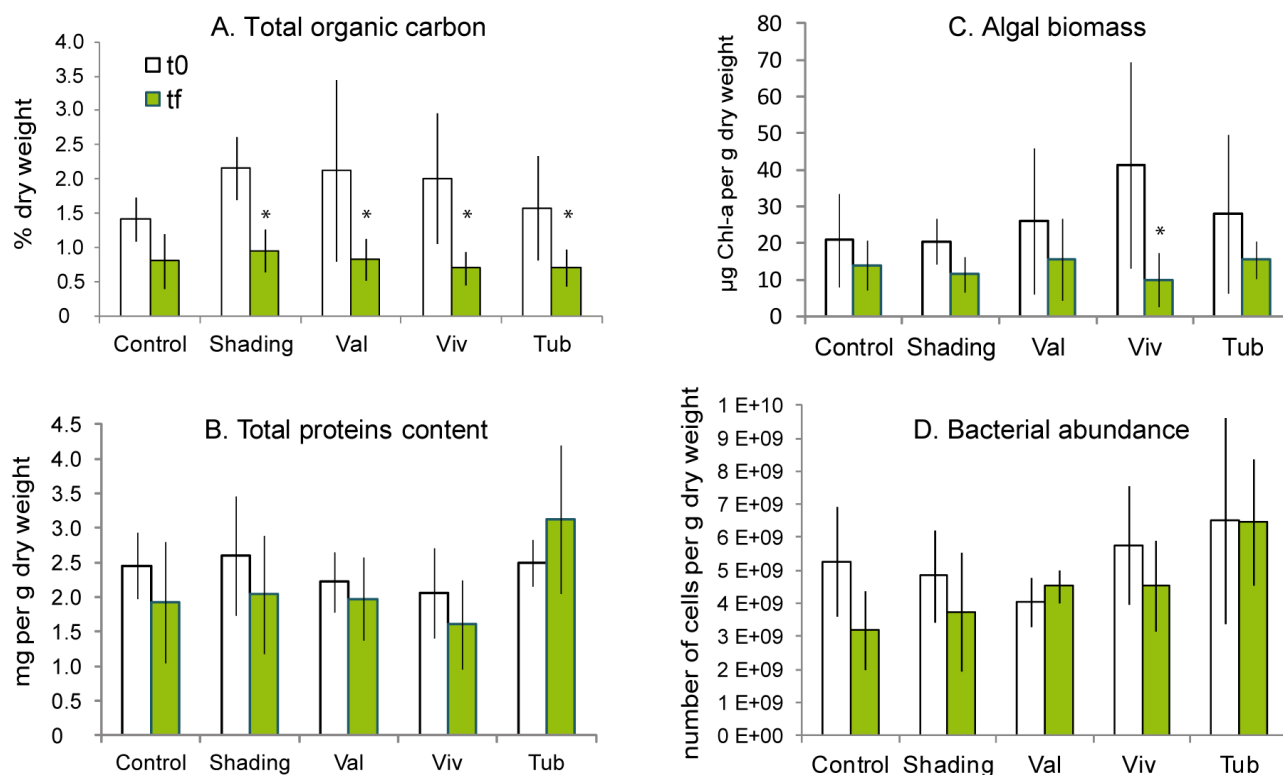


Figure 4 : Caractérisation de la biomasse du biofilm développé dans la couche superficielle (0-1 cm) à t_0 et t_f avec les teneurs en (A) carbone organique total, (B) protéines, (C) chlorophylle-*a*, et (D) abondances bactériennes pour les traitements contrôle (Control), ombrage (Shading), *V. spiralis* (Val), *V. viviparus* (Viv) et *L. hoffmeisteri* (Tub), ($n=6$). L'astérisque * indique une différence significative entre t_0 et t_f .

Concernant l'activité hydrolytique, aucune différence n'a été détectée, que ce soit au cours du temps ou entre traitement (Figure 4A), cette activité est donc maintenue au cours de l'expérience. Malgré tout, une légère augmentation a été observée dans l'ensemble des traitements alors qu'elle a plutôt tendance à diminuer dans les contrôles. Concernant l'activité et l'efficacité photosynthétique, elles présentaient exactement les mêmes évolutions au cours du temps, à savoir une diminution significative au cours du temps pour le traitement *V. spiralis* (Figure 4B et 4C, Test post-hoc de Tukey, $p < 0.05$ pour l'effet temps), une tendance à la diminution pour le traitement ombrage, et aucune différence pour les autres traitements. Par ailleurs, l'activité et l'efficacité photosynthétiques de *V. spiralis* sont également significativement inférieures à celles des contrôles.

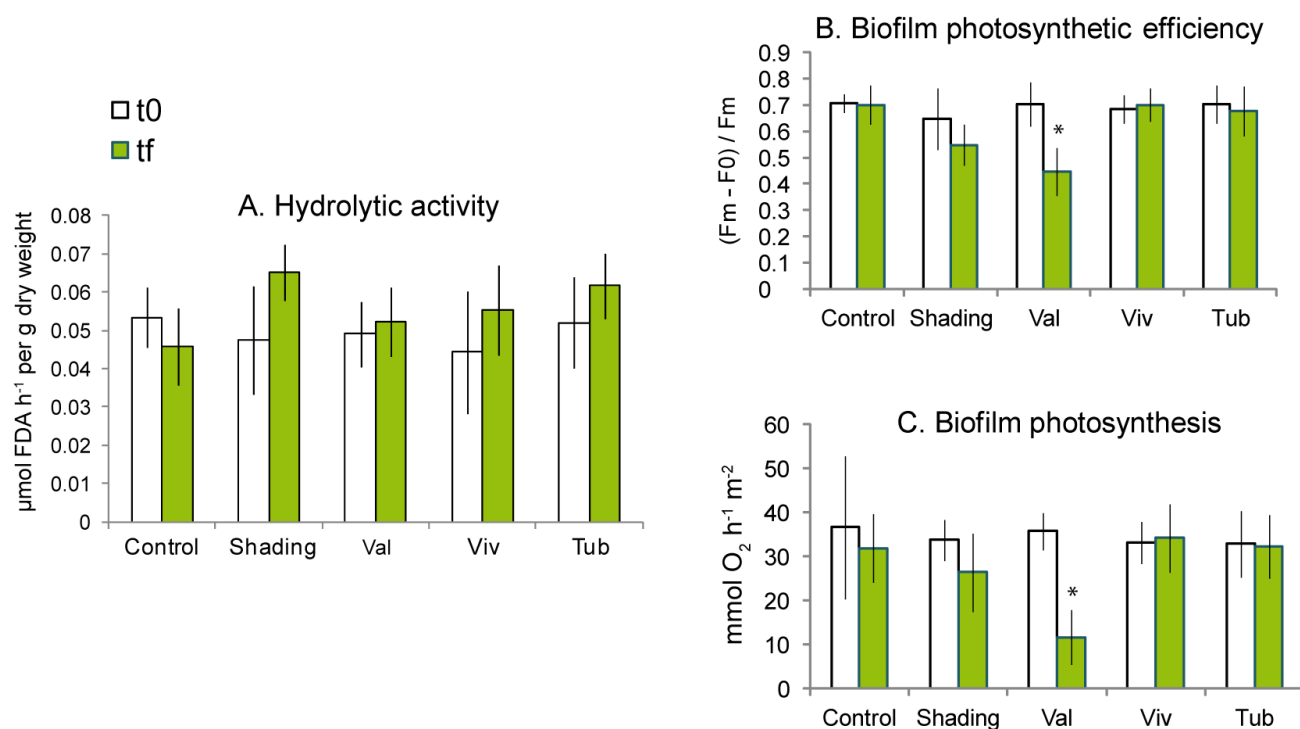


Figure 5 : (A) Activité hydrolytique, (B) Efficacité photosynthétique, et (C) activité photosynthétique du biofilm développé dans la couche superficielle (0-1 cm) à t0 et tf pour les traitements contrôle (Control), ombrage (Shading), *V. spiralis* (Val), *V. viviparus* (Viv) et *L. hoffmeisteri* (Tub), ($n=6$). Les astérisques * indiquent des différences significatives entre t0 et tf

IV. Discussion

L'objectif de cette étude était d'évaluer l'effet de différents traitements, biotiques et abiotiques, sur le niveau de colmatage de bassins d'infiltration. Nos résultats ont montré que certains des traitements testés ont eu l'effet escompté en améliorant ou en limitant la diminution de conductivité hydraulique à saturation. En effet, nous avons mis en évidence un taux d'infiltration significativement plus élevé à t_f dans les encagements associés à *V. spiralis* par rapport aux contrôles. De plus, malgré la forte variabilité observée dans les encagements associés à *V. viviparus*, cette espèce semble également pouvoir améliorer l'infiltration lorsque les conditions initiales de perméabilité sont déjà dégradées. Les mécanismes agissant sur la perméabilité des sédiments sont à la fois physique avec la filtration des particules en suspension par la matrice sédimentaire, chimiques avec les processus d'adsorption et de précipitation, ou biologiques avec le développement d'un biofilm dense à l'interface eau/sédiment (Langergraber *et al.*, 2003; Knowles *et al.*, 2011). Etant donné que les encagements ont tous été placés dans le même bassin, ils ont tous subis les mêmes apports pendant l'expérience. Nos résultats concernant les particules fines ont confirmé ce point, avec des proportions équivalentes entre les traitements ; de plus, le traitement pour lequel une légère diminution de cette quantité de particules fines a été observée, à savoir *L. hoffmeisteri*, est également celui pour lequel le taux d'infiltration a le plus diminué pendant l'expérience avec les contrôles (-76% en moyenne). Ces résultats permettent de conclure que l'évolution des niveaux de colmatage n'est pas liée à des apports de particules fines, mais à d'autres paramètres, qui diffèrent selon les traitements.

Le carbone organique total, qui a diminué de manière équivalente dans tous les traitements (Figure 4A) ne peut pas non plus expliquer les différences observées entre les évolutions de perméabilité. Cette diminution globale ne se répercute pas sur les autres variables structurelles comme les protéines ou les abondances bactériennes (Figure 4B et 4D), et la légère baisse observée pour la chlorophylle-*a* ne peut pas entraîner une telle diminution. Aussi, cette perte de matière organique peut être liée à une dégradation de la MO sénescence présente au début de l'expérience.

Dans le cas des encagements associés à *V. spiralis*, nous avons observé une baisse significative de l'activité et de l'efficacité photosynthétiques du biofilm au cours de l'expérience (Figures 5B et 5C), ce qui indique que cette espèce a eu un effet inhibiteur sur la composante phototrophe du biofilm des sédiments. Ce résultat confirme une précédente étude (Gette-Bouvarot *et al.*, 2014b) au cours de laquelle nous avons mis en évidence une réduction de l'efficacité photosynthétique de biofilms benthiques en présence de *V. spiralis*; résultat attribué à une altération du photosystème. La durée réduite de l'expérience encagée n'a pas permis à ces effets de se répercuter sur la biomasse des algues, puisque la légère baisse de chlorophylle-*a* observée dans les traitements *V. spiralis* est comparable à celle des contrôles (Figure 4C). Si l'expérience avait duré plus longtemps, cette baisse d'activité photosynthétique aurait sans doute eu des conséquences sur la production primaire brute probablement visibles à plus long terme sur la biomasse algale mesurée. Finalement, l'augmentation de perméabilité au cours de l'expérience dans les encagements de *V. spiralis* n'est donc pas due à une diminution de la biomasse du biofilm, mais peut en revanche être lié à l'inhibition de l'activité photosynthétique du biofilm. En effet, Schuh (1990) et Heilweil et Watt (2011) expliquent que l'absorption de CO₂ dissous et d'ions carbonates entraînent une alcalinisation de l'eau et une baisse de solubilité du carbonate de calcium. La précipitation de ce composé tend ensuite à cimenter des particules composant le support d'infiltration et ainsi diminuer sa perméabilité. Aussi, une inhibition de l'activité photosynthétique du biofilm a pu restreindre ce phénomène et ainsi limiter la dégradation de l'infiltration. Enfin, le développement du réseau racinaire des *V. spiralis*, notamment la formation de stolons par multiplication végétative, a pu créer des macroporosités au sein du sédiment et ainsi favoriser les écoulements. Brix (1997) explique à ce sujet que les racines et rhizomes des plantes peuvent être très efficaces pour créer des chemins pour l'eau, à la fois lors de leur développement, qui peut « perturber et desserrer » le sédiment, mais aussi lors de leur décomposition qui laisse derrière elle des macropores tubulaires.

Le biofilm associé au traitement ombrage présentait les mêmes tendances qu'en présence de *V. spiralis*, mais moins marquées. En effet, comme pour le traitement avec les macrophytes, nous avons observé une diminution de l'activité et de l'efficacité

photosynthétiques (Figures 5B et 5C), mais beaucoup plus légère, ainsi qu'une évolution de la biomasse algale équivalente à celle des traitements contrôles (Figure 4C). La réduction de lumière a donc bien limité la photosynthèse dans ces encagements, mais comme pour le traitement *V. spiralis*, la durée de l'expérience ne nous a pas permis d'observer d'effets associés sur la biomasse algale. Il faut noter que le taux d'infiltration a moitié moins diminué dans ce traitement que dans les contrôles (-40% en moyenne contre -80% dans les contrôles, Figure 2A). Ce résultat vient donc confirmer que l'inhibition de la photosynthèse peut limiter la dégradation des propriétés hydrauliques en diminuant les processus de précipitation, le réseau racinaire n'intervenant pas ici.

Concernant le traitement *V. viviparus*, ces effets sur la perméabilité du milieu sont différents puisque le biofilm associé à ce traitement présentait cette fois une activité photosynthétique maintenue, voire stimulée (Figures 5B et 5C). En revanche, nous avons observé une diminution significative de la biomasse algale dans ces encagements (Figure 4C). Ce résultat est lié à l'activité de broutage du gastéropode, qui a consommé une partie de la composante algale du biofilm. C'est d'ailleurs un résultat couramment obtenu dans la littérature (Hillebrand, 2009; Jakubik, 2009). L'étude d'Arakelova (2010) sur des communautés périphytiques montre que l'activité physiologique des brouteurs, liée à leur alimentation et leurs excréments, est décisive pour la biomasse et la productivité des algues. L'auteur explique que les pelotes fécales excrétées par les gastéropodes contiennent une proportion considérable de phosphore sous forme organique, et qu'en conséquence, le broutage d'algues périphytiques associé à la libération d'éléments biogènes à partir des excréments dans le milieu peut influencer l'activité des producteurs autotrophes, de manière positive ou négative. McCormick et Stevenson (1991) ont d'ailleurs suggéré que la croissance des algues dans les couches inférieures du biofilm pouvait être stimulée lorsque les cellules de surface ont été pâturées. Ces conclusions sont en accord avec nos résultats qui montrent une composante algale du biofilm moins dense mais plus active en présence des gastéropodes. Des analyses complémentaires en microscopie électronique à balayage (MEB) semblent d'ailleurs montrer un effet de raclage et de « nettoyage » des grains par *Viviparus viviparus* alors que, dans les autres traitements, le biofilm attaché aux grains semblait plus dense (voir Figure 6 avec les traitements *L. hoffmeisteri*, *Viviparus viviparus*

et ombrage). Les *V. viviparus* ont donc clairement une influence sur le biofilm, mais des effets contrastés sur la perméabilité des sédiments selon les conditions initiales (Figure 2B). Lorsque la perméabilité initiale est élevée ($K_s > 10^5 \text{ m s}^{-1}$), les *V. viviparus* n'ont eu aucun effet, avec une évolution de l'infiltration comparable à celle des contrôles ou des *L. hoffmeisteri* (-66% en moyenne). En revanche, avec des conditions initiales dégradées, c'est-à-dire pour une conductivité hydraulique à saturation inférieure aux valeurs classiques des sables utilisés (nous avons choisi pour valeur limite 10^5 m s^{-1}), la présence des *V. viviparus* augmente considérablement la perméabilité du milieu (+150%). Ce résultat vient confirmer le rôle clé de la composante algale du biofilm des sédiments dans la dégradation des performances hydrauliques des ouvrages, que nous avons mis en évidence dans une précédente étude réalisée sur plusieurs bassins du même site (Gette-Bouvarot *et al.*, 2014a). Le broutage des gastéropodes a ainsi pu fragmenter le tapis algal dans les encagements colmatés et considérablement améliorer l'infiltration, alors qu'il n'a pas eu d'effet sur l'infiltration dans les cages où le tapis algal ne recouvrait pas la totalité de la surface. Cette hypothèse est en accord avec plusieurs études réalisées sur les invertébrés expliquant qu'ils sont d'autant plus efficaces sur des systèmes qu'ils sont susceptibles de modifier ; en d'autres termes, les effets des organismes ingénieurs des écosystèmes dépendent fortement des caractéristiques physiques des habitats modifiés (Jones *et al.*, 1994; Navel *et al.*, 2012).

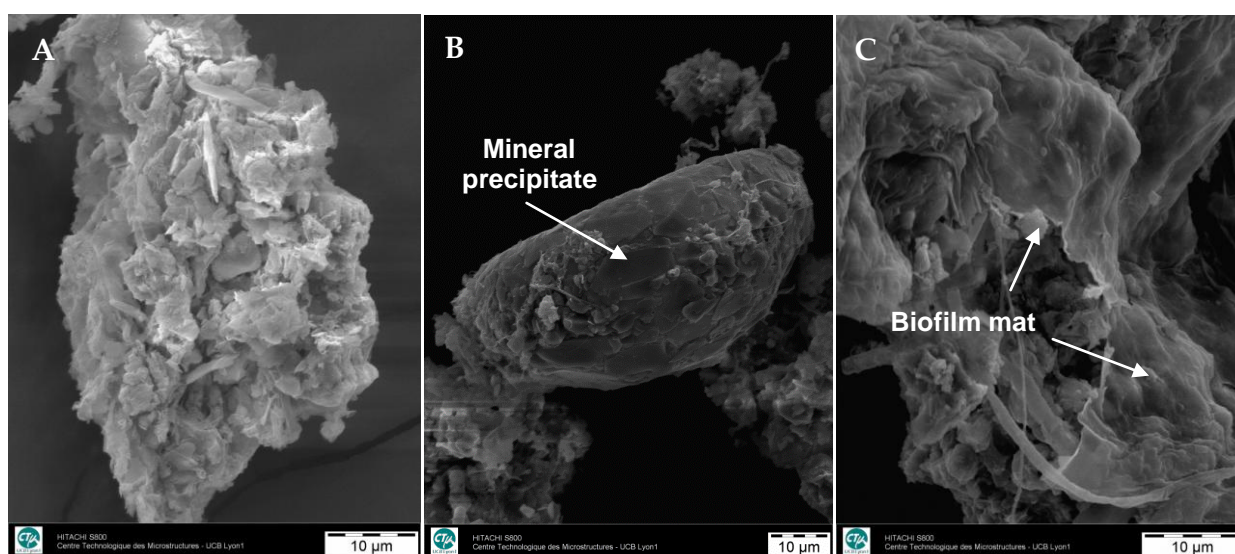


Figure 6: Photographies MEB des particules de sédiments prélevés dans les encagements correspondant au traitement *L. hoffmeisteri* (A), au traitement *V. viviparus* (B) et au traitement ombrage (C).

Cette dernière hypothèse explique également nos résultats obtenus avec le ver tubificidé *L. hoffmeisteri*. En effet, l'étude de Navel *et al.* (2012) concernait également des vers tubificidés (*Tubifex tubifex*) et montrait à l'échelle du laboratoire que les caractéristiques initiales d'un milieu module les effets des bioturbateurs. Ces derniers ont en effet augmenté de manière significative la perméabilité dans des sédiments recouverts de sable fin, alors qu'ils ont eu des effets beaucoup plus faibles dans des sédiments surmontés de sable grossier. Dans le cadre de notre étude, les vers n'ont eu aucun effet sur la perméabilité (Figure 2A) du milieu, ni sur le biofilm qui présente les mêmes caractéristiques que dans les traitements contrôles (Figures 4 et 5). Ce résultat peut-être lié au type de colmatage de notre système, qui résulte de la présence d'un tapis algal plutôt que de l'accumulation de particules fines. Ainsi, autant les vers peuvent avoir des effets positifs en laboratoire, en limitant le colmatage et en restaurant les conditions aérobies dans des colonnes de sédiments fins (Nogaro et Mermillod-Blondin, 2009; Navel *et al.*, 2012), autant ils ne sont pas capables de fragmenter le dense tapis algal développé à la surface des sédiments dans les bassins étudiés ici.

Enfin, sur les 4 traitements testés, 2 semblent en mesure de limiter la dégradation des performances hydrauliques. Il s'agit du macrophyte *V. spiralis* et du gastéropode *V. viviparus*. A notre connaissance, ce travail est le premier à mettre en évidence de tels effets sur la perméabilité en conditions de terrain. Cette étude a été complétée par des mesures de tomographie par rayons X assistée par ordinateur (CT scan) sur des carottes de sédiment réalisée dans les encagements. Cette méthode non-destructive permet de caractériser la variabilité spatiale et la structure du sédiment de manière quantitative à une micro-échelle. Les résultats concernant cette mesure sont en cours de traitement et semblent très prometteurs pour évaluer l'épaisseur du biofilm et caractériser le réseau poral, et permettra peut-être une analyse plus fine des effets de différents traitements sur les caractéristiques physiques du milieu. Par ailleurs, la solution actuelle pour lutter contre le colmatage consiste à changer totalement le substrat, ce qui supprime totalement le biofilm pourtant nécessaire aux processus de dégradation, et engendre en plus des coûts et quantités de matériaux importants (Knowles *et al.*, 2011). Or, les effets observés sur la perméabilité des sédiments dans cette étude sont associés à un maintien des activités hydrolytiques (Figure 5A), aussi, les traitements *V. spiralis* et *V. viviparus*

permettent de conserver un potentiel de dégradation de la matière organique, tout en maintenant l'infiltration. Nos résultats sont donc très prometteurs pour le développement futur de techniques d'ingénierie écologique dans la gestion et l'amélioration de la durée de vie des ouvrages d'infiltration. Néanmoins, avant des applications opérationnelles, il est nécessaire de compléter nos résultats par de nouveaux essais, notamment en s'intéressant à plusieurs bassins présentant des niveaux de colmatage contrastés afin de généraliser ces premiers résultats.

V. Remerciements

Nous souhaitons remercier l'ensemble des personnes qui ont participé aux expérimentations, à savoir Thérèse Bastide, Alicia Naveros, Margot Jacquy, Felix Vallier, Jean-Philippe Bedell, Dieuseul Predelus, Chantal Mora, Mickael Gette et Marc Danjean. Merci également à Alexandre Elaphos pour le traitement numérique des données d'infiltration. Enfin, nous remercions le Grand Lyon et Veolia pour le soutien technique et financier de ce travail.



VI. Références

- Arakelova, E. S., 2010. "Periphyton grazing and phosphorus excretion by mollusks." *Russian Journal of Ecology* 41(4): 327-332.
- Armitage, A. R., Gonzalez, V. L. and Fong, P., 2009. "Decoupling of nutrient and grazer impacts on a benthic estuarine diatom assemblage." *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 84(3): 375-382.
- Baclight, 1995. "Molecular Probes Live/Dead *BacLight* bacteria viability kit Molecular Probes Inc."
- Battin, T. J., 1997. "Assessment of fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total esterase activity in natural stream sediment biofilms." *Science of the Total Environment* 198(1): 51-60.
- Baveye, P., Vandevivere, P., Hoyle, B. L., DeLeo, P. C. and de Lozada, D. S., 1998. "Environmental impact and mechanisms of the biological clogging of saturated soils and aquifer materials." *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 28(2): 123-191. 10.1080/10643389891254197.

- Bourassa, N. and Cattaneo, A., 1998. "Control of periphyton biomass in Laurentian streams (Quebec)." *Journal of the North American Benthological Society* 17(4): 420-429.
- Brix, H., 1997. "Do macrophytes play a role in constructed treatment wetlands." *Water Science and Technology* 35(5): 11-17.
- Cole, J. J., 1982. "Interactions between bacteria and algae in aquatic ecosystems." *Annual review of ecology and systematics*. Volume 13: 291-314.
- Dechesne, M., Barraud, S. and Bardin, J. P., 2004. "Indicators for hydraulic and pollution retention assessment of stormwater infiltration basins." *Journal of Environmental Management* 71(4): 371-380.
- Feminella, J. W. and Hawkins, C. P., 1995. "Interactions between stream herbivores and periphyton: A quantitative analysis of past experiments." *Journal of the North American Benthological Society* 14(4): 465-509.
- Gette-Bouvarot, M., Mermillod-Blondin, F., Angulo-Jaramillo, R., Delolme, C., Lemoine, D., Lassabatere, L., Loizeau, S. and Volatier, L., 2014a. "Coupling hydraulic and biological measurements highlights the key influence of algal biofilm on infiltration basin performance." *Ecohydrology* 7(3): 950-964.
- Gette-Bouvarot, M., Mermillod-Blondin, F., Lemoine, D., Delolme, C., Etienne, L. and Volatier, L., 2014b. "The potential of allelopathic macrophytes to control benthic biofilm growth – a mesocosm approach." in prep.
- Goldsborough, L. G. and Robinson, G. G. C., 1996. Pattern in Wetlands. IN *Algal Ecology*. J. R. Stevenson, M. L. Bothwell and R. L. Lowe. London, Academic Press pp. 77-117.
- Gross, E. M., 2003. "Allelopathy of aquatic autotrophs." *Critical Reviews in Plant Sciences* 22(3-4): 313-339.
- Haglund, A. L. and Hillebrand, H., 2005. "The effect of grazing and nutrient supply on periphyton associated bacteria." *FEMS Microbiology Ecology* 52(1): 31-41.
- Heilweil, V. M. and Watt, D. E., 2011. "Trench infiltration for managed aquifer recharge to permeable bedrock." *Hydrological Processes* 25(1): 141-151.
- Hillebrand, H., 2009. "Meta-analysis of grazer control of periphyton biomass across aquatic ecosystems." *Journal of Phycology* 45(4): 798-806.
- Hockelmann, C. and Pusch, M., 2000. "The respiration and filter-feeding rates of the snail *Viviparus viviparus* (Gastropoda) under simulated stream conditions." *Archiv fur Hydrobiologie* 149(4): 553-568.
- Jakubik, B., 2009. "Food and feeding of *Viviparus Viviparus* (L.) (Gastropoda) in dam reservoir and river habitats." *Polish Journal of Ecology* 57(2): 321-330.
- Jones, C. G., Lawton, J. H. and Shachak, M., 1994. "Organisms as ecosystem engineers." *Oikos* 69(3): 373-386.
- Katznelson, R., 1989. "Clogging of groundwater recharge basins by cyanobacterial mats." *FEMS Microbiology Ecology* 62(4): 231-242.
- Knowles, P., Dotro, G., Nivala, J. and García, J., 2011. "Clogging in subsurface-flow treatment wetlands: Occurrence and contributing factors." *Ecological Engineering* 37(2): 99-112.
- Kostel, J. A., Wang, H., St. Amand, A. L. and Gray, K. A., 1999. "1. Use of a novel laboratory stream system to study the ecological impact of PCB exposure in a periphytic biolayer." *Water Research* 33(18): 3735-3748.

- Langergraber, G., Haberl, R., Laber, J. and Pressl, A., 2003. "Evaluation of substrate clogging processes in vertical flow constructed wetlands." *Water Science and Technology* 48(5): 25-34.
- Liess, A. and Kahlert, M., 2007. "Gastropod grazers and nutrients, but not light, interact in determining periphytic algal diversity." *Oecologia* 152(1): 101-111.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J., 1951. "Protein measurement with the folin phenol reagent." *Journal of Biological Chemistry* 193(1): 265-275.
- Martinet, F., Juget, J. and Riera, P., 1993. "Carbon fluxes across water, sediment and benthos along a gradient of disturbance intensity ; adaptative responses of the sediment feeders. ." *Arch. hydrobiol.* 127: 39-56.
- Mauclaire, L., Schürmann, A., Thullner, M., Gammeter, S. and Zeyer, J., 2004. "Sand filtration in a water treatment plant: Biological parameters responsible for clogging." *Journal of Water Supply: Research and Technology - AQUA* 53(2): 93-108.
- McCormick, P. V. and Stevenson, R. J., 1991. "Grazer control of nutrient availability in the periphyton." *Oecologia* 86(2): 287-291.
- Mermillod-Blondin, F., Creuzé des Châtelliers, M. and Gérino, M., 2003. "Effects of the interaction between tubificid worms on the functioning of hyporheic sediments: An experimental study in sediment columns." *Archiv fur Hydrobiologie* 156(2): 203-223.
- Mermillod-Blondin, F., Gérino, M., Degrange, V. G., Lensi, R., Chassé, J.-L., Rard, M. and Creuzé des Châtelliers, M., 2001. "Testing the functional redundancy of *Limnodrilus* and *Tubifex* (Oligochaeta, Tubificidae) in hyporheic sediments: an experimental study in microcosms." *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 8: 1747-1759.
- Navel, S., Mermillod-Blondin, F., Montuelle, B., Chauvet, E. and Marmonier, P., 2012. "Sedimentary context controls the influence of ecosystem engineering by bioturbators on microbial processes in river sediments." *Oikos* 121(7): 1134-1144. 10.1111/j.1600-0706.2011.19742.x.
- Nogaro, G. and Mermillod-Blondin, F., 2009. "Stormwater sediment and bioturbation influences on hydraulic functioning, biogeochemical processes, and pollutant dynamics in laboratory infiltration systems." *Environmental Science and Technology* 43(10): 3632-3638.
- Nogaro, G., Mermillod-Blondin, F., François-Carcaillet, F., Gaudet, J. P., Lafont, M. and Gibert, J., 2006. "Invertebrate bioturbation can reduce the clogging of sediment: An experimental study using infiltration sediment columns." *Freshwater Biology* 51(8): 1458-1473.
- Nogaro, G., Mermillod-Blondin, F., Montuelle, B., Boisson, J. C. and Gibert, J., 2008. "Chironomid larvae stimulate biogeochemical and microbial processes in a riverbed covered with fine sediment." *Aquatic Sciences* 70(2): 156-168.
- Nogaro, G., Mermillod-Blondin, F., Vallet, M. H., François-Carcaillet, F., Gaudet, J. P., Lafont, M. and Gibert, J., 2009. "Ecosystem engineering at the sediment-water interface: Bioturbation and consumer-substrate interaction." *Oecologia* 161(1): 125-138.
- Pedescoll, A., Samsó, R., Romero, E., Puigagut, J. and García, J., 2011. "Reliability, repeatability and accuracy of the falling head method for hydraulic conductivity measurements under laboratory conditions." *Ecological Engineering* 37: 754-757.

- Pedescoll, A., Uggetti, E., Llorens, E., Granés, F., García, D. and García, J., 2009. "Practical method based on saturated hydraulic conductivity used to assess clogging in subsurface flow constructed wetlands." *Ecological Engineering* 35: 1216–1224.
- Rodgers, M. and Mulqueen, J., 2006. "Field-saturated hydraulic conductivity of unsaturated soils from falling-head well tests." *Agricultural Water Management* 79: 160-176.
- Romaní, A. M. and Sabater, S., 1999. "Effect of primary producers on the heterotrophic metabolism of a stream biofilm." *Freshwater Biology* 41(4): 729-736.
- Sand-Jensen, K. and Borum, J., 1991. "Interactions among phytoplankton, periphyton, and macrophytes in temperate freshwaters and estuaries." *Aquatic Botany* 41(1-3): 137-175.
- Schuh, W. M., 1990. "Seasonal variation of clogging of an artificial recharge basin in a northern climate." *Journal of Hydrology* 121(1-4): 193-215.
- Steinman, A. D., 1996. Effects of grazers on freshwater benthic algae. IN *Algal Ecology*. R. J. Stevenson, M. L. Bothwell and R. L. Lowe. London, Academic Press pp. 753 pages.
- Stevenson, J. R., Bothwell, M. L. and Lowe, R. L., 1996. *Algal Ecology, Freshwater Benthic Ecosystems*. London, Academic Press. 753 pages.
- Stevenson, R. J., 1997. "Resource thresholds and stream ecosystem sustainability." *Journal of the North American Benthological Society* 16(2): 410-424.
- Sturt, M. M., Jansen, M. A. K. and Harrison, S. S. C., 2011. "Invertebrate grazing and riparian shade as controllers of nuisance algae in a eutrophic river." *Freshwater Biology* 56(12): 2580-2593.
- Thullner, M., Zeyer, J. and Kinzelbach, W., 2002. "Influence of microbial growth on hydraulic properties of pore networks." *Transport in Porous Media* 49(1): 99-122.
- Van Donk, E. and Van de Bund, W. J., 2002. "Impact of submerged macrophytes including charophytes on phyto- and zooplankton communities: Allelopathy versus other mechanisms." *Aquatic Botany* 72(3-4): 261-274. 10.1016/s0304-3770(01)00205-4.
- Wallace, J. B. and Webster, J. R., 1996. "The role of macroinvertebrates in stream ecosystem function." *Annual review of entomology*. Vol. 41: 115-139.
- Wood, W. W. and Bassett, R. L., 1975. "Water quality changes related to the development of anaerobic conditions during artificial recharge." *Water Resources Research* 11(4): 553-558.
- Yan, D., Bai, Z., Rowan, M., Gu, L., Shumei, R. and Yang, P., 2009. "Biofilm structure and its influence on clogging in drip irrigation emitters distributing reclaimed wastewater." *Journal of Environmental Sciences* 21(6): 834-841.
- Zhao, L., Zhu, W. and Tong, W., 2009. "Clogging processes caused by biofilm growth and organic particle accumulation in lab-scale vertical flow constructed wetlands." *Journal of Environmental Sciences* 21(6): 750-757.

Synthèse & Perspectives

I. Synthèse

Cette partie vise à résumer de façon synthétique les principales conclusions de ce travail de thèse qui se décline en deux grands volets :

- l'évaluation de l'influence des biofilms phototrophes dans les processus de colmatage des sédiments de bassins d'infiltration ;
- l'étude des effets de macro-organismes aquatiques sur le biofilm d'une part et sur le support d'infiltration d'autre part, ceci avec pour objectif de limiter le colmatage.

I.1 Quel rôle du biofilm phototrophe sur les processus de colmatage des bassins d'infiltration ?

Les résultats ont mis en évidence que la couche superficielle (0-1 cm) des sédiments de bassins d'infiltration se distingue clairement des horizons inférieurs (2-14 cm). En effet, le pourcentage volumétrique des particules de sédiments inférieures à 63 μm , c'est-à-dire les limons et argiles, est significativement supérieur dans cette couche superficielle comparativement aux horizons sous-jacents (8 à 40 fois plus élevé selon le bassin étudié). De plus, cette couche se distingue des autres profondeurs car elle est également le siège d'un développement et d'une activité biologique clairement plus intense : les valeurs des variables descriptives de la structure et des activités enzymatiques des biofilms y sont systématiquement et significativement plus élevées. A titre d'exemple, les teneurs en carbone organique et en protéines sont environ 5 fois plus élevées et l'activité enzymatique hydrolytique environ 10 fois plus élevée comparativement aux horizons inférieurs. Les teneurs en chlorophylle-*a* dans la couche superficielle sont également élevées avec des valeurs variant de 5 à 60 $\mu\text{g.g}^{-1}$ de sédiment sec selon le bassin considéré ; celles-ci diminuent drastiquement dans les couches inférieures jusqu'à atteindre une valeur nulle au-delà de 5 cm, confirmant la présence d'une biomasse phototrophe au niveau de la couche superficielle des bassins, qui décroît très rapidement avec le gradient de lumière verticale. Nos résultats soutiennent donc clairement une stratification verticale des caractéristiques physiques et biologiques des sédiments de

bassins d'infiltration, couramment observée dans la littérature scientifique (Badin *et al.*, 2009b; Nogaro *et al.*, 2010; Pastor *et al.*, 2011).

Cette couche superficielle des bassins joue par ailleurs un rôle déterminant dans les processus de colmatage puisque nos résultats ont mis en évidence une nette augmentation de la conductivité hydraulique à saturation après retrait du premier centimètre de sédiment dans les bassins ; cette augmentation pouvant aller jusqu'à un facteur 60. La perméabilité d'un milieu stratifié est contrôlée par la couche de plus faible perméabilité, c'est donc clairement la couche superficielle des sédiments (0-1 cm) qui contrôle les performances hydrauliques du substrat des bassins d'infiltration. En effet, lorsque le colmatage y devient assez important pour que la conductivité hydraulique soit inférieure à celle du sol sous-jacent, c'est cette couche superficielle qui régit toute l'infiltration. Ce résultat rejoint les conclusions de nombreuses études qui mettent en évidence le rôle de la « couche superficielle colmatante » dans les processus de colmatage des ouvrages d'infiltration (Platzer et Mauch, 1997; Bouwer, 2002; Langergraber *et al.*, 2003)

Toutefois, la comparaison de deux bassins exploités dans des conditions similaires a montré que le retrait de la couche superficielle (0-1 cm) ne conduisait pas à la même augmentation de la conductivité hydraulique ; ceci, alors que les analyses granulométriques n'ont révélé aucune différence concernant la quantité de particules fines. Par ailleurs, le bassin qui présentait la plus forte augmentation de perméabilité après retrait de la couche superficielle était aussi celui qui se distinguait par un développement et une activité biologique supérieurs. Etant donné que la plus forte différence portait sur la teneur en chlorophylle-*a*, cette variable a été examinée au regard des propriétés hydrodynamiques issues de la modélisation, c'est-à-dire la conductivité hydraulique à saturation et du rayon de pore hydrauliquement fonctionnel.

Il est ressorti de cette étude un effet seuil de la biomasse algale sur la porosité hydrauliquement fonctionnelle du milieu, c'est-à-dire la porosité utile aux écoulements. Concrètement, trois tendances ont été observées (i) pour des teneurs en chlorophylle-*a* faibles ($< 1 \mu\text{g.g}^{-1}$ de sédiment sec), la biomasse algale n'a aucun effet particulier sur le réseau poral ; (ii) pour des teneurs « moyennes » (comprises entre 4 et $9 \mu\text{g.g}^{-1}$ de

sédiment sec), la biomasse algale tend à favoriser l'agrégation des particules, ce qui conduit à une augmentation de la porosité fonctionnelle et favorise l'infiltration, et (iii) pour des teneurs élevées en chlorophylle, ($> 9 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de sédiment sec), le rayon moyen des pores décroît rapidement avec l'augmentation de la teneur en chlorophylle-*a*, ce qui fait chuter les capacités d'infiltration. Ce dernier point s'explique par une accumulation d'algues en surface des sédiments qui forment un tapis dense et colmatant [Figure 48]. Ces résultats sont, à notre connaissance, les premiers à mettre en évidence les effets de la biomasse algale sur la porosité efficace d'un milieu poreux et sur ses capacités d'infiltration.

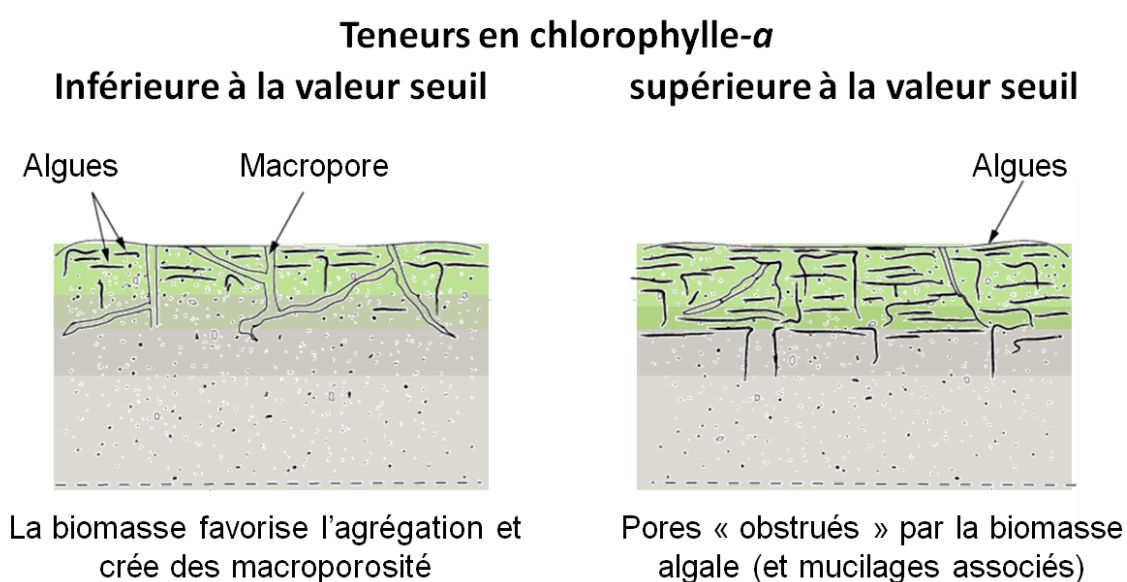


Figure 48 : Illustration de l'effet seuil de la biomasse algale sur le réseau poral

En résumé, nos résultats ont mis en évidence une structuration verticale des caractéristiques physiques et biologiques des sédiments, notamment du fait de la présence d'une biomasse phototrophe en surface. La couche superficielle des sédiments des bassins joue un rôle déterminant sur les capacités d'infiltration puisque son retrait peut multiplier par 60 la conductivité hydraulique à saturation. Ces effets sur la perméabilité sont clairement liés à la biomasse phototrophe des biofilms développés aux interfaces eau/sédiment qui modifie la géométrie du réseau poral des sédiments : si le développement algal tend en premier lieu à favoriser la formation de macropores par agrégation des particules, une accumulation trop importante de biomasse algale tend à réduire la porosité efficace en réduisant la taille et la connectivité entre les pores, ce qui diminue les capacités d'infiltration du milieu.

I.2 Quelle influence des macrophytes allélopathiques sur la composante phototrophe des biofilms benthiques ?

Cette partie aborde les effets des macrophytes sur l'évolution des biofilms développés au sein et à la surface de la couche superficielle des sédiments (0-1 cm). L'influence de 4 plantes allélopathiques, caractéristiques des lînes du Rhône (*Berula erecta*, *Vallisneria spiralis*, *Chara globularis* et *Ceratophyllum demersum*) et a été évaluée *via* des essais en mésocosmes.

En premier lieu, les mesures effectuées témoignent de deux tendances nettes et opposées : une faculté d'adaptation des espèces *Vallisneria spiralis* et *Chara globularis* aux sédiments de bassins d'infiltration d'une part, et une dégradation de l'espèce *Berula erecta* au cours de l'expérience d'autre part. Les mesures relatives à l'espèce *Ceratophyllum demersum* sont moins marquées mais elles suggèrent néanmoins une adaptation moins satisfaisante que pour les espèces *Vallisneria spiralis* et *Chara globularis*.

Les résultats montrent que la présence des plantes, quelle que soit l'espèce considérée, conduit à une diminution de la concentration moyenne en carbone organique total dans les sédiments, avec des effets significatifs dans le cas des espèces *Vallisneria spiralis* et *Chara globularis*. En l'absence de plantes, c'est-à-dire dans les essais « témoins », aucune évolution n'a été constatée. De plus, quel que soit le traitement considéré, les activités enzymatiques ont été maintenues au cours de l'expérience.

En revanche, après 6 semaines d'exposition, une diminution des teneurs en chlorophylle-*a* a été enregistrée dans l'ensemble des mésocosmes, ce qui inclut les essais « témoins ». De manière générale, une diminution de la teneur en chlorophylle-*a* dans les biofilms peut-être observée lorsque la production de matière ne permet de compenser les pertes de biomasses (décrochement, prédation, broutage). Cela étant, les teneurs en COT dans les essais témoins étant comparables en début et en fin, cette explication ne peut pas être retenue. Les invertébrés algivores ayant été retirés des sédiments, la pression de prédation est *a priori* faible. La diminution de la teneur en chlorophylle-*a* peut être également liée à une sénescence de la composante algale des biofilms mais le maintien de l'intégrité fonctionnelle du photosystème va à l'encontre de cette seconde possibilité. La

diminution en chlorophylle-*a* dans les essais témoins est donc ici supposée due à un effet d'ombrage provoqué par un développement algal important au sein de la colonne d'eau.

Le développement massif des algues en colonne d'eau s'explique très clairement par le fait que l'expérimentation soit effectuée en systèmes clos, c'est-à-dire dans des conditions de température et de stabilité hydraulique largement favorables à leur développement. Ce bloom algal au sein de la colonne d'eau a été observé dans tous les traitements de manière comparable (5 à 8 mg chloro-*a*/mésocosmes) à l'exception de celui concernant l'espèce *Chara globularis* (moins de 1mg). Cette espèce a donc une action déterminante sur le développement des algues phytoplanctoniques probablement lié à un effet allélopathique (Wium-Andersen et al., 1982; Van Donk et Van de Bund, 2002; Berger et Schagerl, 2004). De plus, nous pouvons affirmer que la diminution de la teneur en chlorophylle-*a* dans les sédiments de ce traitement n'est en aucun cas liée à un effet d'ombrage (peu de développement algal dans la colonne d'eau) : un effet allopathique de la plante sur le développement de composante algale du biofilm est donc fortement suspecté. Les mesures d'efficacité photosynthétique sont quant à elles comparables à celles observées en début d'essai. Aussi, pouvons-nous conclure que la présence de *Chara globularis* inhibe la production primaire du biofilm benthique, mais que cette inhibition n'est pas liée à une altération du photosystème.

Les résultats montrent une chute considérable et significative de la teneur en chlorophylle-*a* dans le traitement *Vallisneria spiralis* : une baisse de plus de 70% a été enregistrée pour ce traitement alors qu'elle n'est que de 40% pour les essais « témoins ». Par ailleurs, une dégradation significative de l'efficacité photosynthétique du biofilm a été mesurée en présence de cette espèce. En d'autres termes, *Vallisneria spiralis* agit sur la production primaire *via* une diminution des activités photosynthétiques du fait d'une altération du fonctionnement du photosystème (teneur en chlorophylle-*a* et efficacité photosynthétique diminuées). Cette altération du photosystème II des micro-algues est attribuée à des effets allélopathiques dans la littérature (Leu *et al.*, 2002; Gross, 2003), mais nos résultats sont les premiers, à notre connaissance, à montrer de tels effets sur des algues benthiques.

En résumé, les résultats ont tout d'abord permis de confirmer des effets déjà observés de Chara globularis sur les algues vivant sous une forme planctonique, auxquels s'ajoutent des effets sur la composante phototrophe du biofilm benthique. Nous avons également mis en évidence des effets de Vallisneria spiralis, espèce jusqu'alors relativement peu étudiée. Les mesures ont en effet clairement révélé un effet inhibiteur de cette espèce sur la structure globale du biofilm des sédiments, et notamment sur sa composante phototrophe, certainement lié à une altération du photosystème II des algues. A notre connaissance, ces résultats sont les premiers à mettre en évidence des effets allélopathiques de macrophytes sur la composante algale des biofilms benthiques. Les macrophytes semblent ainsi capables de réduire la densité du biofilm se développant à l'interface eau-sédiment, tout en assurant un maintien des activités enzymatiques impliquées dans la dégradation de la matière organique, des résultats prometteurs pour le développement de techniques d'ingénierie écologique. Reste à vérifier ces potentialités allélopathiques structurantes des communautés benthiques à une échelle plus réaliste via des essais in situ.

I.3 Des processus écologiques au service du décolmatage des bassins d'infiltration ?

Cette partie aborde les effets de facteurs biotiques (broutage, bioturbation, allélopathie) et abiotique (ombrage) sur la croissance et le fonctionnement de biofilms, d'une part, et sur la conductivité hydraulique du support d'infiltration d'autre part. La croissance, donc l'épaississement des biofilms, est favorisée par l'accessibilité à la lumière et aux nutriments, alors qu'elle est peut être limitée par des interactions biotiques telles que le broutage, la bioturbation, la compétition ou l'allélopathie (Stevenson, 1997; Bourassa et Cattaneo, 1998; Haglund et Hillebrand, 2005; Nogaro *et al.*, 2009; Sturt *et al.*, 2011); ces différentes conditions expérimentales sont donc susceptibles de conduire à une inhibition de la croissance ou à une perte de biomasse. De plus, certains de ces facteurs agissent directement sur la structure du sédiment et peuvent donc agir sur la conductivité hydraulique du support d'infiltration; c'est le cas de la bioturbation ou de l'introduction de macrophytes (Brix, 1997; Nogaro *et al.*, 2006).

Des encagements implantés *in situ* ont été mis en œuvre pour tester ces différents facteurs. Ceux-ci ont consisté en l'introduction de (i) un invertébré agissant comme brouteur : le gastéropode *Viviparus viviparus* (ii) un invertébré bioturbateur, susceptible de modifier les flux de nutriments ainsi que la structure du sédiment : le ver tubificidé *Limnodrilus hoffmeisteri* (iii) un macrophyte choisi via les résultats de l'expérience précédente : *Vallisneria spiralis* L.; (iv) un traitement abiotique conçu pour simuler un ombrage important (-90%) et (v) un contrôle.

Les résultats ont montré des effets contrastés des traitements sur l'évolution de la conductivité hydraulique à saturation : le traitement *Limnodrilus hoffmeisteri* montre des résultats comparables aux contrôles, à savoir une diminution de la conductivité hydraulique à saturation au cours de l'expérience de 80% en moyenne, tandis que deux traitements semblent en mesure de limiter la dégradation des performances hydrauliques; il s'agit du macrophyte *Vallisneria spiralis* et du gastéropode *Viviparus viviparus*, qui ont maintenu, voire augmenté la conductivité hydraulique à saturation au cours de l'expérience. Les résultats obtenus avec le traitement ombrage sont plus mitigés, puisque le maintien de l'infiltration est moins important pour ce traitement (-40% en moyenne contre -80% pour le traitement contrôle). Etant donné que le carbone organique

total et les mesures granulométriques ne montrent aucune différence entre traitements à la fin de l'expérience, l'évolution des niveaux de colmatage n'est pas liée à des apports de particules fines ou à des apports organiques, mais à d'autres paramètres qui diffèrent selon les traitements.

En présence de *Vallisneria spiralis*, une baisse significative de l'activité et de l'efficacité photosynthétiques du biofilm a été observée au cours de l'expérience, ce qui suggère que cette plante a eu un effet inhibiteur sur le fonctionnement et l'état physiologique de la composante phototrophe. L'absence d'effet sur la biomasse algale des biofilms a été attribué à la durée de l'expérimentation qui est probablement trop courte au regard de ce critère. Par conséquent, l'augmentation de perméabilité du milieu mesurée en fin d'essai (+24%) est probablement expliquée par l'inhibition de l'activité photosynthétique du biofilm. En effet, la consommation de bicarbonate durant l'activité photosynthétique se traduit par une augmentation du pH favorisant les processus de précipitation et de cimentation des sédiments ; aussi, une diminution de l'activité photosynthétique est susceptible de restreindre ce phénomène. Ces résultats rejoignent les conclusions de Schuh (1990) et Heilweil et Watt (2011). Le biofilm associé au traitement ombrage présentait les mêmes tendances qu'en présence de *Vallisneria spiralis*, mais de manière moins marquées.

Dans le cas du traitement *Viviparus viviparus*, les biofilms présentaient une activité photosynthétique maintenue, voire stimulée. En revanche, une diminution significative de la biomasse algale a été observée pour ce traitement, sans doute liée à l'activité de broutage du gastéropode. C'est d'ailleurs un résultat couramment obtenu dans la littérature (Hillebrand, 2009; Jakubik, 2009). Nos résultats montrent non seulement que les *Viviparus viviparus* ont clairement une influence sur le biofilm mais également que leurs effets sur la perméabilité des sédiments sont fonction des conditions initiales de colmatage. Lorsque la perméabilité initiale est élevée ($K_s > 105 \text{ m s}^{-1}$), les *V. viviparus* n'ont eu aucun effet, avec une évolution de l'infiltration comparable à celle des contrôles ou des *L. hoffmeisteri* (-66% en moyenne). En revanche, avec des conditions initiales plus dégradées, c'est-à-dire pour une conductivité hydraulique à saturation inférieure aux valeurs classiques des sables utilisés, la présence des *V. viviparus* augmente considérablement la perméabilité du milieu (+150%). Ce résultat vient confirmer le rôle

clé de la composante algale du biofilm des sédiments dans la dégradation des performances hydrauliques des ouvrages : le broutage des gastéropodes a fragmenté le tapis algal dans les encagements colmatés et considérablement amélioré l'infiltration, alors qu'il n'a pas eu d'effet sur l'infiltration dans les cages où le tapis algal ne recouvrait pas la totalité de la surface.

Malgré des résultats encourageants concernant l'effet positif de vers tubificidés sur la perméabilité de sédiments fins obtenus à l'échelle du laboratoire (Nogaro *et al.*, 2006; Nogaro *et al.*, 2009), les vers *Limnodrilus hoffmeisteri* n'ont eu aucun effet dans cette étude, que ce soit sur la perméabilité ou sur les caractéristiques du biofilm. L'étude de Navel *et al.* (2012) montre à l'échelle du laboratoire que les caractéristiques initiales d'un milieu en termes de granulométrie module les effets des bioturbateurs, qui semblent présenter un effet maximal sur la perméabilité, la disponibilité en oxygène et l'activité microbienne lorsqu'ils évoluent dans des sédiments très fins. Or, dans les bassins étudiés, le colmatage était davantage lié à la présence d'un dense tapis algal qu'à l'accumulation de particules fines, aussi, les *Limnodrilus hoffmeisteri* n'ont sans doute pas été capable de fragmenter ce tapis et sont restés dans les sédiments sous-jacents au cours de l'expérience.

Enfin, il faut noter que les effets observés sur la perméabilité des sédiments sont associés à un maintien des activités enzymatiques hydrolytiques ; aussi, les traitements *V. spiralis* et *V. viviparus* permettent de conserver un potentiel de dégradation de la matière organique, tout en maintenant/améliorant l'infiltration.

*En résumé, les résultats montrent que certains traitements pourraient réguler la croissance du biofilm benthique et améliorer le taux d'infiltration. Ainsi, les encagements contenant des gastéropodes *Viviparus viviparus* d'une part et le macrophyte *Vallisneria spiralis* d'autre part ont montré un maintien, voire une augmentation de perméabilité, alors que cette dernière a fortement diminué dans les encagements témoin au cours de l'expérience. Les effets semblent néanmoins fortement dépendant des conditions initiales en termes d'infiltration et de développement biologique, et devront être confirmés via des essais sur des bassins aux caractéristiques initiales contrastées. Ces résultats restent très prometteurs pour le développement futur de solutions d'ingénierie écologique pour prévenir le colmatage biologique dans les systèmes dédiés à*

l'infiltration. À notre connaissance, cette étude est la première à mettre en évidence un tel potentiel dans des conditions de terrain.

II. Perspectives

A court terme, les principales perspectives qui découlent de ce travail de recherche concernent le traitement de certaines des données obtenues lors de la dernière expérimentation et la réalisation d'expérimentations complémentaires. A plus long terme, l'objectif est de généraliser certains des résultats obtenus dans le cadre de cette thèse et d'approfondir quelques points.

II.1 les perspectives à court terme

II.1.1 Caractériser les propriétés du sédiment

Etant donné les résultats obtenus sur le lien entre la biomasse phototrophe des biofilms et les propriétés du milieu poreux, notamment l'effet seuil de la biomasse algale sur le réseau poral, il a semblé pertinent d'étudier plus en détail la géométrie du réseau poral avec des techniques d'imageries. Pour cela, nous avons complété la dernière expérimentation par des mesures de tomographie par rayons X assistée par ordinateur (CT scan). Cette méthode non destructive permet d'observer et d'effectuer des mesures quantitatives des propriétés physiques des sédiments dans un espace à trois dimensions. Elle a été appliquée sur des carottes de sédiments non-perturbées, prélevées dans le cadre de la dernière expérience en encagements, et vise à caractériser la micro-structure du sédiment et de sa variabilité spatiale, notamment en identifiant les propriétés suivantes :

- la porosité totale
- la géométrie du réseau poral : morphologie des pores et indice de connectivité
- la tortuosité,
- la teneur en eau dans les différentes directions de l'espace
- la granulométrie de la phase solide,
- l'épaisseur des sédiments superficiels influencée par le biofilm phototrophe

Le travail de traitement des données a été initié avec les travaux de Dejollat (2014) et se poursuivent actuellement. Il est d'ores et déjà possible de déterminer l'épaisseur de

biofilm à la surface des sédiments à travers le traitement des images de CT-scan à l'aide du logiciel imageJ [Figure 49].

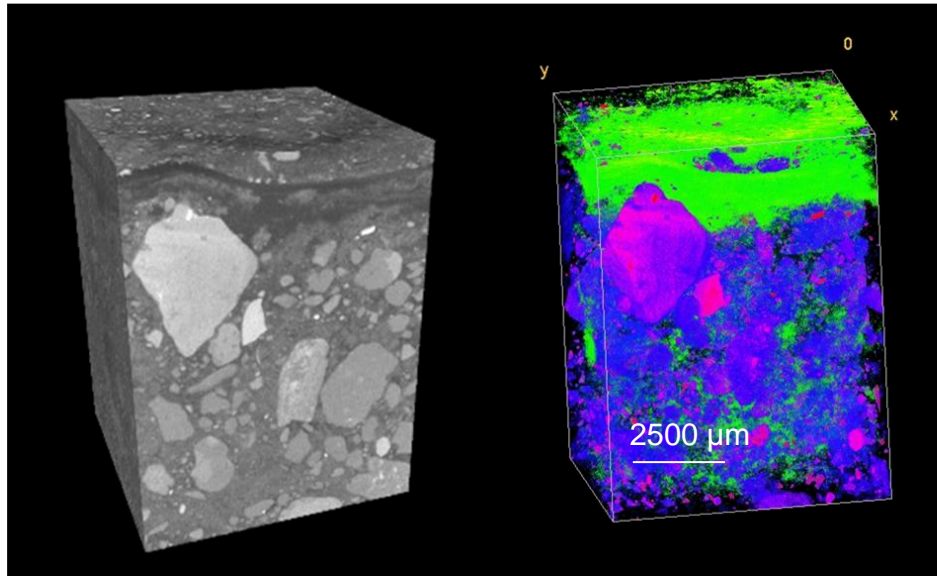


Figure 49 : Exemple de traitement d'image CT scan avec le logiciel ImageJ, l'épaisseur du biofilm apparaît clairement après traitement (en vert).

II.1.2 Réaliser des expérimentations complémentaires

L'objectif des expérimentations complémentaires présentées ici est de confirmer la faisabilité et l'efficacité des solutions de « décolmatage biologique » testées avant d'envisager leur mise en œuvre à plus grande échelle.

Avec des bassins aux caractéristiques contrastées

La dernière expérience a mis en évidence l'importance des conditions initiales (perméabilité et développement biologique) sur l'effet des macro-organismes, en particulier du gastéropode *Viviparus viviparus*, sur le biofilm benthique d'une part, et sur la perméabilité d'autre part. Aussi, il semble intéressant de reproduire les essais d'encagement *in situ* dans d'autres bassins présentant des niveaux de colonisation et de colmatage différents, ceci afin de généraliser les résultats observés.

Cette expérience est prévue pour la période août-septembre 2014 et consistera à utiliser le traitement ayant donné les résultats les plus significatifs sur la perméabilité, à savoir *Viviparus viviparus* en travaillant sur plusieurs bassins du site d'étude. Ces essais pourront également être couplés avec des tests en laboratoire (colonnes, microcosmes)

afin d'expérimenter un plus grand nombre de conditions initiales, et/ou d'évaluer les effets d'un décolmatage biologique sur la qualité physico-chimique et biologique des eaux infiltrées. En effet, dans le cadre de bassins d'infiltration utilisés pour la recharge d'aquifères ressources pour l'alimentation en eau potable, il est crucial de déterminer en quoi des pratiques d'ingénierie écologique peuvent affecter les transferts de contaminants.

En augmentant la durée des essais

Les traitements *Vallisneria spiralis* et ombrage semblent pouvoir inhiber l'activité photosynthétique de la composante phototrophe du biofilm benthique. Or, nos mesures n'ont montré aucun effet associé sur la biomasse phototrophe, résultat que nous avons attribué à la durée trop courte de l'essai. Aussi ; il semble important de réaliser des essais pour vérifier sur le long terme les effets des traitements (i) sur la structure du biofilm et (ii) sur la perméabilité.

Avec la combinaison de plusieurs traitements

Les résultats obtenus lors de la dernière expérience sur le terrain ont fait ressortir deux traitements pouvant potentiellement limiter le colmatage des bassins d'infiltration : le macrophyte *Vallisneria spiralis* et le gastéropode *Viviparus viviparus*. Ces deux organismes avaient en revanche des effets différents : le macrophyte a tendance à inhiber l'activité photosynthétique du biofilm phototrophe, tandis que le gastéropode réduit sa biomasse algale par broutage. Ces deux traitements peuvent donc potentiellement se compléter et il serait donc intéressant de les coupler (i) soit pour mettre en évidence un effet encore plus intéressant sur la perméabilité des sédiments, (ii) soit des effets antagonistes qui amèneraient à conserver les traitements de manière isolés.

En vérifiant certains résultats en laboratoire

Concernant les effets des macrophytes sur le biofilm benthique, des dosages des substances allélopathiques secrétées par les plantes pourraient être réalisés à l'échelle du laboratoire et venir préciser nos résultats.

II.2 Les perspectives à long terme

II.2.1 Suivre la colonisation d'un bassin depuis un état initial « après raclage »

Nos résultats ont mis en évidence le rôle clé de la composante phototrophe des biofilms sur les propriétés physiques du milieu support, et notamment un effet seuil de la biomasse algale. Toutefois, ces résultats ont été obtenus suite à des prélèvements ponctuels dans des bassins aux caractéristiques contrastées. Il semble important d'étudier la dynamique de la relation « biofilm-colmatage » au cours du temps, et pour cela, de suivre conjointement l'évolution des biofilms et des propriétés hydrodynamiques de la couche superficielle des sédiments (0-1 cm). Cela pourrait être réalisé dès la mise en service d'un bassin à partir d'un sable « neuf » mis en place après raclage d'un bassin par exemple.

La durée de ce suivi serait définie en fonction (i) de l'apparition d'une réduction significative des performances hydrauliques ; (ii) de la volonté d'inclure différentes saisons. Ces essais constitueraient un test de validation expérimentale des effets de la teneur en chlorophylle-*a* sur la structure et la conductivité hydraulique des sédiments des bassins. De plus, ils permettraient de caractériser les modifications de perméabilité et de la biomasse algale à des échelles de temps courtes, données nécessaires afin de mieux appréhender l'influence des facteurs du milieu (température, luminosité, gestion des bassins) sur le fonctionnement des bassins.

Suivi complémentaire de l'influence des cycles de sollicitation

Les bassins sont soumis à des phases d'inondation et des phases d'exondation suivies, ou non, d'une période d'assèchement d'intensité variable. La fréquence et la durée de ces conditions hydrologiques jouent un rôle dans la dynamique de colonisation, mais également dans les processus de colmatage (Schuh, 1990; Dodds *et al.*, 1996a; Loizeau, 2013). Pour mieux comprendre ces processus, des prélèvements de biofilm pourraient être effectués avant et après un assec. Cette étude pourrait être couplée avec le suivi depuis un état initial présenté ci-dessus.

II.2.2 Examiner la diversité des communautés microbiennes

L'analyse de la diversité des différentes communautés composant le biofilm pourrait apporter des informations supplémentaires sur les relations entre les communautés qui se développent naturellement dans les bassins et les propriétés du milieu physique, et finalement sur le fonctionnement de l'interface sédimentaire.

Concernant par exemple les communautés phototrophes des biofilms benthiques, elles sont généralement très différentes de celles présentes au sein de la colonne d'eau du fait de l'accumulation d'organismes à l'interface eau/sédiment et des perturbations importantes que subissent les bassins d'infiltration (successions de périodes d'inondation et d'exondation qui ont un impact important sur la dynamique des communautés et le développement du biofilm). Aussi, un milieu perturbé devrait présenter une forte variabilité temporelle. Etant donné les enjeux relatifs à la qualité des eaux dans des bassins ayant pour vocation la recharge des nappes souterraines, il est important de connaître la composition des communautés microbiennes, en particulier vis-à-vis des de certaines bactéries et cyanobactéries qui peuvent être toxiques.

Dans le cadre de ce travail, une première caractérisation qualitative a été effectuée par une analyse pigmentaire par HPLC (Voir Annexe) qui a permis d'identifier les principaux groupes d'algues rencontrés dans les bassins d'infiltration. Cette analyse doit toutefois être complétée par une identification plus fine des différentes espèces, et notamment des cyanobactéries.

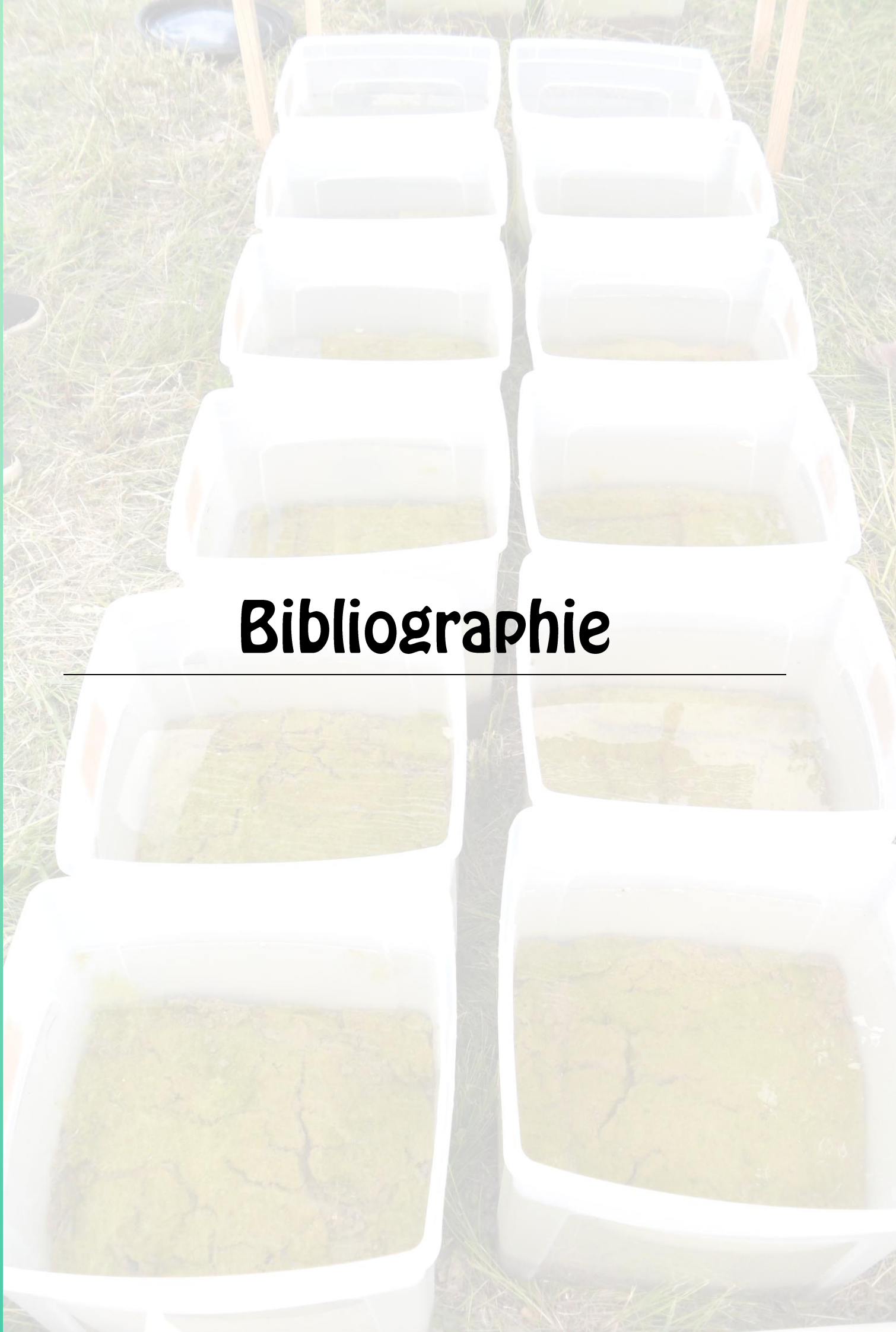
II.2.3 Déterminer la qualité des eaux infiltrées avec et sans traitement

Pour faire suite aux paragraphes précédents, il est important de vérifier les effets des traitements biologiques sur la qualité des eaux infiltrées, du fait des enjeux associés à cette ressource. Nos travaux ont mis en évidence le maintien des activités enzymatiques de dégradation de la matière organique au cours des expériences utilisant des traitements biologiques. De plus, l'utilisation de telles techniques permettant de réduire la densité du biofilm sans le supprimer permet de conserver ses propriétés épuratrices tout en maintenant l'infiltration, contrairement aux opérations de raclage et de

changement de substrat actuellement utilisées. Toutefois, il semble important de réaliser un suivi complémentaire de la qualité des eaux infiltrées en présence des macro-organismes, soit directement sur le terrain (avec des mini piézomètres permettant des collectes d'eau interstitielle dans les bassins), soit à l'échelle du laboratoire (en colonnes de sédiment).

Pour cela, il est possible de suivre des marqueurs physico-chimiques et biologiques globaux parmi lesquels on retrouve (i) des paramètres physicochimiques tels que la température de l'eau, l'oxygène dissous, le pH, la conductivité électrique, la quantité de matière en suspension, le carbone organique dissous et les teneurs en ammonium, nitrates et phosphates, et (ii) des paramètres bactériologiques tels que les hétérotrophes totaux, les indicateurs de contamination fécales (coliformes et entérocoques) et les bactéries sulfato-réductrices indicatrices de conditions anaérobies dans les sédiments. Ces recherches sur les contaminants biologiques pourraient aller plus loin *via* des collaborations (équipe de Benoit Cournoyer, UMR 5557, Lyon 1) par la recherche de souches bactériennes opportunistes de l'environnement telles que *Pseudomonas aeruginosa*.

Bibliographie





- Ahimou, F., Semmens, M. J., Haugstad, G. and Novak, P. J., 2007. "Effect of protein, polysaccharide, and oxygen concentration profiles on biofilm cohesiveness." *Applied and Environmental Microbiology* 73(9): 2905-2910.
- Anderson, J. U., 1963. "An improved pretreatment for mineralogical analysis of samples containing organic matter." *New Mexico State University Agricultural Experiment Station*. 172: 380-388.
- Angulo-Jaramillo, R., Vandervaere, J. P., Roulier, S., Thony, J. L., Gaudet, J. P. and Vauclin, M., 2000. "Field measurement of soil surface hydraulic properties by disc and ring infiltrometers : A review and recent developments." *Soil and Tillage Research* 55: 1-29.
- Angulo, R., 2011. Rapport final des essais Beerkan sur les bassins d'infiltration de Crépieux-Charmy. LEHNA-IPE. 65 pages.
- Arakelova, E. S., 2010. "Periphyton grazing and phosphorus excretion by mollusks." *Russian Journal of Ecology* 41(4): 327-332.
- Arye, G., Tarchitzky, J. and Chen, Y., 2011. "Treated wastewater effects on water repellency and soil hydraulic properties of soil aquifer treatment infiltration basins." *Journal of Hydrology* 397(1-2): 136-145.
- Azzout, Y., Cres, F. N., Barraud, S. and Alfakih, E., 1994. Techniques alternatives en assainissement pluvial., Paris, Lavoisier - Techniques et Documents. 372 pages.



- Baclight, 1995. "Molecular Probes Live/Dead *BacLight* bacteria viability kit Molecular Probes Inc."
- Bacteria-world. (2014). "Biofilms" Consulté le 28 mai 2014, Url: < <http://www.bacteria-world.com/biofilms.html> >.
- Badin, A. L., Bedell, J. P. and Delolme, C., 2009a. "Effect of water content on aggregation and contaminant leaching : the study of an urban technosol." *Journal Soils Sediments* 9: 653-663.
- Badin, A. L., Faure, P., Bedell, J. P. and Delolme, C., 2008. "Distribution of organic pollutants and natural organic matter in urban storm water sediments as a function of grain size." *Science of the Total Environment* 403(1-3): 178-187.
- Badin, A. L., Méderel, G., Béchet, B., Borschneck, D. and Delolme, C., 2009b. "Study of the aggregation of the surface layer of Technosols from stormwater infiltration basins using grain size analyses with laser diffractometry." *Geoderma* 153(1-2): 163-171.
- Badin, A. L., Monier, A., Volatier, L., Geremia, R. A., Delolme, C. and Bedell, J. P., 2011. "Structural Stability, Microbial Biomass and Community Composition of Sediments Affected by the Hydric Dynamics of an Urban Stormwater Infiltration Basin: Dynamics of Physical and Microbial Characteristics of Stormwater Sediment." *Microbial Ecology* 61(4): 885-897.

- Bali, M., Gueddari, M. and Boukchina, R., 2010. "Treatment of secondary wastewater effluents by infiltration percolation." *Desalination* 258(1-3): 1-4.
- Bardin, J. P., Barraud, S., Alfakih, E. and Dechesne, M., 2002. Performance assessment of stormwater infiltration strategies: A multi-indicator approach. Ninth International Conference - Global Solution for Urban Drainage, Portland, Oregon, United States.
- Barko, J. W. and James, W. F., 1997. Effect of submersed aquatic macrophytes on nutrients dynamics, sedimentation and resuspension. IN The structuring role of submerged macrophytes in lakes. E. Jeppensen, M. Sondergaard, M. Sondergaard and K. Christoffersen, Ecological studies vol. 131. New York : Springer pp. 197-214.
- Barraud, S., Perrodin, Y., S., L., Delolme, C., Bedell, J. P., Winiarsky, T., Gibert, J., Mermillod-blondin, F., Malard, F., Gourdon, R., Desjardins, V., BreLOT, E. and Bacot, L., 2006. Recommandations pour la faisabilité, la conception et la gestion des ouvrages d'infiltration des eaux pluviales en milieu urbain. 62 pages pages.
- Battin, T. J., 1997. "Assessment of fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total esterase activity in natural stream sediment biofilms." *Science of the Total Environment* 198(1): 51-60.
- Battin, T. J., Kaplan, L. A., Newbold, J. D. and Hansen, C. M. E., 2003. "Contributions of microbial biofilms to ecosystem processes in stream mesocosms." *Nature* 426(6965): 439-442.
- Battin, T. J. and Sengschmitt, D., 1999. "Linking sediment biofilms, hydrodynamics, and river bed clogging: Evidence from a large river." *Microbial Ecology* 37(3): 185-196.
- Baumann, T., Müller, S. and Niessner, R., 2002. "Migration of dissolved heavy metal compounds and PCP in the presence of colloids through a heterogeneous calcareous gravel and a homogeneous quartz sand-pilot scale experiments." *Water Research* 36(5): 1213-1223.
- Baver, L. D., 1963. Soil Physics. New York, John Wiley & Sons, 3rd edition. 398 pages.
- Baveye, P., Vandevivere, P., Hoyle, B. L., DeLeo, P. C. and de Lozada, D. S., 1998. "Environmental impact and mechanisms of the biological clogging of saturated soils and aquifer materials." *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 28(2): 123-191. 10.1080/10643389891254197.
- Berger, J. and Schagerl, M., 2004. "Allelopathic activity of Characeae." *Biologia - Section Botany* 59(1): 9-15.
- Berges, J. A., Charlebois, D. O., Mauzerall, D. C. and Falkowski, P. G., 1996. "Differential effects of nitrogen limitation on photosynthetic efficiency of photosystems I and II in microalgae." *Plant Physiology* 110(2): 689-696.
- Biggs, B. J. F., Goring, D. G. and Nikora, V. I., 1998. "Subsidy and stress responses of stream periphyton to gradients in water velocity as a function of community growth form." *Journal of Phycology* 34(4): 598-607.
- Biggs, B. J. F., Nikora, V. I. and Snelder, T. H., 2005. "Linking scales of flow variability to lotic ecosystem structure and function." *River Research and Applications* 21(2-3): 283-298.
- Bio-Pro. (2011). "Underground career – bacteria as the builders of sediments" Consulté le 28 mai 2014, Url: < <http://www.bio-pro.de/magazin/thema/07871/index.html?lang=en&artikelid=/artikel/06198/index.html> >.

- Blankenship, R. E., 2014. Molecular Mechanisms of Photosynthesis, 2nd Edition. Wiley-Blackwell, 312 pages.
- Bloesch, J., Bossard, P., Bührer, H., Bürgi, H. R. and Uehlinger, U., 1988. "Can results from limnocorral experiments be transferred to in situ conditions? - Biomanipulation in Limnocorrals VI." *Hydrobiologia* 159(3): 297-308.
- Bormann, H. and Klaassen, K., 2008. "Seasonal and land use dependent variability of soil hydraulic and soil hydrological properties of two Northern German soils." *Geoderma* 145: 295-302. 10.1016/j.geoderma.2008.03.017.
- Bornette, G., Piegay, H., Citterio, A., Amoros, C. and Godreau, V., 2001. "Aquatic plant diversity in four river floodplains: A comparison at two hierarchical levels." *Biodiversity and Conservation* 10(10): 1683-1701.
- Bostelmann, R. (2000). "Biototyp - Bild" Consulté le 8 juillet, 2014, Url: < http://www2.lubw.baden-wuerttemberg.de/public/abt2/dokablage/diaarchiv/1/R10_002712.jpg >.
- Bourassa, N. and Cattaneo, A., 1998. "Control of periphyton biomass in Laurentian streams (Quebec)." *Journal of the North American Benthological Society* 17(4): 420-429.
- Bouwer, H., 2002. "Artificial recharge of groundwater: Hydrogeology and engineering." *Hydrogeology Journal* 10(1): 121-142.
- Braud, I., De Condappa, D., Soria, J. M., Haverkamp, R., Angulo-Jaramillo, R., Galle, S. and Vauclin, M., 2005. "Use of scaled forms of the infiltration equation for the estimation of unsaturated soil hydraulic properties (the Beerkan method)." *European Journal of Soil Science* 56(3): 361-374.
- Briandet, R., Fechner, L., Naïtali, M. and Dreanno, C., 2012. Biofilms, quand les microbes s'organisent. Les carnets de la science - Quae, Versailles. 184 pages.
- Brissaud, F., Lefevre, F., Joseph, C., Alamy, Z. and Landreau, A., 1989. Waste water, infiltration-percolation for aquifer recharge or water re-use. Groundwater management - quality and quantity, Benidorm, Spain.
- Brix, H., 1994. "Functions of macrophytes in constructed wetlands." *Water Science and Technology* 29(4): 71-78.
- Brix, H., 1997. "Do macrophytes play a role in constructed treatment wetlands." *Water Science and Technology* 35(5): 11-17.
- Brooks, R. H. and Corey, C. T., 1964. "Hydraulic properties of porous media." Colorado State University, Fort Collins - Hydrol. paper. vol 3: 27 pages.
- Bryant, D. A. and Frigaard, N. U., 2006. "Prokaryotic photosynthesis and phototrophy illuminated." *Trends in Microbiology* 14(11): 488-496.
- Buchaca, T. and Catalan, J., 2008. "On the contribution of phytoplankton and benthic biofilms to the sediment record of marker pigments in high mountain lakes." *Journal of Paleolimnology* 40(1): 369-383.
- Burdine, N. T., 1953. "Relative permeability calculations from pore size distribution data." *Transactions of the American Institute of Mining and Metallurgical Engineers* 198: 71-77.



- Camacho, A. and De Wit, R., 2003. "Effect of nitrogen and phosphorus additions on a benthic microbial mat from a hypersaline lake." *Aquatic Microbial Ecology* 32: 261-273.
- CAMPBELL, N. and REECE, J., 2007. Biologie, 7ème édition. San Francisco, PEARSON Education. pages.
- Cannavo, P., Vidal-Beaudet, L., Béchet, B., Lassabatere, L. and Charpentier, S., 2010. "Spatial distribution of sediments and transfer properties in soils in a stormwater infiltration basin." *Journal of Soils and Sediments* 10(8): 1499-1509.
- Caquet, T., Lagadic, L., Jonot, O., Baturu, W., Kilanda, M., Simon, P., Le Bras, S., Echaubard, M. and Ramade, F., 1996. "Outdoor experimental ponds (mesocosms) designed for long-term ecotoxicological studies in aquatic environment." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 34(2): 125-133.
- Carignan, R. and Kalff, J., 1982. "Phosphorus release by submerged macrophytes: Significance to epiphytes and phytoplankton." *Limnol. Oceanogr.* 27: 341-370.
- Carpenter, S. R. and Lodge, D. M., 1986. "Effects of submersed macrophytes on ecosystem processes." *Aquatic Botany* 26: 341-370.
- CathMatters. (2014). "Catheter management education" Consulté le 24 juin, 2014, Url: < <http://www.cathmatters.com/education/education-cvad-care.jsp> >.
- CAUE27. (2014). "Conseil d'Architecture, d'Urbanisme et d'Environnement de l'Eure" Consulté le 24 juin, 2014, Url: < <http://www.caue27.fr/documentation/phototheque/> >.
- Causse, B., 2009. Mécanismes d'adsorption des métaux lourds par les exopolysaccharides bactériens: Le système Xanthane-Cuivre comme modèle d'étude. PhD, Université Joseph-Fourier-Grenoble I.
- Causse, B., Spadini, L., Martins, J. M. F., Lenoir, T., Heyraud, A. and Delolme, C., 2013. "Xanthan exopolysaccharide: Acid-base reactivity related to structure and conformation. A model for understanding the reactivity of degraded and colloidal soil organic matter." *Chemical Geology* 359: 150-158.
- Certu, 1998. Techniques alternatives aux réseaux d'assainissement pluvial. 156 pages.
- Chabaud, S., 2007. Influence du biofilm sur les performances des systèmes de traitement par infiltration dans le sol : Application à l'assainissement non-collectif Sciences pour l'ingénieur, Université de Nantes.
- Chabaud, S., Andres, Y., Lakel, A. and Le Cloirec, P., 2006. "Comparisons of Packing Materials in On-Site Wastewater Treatment System " *Water Practice & Technology* 1(3): © IWA Publishing. 10.2166/WPT.2006046
- Chapelle, F. H., 1993. Ground-water microbiology geochemistry. Wiley J. and Sons. New York, Wiley Press. 424 pages.
- Chapin, F. S., Schulze, E.-D. and Mooney, H. A., 1992. "Biodiversity and ecosystem processes." *Trends Ecol. Evol.* 7: 107-108.
- Characklis, W. G. and Marshall, K. C., 1990. Biofilms. Wiley & Sons. pages.
- Chen, C. J., Han, Z. Y., Zhu, Y. M. and Wu, W. X., 2009. "Periphyton and its application in water purification." *Chinese Journal of Applied Ecology* 20(11): 2820-2826.

- Chocat, B., 1997. Encyclopédie de l'hydrologie urbaine et de l'assainissement. Tec & Doc. Paris, Lavoisier. 357pages.
- Chocat, B., 2013. Ingénierie écologique appliquée aux milieux aquatiques, Pourquoi ? Comment ? Rapport ASTEE,ONEMA. 357 pages.
- Chróst, R. J., 1991. Environmental Control of the Synthesis and Activity of Aquatic Microbial Ectoenzymes. IN Microbial Enzymes in Aquatic Environments. R. Chróst, Springer New York pp. 29-59. 10.1007/978-1-4612-3090-8_3.
- Chróst, R. J. and Overbeck, J., 1987. "Kinetics of Alkaline Phosphatase Activity and Phosphorus Availability for Phytoplankton and Bacterioplankton in Lake Plüßsee (North German Eutrophic Lake)." *Microbial Ecology* 13: 229-248.
- Cibic, T., Blasutto, O., Hancke, K. and Johnsen, G., 2007. "Microphytobenthic species composition, pigment concentration, and primary production in sublittoral sediments of the Trondheimsfjord (Norway)." *Journal of Phycology* 43(6): 1126-1137.
- Cole, J. J., 1982. "Interactions between bacteria and algae in aquatic ecosystems." *Annual review of ecology and systematics*. Volume 13: 291-314.
- Conférence de Dublin, 1992. Conférence Internationale sur l'Eau et l'Environnement, Dublin - 26 janvier 1992.
- Conseil général des Landes. (2009). "Surveillance des cours d'eau Landais" Consulté le 25 juin, 2014, Url: < http://services.landés.org/ressources_eau09/fr_vivre_eau_cours_reseau.htm >.
- Corolla, J.-P. and Kupper, M. (2014). "DORIS - Vallisneria spiralis L." Consulté le 8 juillet, 2014, Url: < http://doris.ffessm.fr/fiche2.asp?fiche_numero=2815 >.
- Corolla, J.-P. and Rochefort, G. (2012). "DORIS - Characeae (famille) S.F. Gray" Consulté le 8 juillet, 2014, Url: < http://doris.ffessm.fr/fiche2.asp?fiche_numero=2948 >.
- Corolla, J.-P., Ziemski, F. and Kupfer, M. (2014). "DORIS - Ceratophyllum demersum L." Consulté le 8 juillet, 2014, Url: < http://doris.ffessm.fr/fiche2.asp?fiche_numero=238 >.
- Costerton, J. W., 1995. "Overview of microbial biofilms." *Journal of Industrial Microbiology* 15(3): 137-140.
- Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R. and Lappin-Scott, H. M., 1995. "Microbial biofilms." *Annual Review of Microbiology* 49: 711-745.
- Cummins, K. W. and Klug, M. J., 1979. "Feeding ecology of stream invertebrates." *Annual review of ecology and systematics*. Volume 13 10: 147-172.
- Cunningham, A. B., Characklis, W. G., Abedeen, F. and Crawford, D., 1991. "Influence of biofilm accumulation on porous media hydrodynamics." *Environmental Science and Technology* 25(7): 1305-1311.



- da Silva, A. P. and Kay, B. D., 1997. "Estimating the Least Limiting Water Range of Soils from Properties and Management." *Soil Sci. Soc. Am. J.* 61(3): 877-883. 10.2136/sssaj1997.03615995006100030023x.
- Davies, D., 2003. "Understanding biofilm resistance to antibacterial agents." *Nat Rev Drug Discov* 2: 114-122. 10.1038/nrd1008.

- Davis, R. B., 1974. "Tubificids alter profiles of redox potential and pH in profundal lake sediment." *Limnol. Oceanogr* 19(2): 342-345.
- de Marsily, G., 1986. Quantitative hydrogeology: groundwater hydrology for engineers. Academic Press. 440 pages.
- Dechesne, M., Barraud, S. and Bardin, J. P., 2004. "Indicators for hydraulic and pollution retention assessment of stormwater infiltration basins." *Journal of Environmental Management* 71(4): 371-380.
- Decho, A. W. and Lopez, G. R., 1993. "Exopolymer microenvironments of microbial flora: Multiple and interactive effects on trophic relationships." *Limnology and Oceanography* 38(8): 1633-1645.
- Dejollat, Y., 2014. Etude des caractéristiques physiques d'une couche sédimentaire d'un bassin d'infiltration - Approche par Tomographie. Travail de Fin d'Etude - ENTPE/LEHNA, 96 pages.
- Delolme, C., Spadini, L., Muris, M., Causse, B. and Gaudet, J.-P., 2011. "Comparison of the acid-base reactivity of free-living *Pseudomonas putida* cells and biofilm." *Chemical Geology* 289(1): 48-54.
- DeNicola, D. M., 1996. Periphyton responses to temperature at different ecological levels. IN Algal Ecology. J. R. Stevenson, M. L. Bothwell and R. L. Lowe. London, Academic Press pp. 149-181.
- Dexter, A. R., Hein, D. and Hewitt, J. S., 1982. "Macro-structure of the surface layer of a self-mulching clay in relation to cereal stubble management." *Soil and Tillage Research* 2(3): 251-264.
- Dinet, A., Desbruyères, D. and Khripounoff, A., 1985. Abondance des peuplements macro et méiobenthiques : Répartition & stratégie d'échantillonnage. IN Peuplement profond du golfe de Gascogne. L. Laubier and C. Moniot, Ifremer, pp. 121-142.
- Dodds, W. K., Hutson, R. E., Eiche, A. C., Evans, M. A., Gudder, D. A., Fritz, K. M. and Gray, L., 1996a. "The relationship of floods, drying, flow and light to primary production and producer biomass in a prairie stream." *Hydrobiologia* 333(3): 151-159.
- Dodds, W. K., Randel, C. A. and Edler, C. C., 1996b. "Microcosms for aquifer research: application to colonization of various sized particles by ground-water microorganisms." *Ground Water* 34(4): 756-759.
- Donlan, R. M. and Costerton, J. W., 2002. "Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms." *Clin Microbiol Rev.* 15(2): 167-193.
- Duchaufour, P., 1995. Abrégé de Pédologie - sol, végétation, environnement. 4ème édition, Masson. 324 pages.
- Durham, B., Rinck-Pfeiffer, S. and Guendert, D., 2002. "Integrated water resource management - Through reuse and aquifer recharge." *Desalination* 152: 333-338.



El-Mufleh, A., Béchet, B., Ruban, V., Legret, M., Clozel, B., Barraud, S., Gonzalez-Merchan, C., Bedell, J.-P. and Delolme, C., 2014. "Review on physical and chemical characterizations of contaminated sediments from urban stormwater infiltration

- basins within the framework of the French observatory for urban hydrology (SOERE URBIS)." *Environmental Science and Pollution Research* 21(8): 5329-5346.
- Elaphos, A., 2014. Essai d'infiltration à charge variable : établissement d'une méthodologie d'exploitation des données. ENTPE. Rapport de TFE,. 80 pages.
- Erhard, D., 2006. Allelopathy in aquatic environments. IN Allelopathy : A physiological process with ecological implications. M. J. Reigosa, N. Pedrol and L. Gonzalez. Netherlands, Springer pp. 433-450.
- Erhard, D. and Gross, E. M., 2006. "Allelopathic activity of *Elodea canadensis* and *Elodea nuttallii* against epiphytes and phytoplankton." *Aquatic Botany* 85(3): 203-211. 10.1016/j.aquabot.2006.04.002.
- Eriksson, E., Baun, A., Scholes, L., Ledin, A., Ahlman, S., Revitt, M., Noutsopoulos, C. and Mikkelsen, P. S., 2007. "Selected stormwater priority pollutants - a European perspective." *Science of the Total Environment* 383(1-3): 41-51.
- Espeland, E. M. and Wetzel, R. G., 2001. "Effects of photosynthesis on bacterial phosphatase production in biofilms." *Microbial Ecology* 42(3): 328-337.

F

- Fein, J. B., Martin, A. M. and Wightman, P. G., 2001. "Metal adsorption onto bacterial surfaces: Development of a predictive approach." *Geochimica et Cosmochimica Acta* 65(23): 4267-4273.
- Feminella, J. W. and Hawkins, C. P., 1995. "Interactions between stream herbivores and periphyton: A quantitative analysis of past experiments." *Journal of the North American Benthological Society* 14(4): 465-509.
- Février, L., 2001. Transfert d'un mélange Zn-Cu-Pb dans un dépôt fluvio-glaciaire carbonaté - approche en colonnes de laboratoire. Chimie de Lyon (Chimie, Procédés, Environnement), Université Lyon 1.
- Filloux, A. and Vallet, I., 2003. "Biofilm: Positioning and organisation of bacterial communities." *médecine sciences* 19(1): 77-83.
- Findlay, R. H. and Watling, L., 1998. "Seasonal variation in the structure of a marine benthic microbial community." *Microbial Ecology* 36(1): 23-30.
- Flemming, H. C., 2011. "The perfect slime." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 86(2): 251-259.
- Flemming, H. C. and Wingender, J., 2010. "The biofilm matrix." *Nature Reviews Microbiology* 8(9): 623-633.
- Flemming, H. C., Wingender, J., Mayer, C., Körstgens, V. and Borchard, W., 2000. Cohesiveness in biofilm matrix polymers. IN Community Structure and Co-Operation in Biofilms. D. G. Allison, P. Gilbert, M. Wilson and H. M. Lappin-Scott. United Kingdom, Cambridge University Press pp. 87-105.
- Fodor, N., Sandor, N., Orfanus, T., Lichner, L. and Rajkai, K., 2011. "Evaluation method dependency of measured saturated hydraulic conductivity." *Geoderma* 165: 60-68.

Freiberg, R., Nomm, M., Tonno, I., Alliksaar, T., Noges, T. and Kisand, A., 2011. "Dynamics of phytoplankton pigments in water and surface sediments of a large shallow lake." *Estonian Journal of Earth Sciences* 60(2): 91-101.



Geffard, O., Ferrari, B., Chaumot, A. and Montuelle, B., 2010. "Les expérimentations *in situ* : Principes & Perspectives." *Sciences Eaux & Territoires* 1: 20-25.

Gerino, M., Stora, G., François-Carcaillet, F., Gilbert, F., Poggiale, J. C., Mermillod-Blondin, F., Desrosiers, G. and Vervier, P., 2003. "Macro- invertebrate functional groups in freshwater and marine sediments: A common mechanistic classification." *Vie et Milieu* 53(4): 221-232.

Gette-Bouvarot, M., Mermillod-Blondin, F., Angulo-Jaramillo, R., Delolme, C., Lemoine, D., Lassabatere, L., Loizeau, S. and Volatier, L., 2014a. "Coupling hydraulic and biological measurements highlights the key influence of algal biofilm on infiltration basin performance." *Ecohydrology* 7(3): 950-964.

Gette-Bouvarot, M., Mermillod-Blondin, F., Lemoine, D., Delolme, C., Etienne, L. and Volatier, L., 2014b. "The potential of allelopathic macrophytes to control benthic biofilm growth – a mesocosm approach." in prep.

Gilbert, F., 2003. Bioturbation et biogéochimie des sédiments marins côtiers : cycle de l'azote et devenir de la matière organique. Habilitation à Diriger les Recherches - Centre d'Océanologie de Marseille - Université de la Méditerranée. 103 pages.

Göbel, P., Dierkes, C. and Coldewey, W. G., 2007. "Storm water runoff concentration matrix for urban areas." *Journal of Contaminant Hydrology* 91(1-2): 26-42.

Goldsborough, L. G. and Robinson, G. G. C., 1996. Pattern in Wetlands. IN Algal Ecology. J. R. Stevenson, M. L. Bothwell and R. L. Lowe. London, Academic Press pp. 77-117.

Gopal, B. and Goel, U., 1993. "Competition and allelopathy in aquatic plant communities." *The Botanical Review* 59(3): 155-210. 10.1007/bf02856599.

Gorbushina, A. A., 2007. "Life on the rocks." *Environmental Microbiology* 9(7): 1613-1631.

Goto, N., Mitamura, O. and Terai, H., 2001. "Biodegradation of photosynthetically produced extracellular organic carbon from intertidal benthic algae." *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 257(1): 73-86.

Gougoussis-Delpy, C., 1982. assainissement individuel et aptitude des sols à l'élimination et à l'épuration des effluents domestiques. Rapport BRGM - 82 SGN 327 EAU. pages.

Graham, A. A., 1990. "Siltation of stone-surface periphyton in rivers by clay-sized particles from low concentrations in suspension." *Hydrobiologia* 199(2): 107-115. 10.1007/bf00005603.

Grand Lyon, 2008. Aménagements et Eaux pluviales sur le territoire du Grand Lyon. 52 pages.

Greskowiak, J., Prommer, H., Massmann, G., Johnston, C. D., Nützmann, G. and Pekdeger, A., 2005. "The impact of variably saturated conditions on hydrogeochemical changes during artificial recharge of groundwater." *Applied Geochemistry* 20(7): 1409-1426.

- Grolimund, D. and Borkovec, M., 1999. "Long-term release kinetics of colloidal particles from natural porous media." *Environmental science & technology* 33(22): 4054-4060.
- Grolimund, D. and Borkovec, M., 2001. "Release and transport of colloidal particles in natural porous media: 1. Modeling." *Water Resources Research* 37(3): 559-570.
- Gross, E. M., 2003. "Allelopathy of aquatic autotrophs." *Critical Reviews in Plant Sciences* 22(3-4): 313-339.
- Gross, E. M., Erhard, D. and Iványi, E., 2003. "Allelopathic activity of *Ceratophyllum demersum* L. and *Najas marina* ssp. *intermedia* (Wolfgang) Casper." *Hydrobiologia* 506-509: 583-589.
- Gross, E. M., Hilt, S., Lombardo, P. and Mulderij, G., 2007. "Searching for allelopathic effects of submerged macrophytes on phytoplankton - State of the art and open questions." *Hydrobiologia* 584(1): 77-88. 10.1007/s10750-007-0591-z.
- Gross, E. M., Meyer, H. and Schilling, G., 1996. "Release and ecological impact of algicidal hydrolysable polyphenols in *Myriophyllum spicatum*." *Phytochemistry* 41(1): 133-138.



- Haack, T. and McFeters, G., 1982. "Nutritional relationships among microorganisms in an epilithic biofilm community." *Microbial Ecology* 8(2): 115-126. 10.1007/bf02010445.
- Haglund, A. L. and Hillebrand, H., 2005. "The effect of grazing and nutrient supply on periphyton associated bacteria." *FEMS Microbiology Ecology* 52(1): 31-41.
- Hajra, M., Reddi, L., Glasgow, L., Xiao, M. and Lee, I., 2002. "Effects of ionic strength on fine particle clogging of soil filters." *Journal of geotechnical and geoenvironmental engineering* 128(8): 631-639.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W. and Stoodley, P., 2004. "Bacterial biofilms: from the Natural environment to infectious diseases." *Nature Reviews Microbiology* 2. 10.1038/nrmicro821.
- Harmand, B., Rodier, E., Sardin, M. and Dodds, J., 1996. "Transport and capture of submicron particles in a natural sand: short column experiments and a linear model." *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 107: 233-244.
- Hatt, B. E., Fletcher, T. D. and Deletic, A., 2008. "Hydraulic and pollutant removal performance of fine media stormwater filtration systems." *Environmental Science and Technology* 42(7): 2535-2541.
- Haverkamp, R., Arrùe, J. L., Vandervaere, J. P., Braud, I., Boulet, G., Laurent, J. P., Taha, A., Ross, P. J. and Angulo-Jaramillo, R., 1996. Hydrological and thermal behavior of the vadose zone in the area of Barrax and Tomelloso (Spain) : Experimental study, analisis and Modeling. pages.
- Haverkamp, R., Debionne, S., Viallet, P., Angulo-Jaramillo, R. and De Condappa, D., 2006. Soil properties and moisture movement in the unsaturated zone. IN The handbook of groundwater engineers. J. W. Delleur, CRC pp. 6.1-6.59.
- Haverkamp, R., Reggiani, P., Ross, P. and Parlange, J.-Y., 2002. Soil water hysteresis prediction model based on theory and geometric scaling. *Environmental Mechanics* :

- Water, Mass and Energy Transfer in the Biosphere - Geophysical Monograph 129 - AGU.
- Heilweil, V. M. and Watt, D. E., 2011. "Trench infiltration for managed aquifer recharge to permeable bedrock." *Hydrological Processes* 25(1): 141-151.
- Herzig, J., Leclerc, D. and Goff, P. L., 1970. "Flow of suspensions through porous media – application to deep filtration." *Industrial & Engineering Chemistry* 62(5): 8-35.
- Hill, D. D. and Sleep, B. E., 2002. "Effects of biofilm growth on flow and transport through a glass parallel plate fracture." *Journal of Contaminant Hydrology* 56(3-4): 227-246.
- Hill, W., 1996. Effects of Light. IN *Algal Ecology*. J. R. Stevenson, M. L. Bothwell and R. L. Lowe. London, Academic Press pp. 121-148.
- Hillebrand, H., 2009. "Meta-analysis of grazer control of periphyton biomass across aquatic ecosystems." *Journal of Phycology* 45(4): 798-806.
- Hillel, D., 1998. *Environmental Soil Physics*. San Diego, Academic Press. 771 pages.
- Hilt, S., 2006. "Allelopathic inhibition of epiphytes by submerged macrophytes." *Aquatic Botany* 85(3): 252-256.
- Hilt, S. and Gross, E. M., 2008. "Can allelopathically active submerged macrophytes stabilise clear-water states in shallow lakes?" *Basic and Applied Ecology* 9(4): 422-432.
- Hockelmann, C. and Pusch, M., 2000. "The respiration and filter-feeding rates of the snail *Viviparus viviparus* (Gastropoda) under simulated stream conditions." *Archiv für Hydrobiologie* 149(4): 553-568.
- Hoffmann, A. and Gunkel, G., 2011. "Bank filtration in the sandy littoral zone of Lake Tegel (Berlin): Structure and dynamics of the biological active filter zone and clogging processes." *Limnologica - Ecology and Management of Inland Waters* 41(1): 10-19.
- Hou, Y., Liang, W., Zhang, L., Cheng, S., He, F. and Wu, Z., 2011. "Freshwater algae chemotaxonomy by high-performance liquid chromatographic (HPLC) analysis." *Frontiers of Environmental Science and Engineering in China* 5(1): 84-91.
- Hu, H. and Hong, Y., 2008. "Algal-bloom control by allelopathy of aquatic macrophytes - A review." *Frontiers of Environmental Science and Engineering in China* 2(4): 421-438.



- Ibaraki, Y. and Murakami, J., 2007. "Distributon of chlorophyll fluorescence parameter Fv/Fm within individual plants under various stress conditions." *Acta Hort. (ISHS)* 761: 255-260.
- Ibisch, R. B., Seydell, I. and Borchardt, D., 2009. "Influence of periphyton biomass dynamics on biological colmation processes in the hyporheic zone of a gravel bed river (River Lahn, Germany)." *Advances in Limnology* 61: 87-104.
- Iglesias, A., Plaxton, W. and Podestá, F., 1993. "The role of inorganic phosphate in the regulation of C4 photosynthesis." *Photosynthesis Research* 35(3): 205-211. 10.1007/bf00016551.
- Inderjit and Duke, S. O., 2003. "Ecophysiological aspects of allelopathy." *Planta* 217(4): 529-539. 10.1007/s00425-003-1054-z.

Island Creek. (2014). "Aquatic Worm *Limnodrilus hoffmeisteri*" Consulté, Url: < http://www.fcps.edu/islandcreekes/ecology/aquatic_worm.htm >.

Iturriaga, R. and Hoppe, H. G., 1977. "Observations of Heterotrophic Activity on Photoassimilated Organic Matter." *Marine Biology* 40: 101-108.



Jacques, D., Mohanty, B. P. and Feyen, J., 2002. "Comparison of alternative methods for deriving hydraulic properties and scaling factors from single-disc tension infiltrometer measurements." *Water Resources Research* 38(7): 1120.

Jakubik, B., 2009. "Food and feeding of *Viviparus Viviparus* (L.) (Gastropoda) in dam reservoir and river habitats." *Polish Journal of Ecology* 57(2): 321-330.

Jansson, M., Olsson, H. and Pettersson, K., 1988. Phosphatases; Origin, Characteristics and Function in Lakes. IN Phosphorus in Freshwater Ecosystems. G. Persson and M. Jansson, Springer Netherlands. 48 pp. 157-175. 10.1007/978-94-009-3109-1_10.

Jardin botanique de Montreal. (2014). "Structure du sol" Consulté le 19 Mai, 2014, Url: < <http://espacepouurlavie.ca/en/soil-structure> >.

Jasser, I., 1995. "The influence of macrophytes on a phytoplankton community in experimental conditions." *Hydrobiologia* 306(1): 21-32.

Jefferson, K. K., 2004. "What drives bacteria to produce a biofilm?" *FEMS Microbiol Lett.* 236(2): 163-173.

Jeffrey, S. W., Mantoura, R. F. C. and Wright, S. W., 2005. Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods. New edition. UNESCO. 667 pages.

Jensen, K., Sloth, N. P., Risgaard-Petersen, N., Rysgaard, S. and Revsbech, N. P., 1994. "Estimation of nitrification and denitrification from microprofiles of oxygen and nitrate in model sediment systems." *Applied and Environmental Microbiology* 60(6): 2094-2100.

Jenssen, P. D. and Siegrist, R. L., 1990. "Technology assessment of wastewater treatment by soil infiltration systems." *Water Science and Technology* 22(3-4): 83-92.

Jobidon, R., Thibault, J. R. and Fortin, J. A., 1989. "Phytotoxic effect of barley, oat and wheat mulches in eastern Québec forest plantations. 1. Effects on red raspberry (*Rubus idaeus* L.)." *Forest Ecology and Management*, 29: 277-294.

Jones, C. G., Lawton, J. H. and Shachak, M., 1994. "Organisms as ecosystem engineers." *Oikos* 69(3): 373-386.

Jorgensen, B. B., 1982. "Mineralization of organic matter in the sea bed - the role of sulphate reduction." *Nature* 296: 643-645. 10.1038/296643a0.

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

Jowett, I. G. and Biggs, B. J. F., 1997. "Flood and velocity effects on periphyton and silt accumulation in two New Zealand rivers." *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 31(3): 287-300.



- Kaiser, K., Eusterhues, K., Rumpel, C., Guggenberger, G. and Kögel-Knabner, I., 2002. "Stabilization of organic matter by soil minerals - Investigations of density and particle-size fractions from two acid forest soils." *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 165(4): 451-459.
- Katznelson, R., 1989. "Clogging of groundwater recharge basins by cyanobacterial mats." *FEMS Microbiology Ecology* 62(4): 231-242.
- Kay, B. D. and Angers, D. A., 2000. Soil structure. IN Handbook of Soil Science. M. E. Sumner. Boca Raton, CRC Press Taylor and Francis group.
- Kim, J.-W., Choi, H. and Pachepsky, Y. A., 2010. "Biofilm morphology as related to the porous media clogging." *Water Research* 44(4): 1193-1201.
- Klamath Water Quality. (2012). "periphyton" Consulté le 22 mai 2014, Url: < <http://www.klamathwaterquality.com/images/periphyton.html> >.
- Knowles, P., Dotro, G., Nivala, J. and García, J., 2011. "Clogging in subsurface-flow treatment wetlands: Occurrence and contributing factors." *Ecological Engineering* 37(2): 99-112.
- Körner, S. and Nicklisch, A., 2002. "Allelopathic growth inhibition of selected phytoplankton species by submerged macrophytes." *Journal of Phycology* 38(5): 862-871.
- Kosinsky, R. J., 1989. Artificial streams in ecotoxicological research. IN "Aquatic Ecotoxicology : Fundamental Concepts and Methodologies" - volume I. A. Boudou and F. Ribeyre, CRC Press pp. 297-316.
- Kostel, J. A., Wang, H., St. Amand, A. L. and Gray, K. A., 1999. "1. Use of a novel laboratory stream system to study the ecological impact of PCB exposure in a periphytic biolayer." *Water Research* 33(18): 3735-3748.
- Kouri, R. and de Graaf, S. (2013). "Le Réseau canadien de biosurveillance aquatique : une fenêtre sur la qualité de l'eau au Canada" Consulté le 3 juillet, 2014, Url: < http://www.ec.gc.ca/scitech/default.asp?lang=Fr&n=4B40916E-1&xsl=privateArticles2_viewfull&po=9AD670B0 >.
- Krantzberg, G., 1985. "The influence of bioturbation on physical, chemical and biological parameters in aquatic environments: A review." *Environmental Pollution Series A, Ecological and Biological* 39(2): 99-122.
- Kristensen, E., 2000. "Organic matter diagenesis at the oxic/anoxic interface in coastal marine sediments, with emphasis on the role of burrowing animals." *Hydrobiologia* 426(1): 1-24. 10.1023/a:1003980226194.
- Kristensen, E., Penha-Lopes, G., Delefosse, M., Valdemarsen, T., Quintana, C. and Banta, G. T., 2012. "What is bioturbation? The need for a precise definition for fauna in aquatic sciences." *Marine Ecology Progress Series* 446: 285-302. 10.3354/meps09506.
- Kupfer, M. and Corolla, J.-P. (2014). "DORIS - *Viviparus viviparus* (Linnaeus, 1758)," Consulté le 11 juillet, 2014, Url: < http://doris.ffessm.fr/fiche2.asp?fiche_numero=1467 >.

L

- Laak, R., 1976. "Pollutant loads from plumbing fixtures and pretreatment to control soil clogging." *Journal of Environmental Health* 39(1): 48-50.
- Lamberti, G. A., Gregory, S. V., Ashkenas, L. R., Li, J. L., Steinman, A. D. and McIntire, C. D., 1995. "Influence of grazer type and abundance on plant-herbivore interactions in streams." *Hydrobiologia* 306(3): 179-188.
- Langergraber, G., Haberl, R., Laber, J. and Pressl, A., 2003. "Evaluation of substrate clogging processes in vertical flow constructed wetlands." *Water Science and Technology* 48(5): 25-34.
- Lassabatere, L., Angulo-Jaramillo, R., Goutaland, D., Letellier, L., Gaudet, J. P., Winiarski, T. and Delolme, C., 2010. "Effect of the settlement of sediments on water infiltration in two urban infiltration basins." *Geoderma* 156(3-4): 316-325.
- Lassabatere, L., Angulo-Jaramillo, R., Soria-Ugalde, J. M., Šimůnek, J. and Haverkamp, R., 2009. "Numerical evaluation of a set of analytical infiltration equations." *Water Resources Research* 45: W12415.
- Lassabatere, L., Angulo-Jaramillo, R., Soria Ugalde, J. M., Cuenca, R., Braud, I. and Haverkamp, R., 2006. "Beerkan estimation of soil transfer parameters through infiltration experiments - BEST." *Soil Science Society of America Journal* 70(2): 521-532.
- Lassabatere, L., Angulo-Jaramillo, R., Winiarski, T. and Yilmaz, D., 2013. BEST method: Characterization of soil unsaturated hydraulic properties.
- Le Coustumer, S.-M., 2008. Colmatage et rétention des éléments traces métalliques dans les systèmes d'infiltration des eaux pluviales. PhD, Institut National des Sciences Appliquées de Lyon, Monash University.
- Lemoine, D. G., Mermillod-Blondin, F., Barrat-Segretain, M. H., Massé, C. and Malet, E., 2012. "The ability of aquatic macrophytes to increase root porosity and radial oxygen loss determines their resistance to sediment anoxia." *Aquatic Ecology* 46(2): 191-200.
- Leu, E., Krieger-Liszkay, A., Goussias, C. and Gross, E. M., 2002. "Polyphenolic allelochemicals from the aquatic angiosperm *Myriophyllum spicatum* inhibit photosystem II." *Plant Physiology* 130(4): 2011-2018. 10.1104/pp.011593.
- Li, F. M. and Hu, H. Y., 2005. "Isolation and characterization of a novel anti-algal allelochemical from *Phragmites communis*." *Applied and Environmental Microbiology* 71(11): 6545-6553. 10.1128/aem.71.11.6545-6553.2005.
- Liess, A. and Kahlert, M., 2007. "Gastropod grazers and nutrients, but not light, interact in determining periphytic algal diversity." *Oecologia* 152(1): 101-111.
- Lin, C., Eshel, G., Negev, I. and Banin, A., 2008. "Long-term accumulation and material balance of organic matter in the soil of an effluent infiltration basin." *Geoderma* 148(1): 35-42.
- Lippemeier, S., Hartig, P. and Colijn, F., 1999. "Direct impact of silicate on the photosynthetic performance of the diatom *Thalassiosira weissflogii* assessed by on- and off-line PAM fluorescence measurements." *Journal of Plankton Research* 21(2): 269-283. DOI:10.1093/plankt/21.2.269.

- Lock, M. A., 1993. Attached microbial communities in rivers. IN Aquatic Microbiology: an Ecological Approach. T. E. E. Ford. Oxford, Blackwell Scientific Publications, pp. 113-138.
- Loizeau, S., 2013. Amélioration de la compréhension des fonctionnements hydrodynamiques du champ captant de Crépieux-Charmy. PhD, Université de Grenoble.
- Lominé, F., 2007. Écoulement de particules dans un milieu poreux PhD, Université de Rennes.
- Lovley, D. R. and Philips, E. J. P., 1986. "Organic Matter Mineralization with Reduction of Ferric Iron in Anaerobic Sediments." *Applied and Environmental Microbiology* 51(4): 683-689.
- Lowe, R. L., 1996. Periphyton Patterns in Lakes. IN Algal Ecology. J. R. Stevenson, M. L. Bothwell and R. L. Lowe. London, Academic Press, pp. 57-76.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J., 1951. "Protein measurement with the folin phenol reagent." *Journal of Biological Chemistry* 193(1): 265-275.
- Lu, Y., Du, X. Q., Chi, B. M., Yang, Y. S., Li, S. T. and Wang, Z. J., 2011. "The porous media clogging due to suspended solid during the artificial recharge of groundwater." *Jilin Daxue Xuebao (Diqui Kexue Ban)/Journal of Jilin University (Earth Science Edition)* 41(2): 448-454.



- Macías, F. A., Galindo, J. L. G., García-Díaz, M. D. and Galindo, J. C. G., 2008. "Allelopathic agents from aquatic ecosystems: Potential biopesticides models." *Phytochemistry Reviews* 7(1): 155-178.
- Maeng, S. K., Ameda, E., Sharma, S. K., Grützmacher, G. and Amy, G. L., 2010. "Organic micropollutant removal from wastewater effluent-impacted drinking water sources during bank filtration and artificial recharge." *Water Research* 44(14): 4003-4014.
- Maillet, C., 1998. Bases chimiques expérimentales des processus d'allelopathie décrits chez les végétaux supérieurs, PhD, Université Claude Bernard Lyon1.
- Martin, J. P., Martin, W. P., Page, J. B., Raney, W. A. and De Ment, J. D., 1955. "Soil aggregation." *Advanced in agronomy* 7: 1-35.
- Martinet, F., Juget, J. and Riera, P., 1993. "Carbon fluxes across water, sediment and benthos along a gradient of disturbance intensity ; adaptative responses of the sediment feeders. ." *Arch. hydrobiol.* 127: 39-56.
- Matagi, S., Swai, D. and Mugabe, R., 1998. "A review of heavy metal removal mechanisms in wetlands." *Afr. J. Trop. Hydrobiol. Fish.* 8(1): 13-25.
- Mauclaire, L., Schürmann, A. and Mermillod-blondin, F., 2006. "Influence of hydraulic conductivity on communities of microorganisms and invertebrates in porous media: A case study in drinking water slow sand filters." *Aquatic Sciences* 68(1): 100-108.
- Mauclaire, L., Schürmann, A., Thullner, M., Gammeter, S. and Zeyer, J., 2004. "Sand filtration in a water treatment plant: Biological parameters responsible for clogging." *Journal of Water Supply: Research and Technology - AQUA* 53(2): 93-108.

- Maxwell, K. and Johnson, G. N., 2000. "Chlorophyll fluorescence - a practical guide." *Journal of Experimental Botany* 51(345): 659-668.
- McCall, P. and Fisher, J., 1980. Effects of tubificid oligochaetes on physical and chemical properties of Lake Erie sediments. IN Aquatic oligochaete biology, Springer pp. 253-317.
- McCarthy, J. F. and Zachara, J. M., 1989. "Subsurface transport of contaminants." *Environmental science & technology* 23(5): 496-502. 10.1021/es00063a001.
- McCormick, P. V. and Stevenson, R. J., 1991. "Grazer control of nutrient availability in the periphyton." *Oecologia* 86(2): 287-291.
- Mermillod-Blondin, F., Creuzé des Châtelliers, M. and Gérino, M., 2003. "Effects of the interaction between tubificid worms on the functioning of hyporheic sediments: An experimental study in sediment columns." *Archiv fur Hydrobiologie* 156(2): 203-223.
- Mermillod-Blondin, F., Gérino, M., Degrange, V. G., Lensi, R., Chassé, J.-L., Rard, M. and Creuzé des Châtelliers, M., 2001. "Testing the functional redundancy of *Limnodrilus* and *Tubifex* (Oligochaeta, Tubificidae) in hyporheic sediments: an experimental study in microcosms." *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 8: 1747-1759.
- Mermillod-Blondin, F. and Lemoine, D. G., 2010. "Ecosystem engineering by tubificid worms stimulates macrophyte growth in poorly oxygenated wetland sediments." *Functional Ecology* 24(2): 444-453.
- Mermillod-Blondin, F., Mauclaire, L. and Montuelle, B., 2005a. "Use of slow filtration columns to assess oxygen respiration, consumption of dissolved organic carbon, nitrogen transformations, and microbial parameters in hyporheic sediments." *Water Research* 39(9): 1687-1698.
- Mermillod-blondin, F., Nogaro, G., Datry, T., Malard, F. and Gibert, J., 2005b. "Do tubificid worms influence the fate of organic matter and pollutants in stormwater sediments?" *Environmental Pollution* 134(1): 57-69.
- Mermillod-Blondin, F., Nogaro, G. and Gibert, J., 2007. Clogging of infiltration basins by stormwater sediments : influence of invertebrate bioturbation. NOVATECH 2007 - 5ème conférence internationale sur les techniques et stratégies durables pour la gestion des eaux urbaines par temps de pluie, Lyon.
- Mermillod-Blondin, F. and Rosenberg, R., 2006. "Ecosystem engineering: The impact of bioturbation on biogeochemical processes in marine and freshwater benthic habitats." *Aquatic Sciences* 68(4): 434-442.
- Middelboe, M., Sondergaard, M., Letarte, Y. and Borch, N. H., 1995. "Attached and free-living bacteria: Production and polymer hydrolysis during a diatom bloom." *Microbial Ecology* 29(3): 231-248.
- Mineralogical Society of America. (2014). Consulté le 28 mai 2014, Url: < <http://rimg.geoscienceworld.org/> >.
- Miyazaki, T., 1988. "Water flow in unsaturated soil in layered slopes." *Journal of Hydrology* 102(1): 201-214.
- Miyazaki, T., Hasegawa, S. and Kasabuchi, T., 1993. Water flow in soils. New-York, Marcel Dekker Inc. 296 pages.

- Mohanty, B. P., Ankeny, M. D., Horton, R. and Kanwar, R. S., 1994. "Spatial analysis of hydraulic conductivity measured using disc infiltrometers." *Water Resources Research* 30: 2489-2498.
- Molisch, H., 1937. *Der Einfluss einer Pflanze auf die andere - Allelopathie*. Fischer, Jena, Germany.
- Moore, R. and Clark, W. D., 1995. *Botany: Plant form and function*. Brown, Wm. C. . 592 pages.
- Morris, C., Grossl, P. R. and Call, C. A., 2009. "Elemental allelopathy: Processes, progress, and pitfalls." *Plant Ecology* 202(1): 1-11.
- Mubarak, I., Mailhol, J. C., Angulo-Jaramillo, R., Ruelle, P., Boivin, P. and Khaledian, M., 2009. "Temporal variability in soil hydraulic properties under drip irrigation." *Geoderma* 150(1-2): 158-165.
- Mulderij, G., Smolders, A. J. P. and Van Donk, E., 2006. "Allelopathic effect of the aquatic macrophyte, *Stratiotes aloides*, on natural phytoplankton." *Freshwater Biology* 51(3): 554-561.
- Mulderij, G., Van Donk, E. and Roelofs, J. G. M., 2003. "Differential sensitivity of green algae to allelopathic substances from *Chara*." *Hydrobiologia* 491: 261-271.



- Nakai, S., Inoue, Y., Hosomi, M. and Murakami, A., 1999. Growth inhibition of blue-green algae by allelopathic effects of macrophytes. 39: 47-53.
- Nakai, S., Inoue, Y., Hosomi, M. and Murakami, A., 2000. "Myriophyllum spicatum-released allelopathic polyphenols inhibiting growth of blue-green algae *Microcystis aeruginosa*." *Water Research* 34(11): 3026-3032.
- Navel, S., Mermillod-Blondin, F., Montuelle, B., Chauvet, E. and Marmonier, P., 2012. "Sedimentary context controls the influence of ecosystem engineering by bioturbators on microbial processes in river sediments." *Oikos* 121(7): 1134-1144. 10.1111/j.1600-0706.2011.19742.x.
- Navel, S., Mermillod-Blondin, F., Montuelle, B., Chauvet, E., Simon, L. and Marmonier, P., 2011. "Water-sediment exchanges control microbial processes associated with leaf litter degradation in the hyporheic zone: a microcosm study." *Microbial Ecology* 61(4): 968-979.
- Nemes, A., Rawls, W. J. and Pachepsky, Y. A., 2005. "Influence of organic matter on the estimation of saturated hydraulic conductivity." *Soil Science Society of America Journal* 69(4): 1330-1337.
- Nguyen, L., 2001. "Accumulation of organic matter fractions in a gravel-bed constructed wetland." *Water Science and Technology* 44(11-12): 281-287.
- Nivala, J., Hoos, M. B., Cross, C., Wallace, S. and Parkin, G., 2007. "Treatment of landfill leachate using an aerated, horizontal subsurface-flow constructed wetland." *Science of the Total Environment* 380: 19-27.

- Noffke, N., Gerdes, G. and Klenke, T., 2003. "Benthic cyanobacteria and their influence on the sedimentary dynamics of peritidal depositional systems (siliciclastic, evaporitic salty, and evaporitic carbonatic)." *Earth-Science Reviews* 62(1-2): 163-176.
- Nogaro, G., 2007. Influence des dépôts de sédiments fins sur le fonctionnement physique et biogéochimique des interfaces sédimentaires aquatiques : Interactions avec les processus de bioturbation. PhD, Université Lyon 1.
- Nogaro, G., Datry, T., Mermillod-Blondin, F., Descloux, S. and Montuelle, B., 2010. "Influence of streambed sediment clogging on microbial processes in the hyporheic zone." *Freshwater Biology* 55(6): 1288-1302.
- Nogaro, G. and Mermillod-Blondin, F., 2009. "Stormwater sediment and bioturbation influences on hydraulic functioning, biogeochemical processes, and pollutant dynamics in laboratory infiltration systems." *Environmental Science and Technology* 43(10): 3632-3638.
- Nogaro, G., Mermillod-Blondin, F., François-Carcaillet, F., Gaudet, J. P., Lafont, M. and Gibert, J., 2006. "Invertebrate bioturbation can reduce the clogging of sediment: An experimental study using infiltration sediment columns." *Freshwater Biology* 51(8): 1458-1473.
- Nogaro, G., Mermillod-Blondin, F., Montuelle, B., Boisson, J. C., Bedell, J. P., Ohannessian, A., Volat, B. and Gibert, J., 2007. "Influence of a stormwater sediment deposit on microbial and biogeochemical processes in infiltration porous media." *Science of the Total Environment* 377(2-3): 334-348.
- Nogaro, G., Mermillod-Blondin, F., Montuelle, B., Boisson, J. C. and Gibert, J., 2008. "Chironomid larvae stimulate biogeochemical and microbial processes in a riverbed covered with fine sediment." *Aquatic Sciences* 70(2): 156-168.
- Nogaro, G., Mermillod-Blondin, F., Vallet, M. H., François-Carcaillet, F., Gaudet, J. P., Lafont, M. and Gibert, J., 2009. "Ecosystem engineering at the sediment-water interface: Bioturbation and consumer-substrate interaction." *Oecologia* 161(1): 125-138.
- Norgaard, N., 1989. Vækst og lysadaptation hos submerse vandlobsmakrofyter. M.S. Thesis,, 1989. Vækst og lysadaptation hos submerse vandlobsmakrofyter. . PhD, University of Aarhus.
- Nothrup, R. R., Yu, Z., R.A., D. and Vogt, K. A., 1995. "Polyphenol control of nitrogen release from pine litter." *Nature* 377: 227-229.
- NPS Photo. (2001). "Aerial view of Grand Prismatic Spring; Hot Springs, Midway & Lower Geyser Basin" Consulté le 24 juin, 2014, Url: < http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/f/f5/Grand_prismatic_spring.jpg >.



- O'Toole, G. A. and Kolter, R., 1998. "Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development." *Molecular Microbiology* 30(2): 295-304.
- Oades, J. M., 1993. "The role of biology in the formation, stabilization and degradation of soil structure." *Geoderma* 56(1-4): 377-400.

- Oberdorfer, J. A. and Peterson, F. L., 1985. "Waste-water injection: Geochemical and biogeochemical clogging processes." *Ground Water* 23(6): 753-761.
- Odum, E. P., 1984. "The mesocosm." *BioScience* 34(9): 558-562.
- Okabe, S., Itoh, T., Satoh, H. and Watanabe, Y., 1999. "Analyses of spatial distributions of sulfate-reducing bacteria and their activity in aerobic wastewater biofilms." *Applied and Environmental Microbiology* 65(11): 5107-5116.
- Okubo, T. and Matsumoto, J., 1979. "Effect of infiltration rate on biological clogging and water quality changes during artificial recharge." *Water Resources Research* 15(6): 1536-1542.
- ONEMA. (2010). "Ingénierie Ecologique" *Cart'Eau*. Consulté le 15 mai, 2014, Url: < http://carteau.onema.fr/contenu/glossaire/ingenierie_ecologique >.
- ONU, 1992. *Sommet planète Terre de Rio de Janeiro*, Rio de Janeiro 3-14 juin 1992.



- Paal, J., Trei, T. and Viik, M., 2007. "Vegetation of Estonian watercourse, III. Drainage basins of the Moonsund sea, the Gulf of Riga and Saaremaa island." *Ann. Bot. Fennici* 44: 321-344.
- Pastor, L., Deflandre, B., Viollier, E., Cathalot, C., Metzger, E., Rabouille, C., Escoubeyrou, K., Lloret, E., Pruski, A. M., Vétion, G., Desmalades, M., Buscail, R. and Grémare, A., 2011. "Influence of the organic matter composition on benthic oxygen demand in the Rhône River prodelta (NW Mediterranean Sea)." *Continental Shelf Research* 31(9): 1008-1019.
- Pavelic, P., Dillon, P. J., Mucha, M., Nakai, T., Barry, K. E. and Bestland, E., 2011. "Laboratory assessment of factors affecting soil clogging of soil aquifer treatment systems." *Water Research* 45(10): 3153-3163.
- Pedescoll, A., Samsó, R., Romero, E., Puigagut, J. and García, J., 2011. "Reliability, repeatability and accuracy of the falling head method for hydraulic conductivity measurements under laboratory conditions." *Ecological Engineering* 37: 754-757.
- Pedescoll, A., Uggetti, E., Llorens, E., Granés, F., García, D. and García, J., 2009. "Practical method based on saturated hydraulic conductivity used to assess clogging in subsurface flow constructed wetlands." *Ecological Engineering* 35: 1216-1224.
- Perceval, O., Caquet, T., Lagadic, L., Bassères, A., Azam, D., Lacroix, G. and Poulsen, V., 2009. "Les mésocosmes : des outils pour les gestionnaires des milieux aquatiques?". Séminaire National d'Ecotoxicologie - Inra-Onema.
- Perroux, K. M. and White, I., 1988. "Designs for disc permeameters." *Soil Science Society Of America Journal* 52(5): 1205-1215.
- Petersen, J. E., Cornwell, J. C. and Kemp, W. M., 1999. "Implicit scaling in the design of experimental aquatic ecosystems." *Oikos*: 3-18.
- 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.
- Pitt, R., Clark, S. and Field, R., 1999. "Groundwater contamination potential from stormwater infiltration practices." *Urban Water* 1(3): 217-236.

- Platzer, C. and Mauch, K., 1997. "Soil clogging in vertical flow reed beds - mechanisms, parameters, consequences and.....solutions?" *Water Science and Technology* 35(5): 175-181. 10.1016/s0273-1223(97)00066-8.
- Pollio, A. P., Ligrone, G. and Alliota, R. G., 1993. "Effects of the potential allelochemical a-sarone on growth, physiology and ultrastructure of two unicellular green algae." *Journal of Applied Phycology* 5(4): 385-403.
- Pratt, L. A. and Kolter, R., 1999. "Genetic analyses of bacterial biofilm formation." *Current Opinion in Microbiology* 2(6): 598-603.
- Pundsack, J., Axler, R., Hicks, R., Henneck, J., Nordman, D. and Mccarthy, B., 2001. "Seasonal pathogen removal by alternative on-site wastewater treatment systems." *Water Environment Research* 73(2): 204-212.
- Pusey, B. J., Arthington, A. H. and Flanders, T. J., 1994. "An outdoor replicated artificial stream system: Design, operating conditions, and initial invertebrate colonization." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 27(2): 177-191.

R

- Ragusa, S. R., de Zoysa, D. S. and Rengasamy, P., 1994. "The effect of microorganisms, salinity and turbidity on hydraulic conductivity of irrigation channel soil." *Irrigation Science* 15(4): 159-166.
- Ragusa, S. R., McNevin, D., Qasem, S. and Mitchell, C., 2004. "Indicators of biofilm development and activity in constructed wetlands microcosms." *Water Research* 38(12): 2865-2873.
- Rawls, W. J., Nemes, A. and Pachepsky, Y. A., 2005. Effects of soil organic matter on soil hydraulic properties. IN Development of Pedotransfer Functions in Soil Hydrology. Y. A. Pachepsky and W. J. Rawls. Amsterdam, Elsevier pp. 95-114.
- Reddi, L. N., Ming, X., Hajra, M. G. and Lee, I. M., 2000. "Permeability reduction of soil filters due to physical clogging." *Journal of geotechnical and geoenvironmental engineering* 126(3): 236-246.
- Reigosa, M. J., Sanchez-Moreiras, A. and Gonzalez, L., 1999. "Ecophysiological approach in allelopathy." *Critical Reviews in Plant Sciences* 18(5): 577-608.
- Revesbech, N. P., Nielsen, J. and Hansen, P. K., 1988. "Benthic Primary Production and Oxygen Profile. Nitrogen Cycling in Coastal Marine Environment." John Wiley and Sons Ltd: 69-83.
- Rice, E. L., 1984. Allelopathy. Orlando, Florida, Academic Press. 368 pages.
- Richer de Forges, A., Feller, C., Jamagne, M. and Arrouays, D., 2008. "Perdus dans le triangle des textures." *Etude et Gestion des Sols* 15(2): 97-111.
- Rinck-Pfeiffer, S., Ragusa, S., Sztajn bok, P. and Vandeveld, T., 2000. "Interrelationships between biological, chemical, and physical processes as an analog to clogging in aquifer storage and recovery (ASR) wells." *Water Research* 34(7): 2110-2118.
- Rodgers, M. and Mulqueen, J., 2006. "Field-saturated hydraulic conductivity of unsaturated soils from falling-head well tests." *Agricultural Water Management* 79: 160-176.

- Roeselers, G., Loosdrecht, M. C. M. V. and Muyzer, G., 2008. "Phototrophic biofilms and their potential applications." *Journal of Applied Phycology* 20(3): 227-235.
- Roeselers, G., Van Loosdrecht, M. and Muyzer, G., 2007. "Heterotrophic pioneers facilitate phototrophic biofilm development." *Microbial Ecology* 54 578–585.
- Rojo, C., Segura, M. and Rodrigo, M. A., 2013. "The allelopathic capacity of submerged macrophytes shapes the microalgal assemblages from a recently restored coastal wetland." *Ecological Engineering* 58(0): 149-155.
- Romaní, A. M. and Sabater, S., 1999. "Effect of primary producers on the heterotrophic metabolism of a stream biofilm." *Freshwater Biology* 41(4): 729-736.
- Ruesink, J. L., 2000. "Intertidal mesograzers in field microcosms: linking laboratory feeding rates to community dynamics." *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 248(2): 163-176.

S

- Salant, N. L., 2011. "'Sticky business': The influence of streambed periphyton on particle deposition and infiltration." *Geomorphology* 126(3-4): 350-363.
- Sanchez de Lozada, D., Vandevivere, P., Baveye, P. and Zinder, S., 1994. "Decrease of the hydraulic conductivity of sand columns by *Methanosarcina barkeri*." *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 10(3): 325-333.
- Sand-Jensen, K., 1990. "Epiphyte shading: Its role in resulting depth distribution of submerged aquatic macrophytes." *Folia Geobotanica et Phytotaxonomica* 25(3): 315-320.
- Sand-Jensen, K. and Borum, J., 1991. "Interactions among phytoplankton, periphyton, and macrophytes in temperate freshwaters and estuaries." *Aquatic Botany* 41(1-3): 137-175.
- Sarmiento, H., Isumbisho, M. and Descy, J. P., 2006. "Phytoplankton ecology of Lake Kivu (eastern Africa)." *Journal of Plankton Research* 28(9): 815-829.
- Schälchli, U., 1992. "The clogging of coarse gravel river beds by fine sediment." *Hydrobiologia* 235-236(1): 189-197.
- Scheffer, M., 1999. "The effect of aquatic vegetation on turbidity; how important are the filter feeders?" *Hydrobiologia* 408-409: 307-316.
- Schlüter, L., Lauridsen, T. L., Krogh, G. and Jorgensen, T., 2006. "Identification and quantification of phytoplankton groups in lakes using new pigment ratios - A comparison between pigment analysis by HPLC and microscopy." *Freshwater Biology* 51(8): 1474-1485.
- Schmidt, C. K., Lange, F. T. and Brauch, H. J., 2007. Characteristics and evaluation of natural attenuation processes for organic micropollutant removal during riverbank filtration. *Water Science and Technology: Water Supply*. 7: 1-7.
- Schnurer, J. and Rosswall, T., 1982. "Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter." *Applied and Environmental Microbiology* 43(6): 1256-1261.

- Schuh, W. M., 1990. "Seasonal variation of clogging of an artificial recharge basin in a northern climate." *Journal of Hydrology* 121(1-4): 193-215.
- Schürch, M. and Vuataz, F. D., 2000. "Groundwater components in the alluvial aquifer of the alpine Rhone River valley, Bois de Finges area, Wallis Canton, Switzerland." *Hydrogeology Journal* 8(5): 549-563.
- Sculthorpe, C. D., 1967. The Biology of Aquatic Vascular Plants. London, Edward Arnold (reprinted 1985 - Koeltz Scientific Books). 610 pages.
- Serôdio, J., Cartaxana, P., Coelho, H. and Vieira, S., 2009. "Effects of chlorophyll fluorescence on the estimation of microphytobenthos biomass using spectral reflectance indices." *Remote Sensing of Environment* 113(8): 1760-1768.
- Serpaud, B., Al-Shukry, R., Casteignau, M. and Matejka, G., 1994. "Heavy metal adsorption (Cu, Zn, Cd and Pb), by superficial stream sediments: effects of pH, temperature and sediment composition." *Adsorption des métaux lourds (Cu, Zn, Cd et Pb) par les sédiments superficiels d'un cours d'eau: rôle du pH, de la température et de la composition du sédiment* 7(4): 343-365.
- Shen, C., Yang, D. and Dong, B., 2010. "A new operation mode solving clogging problems of horizontal subsurface constructed wetlands." *Water Science and Technology* 62(5): 1045-1051.
- Siegrist, R. L., 1987. "Soil clogging during subsurface wastewater infiltration as affected by effluent composition and loading rate." *Journal of Environmental Quality* 16(2): 181-187.
- Sigg, L., Behra, P. and Stumm, W., 2000. Chimie des milieux aquatiques, Chimie des eaux naturelles et des interfaces dans l'environnement. 5ème édition - Paris, Dunod. 497 pages.
- Šimůnek, J. and van Genuchten, M. T., 1997. "Estimating unsaturated soil hydraulic properties from multiple tension disc infiltrometer data." *Soil Science* 162(6): 383-398.
- Six, J., Bossuyt, H., Degryze, S. and Denef, K., 2004. "A history of research on the link between (micro)aggregates, soil biota, and soil organic matter dynamics." *Soil and Tillage Research* 79(1): 7-31. <http://dx.doi.org/10.1016/j.still.2004.03.008>.
- Skolasińska, K., 2006. "Clogging microstructures in the vadose zone - Laboratory and field studies." *Hydrogeology Journal* 14(6): 1005-1017.
- Smirnova, T. A., Didenko, L. V., Azizbekyan, R. R. and Romanova, Y. M., 2010. "Structural and functional characteristics of bacterial biofilms." *Microbiology* 79(4): 413-423.
- Smith, E., R, Smettem, J., Broadbridge, P. and Woolhiser, D. A., 2002. Infiltration theory for hydrologic applications. Washington, D. C., Water Resour. Monogr. Ser. 15, AGU. 212 pages.
- Sobieraj, J. A., Elsenbeer, H. and G., C., 2004. "Scale dependency in spatial patterns of saturated hydraulic conductivity." *Catena* 55: 49-77. 10.1016/s0341-8162(03)00090-0.
- Sommer, U., 2000. "Benthic microalgal diversity enhanced by spatial heterogeneity of grazing." *Oecologia* 122(2): 284-287.
- Stal, L. J., 2010. "Microphytobenthos as a biogeomorphological force in intertidal sediment stabilization." *Ecological Engineering* 36(2): 236-245.

- Stanley, E. H., Johnson, M. D. and Ward, A. K., 2003. "Evaluating the influence of macrophytes on algal and bacterial production in multiple habitats of a freshwater wetland." *Limnology and Oceanography* 48(3): 1101-1111.
- Steinman, A. D., 1996. Effects of grazers on freshwater benthic algae. IN Algal Ecology. R. J. Stevenson, M. L. Bothwell and R. L. Lowe. London, Academic Press pp. 753 pages.
- Stevenson, J. R., Bothwell, M. L. and Lowe, R. L., 1996. Algal Ecology, Freshwater Benthic Ecosystems. London, Academic Press. 753 pages.
- Stevenson, R. J., 1997. "Resource thresholds and stream ecosystem sustainability." *Journal of the North American Benthological Society* 16(2): 410-424.
- Stevik, T. K., Aa, K., Ausland, G. and Hanssen, J. F., 2004. "Retention and removal of pathogenic bacteria in wastewater percolating through porous media: A review." *Water Research* 38(6): 1355-1367.
- Stevik, T. K., Ausland, G., Hanssen, J. F. and Jenssen, P. D., 1999. "The influence of physical and chemical factors on the transport of E. coli through biological filters for wastewater purification." *Water Research* 33(18): 3701-3706.
- Stolz, J. F., 2000. Structure of Microbial Mats and Biofilm. IN Microbial sediments. R. E. Riding and S. M. Awramik. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag pp. 331.
- Stoodley, P., Dodds, W. K., Boyle, J. D. and Lappin-Scott, H. M., 1999. "Influence of hydrodynamics and nutrients on biofilm structure." *Journal of Applied Microbiology* 85: 19S-28S.
- Sturt, M. M., Jansen, M. A. K. and Harrison, S. S. C., 2011. "Invertebrate grazing and riparian shade as controllers of nuisance algae in a eutrophic river." *Freshwater Biology* 56(12): 2580-2593.
- Suliman, F., French, H. K., Haugen, L. E. and Søvik, A. K., 2006. "Change in flow and transport patterns in horizontal subsurface flow constructed wetlands as a result of biological growth." *Ecological Engineering* 27(2): 124-133.
- Sutherland, I. W., 2001. "The biofilm matrix - An immobilized but dynamic microbial environment." *Trends in Microbiology* 9(5): 222-227.
- Švanys, A., Paškauskas, R. and Hilt, S., 2013. "Effects of the allelopathically active macrophyte *Myriophyllum spicatum* on a natural phytoplankton community: a mesocosm study." *Hydrobiologia*: 1-10.



- Taylor, S. W. and Jaffé, P. R., 1990. "Biofilm growth and the related changes in the physical properties of a porous medium. 1. Experimental investigation." *Water Resources Research* 26(9): 2153-2159.
- Thomasson, A. J., 1978. "Towards an objective classification of soil structure." *Journal of Soil Science* 29(1): 38-46. 10.1111/j.1365-2389.1978.tb02029.x.
- Thompson, A. J. and Sinsabaugh, R. L., 2000. "Matric and particulate phosphatase and aminopeptidase activity in limnetic biofilms." *Aquatic Microbial Ecology* 21: 151-159.
- Thullner, M., 2010. "Comparison of bioclogging effects in saturated porous media within one- and two-dimensional flow systems." *Ecological Engineering* 36(2): 176-196.

- Thullner, M., Mauclaire, L., Schroth, M. H., Kinzelbach, W. and Zeyer, J., 2002a. "Interaction between water flow and spatial distribution of microbial growth in a two-dimensional flow field in saturated porous media." *Journal of Contaminant Hydrology* 58(3-4): 169-189.
- Thullner, M., Zeyer, J. and Kinzelbach, W., 2002b. "Influence of microbial growth on hydraulic properties of pore networks." *Transport in Porous Media* 49(1): 99-122.
- Tisdall, J. M. and Oades, J. M., 1982. "Organic matter and water-stable aggregates in soils." *Journal of Soil Science* 33(2): 141-163. 10.1111/j.1365-2389.1982.tb01755.x.
- Twain, Q. (2013). "Researchers Develop New Material to Fight Biofouling Biofilms" Consulté le 22 juin, 2014, Url: < <http://physicsbuzz.physicscentral.com/2013/01/researchers-develop-new-material-to.html> >.



- Unesco, 1966. Determination of photosynthetic pigments in seawater. Monographs on oceanographic methodology. pages.
- University of Alaska. (2014). "Microbial biofilms and drinking water" Consulté le 24 juin, 2014, Url: < <http://ine.uaf.edu/werc/2014/03/27/microbial-biofilms-and-drinking-water/> >.
- USDA. (2014). "Guide to Texture by Feel" Consulté le 23 juin, 2014, Url: < http://www.nrcs.usda.gov/wps/portal/nrcs/detail/soils/edu/kthru6/?cid=nrcs142p2_054311 >.



- Van Cuyk, S., Siegrist, R., Logan, A., Masson, S., Fischer, E. and Figueroa, L., 2001. "Hydraulic and purification behaviors and their interactions during wastewater treatment in soil infiltration systems. ." *Water Research* . 35(4): 953-964.
- Van Der Lee, J., De Windt, L., Lagneau, V. and Goblet, P., 2003. "Module-oriented modeling of reactive transport with HYTEC." *Computers & Geosciences* 29(3): 265-275.
- Van Donk, E. and Van de Bund, W. J., 2002. "Impact of submerged macrophytes including charophytes on phyto- and zooplankton communities: Allelopathy versus other mechanisms." *Aquatic Botany* 72(3-4): 261-274. 10.1016/s0304-3770(01)00205-4.
- van Genuchten, M. T., 1980. "Closed-form equation for predicting the hydraulic conductivity of unsaturated soils " *Soil Science Society of America Journal* 44(5): 892-898.
- Vandevivere, P. and Baveye, P., 1992. "Effect of bacterial extracellular polymers on the saturated hydraulic conductivity of sand columns." *Applied and Environmental Microbiology* 58(5): 1690-1698.
- Vymazal, J., 1995. Algae and element cycling in wetlands. USA, Lewis Publishers Inc. 689 pages.
- Vymazal, J., 2013. "Plants in constructed, restored and created wetlands." *Ecological Engineering* 61: 501-504.



- Wallace, J. B. and Webster, J. R., 1996. "The role of macroinvertebrates in stream ecosystem function." Annual review of entomology. Vol. 41: 115-139.
- Wentworth, C. K., 1922. "A scale of grade and class terms for clastic sediments." J. Geology 30: 377-392.
- Wetzel, R. G., 1983. *Limnology*. Philadelphia, PA., 2nd edition, Saunders. 767 pages.
- Wetzel, R. G., 1996. Benthic algae and nutrient cycling in lentic freshwater ecosystems. IN *Algal Ecology*. J. R. Stevenson, M. L. Bothwell and R. L. Lowe. London, Academic Press pp. 753.
- White, R. E., 1985. "The influence of macropores on the transport of dissolved and suspended matter through soil." Adv. Soil Sci. 3: 94-120.
- Wikhydro. (2013). "Les ouvrages de gestion à la source des eaux pluviales" Consulté le 15 janvier 2014, Url: < http://wikhydro.developpement-durable.gouv.fr/index.php/Les_ouvrages_de_gestion_à_la_source_des_eaux_pluviales >.
- Wilhelm, C., Rudolph, I. and Renner, W., 1991. "A quantitative method based on HPLC-aided pigment analysis to monitor structure and dynamics of the phytoplankton assemblage - a study from lake Meerfelder Maar (Eifel, Germany)." Archive of Hydrobiology 123(1): 21-35.
- Wimpenny, J., Manz, W. and Szewzyk, U., 2000. "Heterogeneity in biofilms." FEMS Microbiology Reviews 24(5): 661-671.
- Winiarski, T., Bedell, J. P., Delolme, C. and Perrodin, Y., 2006. "The impact of stormwater on a soil profile in an infiltration basin." Hydrogeology Journal 14(7): 1244-1251.
- Wium-Andersen, S., Anthoni, U., Christophersen, C. and Houen, G., 1982. "Allelopathic effects on phytoplankton by substances isolated from aquatic macrophytes (Charales)." Oikos 39(2): 187-190.
- Wium-Andersen, S., Anthoni, U. and Houen, G., 1983. "Elemental sulphur, a possible allelopathic compound from *Ceratophyllum demersum*." Phytochemistry 22(11): 2613.
- Wood, W. W. and Bassett, R. L., 1975. "Water quality changes related to the development of anaerobic conditions during artificial recharge." Water Resources Research 11(4): 553-558.
- Wright, S. W., 1991. "Improved HPLC method for the analysis of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton." Marine Ecology Progress Series 77(2-3): 183-196.
- Wu, J., Gui, S., Stahl, P. and Zhang, R., 1997. "Experimental study on the reduction of soil hydraulic conductivity by enhanced biomass growth." Soil Science 162(10): 741-748.



- Xian, Q., Chen, H., Liu, H., Zou, H. and Yin, D., 2006. "Isolation and identification of anti-algal compounds from the leaves of *Vallisneria spiralis* L. by activity-guided fractionation." Environmental Science and Pollution Research 13(4): 233-237.

- Xian, Q., Chen, H., Qu, L., Zou, H. and Yin, D., 2005. "Allelopathic potential of aqueous extracts of submerged macrophytes against algal growth." *Allelopathy Journal* 15(1): 95-104.
- Xiao, X., Lou, L. P., Li, H. and Chen, Y. X., 2009. "Algal control ability of allelopathically active submerged macrophytes: A review." *Chinese Journal of Applied Ecology* 20(3): 705-712.

Y

- Yan, D., Bai, Z., Rowan, M., Gu, L., Shumei, R. and Yang, P., 2009. "Biofilm structure and its influence on clogging in drip irrigation emitters distributing reclaimed wastewater." *Journal of Environmental Sciences* 21(6): 834-841.
- Yilmaz, D., Lassabatere, L., Angulo-Jaramillo, R., Deneele, D. and Legret, M., 2010. "Hydrodynamic Characterization of Basic Oxygen Furnace Slag through an Adapted BEST Method." *Vadose Zone Journal* 9(1): 107-116.
- Yilmaz, D., Lassabatere, L., Deneele, D., Angulo-Jaramillo, R. and Legret, M., 2013. "Influence of carbonation on the microstructure and hydraulic properties of a basic oxygen furnace slag." *Vadose Zone Journal* 12(2): 9-15. 10.2136/vzj2012.0121.

Z

- Zhang, X. and Bishop, P. L., 2003. "Biodegradability of biofilm extracellular polymeric substances." *Chemosphere* 50(1): 63-69.
- Zhang, X., Bishop, P. L. and Kupferle, M. J., 1998. "Measurement of polysaccharides and proteins in biofilm extracellular polymers." *Water Science and Technology* 37(4-5): 345-348.
- Zhao, L., Zhu, W. and Tong, W., 2009. "Clogging processes caused by biofilm growth and organic particle accumulation in lab-scale vertical flow constructed wetlands." *Journal of Environmental Sciences* 21(6): 750-757.
- Zhu, J., Liu, B., Wang, J., Gao, Y. and Wu, Z., 2010. "Study on the mechanism of allelopathic influence on cyanobacteria and chlorophytes by submerged macrophyte (*Myriophyllum spicatum*) and its secretion." *Aquatic Toxicology* 98(2): 196-203.

ANNEXES

I. Communications affichées

Influence of Algal Biofilm on Performance of Infiltration Basins Designed for Groundwater Recharge

Morgane GETTE-BOUVAROT, Florian MERMILLOD-BLONDIN, Rafael ANGULO-JARAMILLO, Laurent LASSABATÈRE, Cécile DELOLME, Laurence VOLATIER

UMR-CNRS 5023, Laboratoire d'Ecologie des Hydrosystèmes Naturels et Anthropisés (LEHNA), Université Claude Bernard Lyon 1, France



Context

Infiltration basins are increasingly used in urban areas for flood protection, groundwater recharge and stormwater disposal. However, their hydraulic and environmental performances are often affected by clogging. Clogging is usually explained by the combined and overlapping effect of:

- Physicochemical processes [1,3]
 - ✓ Fine sediment deposition
 - ✓ Precipitates & adsorption mechanisms
- Biological processes [1,2,4,5]
 - ✓ Accumulation of organic matter (OM)
 - ✓ Biofilm growth

Clogging

The present work aimed to evaluate the respective contributions of sediment deposition and biofilm growth on clogging in two infiltration basins submitted to contrasting infiltrated volumes per unit area.

Materials & Methods

Study site

Pumping wellfield of "Crépieux-Charmy" (Lyon, France). It is the largest in Europe (375 hectares, 1 280 000 inhabitants supplied). Several infiltration basins have been set up on this site in a protective purpose (hydraulic barrier, groundwater recharge).

We focused on two basins built in April 2008, named B1 and B2, supplied with the same water. For operational reasons, greater volumes of water were infiltrated per year in B2 (~30% more than in B1).

Sampling

Samples were collected by coring on 20 October 2010 from 3 homogeneous areas of each basin.

Sediment cores were sliced to obtain samples from 3 layers: 0-1 cm (H1), 2-3 cm (H2) and 10-14 cm (H3).

Measures performed



Analyzes of particle size distribution

- ✓ Grain size distribution before and after removal of OM by NaOCl treatment.

Variables associated with biofilm

- ✓ Total organic carbon (TOC) and Total nitrogen (TN)
- ✓ Chlorophyll-a content
- ✓ Abundance of intact and damaged bacterial cells
- ✓ Total protein content
- ✓ Hydrolytic activity (FDA)

In situ infiltration measurements and data collection have been carried out with and without the top layer H1 (0-1cm) using the Beerkan procedure and the BEST-algorithm [6].

Conclusions

- The top layer (0-1 cm) constitutes both a hot spot of biological development, and a layer controlling the efficient permeability of the infiltration media.
- As in B2, algae could affect the pore network by reducing the pore size and/or by filling connections between the pores.

- References**
1. Baveye, P., Vandevivere, P., Hoyle, B. L., DeLeo, P. C. and de Lozada, D. S. (1998). "Environmental Impact and Mechanisms of the Biological Clogging of Saturated Soils and Aquifer Materials." *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 28(2): 123-191.
 2. Baten, T. J. and Bengtsson, D. (1998). "Sinking sediment bedforms, hydrodynamics, and river bed clogging: Evidence from a large river." *Microbial Ecology* 37(3): 165-168.
 3. Schachtel, U. (1982). "The clogging of coarse gravel river beds by fine sediment." *Hydrobiologia* 235-238(1): 189-197.
 4. Thullner, M., Zeyer, J. and Kitzlerbach, W. (2002). "Influence of microbial growth on hydraulic properties of pore networks." *Transport in Porous Media* 48(1): 99-122.
 5. Zhao, S., Zuo, W. and Tong, W. (2008). "Clogging processes caused by biofilm growth and organic particle accumulation in lab-scale vertical flow constructed wetlands." *Journal of Environmental Sciences* 21(8): 756-757.
 6. Lassabatère, L., Angulo-Jaramillo, R., Soto-Ilagide, J. M., Cuencana, R., Braud, I. and Haverkamp, R. (2006). "Beerkan estimation of soil transfer parameters through infiltration experiments - BEST." *Soil Science Society of America Journal* 70(3): 471-477.

Acknowledgements

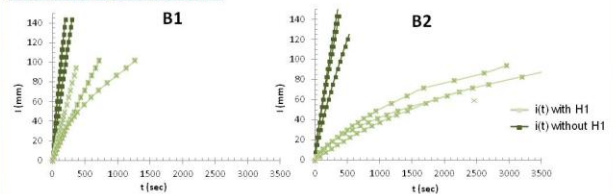


We would like to thank Laurent Simon, Felix Valler and Marc Danjean for their very efficient technical assistance during the experiments. This research was financially and technically supported by the Greater-Lyon urban community and Veolia.

Contacts: morgane.gette@entpe.fr, laurence.volatier@entpe.fr, mermillob@recherche.univ-lyon1.fr

Results & Discussion

Hydraulic characterization



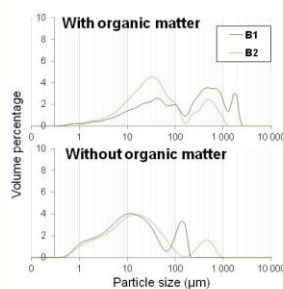
■ Before removal of H1, mean estimated saturated hydraulic conductivity K_s was significantly lower in B2 ($8.39 \pm 5.90 \text{ mm h}^{-1}$) than in B1 ($353 \pm 371 \text{ mm h}^{-1}$).

■ Mean hydraulically functional pore ξ_m was also lower in B2 ($0.026 \pm 0.021 \text{ mm}$) than in B1 ($0.48 \pm 0.51 \text{ mm}$).

■ After removal of H1, strong increase in infiltration in the two basins. K_s was 2-fold higher in B1 and 60-fold higher in B2.

→ Hydraulic performances: B1 > B2

→ Main control of hydraulic performances by the permeability of the 0-1 cm sedimentary layer (H1)



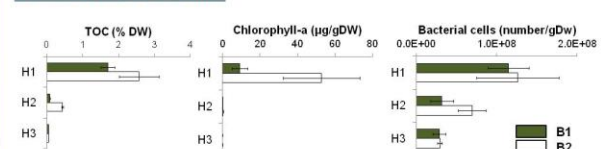
Particle size distributions in H1

■ Before removal of OM, particle size in H1 presented a multimodal distribution, with two main modes (around $30 \mu\text{m}$ and $450 \mu\text{m}$).

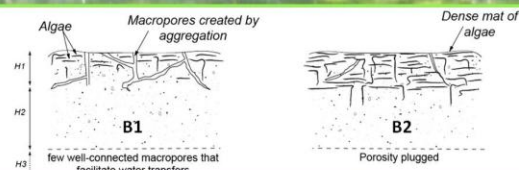
■ After removal of OM, differences in grain size distributions observed between basins were suppressed, especially for fine particles ($<63 \mu\text{m}$).

→ The large difference in K_s between B1 and B2 in H1 was not due to mineral clogging. So, it should be linked to biofilm.

Biological characterization



→ Difference in OM content between B1 and B2 in H1 was associated with algal biomass (5-fold higher in B2).



Macrophytes allélopathiques : des acteurs potentiels du « décolmatage » des sédiments de bassins d'infiltration ?

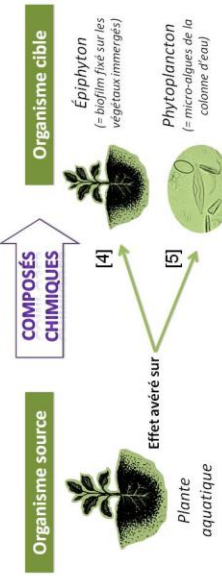
Morgane Gette-Bouvarot, Florian Mermillod-Blondin, Damien Lemoine, Cécile Delorme, Laura Etienne, Laurence Volatier
 LEHNA UMR5023, Laboratoire d'Ecologie des Hydrosystèmes Naturels et Anthropisés, Université Claude Bernard Lyon 1, ENTPE, CNRS, INRA, France



Contexte & Objectifs

Les bassins d'infiltration sont de plus en plus utilisés pour la gestion des eaux pluviales, ou pour la recharge des nappes phréatiques. Toutefois, leur fonctionnement est menacé par le colmatage des sédiments qui entraîne une diminution de leurs performances hydrauliques et environnementales. Le développement de « biofilms » à l'interface eau/sédiment participe activement aux processus de colmatage en diminuant la porosité du milieu et en créant un tapis colmatant par accumulation de biomasse [1]. Les biofilms désignent ici des assemblages microbiens principalement composés d'algues et de bactéries et vivant dans une matrice polymérique [2]. Nos précédents travaux ont révélé une influence majeure de la composante algale de ces biofilms sur la perméabilité des supports d'infiltration [3].

Dans le but de garantir la pérennité des ouvrages et la qualité des eaux infiltrées, cette étude vise à évaluer dans quelle mesure la présence de plantes aquatiques peut limiter le développement des biofilms, à travers des effets allélopathiques, i.e. la libération de composés chimiques (cf. figure ci-après) et/ou d'ombfrage.



Matériels & Méthodes

Approche expérimentale = mésocosmes extérieurs (systèmes clos), introduction de sédiments déjà colonisés provenant d'un bassin d'infiltration,



Introduction de 4 espèces de plantes, choisies pour leur caractère allélopathique, leur capacité d'ombfrage, leur système racinaire, leur capacité d'adaptation aux bassins d'infiltration et leur perméabilité.

Références

[1] P. Bayvre, P. Vandeweyer, B.L. Havel, P.C. Dolico, and D.S. de Lencastre, 1998, "Environmental Impact and Mechanisms of the Biological Clogging of Saturated Soil and Aquifer Materials", *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 28(2): p. 123-191.

[2] M.C. Charaldis and K.C. Marshall, 1995, *Biofilms*, Wiley & Sons.

[3] M. Gette-Bouvarot, F. Mermillod-Blondin, D. Lemoine, C. Delorme, D. Lemoine, L. Etienne, S. Loubser, and L. Volatier, 2013, "Scaling between hydrological and biological measurements highlights the key role of algal biofilms in infiltration basin performance", *Water Science and Technology*, 67(12): p. 2355-2362.

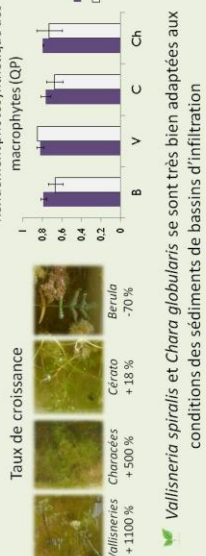
[4] D. Ghani and E.M. Grove, 2006, "Allelopathic actions of *Elymus scrolo* against epiphytes and phytoplankton", *Aquatic Botany*, 85(3): p. 203-211.

[5] B. Castel and U. Gohl, 1993, "Competition and allelopathy in aquatic plant communities", *The Ecological Review*, 5(1): p. 155-216.

[6] D. de Lencastre, F. Mermillod-Blondin, M.H. Barabgaehian, C. Hanae, and P. Mabit, 2012, "The ability of aquatic macrophytes to increase root porosity and radial oxygen loss determines their resistance to sediment anoxia", *Aquatic Botany*, 46(2): p. 191-209.

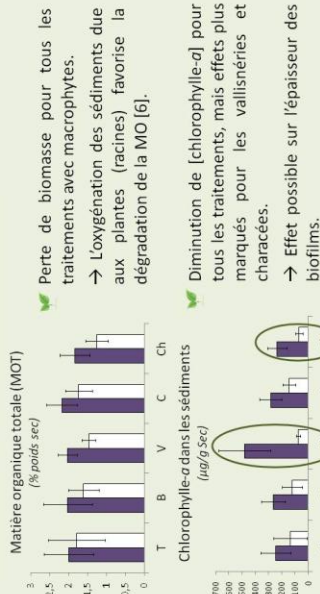
Résultats & Discussion

Etat physiologique des macrophytes



Vallisneria spiralis et Chara globularis se sont très bien adaptées aux conditions des sédiments de bassins d'infiltration

Effet des macrophytes sur la structure des biofilms



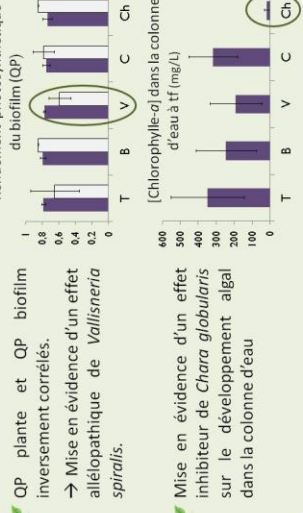
Perte de biomasse pour tous les traitements avec macrophytes.

→ L'oxygénation des sédiments due aux plantes (racines) favorise la dégradation de la MO [6].

Diminution de [chlorophyll-e-a] pour tous les traitements, mais effets plus marqués pour les Vallisneria et Characées.

→ Effet possible sur l'épaisseur des biofilms.

Effet des macrophytes sur le métabolisme des biofilms et sur les algues développées dans la colonne d'eau



QP plante et QP biofilm inversement corrélés.

→ Mise en évidence d'un effet allélopathique de Vallisneria spiralis.

Mise en évidence d'un effet inhibiteur de Chara globularis sur le développement algal dans la colonne d'eau

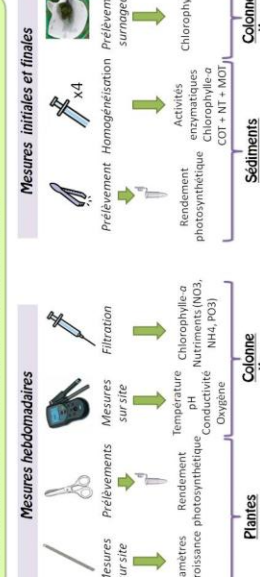
Conclusions & Perspectives

2 des 4 plantes testées dans cette étude (Vallisneria spiralis et Chara globularis) semblent présenter un effet inhibiteur sur la composante algale des biofilms développés dans des bassins d'infiltration.

Dans une prochaine expérimentation, ces 2 espèces seront testées in situ et associées à des mesures d'infiltration pour évaluer leurs effets sur le colmatage.

Espèce de macrophyte	Conditions naturelles	Caractère allélopathique avéré sur	Lieu de prélèvement	Notation
<i>Ceratophyllum demersum</i> L.	Cours d'eau lents Milieux stagnants	Cyanobactéries, diatomées, algues vertes	Lônes du Rhône	C
<i>Vallisneria spiralis</i> L.	Eaux tranquilles et peu profondes	Cyanobactéries	Lônes du Rhône	V
<i>Chara globularis</i> L.	Milieux stagnants oligotrophes	Cyanobactéries, algues vertes, diatomées	Lônes du Rhône	Ch
<i>Berula erecta</i> (Huds.) Coville	Cours d'eau lents Milieux stagnants	Diatomées	Lônes du Rhône	B

[4 traitements « avec plante » + 1 traitement témoin] x 4 réplicats = 20 mésocosmes. Durée de l'expérience : 6 semaines.



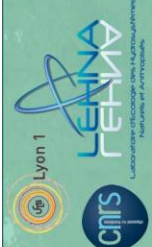
Les auteurs souhaitent également remercier Laurent Simon, Faik Vallier et Marc Danjean pour leur assistance technique précieuse lors des expérimentations.

Contact : morgane.gette@entpe.fr — laurence.volatier@entpe.fr

Ecological engineering to control bioclogging: an original field study coupling infiltration and biological measurements



Morgane Gette-Bouvarot, Florian Mermillod-Blondin, Laurent Lassabaterre, Damien Lemoine, Cécile Delblime, Yann Dejoilat and Laurence Volatier
 UMR-CNRS 5023, Laboratoire d'Ecologie des Hydrostèmes: Naturels et Anthropisés (LEHNA), Université Claude Bernard Lyon 1, France



Context

Infiltration basins are used in urban areas for flood protection, groundwater recharge and/or stormwater disposal. However, their functioning is often impacted by clogging, due to the combined and overlapping processes of pore occlusion by fine particles and biofilm development [1, 2].

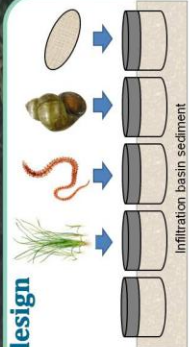
In a previous study, we showed that the phototrophic component of biofilms developed at the surface layer of infiltration systems could reduce by up to 60-fold the saturated hydraulic conductivity [3]. Consequently, it appears crucial to control biofilm growth to maintain infiltration media performances.

The present study aimed to test the influence of biotic and abiotic treatments on biofilm development and associated hydraulic properties in an infiltration basin designed for groundwater recharge.

Experimental design

Field enclosures consisting in stainless steel cylinders were set in approximately 10-12 cm in sediment of an infiltration basin (Lyon, France). Experiment was conducted for 6 weeks, from 1 October (10) to 8 November (11) 2013.

5 treatments were tested: a Control treatment; the macrophyte *Vallisneria spiralis* L. that could inhibit benthic biofilm by allelopathic activity [4]; the worm *Tubifex tubifex* that digs galleries in sediments (bioturbation) [5]; the snail *Viviparus viviparus* that acts as algae grazer [6]; and a treatment designed to simulate Shading and limit development of phototrophs.



Total of 25 enclosures (5 treatments, replicated 5 times)

Materials & Methods

Infiltration measurements



Infiltration was estimated under saturated conditions using the « falling head method ». A graduated tube (5cm in diameter, 1m height) was inserted to a depth of about 5mm in the sediment (to avoid lateral losses of water).

Water was poured into the tube until it reached the top, corresponding to time zero. Times were recorded for every centimeter drop to obtain an infiltration curve (t). Hydrodynamic parameters were then deduced. These measures were replicated 5 times per enclosure.

Measurements in the water column



In situ measurements of temperature, pH, electric conductivity and dissolved oxygen.

Nutrients concentration [NO₃⁻, NH₄⁺, and PO₄³⁻] in filtered water.

Sediment characterization

Sampling by coring of the 0-1 cm layer with a cut syringe (1 cm in diameter) in each enclosure.

Physical characterization

- Particle size distribution before and after ultrasound treatment to assess sediment texture and structure.
- X-ray computed tomography (CT scanning) applied on undisturbed sediment cores for 3D observations and quantitative measurements of sediment structure at a micro-scale.

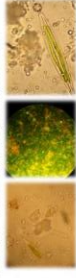
Variables associated with biofilm

- Structural state

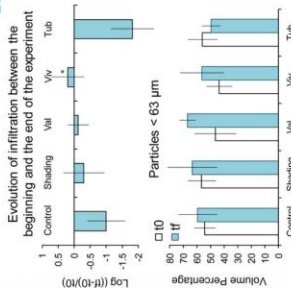
Scanning electron microscopy (SEM) to observe biofilm structure. Protein and sugar content to assess biofilm polymeric matrix. Chlorophyll-a content to estimate algal biomass. Bacterial counting to assess abundance of intact and damaged bacterial cells.

Functional state

Photosynthetic efficiency and activity to assess algal physiological state. Microbial enzymatic activities.



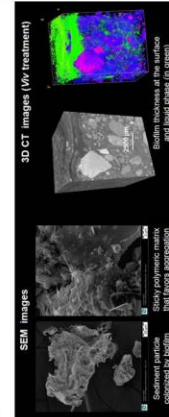
Results & Discussion



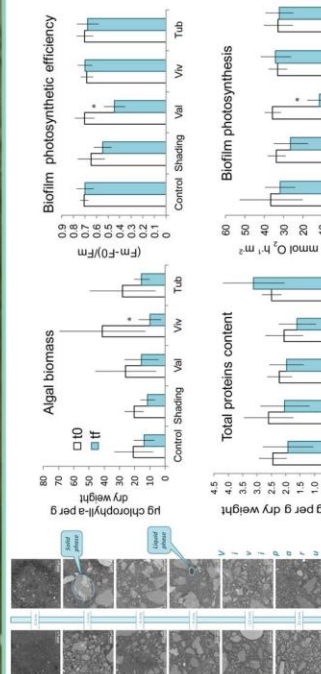
The infiltration rate globally decreased for Control and Tub treatments during the experiment, while it was maintained for Val and Shading, and presented an increase for Vv treatment.

Fine particle measurements showed no difference between treatment at tf so differences in infiltration between treatments are related to other parameters.

Influence of sediment structure and/or biofilm development ?



SEM and 3D CT images are under analyses and seem promising to evaluate the effects of each treatment on sediment and biofilm structures.



Viviparus viviparus treatment: A significant decrease in chlorophyll content without alteration of photosynthetic efficiency and activity; biofilm is less dense but more active compared to control.

- Hypothesis : Grazing reduces the algal biomass and stimulates the photosynthetic activity.

Shading and Vallisneria spiralis treatments: The biofilm photosynthetic efficiency and activity presented a decrease between to and tr, significant for Val treatment.

- Hypothesis : inhibition of photosystem II, but no associated effect on biomass at the time scale of the experiment.

Tubifex tubifex treatment: No effect on clogging in this experiment, despite interesting effects at lab-scale in sediment clogged by fine particles [5]. This result could be linked to the type of clogging, as algal and mineral cloggings could not be altered in the same way by tubificid worms.

Conclusions

Results obtained with *Viviparus viviparus*, Shading and *Vallisneria spiralis* treatments are very promising for the future development of ecological engineering solutions to prevent biological clogging in systems dedicated to infiltration. To our knowledge, this study is the first to highlight such “unclog”, potential role of macro-organisms under field conditions.

References

- [1] Kowalski, P., Doms, G., Hügels, J., and Goetz, J., 2011. "Clogging in subsurface flow bioreactors: Occurrence and contribution factors." *Ecological Engineering*, 37(2), 98-112.
- [2] Bakwa, P., Vanhaverbeke, P., Hoye, B. L., Dulaiova, P. C., and de Looze, D. S., 1998. "Environmental impact on mineral anions of the biological clogging of saturated soils and aquifer materials." *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 28(2), 123-191.
- [3] Gette-Bouvarot, M., Mermillod-Blondin, F., Delblime, C., Lemoine, D., Lassabaterre, L., Loizeau, S., and Volatier, L., "Coupling hydraulic and biological measurements highlights the key influence of algal biofilm on infiltration basin performance." *Ecology*, in press.
- [4] Buisson, R., and Volatier, L., 2006. "The potential of allelopathic macrophytes to control benthic biofilm growth—an eco-com approach." In prep.
- [5] Buisson, R., and Volatier, L., 2006. "The potential of allelopathic macrophytes to control benthic biofilm growth—an eco-com approach." *Freshwater Biology*, 51(8), 1458-1473.
- [6] Jakubik, B., 2009. "Food and feeding of *Viviparus viviparus* L. (Caudofoveata) in gammarus and river habitats." *Polish Journal of Ecology*, 57(2), 321-330.

Acknowledgments

We would like to thank Margot Jacquot, Thibault Estienne, Laurent Simon, Jean-Philippe Basset, Pauline and Marc-Etienne for their very helpful technical assistance during the experiments.

This research was financially and technically supported by the Greater-Lyon urban community and Veolia-Water.

Contact : morgane.gettebouvarot@entpe.fr ; mermillod@ecb.usherbrooke.ca

GRAND LYON
 UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD LYON 1
VEOLIA

II. Tableaux de données

II.1 Expérience 1

Composition physico-chimique des sédiments

Echantillon	Bassin	Horizon	Calcium (µg/g sec)	Aluminium (µg/g sec)	Fer (µg/g sec)	Souffre (µg/g sec)	Phosphore (µg/g sec)	Teneur en eau (% massique)
5_1 A H1	5_1	1	180000	2600000	5000000	1900	300,9403471	35,01
5_1 A H2	5_1	2	160000	2500000	5400000	600	223,6303435	12,34
5_1 A H3	5_1	3	150000	2200000	4900000	600	197,7321491	15,99
5_1 B H1	5_1	1	180000	2600000	5000000	1900	266,4979646	28,53
5_1 B H2	5_1	2	150000	2300000	5000000	1600	146,9800481	15,53
5_1 B H3	5_1	3	140000	2500000	5600000	1400	241,1181254	15,51
5_1 C H1	5_1	1	180000	2600000	5000000	1900	255,6052893	39,50
5_1 C H2	5_1	2	150000	2700000	5500000	1500	93,38521773	14,63
5_1 C H3	5_1	3	130000	2500000	5700000	1300	284,1087899	15,13
5_2 A H1	5_2	1	220000	4000000	6200000	2600	176,7823981	58,19
5_2 A H2	5_2	2	170000	3900000	7200000	1900	302,5935561	23,01
5_2 A H3	5_2	3	170000	2500000	5500000	1800	442,3043243	15,89
5_2 B H1	5_2	1	220000	4000000	6200000	2600	257,7004982	60,78
5_2 B H2	5_2	2	180000	3800000	6600000	2000	331,4396813	31,54
5_2 B H3	5_2	3	170000	1800000	4400000	600	264,6710038	15,99
5-2 C H1	5_2	1	220000	4000000	6200000	2600	311,3064034	57,35
5-2 C H2	5_2	2	160000	2900000	5800000	700	409,1972615	19,80
5-2 C H3	5_2	3	180000	2200000	4900000	1800	411,7783283	13,03

Caractérisation biologique des sédiments

Echantillon	Bassin	Horizon	C (% massique)	N (% massique)	Protéines (µg/g sec)	µgSucres/g Sec	µgCellulos e/gSec	Chloro a (µg/g sec)	Phéopigme nt (µg/g sec)	Nombre de bc /gsec	Taux bactéries lésées	FDA (µmol/g sec/h)
5_1 A H1	5_1	1	1,3394	0,1662	1988,674222	1977,991199	36261,22819	8,67	2,18	1,07E+09	15,88	0,615234462
5_1 A H2	5_1	2	0,0892	0,0128	147,9585912	886,4958731	3398,603946	0,07	0,07	2,56E+08	18,16	0,00399077
5_1 A H3	5_1	3	0,0629	0,0106	78,90939974	14,68282831	X	0,00	0,00	3,78E+08	16,08	0,000778666
5_1 B H1	5_1	1	2,2292	0,2528	1633,621185	582,9103963	X	13,44	2,22	1,43E+09	12,94	0,299809344
5_1 B H2	5_1	2	0,0639	0,0091	97,83380289	792,8436091	4543,709752	0,08	0,00	2,17E+08	21,82	0,002152317
5_1 B H3	5_1	3	0,0385	0,0075	70,81253415	4,951504477	29,70902686	0,00	0,00	2,27E+08	28,61	0,001838236
5_1 C H1	5_1	1	1,5193	0,1731	1344,841781	3119,481187	33018,89542	5,20	3,06	9,42E+08	24,70	0,508612114
5_1 C H2	5_1	2	0,1033	0,0137	163,8791669	425,5529996	4230,873434	0,08	0,05	4,86E+08	11,78	0,005196204
5_1 C H3	5_1	3	0,0316	0,0076	87,07519349	4,963971774	2,481985887	0,00	0,00	2,51E+08	33,33	0,000900891
5_2 A H1	5_2	1	2,5784	0,3106	3768,135859	3643,862495	18621,98604	72,63	2,33	6,73E+08	14,13	1,202772571
5_2 A H2	5_2	2	0,5784	0,0694	458,5401526	1304,420028	4066,257572	0,42	0,84	4,19E+09	12,34	0,057733874
5_2 A H3	5_2	3	0,0434	0,0076	78,17954305	9,893046154	27,18478036	0,00	0,00	2,87E+08	33,03	0,000995438
5_2 B H1	5_2	1	2,6188	0,3250	5300,896828	3665,307945	42048,67628	53,61	1,36	1,62E+09	21,95	1,063161653
5_2 B H2	5_2	2	0,4851	0,0604	386,6111687	1173,960392	3695,838437	0,32	0,77	4,26E+09	12,20	0,054930167
5_2 B H3	5_2	3	0,0455	0,0071	53,77901615	2,457215569	12,28607784	0,00	0,00	3,23E+08	23,17	0,002484301
5-2 C H1	5_2	1	0,2549	0,0371	3798,115285	3325,222679	26271,75768	31,74	3,21	1,49E+09	20,24	0,979267508
5-2 C H2	5_2	2	2,5118	0,3154	331,5801873	1178,861745	3656,331915	0,15	0,28	6,93E+08	11,63	0,029394382
5-2 C H3	5_2	3	0,0450	0,0068	52,06576069	4,92426	7,38639	0,00	0,00	2,68E+08	26,16	0,000968432

Résultats de l'algorithme BEST

Référence :	Basin 5.1-11 Without Algae	Basin 5.1-12 Without Algae	Basin 5.1-13 Without Algae	Basin 5.1-14 Algae CONT psd 2	Basin 5.1-15 Algae CONT psd 2	Basin 5.1-16 Algae CONT psd 2	Basin 5.2-14 Without Algae	Basin 5.2-15 Without Algae	Basin 5.2-16 Without Algae	Basin 5.2-11 Algae CONT psd 2	Basin 5.2-12 Algae CONT psd 2	Basin 5.2-13 Algae CONT psd 2
r disk (mm)	65	65	65	65	65	65	65	65	65	65	65	65
hsurf (mm)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
rod (g/cm3) corr cailloux	1,559	1,566	1,566	1,566	1,566	1,566	1,564	1,564	1,564	1,564	1,564	1,564
teta_0	0,1482	0,1259	0,1259	0,1259	0,1259	0,1259	0,0755	0,0755	0,0755	0,0755	0,0755	0,0755
teta_S	0,4118	0,409	0,409	0,409	0,409	0,409	0,4099	0,4099	0,4099	0,4099	0,4099	0,4099
M	0,4606	0,4606	0,4606	0,1657	0,1657	0,1657	0,4606	0,4606	0,4606	0,1657	0,1657	0,1657
N	3,708	3,708	3,708	2,3972	2,3972	2,3972	3,708	3,708	3,708	2,3972	2,3972	2,3972
M.N	1,708	1,708	1,708	0,3972	0,3972	0,3972	1,708	1,708	1,708	0,3972	0,3972	0,3972
Dg (µm)	586,3302	586,3302	586,3302	877,1743	877,1743	877,1743	586,3302	586,3302	586,3302	877,1743	877,1743	877,1743
m	0,2959	0,2964	0,2964	0,0938	0,0938	0,0938	0,2962	0,2962	0,2962	0,0938	0,0938	0,0938
n	2,8406	2,8424	2,8424	2,2071	2,2071	2,2071	2,8419	2,8419	2,8419	2,207	2,207	2,207
m.n	0,8406	0,8424	0,8424	0,2071	0,2071	0,2071	0,8419	0,8419	0,8419	0,207	0,207	0,207
eta	6,0833	6,0778	6,0778	13,5627	13,5627	13,5627	6,0794	6,0794	6,0794	13,568	13,568	13,568
cp	1,63	1,6295	1,6295	2,1754	2,1754	2,1754	1,6296	1,6296	1,6296	2,1757	2,1757	2,1757
S (mm/s ^{1/2}) Best.l ou BEST.q	1,0886	2,1591	2,9477	0,9648	0,9559	1,2065	2,2212	2,1914	1,8951	0,8186	0,6854	0,6791
Ks (mm/s) Best.l ou BEST.q	0,0311	0,1583	0,4223	0,2101	0,0787	0,0052901	0,1726	0,2047	0,0418	0,001535	0,0012503	0,0042212
alfa-l (mm)	23,4138	18,0872	12,6371	2,0366	5,3379	126,4828	17,5426	14,3982	52,7312	200,6361	172,7032	50,2191
alfa-t (sec)	753,996	114,352	29,9483	9,6938	67,8393	23909	101,6515	70,3482	1261,8	130710	138120	11897
alfa-h (mm)	88,8233	63,89	44,6382	7,1938	18,8551	446,7778	52,46	43,0568	157,6889	599,9882	516,457	150,1768
alfa-teta	0,2636	0,2831	0,2831	0,2831	0,2831	0,2831	0,3344	0,3344	0,3344	0,3344	0,3344	0,3344
alfa-K	0,0311	0,1582	0,422	0,2101	0,0787	0,0052901	0,1726	0,2047	0,0418	0,001535	0,0012503	0,0042212
lambda-teta	0,4118	0,409	0,409	0,409	0,409	0,409	0,4099	0,4099	0,4099	0,4099	0,4099	0,4099
lambda-K	0,0311	0,1583	0,4223	0,2101	0,0787	0,0052901	0,1726	0,2047	0,0418	0,001535	0,0012503	0,0042212
lambda-h	88,8233	63,89	44,6382	7,1938	18,8551	446,7778	52,46	43,0568	157,6889	599,9882	516,457	150,1768
xm (mm)	0,0838	0,1165	0,1667	1,0344	0,3947	0,0167	0,1418	0,1728	0,0472	0,0124	0,0144	0,0496
zm (mm)	0,0838	0,1165	0,1667	1,0344	0,3947	0,0167	0,1418	0,1728	0,0472	0,0124	0,0144	0,0496
hg (mm)	-77,575	-55,9212	-39,0706	-8,083	-21,1856	-502	-45,4396	-37,2948	-136,5864	-668	-575	-167,2001
alfa_ratio	2,0663	2,0655	2,0655	2,4814	2,4814	2,4814	2,0658	2,0658	2,0658	2,4815	2,4815	2,4815
hgpw	-77,575	-55,9212	-39,0706	-8,083	-21,1856	-502	-45,4396	-37,2948	-136,5864	-668	-575	-167,2001
teta_R pw	0,0671	0,0573	0,0573	0,0216	0,0216	0,0216	0,0345	0,0345	0,0345	0,0129	0,0129	0,0129
hgmw	-62,7824	-46,7537	-32,6655	-6,22	-16,3027	-386,2988	-40,9367	-33,599	-123,0511	-572,0483	-492,4069	-143,1834
hgmd	-129,7294	-96,5717	-67,472	-15,4346	-40,454	-958,5731	-84,5657	-69,4077	-254,195	-1419,6	-1221,9	-355,3151
COMMENTS	No Comments	No Comments	No Comments	No Comments	No Comments	No Comments	No Comments	No Comments	No Comments	No Comments	No Comments	No Comments
Y1	139,9885	136,3543	137,75	69,8409	94,0215	160,8851	131,5103	130,0794	143,3666	133,2204	143,261	138,3582
X0	-63,8957	-62,2369	-62,874	-31,8779	-42,9147	-73,4337	-60,026	-59,3729	-65,4376	-60,8065	-65,3894	-63,1516
X1	12,7791	12,4474	12,5748	6,3756	8,5829	14,6867	12,0052	11,8746	13,0875	12,1613	13,0779	12,6303
X2	76,6748	74,6843	75,4488	38,2534	51,4977	88,1204	72,0312	71,2474	78,5251	72,9678	78,4673	75,7819
lambda-c (White et Sully)	79,4698	57,2154	39,9748	8,6073	22,5597	534,5599	47,0183	38,5905	141,3317	717,9606	618,005	179,7052
lambda-m (White et Sully)	0,0936	0,1301	0,1862	0,8645	0,3299	0,0139	0,1583	0,1928	0,0527	0,0104	0,012	0,0414
dim fractale s	0,6759	0,6753	0,6753	0,6753	0,6753	0,6753	0,6755	0,6755	0,6755	0,6755	0,6755	0,6755
dens. apparente mesurée (g/cm3)	1,559	1,566	1,566	1,566	1,566	1,566	1,564	1,564	1,564	1,564	1,564	1,564
% cailloux NON poreux >2mm	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
% cailloux poreux >2mm	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Shape index PSD	1,1694	1,1694	1,1694	0,3407	0,3407	0,3407	1,1694	1,1694	1,1694	0,3407	0,3407	0,3407
Water ret curve Shape index	0,6487	0,6498	0,6498	0,1893	0,1893	0,1893	0,6495	0,6495	0,6495	0,1893	0,1893	0,1893
BETA	0,6331	0,6281	0,6281	0,8398	0,8398	0,8398	0,6186	0,6186	0,6186	0,8341	0,8341	0,8341
GAMMA	0,5822	1,0159	0,5992	0,8726	1,0757	0,6	0,7392	0,8107	0,8057	0,6005	0,6	0,6007
Erreur sur l Erl	8,73E-03	0,0285	0,0087575	0,0104	0,0319	0,0805	0,0053674	0,003351	0,0159	0,0811	0,0943	0,0446
RMSEI	0,0102	0,0334	0,0103	0,0128	0,0391	0,0986	0,0062748	0,0039132	0,0186	0,0986	0,1147	0,0546
Erreur sur q Erq	0,2022	0,0808	0,1144	0,0634	0,0866	0,2524	0,1045	0,1671	0,1564	0,1828	0,2913	0,1697
RMSEq	0,1986	0,0776	0,109	0,0618	0,0844	0,2647	0,0981	0,1566	0,1475	0,1797	0,3044	0,1689

II.2 Expérience 2

Physico-chimie de la colonne d'eau des mésocosmes

		O2 (mg/L)	Ecart-type	δ (µS/cm)	Ecart-type	pH	Ecart-type	T	Ecart-type	NH4+	Ecart-type	NO3-	Ecart-type	PO4	Ecart-type
to	T	10,9525	0,4990908	198	18,131189	9,33	0,2428992	20,55	0,2516611	2,41425	0,7834272	0,02475	0,0061305	14,472	7,5202563
	Berula	10,4425	0,9582058	190,325	12,126383	9,295	0,308707	19,9	0,2160247	5,67475	2,7528211	0,017	0	13,72975	2,0991643
	Valli	9,9425	1,0873324	206,225	32,00483	9,23	0,1679286	20,175	0,3947573	2,986	1,5350954	0,013	0,0046188	15,28325	2,6112263
	Cerato	10,6625	0,7676099	207,85	24,63852	9,3825	0,0585235	20,675	0,340343	3,8115	2,9586256	0,019	0,004	12,9875	1,9163522
	Chara	11,0125	1,9936294	194,4	10,707318	9,175	0,1884144	20,3	0,4546061	3,367	1,2167659	0,015	0,0076594	13,4275	1,3543925
t1	T	10,4075	2,0364409	268,25	37,526657	9,44	0,5409251	21,725	0,35	18,07225	4,4061414	0,1195	0,0200915	9,051	3,2792548
	Berula	11,185	0,8867356	256,5	22,173558	9,5325	0,2582473	21,4	0,3559026	23,433	3,9019704	0,135	0,0443697	8,8935	3,2943493
	Valli	8,7525	2,4248488	297,5	28,431204	9,1275	0,7684346	21,325	0,3095696	24,30875	7,1317884	0,1035	0,0189121	8,8935	1,2788436
	Cerato	7,5625	3,4689804	295,75	40,458827	9,055	0,7747042	21,875	0,6130525	23,608625	8,4362709	0,10825	0,0129196	10,569	2,7714761
	Chara	7,3025	3,6368519	303,25	47,563116	8,6875	0,8878579	21,725	0,2872281	21,154625	6,5580034	0,1075	0,0356885	9,282	4,0419772
t2	T	9,21	1,2353137	216,2	37,583596	8,7575	0,4929757	17,35	0,3	27,81125	6,0390924	0,1095	0,0193993	6,75625	1,3973788
	Berula	9,63	0,7772173	210,775	17,6466	8,92	0,2738613	17,525	0,2872281	15,256	3,8593242	0,1725	0,075602	8,1026667	1,4735
	Valli	8,315	2,4716324	243,75	42,742446	8,495	0,6804165	17,425	0,3304038	41,477	6,1451557	0,10775	0,0311595	10,146	2,6626064
	Cerato	8,205	2,3662417	254,25	42,515683	8,62	0,6760671	17,2	0,0816497	16,7275	8,9385686	0,105	0,0267208	6,0195	1,2157117
	Chara	6,44	3,8649795	256,25	53,243935	8,23	0,7289719	17,6	0,3464102	32,846	10,308448	0,103	0,0202155	7,934	1,2495047
t3	T	9,55	3,3567941	198,325	21,462118	8,9025	0,669745	18,1	0,5228129	9,341	5,573437	0,06675	0,021762	6,83775	1,6485402
	Berula	12,295	1,0469161	170,625	12,052489	9,6525	0,2651258	17,75	0,341565	13,911	5,2074434	0,064	0,006	6,83775	1,6485402
	Valli	11,01	1,3279809	201,7	36,796286	9,335	0,61	17,975	0,499166	21,696	4,8193326	0,0535	0,0151548	8,312	0,7094796
	Cerato	11,9075	2,3467051	197,075	36,457407	9,495	0,7483537	19	0,4320494	11,706	9,89	0,0585	0,0124499	7,575	0,9410731
	Chara	11,7	2,2182125	205,9	48,904397	9,1925	0,6414762	18,25	0,7187953	33,566	11,973397	0,0515	0,0179907	8,312	0,7094796
t4	T	10,265	4,7037326	215,2	54,976904	8,6475	0,7735793	23	0,5291503	13,04675	6,8462463	0,071	0,0146059	4,17975	0,7515
	Berula	15,62	3,0864327	160,25	16,39197	9,315	0,5233546	23,225	0,4645787	16,757	6,7442795	0,0746667	0,0063509	3,804	1,2271944
	Valli	12,46	1,2445347	172,975	13,830251	9,2375	0,3402328	22,775	0,6130525	13,32575	6,1581594	0,065	0,004	5,30725	1,2276026
	Cerato	13,3075	2,8216824	178,15	34,495265	9,48	0,7655064	23,375	0,4924429	21,56075	5,623727	0,0683333	0,0046188	4,17975	1,4390129
	Chara	13,8375	1,6663408	176,95	29,064583	9,145	0,4935247	23,325	0,6751543	11,380667	3,8104935	0,063	0,006532	4,5555	0,8677575
t5	T	13,7575	5,7545887	203,8	42,967197	8,985	0,8214824	24,525	0,8057088	2,08625	0,4087154	0,096	0,0095568	6,48375	1,1467695
	Berula	16,54	2,84305	165,325	10,230469	9,6875	0,2171597	24,2	0,1632993	3,18225	1,3847947	0,08275	0,0072284	8,239	1,3442277
	Valli	12,3275	1,4184587	168,75	13,943816	9,39	0,1885029	24,125	0,2217356	3,21975	1,1329523	0,07725	0,0061305	7,537	0,702
	Cerato	15,93	4,7449271	184,7	15,854547	9,6525	0,6483505	24,25	0,2380476	4,5273333	1,819741	0,0873333	0,0040415	6,83475	1,7669924
	Chara	15,8525	3,0441132	158,425	2,1484491	9,58	0,3249615	24,675	0,2753785	2,7586667	1,1715342	0,0755	0,0071414	8,59	1,8125562
tf	T	13,78	4,1993571	155,9	15,619219	9,6975	0,6752962	19,825	0,6601767	2,105	0,2066253	0,08625	0,0198893	7,537	0,702
	Berula	15,615	1,2106885	145,175	7,0334321	10,1975	0,3297853	20,075	0,5315073	2,49575	0,3943572	0,081	0,0176446	6,83475	1,3446629
	Valli	12,885	1,3770137	142,775	7,2848587	9,84	0,1442221	19,725	0,3947573	5,058	5,6971407	0,066	0,0046188	6,48375	1,1467695
	Cerato	16,68	4,5012961	165,975	10,647183	10,08	0,6691288	19,925	0,2872281	2,684	0,847	0,094	0,0196469	7,186	0,8105998
	Chara	16,065	1,735982	135,525	1,985573	10,16	0,1385641	20,375	0,3593976	2,30725	0,1958186	0,064	0,0063246	5,7815	0,8111771

Caractérisation du biofilm des sédiments

Echantillon	traitement	N (% massique)		COT (% massique)		Efficacité photo		Activité phosphatase		Activité hydrolitique	
		t0	tf	t0	tf	t0	tf	t0	tf	t0	tf
T1	Témoïn	0,08306945	0,06676363	0,64065675	0,50749661	0,762	0,56695	39,692122	23,95994	1,6747368	1,3131699
T2	Témoïn	0,09958264	0,06927923	0,78515993	0,54626939	0,769	0,85	36,967731	35,234648	0,9962713	1,0478311
T3	Témoïn	0,15190706	0,1697	1,11799216	1,3008	0,799	0,85	70,724522	55,544538	1,7081872	1,3123309
T4	Témoïn	0,07834378	0,08736641	0,62850698	0,72330115	0,811	0,81685	24,516606	20,167458	0,6553726	1,0400306
B1	Berula	0,10690333	0,07453814	0,83293202	0,59371005	0,822	0,85	41,453269	39,223058	1,5153448	1,7432865
B2	Berula	0,10112403	0,06243241	0,78504546	0,48603891	0,798	0,85	35,558841	22,282353	1,2447733	1,3264344
B3	Berula	0,11774086	0,12404941	0,88630001	0,93281686	0,802	0,85	39,268021	37,246626	1,5587186	1,6210512
B4	Berula	x	x	x	x	0,749	0,85	32,929687	25,061224	0,9476433	1,3428735
V1	Valli	0,1252	0,0781	0,9637	0,6267	0,758	0,72845	40,576603	31,046882	1,6982139	1,561337
V2	Valli	0,13008873	0,07328878	0,98353225	0,61003751	0,754	0,6001	48,777785	45,930455	1,2912042	1,448027
V3	Valli	0,0827	0,0570	0,6774	0,4844	0,769	0,4726	35,778533	21,783754	1,6803907	1,2115594
V4	Valli	0,0772	0,0507	0,6271	0,3909	0,788	0,56695	26,647004	18,07068	1,1911261	1,1746314
C1	Cerato	0,1015	0,1050	0,7815	0,7689	0,792	0,85	30,351528	24,815347	0,986664	1,2622973
C2	Cerato	0,09976277	0,0732	0,73714348	0,6100	0,769	0,85	61,572338	35,314126	1,3322833	1,3120871
C3	Cerato	0,0986	0,0898	0,7888	0,7188	0,689	0,595	43,320374	39,666621	1,4278309	1,4662914
C4	Cerato	0,1038	0,0697	0,8827	0,5796	0,742	0,85	47,323324	41,887368	1,6277009	1,4671223
Ch1	Chara	0,1101	0,0613	0,8589	0,4759	0,719	0,85	34,647028	53,719936	1,3977122	1,5148983
Ch2	Chara	0,1033	0,0591	0,7597	0,4517	0,785		40,162544	49,180089	1,3799197	1,3999767
Ch3	Chara	0,0707	0,0771	0,7302	0,6448	0,801	0,85	29,855934	31,581729	1,3252742	1,7513878
Ch4	Chara	0,0837	0,0525	0,6930	0,3624	0,699	0,85	32,113834	20,129052	1,190625	1,5663609

						rouge : algues sur le filtre				
	Masse volumique des sédiments (g/L)	Teneur en eau des sédiments = Meau/Mtotale (%)	Masse volumique des sédiments (gSEC/L)	Contenu en chloro-a du biofilm des sédiments (µg/g sec)	Contenu en chloro-a total du biofilm des sédiments (µg/bac)	contenu en chloro-a dans la colonne d'eau (µg/L)	Contenu en chloro-a dans colonne d'eau (µg/bac)	Contenu en chloro-a des filamenteuses (µg/gsec)	Masse sèche des filamenteuses (g)	Contenu en chloro-a total des filamenteuse (µg / bac)
T1	3003,168855	32,33830846	2031,994847	8,748885523	23875,43807	1,384814286	40,85202143	559,35392	3,698001003	2068,491357
T2	3444,092349	27,76699029	2487,771561	12,3944043	41410,6617	0,490542857	14,47101429	724,083551	1,169318716	846,684481
T3	3343,594387	42,27318046	1930,150698	35,50995249	92048,6285	38,03751836	1122,106792	2605,911705	4,069777462	10605,48072
T4	3320,95971	21,5010142	2606,919691	5,197717633	18197,69358	1,239730886	36,57206114	3367,832056	1,200710948	4043,792821
T5	3275,690358	24,92725509	2459,150666	5,725139773	18908,07187	3,034087639	89,50558536	2152,10369	8,314825083	17894,36574
T6	2889,995473	24,92725509	2169,598929	11,20154741	32638,74807	2,944364295	86,85874671	2293,991964	5,357839613	12290,84102
B1	3375,282933	25,07903056	2528,794695	19,54268828	66370,31658	0,628374865	18,53705852	2707,841827	1,670277701	4522,847822
B2	2951,561793	22,44318182	2289,137413	4,685616724	14405,04559	1,167240845	34,43360492	1316,551228	5,250757883	6912,891736
B3	3067,451335	30,76923077	2123,620155	17,80583457	50782,62959	30,41630562	897,2810157	2348,980142	2,162422113	5079,486603
B4	3119,058397	24,2074928	2364,012561	6,637392451	21072,85066	9,475957049	279,5407329	1956,330935	1,215680252	2378,272885
V1	3195,11091	29,17093142	2263,067298	8,726530319	26522,53819	2,17711225	64,22481139	2228,170704	4,019294817	8955,674961
V2	2581,258488	29,17093142	1828,281345	17,70081234	43462,25327	2,117419667	62,46388019	3154,442513	2,742855701	8652,180632
V3	3259,393391	27,46268657	2364,2764	7,729002372	24541,30768	299,3755217	8831,577891	2790,115922	1,536299257	4286,453019
V4	3203,259393	26,76720075	2345,836521	5,826348125	18355,66767	2,67277954	78,84699644	815,6226877	2,590428975	2112,812643
C1	3138,071526	29,82954545	2201,999053	16,54018645	48914,04079	22,61790007	667,2280522	1563,042287	5,305217078	8292,278635
C2	2759,619737	32,55587949	1861,201261	7,067292284	17665,3564	0,894271429	26,38100714	1302,994676	3,645900753	4750,589269
C3	3184,246265	32,44739756	2151,04122	16,53954063	47780,2248	12,58869796	371,3665897	4543,165222	2,304913662	10471,60359
C4	2999,547306	34,93975904	1951,512705	16,99318679	44537,12995	37,87296479	1117,252461	903,9956288	5,253078214	4748,759743
Ch1	3157,084654	28,04391218	2271,714606	4,588005327	13997,60379	0,314187433	9,26852926	0	0,029932812	0
Ch2	2796,740607	28,04391218	2012,425127	9,777946134	26426,72737	4,490053456	132,456577	2185,181941	2,019709669	x
Ch3	3245,812585	36,64864865	2056,266135	9,697312195	26779,76202	1,384814286	40,85202143	2523,249069	0,090732194	228,9399245
Ch4	3203,259393	26,02880658	2369,489201	6,079725641	19347,04883	5,709782594	168,4385865	1512,393584	0,862337267	1304,193349

Caractérisation des macrophytes

Echantillon	Traitement	Biomasse plantes		Efficacité photo	
		Biomasse plante to	Biomasse plante tf	Phi plante t0	Phi plante tf
B1	Berula	28,5	22,14	0,813	0,56695
B2	Berula	24,2	1,7	0,749	0,7225
B3	Berula	33,5	12,731	0,791	0,646
B4	Berula	29,5	3,65	0,801	0,7225
V1	Valli	13,06	40,29	0,785	x
V2	Valli	13,82	28,41	0,769	0,85
V3	Valli	10,2	17,47	0,811	0,85
V4	Valli	15,9	25,52	0,862	0,85
C1	Cerato	29,652	24,64	0,754	0,748
C2	Cerato	20,846	18,68	0,796	0,6392
C3	Cerato	25,732	21,9	0,698	0,7429
C4	Cerato	16,73	18,25	0,812	0,5729
Ch1	Chara	20,1	41,69	0,795	0,85
Ch2	Chara	24,5	x	0,745	0,85
Ch3	Chara	22,2	66,07	0,788	0,74035
Ch4	Chara	29,8	52,53	0,795	0,59075

II.3 Expérience 3

Caractérisation du biofilm des sédiments

Echantillon	Traitement	Temps	Chloro	Phéo	Bactéries	Tauxléesées	Sucres	Prot	Activité phosphatase	Activité hydrolytique	Efficacité photo	Photosynthèse	Teneur en eau
T1	T	t0	7,815895646	3,446784766	5812192691	14,56723338	3,97190	1,95981	217,3754562	0,054931706	0,745	30,61	43,0523918
T2	T	t0	7,77922575	7,204124004	10318470997	13,95631068	4,34382	3,11997	305,0557609	0,052016594	0,712	17,055	58,64527629
T3	T	t0	21,33307515	8,235624848	4614271778	17,51442056	3,69301	2,21454	280,9448087	0,06176448	0,694	54,615	47,8313253
T4	T	t0	4,189491974	6,195403859	3482954961	12,17447917	7,22873	2,82356	226,0830151	0,047420327	0,648		43,22580645
T5	T	t0	10,69170397	6,35253845	4667246295	12,57449344	8,75499	1,97293	200,4625489	0,061730688	0,742		43,15196998
T6	T	t0	4,242503276	4,590187079	13439126770	13,95486936	22,97758	2,63281	327,8610227	0,042111018	0,698	44,145	57,77559055
Omb1	Omb	t0	29,42962517	39,87912483	6853457171	20,13758599	5,19051	3,53744	293,2635022	0,072466446	0,688	30,4275	53,90804598
Omb2	Omb	t0	11,2176291	15,02664173	5946510034	18,8101983	5,92433	3,37433	251,735769	0,050687764	0,618	37,05	52,38095238
Omb3	Omb	t0	11,1164856	10,32960577	4574833568	20,13888889	11,15315	2,92754	254,7587505	0,051277515	0,478		47,76699029
Omb4	Omb	t0	13,52737087	6,602277374	3884056339	12,12121212	7,62139	2,00666	215,4334172	0,035774072	0,658		51,54639175
Omb5	Omb	t0	6,948818848	6,002567291	2997722937	21,0251046	6,09763	1,27833	207,7558797	0,04038514			36,94374475
Omb6	Omb	t0	8,601777078	8,450325487	4835663627	13,94658754	6,18485	2,44175	263,3720835	0,035034677	0,801		53,61842105
Val1	Val	t0	6,057978115	3,621625845	11320921783	13,91661773	2,89045	2,42948	285,3841844	0,057495251	0,744	36,375	57,8891258
Val2	Val	t0	4,929521849	4,181185222	4113555938	16,71686747	13,13579	2,48675	251,8366013	0,035789432	0,648	39,61	56,41025641
Val3	Val	t0	6,03242262	3,621636786	4921948912	18,59137056	2,20173	1,62064	164,4438388	0,045821363	0,579	31,305	46,34448575
Val4	Val	t0	14,79331092	10,77261873	3137358173	16,4882227	4,12033	4,60843	326,7030584	0,054941834	0,688		60,12269939
Val5	Val	t0	18,79974084	7,897578752	7816757799	14,12056152	4,08405	2,64322	230,3782649	0,056064378	0,758		47,53488372
Val6	Val	t0	25,61596931	8,723729183			6,84997	1,91600	271,5014151	0,044746868	0,809		54,27027027
Viv1	Viv	t0	15,61879227	6,950862905	3235021869	12,69709544	4,03031	2,06214	183,6990932	0,030164639	0,744	28,69	35,18900344
Viv2	Viv	t0	43,03403548	7,810914019	8246408690	18,23229986	4,66686	2,79120	274,3430842	0,049865539	0,658	32,47	50,22371365
Viv3	Viv	t0	29,00812725	8,933951956	7074524900	17,07624449	3,98450	2,88121	250,850072	0,053448034	0,698	38,16	54,07636739
Viv4	Viv	t0	39,58002431	11,1551242	5652696234	18,5019564	2,92314	1,57725	239,3807752	0,062590587	0,713		44,68784228
Viv5	Viv	t0	33,04501133	4,531277325	6013122380	6,917885264	7,60603	1,34717	230,4723932	0,038099643	0,709		50,67264574
Viv6	Viv	t0	7,41417166	5,248264888	4395266363	9,31198102	3,10035	1,68214	159,6268771	0,031972193	0,589		30,43912176
Tub1	Tub	t0	7,469943539	7,647569415	2643336538	16,35555556	4,09304	2,20290	220,823358	0,034674225	0,812	24,23	41,10032362
Tub2	Tub	t0	25,88929816	6,337497952	6845413520	18,12469792	5,65261	2,96601	265,7115162	0,049920787	0,745	35,62	47,67676768
Tub3	Tub	t0	4,40114671	3,887808514	10310304176	14,97191011	3,09541	2,28226	206,5206036	0,060221129	0,687	38,625	53,36734694
Tub4	Tub	t0	20,20748897	7,53336411	11436834974	17,37331954	5,73412	2,28698	308,8073807	0,045493753	0,715		55,07075472
Tub5	Tub	t0	12,5391093	6,126634286	10270906042	22,98025135	5,79811	5,84374	407,2861591	0,068860882	0,655		67,04980843
Tub6	Tub	t0	22,82662265	5,764907963	6320260641	12,28070175	22,69013	2,73657	303,8057118	0,05316579	0,604		56,14035088
T1	T	tf	0,092720735	0,034998563	3217600297	13,82978723	11,5044106	1,699940572	29,39125759	0,046014323	0,732	38,43	34,21400264
T2	T	tf	15,06487242	8,106888551	5197703303	12,73801707	40,68864257	3,609359654	60,95541493	0,054709587	0,723	33,315	49,3656286
T3	T	tf	7,711797473	6,097250146	2180076911	14,71442401	11,67672022	1,269180899	42,58642495	0,039608404	0,645	24,07	35,15731874
T4	T	tf	7,844065914	5,884301433	2825626776	19,7080292	42,44755864	2,118596397	42,15094486	0,058699766	0,578	39,93	31,83940243
T5	T	tf	3,869566151	3,209757521	9716660993	14,10807144	1,426366335	1,475342807	29,8614449	0,043844999	0,788	20,58	29,47259566
T6	T	tf	5,454176487	3,733708128	2592515891	15,61771562	3,662421518	1,355837032	28,34325349	0,031109385	0,741	35,205	22,67303103
Omb1	Omb	tf	11,93115279	8,357351878	2596311733	11,23188406	9,58564563	2,730601547	52,14905745	0,073255241	0,455	25,935	41,64037855
Omb2	Omb	tf	7,00860425	5,107792147	2414773235	8,507223114	8,480635743	1,951855746	36,96570916	0,064884685	0,601	15,55	32,71413829
Omb3	Omb	tf	7,324120422	6,853860347	6598515187	11,65644172	38,45258012	3,234403538	42,68856325	0,060478985	0,496	20,09	36,73163418
Omb4	Omb	tf	3,985196533	2,336352762	2659663033	10,87435709	0,629361908	0,963164359	28,92412583	0,053984255	0,655	36,315	28,75667429
Omb5	Omb	tf	11,66567161	5,137873844	4502945809	8,733153639	14,18601678	1,285529949	35,28728276	0,066337381	0,489	34,185	36,7278798
Omb6	Omb	tf	42,97778746	11,6834738	12999307595	10,74249605	5,011144494	2,073368302	64,59918237	0,072629024	0,587		49,60491659
Val1	Val	tf	23,65895729	10,66546482	16376624811	12,21551324	18,96083688	3,105296182	51,70619484	0,062176564	0,365	15,33	42,98245614
Val2	Val	tf	4,649753436	3,261400411	4444087502	9,090909091	9,779859778	1,97161734	42,95831644	0,039761293	0,412	13,815	32,89036545
Val3	Val	tf	15,33980718	7,757008742	3865824754	10,22400919	10,05382215	1,373030251	31,15282313	0,058673912	0,401	3,29	20,46728972
Val4	Val	tf	7,072171432	4,042977083	4940469664	12,7963869	11,00732407	1,66949846	34,21704026	0,051739267	0,437	5,16	29,39393939
Val5	Val	tf	22,41670929	6,25374943			10,239536	1,699252106	34,33145602	0,04335734	0,443	13,41	28,25112108
Val6	Val	tf	7,580514272	6,502122092	4871938916	11,94581281	14,31811415	2,010784359	47,5879304	0,058286466	0,622	19,08	34,22263109
Viv1	Viv	tf	2,463162318	2,169419842	3355838363	19,09814324	3,892440575	1,136202706	26,48550592	0,053177717	0,769	45,075	21,87822497
Viv2	Viv	tf	18,67621919	7,702184168	4058051647	11,06955871	11,15028659	1,254363136	39,26176273	0,070526658	0,701	25,67	22,76051188
Viv3	Viv	tf	4,387150496	5,063574142	5164513209	11,92425793	22,50301906	2,660248627	48,41382218	0,056539434	0,587	25,42	38,79310345
Viv4	Viv	tf	3,480140744	4,109296485	9549739742	11,84210526	7,911972511	1,150704639	40,1598871	0,041707561	0,698	35,22	36,05359318
Viv5	Viv	tf	7,048584748	5,951690481	6599839238	14,41241685	14,59649454	1,817609228	46,80818389	0,062708542	0,754	34,215	41,73333333
Viv6	Viv	tf	10,26860485	4,096765524	3460012551	12,68781302	9,632765031	0,91422937	34,63883528	0,046902181	0,694	39,765	28,12960236
Tub1	Tub	tf	11,12269889	5,857393273	8828038338	15,8030136	24,13684665	3,108356975	40,67788055	0,070959839	0,745	33,375	38,21138211
Tub2	Tub	tf	12,75597322	7,837915194	5350999765	13,51995235	22,95894867	5,00330467	51,93372446	0,071363468	0,689	35,715	43,47442681
Tub3	Tub	tf	12,60419246	6,465128804	8065843141	16,84861718	16,49697201	3,162450909	51,47124102	0,063343605	0,701	21,25	38,53685837
Tub4	Tub	tf	5,272436762	3,215159392	5293285849	11,16981132	6,997887439	1,705729298	22,58030977	0,052345477	0,699	41,805	28,76712329
Tub5	Tub	tf	9,579586574	4,447800093	3932161945	11,97231834	10,51154215	2,99355794	36,46029916	0,053082502	0,745	34,44	34,20479303
Tub6	Tub	tf	15,60343489	7,521588811	7417544320	11,77394035	47,15410443	2,771146956	48,47328426	0,058730581	0,489	26,745	37,85192909

Tableaux utilisés sur le terrain pour les mesures d'infiltration

Champ-captant Crépieux-Charmy
bassin 4.2

Opérateur:

Traitement:

Position (Ligne-numéro):

Obs. Générales (Remarques, prélèvements, granulométries, etc.)

Essais d'infiltration temps final

Diamètre tube :

Temps	sec		hauteur d'eau dans le tube cm	Temps	sec		hauteur d'eau dans le tube cm	Temps	sec		hauteur d'eau dans le tube cm	Temps	sec		hauteur d'eau dans le tube cm
	min				min				min				min		
1				1				1				1			
2				2				2				2			
3				3				3				3			
4				4				4				4			
5				5				5				5			
6				6				6				6			
7				7				7				7			
8				8				8				8			
9				9				9				9			
10				10				10				10			
11				11				11				11			
12				12				12				12			
13				13				13				13			
14				14				14				14			
15				15				15				15			
16				16				16				16			
17				17				17				17			
18				18				18				18			
19				19				19				19			
20				20				20				20			
21				21				21				21			
22				22				22				22			
23				23				23				23			
24				24				24				24			
25				25				25				25			
26				26				26				26			
27				27				27				27			
28				28				28				28			
29				29				29				29			
30				30				30				30			

Observations

Exemple de résultats

Septembre 2014

Essais d'infiltration

Diamètre tube : 5 cm

Hinitiale	Temps		hauteur d'eau dans le tube	
	min	sec		
1	15	54	66,5	
2	32	98	2	
3	51	61	3	
4	1	8	26	4
5	1	30	27	5
6	1	50	20	6
7	2	6	48	7
8	2	32	9	8
9	2	59	91	9
10	3	21	90	10
11	3	49	75	11
12	4	11	77	12
13	4	31	77	13
14	4	58	99	14
15	5	22	65	15
16	5	49	12	16
17	6	18	62	17
18	6	45	28	18
19	7	14	85	19
20	7	47	24	20
21				
22				
23				
24				
25				
26				
27				
28				
29				
30				

Temps		hauteur d'eau dans le tube		
min	sec			
1	3	15	1	
2	8	87	2	
3	14	72	3	
4	22	13	4	
5	27	56	5	
6	35	87	6	
7	42	38	7	
8	49	20	8	
9	57	3	9	
10	1	4	29	10
11	1	13	27	11
12	1	20	93	12
13	1	30	42	13
14	1	38	89	14
15	1	48	5	15
16	1	58	33	16
17	2	7	78	17
18	2	18	51	18
19	2	29	46	19
20	2	41	30	20
21				
22				
23				
24				
25				
26				
27				
28				
29				
30				

Temps		hauteur d'eau dans le tube		
min	sec			
1	6	30	1	
2	23	71	2	
3	45	64	3	
4	52	2	4	
5	54	70	5	
6	55	55	*	
7	57	98	7	
8	1	1	88	8
9	1	2	85	9
10	1	4	39	10
11	1	5	54	11
12	1	7	4	12
13	1	8	13	13
14	1	9	59	14
15	1	10	73	15
16	1	12	12	16
17	1	13	10	17
18	1	14	13	18
19	1	15	8	19
20	1	16	52	20
21				
22				
23				
24				
25				
26				
27				
28				
29				
30				

Temps		hauteur d'eau dans le tube		
min	sec			
1		69,5		
2		0	5	
3	10	80	7	
4	15	23	8	
5	21	4	9	
6	25	92	10	
7	32	49	11	
8	37	95	12	
9	45	43	13	
10	51	96	14	
11	1	0	65	15
12	1	7	13	16
13	1	14	33	17
14	1	20	37	18
15	1	25	39	19
16	1	31	22	20
17	1	36	46	21
18	1	42	70	22
19	1	50	19	23
20	1	59	98	24
21	2	10	74	25
22				
23				
24				
25				
26				
27				
28				
29				
30				

Résultats bruts infiltration

t0	essai1	essai2	essai3	essai4	essai5	Kmoy (m/s)(*)	tf	essai1	essai2	essai3	essai4	essai5	Kmoy (m/s)(*)
T1	1,98E-05	6,19E-06	6,58E-06	2,47E-05	4,75E-05	2,09E-05	T1	2,66E-06	1,87E-06	7,26E-06	1,46E-06	2,02E-06	3,05E-06
T2	1,72E-04	2,13E-04	2,13E-05	5,57E-05	1,64E-04	1,25E-04	T2	2,15E-05	2,19E-05	1,12E-06	2,05E-05		1,62E-05
T3	3,53E-06	8,22E-06	3,95E-06	8,80E-06	2,96E-06	5,49E-06	T3	7,51E-06	2,24E-06	7,33E-06	5,76E-06	5,19E-06	5,61E-06
T4	5,11E-06	2,84E-06	2,49E-04	9,49E-06	6,60E-06	5,45E-05	T4	4,56E-05	4,41E-06	8,23E-05	3,17E-06	6,09E-06	2,83E-05
T5	1,28E-05	9,89E-05	2,32E-04	4,01E-05	8,26E-06	7,84E-05	T5	4,31E-06	3,28E-06	2,23E-06	2,30E-06	2,85E-06	3,00E-06
T5bis	9,54E-06	2,83E-05	1,33E-05	4,58E-04	8,96E-06	1,04E-04	T5bis	3,11E-06	1,92E-06	5,70E-06			3,58E-06
T6	1,07E-05	1,65E-06	1,13E-05	2,64E-06	7,58E-06	6,76E-06	T6	1,58E-06	6,57E-06	1,38E-05	2,82E-05	1,70E-04	4,40E-05
moyenne T						5,64E-05	moyenne T						1,48E-05
OMB1	2,22E-06	1,21E-05	9,01E-07	1,32E-05	4,38E-05	1,44E-05	OMB1	5,51E-04	2,99E-04	7,16E-06	9,76E-07	2,41E-05	1,77E-04
OMB2	1,19E-05	3,47E-06	8,09E-06	4,01E-06	7,40E-04	1,54E-04	OMB2	4,06E-04	1,01E-05	2,11E-06	1,02E-05	3,26E-05	9,23E-05
OMB3	7,28E-06	7,09E-04	4,06E-06	4,79E-04	2,98E-06	2,40E-04	OMB3	7,39E-06	1,72E-06	2,47E-04	5,01E-06		6,53E-05
OMB4	1,29E-05	1,90E-05	1,08E-05	2,94E-05	2,73E-06	1,50E-05	OMB4	1,48E-05	4,50E-05	2,83E-05	2,14E-06	2,15E-06	1,85E-05
OMB5	2,44E-05	1,80E-05	4,64E-05	2,80E-05	6,50E-06	2,47E-05	OMB5	3,58E-06	1,98E-05	6,36E-06	8,43E-06	4,91E-06	8,63E-06
OMB6	5,09E-06	1,80E-05	2,18E-05	1,14E-04	2,59E-04	8,35E-05	OMB6	4,99E-06	7,22E-06	6,28E-06			6,17E-06
moyenne OM						8,86E-05	moyenne OM						6,12E-05
VIV1	1,02E-05	5,27E-06	1,23E-05	5,28E-06	1,35E-05	9,30E-06	VIV1	2,69E-05	1,53E-05	3,95E-05	1,43E-05		2,40E-05
VIV2	1,73E-04	6,12E-05	4,81E-04	9,62E-05	1,97E-05	1,66E-04	VIV2	1,87E-04	1,95E-06	2,56E-05	1,56E-05		5,77E-05
VIV3	4,05E-06	1,63E-06	3,16E-07	9,02E-05	1,47E-06	1,95E-05	VIV3	2,53E-06	8,86E-06		6,21E-06	1,46E-05	8,04E-06
VIV4	7,42E-04	5,09E-05	1,88E-04	2,07E-05	2,23E-05	2,05E-04	VIV4	2,34E-05	3,10E-05	2,05E-06	3,89E-06	6,77E-06	1,34E-05
VIV5	2,91E-06	3,75E-06	3,44E-06	3,62E-06	3,80E-06	3,50E-06	VIV5	1,40E-05	4,69E-06	2,15E-06	1,53E-05		9,02E-06
VIV6	2,34E-05	5,28E-05	1,74E-05	1,39E-05	1,62E-05	2,48E-05	VIV6	1,56E-05	8,84E-06	1,15E-05	1,12E-05		1,18E-05
moyenne VIV						7,14E-05	moyenne VIV						2,07E-05
TUB11	4,27E-05	4,64E-05				4,45E-05	TUB11	2,86E-06	1,74E-06	7,46E-06	5,33E-06		4,35E-06
TUB12	2,14E-05	3,24E-05	3,49E-05	2,67E-05	4,56E-06	2,40E-05	TUB12	6,10E-06	1,18E-05	1,70E-05	2,47E-05	2,27E-05	1,65E-05
TUB13	1,88E-05	6,64E-05	3,43E-05	1,44E-04	1,70E-05	5,61E-05	TUB13	5,29E-06	1,22E-06		1,01E-05	2,00E-06	4,66E-06
TUB14	1,88E-05	1,51E-05	2,42E-05	1,15E-05	2,48E-05	1,89E-05	TUB14	3,13E-06	1,49E-05	7,97E-07	3,87E-06	1,11E-06	4,76E-06
TUB15	1,00E-04	3,38E-05	6,60E-05	8,57E-05	7,00E-05	7,12E-05	TUB15	7,28E-06	3,37E-06	2,95E-06	1,18E-05	2,36E-06	5,55E-06
TUB16	1,52E-04	5,53E-06	8,06E-06	1,70E-06	2,35E-05	3,82E-05	TUB16	4,64E-06	4,40E-06	9,19E-06	1,11E-05		7,34E-06
moyenne TUB						4,21E-05	moyenne TUB						7,19E-06
VALL11	2,83E-06	2,91E-06	3,65E-06		4,08E-06	3,37E-06	VALL11	3,79E-06	7,14E-06		6,76E-06		5,90E-06
VALL12	4,66E-06	2,38E-06	9,97E-06	5,11E-06	3,62E-05	1,17E-05	VALL12	2,05E-06	1,66E-05		6,58E-06	1,95E-05	1,12E-05
VALL13	8,61E-06	2,86E-06	6,23E-06	4,89E-06	1,02E-05	6,55E-06	VALL13	2,89E-06	7,19E-06	7,59E-06	1,65E-05		8,53E-06
VALL14	6,66E-06	2,41E-06	9,03E-06		6,61E-06	6,18E-06	VALL14	3,37E-06	3,81E-06	1,86E-06	9,77E-06	1,84E-05	7,43E-06
VALL16	2,80E-06	3,70E-06	7,68E-06	4,07E-06	5,05E-06	4,66E-06	VALL16	1,66E-06	2,34E-06	7,81E-06	1,13E-05		5,78E-06
moyenne VALLI						6,49E-06	moyenne VALLI						7,76E-06
moyenne globale K						5,47E-05	moyenne globale K						2,26E-05

III. Analyse pigmentaire par HPLC

Note de synthèse sur l'analyse pigmentaire par HPLC des communautés phototrophes développées dans la couche superficielle des sédiments de bassins d'infiltration, rédigée en 2011 pour Veolia et le Grand-Lyon.

1. Pourquoi étudier la signature pigmentaire des biofilms ?

L'analyse de la distribution pigmentaire des biofilms permet d'appréhender la diversité des communautés phototrophes représentées. Cette approche repose sur l'existence de pigments « indicateurs » caractéristiques de certaines classes algales. La *figure 1* ci-dessous présente les pigments majoritairement retrouvés au sein des communautés phototrophes et précise le message taxonomique qu'ils fournissent.

Pigments photosynthétiques	Message taxonomique
Chlorophylle - <i>a</i>	Toutes les algues photosynthétiques
Divinyl chlorophyll - <i>a</i>	Prochlorophytes (cyanobactéries)
Chlorophylle - <i>b</i>	Algues vertes et symbiotiques prochlorophytes
Chlorophylle <i>c</i> _{1,2}	Chromophytes (algues brunes)
Chlorophylle <i>c</i> ₃	Certaines prymnesiophycées, certaines diatomées, certaines chrysophytes
Caroténoïdes	Message taxonomique
Alloxanthin	Cryptophycées
Antheraxanthin	Algues vertes
19'-Butanoyloxyfucoxanthin	Prymnesiophycées, chrysophycées et 3 dinoflagellées
Canthaxanthin	Cyanobactéries, diatomées, prymnesiophycées et eustigmatophycées
β-β-Carotène	Algues vertes, à l'état de trace dans les chromophytes
Diadinoxanthine	Diatomées, prymnesiophycées, certaines chrysophytes et dinoflagellées
Echine none	Cyanobactéries
Fucoxanthine	Diatomées, prymnesiophycées, chrysophycées
19'-Hexanoyloxyfucoxanthin	Prymnesiophycées, certaines dinoflagellées
Lutéine	Algues vertes
Myxoxanthophylle	Prochlorophytes (cyanobactéries)
Péridine	Dinoflagellées photosynthétiques
Prasincoxanthine	Prasinophycées
Violaxanthine	Algues vertes
Zeaxanthine	Prochlorophycées, cyanobactéries, algues vertes, certaines chrysophycées, raphidophycées

Figure 1 : Principaux pigments et message taxonomique, d'après Jeffrey et al., 2005 ; Vymazal, 1995.

Face à ce constat, différentes techniques ont vu le jour pour caractériser la signature pigmentaire des communautés algales de manière qualitative et/ou quantitative, et notamment L'HPLC (High Performance Liquid Chromatography). Cette analyse pigmentaire permet en effet d'une part d'estimer la biomasse algale et sa diversité, et d'autre part d'évaluer l'état physiologique de la communauté, c'est-à-dire son niveau de sénescence, à travers l'identification des produits de dégradation de certains pigments (phéopigments).

2. Application aux biofilms des bassins d'infiltration de Crépieux-Charmy

2.1. Les échantillons analysés

Nous avons choisi d'analyser par cette méthode la composante phototrophe des communautés microbiennes des biofilms se développant à l'interface eau/sédiment dans les bassins du champ captant de Crépieux-Charmy. L'analyse pigmentaire a concerné les échantillons de sédiments de surface (H1) prélevés dans les 4 bassins d'infiltration nommés 3.1, 3.2, 5.1 et 5.2.

2.2. Grands principes de la méthode analytique appliquée (HPLC)

La première étape de l'analyse HPLC est l'extraction des pigments algaux à l'aide d'un solvant. Cette extraction est plus compliquée qu'une simple interaction entre solvant et soluté car le solvant doit dans un premier temps pénétrer la membrane de la cellule algale avant de solubiliser les lipides et les lipoprotéines des chloroplastes. L'efficacité de l'extraction dépend ainsi de la résistance de la paroi cellulaire, du pouvoir de pénétration du solvant, de la durée de l'extraction ainsi que du mode d'extraction utilisé (Jeffrey *et al.*, 2005). Les différents solvants et méthodes utilisés pour les extractions dans la littérature ont été comparées dans la thèse d'Anne-Sophie Hesse (2011), et c'est à partir de ses conclusions que nous avons choisi une extraction dans de l'acétone pur, puisque les échantillons de sédiments contenaient déjà une forte teneur en eau, avec application d'ultrasons pour favoriser la pénétration du solvant au sein des cellules.

Les extraits obtenus sont ensuite dosés par HPLC : l'échantillon à analyser est injecté dans une colonne contenant un fluide (« phase mobile ») permettant sa dilution et son entraînement dans la colonne contenant une phase dite « stationnaire ». Les solutés contenus dans l'échantillon sont plus ou moins retenus par la phase stationnaire et plus ou moins solubles dans la phase mobile. Il en résulte une migration différentielle, en fonction de leur affinité spécifique pour la phase

stationnaire. Dans notre cas, la séparation chromatographique a été réalisée avec une colonne C18 et un programme d'élution de 29 min.

Les résultats d'une analyse se présentent sous forme d'un chromatogramme où chaque pic correspond à un composant de l'échantillon de départ. La réalisation d'étalons permet par ailleurs de quantifier chaque composant. Ces pigments, c'est-à-dire les pigments photosynthétiques présents sont ensuite identifiés selon deux critères :

- *Leur temps de rétention* : Chaque pigment possède un temps de rétention particulier, qui peut varier légèrement d'une colonne à l'autre, mais quelle que soit la colonne, les pigments sortent dans le même ordre, ainsi on peut déterminer quel pigment doit arriver à quel moment.
- *Leur spectrogramme* : A chaque pic de sortie correspond un spectrogramme avec ou plusieurs pics d'absorption, on peut donc comparer les maxima obtenus avec les données issus de la littérature d'une part (Wright, 1991; Jeffrey *et al.*, 2005; Hou *et al.*, 2011) et avec des standards testés d'autre part, pour déterminer à quel pigment ils correspondent. La figure 2 est un exemple de chromatogramme obtenu par cette analyse.

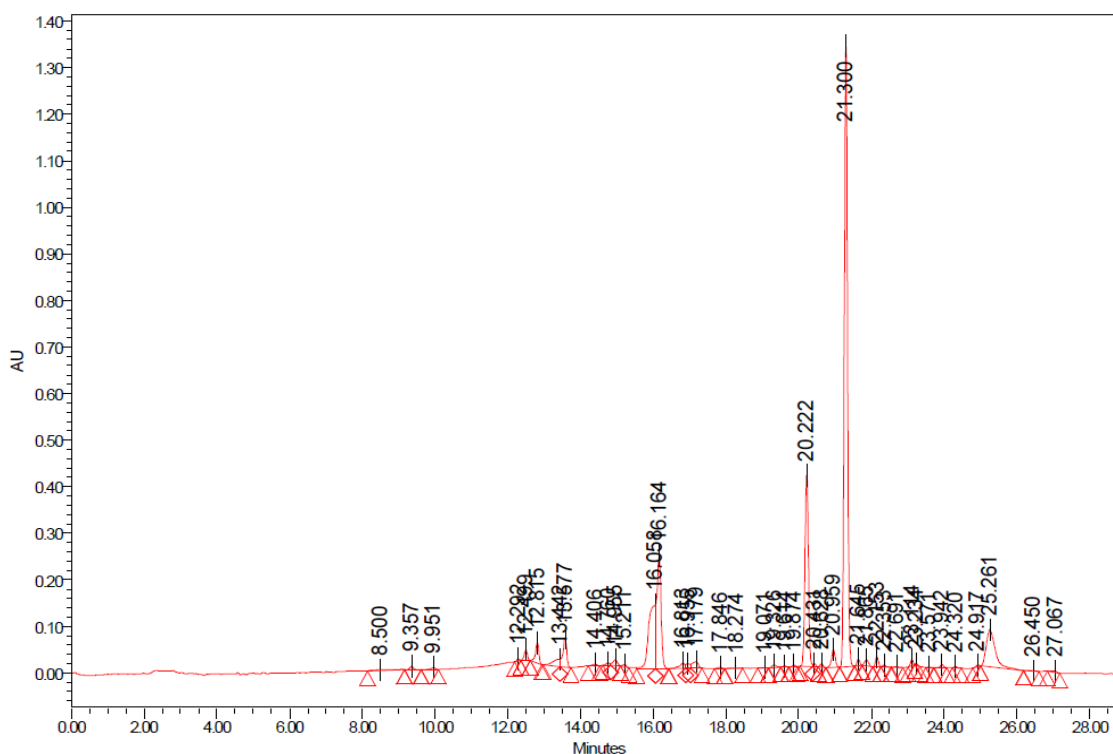


Figure 2 : Exemple d'un chromatogramme issu de l'analyse HPLC d'un extrait de pigments algaux de sédiment dans le bassin 3.1. Chaque pic correspond à un composant de l'extraction dosée et est annoté de son temps de rétention.

Par ailleurs, après identification des pigments présents dans les échantillons de sédiments, certains d'entre eux ont fait l'objet d'une quantification *via* des standards. En effet, des pics de taille identique peuvent refléter des quantités molaires différentes du fait de l'absorption non-spécifique de la longueur d'onde utilisée (Wilhelm *et al.*, 1991). C'est pourquoi des standards ayant une quantité molaire de pigment pur définie sont mesurés. Ils concernaient les pigments suivants :

- Les chlorophylles a, b, c₃ et c₂,
- Les xanthophilles violaxanthine, diadinoxanthine, zeaxanthine, fucoxanthine, lutéine, peridine, myxoxanthophylle
- Le β - β -carotène,
- Et les phéopigments phéophorbide-*a* et phéophytin-*a*

L'application de tels standards nous a permis d'une part d'estimer les concentrations des pigments considérés ci-dessus de manière quantitative, mais également de contrôler l'identification de certains pics en fonction des temps de rétention des spectrogrammes caractéristiques de la colonne que nous avons utilisée. Ce point est important car selon le type de colonne utilisée, des différences peuvent être observées par rapport aux données publiées et conduire à des incertitudes.

La *figure 3* présente un exemple de spectrogramme obtenu pour le standard de myxoxanthophylle.

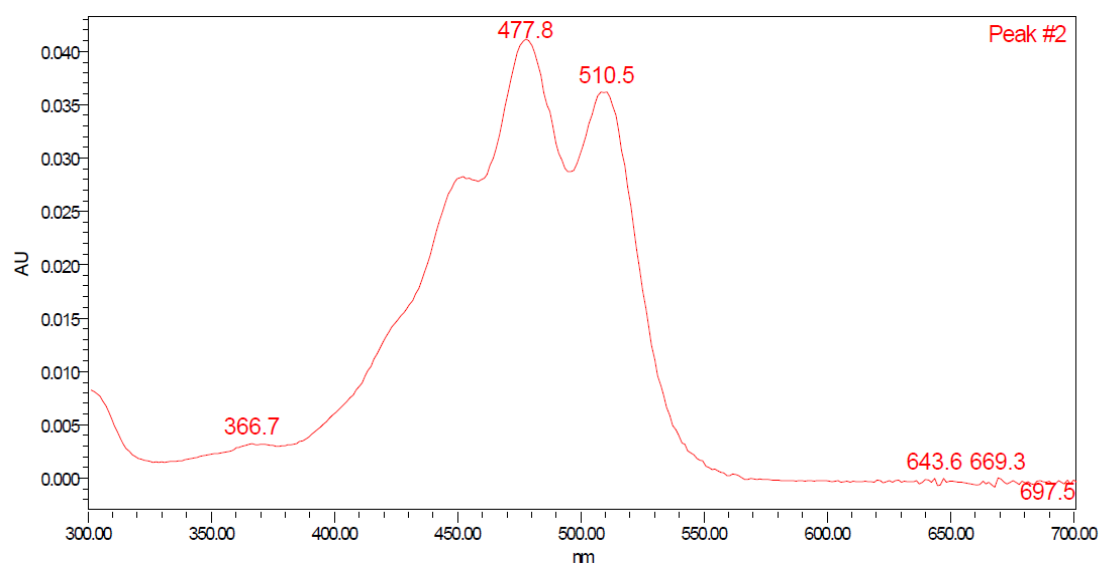


Figure 3 : Exemple du spectrogramme obtenu pour un standard de myxoxanthophylle à un temps de rétention de 13,47 min. On observe plusieurs pics d'absorption, dont 2 principaux à 477,8 nm et 510,5 nm.

3. Lecture et interprétation des données

2.1 Diversité pigmentaire

Les chromatogrammes obtenus présentaient un nombre de pics, donc de composants variant de 32 à 50. Sur la base de leur temps de rétention et de leur spectres d'absorbance, nous avons identifié un total de 25 pigments différents sur les 4 bassins étudiés, c'est-à-dire les bassins 3.1, 3.2, 5.1 et 5.2.

Les pics non-identifiés peuvent s'expliquer de différentes façons :

- ils correspondent à des aires très petites - jugées négligeables – qui ne serait pas apparues avec la mise en place d'un filtre,
- ils correspondent à des spectrogrammes trop déformés pour déterminer les pics d'absorbances et donc le pigment correspondant,
- notons également la présence parmi ces pics de certains allomères chlorophylliens non pris en compte dans cette étude, ce qui est une démarche classique.

Le *tableau 4* suivant résume les différents pigments identifiés, et à les temps de rétention auxquels ils sont apparus avec la colonne utilisée.

Pigments identifiés	Temps de rétention (min)	3.1	3.2	5.1	5.2
Chlorophyllide	9,2	*	*	*	*
chlorophylle-c2	9,27	*	*	*	*
chlorophylle-c3	10,1				*
Siphonaxanthine	12,2		*		
19'-Butanoyloxyfucoxanthine	12,3	*	*	*	*
Fucoxanthine	12,67	*	*	*	*
Neoxanthine	12,75	*	*	*	*
19'-hexanoyloxyfucoxanthine	13,3		*		
Myxoxanthophylle	13,47		*	*	*
Violaxanthine	13,8	*	*	*	*
Alloxanthine	14,05		*	*	*
Diadinoxanthine	14,59	*	*	*	*
Monadoxanthine	14,9				*
Diatoxanthine	15,1	*	*	*	*
Lutéine	16,3	*	*	*	*

zeaxanthine	16,38	*		*	*
siphonéine	17,7	*	*	*	*
canthaxanthine	17,8			*	
chlorophylle-b	20,16	*	*	*	*
chlorophylle-a	21,25	*	*	*	*
échinénone	21,8		*	*	*
divinyl chlorophylle-a	22,2		*	*	*
pheophytine	23,41	*	*	*	*
pyropheophytine	24,2	*	*	*	*
$\beta\beta$ -Carotène	25,81	*	*	*	*

Figure 4: Tableau de résumé des pigments identifiés, temps de rétention et présence dans les 4 bassins étudiés les pigments qui diffèrent entre bassin sont indiqués en vert foncé.

On observe une diversité pigmentaire importante, ce qui souligne la complexité et l'hétérogénéité des communautés phototrophes des biofilms microbiens développés à la surface des sédiments de bassins d'infiltration. En premier lieu, on constate la présence des pigments caractéristiques de 3 classes algales communément retrouvées dans les biofilms :

- la lutéine, la chlorophylle-*b* et le β - β -carotène pour les algues vertes,
- la myxoxanthophylle, la zéaxanthine et l'échinénone pour les cyanobactéries,
- la fucoxanthine, la diatoxanthine et la chlorophylle-*c* pour les diatomées,

On notera également la présence d'alloxanthine, caractéristiques des cryptophytes. Ce pigment a retenu notre attention du fait de son identification dans les études préalablement menés par le Cemagref de Bordeaux sur la colonne d'eau des bassins de ce même site (suivi 2009).

En plus de ces pigments classiques, nous avons identifié des produits de dégradation des pigments photosynthétiques, tels que la phéophytine.

Enfin, certains pigments identifiés sont des marqueurs d'autres espèces comme les pigments 19'-hexanoyloxyfucoxanthine et 19'-Butanoyloxyfucoxanthine, caractéristiques des prymnesiophytes (Jeffrey *et al.*, 2005). La présence de diadinoxanthine, couplée à la diatoxanthine et la fucoxanthine peut caractériser, en plus des diatomées, des classes algales telles que chrysophytes ou xanthophytes, pour lesquelles la diadinoxanthine est le pigment majoritaire (Vymazal, 1995).

D'un point de vue qualitatif, ces données ne révèlent pas de différences notables entre les bassins étudiés, ce n'est que l'absence de cyanobactéries dans le bassin 3.1. En effet, nous n'avons pas identifié de myxoxanthophylle ni d'echinenone dans ce bassin, deux pigments caractéristiques de cette classe algale. Au contraire, la zéaxanthine est présente dans le bassin 3.1, ce qui indique que la présence de ce pigment est certainement due à d'autres classes algales (comme les rhodophytes ou les cryptophytes chez qui elle se retrouve également (Vymazal, 1995)).

En revanche, nous n'avons retrouvé aucun marqueur des dinoflagellés (dinoxanthine et peridinine) dans nos échantillons de sédiments. Plusieurs auteurs ont étudié la répartition des pigments dans des biofilms développés sur des sédiments de lacs ou de zone littorale (Camacho et De Wit, 2003; Schlüter *et al.*, 2006; Cibic *et al.*, 2007; Buchaca et Catalan, 2008; Freiberg *et al.*, 2011) et ont mis en évidence une répartition très différente entre les pigments mesurés dans les sédiments et ceux dans la colonne d'eau. Buchaca & Catalan (2008) ont notamment comparé les pigments entre colonne d'eau, sédiments de surface et sédiments plus profonds dans 82 lacs des Pyrénées et ont montré que la plupart des pigments de la colonne d'eau se retrouvaient dans les sédiments, mais en quantités différentes, excepté la dinoxanthine, marqueur des dinoflagellés, ce qui rejoint nos observations.

Cette première approche basée uniquement sur l'absence ou la présence des pigments est à nuancer : d'une part, certains composants non identifiés sur le chromatogramme, du fait d'un spectrogramme trop déformé par exemple, pourraient correspondre à des pigments connus et caractéristiques de certaines classes algales et, d'autre part, certains pigments ont été identifiés, mais sont en quantité très faible. C'est pourquoi nous allons maintenant nous intéresser aux résultats obtenus avec l'aide des standards mis en place.

2.2 Quantité pigmentaire

L'aire totale du chromatogramme obtenu par analyse HPLC contient de nombreux pigments dont la distribution dans les différentes classes algales n'est pas spécifique. En conséquence, la quantité des pigments spécifiques ne peut pas être ramenée à l'aire totale du système, un paramètre de référence doit être choisi (Wilhelm *et al.*, 1991). Celui semblant le plus digne de confiance est la quantité de chlorophylle-*a* qui est caractéristique de la biomasse

phototrophe d'une communauté bactérienne et est utilisé par de nombreux auteurs (Jeffrey *et al.*, 2005; Sarmiento *et al.*, 2006; Schlüter *et al.*, 2006). Aussi, nous étudierons dans cette partie les quotients « xanthophylles/chlorophylle-*a* ».

Dans un premier temps, nous nous intéressons aux quantités globales de chlorophylle-*a* dans chaque bassin (figure 5), qui permet une première estimation de la biomasse phototrophe.

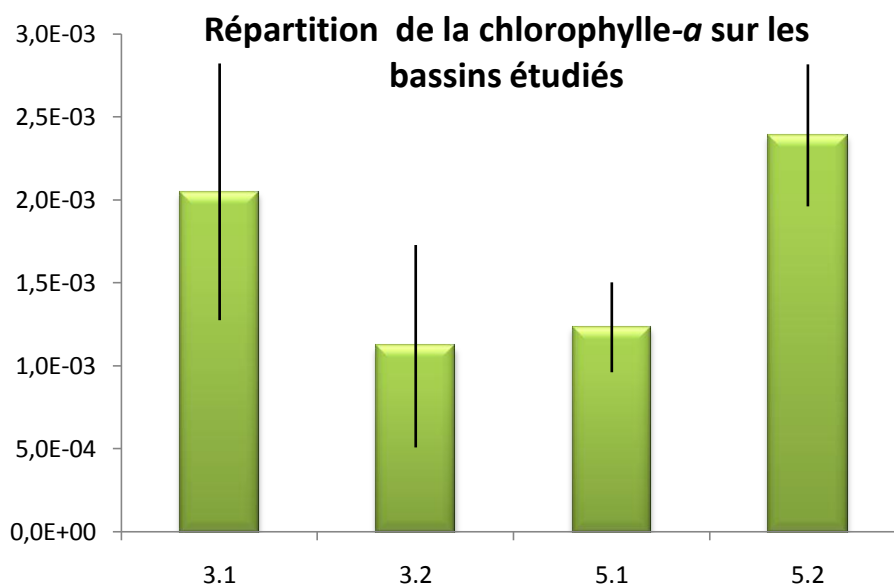


Figure 5 : Quantités de chlorophylle-*a* dans l'horizon de surface des différents bassins étudiés obtenues à partir de l'analyse HPLC, $n=3$ échantillons/bassin

On remarque sans surprise que c'est le bassin 5.2 qui possède la biomasse algale la plus importante. En effet, lors des prélèvements, c'est le bassin qui présentait un épais tapis biologique composé majoritairement d'algues vertes alors que l'organisation du biofilm dans le bassin 5.1 était beaucoup moins dense et plus éparse. Le bassin 3.1 semblait plutôt colonisé par un biofilm jeune, actif et également très vert, tandis que le 3.2 présentait un biofilm sénescant de couleur jaunâtre.

Figure 6 : Biofilm développé à l'interface eau-sédiment dans le bassin 5.2 - source photo : Veolia-Eau



L'utilisation de standard a permis de déterminer quantitativement les pigments précédemment cités à partir des aires obtenues sur le chromatogramme et des « facteurs réponse » déterminés. Les résultats suivants ont été obtenus (figure 7), exprimés selon la quantité de chlorophylle-*a*

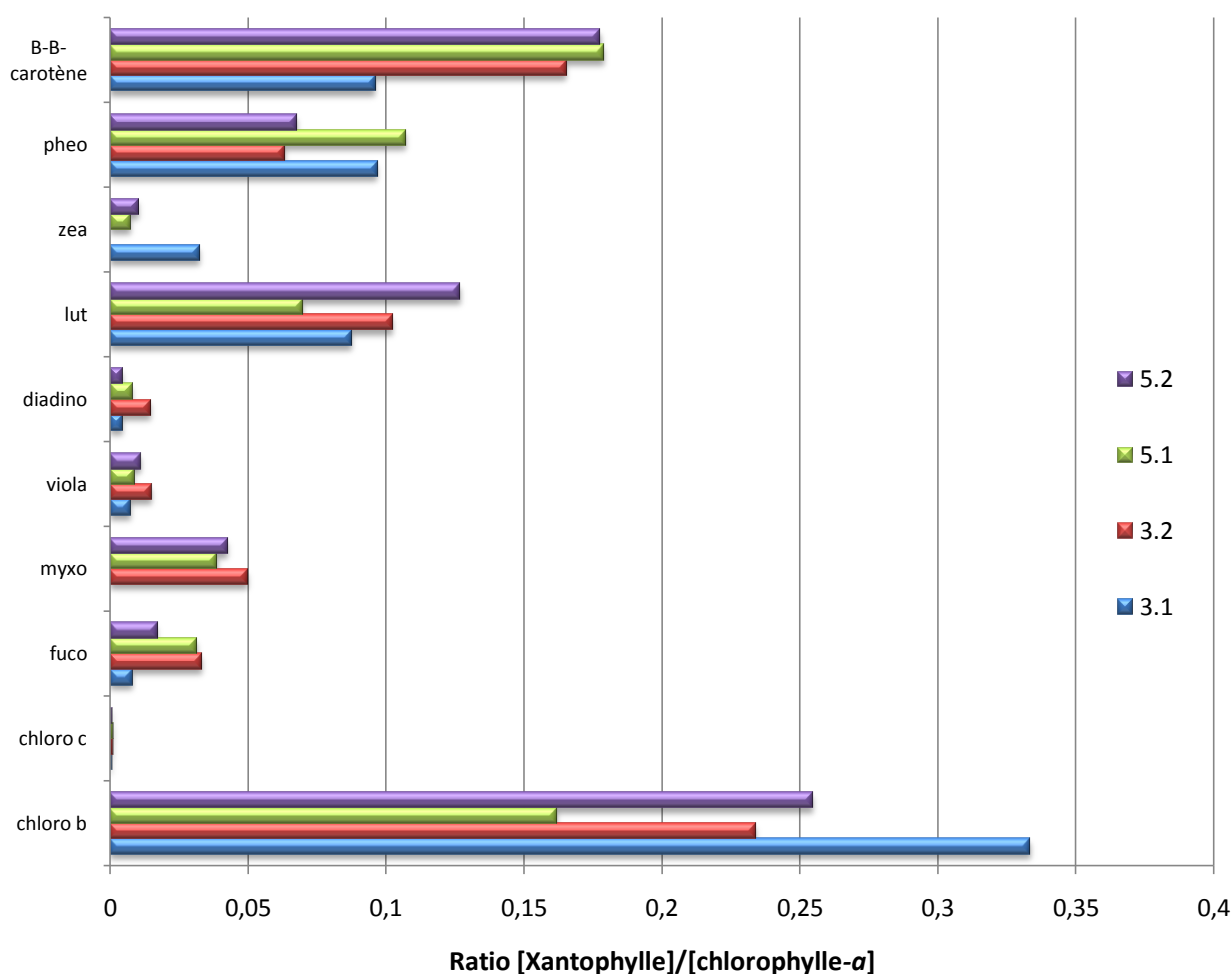


Figure 7 : Répartition des pigments dans l'horizon de surface des 4 bassins étudiés

On constate que les pigments majoritaires dans l'ensemble des bassins sont la chlorophylle-*b*, la lutéine et le β -carotène, caractéristiques des chlorophytes (algues vertes), ce qui semble indiquer une prédominance des algues vertes. Pour estimer les abondances relatives de chaque classe algale et confirmer cette première observation, on regarde maintenant la répartition des pigments caractéristiques des 3 classes principales, c'est-à-dire algues vertes, cyanobactéries et diatomées (nous n'avons pas de valeurs quantitatives pour les cryptophytes). Pour cela, nous avons choisi de considérer les pigments suivants, déterminés à partir de la littérature (Wright, 1991; Camacho et De Wit, 2003; Hou *et al.*, 2011) :

- La **lutéine** pour les chlorophytes (algues vertes)

- La *myxoxanthophylle* pour les prochlorophytes (cyanobactéries), plus spécifique que la zeaxanthine qui se retrouve chez d'autres classes algales
- La *fucoxanthine* pour les bacillariophytes (diatomées)

On obtient les répartitions suivantes (figure 8).

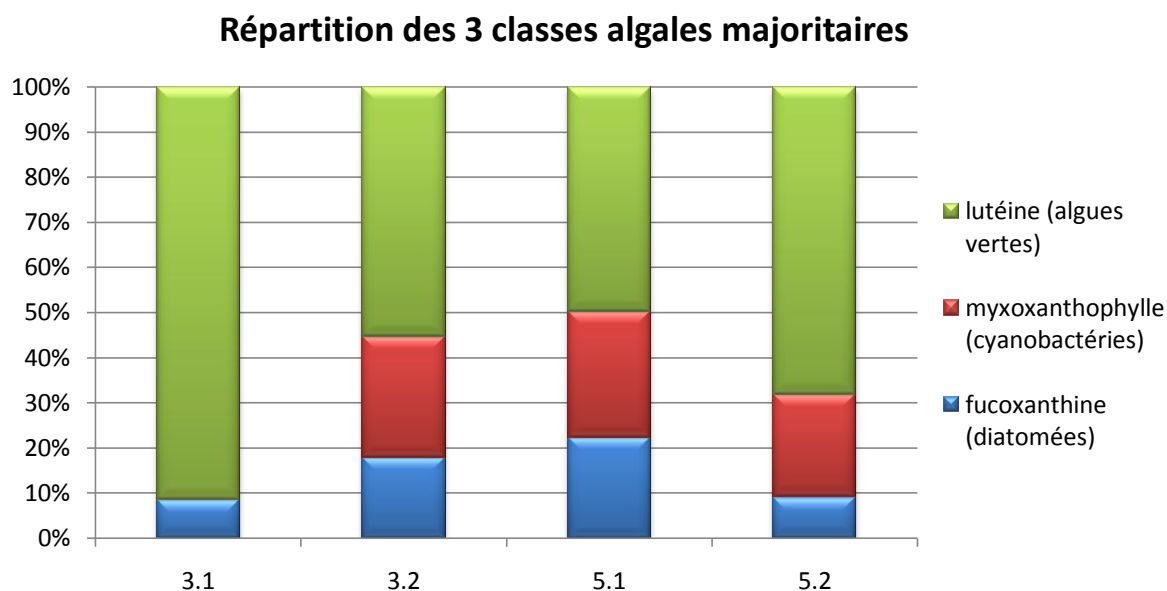


Figure 8 : Répartition des classes algales majoritaires à partir des pigments lutéine pour les algues vertes, myxoxanthophylle pour les cyanobactéries et fucoxanthine pour les diatomées.

Cette répartition confirme la prédominance des algues vertes. Or, les différents auteurs ayant travaillé sur des systèmes colonne d'eau/sédiments montrent tous que l'on retrouve normalement majoritairement des diatomées dans les biofilms développés dans des sédiments (Sarmiento *et al.*, 2006; Schlüter *et al.*, 2006; Buchaca et Catalan, 2008). Cette différence importante peut s'expliquer de la manière suivante : les échantillons étudiés ici ont été prélevés *in-situ* par carottage, et correspondent au premier centimètre de sédiments, accompagné du biofilm se développant à sa surface. Or, parmi cette « moquette » de surface, une étude du Cemagref réalisée en 2009 a mis en évidence la présence d'algues vertes multicellulaires et de nombreuses cyanobactéries à la surface de la colonne d'eau (figure 9), et surtout à la surface des sédiments. Ces algues filamenteuses se retrouvent « accrochées » au biofilm et ont donc été également prélevées, ce qui explique ces résultats concernant les algues vertes.

Le fait que le bassin 5.1 soit le moins colonisé en surface et qu'il présente également le plus faible taux d'algues vertes vient confirmer cette hypothèse.

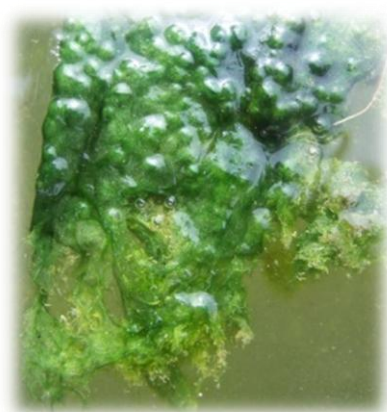


Figure 9 : les algues filamenteuses en surface de colonne d'eau - source photo : Veolia-Eau

1. Limites de l'analyse HPLC

Il faut enfin noter plusieurs limites à l'identification et l'analyse des pigments par cette méthode :

Tout d'abord, physiologiquement, les pigments algaux sont extrêmement sensibles aux changements de lumière, c'est même le facteur le plus limitant du développement algal en surface de sédiments (Cibic *et al.*, 2007), ainsi les pigments peuvent d'une part être modifiés sur le terrain selon la hauteur d'eau dans les bassins, mais également lors des analyses, car même avec beaucoup de précautions, les échantillons peuvent être soumis à un stress lumineux et voir leur contenu pigmentaire drastiquement modifié.

Ensuite sur l'interprétation propre des chromatogrammes : certaines séparations ne sont pas complètes, et plusieurs pigments peuvent se chevaucher, notamment la fucoxanthine et la neoxanthine qui ont des temps de rétention très proches (*figure 4*). Il est alors difficile de savoir quelle aire correspond à quel pigment (Wilhelm *et al.*, 1991).

Par ailleurs, même si certains pigments ne caractérisent qu'une seule classe d'algues, d'autres se retrouvent chez différents groupes, et par conséquent, la détermination taxonomique est une tâche difficile est assez subjective. A titre d'exemple, la myxoxanthophylle est caractéristique des cyanobactéries et ne se retrouvent chez aucune autre classe d'algue. En revanche, la zeaxanthine, présente chez les cyanobactéries se retrouvent également chez certaines algues rouges telles que les rhodophytes ou vertes telles que charophytes ou prasinophytes (Vymazal, 1995). Il est donc difficile d'établir des rapprochements précis entre quantité de pigments et quantité d'algues si le pigment considéré se retrouve chez plusieurs classes algales. Des corrélations avec d'autres pigments plus spécifiques peuvent être réalisées, mais restent imprécises. Enfin, certains pigments

peuvent correspondre à des végétaux supérieurs ou comme on l'a vu à des algues pluricellulaires, ou encore à du matériel détritique, il faut alors là encore rechercher certaines corrélations pour s'assurer de leur origine.

2. Conclusion & Perspectives

La dynamique des pigments au sein des sédiments est généralement très différente de celle au sein de la colonne d'eau du fait de l'accumulation d'organismes à l'interface eau/sédiment (Freiberg *et al.*, 2011) qui se développent sous forme de biofilm. Les échanges avec la colonne d'eau sont au départ très intenses, mais au fur et à mesure de son développement, le biofilm va devenir un microcosme créant sa propre synergie et sa propre dynamique. La composition du biofilm mature sera ainsi complètement différente de celle de départ.

Par ailleurs, les bassins d'infiltration sont des milieux subissant des perturbations importantes, et notamment des successions de périodes d'inondation et d'exondation qui ont un impact important sur l'enchaînement des espèces et la dynamique de développement du biofilm. Aussi, un milieu perturbé va présenter une taxonomie complexe. Ce constat est confirmé par l'analyse pigmentaire : la forte diversité pigmentaire indique une colonisation par de nombreuses algues différentes.

Enfin, les conclusions sur les quantités relatives de chaque pigment sont à nuancer car les analyses ont été faussées par la présence d'algues pluricellulaires n'appartenant pas au biofilm se développant dans les sédiments.

3. Bibliographie

- Buchaca, T. and J. Catalan (2008). "On the contribution of phytoplankton and benthic biofilms to the sediment record of marker pigments in high mountain lakes." *Journal of Paleolimnology* 40(1): 369-383.
- Camacho, A. and R. De Wit (2003). "Effect of nitrogen and phosphorus additions on a benthic microbial mat from a hypersaline lake." *Aquatic Microbial Ecology* 32: 261-273.
- Cibic, T., O. Blasutto, K. Hancke and G. Johnsen (2007). "Microphytobenthic species composition, pigment concentration, and primary production in sublittoral sediments of the Trondheimsfjord (Norway)." *Journal of Phycology* 43(6): 1126-1137.
- Freiberg, R., M. Nomm, I. Tonno, T. Alliksaar, T. Noges and A. Kisand (2011). "Dynamics of phytoplankton pigments in water and surface sediments of a large shallow lake." *Estonian Journal of Earth Sciences* 60(2): 91-101.

- Hou, Y., W. Liang, L. Zhang, S. Cheng, F. He and Z. Wu (2011). "Freshwater algae chemotaxonomy by high-performance liquid chromatographic (HPLC) analysis." *Frontiers of Environmental Science and Engineering in China* 5(1): 84-91.
- Jeffrey, S. W., R. F. C. Mantoura and S. W. Wright (2005). Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods. New edition. pages.
- Sarmento, H., M. Isumbisho and J. P. Descy (2006). "Phytoplankton ecology of Lake Kivu (eastern Africa)." *Journal of Plankton Research* 28(9): 815-829.
- Schlüter, L., T. L. Lauridsen, G. Krogh and T. Jorgensen (2006). "Identification and quantification of phytoplankton groups in lakes using new pigment ratios - A comparison between pigment analysis by HPLC and microscopy." *Freshwater Biology* 51(8): 1474-1485.
- Vymazal, J. (1995). Algae and element cycling in wetlands. Lewis Publishers Inc. pages.
- Wilhelm, C., I. Rudolph and W. Renner (1991). "A quantitative method based on HPLC-aided pigment analysis to monitor structure and dynamics of the phytoplankton assemblage - a study from lake Meerfelder Maar (Eifel, Germany)." *Archive of Hydrobiology* 123(1): 21-35.
- Wright, S. W. (1991). "Improved HPLC method for the analysis of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton." *Marine Ecology Progress Series* 77(2-3): 183-196.

Résumé : Les bassins d'infiltration sont de plus en plus utilisés en milieux urbains pour la réduction des eaux de ruissellement et la recharge des nappes phréatiques. Toutefois, leur fonctionnement est souvent affecté par des problèmes de colmatage, physiques, chimiques et/ou biologiques, qui conduisent à une diminution des capacités d'infiltration et à une altération potentielle de la qualité des eaux infiltrées. Aussi, la prévention de ce risque devient-elle un enjeu majeur pour garantir la pérennité des ouvrages d'infiltration et la qualité des eaux infiltrées. Si les mécanismes impliqués dans le colmatage sont décrits assez finement dans le cas des processus purement physiques ou géochimiques, les verrous scientifiques sont encore importants pour comprendre la contribution du compartiment biologique (biofilms, végétation, invertébrés). Ce travail de thèse avait ainsi pour objectif de quantifier l'influence du compartiment biologique sur les processus de colmatage et de décolmatage dans des bassins d'infiltration. Pour cela, il était composé de deux grands volets :

- (i) le premier visait à évaluer la contribution relative du biofilm et de l'accumulation de particules fines sur les paramètres hydrodynamiques du milieu poreux support d'infiltration, ceci dans 2 bassins aux caractéristiques contrastées,
- (ii) le second avait pour objectif d'évaluer les potentialités de processus écologiques (bioturbation, broutage, allélopathie) à décolmater les bassins par l'introduction de macro-organismes (invertébrés et macrophytes) en mésocosmes ou par encagements *in situ*.

Les résultats ont mis en évidence le rôle déterminant de la composante phototrophe des biofilms sur la dégradation de perméabilité des supports d'infiltration. Un effet seuil de la biomasse phototrophe a été observé sur le rayon moyen des pores hydrauliquement fonctionnels, avec pour conséquences des effets non-linéaires sur la perméabilité. Face à ce colmatage biologique, les résultats obtenus en mésocosmes ont clairement montré que la présence de macrophytes tels que *Vallisneria spiralis* L. et *Chara globularis* L. permettait de réduire la biomasse algale par allélopathie. Par la suite, l'introduction par encagement dans un bassin d'infiltration de l'espèce *V. spiralis* a démontré sa potentialité à réduire le phénomène de colmatage en affectant la physiologie du biofilm algal. De plus, l'introduction du gastéropode aquatique *Viviparus viviparus* qui se nourrit directement du biofilm permettait de maintenir et même d'améliorer les capacités d'infiltration du bassin. Ces résultats offrent des perspectives intéressantes pour le développement futur de techniques d'ingénierie écologique dans la gestion et l'amélioration de la durée de vie des ouvrages d'infiltration.

Abstract: Infiltration basins are increasingly used in urban areas for stormwater management or groundwater recharge. However, their functions are often affected by physical, chemical and / or biological clogging, leading to a decrease in infiltration rate and a potential alteration of infiltrated water quality. The prevention of clogging is therefore becoming a major challenge to ensure the sustainability of infiltration devices and the quality of infiltrated water. Although the mechanisms involved in clogging are accurately described for purely physical and geochemical processes, scientific obstacles still prevent from understanding the contribution of biological compartment (i.e. biofilms, vegetation, invertebrates). The aim of this work was to quantify the influence of biological compartment on clogging/unclogging processes in infiltration basins. It was divided in two objectives:

- (i) To assess the relative contribution of biofilm and fine particle accumulation on the hydrodynamic parameters of the porous media in two basins with contrasting characteristics.
- (ii) To assess the potential of ecological processes (bioturbation, grazing, allelopathy) to unclog the basins, by the introduction of macro-organisms (invertebrates and macrophytes) in mesocosms or *in situ* enclosures.

Results highlighted the critical role of the phototrophic component of biofilms on the degradation of infiltration media permeability. A threshold effect of algal biomass was observed on the hydraulically functional pore size, with non-linear consequences on the permeability. Faced with this biological clogging, the results obtained with mesocosm experiments clearly showed that the presence of the macrophytes *Vallisneria spiralis* L. and *Chara globularis* L. could reduce algal biomass by allelopathy. The introduction of *V. spiralis* by enclosure in an infiltration basin then demonstrated its potential to reduce the clogging by affecting algal biofilm physiology. In addition, the introduction of the aquatic gastropod *Viviparus viviparus*, which feeds directly on the biofilm, allowed to maintain, and even improve, the infiltration capacity of the basin. These outcomes offer interesting perspectives for the future development of ecological engineering techniques, to manage and improve the lifetime of infiltration devices
