



HAL
open science

Biodiversité des eaux souterraines dans un gradient de temps de résidence et d'influence anthropique : approches métagénomique et géochimique couplées

Sarah Ben Maamar

► To cite this version:

Sarah Ben Maamar. Biodiversité des eaux souterraines dans un gradient de temps de résidence et d'influence anthropique : approches métagénomique et géochimique couplées. Sciences de la Terre. Université de Rennes, 2016. Français. NNT : 2016REN1S108 . tel-02145441v2

HAL Id: tel-02145441

<https://theses.hal.science/tel-02145441v2>

Submitted on 3 Jun 2019

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.



**UNIVERSITE
BRETAGNE
LOIRE**

THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1
sous le sceau de l'Université Européenne de Bretagne

pour le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1

Mention : Sciences de la Terre

Ecole doctorale SDLM

présentée par

Sarah BEN MAAMAR

Préparée à l'UMR CNRS 6118 et l'UMR CNRS 6553
Géosciences Rennes et ECOBIO
UFR Sciences et Propriétés de la Matière

**Biodiversité des eaux
souterraines dans un
gradient de temps de
résidence et
d'influence
anthropique :
approches
métagénomique et
géochimique
couplées.**

Thèse rapportée par :

Emmanuelle PETELET-GIRAUD

Chef de projet au BRGM, Orléans / *rapporteur*

Isabelle MARY

Maitre de conférence à l'Université Blaise Pascal,
Clermont-Ferrand / *rapporteur*

et soutenue à Rennes

le 2 juin 2016

devant le jury composé de :

Françoise ELBAZ-POULICHET

Directrice de recherche au CNRS à l'Université
Montpellier 2 / *examineur*

Jean-Raynald DE DREUZY

Directeur de recherche au CNRS à l'Université de
Rennes 1 / *examineur*

Hélène PAUWELS

Directrice de recherche au BRGM / *co-directrice de
thèse*

Luc AQUILINA

Professeur à l'Université de Rennes 1 / *directeur de
thèse*

Alexis DUFRESNE

Chargé de recherche 2 au CNRS / *co-encadrant de
thèse*

REMERCIEMENTS

IM-PO-SSIBLE pour moi de zapper l'étape des remerciements. Et oui, la gratitude c'est bien le moins que je puisse témoigner à beaucoup d'entre vous ! Après toutes ces années passées parmi vous, les personnes que je souhaite remercier sont nombreuses, alors... J'y vais, je me lance !

Je remercie en premier lieu chaleureusement les directeurs d'unité des deux UMR, Michel Ballèvre à Géosciences Rennes, et Françoise Binet à Ecobio, pour leur accueil et leur soutien au sein de leur laboratoire. Je remercie mes directeurs de thèse de m'avoir confié ce sujet de thèse, et l'ensemble des membres de mon jury d'avoir accepté de juger ce travail. Je remercie également l'ensemble des équipes hydro et RBPE pour leur accueil au sein de leur équipe.

Je tiens à adresser un grand merci à Philippe, Virginie, Alix et Achim pour leur aide précieuse sur le manuscrit. Un IMMENSE MERCI à Philippe, Christophe, Alix, Isabelle, Nico G et Amélie, Youssef, Eliot pour leur amitié et leur soutien exceptionnels. Vous êtes supers, et doués d'une humanité, d'une générosité et d'une gentillesse vraiment rares. Je suis extrêmement fière de vous connaître, incontestablement vous faites partie de mes plus belles rencontres et je mesure la chance que j'ai eue de vous croiser ☺ Ne changez rien, car vous êtes exceptionnels ;-)

Je ne peux et ne pourrai oublier également mes chers et valeureux camarades scientifiques doctorants Régis, Jonathan et Emma, Olivier B., Luc B., Marie O., Hugo, Jérôme, Diana, Antoine D., Antoine H., Marie-Françoise, Hélène, Charlotte, Nathan, Kévin, Julien B. et Lorine. Beaucoup d'entre vous sont sur le point de terminer (oui oui Régis ☺) et je suis vraiment fière et ravie pour vous, vous le méritez vraiment ! Simplement ne lâchez rien, car le succès est à votre porte ! Pour ceux qui ne sont pas encore tout proche de la fin, je vous souhaite plein de réussite et de ne pas oublier qu'un peu de courage et de persévérance abattent parfois des montagnes. J'aimerais pouvoir vous rendre tous les gestes d'amitiés et de soutien dont vous m'avez fait part, ils sont tellement nombreux et m'ont beaucoup touché. Mais clairement il me faudrait écrire un autre manuscrit ! Comme j'ai un peu moins de place ici, je me contenterai de vous dire vraiment MERCI pour vos encouragements, votre aide, votre soutien moral, vos visites quotidiennes voire « pluriquotidiennes », les sorties (resto et cheval notamment) et fabuleuses discussions ☺ Grâce à vous, même les mauvais moments restent de très bons souvenirs, il n'y a pas beaucoup de magiciens capables de faire ça ☺

Merci pour leur bonne humeur constante, leur soutien et mots gentils à Thierry L, Nicolas L., Baudoin, Aurélie, Julien F., Alain-Hervé, Aline L., Aline D., Myriam et Gilles. Un merci spécial à André-Jean qui a gracieusement accepté de me reloger et d'avoir une nouvelle « coloc' » ;-)

Un merci aussi à Sandra la super gestionnaire, à Valérie B. la super aide documentaliste, à Alexandra et Sophie les supers ingénieurs de la plateforme. Un grand merci également aux anciens pour tous les excellents moments passés ensemble, ça a été un très grand plaisir de vous croiser : Pietro, Quino, Tanguy, Clément, Rebecca, Etienne et Morgane, Sarah et Fernando, Marie D. et Stéphan. F., Flore, Amandine, Elo, Stéphane M., Maxime D., Xavier B., Kévin H. et Cécile. J'espère n'oublier et ne froisser personne, mais ce n'est pas si facile... Alors je tiens à te remercier TOI aussi, que j'ai pu rencontrer à Ecobio ou à Géosciences et que je n'ai pas nommé ici mais avec qui j'ai pu passer de très bons moments.

Finalement, la palme du plus grand MERCI revient indiscutablement à ma famille, en particulier à mes chers parents à qui je dois beaucoup. Mes parents ont toujours eu la main verte. Un jour, ils ont eu l'idée de semer en mon jeune esprit une petite graine, la graine de la recherche. Cette graine a germé avec les années, a donné une jeune plante, puis grâce à un arrosage régulier et une attention permanente, cette plante a pu devenir un arbre. Des tempêtes se sont abattues et l'arbre toujours là, a fini aujourd'hui par donner un fruit. Ce premier fruit qu'est ce manuscrit, c'est à mes parents qu'il revient ainsi qu'à mes frères et sœurs. C'est donc avec une immense fierté que je leur dédie pudiquement cet humble manuscrit en l'affublant d'un grand « MERCI d'avoir rend cela POSSIBLE ».

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES

| | |
|--|-----------|
| TABLE DES MATIERES..... | 1 |
| LISTE DES FIGURES..... | 4 |
| LISTE DES TABLEAUX..... | 6 |
| LISTE DES ABREVIATIONS..... | 7 |
| GLOSSAIRE..... | 8 |
| CHAPITRE 1 – INTRODUCTION GENERALE..... | 11 |
| 1. PRESENTATION DU MODELE D'ETUDE : L'AQUIFERE DE SOCLE FISSURE-FRACTURE..... | 13 |
| 1.1. Les aquifères de socle fissuré-fracturé..... | 13 |
| 1.2. Le temps de résidence des eaux souterraines..... | 15 |
| 1.3. Compartimentation des aquifères de socle dans le Massif Armoricain, temps de résidence et gradient de pollution anthropique..... | 17 |
| 1. ECOLOGIE DANS LES EAUX SOUTERRAINES..... | 18 |
| 2.1. Historique de l'étude de la diversité dans les aquifères..... | 18 |
| 2.2. La vie dans le souterrain..... | 20 |
| 2. INTERACTIONS ENTRE LES COMMUNAUTES MICROBIENNES, L'HYDROCHIMIE ET LES CIRCULATIONS HYDROLOGIQUES..... | 29 |
| 3.1. A l'échelle globale : la répartition spatiale des communautés..... | 29 |
| 3.2. A l'échelle locale : la diversité au niveau de la fracture..... | 31 |
| 4. PROBLEMATIQUE..... | 33 |
| CHAPITRE 2 – MATERIEL ET METHODES..... | 35 |
| 1. DESCRIPTION DES SITES ET DES EAUX SOUTERRAINES ANALYSEES..... | 35 |
| 1.1. Betton..... | 35 |
| 1.2. Saint-Brice-En-Coglès..... | 36 |
| 1.3. Ploemeur..... | 38 |
| 2. TECHNIQUES DE PRELEVEMENT DES EAUX SOUTERRAINES..... | 39 |
| 2.1. Description d'un piézomètre..... | 39 |
| 2.2. Pompage et mesure de la signature hydrochimique de l'eau..... | 40 |
| 2.3. Prélèvement d'eau souterraine pour la chimie, les CFC/SF6 et gaz nobles, et la microbiologie..... | 40 |
| 3. TRAITEMENT DES ECHANTILLONS..... | 41 |
| 3.1. Caractérisation chimique des échantillons d'eau souterraine..... | 41 |
| 3.2. Caractérisation de la diversité microbiologique des eaux souterraines..... | 42 |
| 4. ANALYSES DES SEQUENCES D'AMPLICONS ET DE METAGENOMES..... | 47 |
| 4.1. Analyse des amplicons d'ARNr 16S avec le pipeline EasyOTU..... | 47 |
| 4.2. Analyse des séquences de métagénomomes..... | 48 |
| 5. RESUME DES DIFFERENTS ECHANTILLONS ET ANALYSES..... | 50 |
| CHAPITRE 3 - EFFETS DES CIRCULATIONS HYDROGEOLOGIQUES, DU TEMPS DE RESIDENCE DES ET DE LA POSITION DANS LA BOUCLE HYDROGEOLOGIQUE D'UNE EAU SOUTERRAINE SUR LA COMPOSITION DES COMMUNAUTES MICROBIENNES DES EAUX SOUTERRAINES D'AQUIFERE DE SOCLE..... | 51 |
| 1. CONTEXTE..... | 51 |
| 1.1. Groundwater isolation governs chemistry and microbial community structure along hydrologic flowpaths..... | 52 |
| 2. MATERIAL AND METHODS OF THE COMPLEMENTARY RESULTS..... | 66 |
| 2.1. Sampling and chemical analyses of groundwater samples for the metagenomic approach..... | 66 |
| 2.2. Total DNA extraction and Illumina library preparation for the metagenomic approach..... | 66 |

| | |
|--|------------|
| 2.3. Community sequence filtering and analyses of the metagenomes | 66 |
| 3. COMPLEMENTARY RESULTS AND DISCUSSION..... | 68 |
| 3.1. Taxonomic composition in Bacteria from metagenomes..... | 68 |
| 3.2. Variability in microbial community structure and hydrochemistry between sites (metagenomes)..... | 70 |
| 3.3. Taxa composition differences between sites (metagenomes) | 73 |
| 3.4. Taxa distribution within the Saint-Brice site samples (metagenomes)..... | 74 |
| 3.5. Taxa distribution within the Ploemeur site samples (metagenomes) | 75 |
| 3.6. Positive correlations between taxa and environmental parameters (metagenomes) | 77 |
| 4. CONCLUSION | 78 |
| CHAPITRE 4 - CONTROLES HYDROGEOCHIMIQUES ET MICROBIENS SUR LES CYCLES REDOX DU FER ET DU SOUFRE DANS L'EAU SOUTERRAINE A TEMPS DE RESIDENCE ELEVE DES AQUIFERES DE SOCLE | 80 |
| HYDROGEOCHEMICAL AND MICROBIAL CONTROLS OF IRON AND SULFUR REDOX CYCLES IN HIGH RESIDENCE-TIME GROUNDWATER OF HARD-ROCK AQUIFERS. | 82 |
| ABSTRACT | 82 |
| 1. INTRODUCTION | 83 |
| 2. MATERIALS AND METHODS | 85 |
| 2.1. Hydrogeological setting..... | 85 |
| 2.2. Community structure | 85 |
| 2.3. Hydrogeochemical and isotopic data | 85 |
| 2.4. Mixing ratios..... | 86 |
| 2.5. Generalized Linear Models (GLM) and general Linear Model (LM)..... | 87 |
| 2.6. Redundancy analyses (RDA)..... | 87 |
| 3. RESULTS | 89 |
| 3.1. Iron and Sulfur geochemistry | 89 |
| 3.2. Relationships between Gallionellaceae, Gallionella and Sideroxydans and environmental parameters in groundwater..... | 91 |
| 3.3. Micro-organisms involved in sulfur cycle..... | 96 |
| 4. DISCUSSION..... | 98 |
| 4.1. Geochemical processes | 98 |
| 4.2. Relationships between the iron redox cycle and the geochemical niche of Gallionellaceae in old groundwater..... | 100 |
| 4.3. Coupling processes and microorganisms acting in the sulfur cycle | 101 |
| 5. CONCLUSION | 102 |
| CHAPITRE 5 – DYNAMIQUE TEMPORELLE DE LA COMPOSITION DES COMMUNAUTES MICROBIENNES DURANT LA TRANSITION HYDROLOGIQUE ENTRE LES PERIODES DE DECHARGE ET RECHARGE, DANS L'AQUIFERE DE SOCLE DE BETTON..... | 104 |
| 1. INTRODUCTION | 104 |
| 2. MATERIELS ET METHODES | 106 |
| 2.1. Site d'étude | 106 |
| 2.2. Suivi de la structure des communautés | 107 |
| 2.3. Suivi hydrochimique, hydrologique et pluviométrique..... | 107 |
| 2.4. Détermination des proportions de mélange entre différentes masses d'eau..... | 108 |
| 2.5. Analyses métagénomiques des communautés microbiennes | 108 |
| 3. RESULTATS | 110 |
| 3.1. Situation des prélèvements chimiques et microbiologiques par rapport à la période de recharge | 110 |
| 3.2. Suivi des paramètres chimiques de l'eau des puits PZ6 et PZ3 au cours du temps durant la transition hydrologique entre les périodes de décharge et recharge..... | 111 |
| 3.3. Suivi de la composition des communautés microbiennes de l'eau des puits PZ6 et PZ3 au cours du temps durant la transition hydrologique entre les périodes de décharge et recharge..... | 118 |

| | |
|---|------------|
| 4. DISCUSSION | 124 |
| 4.1. <i>Variations hydrochimiques au cours du temps</i> | 124 |
| 4.2. <i>Interprétation des changements de structures de communauté microbienne au cours du temps</i> .. | 125 |
| 5. CONCLUSION | 127 |
| CHAPITRE 6 – DISCUSSION, CONCLUSION ET PERSPECTIVES | 128 |
| 1. IMPORTANCE DE L'ETUDE DE L'ECOSYSTEME MICROBIEN AU SEIN DES EAUX SOUTERRAINES EN BRETAGNE | 128 |
| 2. APPORT DE NOS TRAVAUX A LA CONNAISSANCE DE L'ECOSYSTEME MICROBIEN DES EAUX SOUTERRAINES D'AQUIFERES | 129 |
| 3. PERSPECTIVES | 133 |
| 3.1. <i>Applications possibles de la connaissance des microorganismes dans les aquifères</i> | 133 |
| 3.2. <i>Les pistes de recherche fondamentale</i> | 134 |
| 3.3. <i>Observer le vivant dans les aquifères</i> | 139 |
| 3.4. <i>Approfondissements possibles de ces travaux</i> | 141 |
| REFERENCES | 144 |
| ANNEXES: AUTRES TRAVAUX..... | 159 |
| ANNEXE A - IMPACT OF CLIMATE CHANGES DURING THE LAST 5 MILLION YEARS ON GROUNDWATER IN BASEMENT AQUIFERS | 159 |
| ANNEXE B - MICROORGANISMS PERSIST AT RECORD DEPTHS IN THE SUBSEAFLOOR OF THE CANTERBURY BASIN | 174 |

LISTE DES FIGURES

LISTE DES FIGURES

| | |
|--|----|
| FIGURE 1.1 SCHEMA DE LA STRUCTURE GEOLOGIQUE, HYDROLOGIQUE ET HYDROCHIMIQUE D'UN AQUIFERE DE SOCLE FISSURE-FRACTURE..... | 15 |
| FIGURE 1.2 SCHEMA SIMPLIFIE DES ECOULEMENTS HYDROLOGIQUES (OU "BOUCLES HYDROLOGIQUES") A L'ECHELLE D'UN BASSIN VERSANT, DE PLUSIEURS BASSINS VERSANTS, ET A L'ECHELLE DE BASSINS VERSANTS REGIONAUX..... | 16 |
| FIGURE 1.3 GRAPHIQUE ILLUSTRANT L'EVOLUTION DES CONCENTRATIONS ATMOSPHERIQUES DES CFC-11, CFC-12 ET CFC-113 EN FONCTION DU TEMPS DEPUIS 1940 JUSQU'A 2001..... | 17 |
| FIGURE 1.4 ARBRE PHYLOGENETIQUE DES PROTEOBACTERIA MONTRANT L'AFFILIATION DE GENRES FREQUEMMENT ISOLEES OU DE SOUCHES ORIGINAIRES D'EAU SOUTERRAINE (EN BLEU) ET DE SEQUENCES ENVIRONNEMENTALES BACTERIENNES D'ARNr16S DETECTEES A PARTIR D'ECHANTILLONS D'AQUIFERES (EN ROUGE)..... | 24 |
| FIGURE 1.5 ARBRE PHYLOGENETIQUE DE BACTERIES AUTRES QUE LES PROTEOBACTERIA, MONTRANT L'AFFILIATION DE GENRES FREQUEMMENT ISOLEES OU DE SOUCHES AYANT POUR ORIGINE LES EAUX SOUTERRAINES (EN BLEU) ET DES SEQUENCES DE GENES D'ARNr16S RETROUVEES A PARTIR D'ECHANTILLONS D'AQUIFERE (EN ROUGE). | 25 |
| FIGURE 1.6 ILLUSTRATION SIMPLIFIEE DE LA SUCCESSION DES VOIES METABOLIQUES RENCONTREES AU SEIN DES COMMUNAUTES MICROBIENNES DES AQUIFERES EN FONCTION DU GRADIENT REDOX, DEPUIS LA SURFACE VERS LA PROFONDEUR D'UN AQUIFERE.. | 28 |
| FIGURE 2.1 LOCALISATION DES SITES D'ETUDE SUR FOND RELIEF... | 36 |
| FIGURE 2.2 SCHEMA CONCEPTUEL DU SITE DE BETTON. | 36 |
| FIGURE 2.3 SCHEMA CONCEPTUEL DU SITE DE SAINT-BRICE-EN-COGLES..... | 37 |
| FIGURE 2.4 SCHEMA CONCEPTUEL DU SITE DE PLOEMEUR MONTRANT L'ACCIDENT GEOLOGIQUE D'ORIENTATION N20 ET LA ZONE DE CONTACT SUBHORIZONTALE ENTRE UN SCHISTE ET UN GRANITE.. .. | 39 |
| FIGURE 2.5 PHOTO D'UN PIEZOMETRE DANS LEQUEL DE L'EAU SOUTERRAINE EST POMPEE..... | 41 |
| FIGURE 2.6 ILLUSTRATION DU DISPOSITIF DE POMPAGE DE L'EAU SOUTERRAINE POUR DES PRELEVEMENTS DE CHIMIE ET DE MICROBIOLOGIE..... | 42 |
| FIGURE 2.7 DISPOSITIF DE FILTRATION DE TYPE BÜCHNER.. | 44 |
| FIGURE 2.8 SCHEMA DU TRAITEMENT DE CHAQUE ECHANTILLON D'EAU SOUTERRAINE PRELEVE. | 46 |
| FIGURE 3.1 PROPORTIONS OF BACTERIAL PHYLA READS IN INVESTIGATED SAMPLES. | 69 |
| FIGURE 3.2 PROPORTIONS OF READS ASSIGNED TO A BETAPROTEOBACTERIA FAMILY IN INVESTIGATED SAMPLES. | 71 |
| FIGURE 3.3 PRINCIPAL COMPONENT ANALYSIS (PCA) PLOT OF HYDROCHEMICAL DATA MEASURED IN TEN DIFFERENT GROUNDWATER SAMPLES FROM THREE HARD-ROCK AQUIFERS DURING 2 TO 5 YEARS ACCORDING TO THE SITE..... | 71 |
| FIGURE 3.4 REPRESENTATION OF THE NON-METRIC-MULTIDIMENSIONAL-SCALING ANALYSIS (NMDS) PLOT OF BRAY-CURTIS DISSIMILARITIES BETWEEN GROUNDWATER COMMUNITIES WITH A VECTOR FITTING OF HYDROGEOCHEMICAL VARIABLES TO COMMUNITY ORDINATION. | 73 |
| FIGURE 3.5 REDUNDANCY ANALYSIS (RDA) PLOT (SCALING 2) OF GROUNDWATER MICROBIAL COMMUNITIES (RESPONSE VARIABLES, IN CIRCLES) ACCORDING TO CONCENTRATIONS OF TOTAL Fe, INORGANIC CARBON (IC), TOTAL ORGANIC CARBON, (TOC), SO ₄ , O ₂ , NO ₃ , DISSOLVED N ₂ IN GROUNDWATER, AND EH AND PH (EXPLAINING VARIABLES, AS ARROWS). | 74 |
| FIGURE 3.6 TERNARY PLOT OF THE DISSIMILARITIES IN TAXA ABUNDANCE BETWEEN THE THREE INVESTIGATED AQUIFERS.. | 75 |
| FIGURE 3.7 TERNARY PLOT OF THE DISSIMILARITIES IN TAXA ABUNDANCE BETWEEN ST-BRICE-EN-COGLÈS MOST DISTANT SAMPLES IN TAXA COMPOSITION. | 76 |
| FIGURE 3.8 TERNARY PLOT OF THE DISSIMILARITIES IN TAXA ABUNDANCE BETWEEN PLOEMEUR MOST DISTANT SAMPLES IN TAXA COMPOSITION | 77 |
| FIGURE 3.9 NETWORK OF STRUCTURAL CORRELATIONS BETWEEN AND AMONG TAXA AND HYDROGEOCHEMICAL VARIABLES..... | 78 |
| FIGURE 3.10 VARIATION PARTITIONING ANALYSIS PLOT..... | 79 |

LISTE DES FIGURES

| | |
|--|-----|
| FIGURE 4.1 $\Delta^{34}\text{S}$ OF GROUNDWATER AS A FUNCTION OF THE INVERSE OF NON-MARINE SULFATE..... | 90 |
| FIGURE 4.2 RELATIVE ABUNDANCES OF GALLIONELLACEAE <i>GALLIONELLA</i> AND <i>SIDEROXYDANS</i> IN ALL OLD GROUNDWATER SAMPLES..... | 91 |
| FIGURE 4.3 RELATIVE ABUNDANCE OF TOTAL GALLIONELLACEAE AS A FUNCTION OF THE MEDIAN TOTAL FE CONCENTRATION..... | 92 |
| FIGURE 4.4 TRIPLLOT OF RDA OF GROUNDWATER SAMPLES WITH RELATIVE ABUNDANCE OF GALLIONELLACEAE, <i>GALLIONELLA</i> AND <i>SIDEROXYDANS</i> RESPONSE VARIABLES) DEPICTED AS + SYMBOLS AND GEOCHEMICAL PARAMETERS (EXPLANATORY VARIABLES) DEPICTED AS BLUE ARROWS..... | 95 |
| FIGURE 4.5 RELATIVE ABUNDANCE OF TOTAL GALLIONELLACEAE IN FUNCTION OF THE MEDIAN MIXING RATE FOR THE ST BRICE GROUNDWATER SAMPLES..... | 96 |
| FIGURE 4.6 "CONSUMED" OXYGEN (MG/L) VERSUS TOTAL GALLIONELLACEAE RELATIVE ABUNDANCE... .. | 96 |
| FIGURE 4.7 TRIPLLOT OF RDA OF THE TAXA RELATED TO SULFUR OXIDATION AND NITRATE REDUCTION AND RELATED ENVIRONMENTAL PARAMETERS..... | 98 |
| FIGURE 5.1 : SCHEMA HYDROGEOLOGIQUE INTERPRETATIF DU SITE DU VAU REUZE..... | 106 |
| FIGURE 5.2 : DIAGRAPHIE PHYSICO-CHIMIQUE REALISEE DANS LE PIEZOMETRE PZ6..... | 107 |
| FIGURE 5.3 SUIVI TEMPOREL DU NIVEAU PIEZOMETRIQUE RELATIF (EN M) DE LA STATION DE LA PETITE NOË (COURBE BLEUE)..... | 110 |
| FIGURE 5.4 EVOLUTION TEMPORELLE SUR DIX ANS DES CONCENTRATIONS EN CL, NO ₃ , O ₂ ET FER TOTAL, ET DU TAUX DE MELANGE AVEC L'EAU DE PZ3, DANS LE PIEZOMETRE PZ6..... | 112 |
| FIGURE 5.5 EVOLUTION TEMPORELLE SUR DIX ANS DES CONCENTRATIONS EN CL, NO ₃ , O ₂ ET FER TOTAL DANS LE PIEZOMETRE PZ3..... | 113 |
| FIGURE 5.6 VARIATIONS TEMPORELLES DES CONCENTRATIONS DES ELEMENTS CHIMIQUES DANS PZ3 ET PZ6.... | 114 |
| FIGURE 5.7 DENDROGRAMME DE CLASSIFICATION HIERARCHIQUE ASCENDANTE DES DIFFERENTS PRELEVEMENTS D'EAU SUR LA BASE DES CONCENTRATIONS DE TOUS LES PARAMETRES CHIMIQUES MESUREES DANS L'EAU DES PUIITS DE PZ6 ET PZ3 DE SEPTEMBRE A JANVIER..... | 115 |
| FIGURE 5.8 EVOLUTION DE LA PROPORTION DE MELANGE ENTRE L'EAU PROFONDE (PZ6 EN SEPTEMBRE A 70M) ET L'EAU DE SURFACE (PZ3) AU COURS DU SUIVI TEMPOREL..... | 116 |
| FIGURE 5.9 EVOLUTION DES CONCENTRATIONS EN NO ₃ ET SO ₄ DURANT LE SUIVI MICROBIOLOGIQUE TEMPOREL ET COMPARAISON AVEC LES CONCENTRATIONS MOYENNES RELEVES SUR PLUSIEURS ANNEES DANS L'EAU DE PZ6 A 80M, PZ6 A 40M, ET DANS LE PIEZOMETRE DE SURFACE A BETTON PZ3..... | 118 |
| FIGURE 5.10 A : EVOLUTION TEMPORELLE DE LA STRUCTURE DES COMMUNAUTES MICROBIENNES DANS PZ3 ET PZ6 (NON METRIC MULTIDIMENSIONAL SCALING, TRANSFORMATION : CHORD ; DISTANCE : BRAY- CURTIS). B : CLASSIFICATION HIERARCHIQUE ASCENDANTE DES ECHANTILLONS D'EAU SOUTERRAINE BASEE SUR LA COMPOSITION TAXONOMIQUE DES COMMUNAUTES MICROBIENNES..... | 120 |
| FIGURE 5.11 A : VARIATION DE LA PROPORTION MOYENNE (EN ‰) DES PRINCIPAUX PHYLA DE MICRO- ORGANISMES DANS LES METAGENOMES. B : POURCENTAGES DE VARIATION DE LA PROPORTION DES PRINCIPAUX PHYLA DE MICRO-ORGANISMES AU COURS DU TEMPS..... | 121 |
| FIGURE 5.12 EVOLUTION TEMPORELLE DE LA PROPORTION (EN ‰ PAR RAPPORT AU NOMBRE DE SEQUENCES DE BETAPROTEOBACTERIA) DES DIFFERENTS GENRES DE BETAPROTEOBACTERIA DETECTES DANS LES METAGENOMES ISSUS DE PZ3 (A) ET PZ6 (B)..... | 123 |
| FIGURE 6.1 MODELE CONCEPTUEL DE LA SUCCESSION DES PROCESSUS MICROBIENS ET DES TAXA PROBABLEMENT IMPLIQUES, LE LONG D'UNE VOIE DE CIRCULATION HYDROLOGIQUE DANS UN AQUIFERE DE SOCLE..... | 132 |
| FIGURE 6.2 CONCEPT DU COMPROMIS ENTRE L'HETEROGENEITE SPATIALE DE LA NICHE, L'AIRE DE L'HABITAT ET LA RICHESSE SPECIFIQUE..... | 140 |

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|--|----|
| TABLE 2.I TABLEAU RECAPITULATIF DES ECHANTILLONS D'EAU SOUTERRAINE PRELEVES ET DES ANALYSES REALISEES SUR CES ECHANTILLONS AU COURS DE CES TRAVAUX DE THESE. | 50 |
| TABLE 4.I GEOCHEMICAL PARAMETERS OF THE "OLD GROUNDWATER" | 89 |
| TABLE 4.II PUNCTUAL REPRESENTATIVE SO ₄ CONCENTRATIONS AND $\Delta^{34}\text{S}$ ISOTOPIC RATIOS OF THE DIFFERENT GROUNDWATER SAMPLES..... | 90 |
| TABLE 4.III DIFFERENT GENERALIZED LINEAR MODELS REALIZED ON THE RELATIVE ABUNDANCE ON <i>SIDEROXYDANS</i> AND <i>GALLIONELLA</i> IN ALL SAMPLES AND IN OLD GROUNDWATER SAMPLES..... | 94 |

LISTE DES ABREVIATIONS

LISTE DES ABREVIATIONS

ADES : Portail national d'Accès aux Données sur les Eaux Souterraines
BRGM : Bureau de Recherches Géologiques et Minières
CFC : ChloroFluoroCarbones
COT : Carbone Organique Total
emPCR : emulsion Polymerase Chain Reaction
GLM : Generalized Linear Models
HAP : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques
LM : Linear Model
MID : Multiplex IDentifiers
NMDS : Non-metric Multidimensional Scaling
OTU : Operational Taxonomic Unit
PCA : Principal Component Analysis
PTFE : PolyTetraFluoroEthylene
rCCA : regularized Canonical Correlation Analysis
RDA : Redundancy Analysis
RT-PCR : Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction
SF₆ : hexaFluorure de Soufre
SOX system : Sulfide OXidation system
UPGMA : Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean

GLOSSAIRE

GLOSSAIRE

Acétogène : désigne une bactérie capable de produire de l'acétate à partir de dioxyde de carbone et d'hydrogène, ou de glucides.

Acétogénèse : processus microbien consistant en la production d'acétate, un des précurseurs directs du méthane, à partir d'alcools (éthanol), d'acides organiques (acide lactique, acide pyruvique) et d'acides gras (acide butyrique). Une autre voie de synthèse de l'acétate passe par la voie de Wood-Ljungdahl qui utilise le dioxyde de carbone et le dihydrogène comme réactif. Ce processus est la deuxième phase de la production de méthanisation, après l'acidogénèse et avant la méthanogénèse.

Age apparent : l'âge apparent désigne le temps de transit apparent d'un mélange de masses d'eau, dans le prélèvement d'eau souterraine.

Aquifère : structure géologique perméable contenant de l'eau. L'eau y circule plus ou moins longtemps (de quelques heures à plusieurs milliers d'années) avant de se déverser dans un exutoire (mer, lac, cours d'eau) ou un autre aquifère.

Aquifère karstique : aquifère caractérisé par des formes superficielles et souterraines engendrées par la dissolution de certaines roches, en particulier les roches carbonatées (karstification).

Archées : microorganismes unicellulaires procaryotes constituant un règne du vivant au même titre que les Bactéries. Les Archées diffèrent des Bactéries par leur machinerie génétique et cellulaire, et on les distingue de ces dernières grâce à la séquence de leur gène d'ARN ribosomal 16S (ARNr 16S).

Bactéries : microorganismes unicellulaires procaryotes constituant un règne du vivant, et qui se distinguent des Archées notamment grâce à la séquence de leur gène d'ARN ribosomal 16S (ARNr 16S).

Battement de nappe : variation au cours de l'année du niveau de la nappe. Le niveau d'une nappe phréatique s'élève en automne et hiver (lors de la recharge) jusqu'au printemps, puis baisse en été pour atteindre son minimum au début de l'automne.

Boucle hydrologique : voie de circulation d'une masse d'eau souterraine depuis son incorporation dans la zone saturée de l'aquifère jusqu'à son exutoire. Il existe des boucles de différentes tailles : les boucles courtes sont rencontrées dans la partie altérée peu profonde des aquifères, alors que les boucles les plus longues descendent plus en profondeur et peuvent avoir lieu à l'échelle de plusieurs aquifères et à l'échelle régionale.

GLOSSAIRE

Chimolithotrophe : organisme (typiquement une bactérie) qui utilise au choix, une molécule organique ou un composé minéral comme source d'énergie (chimiosynthèse) et des composés minéraux oxydants comme les nitrates, le dioxygène, le fer(II) etc..., comme donneurs d'électrons.

Commensalisme : exploitation non-parasitaire d'une espèce vivante par une autre espèce.

Espèces allopatriques : espèces qui n'ont pas ou presque pas d'échanges génétiques, du fait qu'une « barrière » naturelle (fractures non connectées entre elles par exemple) les sépare.

Exutoire : dans un aquifère, l'exutoire est le déversoir, naturel ou non, des eaux souterraines présentes en excès dans le sous-sol.

Hétérotrophe : organisme vivant dont la source de carbone est un composé organique produit par un autre organisme vivant. Par opposition les organismes autotrophes utilisent une source de carbone qui n'est pas produite par d'autres organismes vivants, comme le dioxyde de carbone.

Lithoautotrophe : organisme (typiquement une bactérie) qui utilise des composés minéraux oxydants comme les nitrates, le dioxygène, le fer(II) etc..., comme donneurs d'électrons, et une source de carbone inorganique comme le dioxyde de carbone.

Métagénomique : méthode d'étude du contenu génétique d'échantillons environnementaux (ex : intestin, océan, sols, air, etc.), via le séquençage direct de l'ADN présent dans l'échantillon, ce qui permet une description du contenu génomique de l'échantillon, mais aussi un aperçu du potentiel fonctionnel des organismes présents dans cet environnement.

Méthanogène : microorganismes appartenant aux Archées, qui produisent du méthane comme sous-produit métabolique de la vie en conditions anoxiques.

Méthanogénèse autotrophe : ensemble de voies métaboliques produisant du méthane chez certains microorganismes, qualifiés de méthanogènes. Quand elle est autotrophe, la méthanogénèse correspond à un processus de respiration anaérobie où le dihydrogène sert de donneur d'électron et est utilisé pour réduire le dioxyde de carbone en méthane.

Méthanotrophe : organisme procaryote (bactérie ou archée) capable de se développer en n'utilisant que le méthane comme source de carbone et d'énergie.

Oligotrophique : un milieu oligotrophique est un milieu pauvre en matières organiques et en matières nutritives.

Protozoaires : protistes (eucaryotes unicellulaires) hétérotrophes qui ingèrent leur nourriture par phagocytose.

GLOSSAIRE

Syntrophie : relation mutualiste établie lors d'un co-développement de deux espèces bactériennes et au cours de laquelle chaque espèce produit un élément nutritif essentiel au développement de l'autre.

Temps de résidence : pour une eau souterraine, le temps de résidence désigne le temps de transit d'une masse d'eau, depuis son incorporation dans la zone saturée de l'aquifère jusqu'à l'exutoire.

Zone altérée : correspond à une formation de roches altérées souvent dans la partie superficielle de l'aquifère de socle, et qui est capable de stocker l'eau dans l'aquifère. Les transferts de l'eau souterraine dans cette zone sont plutôt rapides et donc les temps de résidence relativement courts.

Zone altérée-fissurée : correspond à une couche géologique de transition entre la zone altérée et la zone fracturée. Cette zone est constituée de roches moins altérées que dans la zone altérée, mais plus altérées que dans la zone fracturée. Elle assure une fonction de transmission de l'eau souterraine entre les zones altérée et fracturée. La zone altérée-fissurée se caractérise par des roches fissurées horizontalement dans ses premiers mètres, puis par une densité de fractures qui diminue avec la profondeur.

Zone de décharge : zone d'exutoire et où les eaux souterraines sont exfiltrées de l'aquifère, suivant en général des voies de circulation ascendantes.

Zone fracturée : correspond à une formation de roches dures fracturées. Dans cette zone, l'eau souterraine circule exclusivement au travers de fractures. La transition entre cette zone et la zone altérée-fissurée n'étant pas évidente, la zone fracturée et la zone fissurée-altérée sont souvent considérées comme une seule et même zone appelée « zone fissurée-fracturée ». Dans cette zone, la circulation de l'eau souterraine est généralement plus lente que dans la zone altérée avec des temps de résidence plus longs.

Zone hyporhéique : Ensemble des sédiments saturés en eau, situés au-dessous et à côtés d'un cours d'eau contenant une certaine quantité d'eau de surface. Si le cours d'eau s'écoule sur un substratum imperméable, il ne développera pas de zone hyporhéique. La zone hyporhéique peut être constituée exclusivement d'eau de surface ou caractérisée par un mélange d'eau de surface et d'eau souterraines. Cette zone peut servir d'interface entre la nappe et la rivière.

CHAPITRE 1 – INTRODUCTION GENERALE

Les aquifères constituent un écosystème microbien à grande échelle, et sont souvent qualifiés de réservoir de biodiversité. Cet écosystème intervient dans la préservation de l'eau souterraine. Pour comprendre son fonctionnement, il est nécessaire d'intégrer des approches d'hydrochimie, d'hydrologie et d'écologie microbienne. Les aquifères sont en effet régis par des contraintes physiques, chimiques et biologiques, qui sont intimement liées, qui dépendent les unes des autres et agissent les unes sur les autres.

Dans les aquifères, les contraintes physiques se traduisent par l'existence de différentes boucles de circulation hydrologique s'étageant sur plusieurs niveaux. Chacune de ces boucles créent différents habitats avec des conditions différentes depuis la partie superficielle où les vitesses de circulations sont rapides, vers la partie la plus profonde de l'aquifère où les circulations se font plus lentement. Ces boucles sont responsables de la connexion entre les différentes communautés microbiennes résidant dans un aquifère ainsi que des flux de nutriments parvenant dans ces écosystèmes. Au cours de son transit le long de ces boucles hydrologiques, l'eau va également interagir avec la roche des aquifères, plus ou moins longtemps selon son temps de résidence. Le voyage de l'eau le long d'une boucle permettra ainsi une évolution chimique de l'eau souterraine depuis la surface en passant par les parties profondes de l'aquifère avant de rejoindre l'exutoire. L'eau transitant par le sol avant d'être incorporée à l'aquifère peut aussi être impactée chimiquement par la présence de polluants dans le sol ou l'atmosphère, et être à l'origine de l'incorporation de polluants issus de la surface au sein de l'aquifère.

Les aquifères constituent une ressource en eau majeure mais exposée à des pollutions ponctuelles et diffuses pouvant impacter l'écosystème microbien. Les pollutions ponctuelles concernent principalement les pollutions par les hydrocarbures ou les pesticides, et ne seront pas abordées au cours de ce travail. Dans ce manuscrit, seuls les cas de pollution diffuse seront traités. En Bretagne, la principale source de pollution diffuse des eaux souterraines est l'agriculture intensive responsable des fortes concentrations en nitrates observées dans les eaux souterraines superficielles. Cette contamination en nitrates peut être amplifiée par les activités de pompage des eaux souterraines dans le cas des sites exploités. Les nitrates constituent une source potentielle d'électrons pour les microorganismes, leur intrusion est donc susceptible d'impacter l'écosystème microbien. Cependant, les effets de cette pollution diffuse sur l'écosystème superficiel des aquifères restent encore mal connus.

Les parties profondes des aquifères constituent des environnements encore très peu explorés. Dans ces environnements profonds, des preuves de vie bactérienne ont été retrouvées à plusieurs kilomètres de profondeur où les circulations hydrologiques sont très lentes. Ces environnements abritent des écosystèmes isolés dont on a peu d'exemples. Ce sont des milieux où les concentrations en oxygène, nitrates et carbone organique, principaux accepteurs et donneur d'électrons en surface, sont très faibles. Dans ces milieux, d'autres

CHAPITRE 1

accepteurs/donneurs d'électron et source de carbone sont donc utilisés. Les parties profondes des aquifères sont alimentées avec une régularité et une intensité variable mais généralement faibles. Cependant, l'intensité et la régularité de la connexion entre les parties superficielles et profondes des aquifères reste encore mal très évaluée. Dans certains cas, des masses d'eau peuvent même rester emprisonnées dans les parties profondes des aquifères, isolées de la surface pendant plusieurs centaines de milliers d'années.

De par leur connexion variable dans le temps entre la partie superficielle et profonde de l'aquifère, responsable de la présence de gradients hydrochimique et hydrologique, les aquifères constituent un bon modèle pour étudier les liens entre l'hydrologie et les communautés microbiennes ainsi que leurs fonctions métaboliques.

Il s'agira donc dans cette thèse d'aborder les questions concernant :

- (1) l'effet du degré d'isolement hydrologique des eaux souterraines et des différentes conditions hydrogéochimiques sur la structure des communautés microbiennes et leur diversité ;
- (2) la continuité de l'écosystème dans les eaux souterraines d'aquifères ;
- (3) les changements hydrochimiques liés aux métabolismes des communautés microbiennes présentes dans les eaux souterraines ;
- (4) l'effet de la variation temporelle de l'intensité de la connexion entre les parties superficielle et profonde des aquifères sur les communautés microbiennes.

1. Présentation du modèle d'étude : l'aquifère de socle fissuré-fracturé

1.1. Les aquifères de socle fissuré-fracturé

1.1.1. Structure géologique générale d'un aquifère de socle

Le terme « aquifère » désigne de façon générique tout terrain perméable contenant une nappe d'eau souterraine. Il existe plusieurs types d'aquifères : sédimentaires au sein des grands bassins continentaux dont la principale caractéristique est d'être relativement homogènes du point de vue des écoulements, karstiques lorsque les conditions climatiques ont permis le développement de drains et galerie impliquant un contraste de vitesse entre la matrice et ces conduits, et les aquifères fissurés-fracturés qui se développent dans les fractures des roches dites cristallines (granites, schiste, gneiss...). Au cours de cette thèse, seuls des aquifères de socle fissurés-fracturés ont été analysés.

Les aquifères de socle cristallin sont classiquement représentés par un modèle géologique proposé par Wyns et collaborateurs et comportant trois zones (Wyns et al., 2004) (Figure 1.1):

- La zone « altérée » : constituée d'altérites sablo-argileuses issues de l'altération des roches sous-jacentes. Cette zone est souvent considérée comme un milieu poreux relativement homogène qui assure la fonction de stockage de l'aquifère. Son épaisseur est plus importante dans les parties hautes du bassin versant et diminue en se rapprochant de l'exutoire.
- La zone « altérée-fissurée » : correspond à une zone de transition et est caractérisée par des fissures horizontales nombreuses dont la densité décroît avec la profondeur. Elle assure la fonction transmissive de l'aquifère.
- La zone « fracturée » : correspond à la roche saine fracturée où la perméabilité est assurée principalement par les fractures et leur connectivité. La densité des fractures diminue avec la profondeur. La limite est souvent floue entre les zones altérée-fissurée et fracturée et ces deux zones sont souvent considérées comme une seule zone.

CHAPITRE 1

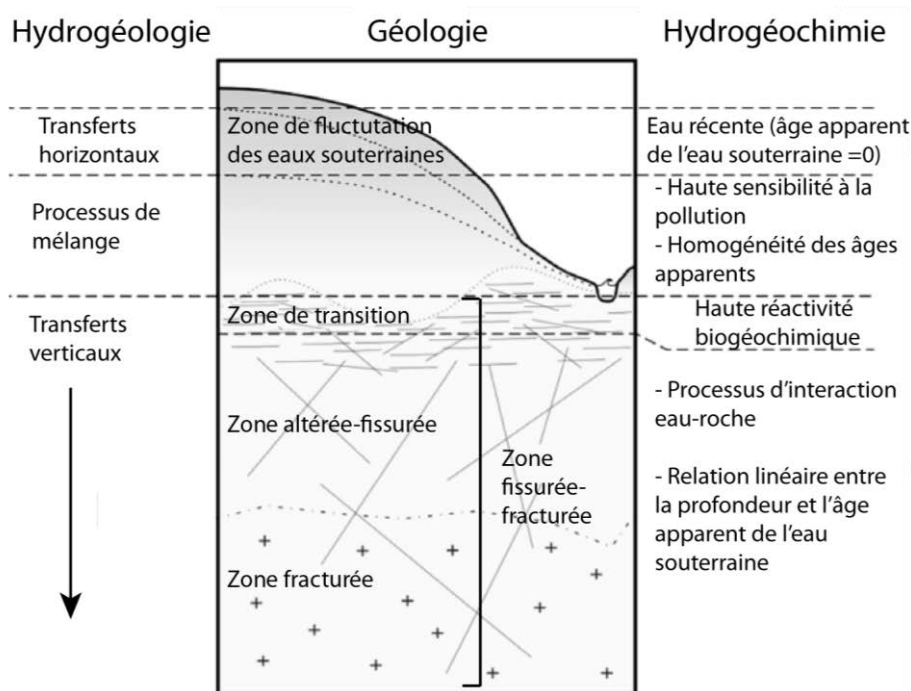


Figure 2.1 Schéma de la structure géologique, hydrologique et hydrochimique d'un aquifère de socle fissuré-fracturé. Traduit et modifié de Ayraud et al., 2008.

1.1.2. Fonctionnement hydrogéologique d'un aquifère de socle

Sous l'effet du gradient hydraulique et des différences de porosité entre la zone altérée et les zones altérée-fissurée et fissurée-fracturée, l'eau circule du haut vers le bas du bassin versant en se partitionnant verticalement entre les différentes zones (Figure 1.2). Au cours de son transit, l'eau va former des boucles hydrologiques descendant plus ou moins profondément au travers des différentes zones, et dont l'étendue peut-être locale, restreinte à une zone donnée et superficielle ; intermédiaires, s'étendant sur tout un bassin versant ; ou même régionale correspondant alors des écoulements s'étendant sur plusieurs bassins versant.

La zone altérée est soumise à la cyclicité de la recharge (pluviométrie) et des variations de niveau (battement de nappe) qui peuvent être importantes. Les conditions d'oxydo-réduction peuvent donc varier fortement et rapidement dans le temps. A l'inverse dans les zones profondes, constamment saturées, des échanges matriciels peuvent se mettre en place dans la fracture et la roche qui l'entoure. Ces interactions eau/roche sont d'autant plus importantes que la fracture va être faiblement connectée au reste du réseau de fracture, pouvant constituer ce qu'on appelle alors quelque fois à tort, une eau fossile.

CHAPITRE 1

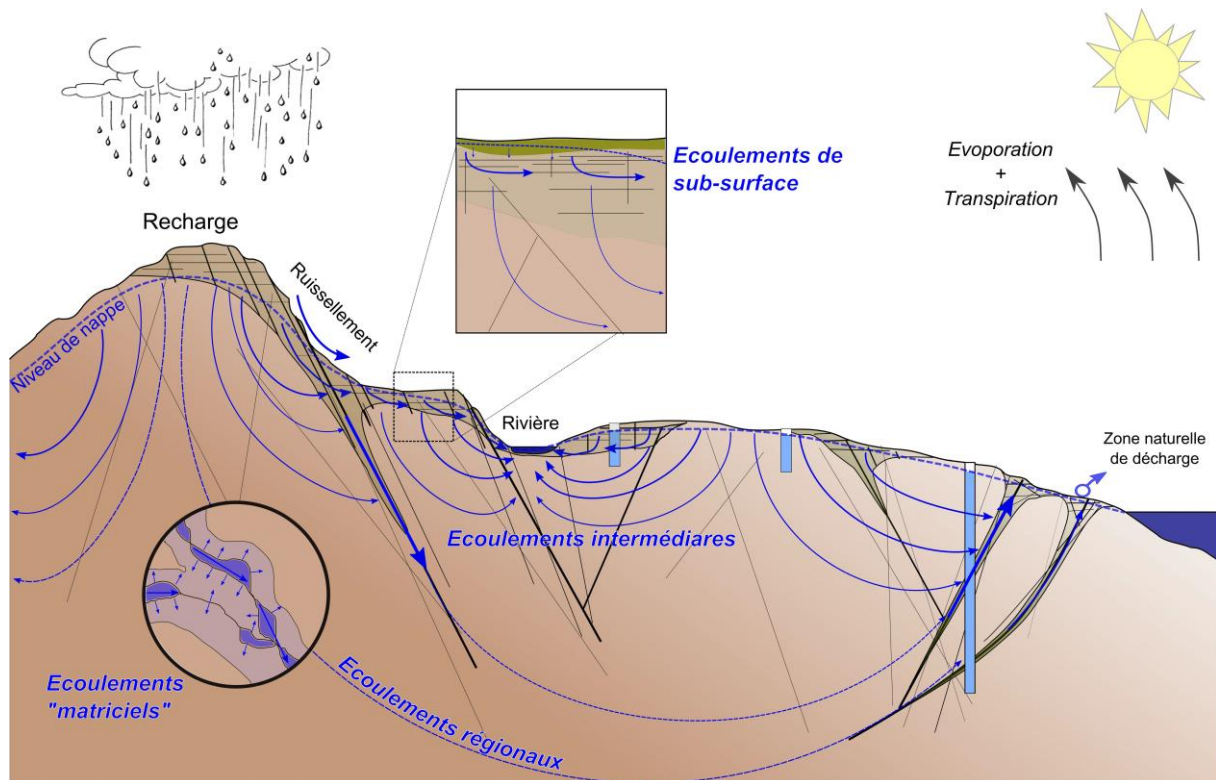


Figure 1.2 Schéma simplifié des écoulements hydrologiques (ou "boucles hydrologiques") à l'échelle d'un bassin versant, de plusieurs bassins versants, et à l'échelle de bassins versants régionaux. Thèse de Clément Roques, 2013.

1.2. Le temps de résidence des eaux souterraines

1.2.1. Concept du temps de résidence

Selon la porosité du milieu et l'intensité du gradient de charge, l'eau va résider plus ou moins longtemps au sein d'un l'aquifère avant de rejoindre l'exutoire. Ce temps est appelé « temps de résidence ». Etre capable de déterminer le temps de résidence d'une eau permet de comprendre le transfert de polluants, les processus de mélange entre de l'eau de surface et de l'eau souterraine et de comprendre comment fonctionne hydrochimiquement un aquifère.

La détermination du temps de résidence appelé également « âge apparent » se base sur la mesure de concentrations de traceur naturel ou artificiels tels que des traceurs environnementaux atmosphériques (^{85}Kr , le ^3H , le SF_6 , CFC) ou encore des traceurs radioactifs tels que le ^{14}C , ^{32}Si , ^{35}S , ^{36}Cl , ^{39}Ar , ^{81}Kr ou le ratio $^3\text{H}/^3\text{He}$.

En déterminant ce temps de résidence à différents endroits et différentes profondeurs de l'aquifère, on peut en déduire des vitesses, des taux de renouvellement, des proportions de mélanges et ainsi mieux comprendre le fonctionnement hydrodynamique du bassin versant.

CHAPITRE 1

1.2.2. Détermination du temps de résidence à partir des concentrations en CFC dans les eaux souterraines

Dans le cadre de ce travail la méthode de datation privilégiée est basée sur la mesure des CFC (chlorofluorocarbones) et du SF₆ (hexafluorure de soufre). Les CFC sont des composés synthétiques, qui ont été produits au début des années 1930 et utilisés dans la réfrigération, les aérosols, l'isolation, les matériaux d'emballage, les solvants, l'industrie électronique, etc. Trois composés sont utilisés en datation : le CFC-12 (dichlorodifluorométhane, CF₂Cl₂), le CFC-11 (trichlorofluorométhane, CFC₁₃) et le CFC-113 (trichlorotrifluoroéthane, C₂F₃Cl₃). Depuis 1940, leur concentration dans l'atmosphère n'a cessé de croître et les CFC ont été incorporés au cycle hydrologique terrestre.

Gaz à effet de serre et destructeurs de la couche d'ozone, une réglementation a été imposée quant à leur utilisation lors du protocole de Montréal. Ainsi en 2001, les concentrations atmosphériques de CFC ont atteint leur pic et se sont stabilisées, ou ont commencé à décroître (Figure 1.3).

A partir des mesures de concentrations en CFC dans un échantillon d'eau souterraine, on peut déduire l'« âge apparent » de cette eau. Dans les cas simples de circulation homogène (flux piston), cet âge apparent est peu ou prou équivalent au temps de résidence. En cas de système plus complexe, des mélanges entre masses d'eau comportant des temps de résidence différents peuvent exister. C'est le cas lorsque des échantillons d'eaux souterraines sont prélevés à proximité de zones de décharge, car ces zones concentrent des eaux de toutes les lignes de flux (ou / dites boucles hydrologiques) ou que l'échantillon d'eau provient d'un réservoir interceptant plusieurs fractures. Dans ce cas la concentration en traceur reflète la part d'eau récente (<60 ans) dans l'échantillon prélevé.

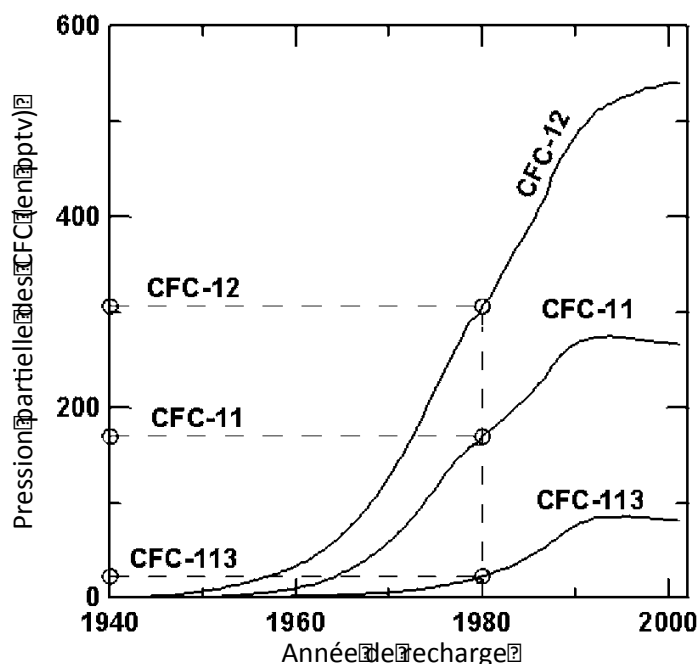


Figure 1.3 Graphique illustrant l'évolution des concentrations atmosphériques des CFC-11, CFC-12 et CFC-113 en fonction du temps depuis 1940 jusqu'à 2001. De Plummer, Busenberg et Cook (2006).

CHAPITRE 1

1.3. Compartimentation des aquifères de socle dans le Massif Armoricaïn, temps de résidence et gradient de pollution anthropique

Les travaux menés ces dernières années sur les aquifères de socles permettent de mieux comprendre le fonctionnement hydrogéologique de ces réservoirs et de chacun de ces compartiments en particulier sur le massif Armoricaïn (Thèse de Clément Roques, 2013 ; Thèse de Virginie Ayraud, 2006 ; Thèse de Antoine Armandine Les Landes, 2014).

Dans la zone altérée, en lien direct avec les activités agricoles, la concentration en NO_3 est souvent élevée (>50 mg/L de NO_3) mais reste néanmoins assez variable d'un site à l'autre. Les temps de résidence estimés s'étalent de 0 à 25 ans avec une moyenne autour de 12 ans (Figure 1.1).

Dans la zone fissurée-fracturée l'âge apparent de l'eau souterraine est clairement corrélé à la profondeur et peut atteindre des valeurs importantes. Les concentrations en NO_3 dans la zone fissurée-fracturée sont faibles eut égard à leur temps de résidence. Mais dans le cas de mélanges, l'absence de nitrates est souvent interprétée comme le résultat d'une dénitrification par oxydation des sulfures. La chimie des eaux souterraines dans cette zone est modifiée par des processus d'interactions entre l'eau et la roche. Ainsi ces eaux profondes présentent souvent de fortes concentrations en fer (Fe) et en carbone inorganique.

1.3.1. La notion de mélange (« mixing »)

Les différents compartiments de ces aquifères peuvent être connectés entre eux. Cette connectivité implique un transfert de la zone de surface plus récente vers la zone profonde. Les concentrations en CFC des eaux mesurées en profondeur sont ainsi de bons indicateurs de la proportion d'eau récente et donc de l'intensité du mélange. En effet, les eaux de la zone fissurée-fracturée ancienne sont exemptes de CFC et donc toute présence de ces traceurs marque la proportion d'eau récente. D'un site à un autre, l'âge apparent des eaux de la zone altérée peut varier légèrement et le calcul de la proportion de mélange doit donc être adapté à chaque contexte.

1.3.2. Les fluides salins et isolés

Dans le Massif Armoricaïn, des eaux à forte salinité (SO_4 , Cl, Na en particulier) sont quelques fois observées dans la zone fissurée-fracturée à distance du littoral. Ces eaux ont un temps de résidence élevé et sont exemptes de CFC et de SF_6 . Les analyses chimiques (Br/Cl, gaz dissous) et isotopiques ($\delta^{34}\text{S}_{\text{SO}_4}$, $\delta^{18}\text{O}_{\text{SO}_4}$, $\delta^{11}\text{B}$, ...) suggèrent qu'une partie de ces eaux provient de fluides salins anciens qui ont une origine marine et datent probablement de la dernière transgression marine il y a 2 millions d'années mélangés à de faible mais continues intrusions météoriques (Thèse de Antoine Armandine Les Landes, 2014 ; Aquilina et al., 2015). Ces environnements constitueront des zones avec des contraintes chimiques et de flux bien particulières.

1. Ecologie dans les eaux souterraines

2.1. Historique de l'étude de la diversité dans les aquifères

Le terme de diversité contient différents niveaux hiérarchiques d'organisation du vivant, intraspécifique et interspécifique notamment, il convient donc de bien définir ce que représente le terme « diversité » dans ce travail de thèse.

La diversité désigne ici de façon générique le nombre total d'espèces (ou « richesse spécifique ») peuplant un type d'habitat ou un écosystème, une région biogéographique ou encore la biosphère tout entière. La diversité est donc ici assimilée à la richesse spécifique qui compose une communauté vivante, quelle que soit l'étendue de son habitat. La structure d'une communauté réfère quant à elle non seulement aux espèces qui composent cette communauté mais aussi à l'abondance relative de chacune des espèces constituant cette communauté.

Les règles d'assemblage des communautés d'organismes correspondent aux facteurs induisant des observations récurrentes dans leur composition. Ces règles ont initialement été définies dans l'objectif théorique de comprendre les communautés d'organismes (Keddy et al., 1992).

Les premières études de la diversité au sein des aquifères ont d'abord consisté en des approches microscopiques comme les travaux de Van Leeuwenhoek en 1677 qui a décrit la première fois des particules semblables à des bactéries dans l'eau d'un puits. En 1853, Cohn identifie par des approches microscopiques également les premières bactéries oxydant le manganèse et le fer dans des puits d'eau souterraine. En 1956, la première caractérisation de la composition taxonomique d'une eau souterraine de la partie superficielle d'un aquifère a suggéré que les communautés microbiennes présentes dans cette eau souterraine étaient différentes de celles retrouvées en surface. Au début des années 1980, les techniques de forage et de carottage se sont améliorées permettant de réaliser des échantillonnages stériles. Des études ont alors clairement montré l'ubiquité de microbes autochtones dans tout le monde souterrain (Dunlap et al., 1977 ; Wilson et al., 1983 ; Phelps et al., 1989). Ces techniques d'échantillonnage ont notamment permis l'émergence des approches culturales depuis les années 1980 afin de tenter de caractériser certains taxa d'intérêt dans les aquifères comme, depuis 1989, *Gallionella ferruginea* oxydant le fer (Hanert, 1989 ; Hallbeck and Pedersen, 1990). Ces approches culturales ont persisté jusqu'à aujourd'hui avec par exemple la culture de *Geobacter sulfurreducens* (Caccavo et al., 1994), de souches de *Clostridium perfringens* prélevées dans les eaux souterraines (Araujo et al., 2004), de *Comamonas* retrouvée dans un suintement d'eau souterraine (Blöthe et Roden, 2009), d'un parent de *Sideroxydans* (Krepski et al., 2012) ou encore de cultures d'enrichissement tentant de cultiver plusieurs espèces simultanément (Pedersen et al., 2008).

L'histoire récente des travaux sur l'écologie des aquifères est intimement liée aux développements technologiques du séquençage massif. Apparue à partir de 2007, le séquençage massif a révolutionné de nombreux domaines en biologie, génétique et en écologie microbienne. Cette technique a permis d'envisager, avec une vision nouvelle

CHAPITRE 1

beaucoup plus élargie, la réalité du vivant et de sa complexité, et notamment de s'intéresser, de questionner, tester, analyser le plus grand réservoir de diversité de la biosphère, que constitue les microorganismes. A cet égard, la technologie de séquençage haut-débit, en particulier la technologie 454 de Roche, a constitué une rupture technologique majeure permettant le passage d'un séquençage de 96 molécules d'ADN simultanément (séquençage selon la méthode de Sanger) à des millions d'ADN différents (séquençage 454 Roche). Le séquençage 454 Roche a ainsi permis d'ouvrir et de démocratiser le séquençage de génomes entiers et de voir émerger la génomique environnementale. Une autre technologie de séquençage haut-débit, la technologie Illumina, s'est développée à partir de 2011 et est devenue dominante aujourd'hui, avec comme ambition un nombre de séquences produites beaucoup plus grand que ne le permet la technologie 454 Roche à un coût fortement réduit mais en produisant des fragments plus courts. Elle a cependant pour limite de rendre notablement plus difficile l'analyse des séquences en particulier l'attribution de la séquence à un groupe taxonomique microbien déterminé, mais permet de sonder plus largement l'ensemble des séquences d'ADN présentes dans un échantillon. Grâce au séquençage haut-débit, il est possible de séquencer tout l'ADN issu des diverses espèces présentes dans un échantillon environnemental donné, c'est-à-dire le séquençage du métagénome.

Comme le métagénome contient à la fois une information sur les espèces microbiennes présentes dans l'échantillon et sur les fonctions métaboliques qu'elles portent, la stratégie d'analyse métagénomique permet en théorie de décrypter la diversité et ses fonctions dans un habitat/milieu donné. Le séquençage haut-débit peut aussi être appliqué à l'étude d'un seul gène ou fragment de gène présent sur le génome des organismes d'un échantillon environnemental étudié. Ce gène ciblé, choisi au préalable, est multiplié artificiellement *in vitro* (amplification) à partir de l'ADN ou des acides ribonucléiques de l'échantillon environnemental. Cet ADN amplifié peut ensuite être séquencé massivement, on parle de « séquençage d'amplicons ». Cette approche ciblée permet d'analyser finement (1) la composition des communautés si l'amplicon contient de l'information phylogénétiquement analysable et (2) une fonction écologique particulière si l'amplicon correspond à un fragment clé d'une fonction écosystémique particulière.

Les approches de séquençage haut-débit ont été menées en parallèle et de façon complémentaire aux approches culturales pour caractériser la diversité microbienne dans différents environnements (Pagani et al., 2011, Tan et al., 2015). Depuis récemment, les approches métagénomiques tiennent une place très importante dans l'étude de la diversité microbienne dans les aquifères (Hemme et al., 2010 ; Smith et al., 2012 ; Ortiz et al., 2013 ; Nyssönen et al., 2013 ; Albertsen et al., 2013 ; Handley et al., 2013 ; Castelle et al., 2013 ; Purkamo et al., 2014 ; Wrighton et al., 2014 ; Hug et al., 2015). Ces différentes études ont toutes démontré que les aquifères et les eaux souterraines constituent de véritables « hotspots » de vie microbienne en dépit de sources énergétiques et carbonées *a priori* très limitées.

Malgré ces nouvelles techniques de séquençage haut-débit, la diversité microbienne dans les aquifères reste très mal connue de par les limites de nos connaissances (contenu des bases de données) et de par la difficulté d'accès de ces environnements. Cependant les progrès techniques encore actuels en séquençage haut-débit et en traitement des séquences issues des

CHAPITRE 1

différentes technologies permettent encore de découvrir et de caractériser de nouveaux grands groupes taxonomiques au sein des aquifères, jusque-là restés indéterminés ou même insoupçonnés (Castelle et al., 2013 ; Probst et al., 2014 ; Brown et al., 2015).

2.2. La vie dans le souterrain

2.2.1. La vie dans les aquifères : limites et stratégies

Les formes de vie présentes dans les aquifères sont surtout unicellulaires. On trouve des archées, des bactéries, des champignons, des protozoaires. Ces communautés microbiennes ont été rapportées comme étant actives et centrales dans les cycles biogéochimiques. Des traces de vie dans les aquifères ont été retrouvées à d'importantes profondeurs, un peu partout dans le monde depuis ces dix dernières années. En 2007, une bactérie *Pseudomonas stutzeri* a été isolée d'un aquifère granitique à 626m (Essén et al., 2007) et des communautés microbiennes ont été détectées jusqu'à 450m de profondeur dans le Aspö Hard Rock Laboratory en Suède (Hallbeck and Pedersen, 2008 ; Jägevall et al., 2011 ; Pedersen et al., 2012). En Finlande, dans un aquifère de socle cristallin de Outokumpu, des communautés microbiennes ont également été retrouvées à 1500m de profondeur en 2011 (Itävaara et al., 2011), puis jusqu'à la profondeur record dans la croûte terrestre de 2516m sur le même site en 2013 (Nyyssönen et al., 2013). Toujours en Finlande, les études des eaux souterraines du site de Olkiluoto ont démontré la présence de communautés microbiennes jusqu'à 450m de profondeur (Pedersen et al., 2008 ; Pedersen et al., 2013). Aux Etats-Unis, le site de réservoir de grès de Mt Simon dans le Bassin Illinois a démontré des communautés microbiennes dominées par *Halomonas sulfidaeris* à 1800m de profondeur (Dong et al., 2014).

Toutes ces études ont montré de façon unanime que c'est dans un premier temps la disponibilité des sources d'électrons, accepteurs et donneurs, qui limitent la vie dans les aquifères, puis dans un second temps la source de carbone. En effet, à la différence des environnements de surface, les écosystèmes des eaux souterraines sont dépourvus de carbone organique frais et disponible, et ne perçoivent pas d'énergie lumineuse permettant la photosynthèse. L'eau souterraine transite par le sol avant d'être incorporée dans le système hydrologique d'un aquifère, il a donc été soupçonné que les communautés microbiennes dans les eaux souterraines peu profondes (<30m) soient majoritairement constituées d'hétérotrophes adaptés aux conditions oligotrophiques et pauvres en nutriments du milieu (Ghiorse et Wilson, 1988 ; Madsen et Ghiorse, 1993). Mais les lithoautotrophes, fixant le CO₂ et récupérant leur énergie de donneurs d'électrons inorganiques, représentent aussi une grande proportion des communautés microbiennes dans les eaux souterraines surtout dans la partie profonde de l'aquifère.

Malgré des sources d'énergie, d'électrons et de carbone limitées au sein des aquifères, les communautés microbiennes se sont adaptées et ont colonisé ce milieu en développant diverses stratégies basées sur différents métabolismes et fonctions. Parmi les communautés microbiennes retrouvées au sein des aquifères, divers groupes fonctionnels ont été constatés tels que les méthanotrophes, les oxydants de l'ammonium, les oxydants et les réducteurs du

CHAPITRE 1

fer, les oxydants du soufre et les réducteurs de sulfate, les acétogènes, les méthanogènes, les fixateurs de CO₂ et les réducteurs de nitrate.

Partie superficielle des aquifères

Dans les parties superficielles des aquifères, les microorganismes retrouvés montrent souvent une capacité à dégrader des polluants. Les méthanotrophes appartiennent aux *Proteobacteria*, et sont étudiés principalement dans les aquifères pour leur capacité à dégrader des solvants chlorés comme le trichloroéthylène (Bowman et al., 1993). Les genres bactériens détectés dans les aquifères incluent par exemple *Methylobacter*, *Methylomonas*, *Methylosinus trichosporium*, *Methylocystis* et *Crenothrix* (Baker et al., 2001, Stoecker et al., 2006). Les oxydants de l'ammonium sont des autotrophes capables de tirer leur énergie de l'oxydation de l'ammonium et aussi comme les méthanotrophes, de la dégradation de solvants chlorés ou composés assimilés (Hyman et al., 1995). Ils sont également fréquemment détectés dans les aquifères basaltiques. De nombreux hétérotrophes appartenant aux *Proteobacteria*, les *Bacteroidetes*, les *Actinobacteria*, et les *Firmicutes* (Hirsch et al., 1992 ; Boivin-Jahns et al., 1995 ; Stim, 1995 ; Zlatkin et al., 1996) sont aussi retrouvés, mais majoritairement dans la partie superficielle des aquifères même s'ils sont aussi présents en profondeur. Les réducteurs de nitrate constituant une communauté phylogénétiquement très diverse, sont aussi fréquemment décelés au sein des aquifères contaminés en nitrate (Santoro, Boehm et Francis, 2006). De la dénitrification hétérotrophe est généralement observée en surface et de la dénitrification autotrophe un peu plus en profondeur a été détectée dans les aquifères (Starr et al., 1993 ; von der Heide et al., 2008 ; Toronto et al., 2008 ; Zhang et al. 2012).

Partie profonde et isolée des aquifères

Plus en profondeur dans les aquifères et dans des eaux souterraines plus isolées, lorsque les concentrations en oxygène et en carbone organique deviennent très faibles, des lithoautotrophes capables d'oxyder le fer et le soufre sont généralement observés. Les donneurs d'électrons inorganiques et la concentration en carbone inorganique sont en effet beaucoup plus abondants en profondeur (Gold, 1992 ; Kotelnikova et Pedersen, 1997 ; Pedersen, 1997 ; Stevens, 1997, Wrighton et al., 2012). L'assimilation du carbone inorganique dans les parties profondes de l'aquifère est suspectée d'être associée à l'oxydation de l'hydrogène ou du méthane, et à la réduction du sulfate, du soufre et/ou du fer ferrique (Wrighton et al., 2012). Des indices de méthanogénèse autotrophe et d'acétogénèse actives ont été trouvés dans les environnements profonds souterrains (Stevens et McKinley, 1995 ; Kotelnikova et Pedersen, 1997). Beaucoup de lithoautotrophes dans les aquifères appartiennent aux *Betaproteobacteria*, tels que *Thiobacillus* et *Halothiobacillus* capables de fixer du carbone inorganique et potentiellement impliqués dans la réoxydation d'espèces sulfurées réduites au sein des aquifères (Alfreider et al., 2003). Les genres *Gallionella* et *Sideroxydans* impliqués dans l'oxydation du fer (ferreux) et capables de fixer le carbone inorganique ont également déjà été rapportés dans les suintements d'eau souterraines d'aquifères (Hallbeck et Pedersen, 1990 ; Emerson et Moyer, 1997). Les sulfato-réducteurs sont très courant en profondeur au sein des aquifères, *Desulfotomaculum* est apparu par

CHAPITRE 1

exemple comme étant la population dominante des sulfato-réducteurs à 120m de profondeur dans un aquifère anoxique primitif (Detmers et al., 2001 ; Detmers et al., 2004). Des bactéries apparentées à *Desulfotomaculum* ont aussi été trouvées prédominantes dans des habitats souterrains à 3km de profondeur (Baker et al., 2003). D'autres genres tels que *Desulfobacter*, *Desulfovibrio* et *Desulfbulbus* ont aussi été détectés (Kleikemper et al., 2002).

Enfin, des archées méthanogènes ont déjà aussi été répertoriées au sein des aquifères comme *Methanosarcina* dans un aquifère granitique suédois, ainsi que *Methanohalophilus*, et *Methanobacterium* dans des eaux isolées à différentes profondeurs dans la même étude (Kotelnikova et Perderson, 1997). En 2005, Kleikemper et collaborateurs ont également trouvé *Methanosaeta* utilisant l'acétate et *Methanospirillum* utilisant l'hydrogène, ainsi que beaucoup d'autres archées potentiellement apparentées à ces méthanogènes. Les Figures 1.4 et 1.5 montrent des genres représentatifs, fréquemment isolés dans les eaux souterraines.

CHAPITRE 1

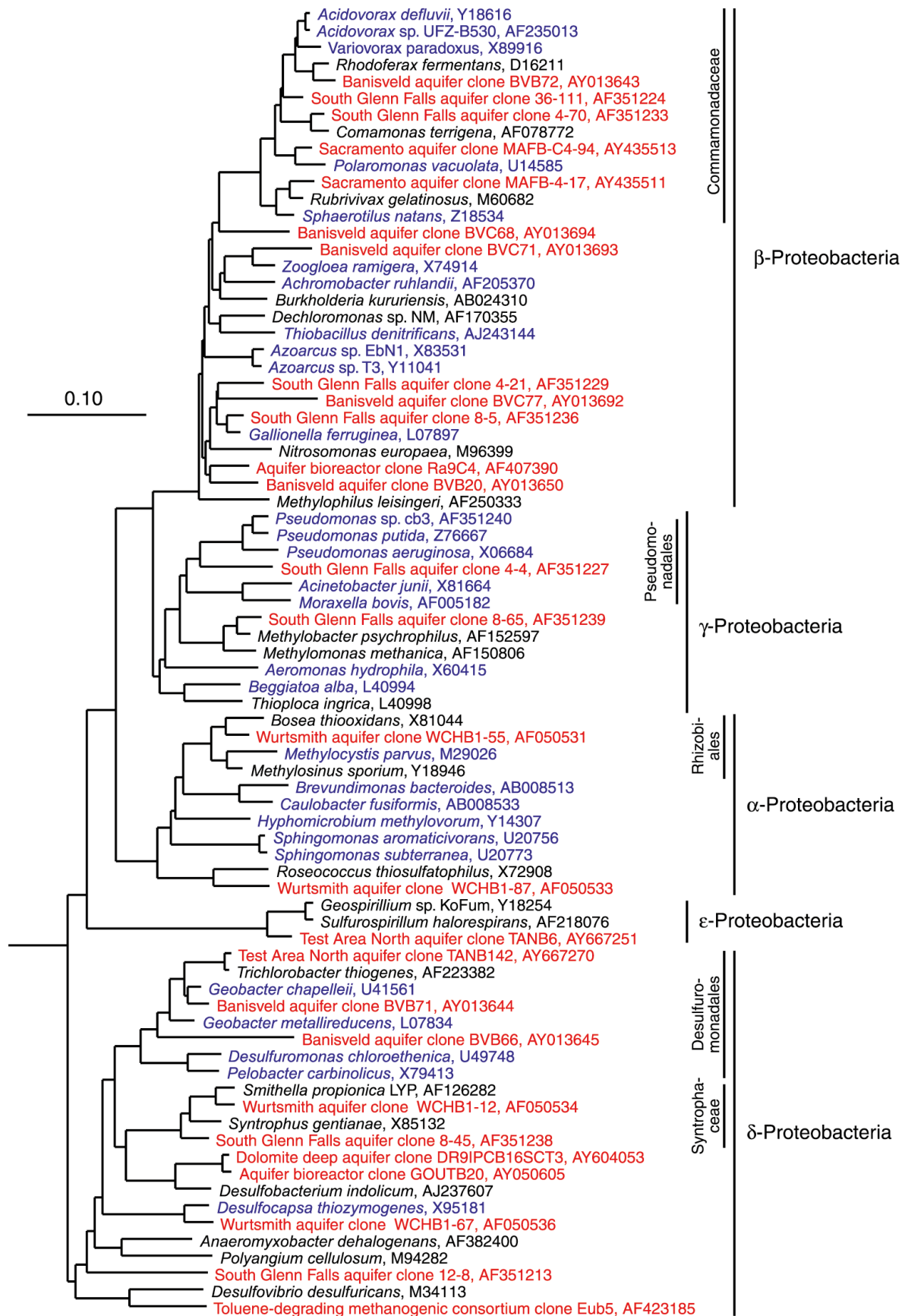


Figure 1.4 Arbre phylogénétique des Proteobacteria montrant l'affiliation de genres fréquemment isolés ou de souches originaires d'eau souterraine (en bleu) et de séquences environnementales bactériennes d'ARNr16S détectées à partir d'échantillons d'aquifères (en rouge). De Griebler et Lueders, 2009.

CHAPITRE 1



Figure 1.5 Arbre phylogénétique de bactéries autres que les Proteobacteria, montrant l'affiliation de genres fréquemment isolés ou de souches ayant pour origine les eaux souterraines (en bleu) et des séquences de gènes d'ARNr16S retrouvées à partir d'échantillons d'aquifère (en rouge). De Griebler et Lueders, 2009.

CHAPITRE 1

Théorie des niches, hypothèse de « l'arche de Noé » et diversité dans les aquifères

L'étonnante diversité des genres, des espèces et des fonctions microbiennes recensées dans les aquifères peut être expliquée en partie par la diversité des habitats qu'arborent les aquifères. En effet, ils sont constitués de plusieurs compartiments plus ou moins connectés entre eux. Chacun de ces compartiments arborent une multitude de niches écologiques constituant plusieurs écosystèmes hydrologiquement plus ou moins connectés, on parle ainsi d'un continuum d'écosystèmes. La connexion hydrologique plus ou moins accrue entre les différents compartiments contrôle le transfert de nutriments, de sources d'énergie, de particules et d'organismes donc les conditions environnementales de chaque niche et limite ainsi aussi la vie (Gibert et al., 1990). D'un point de vue empirique, on peut aussi expliquer la diversité observée par des différences existantes entre la fraction attachée et la fraction suspendue des microorganismes au sein des aquifères (Griebler et al., 2002 ; Flynn et al., 2008).

S'il existe une connexion hydrologique locale, à plus grande échelle un certain niveau d'isolement existe. Cet isolement peut gouverner des baisses ou dans certains cas des augmentations de diversité. L'hypothèse de « l'arche de Noé », par la formation de refuges locaux, suppose que la conséquence de l'isolement conduise à une différenciation de ces communautés. De cet isolement résulterait une diversité originale et un entretien d'un niveau élevé de diversité. Ces explications théoriques ou empiriques n'indiquent pas néanmoins quelles forces déterminent la diversité des microorganismes dans les eaux souterraines.

2.2.2 Facteurs contrôlant la diversité dans les eaux souterraines

Une diversité considérable est observée au sein des aquifères, alors qu'ils constituent des milieux oligotrophiques. Les facteurs fréquemment rapportés dans le contrôle de la diversité sont l'isolement des masses d'eau, l'homogénéité des conditions environnementales, la taille des habitats, l'hétérogénéité physique et chimique du milieu, les fluctuations temporelles des conditions environnementales (recharge) et les perturbations d'origine anthropique (pollution).

Réciproquement à la prédiction de l'hypothèse de « l'arche de Noé », l'isolement des masses d'eau provoquerait une faible diversité car les conditions locales uniformes sélectionneraient certains génotypes spécifiques sur de longues périodes (Van Waasbergen et al., 2000). De plus, la connectivité de cette niche isolée ralentit les transferts horizontaux de gènes à large échelle (Herrick et al., 1997 ; Zhou et Tiedje, 1995) et favoriserait l'émergence de nouveaux gènes dans la communauté isolée indigène de l'aquifère, pour faire face rapidement aux changements des conditions environnementales (Van der Meer et al., 1998).

L'homogénéité des conditions environnementales au sein des aquifères ne favoriserait pas l'augmentation ni l'émergence de nouvelles espèces dans des populations d'espèces qui sont déjà de petite taille et faiblement actives au sein des aquifères (Cohan, 2002). L'hétérogénéité de milieu entretenant une diversité de niche permettrait en théorie une diversité plus importante (Allouche et al., 2012).

CHAPITRE 1

La taille de l'habitat est quant à elle suspectée d'accroître la richesse d'espèces au sein des aquifères car elle augmente la diversité des niches écologiques et des conditions environnementales, mais cela n'a pas encore été investigué dans le cas des eaux souterraines.

L'hétérogénéité physique des aquifères (minéralogie et taille des grains de sédiments), l'hétérogénéité chimique (contenu en carbone organique, conductivité hydraulique) entretiennent la diversité des eaux souterraines (Kölbl-Boelke et Nehrkorn, 1992 ; Zhou et al., 2002) et semble donc constituer un élément important dans les règles d'assemblage des communautés de microorganismes dans les aquifères.

D'autres facteurs influençant l'hydrochimie et les communautés microbiennes sont les phénomènes de recharge des aquifères, induisant une entrée importante d'eau de surface dans l'hydrosystème qui impacte les zones redox des aquifères, ainsi que les pollutions anthropiques notamment issues des activités agricoles intensives (Vroblesky et Chapelle, 1994 ; Röling et al., 2001). Tous ces facteurs vont directement impacter les conditions chimiques des eaux souterraines, cette dernière contraignant elle-même directement la diversité.

L'influence majeure de l'hydrochimie sur la composition des communautés de microorganismes dans les aquifères

Des approches de modélisation des activités microbiennes basées sur les conditions chimiques et l'advection dans les eaux souterraines, ont démontré que les conditions chimiques relevées contraignaient à des temps de doublement des microorganismes de l'ordre de plusieurs siècles (Phelps et al., 1994). Dès 1982, Hoos et Schweisfurth ont rapporté différents groupes fonctionnels microbiens dans des aquifères jusqu'à des profondeurs de 90m, à la fois dans les zones saturée et non saturée (Hoos et Schweisfurth, 1982). Tous les groupes fonctionnels ont été retrouvés à plusieurs profondeurs, et leur occurrence a été reliée à la structure locale du sédiment de l'aquifère. La composition minéralogique des sédiments influence directement la chimie de l'eau par le biais des interactions eau-roche, ces dernières étant accrues dans les eaux souterraines à long temps de résidence. Ainsi en 1992, Kölbl-Boelke et Nehrkorn ont montré que la diversité isolée par des approches culturales dans différents forages et à différentes profondeurs d'un même aquifère dépendait des conditions physico-chimiques (Kölbl-Boelke et Nehrkorn, 1992). De façon similaire, en 2003 Takai et collaborateurs ont mis en évidence une relation entre la variation lithologique et géochimique et la diversité des communautés archéennes dans des roches du Crétacé (Takai et al., 2003). Les auteurs ont en effet exposé des sédiments à différentes profondeurs, chaque profondeur montrant des conditions géochimiques différentes : une profondeur montrait une forte concentration de carbone organique, de méthane et une faible concentration de sulfate, alors qu'une autre montrait de faibles concentrations en méthane et carbone organique et une forte concentration en sulfate. Bien que la diversité globale observée reste constante avec la profondeur, les auteurs ont constaté des changements significatifs dans les communautés selon l'hydrochimie, en particulier dans les communautés archéennes et surtout à l'interface géochimique. Il a été à nouveau rappelé en 2009 (Griebler et Lueders, 2009), que les facteurs importants contrôlant potentiellement la biodiversité dans les aquifères incluent l'hydrogéochimie, la disponibilité

CHAPITRE 1

des substrats oxydables, la dispersion des microbes à partir de la zone insaturée, et la structure du réseau trophique au sein des aquifères.

D'une manière plus générale, les communautés microbiennes au sein des aquifères sont soumises à un gradient redox global depuis la surface constituant un environnement très oxydant, jusqu'en profondeur où l'environnement est réduit, riches en espèces chimiques réduites tels que les minéraux sulfurés ou le méthane. Le long de ce gradient redox global, de nombreuses combinaisons potentielles de donneurs et d'accepteurs d'électrons, et de sources de carbone ont donné lieu à une énorme diversité écologique et métabolique de microorganismes, toujours en cours d'exploration. Les différents niveaux redox d'un environnement dans le temps et l'espace ont abouti à une hiérarchisation des processus métaboliques et écologiques, également reflétée par la diversité des communautés microbiennes associée à ces processus (Figure 1.6). Cependant très peu de travaux ont exploré ces successions écologiques et métaboliques au sein des communautés microbiennes dans les aquifères.

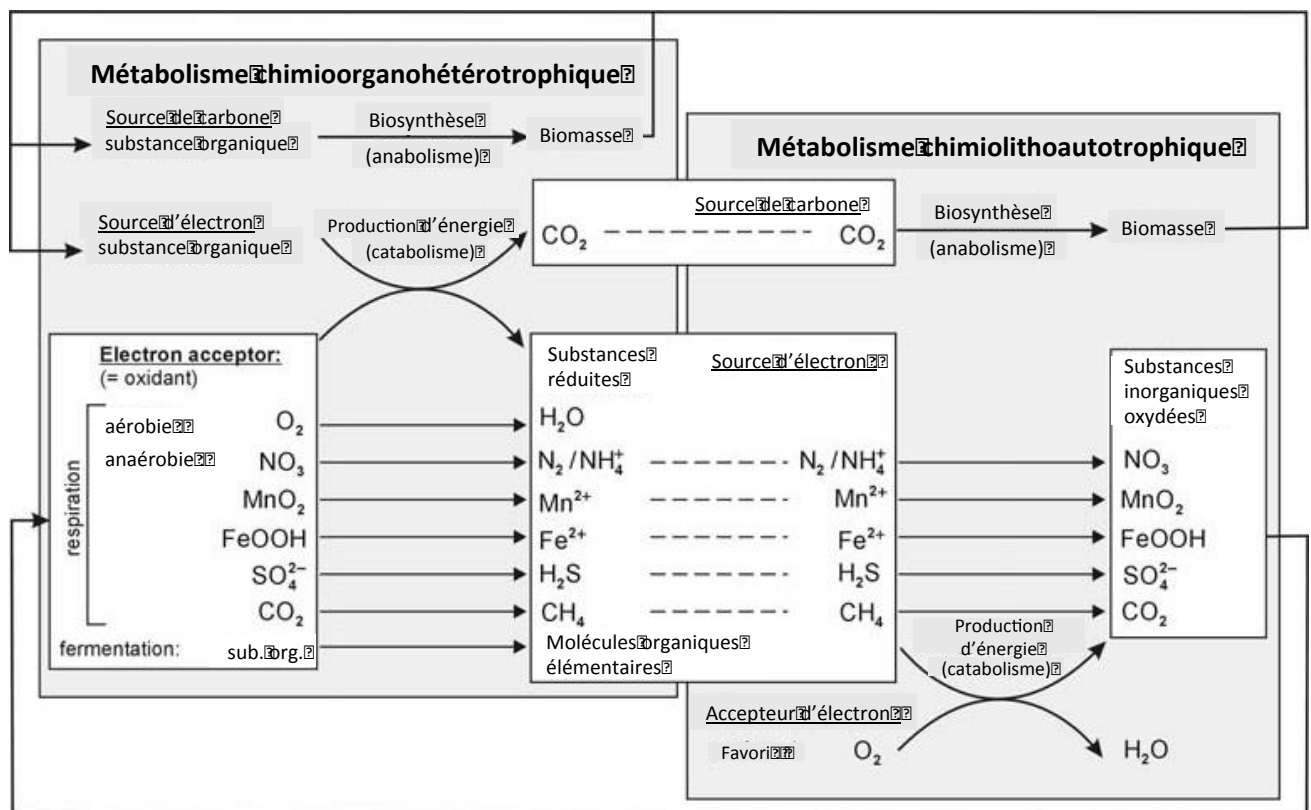


Figure 1.6 Illustration simplifiée de la succession des voies métaboliques rencontrées au sein des communautés microbiennes des aquifères en fonction du gradient redox, depuis la surface vers la profondeur d'un aquifère. Traduit et modifié d'après Goldscheider, Hunkeler et Rossi, 2006.

Les communautés de microorganismes des aquifères modifient les conditions du milieu et par conséquent impactent la diversité

Les communautés microbiennes impactent aussi directement la chimie de l'eau souterraine, en particulier dans les parties les plus profondes où les temps de résidence sont plus longs et

CHAPITRE 1

où les principaux donneurs et accepteurs d'électrons proviennent de la roche. Les cas les plus courants ayant permis de constater l'effet des communautés microbiennes sur l'hydrochimie dans les aquifères sont le cas des contaminations des aquifères par des hydrocarbures, des composés halogénés, des eaux usées, des déchets radioactifs ou encore des pesticides et des fertilisants (Ledin et Pedersen, 1996 ; Dar et al., 2013 ; Fabisch et al. 2013). En effet, dans ces situations/contextes, il est simple d'estimer les taux de biodégradation de ces composés par les microorganismes.

Dans le cas des aquifères non pollués, il est plus difficile d'évaluer l'effet *in situ* des communautés microbiennes sur l'hydrochimie car celles-ci jouent un rôle dans plusieurs cycles biogéochimiques interagissant entre eux. De nombreux processus ayant lieu dans les eaux souterraines peuvent être réalisés de façon biotique et abiotique, telle que l'oxydation du fer (Melton et al., 2014) mais/et il est difficile de différencier la part attribuable aux processus biotiques et abiotiques. De plus, de nombreux accepteurs et donneurs d'électrons inorganiques comme le fer ou le soufre retrouvés dans les parties profondes des aquifères sont présents à la fois sous forme soluble et sous forme précipitée dans les eaux souterraines (Jakobsen et Postma, 1999). Ainsi en 2014, Flynn et collaborateurs ont pu mettre en évidence, par des approches culturales en bioréacteurs de microorganismes issus des aquifères impliqués dans l'oxydation et la réduction du soufre et dans la réduction du fer, un cycle cryptique du soufre à pH alcalin (Flynn et al., 2014). Ce cycle est difficilement identifiable par des approches uniquement géochimiques et de diversité, car les concentrations de sulfate, thiosulfate, et de sulfure d'hydrogène n'ont pas le temps d'être détectées ou ne varient pas. En 2013, ces mêmes auteurs montrent l'effet des sulfato-réducteurs, des réducteurs de fer, des méthanogènes et des méthanotrophes sur l'hydrochimie des eaux souterraines de l'aquifère de Mahomet (Flynn et al., 2013). Dans l'aquifère karstique d'Edwards au Texas, Gray et Engel montrent l'effet des communautés sur la dissolution des carbonates (Gray et Engel, 2013). Par ailleurs, des nitrates sont naturellement présents dans les eaux souterraines, et leur baisse en concentration dans les eaux souterraines associée à de la dénitrification autotrophe et hétérotrophe est régulièrement détectée (Korom et al., 1992).

Les interactions biotiques dans les règles d'assemblage des communautés

Les interactions entre microorganismes dans les aquifères contrôlent aussi la diversité via des processus tels que la prédation des communautés microbiennes par les virus, la compétition pour les ressources, la syntrophie ou le mutualisme entre des microorganismes réalisant des fonctions métaboliques complémentaires ou interdépendantes. Dans les aquifères, le type d'interaction entre les populations microbiennes dépend des voies métaboliques et de la direction du flux. Par exemple, des bactéries aérobies créent les conditions de vie pour les bactéries anaérobies plus bas dans le gradient géochimique des eaux souterraines, alors qu'il n'y a pas d'influence dans la direction opposée (commensalisme). Ainsi en 2013, Flynn et collaborateurs supposent/attribuent une relation mutualiste entre les réducteurs de fer et de sulfate, les méthanogènes et les méthanotrophes dans les eaux souterraines de l'aquifère de Mahomet (Flynn et al., 2013). Les sulfato-réducteurs coexistent et sont en compétition avec des méthanogènes, ces derniers favorisant l'émergence des méthanotrophes. Dans les biofilms, toutes les populations sont en synergie, c'est-à-dire que toutes les populations sont

CHAPITRE 1

bénéficiaires (Quaiser et al., 2014 ; Ross et al., 2001). En 2014, Fleming et collaborateurs rapportent ainsi qu'une succession écologique entre les deux oxydants du fer *Leptothrix* et *Gallionella* au sein d'un biofilm issu d'un suintement d'eau souterraine avait lieu. Les auteurs montrent que *Gallionella* est dominante au début du printemps, alors que *Leptothrix* devient plus abondante le reste de l'année (Fleming et al., 2014). De la compétition pour les faibles quantités en carbone organique est suspectée dans les aquifères granitiques (Goldscheider et al., 2006), et de la prédation a pu être observée avec les virus bactériophages parasitant les bactéries des eaux souterraines (Kyle et al., 2008 ; Roudnew et al. 2010 ; Smith et al. 2013) et les protozoaires et les invertébrés ayant pour proies les bactéries (Sinclair et Alexander, 1989 ; DeLeo et Baveye 1997).

Ainsi, de nombreux facteurs biotiques et abiotiques sont suspectés d'exercer un contrôle sur la diversité et les fonctions des communautés microbiennes au sein des aquifères. Les communautés microbiennes exercent également un contrôle sur elles-mêmes via leur interaction avec leur environnement. Cette interaction avec l'environnement est visible via les changements des conditions hydrochimiques. Mais ces conditions hydrochimiques sont également le reflet des processus physiques survenant au sein des aquifères, tel que le phénomène de recharge des aquifères induisant des changements de pression hydraulique et donc des circulations hydrologiques. La variation de ces paramètres physiques influence aussi les communautés microbiennes.

2. Interactions entre les communautés microbiennes, l'hydrochimie et les circulations hydrologiques

3.1. A l'échelle globale : la répartition spatiale des communautés

Lien entre diversité et profondeur au sein des aquifères

L'isolement de masses d'eau et l'hétérogénéité des niches dans les aquifères présentant des conditions environnementales très contrastées peuvent être à l'origine de pattern de distribution des microorganismes marqué, comme suggéré par les études de Whitaker, Grogan et Taylor en 2003 sur les archées hyperthermophiles, ou de Papke et collaborateurs sur les cyanobactéries de sources chaudes (Whitaker, Grogan et Taylor, 2003 ; Papke et al., 2003). De plus l'isolement de masses d'eau pendant plusieurs centaines ou millions d'années peut permettre une évolution locale des communautés microbiennes et l'émergence d'espèces allopatriques (Fredrickson et Onstott, 2001).

Certains auteurs ont remarqué une corrélation entre la profondeur et la biodiversité observée, mais l'ont relié aux variations lithologiques et géochimiques. Ainsi en 2003, Takai et collaborateurs ont mis en évidence dans des roches du Crétacé que l'ensemble des espèces était retrouvé quasiment à toutes les profondeurs mais que des changements de communautés

CHAPITRE 1

étaient tout de même observables suivant la profondeur car les conditions chimiques évoluent localement (Takai et al., 2003). Une étude pionnière en 1988 avait déjà démontré une variation de la diversité bactérienne dans un aquifère superficiel sableux, en fonction de la profondeur d'un même puits, ainsi que dans les puits adjacents (Kölbl-Boelke, Anders et Nehrkorn, 1988). Une étude beaucoup plus récente montre une diversité des communautés bactériennes et archéennes le long d'un forage de 2516m dans la croûte continentale cristalline à Outokumpu en Finlande (Nyyssönen et al., 2013). Ces communautés varient également en diversité et en physiologie suivant la profondeur en réponse à la lithologie et à l'hydrogéochimie. Les auteurs concluent que les conditions géologiques et hydrogéochimiques, y compris l'existence et la connectivité du système de fractures et la faible quantité d'énergie disponible, ont un rôle clé dans l'écologie des communautés microbiennes de la biosphère profonde.

Effet des fluctuations annuelles des conditions environnementales (phénomène de recharge)

A l'échelle de l'aquifère, quelques études ont été menées dans le but d'examiner la dynamique spatio-temporelle des communautés microbiennes au sein d'un aquifère à l'échelle saisonnière. Ces études ont notamment permis de constater l'effet de la connexion des aquifères avec les rivières situées à proximité, en particulier pendant la période de recharge.

En 2012, Zhou et collaborateurs ont exploré le pattern saisonnier des communautés microbiennes et de l'eau souterraine d'un aquifère poreux alpin présentant de fortes fluctuations de la nappe. Les auteurs ont observé une baisse de la diversité lorsque le niveau de la nappe était au plus bas durant le printemps et l'été (Zhou et al., 2012). Le nombre de bactéries était plus élevé en automne après la période de recharge par les pluies d'été. Par ailleurs, les auteurs ont réalisé des incubations de sédiments stériles dans différents puits de l'aquifères et ont pu observer qu'après un an d'incubation les sédiments des puits arboraient un nombre de microorganismes et une diversité similaire aux sédiments incubés dans la rivière située à proximité des puits.

Des résultats similaires ont été obtenus par Lin et collaborateurs dans l'aquifère non confiné de Hanford (Washington, USA) (Lin et al., 2012). Les auteurs ont aussi analysé la dynamique spatiale et temporelle de la diversité des communautés microbiennes durant dix mois dans un aquifère superficiel (jusqu'à 17m de profondeur) situé près de la rivière Columbia. Des changements dans la composition des communautés ont été observés dans tous les puits durant les dix mois. Les changements les plus importants ont été observés au niveau de la zone de fluctuation de la nappe du fait de l'intrusion d'eau de la rivière Columbia (Washington, USA) dans la partie superficielle de l'aquifère au moment de la recharge. L'intrusion de l'eau de la rivière a en effet induit des changements dans les flux de donneurs et accepteurs d'électrons ainsi qu'une intrusion de protozoaires, prédateurs des communautés microbiennes, sur un cycle annuel.

Ces études ont apporté une meilleure compréhension de l'impact que peut avoir la zone hyporhéique sur les communautés microbiennes superficielles d'un aquifère, ainsi que l'effet à l'échelle plus locale de la lithologie et de l'hydrochimie dans un puits en fonction de la profondeur.

CHAPITRE 1

Cependant, aucune étude n'a évalué la dynamique des communautés microbiennes dans les parties plus profondes d'un aquifère, et à l'échelle de plusieurs aquifères. De rares travaux tels que ceux de Roques et collaborateurs ont montré que la recharge influence annuellement l'hydrochimie et la réactivité d'un aquifère, car celle-ci engendre un phénomène de mélange entre les eaux de surface et des eaux isolées plus profondes (Roques et al., 2014). Actuellement, aucune étude n'a évalué précisément l'effet de ce mélange des masses d'eau superficielles à faible temps de résidence et celles à long temps de résidence. Les effets du phénomène de recharge sur les communautés microbiennes restent encore largement inexplorés.

De même, les effets des activités de pompage sur l'hydrochimie et les communautés microbiennes au sein d'aquifères exploités restent tout aussi méconnus. Comme le phénomène de recharge, ces activités de pompage induisent des mélanges de masses d'eau présentant des temps de résidence et des conditions hydrochimiques très différents, dont les effets sur les communautés microbiennes restent indéterminés.

3.2. A l'échelle locale : la diversité au niveau de la fracture

Des différences de diversité et de fonctions sont observées entre les communautés microbiennes attachées à la roche et les communautés suspendues dans l'eau souterraine

La plupart des études de la diversité des communautés microbiennes dans les aquifères sont réalisées le long d'un forage ou à l'échelle de la partie superficielle d'un même aquifère. Du fait de la difficulté d'échantillonner les eaux souterraines d'aquifères, très peu d'études traitent de la diversité microbienne à l'échelle d'une fracture. Cependant, quelques études ont permis d'observer des différences entre les communautés microbiennes au contact de la roche par opposition aux communautés microbiennes suspendues dans l'eau souterraine.

Lehman et collaborateurs, ont étudié dans une autre étude le partitionnement des microorganismes entre l'eau souterraine et le milieu géologique, l'effet du flux d'eau dans un milieu poreux et dans un milieu fracturé sur le partitionnement des microorganismes (Lehman et al. 2001, b). Pour cela les auteurs ont réalisé des colonnes, certaines contenant un segment de basalte intact présentant des fractures naturelles et pour d'autres le même basalte broyé en particules. Les auteurs ont observé que 99% de la biomasse microbienne était attachée et qu'il y avait des différences entre la fraction attachée et la fraction non attachée des microorganismes. Ils ont par ailleurs noté que les *Betaproteobacteria* étaient plus abondantes dans la fraction suspendue des microorganismes à la fois dans le cas d'une fracture et dans le cas d'un milieu poreux. Dans le cas du milieu fracturé, les *Gammaproteobacteria* étaient plus importantes en abondance dans la fraction attachée.

En 2013, Flynn et collaborateurs ont mis en évidence une abondance importante de *Geobacter* capables de respirer des composés insolubles comme les oxydes de fer dans la communauté attachée à la roche par rapport à la communauté suspendue des eaux souterraines de l'aquifère de Mahomet (Flynn et al., 2013).

Lehman et collaborateurs démontrent dans une étude en 2001 sur un aquifère à roches cristallines qu'il existe des différences considérables en biomasse et en capacités

CHAPITRE 1

physiologiques entre les populations de microorganismes attachées à la roche et les populations suspendues dans l'eau souterraine le long d'un forage de 120m (Lehman et al. 2001, a). Ils montrent que l'abondance de microorganismes est plus importante dans la fraction non attachée à la roche donc dans l'eau souterraine. Ils observent également que les chimiolithotrophes sont plutôt retrouvés dans l'eau souterraine, que les hétérotrophes sont retrouvés dans les fractions attachée et non attachée mais qu'ils sont plus divers dans la fraction attachée.

En 2008, Hallbeck et Pedersen ont grâce à une flow-cell simulé les conditions chimiques et de pression des roches fracturées en travaillant avec de l'eau souterraine issue d'une fracture à 447m de profondeur. Le but de cette étude était de déterminer/d'évaluer la diversité et les taux des processus microbiens dans l'aquifère de Aspö (Hallbeck et Pedersen, 2008). Les auteurs ont pu grâce à leur dispositif déterminer/estimer le nombre de microorganismes (environ 10^5 cellules/mL) et les processus microbiens présents tels que réduction des nitrates, du fer, du manganèse, des sulfates, des acétogènes et des méthanogènes. Les auteurs ont pu observer le processus par lequel le sulfure d'hydrogène réagissait avec le fer ferreux pour former de la pyrite, et que le sulfure d'hydrogène produit via la sulfato-réduction microbienne, était aussitôt consommé par cette réaction.

Les différences entre les communautés attachées et les communautés suspendues sont reliées aux flux hydrologiques

En 2009 Picioreanu et collaborateurs modélisent la formation d'un biofilm en fonction de la dynamique des fluides, du transport des solutés, à partir d'un modèle physique tridimensionnel de filaments cylindriques communiquant entre eux, dans le but de simuler les circulations de l'eau souterraine et le développement de biofilm au cours du temps au sein de microfractures (Picioreanu et al., 2009). Les auteurs montrent par leur étude que le développement, l'attachement et l'accumulation de la biomasse au cours du temps affectent fortement la pression au sein des fractures, la distribution des vitesses de l'eau et la distribution du temps de résidence. Les auteurs démontrent également le développement d'un schéma d'écoulement hétérogène avec des canaux de flux préférentiels aboutissant à des zones de circulations quasi stagnantes, et une augmentation de la dispersion de la distribution du temps de résidence. Le développement d'une hétérogénéité du temps de résidence, des vitesses de circulation de l'eau, et de la pression au sein d'un petit réseau de fractures engendrerait donc une différenciation des communautés microbiennes. De façon cohérente, Zhou et collaborateurs ont observé que la dynamique hydrologique saisonnière induit des changements considérables des communautés microbiennes suspendues dans l'eau alors que les communautés des sédiments semblaient non affectées au niveau de leur biomasse et de leur diversité (Zhou et al., 2012).

La vitesse de circulation de l'eau, le temps de résidence et la pression hydraulique exercée à l'échelle des fractures, en particulier dans les parties plus isolées et profondes des aquifères, sont à l'origine du contact plus ou moins long entre l'eau et la roche. Ce temps de contact entre l'eau et la roche contraint les interactions eau-roche et donc la disponibilité de certains donneurs et accepteurs d'électrons, dans un milieu où les sources d'électrons pour les microorganismes proviennent essentiellement de la roche. Le phénomène de recharge et les

CHAPITRE 1

activités de pompage exercent un contrôle direct sur ces paramètres physiques, en induisant des changements de pression hydraulique au sein de l'ensemble d'un bassin versant. Ils sont donc susceptibles d'impacter les communautés microbiennes à l'échelle des différentes fractures, en modifiant les flux de nutriments, les sources d'électrons et également en influençant le détachement des microorganismes de la roche, permettant ainsi leur dispersion au sein du réseau de fractures.

L'écologie étudie la manière dont vivent et interagissent les organismes dans leurs milieux. Un écosystème se compose de différentes populations qui coexistent dans le même habitat et qui le plus souvent assument des fonctions écologiques différentes (Tilman, 1982). Des phénomènes tels que la migration individuelle ou la dispersion permettent aux populations et individus d'interagir et constituent un moteur de flux de gènes et de modifications dynamiques de populations et communautés d'organismes (Clobert et al., 2009). La dispersion dépend de la connectivité entre populations. Pour les microorganismes, cette dispersion peut être active (mobilité pour la recherche de nutriment et la colonisation de niche) ou passive (subie avec les mouvements de masse d'eau par exemple). Localement, l'hétérogénéité dans la composition des communautés de microorganismes est dépendante de ces phénomènes de dispersion active et passive. Avec un fort brassage, une homogénéisation de l'habitat est attendue conduisant en théorie à une faible hétérogénéité locale des communautés. Réciproquement, quand le brassage et la dispersion sont faibles, une structure plus réticulée et hétérogène des communautés est attendue.

4. Problématique

Dans ce contexte, ce travail de thèse tente ainsi de répondre aux questions suivantes :

- 1) **Quelles sont les règles d'assemblage des communautés microbiennes au sein des aquifères ?**
- 2) **Quels sont les effets de la circulation hydrologique sur la composition des communautés ?**
- 3) **Comment le degré d'isolement ou le degré de connexion d'une masse d'eau influence-t-il la composition des communautés microbiennes ?**
- 4) **Quel impact ont les communautés microbiennes sur les conditions hydrochimiques des aquifères ?**
- 5) **Quel est l'effet de la variation temporelle des flux hydrologiques notamment de la recharge sur les communautés microbiennes ?**

Afin de répondre à ces questions, un couplage des approches hydrochimique, hydrologique, et métagénomique sur trois aquifères de socle en Bretagne a été réalisé. Ce couplage permet de mieux comprendre le fonctionnement hydrologique des aquifères de socle via la détermination de la composition des communautés microbiennes qui y résident.

CHAPITRE 1

Les différents groupes microbiens retrouvés au sein des aquifères permettent en effet de comprendre plus finement l'impact des circulations hydrologiques et des processus de mélange au sein des aquifères. Ils permettent également d'estimer la vulnérabilité d'un aquifère face aux pollutions anthropiques diffuses.

La connaissance hydrologique et hydrochimique de ces aquifères permet également une compréhension de la composition des communautés microbiennes au sein des aquifères, par la détermination des principales forces qui les régissent. Les aquifères constituent des modèles intéressants en écologie microbienne, car ce sont des milieux dans lesquels les facteurs environnementaux sont très contraints, permettant ainsi une évaluation fine des traits fonctionnels et de l'hétérogénéité en composition des communautés microbiennes des aquifères.

CHAPITRE 2 – MATERIEL ET METHODES

1. Description des sites et des eaux souterraines analysées

La Figure 2.1 localise les différents sites où des eaux souterraines ont été prélevées.

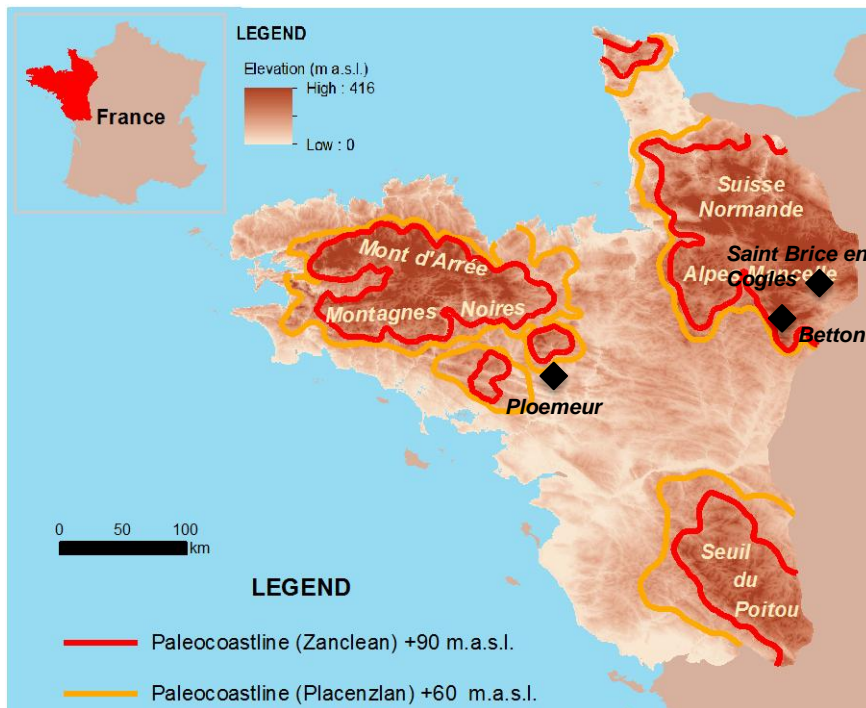


Figure 2.3 Localisation des sites d'étude sur fond relief. Les anciennes lignes de côtes sont représentées d'après Armandine Les Landes et al., 2014.

1.1. Betton

Le site d'exploitation du Vau-Reuzé repose sur des schistes Protérozoïque et est situé à 10km au nord de Rennes, près de la commune de Betton, en Bretagne. Le site est équipé de plusieurs piézomètres et est suivi depuis le début les années 2000. Les études réalisées mettent en évidence sur ce site trois masses d'eau principales (Figure 2.2) :

- Une masse d'eau dans les altérites, exploitée à partir d'un puits superficiel (le captage) puisant l'eau à 8m de profondeur, situé sur une rupture de pente de 9 % et s'écoulant selon un axe est-ouest. Cette masse d'eau relativement superficielle présente des caractéristiques hydrochimiques assez classiques : fortes concentrations en nitrates (> 50mg/L) ayant limité son exploitation pour l'eau potable, et temps de résidence moyen de l'ordre de 15-20 ans (Ayraud et al., 2006)
- Une masse d'eau profonde s'écoulant selon un axe nord-sud, exploitée pour l'eau potable depuis 1999 à partir d'un forage de façon à la mélanger avec l'eau du captage. Cette eau exempte de nitrates est par contre très riche en fer (jusqu'à 8-9 mg/L) et est relativement ancienne.

CHAPITRE 2

- Une seconde masse d'eau profonde au sud du site qui a pour caractéristique une très forte salinité résiduelle des dernières transgressions marines (Armandine et al., 2015 ; Aquilina et al., 2015)

Il a également été identifié sur le site, et en particulier dans le forage, l'existence d'une dénitrification autotrophe par oxydation de la pyrite (Ayraud et al., 2006, Aquilina et al., 2016).

Les deux puits investigués à Betton interceptent donc des masses d'eau très différentes. Le piézomètre PZ3 est situé proche de la surface, intercepte une eau riche en nitrates, et est alimenté par des boucles de circulations courtes avec de faibles temps de résidence. Le piézomètre PZ6 atteint des eaux souterraines profondes et salées présentant des temps de résidence de plusieurs milliers d'années.

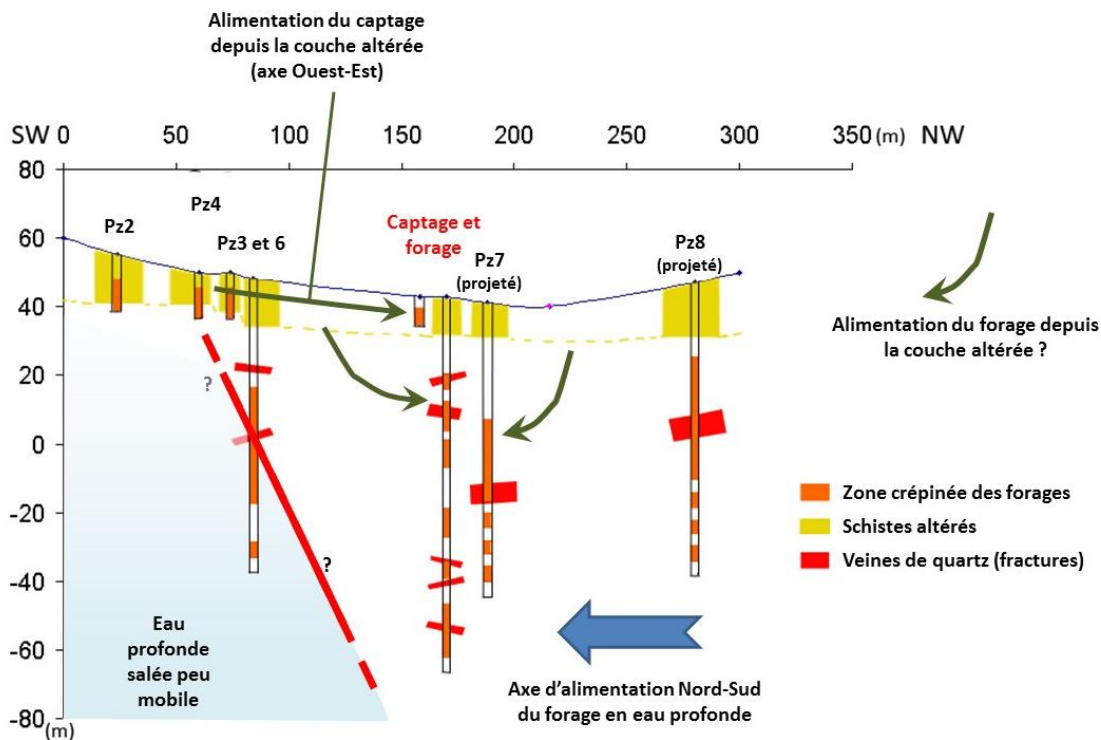


Figure 4.2 Schéma conceptuel du site de Betton.

1.2. Saint-Brice-En-Coglès

Le site de Saint-Brice-en-Coglès est situé sur des cornéennes (Hornfel schists) développées au contact d'un granitoïde Cadomien. Le site d'étude est situé en contrebas d'un ressaut topographique d'une vingtaine de mètres, indiquant la présence d'un accident géologique de type faille, délimitant une structure de type grabben. Sélectionné lors du projet RAPSODI mené par le BRGM (Carn-Dheilly et Thomas, 2008), ce site expérimental est le cœur du projet CASPAR (Thèse de Clément Roques, 2014). Deux forages profonds y ont été réalisés :

CHAPITRE 2

F3 (216m) et FC4 (forage carotté à 250m de profondeur). Le site est complété par deux forages moins profonds : MFT80 (80 mètres) et MFT20 (20 mètres) (Figure 2.3).

Les travaux réalisés sur ce site mettent en évidence une zone de décharge d'une boucle d'eau souterraine régionale caractérisée par un temps de résidence moyen important (Roques et al., 2014). L'eau circule le long d'une large zone de faille jusque vers la surface et se décharge dans le système aquifère de surface et la rivière. Les piézomètres FC4, F3 et MFT80 sont alimentés par ce flux d'eau profond bien que situés à des profondeurs différentes, alors que le piézomètre MFT20 capte davantage d'eau superficielle aboutissant à un phénomène de mélange entre une eau récente et une eau ancienne arrivant de la profondeur.

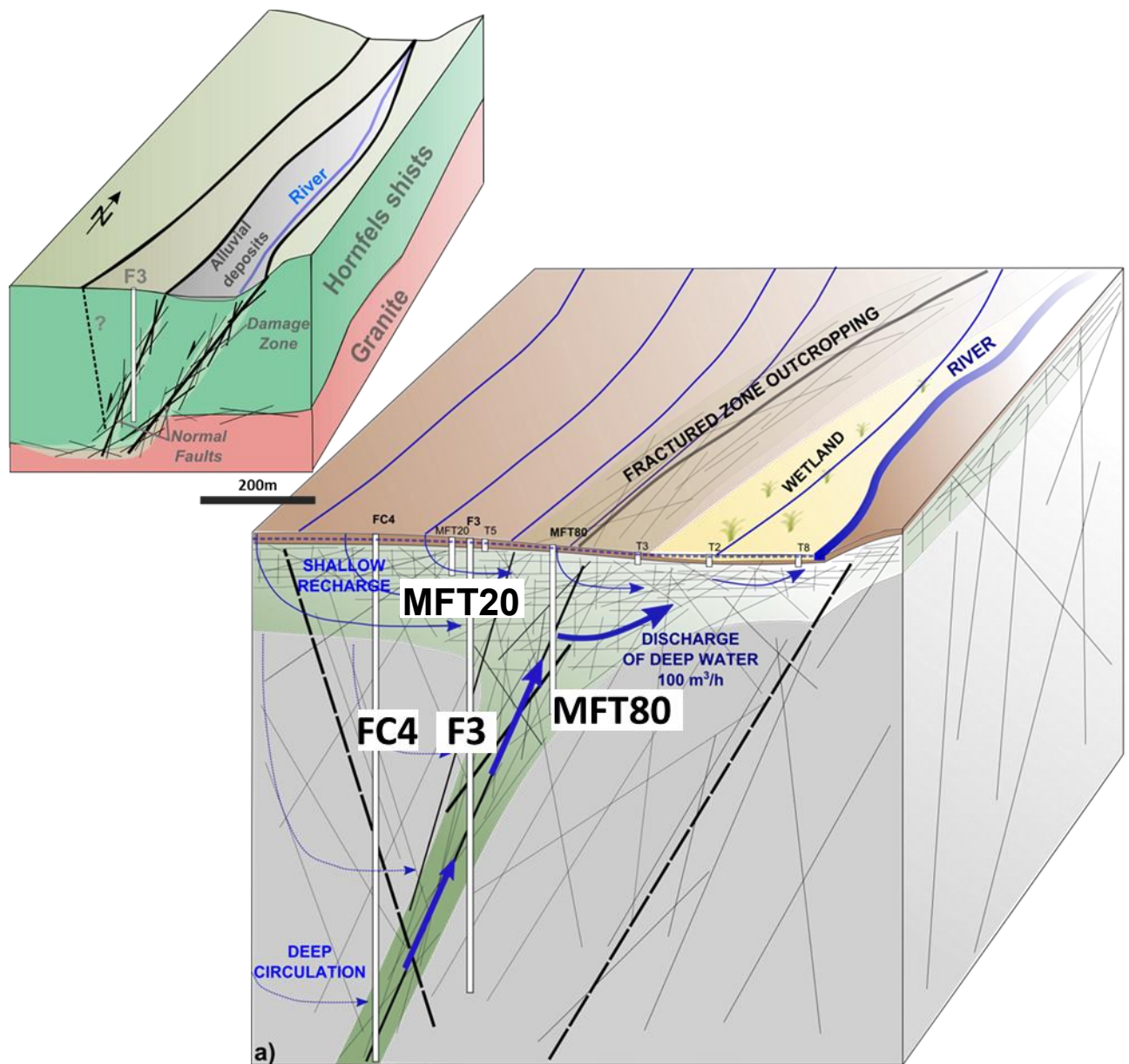


Figure 2.5 Schéma conceptuel du site de Saint-Brice-en-Coglès. D'après la thèse de Clément Roques, 2014.

CHAPITRE 2

1.3. Ploemeur

Le site de Ploemeur, situé dans le Morbihan, est situé sur une zone de contact subhorizontale entre un granite et un schiste recoupé par accident géologique d'orientation N20. Ce site est intégré dans le réseau de sites hydrogéologiques de l'Observatoire de Recherche en Environnement H+. Disposant de près d'une vingtaine de piézomètres il est l'objet de nombreuses études et expérimentations. Une autre caractéristique majeure de ce site est sa forte sollicitation depuis le début des années 90 pour la production d'eau potable à hauteur de 1 million de m³/an principalement à partir d'un ouvrage semi profond (65 m de profondeur). (Le Borgne et al., 2004 ; Jimenez-Martinez et al., 2014). Lors de la mise en place du pompage, la qualité chimique de l'eau a évolué fortement avec une baisse significative des concentrations en nitrates, une forte augmentation de la concentration en chlorures sur les cinq premières années, et une augmentation continue de la concentration en sulfates (Tarits et al., 2006 ; Ayraud et al., 2006). Cette évolution est aujourd'hui interprétée comme le résultat de la mise en équilibre du mélange entre les masses d'eau sollicitées. En effet sur ce site également, plusieurs masses d'eau ont été identifiées (Laurencelle, 2010) dont :

- Des eaux très récentes dites de circuit court
- Des eaux relativement récentes (15-20 ans) fortement influencés par les activités anthropiques autour du site et donc riches en nitrates
- Des eaux anciennes riches en manganèse et chlorures en profondeur.

Un certain nombre d'ouvrages captent en réalité un mélange entre les différentes masses en proportions différentes. Contrairement au site de Betton aucun ouvrage ne présente une forte salinité, néanmoins les études isotopiques (Ayraud et al., 2006 ; Pauwels et al., 2010) indiquent qu'une masse d'eau de ce type peut exister sur le site. Des réactions biogéochimiques et en particulier une dénitrification autotrophe par oxydation de sulfures est également suspectée sur certains ouvrages.

Sur ce site, trois ouvrages ont été prélevés (Figure 2.4) :

- un forage profond : F38
- un forage puisant de l'eau récente anthropisée : F9
- et un forage correspondant à un mélange entre eau ancienne et eau récente : F34.

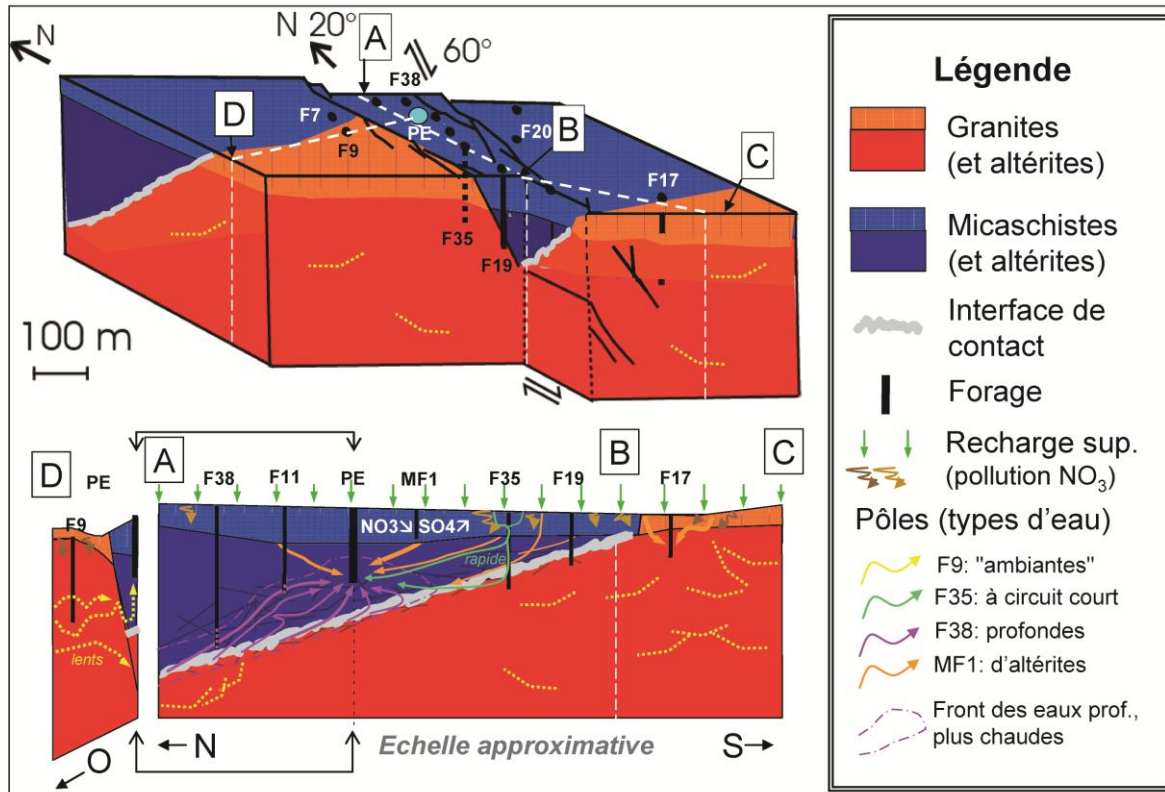


Figure 2.6 Schéma conceptuel du site de Ploemeur montrant l'accident géologique d'orientation N20 et la zone de contact subhorizontale entre un schiste et un granite. D'après la thèse de Sébastien Ruelleu, 2010 et Laurencelle, 2010.

2. Techniques de prélèvement des eaux souterraines

2.1. Description d'un piézomètre

Un piézomètre correspond à un forage réalisé pour le prélèvement et la surveillance des eaux souterraines. Il est souvent de plus petit diamètre que les ouvrages d'exploitation. Il permet ainsi de mesurer le niveau de la nappe phréatique (niveau piézométrique). Les piézomètres sont souvent tubés en PVC (quelque fois en acier) et cimentés sur au moins les 10 premiers mètres pour limiter les infiltrations. Idéalement une margelle de propreté est également aménagée dans le même but. Ils sont fermés par un capot cadenassé (Figure 2.5). Le tube PVC n'est pas plein sur toute sa longueur, il présente en effet des parties percées de multiples trous aux profondeurs où le forage intercepte des fractures drainant beaucoup d'eau. On appelle « crépines » ou « parties crépinées » les parties du tube PVC percées de trous. Lorsqu'on veut prélever de l'eau souterraine on privilégie autant que possible le pompage de l'eau au niveau des crépines pour collecter principalement l'eau drainée par les fractures.



Figure 2.7 Photo d'un piézomètre dans lequel de l'eau souterraine est pompée.

2.2. Pompage et mesure de la signature hydrochimique de l'eau

L'eau souterraine est prélevée grâce à une pompe MP1 de Chez Grundfoss équipée d'un tuyau en nylon de plusieurs dizaines de mètres insérée dans un piézomètre et descendue jusque dans la zone saturée de l'aquifère. Cette pompe est connectée à une console alimentée par un générateur, et à l'eau. L'eau présente dans un piézomètre correspond souvent à de l'eau stagnante. Afin d'être certain de collecter une eau issue d'une fracture interceptant le forage et non l'eau stagnante, la pompe est placée devant la fracture à prélever (quand la profondeur est connue) et le pompage est maintenu pendant environ trente minutes. Ce pompage permet de purger l'eau stagnante du forage et de collecter principalement l'eau issue d'une fracture.

Au cours de ce pompage de trente minutes les paramètres physico-chimiques sont surveillés: l'Eh (électrode en platine Ag/AgCl (Metter Pt 1805)), le pH (électrode combinée Sentix 50), la conductivité, la concentration en oxygène dissous et la température (WTW315i-CondOx). Leur stabilisation indique que l'eau pompée présente une chimie stable. Les eaux souterraines analysées dans ce travail de thèse ont été suivies hydrochimiquement depuis plusieurs années, et présentent donc des signatures chimiques bien caractérisées. Il est donc aisé de vérifier si l'eau pompée correspond bien à l'eau habituellement analysée.

2.3. Prélèvement d'eau souterraine pour la chimie, les CFC/SF6 et gaz nobles, et la microbiologie

Sur le terrain, des échantillons d'eau souterraine ont été prélevés afin d'établir leur teneur en cation, anions, en carbone organique total et carbone inorganique. L'eau prélevée pour les mesures des concentrations en cations et anions a été filtrée à travers un filtre d'acétate de

CHAPITRE 2

cellulose de 0,2 μ m et stockée dans des flacons PTFE ayant été rincés deux fois avec de l'acide bi-distillé puis avec de l'eau ultra-pure. Les échantillons d'eau pour l'analyse des cations ont été acidifiés avec du HNO₃ 7N ultrapure afin de stabiliser leur chimie et les conserver à 4°C dans le noir jusqu'à deux mois en attendant analyse.

Les CFC et SF₆ sont prélevés dans des ampoules en acier inoxydable que l'on referme aux deux extrémités par deux valves, après avoir rincé trois fois l'ampoule avec l'eau prélevé et pris soin d'éviter tout contact de l'intérieur de l'ampoule avec l'air durant l'échantillonnage.

Les prélèvements pour les analyses microbiologiques sont effectués dans des bidons Nalgène stériles de 20L autoclavés (Figure 2.6). Chaque bidon est rincé préalablement trois fois avec l'eau souterraine avant d'être rempli à ras bord et fermé hermétiquement jusqu'à filtration de l'eau dès l'arrivée au laboratoire. De quatre à six bidons de 20L sont prélevés pour chaque eau souterraine analysée afin d'effectuer des extractions d'ARN et d'ADN.



Figure 2.6 Illustration du dispositif de pompage de l'eau souterraine pour des prélèvements de chimie et de microbiologie.

3. Traitement des échantillons

3.1. Caractérisation chimique des échantillons d'eau souterraine

3.1.1. Analyse des concentrations en cations, anions, carbone organique total (COT) et en isotopes du sulfate dans l'eau

Les concentrations en cations, anions et carbone organique total (COT) sont mesurées au Centre Commun Analytique de Géosciences Rennes en utilisant un ICP-MS HP 4500, suivant les méthodes standards de laboratoire (Bouhnik-Le-Coz et al., 2001). Les concentrations en anions sont mesurées dans la semaine suivant le prélèvement par chromatographie ionique

CHAPITRE 2

(Dionex DX-120). La concentration en COT et en carbone inorganique dans l'eau est déterminée à l'aide d'un analyseur de carbone (Shimadzu 5050 A - Petitjean et al., 2004). Les isotopes des sulfates ont été analysés précédemment à ce travail au laboratoire d'analyse du BRGM au cours de la thèse de Virginie Ayraud (Thèse de Virginie Ayraud, 2005).

3.1.2. Analyse de l'âge apparent de l'eau

La détermination de l'âge apparent se fait au laboratoire de datation des eaux de Géosciences Rennes (Plateforme CONDATE Eau) en utilisant les procédures analytiques décrites dans les travaux précédents (Aquilina et al., 2015 ; Ayraud et al., 2008 ; Labasque et al., 2006). La concentration en CFC et SF₆ nécessaires à la détermination de l'âge apparent des eaux est obtenue par une analyse en chromatographie en phase gazeuse équipée d'un détecteur d'électron. Les gaz dissous sont extraits de l'échantillon en ampoule par un dégazage sous azote ultrapure. Les gaz ainsi extraits sont piégés à froid (-90°C) puis désorbés à chaud (+100°C) (méthode du purge-and-trap, Busemberg and Plummer, 1992 ; Labasque et al., 2006). Les gaz sont ensuite séparés par chromatographie. L'âge apparent d'une eau est obtenu par comparaison de la concentration dissoute des CFC-11, CFC-12 et CFC-113 et du SF₆ dans cette eau et les courbes atmosphériques. Cette concentration atmosphérique en CFC équivalente permet de déduire l'année à laquelle l'eau a pour la dernière fois été à l'équilibre avec l'atmosphère. La détermination de l'âge apparent d'une eau dépend de la température de recharge de l'eau et de l'excès d'air présent dans cette eau. Ces deux paramètres sont estimés avec les mesures des concentrations en gaz nobles, en particulier Ar et Ne.

3.2. Caractérisation de la diversité microbiologique des eaux souterraines

3.2.1. Filtration de l'eau

Pour chaque eau souterraine prélevée, trois bidons de 20L sont remplis et 5 Litres d'eau de chaque bidon sont filtrés sur un filtre de polyfluorure de vinylidène Durapore, d'une porosité de 0,22µm. A cette taille de pore, seules les bactéries et organismes de taille supérieure seront retenus sur le filtre.

Le système utilisé pour la filtration est un système de filtration de type Büchner. Quatre unités de filtration Nalgène sont reliées en parallèle à une pompe à vide, permettant ainsi la filtration de 4 x 5 Litres d'eau simultanément (Figure 2.7). Les unités de filtrations sont stérilisables à l'autoclave et démontables pour permettre le changement du filtre et la vidange du compartiment inférieur. Une fois que 5 Litres d'eau souterraine sont passés sur un filtre, celui-ci est retiré de l'unité de filtration, placé dans un tube stérile de 15mL puis plongé dans l'azote liquide avant d'être stocké dans un congélateur à -80°C. Chaque filtre constitue un réplicat d'échantillonnage d'une eau souterraine donnée. Ainsi, au total 10 eaux souterraines ont été échantillonnées en triplicats (3 filtres x 10) et pour chaque eau, les 3 filtres (1 filtre = 5 Litres d'eau filtrés) sont obtenus à partir de trois bidons différents.

CHAPITRE 2



Figure 2.7 Dispositif de filtration de type Büchner. Quatre unités de filtration portant chacune un filtre, sont reliées en parallèle à une pompe à vide qui crée le vide dans le compartiment inférieur de chaque unité. Le filtre est placé sur une grille placée entre les compartiments supérieur et inférieur de l'unité, et l'eau s'écoule à travers le filtre du compartiment supérieur vers le compartiment inférieur grâce à la différence de pression entre les deux compartiments.

3.2.2. Extraction de l'ADN total, extraction de l'ARN total et RT-PCR du gène l'ARNr16S

Extraction de l'ARN total

L'extraction d'ARN total est réalisée sur chaque réplicat d'échantillon à partir d'un filtre, correspondant aux organismes récoltés dans 5 litres d'eau (Figure 2.8).

Le protocole d'extraction utilisé au cours de cette thèse a été optimisé par Achim Quaiser (Quaiser et al., 2014) et est basé sur le protocole du kit NucleoSpin RNA II de Macherey-Nagel. La première partie du protocole du kit a été modifiée notamment pour optimiser l'élimination de contaminants organiques. Les modifications apportées sont les suivantes : les filtres conservés dans des tubes de 15mL à -80°C ont été plongés dans de l'azote liquide puis fragmenté à l'aide d'une spatule stérilisée ; le filtre réduit en petits morceaux est immédiatement immergé dans un tampon de lyse (pH 6,8) qui contient du CTAB (Cetyl TrimethylAmmonium Bromide) (4%), du guanidine thiocyanate (1M) et de la polyvinylpyrrolidone (0,5%) afin d'éliminer les composés organiques inhibiteurs d'enzyme comme les polysaccharides, les acides humiques et les acides fulviques, et NaCl (0,7M) et du Béta-mercaptoéthanol (0,14M) ; le filtre est incubé dans le tampon de lyse pendant 20 min à 65°C et homogénéisé au vortex toutes les 2min ; le tampon de lyse est ensuite transvasé dans un tube de 50mL puis un volume de Chloroforme-Isoamylalcool (24:1) est ajouté au tampon, et le tout est mélangé au vortex une minute ; le mélange est ensuite centrifugé à 12000 g à 4°C pendant 10min, puis la phase aqueuse supérieure est récupérée dans un nouveau tube de 50ml ; à cette phase aqueuse, un demi-volume d'éthanol pur est ajouté et mélangé en inversant le tube rapidement ; la solution est chargée en plusieurs fois sur une colonne de purification de l'ARN (kit Macherey-Nagel), par centrifugation. Après des étapes de lavage, une digestion de l'ADN sur la colonne est réalisée avec une DNase. L'ARN restant fixé sur la

CHAPITRE 2

colonne est alors élué avec de l'eau sans RNase. L'élimination complète de l'ADN génomique a été vérifiée par PCR sur l'ARN extrait, avec des amorces universelles pour bactéries (U27F-U1492R). L'intégrité et la qualité de l'ARN ont été vérifiées sur des puces d'ARN pico (Bioanalyzer). Les ARN extraits sont conservés à -80°C.

RT-PCR du gène de l'ARN ribosomal 16S

L'ARN total a été extrait dans le but d'évaluer les différents taxons microbiens actifs au sein de chaque eau souterraine. Pour cela il n'est pas nécessaire d'examiner tout l'ARN total d'un échantillon, il convient de plutôt cibler un gène précis présent et conservé chez toutes les bactéries : le gène de l'ARNr16S. Ce gène est composé dans sa séquence de régions plus ou moins variables, et les différentes versions existantes des régions hypervariables de l'ARNr16S permettent aujourd'hui de discriminer les différents taxons bactériens entre eux. Dans cette thèse, ce sont les régions hypervariables V4 et V5 de l'ARNr16S qui ont été ciblées pour déterminer les différents taxons bactériens actifs dans chaque eau souterraine. Actuellement il n'est pas possible de séquencer de l'ARN simple brin directement, il faut le convertir en son équivalent ADN : l'ADN complémentaire double brin (dbADNc). La réaction de RT-PCR (Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction) permet de convertir l'ARN codant un gène particulier (ici un fragment de gène, avec les régions V4 et V5 de l'ARNr16S) en ADN double brin, et de multiplier cet ADN double brin des millions de fois par PCR. Cependant cette réaction a une limite : la multiplication de l'ADN double brin (amplification) n'est pas toujours équivalente d'une réaction à une autre, et cela dépend de l'ADN ciblé, c'est le biais d'amplification.

Au total 6 échantillons (18 réplicats biologiques) ont été analysés par RT-PCR (PCR de reverse transcription). Le kit utilisé pour réaliser les RT-PCR est le kit Titan One Tube RT-PCR system (Roche). Le protocole suivi est celui du fournisseur en utilisant 10µl d'ARN. Les amorces utilisées dans les réactions de RT-PCR ciblant les régions V4 et V5 des ARNr16S procaryotes sont 515F (5'-GTG CCA GCM GCC GCG GTA ATA C-3') et 926R (5'-CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT-3'). Ces amorces sont des amorces de fusion : elles sont fusionnées à des adaptateurs de séquençage Roche et des Multiplex Identifiers (MID) permettant le multiplexage des échantillons dans un séquençage.

Cette réaction de RT-PCR est réalisée en duplicat technique pour chaque réplicat d'échantillon, puis les produits des deux RT-PCR sont mélangés afin de limiter les biais d'amplification (sure 8). Des RT-PCR sur des témoins négatifs avec 10µL d'eau ultra-pure sont aussi réalisées pour vérifier l'absence de contamination. Tous les témoins négatifs se sont avérés négatifs.

Extraction de l'ADN total

Les extractions d'ADN total ont été comme les extractions d'ARN, réalisée sur trois filtres constituant chacun un réplicat d'échantillonnage pour une eau souterraine donnée (Figure 2.8).

CHAPITRE 2

Le protocole utilisé pour extraire l'ADN est identique à celui décrit dans la partie *Extraction de l'ARN total* pour toute l'étape de lyse à partir du filtre. Après cette étape, le kit NucleoSpin gDNA Clean-up de Macherey-Nagel spécifique de l'ADN a été utilisé.

Le lysat mélangé à l'éthanol est chargé en plusieurs fois sur la colonne NucleoSpin gDNA Clean-up en centrifugeant entre chaque chargement. L'ADN est élué dans un tampon Tris-HCl (10mM, pH 8). La qualité de l'ADN était analysé sur gel électrophorèse ou des puces ADN « High sensitivity » (Bioanalyzer). L'ADN est stocké à -20°C.

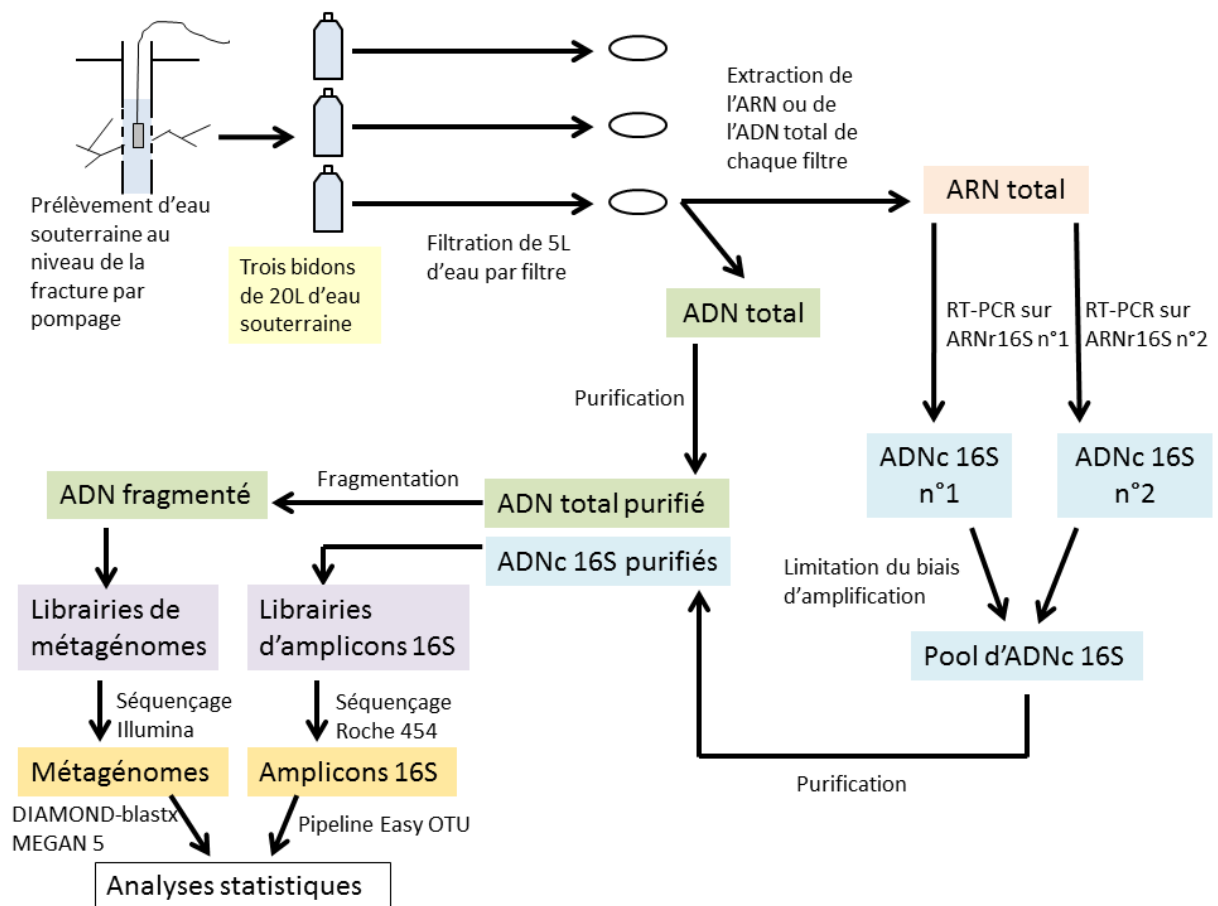


Figure 2.8 Schéma du traitement de chaque échantillon d'eau souterraine prélevé. Des prélèvements indépendants ont été réalisés pour les analyses basées sur l'ADN total et les analyses basées sur l'ARNr16S. Pour chaque échantillon d'eau souterraine, l'ARN ou l'ADN est extrait de trois filtres issus de trois bidons différents. Chaque filtre constitue un répliquat d'échantillonnage de l'eau souterraine.

3.2.3. Constructions des bibliothèques

3.2.3.1. Bibliothèques d'amplificateurs d'ARNr 16S pour séquençage en technologie 454

Les bibliothèques ont été constituées selon les recommandations du constructeur Roche 454 (Protocoles *Amplicon Library Preparation Method Manual* et *emPCR Amplification Method Manual-Lib-A*). Les principales étapes de la construction des bibliothèques jusqu'à l'étape de séquençage sont les suivantes :

CHAPITRE 2

- 1) Les amplicons d'ADNc 16S sont purifiés deux fois, afin d'éliminer les acides nucléiques de petite taille (inférieurs à 300 bases).
- 2) Les amplicons purifiés sont dosés en duplicat avec le kit Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay permettant de connaître précisément la quantité d'ADN double brin par unité de volume (ng/ μ L) présente dans chaque réplicat d'échantillon. Le dosage est basé sur la comparaison des échantillons avec une gamme étalon de concentrations d'ADN connues donnant avec les réactifs du kit une absorbance connue. A partir de la concentration en ADN, le nombre de molécules d'ADN (copie reverse-transcrite de l'ARNr16S) par unité de volume (molécules/ μ L) a été déterminé.
- 3) Les amplicons provenant des différents échantillons censés être séquencés au cours du même run de séquençage sont réunis dans un même tube en quantité équimoléculaire pour constituer le pool d'amplicons ou « librairie d'amplicons ».
- 4) Le pool d'amplicons subit une PCR à émulsion (emPCR) qui est une amplification clonale des acides nucléiques (ici ADNc). Cette étape va fixer chaque amplicon dénaturé de la librairie sur une bille de capture. Après amplification les billes sont étalées sur une plaque de séquençage Roche 454 pour procéder au séquençage.

3.2.3.2. Bibliothèques de métagénomiques pour séquençage en technologie Illumina Mi-Seq Paired-End

Purification et fragmentation de l'ADN total extrait

L'ADN total extrait de chaque réplicat d'échantillon doit être fragmenté afin de générer des fragments d'ADN d'une taille adaptée au séquençage. Dans cette thèse, la technologie Illumina choisie permet de séquencer des fragments d'ADN de 250 bases. L'ADN total a d'abord été purifié afin d'optimiser la fragmentation -avec le kit AMPureXP (Agencourt). Une fois purifié, l'ADN double brin des différents échantillons a ensuite été fragmenté à l'aide d'une enzyme : la NEBNext dsDNA Fragmentase (New England Biolabs ; NEB). Cette enzyme permet, selon le temps d'incubation, la quantité d'ADN total à fragmenter et le contenu en GC de l'ADN, de générer des fragments de 100 à 800 paires de bases. Ici l'ADN a été fragmenté de façon à obtenir une taille moyenne de fragment de 300 paires de bases. La purification et la sélection des fragments d'ADN faisant spécifiquement une taille de 300 pb a été réalisée avec le kit AMPure XP (Agencourt). La qualité et la taille de l'ADN fragmenté ont été analysées sur une puce High sensitivity (Agilent Bioanalyzer 2100).

Construction des bibliothèques Illumina

Les bibliothèques Illumina ont été préparées suivant le kit NEBNext Ultra DNA Library Prep Kit for Illumina de BioLabs, suivant les indications du constructeur (*NEBNext Ultra DNA Library Prep Kit for Illumina Instruction Manual*). Les fragments d'ADN utilisés pour construire les bibliothèques faisaient entre 200 et 350 paires de bases. Les principales étapes de la construction des bibliothèques sont les suivantes : réparation des extrémités des fragments d'ADN ; ligation de

CHAPITRE 2

l'adaptateur de séquençage aux fragments d'ADN réparés, sélection de taille des fragments d'ADN fusionnés à l'adaptateur (>400 bases), amplification clonale (PCR) des fragments d'ADN liés aux adaptateurs, purification des fragments amplifiés et élimination des petits fragments (< 100 bases) et des amorces PCR. Ces étapes ont été réalisées en suivant le protocole du fournisseur. La qualité de l'ADN a été vérifiée sur une puce DNA High sensitivity (Bioanalyzer). Les librairies ainsi réalisées ont été envoyées à la plateforme de séquençage de Biogenouest (Nantes) qui a procédé à une quantification des librairies (par PCR quantitative), avant de réaliser des mélanges équimolaires des différents échantillons et de procéder au séquençage en multiplexage sur un appareil MiSeq (Illumina) (plateforme Biogenouest de Nantes).

4. Analyses des séquences d'amplicons et de métagénomés

4.1 Analyse des amplicons d'ARNr 16S avec le pipeline EasyOTU

Nettoyage et filtration des séquences brutes Roche 454 avec EasyOTU

Afin d'analyser les séquences d'ARNr16S amplifiées brutes obtenues avec la technologie Roche 454, un pipeline « EasyOTU » a été créé (Alexis Dufresne et Mathieu Bahin, non publié) et implémenté au sein du serveur Galaxy. Ce pipeline a dans un premier temps pour objectif de nettoyer et filtrer les séquences brutes obtenues depuis un séquençage Roche 454. Il est essentiellement basé sur des commandes de Mothur (Schloss et al., 2009).

Les séquences brutes en sortie de séquençage avec la technologie Roche 454 sont sous format sff qui est un équivalent du format fastq. Ces deux formats permettent de voir la composition en base d'une séquence biologique, et associe une valeur de qualité à chaque base reflétant la fiabilité de l'identification de chaque base au cours du séquençage. La première partie du pipeline EasyOTU consiste à convertir les séquences brutes sous format sff en format fasta, correspondant à de séquences biologiques simples (sans valeur de qualité). Une fois converties en séquences fasta, les séquences sont nettoyées en fonction de leur taille, du nombre maximal de bases ambiguës (N) et de la taille maximale tolérée pour une séquence répétée. Les valeurs adoptées ici sont les valeurs par défaut. Le pipeline va également séparer les séquences brutes en fonction de l'échantillon environnemental dont elles proviennent selon les Multiplex IDentifiers (MID). Le pipeline EasyOTU va éliminer les séquences de mauvaise qualité et les séquences chimères, séparer les séquences par échantillon et mettre les séquences dans le même sens (toutes en forward).

Constitution des OTUs et assignation taxonomique des séquences et des OTUs avec EasyOTU

Le pipeline va ensuite rassembler les séquences nettoyées, filtrées et sans chimères en groupes formant des unités taxonomiques opérationnelles (OTU) en fonction de leur similarité : les séquences identiques à 97% ou plus forment une OTU. Pour éviter les artefacts, seules les

CHAPITRE 2

OTUs présentant au moins deux séquences identiques à 97% ou plus dans deux répliquats d'échantillon sont retenues.

Chaque OTU et chaque séquence comprise dans ces OTUs se voit ensuite assignée à un taxon en les comparant à une base de donnée de référence. Cette base de données de référence contient une liste de séquences fasta assignées officiellement à un taxon. Le pipeline utilise comme base de données de référence pour les séquences de gènes d'ARNr16S, la base de données SILVA (Quast et al., 2013). Il renvoie à l'utilisateur un résumé des assignations taxonomiques de chaque OTU et de chaque séquence, ainsi que la distribution des OTUs et des séquences dans les différents échantillons et les différents niveaux taxonomiques. Ainsi, deux tableaux de contingence sont obtenus : un avec les différents taxons et le nombre d'OTUs associées à chaque taxon dans chaque répliquat d'échantillon environnemental ; et un autre résumant les différents taxons et le nombre de séquences associées à chaque taxon dans chaque répliquat d'échantillon environnemental.

4.2. Analyse des séquences de métagénomés

Nettoyage et filtration des séquences nucléiques brutes MiSeq Illumina

La technologie Illumina MiSeq Paired-End permet de séquencer les deux parties terminales d'une séquence et produire deux séquences : forward et reverse. Ces séquences peuvent être par la suite alignées entre elles, puis assemblées. Les séquences brutes en sortie de la technologie Illumina sont sous format fastq. Ce format affiche des valeurs de qualité pour chaque base de la séquence reflétant la probabilité qu'une base ait été mal identifiée par le séquenceur. Les séquences fastq ont été nettoyées en fonction des scores de qualité de chaque base. Etant donné que la qualité du séquençage se dégrade linéairement le long de la séquence, des outils bioinformatiques ont été conçus pour évaluer la qualité des parties terminales des séquences forward et reverse et les tronquer en fonction de la valeur de qualité seuil choisie. Les algorithmes de ces outils se basent sur la valeur de qualité de chaque base, et d'autres critères comme le contenu en GC de la séquence, la longueur de la séquence, la présence de bases ambiguës (notée « N » pour les positions dans la séquence où une base particulière n'a pas pu être identifiée), la complexité de la séquence (comme la présence de motifs courts répétés) pour évaluer la qualité et la fiabilité des fins de séquence.

Les séquences fastq ont également chacune de courtes séquences index pour différencier les différents échantillons entre eux, et des séquences d'adaptateur et d'amorces permettant le séquençage. Des outils bioinformatiques permettent de filtrer ces séquences. Une fois les séquences tronquées et sans séquences artificielles, celles-ci sont filtrées en fonction de leur qualité et de leur longueur. Les séquences de taille trop courtes après troncature sont exclues.

Au cours de ce travail, l'outil bioinformatique utilisé pour retirer les séquences artificielles, trier les séquences en fonction de l'échantillon dont elles proviennent est « cutadapt » qui est un package du langage Python (Martin et al., 2011) ; et « PEAR » (Zhang et al., 2014) pour filtrer les séquences en fonction de leur longueur, de leur qualité et de leur contenu en base non identifiée. Une valeur de qualité seuil de 30 pour chaque base d'une séquence a été

CHAPITRE 2

choisie, signifiant que seule une base mal identifiée sur mille dans les séquences filtrées est tolérée. Le séquençage Illumina MiSeq Paired-End réalisé au cours de cette étude produit des séquences forward et reverse de 250 bases (2x 250b, séquences artificielles comprises), la probabilité qu'une base ait été mal identifiée dans une séquence de cette taille avec une valeur de qualité seuil de 30 est donc faible.

Assemblage des séquences nucléiques forward et reverse nettoyées et filtrées

Chaque séquence environnementale présente dans un échantillon est répliquée dans les deux sens (forward et reverse). Les séquences forward et reverse correspondant à la même séquence environnementale séquencée dans les deux sens, il est donc possible d'assembler les séquences forward et reverse afin de retrouver la séquence environnementale d'origine plus longue. L'assemblage n'est possible que si les séquences forward et reverse se chevauchent. L'assemblage suit des règles basées entre autres sur la valeur de qualité de chaque base, et sur la qualité et la longueur de l'alignement entre les deux séquences, et qui permettent par exemple de trancher entre deux bases différentes chevauchantes. Si les séquences forward et reverse ne se chevauchent pas, elles sont alors analysées telle quelle par la suite

Dans cette étude, les séquences fastq nettoyées et filtrées ont été assemblées avec l'outil bioinformatique PEAR. L'outil PEAR assigne une nouvelle valeur de qualité pour chaque base de la partie assemblée de la séquence à partir des valeurs qualité de la base de la séquence forward et de la séquence reverse. Cet outil permet aussi le tri des séquences assemblées en mettant de côté les séquences dont la longueur est supérieure à une taille maximale définie, et dont le contenu en base non identifiée est supérieur à un nombre maximal fixé par l'utilisateur.

Assignment taxonomique des séquences nucléiques assemblées

Les séquences nucléiques nettoyées, filtrées et assemblées ainsi obtenues sont ensuite comparées aux séquences de gènes traduits en acides aminés des génomes complets et partiels de bactéries, archées et virus présents dans la base du NCBI (base « nr ») en utilisant DIAMOND-blastx (Double Index AlignMent Of Next-generation sequencing Data) (Buchfink et al., 2015). Cet outil aligne comme blastx, les séquences nucléiques assemblées avec toutes les séquences nucléiques traduites en acides aminés de tous les gènes des génomes bactériens, archéens et viraux de la base nr du NCBI. A l'issue de tous les alignements, DIAMOND ne renvoie que les alignements significatifs, dans notre cas avec une e-value inférieure ou égale à 10^{-4} .

A partir de la comparaison des séquences assemblées avec des séquences de génomes par DIAMOND, un programme assigne un taxon pour chaque séquence assemblée. L'assignation taxonomique est réalisée si l'alignement entre la séquence génomique la plus proche de la séquence assemblée et la séquence assemblée est significatif, sinon aucune assignation taxonomique n'est réalisée et les séquences sont considérées « non-assignées ». L'outil utilisé pour assigner les séquences assemblées à des taxons à partir des alignements de DIAMOND est MEGAN5 (Huson et al., 2007). MEGAN5 réalise l'assignation taxonomique en utilisant

CHAPITRE 2

l'algorithme du Lowest Common Ancestor (LCA). Cet algorithme cherche à assigner le niveau taxonomique le plus bas possible.

Ainsi, quelle que soit la fonction du gène codé par la séquence la plus proche de la séquence assemblée, un taxon peut être assigné à chaque séquence environnementale assemblée dès lors que l'alignement est significatif. Ce traitement permet au final d'obtenir un tableau de contingence avec le contenu en taxa et le nombre de séquences assignées à chaque taxon, dans chaque réplicat d'échantillon.

5. Résumé des différents échantillons et analyses

Le tableau qui suit présente l'ensemble des échantillons collectés et traités au cours de cette thèse, les dénominations qui leur sont attribuées ainsi que les différentes analyses réalisées sur chacun d'entre eux.

| Site | Echantillon | | Analyses réalisées sur l'échantillon | | | | | |
|-----------------------|-------------|---|--------------------------------------|--------|----------|--------------------|--------------------|---------------|
| | Nom usuel | Nom attribué dans Ben Maamar et al., 2015 | Profondeur de prélèvement (m) | Chimie | Isotopie | Temps de résidence | Amplicons ARNr 16S | Métagénomique |
| Saint-Brice-En-Coglès | MFT20 | SB-O | 15 | ✓ | ✓ | ✓ | | ✓ |
| | MFT80 | SB-O1 | 50 | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| | F3 | SB-O2 | 78 | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| | FC4 | | 85 | ✓ | ✓ | ✓ | | ✓ |
| Betton | PZ6 | B-O | 70 | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| | PZ3 | B-R | 13 | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| Ploemeur | F9 | P-R1 | 67 | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| | F34 | P-R2 | 70 | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| | F38 | P-O | 85 | ✓ | | ✓ | | ✓ |
| | MF1 | | 23 | ✓ | ✓ | ✓ | | ✓ |

Table 2.1 Tableau récapitulatif des échantillons d'eau souterraine prélevés et des analyses réalisées sur ces échantillons au cours de ces travaux de thèse. Ce tableau comprend pour chaque échantillon la dénomination usuelle et éventuellement attribuée, la profondeur de prélèvement, et les différentes analyses chimiques et microbiologiques effectuées.

CHAPITRE 3 - EFFETS DES CIRCULATIONS HYDROGEOLOGIQUES, DU TEMPS DE RESIDENCE DES ET DE LA POSITION DANS LA BOUCLE HYDROGEOLOGIQUE D'UNE EAU SOUTERRAINE SUR LA COMPOSITION DES COMMUNAUTES MICROBIENNES DES EAUX SOUTERRAINES D'AQUIFERE DE SOCLE.

1. Contexte

Le travail présenté dans ce troisième chapitre traite des effets du fonctionnement hydrodynamique des aquifères de socle sur les communautés microbiennes d'eau souterraines. Dans les aquifères de socle, la circulation hydrologique hétérogène contraint fortement le temps de résidence des eaux souterraines, l'hydrochimie, et l'apport en nutriments. Ici le temps de résidence et une large gamme de facteurs environnementaux ont été utilisés pour tester l'influence de la circulation des eaux souterraines sur la composition des communautés microbiennes, estimée par séquençage haut-débit. L'approche de séquençage haut-débit utilisée dans ce chapitre est double : une première approche est basée sur le séquençage du gène de l'ARNr 16S présent dans six eaux souterraines différentes (Ben Maamar et al., 2015), et une deuxième approche s'appuie sur le séquençage de métagénomes issus des mêmes eaux souterraines et de quatre eaux souterraines supplémentaires (deuxième partie du chapitre). Les eaux souterraines d'âge différent ont été échantillonnées le long de voies hydrogéologiques ou boucles hydrogéologiques, dans trois aquifères de socle contrastés en Bretagne (France). La composition de la communauté microbienne dépend du temps de résidence de l'eau souterraine et de la position dans la boucle hydrogéologique. Dans l'eau souterraine récente, dans la section haute de l'aquifère ou dans leur zone de recharge, les apports d'eau de surface sont responsables d'une concentration en nitrate élevée et d'une prédominance de dénitrifiants potentiels. Bien que la dénitrification ne semble pas faire baisser complètement les concentrations en nitrate du fait des faibles concentrations en carbone organique dissout, l'apport de nitrate a un effet majeur sur les communautés microbiennes. La présence de taxa potentiellement liés à l'utilisation de fertilisants organiques a aussi été observée. Dans les eaux souterraines anciennes isolées, un écosystème basé sur le recyclage du Fe(II)/Fe(III) et du S/SO₄ en fonction du potentiel redox a été observé jusqu'à plusieurs centaines de mètres sous la surface. Dans la partie profonde, les communautés microbiennes sont dominées par des bactéries oxydant le Fe(II) appartenant à la famille des Gallionellaceae. Ces dernières sont associées à de l'eau souterraine ancienne avec des concentrations en Fe(II) élevées et une faible mais non nulle proportion d'eau récente induisant des concentrations en oxygène en dessous de 2,5 mg/L. Ces deux types de communauté microbienne ont été observés sur les trois sites indépendamment de la géologie du site et de la géométrie de l'aquifère, démontrant que la circulation hydrogéologique exerce un contrôle majeur sur les communautés microbiennes.

CHAPITRE 3

1.1. Groundwater isolation governs chemistry and microbial community structure along hydrologic flowpaths



Groundwater Isolation Governs Chemistry and Microbial Community Structure along Hydrologic Flowpaths

Sarah Ben Maamar^{1,2,3}, Luc Aquilina², Achim Quaiser¹, Hélène Pauwels³, Sophie Michon-Coudouel⁴, Virginie Vergnaud-Ayraud², Thierry Labasque², Clément Roques², Benjamin W. Abbott⁴ and Alexis Dufresne^{1*}

¹ OSUR-UMR 6553 ECOBIO, Université de Rennes 1 and Centre National de la Recherche Scientifique, Rennes, France,

² OSUR-UMR 6118 Géosciences, Université de Rennes 1 and Centre National de la Recherche Scientifique, Rennes, France, ³ BRGM, Laboratory Department, Orléans, France, ⁴ OSUR-UMS 3343, Université de Rennes 1 and Centre National de la Recherche Scientifique, Rennes, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Partha Basu,
Duchesne University, USA

Reviewed by:

John W. Moreau,
University of Melbourne, Australia
Mustafa Yucel,
Middle East Technical University,
Turkey
Jarrod Scott,
Bigelow Laboratory for Ocean
Sciences, USA

*Correspondence:

Alexis Dufresne
alexis.dufresne@univ-rennes1.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Microbiological Chemistry
and Geomicrobiology,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 28 July 2015

Accepted: 04 December 2015

Published: 22 December 2015

Citation:

Ben Maamar S, Aquilina L, Quaiser A, Pauwels H, Michon-Coudouel S, Vergnaud-Ayraud V, Labasque T, Roques C, Abbott BW and Dufresne A (2015) Groundwater Isolation Governs Chemistry and Microbial Community Structure along Hydrologic Flowpaths. *Front. Microbiol.* 6:1457. doi: 10.3389/fmicb.2015.01457

This study deals with the effects of hydrodynamic functioning of hard-rock aquifers on microbial communities. In hard-rock aquifers, the heterogeneous hydrologic circulation strongly constrains groundwater residence time, hydrochemistry, and nutrient supply. Here, residence time and a wide range of environmental factors were used to test the influence of groundwater circulation on active microbial community composition, assessed by high throughput sequencing of 16S rRNA. Groundwater of different ages was sampled along hydrogeologic paths or loops, in three contrasting hard-rock aquifers in Brittany (France). Microbial community composition was driven by groundwater residence time and hydrogeologic loop position. In recent groundwater, in the upper section of the aquifers or in their recharge zone, surface water inputs caused high nitrate concentration and the predominance of putative denitrifiers. Although denitrification does not seem to fully decrease nitrate concentrations due to low dissolved organic carbon concentrations, nitrate input has a major effect on microbial communities. The occurrence of taxa possibly associated with the application of organic fertilizers was also noticed. In ancient isolated groundwater, an ecosystem based on Fe(II)/Fe(III) and S/SO₄ redox cycling was observed down to several 100 of meters below the surface. In this depth section, microbial communities were dominated by iron oxidizing bacteria belonging to Gallionellaceae. The latter were associated to old groundwater with high Fe concentrations mixed to a small but not null percentage of recent groundwater inducing oxygen concentrations below 2.5 mg/L. These two types of microbial community were observed in the three sites, independently of site geology and aquifer geometry, indicating hydrogeologic circulation exercises a major control on microbial communities.

Keywords: aquifers, hydrology, 16S rRNA, pyrosequencing, groundwater, bacterial communities, iron oxidation, nitrate

INTRODUCTION

Aquifers are populated by a vast diversity of microorganisms, some of which can play a critical role in subsurface biogeochemical cycling and pollutant degradation (Yagi et al., 2010). Because groundwater usually contains low concentrations of organic carbon, microbial life there depends mostly on oxidation and reduction of inorganic compounds for energy. Thus, geochemical conditions, and in particular the availability of electron donors and acceptors, are a major driver of microbial community composition and diversity in groundwater and the geological substratum (Akob et al., 2007; Boyd et al., 2007; Flynn et al., 2012, 2013; Nyssönen et al., 2014).

Groundwater geochemistry is regulated in part by the distribution of groundwater flow paths and groundwater residence time (Tarits et al., 2006; Roques et al., 2014a). To date very few studies have addressed the effect of hydrology on groundwater microbial communities, and those that have were restricted to a single aquifer (Roudnew et al., 2010; Bougon et al., 2012; Larned, 2012; Lin et al., 2012; Zhou et al., 2012). It is therefore imperative to assess the effects of groundwater circulation on microbial communities. The comparison of several aquifers with well-defined hydrogeologic conditions allows to constrain the influence of groundwater flow in order to better understand biogeochemical functioning of groundwater ecosystems.

Crystalline rocks represent about 35% of the continental surface (Blatt and Jones, 1975; Amiotte Suchet et al., 2003). They include crystalline aquifers also called hard-rock aquifers which constitute sensitive water resources that are increasingly exploited (Foster and Chilton, 2003; Mall et al., 2006). Water circulation in any aquifer is caused by the difference between the groundwater-table level in recharge zones high in the catchment, and the groundwater-table level in discharge zones in lowlands when the underground hydrogeologic catchment is similar to the hydrologic surface catchment. That difference induces a hydrogeologic gradient, generating hydrogeologic flow paths or loops along the catchment slope (see **Figure 1A** for a model of hydrogeologic circulations). More specifically, in hard-rock aquifers, the groundwater flow constitutes a topographic flow system mainly in the near-surface weathered zone, which constitutes the upper layer of these aquifers (Wyns et al., 2004; Ayraud et al., 2008). Hydrogeologic loops may extend beneath the weathered layer into the fractured compartment where circulation takes place exclusively in networks of fractures (Wyns et al., 2004; Ayraud et al., 2008). Large-scale regional loops may connect recharge and discharge zones over larger distances than the catchment size (i.e., hydrogeologic catchment is larger than hydrologic catchment), causing inter-watershed exchanges and making it more difficult to define the recharge zone supplying large fracture discharges (Roques et al., 2014a; Aquilina et al., 2015). There is a partitioning between the weathered formation and the deeper fractured rock formation which have different permeability and porosity resulting in contrasting mean residence times (Ayraud et al., 2008). This partitioning results in short mean residence times in the superficial layer (<25 years) and long residence times (ranging from 40 years to millennia)

in the deeper fractured formation which is thus considered as partly isolated as compared to the surface layer which is actively recharged.

Differences in hydrogeologic circulation and residence time result in distinct groundwater geochemical composition, e.g., modulating contributions of atmospheric oxygen and agricultural effluents. Annual recharge provides a relatively constant supply of oxygen from the surface to the weathered zone of hard-rock aquifers, as well as chemical elements resulting from intensive agriculture such as nitrate and leaching of fertilizers. Conversely, groundwater in the fractured zone is relatively protected and relatively isolated (Ayraud et al., 2008). However, even regional hydrogeological loops are mixed to a certain degree to modern groundwater from the weathered zone and do not represent fully isolated ecosystems.

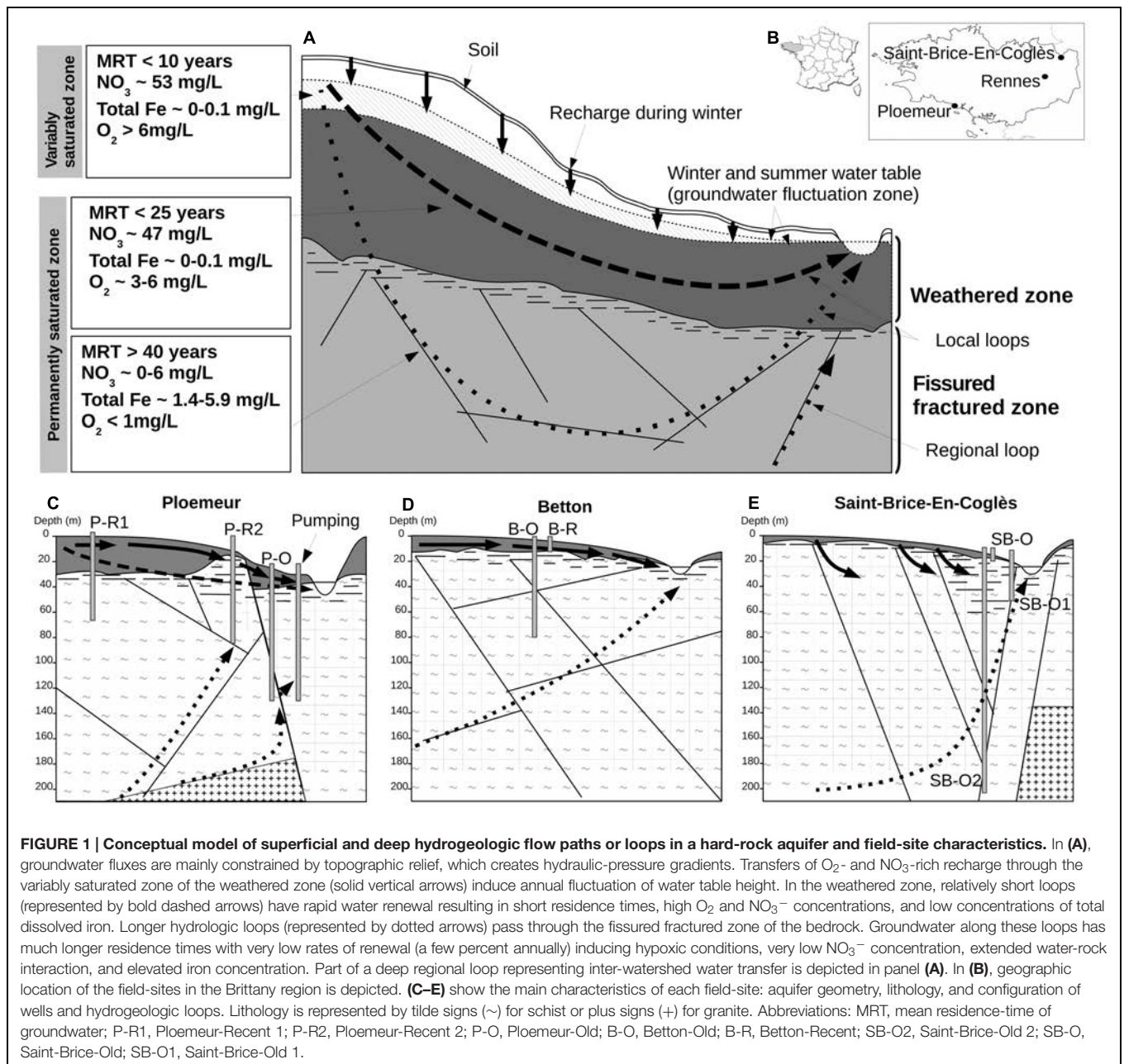
In this study, we assessed how groundwater partitioning and isolation drives both groundwater hydrogeochemistry and active microbial community structure in hard-rock aquifers by comparing surface recent groundwater considered as an opened ecosystem, and old deep groundwater considered as partly isolated, i.e., with low surface groundwater renewal.

High-throughput sequencing based approaches such as 16S rRNA gene profiling and metagenomics have made it possible to explore complex groundwater microbial community and metabolism (Hemme et al., 2010; Lin et al., 2012; Smith et al., 2012; Wrighton et al., 2012; Castelle et al., 2013; Nyssönen et al., 2014; Brown et al., 2015). Here, we collected groundwater samples from three geographically distinct aquifers (Brittany, France, see **Figure 1**) where hydrogeologic and hydrogeochemical parameters have been monitored for the last 5 years allowing to determine residence times of groundwater. We used pyrosequencing of 16S Ribosomal RNA amplicons to characterize groundwater microbial communities, and to infer putative microbial processes. As dissolved organic carbon concentrations are below 1.3 mg/L in all the investigated sites (Ayraud et al., 2006; Aquilina et al., 2015; Ploemur monitoring database <http://hplus.ore.fr/>), we hypothesized that heterotrophy remains limited at all depths. We also hypothesized that nitrate and oxygen are the major drivers in the weathered zone and that chemolithotrophic metabolisms linked to iron and reduced sulfur oxidation or sulfate reduction may occur in the fractured zone which represents an interesting situation of very slow nutrient renewal, i.e., a transition state close to full isolation. The investigation of three aquifers at the regional scale, with different hydrological conditions which are well constrained, allowed us investigating a more general case to determine the relationships between microbial diversity and hydrology.

MATERIALS AND METHODS

Hydrogeologic Context

Hard-rock aquifers from a geologic and hydrogeologic point of view typically consist of two layers (a surficial weathered layer and a deep fractured layer) with a sharp boundary separating two distinct hydrogeologic regimes resulting in contrasting



hydrogeological properties : a topographic flow regime and deeper local or regional groundwater loops (Figure 1A) (Wyns et al., 2004; Ayraud et al., 2008). However, the geochemical composition of groundwater bodies does not always strictly reflect the surface/deep fractured compartmentalization as it may be influenced by regional hydrogeologic loops crossing watershed boundaries (Figure 1A). In this study, we have collected samples at various positions along hydrogeologic loops, determined by residence time, in order to access recent and old groundwater in different geologic contexts (Figures 1C–E). Three hard-rock aquifers in Brittany (Western France) were investigated near the cities of Ploemeur (N47.735°, W-3.427°), Betton (N48.182°, W-1.643°) and Saint-Brice-En-Cogles (N48.411°, W-1.365°)

(Figure 1B). Field-site and well attributes are represented in Figures 1C–E of . Wells are coded with the first letter of the field-site (P for Ploemeur, B for Betton, or SB for Saint-Brice-En-Cogles) followed by the mean groundwater residence time (O for old i.e., >40 years, or R for recent, i.e., <25 years). Mean groundwater residence time was determined by the analysis of dissolved anthropogenic gasses (see Ayraud et al., 2008) for further details about the groundwater dating protocols and further references herein). The Ploemeur site is an active recharge zone occurring on a geologic boundary between a Hercynian granite and a schist bedrock, and is influenced by intensive pumping (1 million m³ annually) (Le Borgne et al., 2004; Jimenez-Martinez et al., 2014) (Figure 1C). This site

includes: a deep well with old groundwater (P-O) sampling the discharge portion of a regional hydrogeologic loop; the P-R1 well that samples shorter circulation loops with recent recharge groundwater; and the P-R2 well, which is a mix of old and recent groundwater related to the active pumping at the Ploemeur site (Tarits et al., 2006; Ayraud et al., 2008). The Betton site is underlain by Proterozoic schists (Figure 1D). The two wells sampled in Betton intersect very distinct groundwater components. The B-R well is close to the surface and is fed by short circulation loops with short groundwater residence times, while the B-O well reaches a deep groundwater compartment with a residence time of several 1000 years (Aquilina et al., 2015; Armandine Les Landes et al., 2015). The St-Brice site is located on a metamorphic formation named the Hornfel schists, close to a Cadomian granitic formation (Figure 1E). It is at the discharge zone of a regional groundwater loop. Groundwater flows along a large fault zone (Roques et al., 2014b) and is characterized by a mean residence time of several 100 years (Roques et al., 2014a). SB-O2 and SB-O1 wells are fed by this groundwater flow, though they were sampled at distinct depths (216 and 80 m), while the SB-O well is fed by more superficial loops resulting in a natural mixing of old and recent groundwater. All investigated wells have a screen length ranging from 1 to 2 m.

The upper part and recharge zone (i.e., topographic flow system) of hard-rock aquifers in Brittany has been investigated; especially for determining nitrate pollution transfer in groundwater (Legout et al., 2005, 2007; Martin et al., 2006; Aquilina et al., 2012; Roques et al., 2014b). Both modeling and groundwater residence time analysis show that groundwater mean vertical velocity is about a few meter per year (Legout et al., 2005; Ayraud et al., 2008). These studies have shown that recharge processes induce rapid transfer through the unsaturated zone which is only a few meter thick and intensive vertical mixing (Rouxel et al., 2011; Bougon et al., 2012). It can thus be assumed that Brittany aquifers present intensive renewal of nitrate and oxygen nutrients in the weathered and/or recharge section. Short residence times are associated to these hydrologic conditions as, except in the variably saturated zone, groundwater presents residence time in the range 5–10 years in the upper meter of the permanently saturated zone.

In the fractured section of these aquifers, groundwater mean vertical velocity is close to 1 m per year (Ayraud et al., 2008). However, such velocity is more difficult to interpret as groundwater flow path strongly depends on the structure of the fracture network. Within the three aquifers investigated, old groundwater represent regional loops with high residence time. As some analysis (^{14}C , ^{36}Cl) indicate large residence times (Roques et al., 2014a; Aquilina et al., 2015), the CFC residence times represent a mixing degree between much older groundwater and recent one. We thus consider that residence times used in this study can be used as a proxy of the mixing degree of these groundwater with recent surface groundwater, i.e., the low degree of oxygen and nitrate potential nutrients to the deep ecosystem. High residence time characterize concentrations that are always very low and vary with time although they are usually not completely absent. As the mixing degree is quite low,

we consider that deep groundwater can be considered as isolated as compared to surface recent groundwater.

Groundwater Sampling and Hydrochemical Analyses

Groundwater samples were collected between October and November 2012. All wells were analyzed for chemistry and all but P-O and SB-O were analyzed for microbial community composition. Sampling was done using a Grundfoss MP1 pump (flow rate : 150–200 L/hr), after purging the tubing and waiting for stabilization of conductivity, pH, redox potential, temperature and oxygen measurements (typically occurring within 30 min). Temperature, conductivity, and oxygen were measured with a WTW315i-CondOx probe, pH with a Combined SenTix 50 electrode, and redox potential with a Pt Ag/AgCl electrode (Mettler Pt 4805). For chemical analyses, approximately 50 ml of groundwater was filtered to 0.22 μm into polytetrafluoroethylene (PTFE) acid-rinsed bottles. Cations were measured with an ICP-MS HP 4500, anions were analyzed by ion chromatography (Dionex DX-100), and carbon was analyzed with a Shimadzu TOC 5050A Analyzer at the Chemistry facility of the Observatoire des Sciences de l'Univers de Rennes (OSUR, University of Rennes 1 – CNRS). We used a principal component analysis (PCA) to assess the variability of hydrochemical parameters over a time period of 5 years, including samples from the two groundwater bodies not included in the high-throughput sequencing (P-O and SB-O). Hydrochemical measurements carried out prior 2012 were performed using the same protocol as described in this paper. The hydrochemical data are available at the website of the H⁺ network of hydrogeological research (hplus.ore.fr). PCA was performed using hydrogeochemical parameters with correlation coefficients calculated using R and lower than 0.8 (Supplementary Table S1).

RNA Extraction, 16S rRNA RT-PCR and Construction of 16S rRNA 454 Libraries

For each groundwater well, triplicate 5 l samples were filtered to 0.22 μm with polyvinylidene fluoride filters (Durapore). RNA extractions were performed with a protocol optimized to improve the removal of organic contaminants (Quaiser et al., 2014). The lysis buffer contained beside CTAB and guanidium thiocyanate, polyvinylpyrrolidone that retains selectively organic compounds as humic acids and fulvic acids (Quaiser et al., 2002). The complete removal of DNA was confirmed by PCR using 16S rRNA gene primers (U27F-U1492R). The 16S rRNA RT-PCR was performed according to manufacturer's instructions (Roche, Titan One RT-PCR kit) using primers 515F (5'-GTG CCA GCM GCC GCG GTA ATA C-3') and 926R (5'-CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT-3'), targeting the V4 and V5 hypervariable regions of Bacteria, and fused to Roche sequencing adaptors and Multiplex Identifiers (MID). With each RNA extract, two independent RT-PCRs were performed with fusion primers containing distinct MIDs. Amplicons from each RT-PCR were quantified and multiplexed. Library preparation, emulsion PCR, and pyrosequencing on a Roche/454 GS FLX Titanium instrument were performed according to manufacturer's protocol

(454 Life Sciences/Roche Applied Biosystems, Branford, CT, USA) at the Environmental Genomics facility at OSUR. These sequence data have been submitted to the ENA databases under the accession No. PRJEB8879.

Community Sequence Analyses

Sequence analyses were performed using Mothur (v1.31.0, Schloss et al., 2009) and DNACLUSt (Ghodsi et al., 2011). Raw reads were filtered to remove those with (i) homopolymers longer than six nucleotides, (ii) undetermined nucleotides, (iii) anomalous length, (iv) one difference, or more in the primer and barcode sequence. Reads were also trimmed based on quality score associated to each nucleotide. Quality filtered reads were then clustered into operational taxonomic units (OTU) with a 97% identity threshold.

We used the distribution of sequences in samples and replicates of amplification to remove spurious OTU that could inflate diversity estimates. Only OTUs containing at least two 100% identical sequences, appeared independently in different replicates were retained for the subsequent analyses. Chimeric sequences were identified with the chimera.uchime command of Mothur and eliminated from the dataset. Valid sequences in OTUs were compared to the SSU rRNA Silva database (Quast et al., 2013, version 115 of August 23, 2013) to determine taxonomic affiliations. We computed richness (*Sobs*) and rarefaction curves as well as diversity (Simpson's index) with Mothur. The community structures were compared with non-metric multidimensional scaling (NMDS) after calculating a Bray–Curtis dissimilarity matrix with vegan (R-package vegan, Oksanen et al., 2015). The fitting of environmental variables to the ordination plot was performed with vegan and the significance was obtained with a 1000 permutations test. Tested parameters were NO_3^- , SO_4^{2-} , O_2 , Cl^- , Na^+ , $\text{Mn}_{(\text{total})}$, $\text{Fe}_{(\text{total})}$, Br^- , Mg^{2+} , K^+ , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , PO_4^{2-} , and total organic carbon concentrations, temperature, conductivity, redox potential, pH, groundwater residence time, and depth. To address more directly how environmental parameters and individual OTUs were related, we performed a regularized Canonical Correlation Analysis (rCCA) between relative frequencies of OTUs and environmental parameters with the R package FRCC (Cruz-Cano and Lee, 2014). We visualized results of the rCCA analysis using the approach developed by Patel et al. (2010) A Network was built from the rCCA results. Each node represents either an OTU or an environmental parameter. Edges connecting nodes are weighted by calculating the dot product between the structural correlations of the first and fifth dimensions of the rCCA (Patel et al., 2010). Only edges with value weights above 0.3 were used to build the network. Network visualization were performed with Cytoscape (Shannon et al., 2003). Additional information were mapped on each node to facilitate the interpretation of the network. This information included the taxonomic assignment and the maximal abundance of each OTU, and the sample where each OTU is the most prevalent. Analysis of the network topology allowed identifying the sets OTUs and environmental features that are the most correlated to each other.

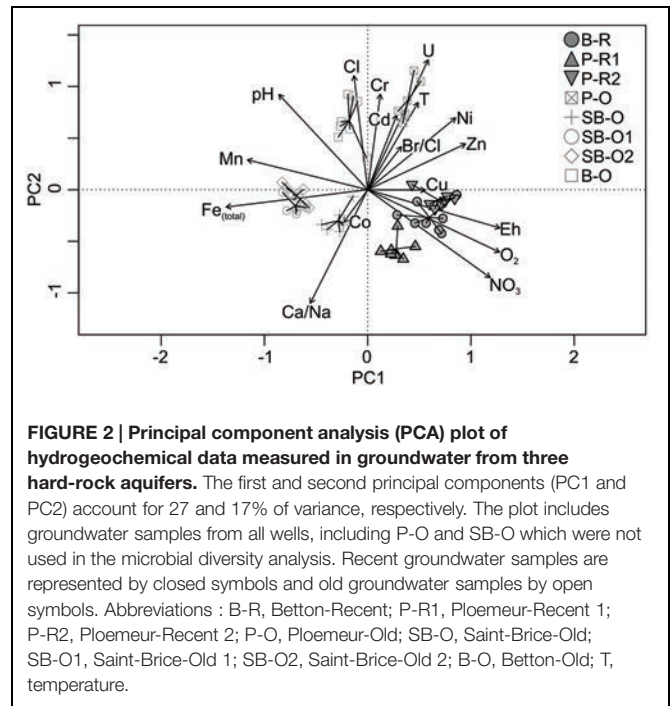


FIGURE 2 | Principal component analysis (PCA) plot of hydrogeochemical data measured in groundwater from three hard-rock aquifers. The first and second principal components (PC1 and PC2) account for 27 and 17% of variance, respectively. The plot includes groundwater samples from all wells, including P-O and SB-O which were not used in the microbial diversity analysis. Recent groundwater samples are represented by closed symbols and old groundwater samples by open symbols. Abbreviations : B-R, Betton-Recent; P-R1, Ploemeur-Recent 1; P-R2, Ploemeur-Recent 2; P-O, Ploemeur-Old; SB-O, Saint-Brice-Old; SB-O1, Saint-Brice-Old 1; SB-O2, Saint-Brice-Old 2; B-O, Betton-Old; T, temperature.

RESULTS

Geochemical Characterization of Groundwater

The hydrochemical variations between different groundwater bodies were visualized by PCA (Figure 2). The first PCA axis separated recent groundwater samples (B-R, P-R1, and P-R2) with an average residence time of 16 years, from old groundwater samples (SB-O2, SB-O1, SB-O, P-O, and B-O) with a residence time greater than 40 years (Supplementary Table S2). Recent groundwater bodies had variable but always high nitrate (47–53 mg/L) and oxygen concentrations (O_2 : 6–10 mg/L), and high redox potentials (>250 mV) (Supplementary Table S2). Conversely, old groundwater samples exhibited high iron (>1 mg/L), manganese, and inorganic carbon (IC) concentrations as well as higher pH and more anoxic conditions (Supplementary Table S2). Old groundwater bodies had nitrate and oxygen concentrations that varied with time but ranged from below detection limit to 1.5 and 2.5 mg/L, respectively. Although samples in the PCA represent 5 years of monitoring covering diverse hydrologic conditions (periods of recharge and discharge and various levels of precipitation) the distinction between recent and old groundwater appears to be the major control on water chemistry. This is particularly clear for the recent groundwater bodies, which group closely despite representing three distinct geological sites. Higher variability between the old groundwater bodies is apparent in the PCA where B-O and P-O were associated with higher chloride, sulfate and sodium concentrations. Most saline groundwater bodies (B-O and P-O) were characterized by higher sulfate concentrations as chloride concentration was

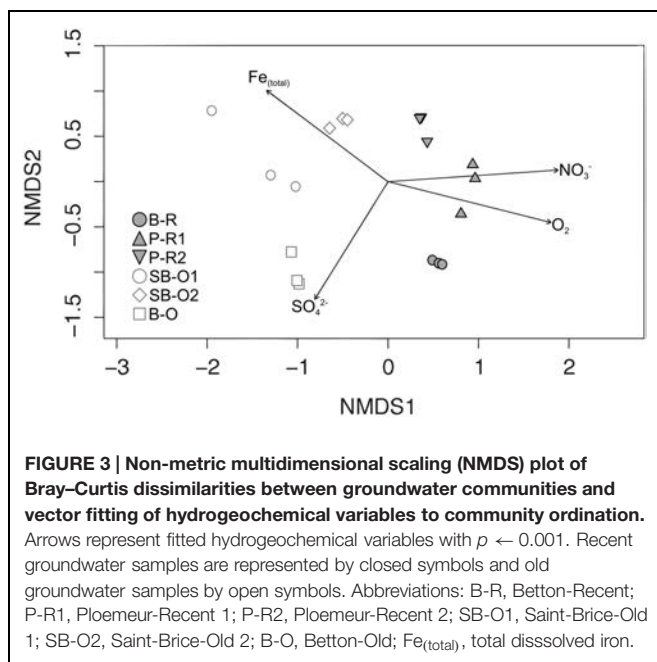
strongly correlated to sulfate concentration (not shown on the PCA plot, $R^2 = 0.971$). The greater salinity of some groundwater bodies is due to complex site history described elsewhere (Aquilina et al., 2015; Armandine Les Landes et al., 2015).

Groundwater Microbial Communities

A total of 3910 OTUs were identified from half a million quality-filtered sequences from all groundwater samples. Individual wells ranged from 611 OTUs to 1827 OTUs (P-R1 and B-R, respectively). Computation of OTU richness and Simpson diversity index did not allow the separation of microbial communities according to their geographical location or sampling depth (Supplementary Figure S1). The dissimilarity in microbial community structure between samples was visualized on an NMDS plot (Figure 3). As in the PCA plot based on groundwater chemistry, there was a clear distinction between old (SB-O2, SB-O1, and B-O) and recent groundwater samples (P-R2, B-R, P-R1). The environmental parameters fitting revealed that differences in community structure were significantly correlated with a small number of environmental parameters: $Fe_{(total)}$, SO_4^{2-} , NO_3^- , and O_2 concentrations ($p < 0.001$). In total, fifteen bacterial phyla were identified in the groundwater sequences (Figure 4A). For old groundwater communities, the majority of sequences were assigned to Betaproteobacteria (accounting for 59–77% of sequences) followed by Deltaproteobacteria (8–16%) and Planctomycetes (3–8%). Sequences of Chlorobi and Chloroflexi accounted for 9% of the sequences in B-O whereas Verrucomicrobia represented a significant portion of sequences in SB-O1 and SB-O2 (3 and 4%, respectively). Taxonomic profiles show that Betaproteobacteria also accounted for a large proportion of sequences in recent groundwater,

with 58% in B-R, 45% in P-R2, and 33% in P-R1. However, we found that Firmicutes represent another dominant phylum in recent groundwater communities with 20 and 46% of the sequences ascribed to this phylum in B-R and P-R1, respectively. The majority of Firmicutes sequences were assigned to the *Clostridium* genus (Supplementary Figure S2). Despite their strong similarity in groundwater chemistry, P-R1 and P-R2 samples had distinct microbial communities, with P-R2 showing more numerous sequences affiliated to *Alpha*- (18%), Gammaproteobacteria (16%), and Actinobacteria (11%) whereas communities from P-R1 were dominated by Firmicutes (46%).

The distinction in community composition between old and recent groundwater samples was more clear at the family level within Betaproteobacteria (Figure 4B). In old groundwater, the majority of sequences were attributed to Gallionellaceae, accounting for 25 to 44% of sequences. In SB-O1, a substantial proportion of sequences was assigned to the Hydrogenophilaceae (9%). Both families were rarely detected in recent groundwater samples (<0.3%). In recent groundwater samples, 26–57% of Betaproteobacteria sequences were assigned to Comamonadaceae (12–20%), Oxalobacteraceae (7–33%), and Rhodocyclaceae (1–4%). Conversely, these three families only accounted for 8–25% in old groundwater. NMDS allows the comparison of communities on a dissimilarity matrix basis. To further investigate the interactions between environmental parameters and specific microbial community members, we performed a rCCA. Positive significant correlations between and among OTUs and hydrogeochemical parameters were visualized through a network with three modules (or sub-networks), each corresponding to a different hydrogeochemical context (Figure 5). Dominant OTUs in old groundwater form two highly interconnected modules (modules I and II). However, a clear separation by site can be observed as OTUs primarily from SB-O1 and SB-O2 (Saint-Brice-En-Coglès) form a distinct module from OTUs primarily detected in B-O (Betton). Both modules I and II were dominated by OTUs of Nitrosomonadales (mainly Gallionellaceae), Planctomycetes (Phycisphaerae, *OM190*, and Planctomycetacia class) and Myxococcales. Module I also contained two large OTUs of Hydrogenophilales (mainly *Sulfuricella*) and many OTUs of Rhodocyclales and Clostridiales. All the OTUs in this module were associated to the total Fe concentration. Module II also gathers OTUs of Ignavibacteriales and Desulfuromonadales and is characterized by the association of OTUs with SO_4^{2-} and IC concentrations. Module III corresponds to a group of OTUs mainly detected in recent groundwater and associated with NO_3^- and O_2 concentrations. This module includes OTUs of Clostridiales (mainly *Clostridium*), Burkholderiales (mainly Comamonadaceae and Oxalobacteraceae), Caulobacterales, Opitutales (mainly *Opitutus* genus), Rhodocyclales (mainly *Propionivibrio* genus), and Sphingomonadales (*Sphingobium* genus). This module showed that sampling site had no effect, as OTUs detected in samples from Ploemeur (P-R1 and P-R2) and Betton (B-R) are all connected together.



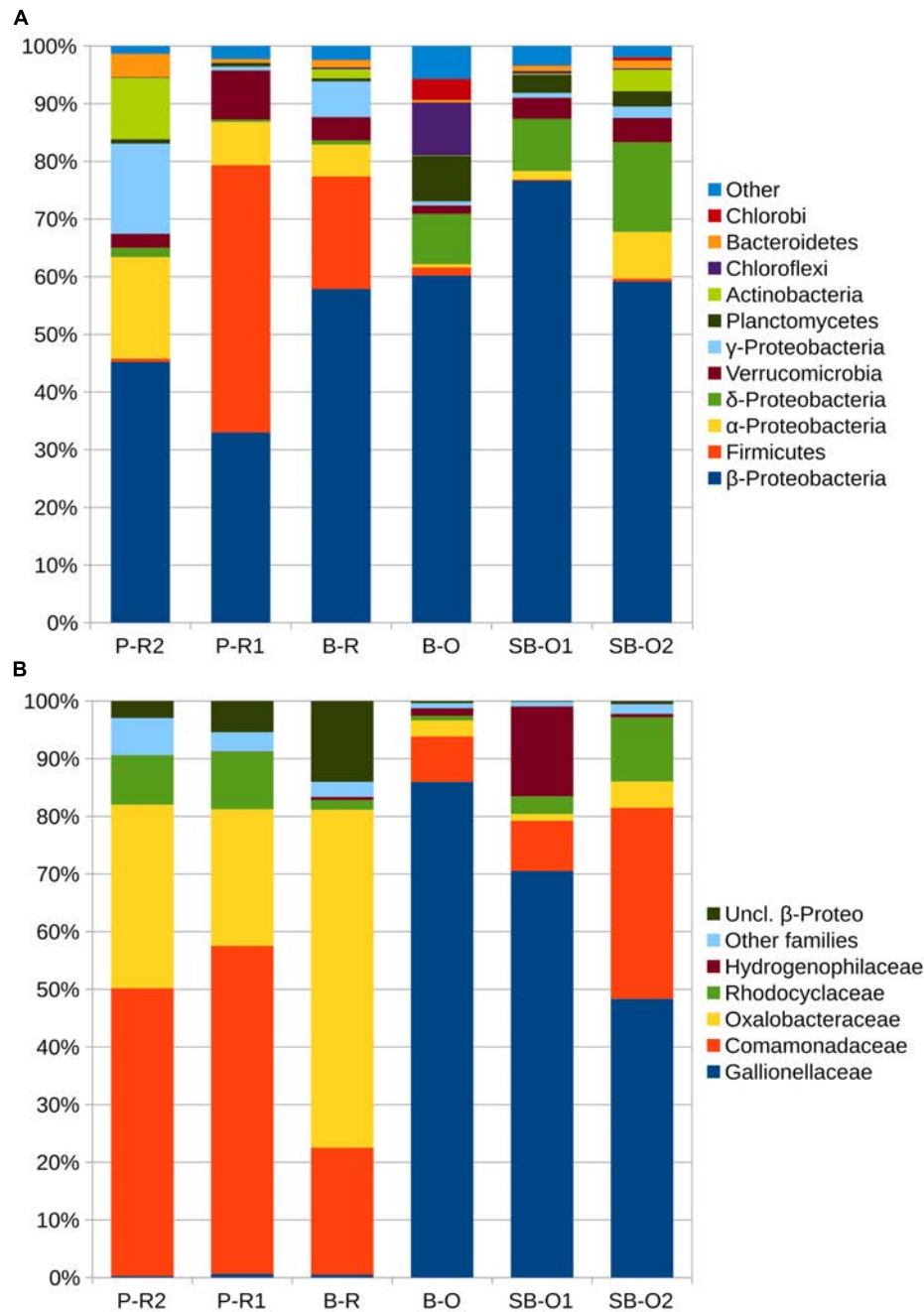


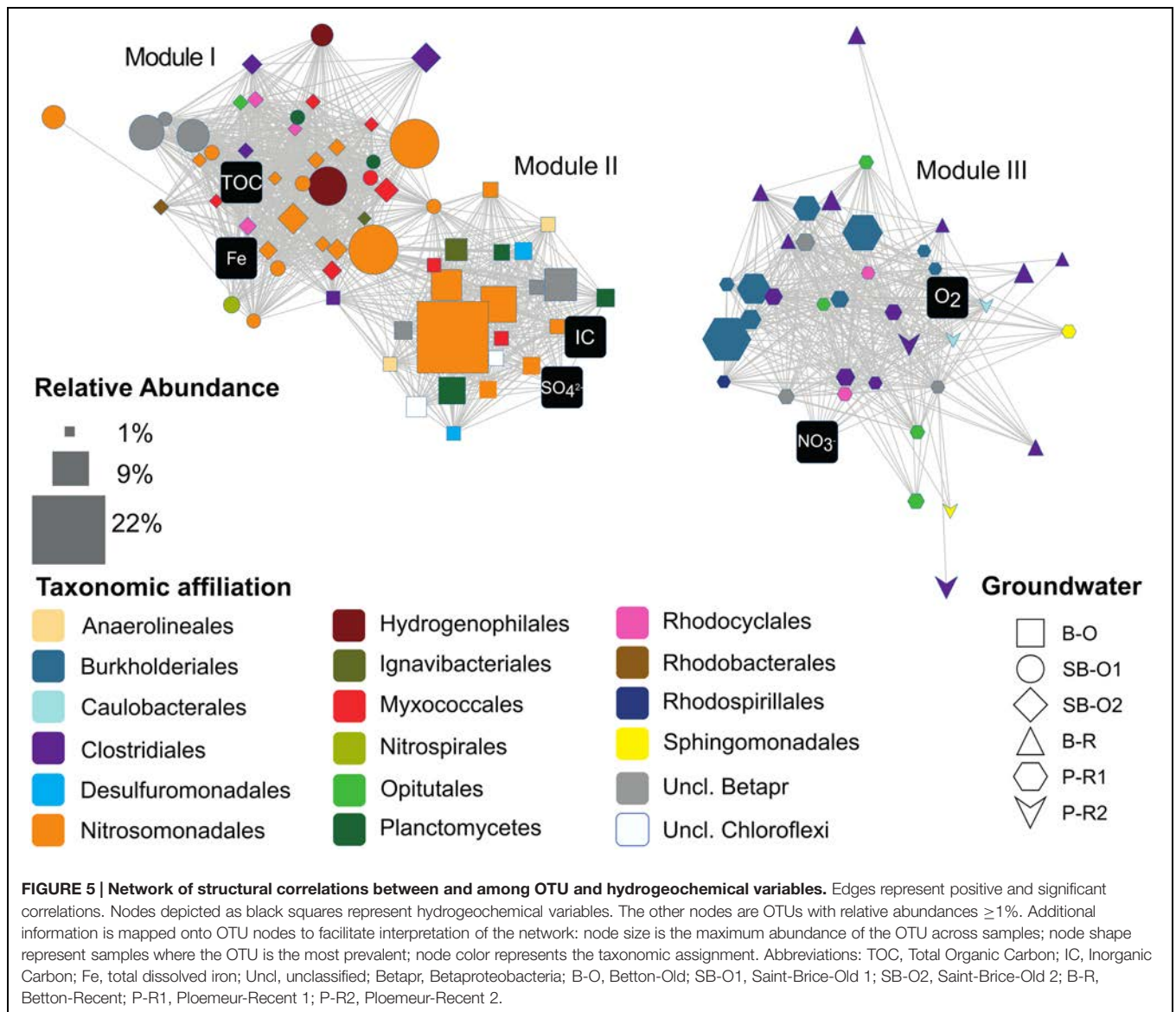
FIGURE 4 | Taxonomic composition of groundwater samples. In **(A)** percentages of sequences assigned to the main phyla of bacteria. For sequences assigned to *Proteobacteria*, percentages represent the class level. In **(B)** is presented percentages of sequences for families of *Betaproteobacteria*. Taxa with less than 10 sequences detected are gathered in the category « other » in **(A)** and « other families » **(B)**. Abbreviations: P-R2, Ploemeur-Recent 2; P-R1, Ploemeur-Recent 1; B-R, Betton-Recent; B-O, Betton-Old; SB-O1, Saint-Brice-Old 1; SB-O2, Saint-Brice-Old 2; uncl., unclassified.

DISCUSSION

Denitrification Processes in the Superficial Ecosystem

Microorganisms detected in recent groundwater were highly associated with NO_3^- and O_2 concentrations (Figures 3 and 5).

Indeed, recent groundwater bodies had very high NO_3^- concentrations (from 47 to 53 mg/L) due to widespread application of organic and inorganic fertilizers on agricultural fields since the 1980s (Aquilina et al., 2012). Recent groundwater samples had a large portion of sequences affiliated with *Comamonadaceae* and *Oxalobacteraceae*. Both of these families



contain many genera of potential denitrifying bacteria such as *Simplicispira*, *Rhizobacter*, *Curvibacter*, *Aquabacterium*, *Polaromonas* (Comamonadaceae, Betaproteobacteria), and *Rugamonas* (Oxalobacteraceae, Betaproteobacteria). The presence of these bacteria in conjunction with high NO_3^- concentration suggests that persistent inputs of NO_3^- -rich water could favor the development of a guild of denitrifying bacteria, representing a profound change in community structure and microbial processes in recent groundwater. However, despite the presence of putative denitrifying Betaproteobacteria, there is no clear evidence of substantial denitrification in these groundwater bodies. Low organic carbon concentrations in groundwater (ranging from 0.24 to 1.3 mg/L over the 5 years) can limit heterotrophic denitrification (Korom, 1992; Starr and Gillham, 1993; Rivett et al., 2008). Autotrophic denitrification linked to Fe oxidation can occur in groundwater (Smith et al., 1994; Rivett et al., 2008; Weymann

et al., 2010) but is likely limited in this aquifer section by the low Fe concentration observed in recent groundwater samples.

These results are in good agreement with previous microbial analysis of a surficial granitic aquifer in Brittany (Bougon et al., 2012) which investigated the communities at a depth ranging from 6 m down to 15 m below the soil surface. This study identified a large proportion of nitrate reducing bacteria in the aquifer although no clear and complete denitrification processes could be detected. These results and the present study indicate that denitrification remains probably a key function in the ecosystem although it does not accounts for a complete nitrate consumption. The strong link between NO_3^- concentration and the proportion of denitrifiers in our dataset suggests that perturbations of the nitrogen cycle in surface catchments can substantially impact microbial community structure in groundwater. These results suggest a

limited denitrification capacity that could constitute a limit to groundwater remediation.

Anthropogenic Influence in the Superficial Ecosystem

Although the mean residence time in recent groundwater is approximately 18 years (Ayraud et al., 2008), the high O_2 concentration suggests inflows of oxygenated surface water through the recharge process. Geochemical tracers and groundwater dating methods showed regular inputs of surface precipitation and soil-water to the top of these topographic groundwater bodies (Legout et al., 2007; Aquilina et al., 2012). Therefore, an alternative explanation for the link between NO_3^- concentration and proportion of potential denitrifiers may be direct transfer of microorganisms from the soil or underlying unsaturated zone where high organic carbon concentration could sustain denitrification. Indeed, nutrients and denitrifying activity are higher in the soil and near-surface unsaturated zone than in the deeper permanently saturated zone (Legout et al., 2005). Analysis of microbial diversity during one hydrological cycle at depth of 6 to 15 m below soil surface (Bougon et al., 2012) showed that microbial diversity at 15 m depth (below soil surface) was more homogeneous than at shallower 6 m depth. Close to the surface, rapid transfer during recharge processes (high groundwater levels) induced a modification of the community structure although diversity in the 6 m shallow groundwater remained similar to the 15 m depth ecosystem during low groundwater-level periods.

In addition to potentially denitrifying proteobacteria, recent groundwater from P-R1 and B-R had a high proportion of 16S rRNA transcripts affiliated to Firmicutes, many of which were assigned to the *Clostridium* genus (Supplementary Figure S2). This genus is often associated with mammalian gut habitats or soil (Lopetuso et al., 2013) and *Clostridium perfringens* has been proposed as an indicator of fecal pollution (Araujo et al., 2004; Mueller-Spitz et al., 2010). Contamination of groundwater by rumen-related bacteria including *Clostridium*-affiliated microorganisms was demonstrated in an intensive farming zone in Korea, from the comparison of livestock-contaminated wastewater and uncontaminated groundwater in sampling sites located 400m apart (Cho and Kim, 2000). Thus, we suggest that the strong prevalence of amplicons attributed to *Clostridium* combined with the high nitrate load in recent groundwater can also be attributed to the transport of bacteria from livestock waste during the recharge process. A similar result was also obtained by Bougon et al. (2012) with *Bacillus* identification.

A Fe-Based Ecosystem in Isolated Groundwater

Old groundwater in all sites was characterized by high Fe concentrations. In sequences from old groundwater, Gallionellaceae sequences were dominant. This family is primarily composed of autotrophic Fe-oxidizers including *Gallionella* and *Sideroxydans* genera that grow optimally in neutral, microaerophilic, Fe-rich environments (Hallbeck and

Pedersen, 1990; Emerson et al., 2013). Abundance of 16S rRNA amplicons does not allow direct quantification of microbial cells activity (Větrovský and Baldrian, 2013) but it does reflect *in situ* transcriptionally active cells, thereby avoiding bias due to dead or dying cells. It constitutes a powerful tool to identify microorganisms with fundamental activities for ecosystem functioning.

Our analysis of rRNA amplicons strongly suggests that Gallionellaceae are the main primary producers in old groundwater where their autotrophic activity could sustain the development of other heterotrophic microorganisms. Their inability to oxidize Fe when O_2 concentration is high (Druschel et al., 2008) explains why Gallionellaceae are restricted to deeper isolated groundwater. However, the distribution of Gallionellaceae also suggests minimal renewal of old groundwater with oxygenated recent groundwater from surface, creating chemical conditions (neutral-pH, Fe-rich, O_2 -poor groundwater) favoring the development of a Gallionellaceae-dominated community. This interpretation corresponds with the geochemical data indicating that contribution from old groundwater bodies makes up a very small percentage of near-surface groundwater. Each year, the percentage of recent groundwater flushing into the old groundwater body is about 1 to 5% of the old groundwater body (Aquilina et al., 2015). The prevalence of *Gallionellaceae* in our dataset raises the question of the Fe origin in old groundwater. Some of the Fe(II) concentration may come from the dissolution of sulfur-bearing minerals (pyrite). Pyrite is very common in crystalline rocks. This mineral dissolution can occur either abiotically through chemical oxidation with O_2 , which must be negligible here because pH are close to neutrality, or can be biologically facilitated by NO_3^- reducing microorganisms (Melton et al., 2014). Beside the release of reduced iron, microbially driven dissolution of pyrite leads to the production of sulfate in significant proportions. Analysis of SO_4^{2-} concentrations and S- SO_4 isotopic ratios indicate that pyrite dissolution occurred at the Ploemeur and St-Brice sites (Pauwels et al., 2010; Roques et al., 2014a). The relative importance of sulfide oxidation is difficult to determine, because SO_4^{2-} concentrations are highly variable. In B-O, where SO_4^{2-} concentrations are the highest, SO_4^{2-} concentration may be the result of marine SO_4^{2-} intrusion in the aquifer two million years ago (Aquilina et al., 2015; Armandine Les Landes et al., 2015).

However, in this old groundwater, SO_4^{2-} to Cl^- ratios are higher than ratios found in seawater and precipitation, suggesting a supplementary SO_4^{2-} source such as microbially mediated oxidation of sulfur-bearing minerals. The genome of *Sideroxydans* ES-1 includes several gene clusters involved in reduced sulfur oxidation. The ability of the ES-1 strain to grow using thiosulfate as the sole source of electrons supports the hypothesis that some members of the Gallionellaceae family can use reduced sulfur oxidation to produce energy (Emerson et al., 2013). However, to date, no evidence has been found that *Sideroxydans* ES-1 is able to couple iron or sulfide oxidation to nitrate reduction. Thus, further investigation is necessary to identify microorganisms actively involved in the weathering and dissolution of minerals and in the release of Fe and SO_4^{2-} in crystalline aquifers. complex

In addition to sequences of bacteria involved in the oxidation of Fe and reduced sulfur compounds, all old groundwater samples contained sequences of microorganisms potentially involved in Fe or SO_4^{2-} reduction. The Myxococcales (39–85% of the Deltaproteobacteria, Supplementary Figure S3) order shows sequences belonging to the *Anaeromyxobacter* genus reported as a Fe(III) reducer (Supplementary Figure S4; Sanford et al., 2002). The Desulfobacterales (1–31% of the Deltaproteobacteria) order includes several genera which have been described as SO_4^{2-} reducers such as *Desulfobulbus*, *Desulfatirhabdium*, and *Desulfosalsimonas* (Supplementary Figures S5A,B; Balk et al., 2008; Kjeldsen et al., 2010; Pagani et al., 2011). Together, the simultaneous occurrence of Fe and reduced sulfur oxidizers and reducers in old groundwater hints at the existence of a complete microbial redox cycle for both elements. Due to the different proportions observed in the amplicon datasets, the oxidative portion of the cycle performed by Gallionellaceae appears to be predominant, thereby controlling the flow of carbon in old groundwater. Yet, we cannot rule out that iron-reducing bacteria might be underrepresented in our dataset because of a sampling bias, as they have the ability to thrive attached onto the aquifer substratum rather than suspended into groundwater (Flynn et al., 2008).

Hydrogeologic Controls

Our results show that geochemistry and microbial community structure do not directly depend on sampling depth or location in the surficial weathered or deep fractured compartment of crystalline aquifers. Conversely, a clear distinction is observed between recent and old groundwater bodies, evident in both their geochemical and microbial signatures. Recent groundwater corresponds to the weathered part and the recharge zone of hard rock aquifers, i.e., to topographic flow systems. These groundwater are highly influenced by rapid transfer from the soil and unsaturated zone and present high oxygen and nitrate concentrations. Old groundwater correspond to deeper hydrogeologic loops where very high residence time groundwater slowly mixes with a low percentage of recent groundwater, resulting in very low but not null oxygen and nitrate concentrations. Thus, groundwater isolation along the hydrogeologic loops following active recharge zones, determine the fluxes of nutrients, energy and microorganisms circulating within the subsurface habitats.

From our analysis of recent groundwater, the massive input of NO_3^- and the transport of microorganisms from the soil constitute major drivers for groundwater chemistry and microbial community composition that seem to overwhelm other factors such as lithology (granite or schist) or aquifer geometry (depth of the weathered zone). Thus, short or rapid groundwater circulation in topographic systems allow the connection between surficial habitats and groundwater bodies. This connection occurs mainly during the recharge period in winter while evapotranspiration is minimum and soil moisture is high, allowing vertical water transfers. This recharge process is not uniform and while it predominantly occurs as a slow transfer of soil water to the water table

(about 1 m per year), rapid water transfer can occur via macropores such as dead root conduits that transport water from soil surface to the groundwater table in a matter of hours (Legout et al., 2007). Following hydrogeologic loops, the recharge water moves downward while microorganisms consume oxygen and nutrients. Within a catchment, except in discharge zones, one would expect oxygen, and nutrients to decrease while residence time increases with depth due to deepening hydrogeologic loops. However, this was not observed in the data where recent groundwater and old groundwater were clearly distinct. In the Ploemeur site, recent groundwater extends to the fractured layer because the fracture network is well connected to the recharge zones and the groundwater velocity is high. In the subsurface, further down the hydrogeologic loop, old groundwater geochemistry and microbial community structure appear to be tightly related to high Fe concentrations and Gallionellaceae prevalence. As for recent groundwater, these specifications are not linked to geology or depth but to the groundwater isolation in the deeper compartment as compared to surface opened groundwater. Although the occurrence of Gallionellaceae is restricted to narrow geochemical conditions (low O_2 and high Fe concentrations; Melton et al., 2014), their occurrence in three different sites indicates that such conditions may be widespread in hard-rock aquifers. Gallionellaceae have been shown to occupy redoxcline habitats between reducing groundwater Fe-rich and oxygenated context. This is the case for groundwater inputs to freshwater systems or underground experiments (James and Ferris, 2004; Anderson et al., 2006; Sahl et al., 2008; Duckworth et al., 2009; Roden et al., 2012; Fleming et al., 2014; Reis et al., 2014; Ionescu et al., 2015). Microbial investigation of deep granitic groundwater ecosystems have shown the dominance of sulfur or iron reducing bacteria (Jain et al., 1997; Pedersen, 1997; Nyssönen et al., 2012). We here document the occurrence of Gallionellaceae-dominated ecosystems in aquifers over a depth range of 50–250 m. This ecosystem is related to the occurrence of mixing with recent groundwater which is expected to decrease with depth. It may be expected that further down, the ecosystem observed may shift to more reducing conditions with adapted microorganisms. We interpret the observed ecosystem as a transition zone which extends over several hundred of meters below the recent topography-dominated upper section of hard rock aquifers.

The Ploemeur site also demonstrates the effect of perturbations on groundwater bodies due to pumping-induced mixing processes, with a local mixing of recent and old groundwater strongly impacting the community structure. As mentioned earlier, near the P-R2 well more than 2500 m^3 of water are pumped daily causing mixing of recent and old groundwater (Le Borgne et al., 2006). Although P-R1 and P-R2 groundwater chemistry are similar, P-R2 groundwater shows a taxonomic composition distinct from even nearby recent groundwater samples (P-R1, Figure 4A). This mixing is associated with the absence of taxa that dominate the other recent groundwater samples, such as Firmicutes. This indicates a complex relationship between nutrient fluxes disturbance induced by human activity, and the microbial community

structure. It suggests that the transition from “recent” to “old” is more of a threshold than a gradient in regards to microbial communities. Identifying the point of transition from recent to old groundwater remains to be investigated, and calls for more spatially intensive sampling in a single aquifer.

CONCLUSION

In order to explore the relationships between microbial community structure and groundwater position along hydrogeologic loops, we investigated the composition of the active microbial communities in three hard-rock aquifers with contrasting geology and hydrologic conditions. The data and analyses presented here reveal highly diverse bacterial community compositions in hard-rock aquifers. Microbial community structure in hard-rock aquifers seems to be intrinsically related to groundwater residence time or to the length of hydrogeologic loop, which determines the fluxes of nutrients, energy, and the delivery of microorganisms originating from the surface. Considering groundwater residence time and working at a regional scale revealed consistent patterns in microbial community structure, despite the multi-scale spatial heterogeneity inherent to hydrogeologic systems. Microbial communities in recent groundwater might be constrained by rapid and persistent transfers of nutrients and microorganisms occurring from surface, independently of aquifer lithology. In old groundwater with large residence time, isolation leads to a profound shift of microbial community composition. Our results also indicate that a constant mixing of a small

percentage of recent groundwater with old groundwater, favors iron oxidation by the Gallionellaceae. Additional sequencing of metagenomes and metatranscriptomes will allow to understand the significance of autotrophic iron oxidizers in groundwater of hard-rock aquifers, and to decipher the relationships between iron oxidation and other biogeochemical cycles.

FUNDING

We thank the Brittany Region, CNRS (EC2CO-AQUADIV & PEPHII-AQUASYST), University of Rennes 1, and the BRGM, which funded this work.

ACKNOWLEDGMENTS

We also thank Christophe Petton and Rebecca Hochreutener for technical assistance in the field, Martine Bouhnik-Le Coz for geochemical analyses, the molecular ecology facility (UMR 6553 ECOBIO), and Alexandra Dheilly for support in preparation and sequencing of amplicon libraries.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2015.01457>

REFERENCES

- Akob, D. M., Mills, H. J., and Kostka, J. E. (2007). Metabolically active microbial communities in uranium-contaminated subsurface sediments. *FEMS Microbiol. Ecol.* 59, 95–107. doi: 10.1111/j.1574-6941.2006.00203.x
- Amiotte Suchet, P., Jean-Luc, P., and Ludwig, W. (2003). Uptake by continental weathering and alkalinity river transport to the oceans. *Global Biogeochem. Cycles* 17, 1038–1051. doi: 10.1029/2002GB001891
- Anderson, C. R., James, R. E., Fru, E. C., Kennedy, C. B., and Pedersen, K. (2006). *In situ* ecological development of a bacteriogenic iron oxide-producing microbial community from a subsurface granitic rock environment. *Geobiology* 4, 29–42. doi: 10.1111/j.1472-4669.2006.00066.x
- Aquilina, L., Vergnaud-Ayraud, V., Armandine les Landes, A., Pauwels, H., Davy, P., Petelet-Giraud, E., et al. (2015). Impact of climate changes during the last 5 million years on groundwaters in basement aquifers. *Sci. Rep.* 5:14132. doi: 10.1038/srep14132
- Aquilina, L., Vergnaud-Ayraud, V., Labasque, T., Bour, O., Molénat, J., Ruiz, L., et al. (2012). Nitrate dynamics in agricultural catchments deduced from groundwater dating and long-term nitrate monitoring in surface- and groundwaters. *Sci. Total Environ.* 435–436, 167–178. doi: 10.1016/j.scitotenv.2012.06.028
- Araujo, M., Sueiro, R. A., Gómez, M. J., and Garrido, M. J. (2004). Enumeration of *Clostridium perfringens* spores in groundwater samples: comparison of six culture media. *J. Microbiol. Methods* 57, 175–180. doi: 10.1016/j.mimet.2003.12.010
- Armandine Les Landes, A., Aquilina, L., Davy, P., Vergnaud, V., and le Carlier, C. (2015). Time scales of regional circulation of saline fluids in continental aquifers (Armorican massif, Western France). *Hydrol. Earth Syst. Sci.* 19, 1413–1426. doi: 10.5194/hess-19-1413-2015
- Ayraud, V., Aquilina, L., Labasque, T., Pauwels, H., Molenat, J., Pierson-Wickmann, A.-C., et al. (2008). Compartmentalization of physical and chemical properties in hard-rock aquifers deduced from chemical and groundwater age analyses. *Appl. Geochem.* 23, 2686–2707. doi: 10.1016/j.apgeochem.2008.06.001
- Ayraud, V., Aquilina, L., Pauwels, H., Labasque, T., Pierson-Wickmann, A.-C., Aquilina, A.-M., et al. (2006). Physical, biogeochemical and isotopic processes related to heterogeneity of a shallow crystalline rock aquifer. *Biogeochemistry* 81, 331–347. doi: 10.1007/s10533-006-9044-4
- Balk, M., Altinbaş, M., Rijpstra, W. I. C., Sinnighe Damsté, J. S., and Stams, A. J. M. (2008). *Desulfatirhabdium butyrivorans* gen. nov., sp. nov., a butyrate-oxidizing, sulfate-reducing bacterium isolated from an anaerobic bioreactor. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58, 110–115. doi: 10.1099/ijs.0.65396-0
- Blatt, H., and Jones, R. L. (1975). Proportions of exposed igneous, metamorphic, and sedimentary rocks. *Geol. Soc. Am. Bull.* 86, 1085–1088. doi: 10.1130/0016-7606(1975)86<1085:POEIMA>2.0.CO;2
- Bougon, N., Aquilina, L., Molénat, J., Marie, D., Delettre, Y., Chancerel, E., et al. (2012). Influence of depth and time on diversity of free-living microbial community in the variably saturated zone of a granitic aquifer. *FEMS Microbiol. Ecol.* 80, 98–113. doi: 10.1111/j.1574-6941.2011.01273.x
- Boyd, E. S., Cummings, D. E., and Geesey, G. G. (2007). Mineralogy influences structure and diversity of bacterial communities associated with geological substrata in a pristine aquifer. *Microb. Ecol.* 54, 170–182.
- Brown, C. T., Hug, L. A., Thomas, B. C., Sharon, I., Castelle, C. J., Singh, A., et al. (2015). Unusual biology across a group comprising more than 15% of domain Bacteria. *Nature* 523, 208–211. doi: 10.1038/nature14486
- Castelle, C. J., Hug, L. A., Wrighton, K. C., Thomas, B. C., Williams, K. H., Wu, D., et al. (2013). Extraordinary phylogenetic diversity and metabolic versatility in aquifer sediment. *Nat. Commun.* 4, 2120. doi: 10.1038/ncomms3120

- Cho, J. C., and Kim, S. J. (2000). Increase in bacterial community diversity in subsurface aquifers receiving livestock wastewater input. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 956–965. doi: 10.1128/AEM.66.3.956-965.2000
- Cruz-Cano, R., and Lee, M.-L. T. (2014). Fast regularized canonical correlation analysis. *Comput. Stat. Data Anal.* 70, 88–100. doi: 10.1016/j.csda.2013.09.020
- Druschel, G. K., Emerson, D., Sutka, R., Suchecki, P., and Luther, G. W. (2008). Low-oxygen and chemical kinetic constraints on the geochemical niche of neutrophilic iron(II) oxidizing microorganisms. *Geochim. Cosmochim. Acta* 72, 3358–3370. doi: 10.1016/j.gca.2008.04.035
- Duckworth, O. W., Holmström, S. J. M., Peña, J., and Sposito, G. (2009). Biogeochemistry of iron oxidation in a circumneutral freshwater habitat. *Chem. Geol.* 260, 149–158. doi: 10.1016/j.chemgeo.2008.08.027
- Emerson, D., Field, E. K., Chertkov, O., Davenport, K. W., Goodwin, L., Munk, C., et al. (2013). Comparative genomics of freshwater Fe-oxidizing bacteria: implications for physiology, ecology, and systematics. *Front. Microbiol.* 4:254. doi: 10.3389/fmicb.2013.00254
- Fleming, E. J., Cetinić, I., Chan, C. S., Whitney King, D., and Emerson, D. (2014). Ecological succession among iron-oxidizing bacteria. *ISME J.* 8, 804–815. doi: 10.1038/ismej.2013.197
- Flynn, T. M., Sanford, R. A., and Bethke, C. M. (2008). Attached and suspended microbial communities in a pristine confined aquifer. *Water Resour. Res.* 44, 1–7. doi: 10.1029/2007WR006633
- Flynn, T. M., Sanford, R. A., Ryu, H., Bethke, C. M., Levine, A. D., Ashbolt, N. J., et al. (2013). Functional microbial diversity explains groundwater chemistry in a pristine aquifer. *BMC Microbiol.* 13:146. doi: 10.1186/1471-2180-13-146
- Flynn, T. M., Sanford, R. A., Santo Domingo, J. W., Ashbolt, N. J., Levine, A. D., and Bethke, C. M. (2012). The active bacterial community in a pristine confined aquifer. *Water Resour. Res.* 48:W09510. doi: 10.1029/2011WR011568
- Foster, S. S. G., and Chilton, P. J. (2003). Groundwater: the processes and global significance of aquifer degradation. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B* 358, 1957–1972. doi: 10.1098/rstb.2003.1380
- Ghods, M., Liu, B., and Pop, M. (2011). DNACLUSt: accurate and efficient clustering of phylogenetic marker genes. *BMC Bioinformatics* 12:271. doi: 10.1186/1471-2105-12-271
- Hallbeck, L., and Pedersen, K. (1990). Culture parameters regulating stalk formation and growth rate of *Gallionella ferruginea*. *J. Gen. Microbiol.* 136, 1675–1680.
- Hemme, C. L., Deng, Y., Gentry, T. J., Fields, M. W., Wu, L., Barua, S., et al. (2010). Metagenomic insights into evolution of a heavy metal-contaminated groundwater microbial community. *ISME J.* 4, 660–672. doi: 10.1038/ismej.2009.154
- Ionescu, D., Heim, C., Polerecky, L., Ramette, A., Haeusler, S., Bizic-Ionescu, M., et al. (2015). Diversity of iron oxidizing and reducing bacteria in flow reactors in the Äspö hard rock laboratory. *Geomicrobiol. J.* 32, 207–220. doi: 10.1080/01490451.2014.884196
- Jain, D. K., Stroes-Gascoyne, S., Providenti, M., Tanner, C., and Cord, I. (1997). Characterization of microbial communities in deep groundwater from granitic rock. *Canadian J. Microbiol.* 43, 272–283. doi: 10.1139/m97-038
- James, R. E., and Ferris, F. G. (2004). Evidence for microbial-mediated iron oxidation at a neutrophilic groundwater spring. *Chem. Geol.* 212, 301–311. doi: 10.1016/j.chemgeo.2004.08.020
- Jimenez-Martinez, J., Longuevergne, L., Le Borgne, T., Davy, P., Russian, A., and Bour, O. (2014). Temporal and spatial scaling of hydraulic response to recharge in fractured aquifers?: insights from a frequency domain analysis. *Water Resour. Res.* 49, 3007–3023. doi: 10.1002/wrcr.20260
- Kjeldsen, K. U., Jakobsen, T. F., Glastrup, J., and Ingvorsen, K. (2010). *Desulfosalsimonas propionica* gen. nov., sp. nov., a halophilic, sulfate-reducing member of the family *Desulfobacteraceae* isolated from a salt-lake sediment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60, 1060–1065. doi: 10.1099/ijso.0.014746-0
- Korom, S. F. (1992). Natural denitrification in the saturated zone: a review. *Water Resour. Res.* 28, 1657–1668. doi: 10.1029/92WR00252
- Larned, S. T. (2012). Phreatic groundwater ecosystems: research frontiers for freshwater ecology. *Freshw. Biol.* 57, 885–906. doi: 10.1111/j.1365-2427.2012.02769.x
- Le Borgne, T., Bour, O., de Dreuzy, J. R., Davy, P., and Touchard, F. (2004). Equivalent mean flow models for fractured aquifers: insights from a pumping tests scaling interpretation. *Water Resour. Res.* 40:W03512. doi: 10.1029/2003WR002436
- Le Borgne, T., Bour, O., Paillet, F. L., and Caudal, J.-P. (2006). Assessment of preferential flow path connectivity and hydraulic properties at single-borehole and cross-borehole scales in a fractured aquifer. *J. Hydrol.* 328, 347–359. doi: 10.1016/j.jhydrol.2005.12.029
- Legout, C., Molenat, J., Aquilina, L., Gascuelodoux, C., Fauchoux, M., Fauvel, Y., et al. (2007). Solute transfer in the unsaturated zone-groundwater continuum of a headwater catchment. *J. Hydrol.* 332, 427–441. doi: 10.1016/j.jhydrol.2006.07.017
- Legout, C., Molenat, J., Lefebvre, S., Marmonier, P., and Aquilina, L. (2005). Investigation of biogeochemical activities in the soil and unsaturated zone of weathered granite. *Biogeochemistry* 75, 329–350. doi: 10.1007/s10533-005-0110-0
- Lin, X., McKinley, J., Resch, C. T., Kaluzny, R., Lauber, C. L., Fredrickson, J., et al. (2012). Spatial and temporal dynamics of the microbial community in the Hanford unconfined aquifer. *ISME J.* 6, 1665–1676. doi: 10.1038/ismej.2012.26
- Lopetuso, L. R., Scaldaferrri, F., Petito, V., and Gasbarrini, A. (2013). Commensal Clostridia: leading players in the maintenance of gut homeostasis. *Gut Pathog.* 5:23. doi: 10.1186/1757-4749-5-23
- Mall, R. K., Gupta, A., Singh, R., Singh, R. S., and Rathore, L. S. (2006). Water resources and climate change: an indian perspective. *Curr. Sci.* 90–12, 1612–1626.
- Martin, C., Molenat, J., Gascuel-Oudoux, C., Vouillamoz, J.-M., Robain, H., Ruiz, L., et al. (2006). Modelling the effect of physical and chemical characteristics of shallow aquifers on water and nitrate transport in small agricultural catchments. *J. Hydrol.* 326, 25–42. doi: 10.1016/j.jhydrol.2005.10.040
- Melton, E. D., Swanner, E. D., Behrens, S., Schmidt, C., and Kappler, A. (2014). The interplay of microbially mediated and abiotic reactions in the biogeochemical Fe cycle. *Nat. Rev. Microbiol.* 12, 797–809. doi: 10.1038/nrmicro3347
- Mueller-Spitz, S. R., Stewart, L. B., Val Klump, J., and McLellan, S. L. (2010). Freshwater suspended sediments and sewage are reservoirs for enterotoxin-positive *Clostridium perfringens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 5556–5562. doi: 10.1128/AEM.01702-09
- Nyssonen, M., Bomberg, M., Kapanen, A., Nousiainen, A., Pitkänen, P., and Itävaara, M. (2012). Methanogenic and sulphate-reducing microbial communities in deep groundwater of crystalline rock fractures in olkiluoto, finland. *Geomicrobiol. J.* 29, 863–878. doi: 10.1080/01490451.2011.635759
- Nyssonen, M., Hultman, J., Ahonen, L., Kukkonen, I., Paulin, L., Laine, P., et al. (2014). Taxonomically and functionally diverse microbial communities in deep crystalline rocks of the Fennoscandian shield. *ISME J.* 8, 126–138. doi: 10.1038/ismej.2013.125
- Oksanen, A. J., Guillaume Blanchet, F., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P. R., et al. (2015). *Vegan: Community Ecology Package. R Package Version 2.2-1*. Available at: <http://CRAN.R-project.org/package=vegan>
- Pagani, I., Lapidus, A., Nolan, M., Lucas, S., Hammon, N., Deshpande, S., et al. (2011). Complete genome sequence of *Desulfobulbus propionicus* type strain (1pr3). *Stand. Genomic Sci.* 4, 100–110. doi: 10.4056/signs.1613929
- Patel, P. V., Gianoulis, T. A., Bjornson, R. D., Yip, K. Y., Engelman, D. M., and Gerstein, M. B. (2010). Analysis of membrane proteins in metagenomics: networks of correlated environmental features and protein families. *Genome Res.* 20, 960–971. doi: 10.1101/gr.102814.109
- Pauwels, H., Ayraud-Vergnaud, V., Aquilina, L., and Molénat, J. (2010). The fate of nitrogen and sulfur in hard-rock aquifers as shown by sulfate-isotope tracing. *Appl. Geochem.* 25, 105–115. doi: 10.1016/j.apgeochem.2009.11.001
- Pedersen, K. (1997). Microbial life in deep granitic rock. *FEMS Microbiol. Rev.* 20, 399–414. doi: 10.1111/j.1574-6976.1997.tb00325.x
- Quaiser, A., Bodi, X., Dufresne, A., Naquin, D., Francez, A.-J., Dheilly, A., et al. (2014). Unraveling the stratification of an iron-oxidizing microbial mat by metatranscriptomics. *PLoS ONE* 9:e102561. doi: 10.1371/journal.pone.0102561
- Quaiser, A., Ochsenreiter, T., Klenk, H.-P., Kletzin, A., Treusch, A. H., Meurer, G., et al. (2002). First insight into the genome of an uncultivated crenarchaeote from soil. *Environ. Microbiol.* 4, 603–611. doi: 10.1046/j.1462-2920.2002.00345.x
- Quast, C., Priebe, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., et al. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 41, D590–D596. doi: 10.1093/nar/gks1219

- Reis, M. P., Avila, M. P., Costa, P. S., Barbosa, F. A. R., Laanbroek, H. J., Chartone-Souza, E., et al. (2014). The influence of human settlement on the distribution and diversity of iron-oxidizing bacteria belonging to the Gallionellaceae in tropical streams. *Front. Microbiol.* 5:630. doi: 10.3389/fmicb.2014.00630
- Rivett, M. O., Buss, S. R., Morgan, P., Smith, J. W. N., and Bemment, C. D. (2008). Nitrate attenuation in groundwater: a review of biogeochemical controlling processes. *Water Res.* 42, 4215–4232. doi: 10.1016/j.watres.2008.07.020
- Roden, E. E., McBeth, J. M., Blöthe, M., Percak-Dennett, E. M., Fleming, E. J., Holyoke, R. R., et al. (2012). The microbial ferrous wheel in a neutral pH groundwater seep. *Front. Microbiol.* 3:172. doi: 10.3389/fmicb.2012.00172
- Roques, C., Aquilina, L., Bour, O., Maréchal, J.-C., Dewandel, B., Pauwels, H., et al. (2014a). Groundwater sources and geochemical processes in a crystalline fault aquifer. *J. Hydrol.* 519, 3110–3128. doi: 10.1016/j.jhydrol.2014.10.052
- Roques, C., Bour, O., Aquilina, L., Dewandel, B., Leray, S., Schroetter, J., et al. (2014b). Hydrological behavior of a deep sub-vertical fault in crystalline basement and relationships with surrounding reservoirs. *J. Hydrol.* 509, 42–54. doi: 10.1016/j.jhydrol.2013.11.023
- Roudnew, B., Seymour, J. R., Jeffries, T. C., Lavery, T. J., Smith, R. J., and Mitchell, J. G. (2010). Bacterial and virus-like particle abundances in purged and unpurged groundwater depth profiles. *Ground Water Monit. Remediat.* 4, 72–77. doi: 10.1111/j1745
- Rouxel, M., Molenat, J., Ruiz, L., Legout, C., Faucheu, M., and Gascuel-Oudou, C. (2011). Seasonal and spatial variation in groundwater quality along the hillslope of an agricultural research catchment (Western France). *Hydrol. Process.* 25, 831–841. doi: 10.1002/hyp.7862
- Sahl, J. W., Schmidt, R., Swanner, E. D., Mandernack, K. W., Templeton, A. S., Kieft, T. L., et al. (2008). Subsurface microbial diversity in deep-granitic-fracture water in Colorado. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 143–152. doi: 10.1128/AEM.01133-07
- Sanford, R. A., Cole, J. R., and Tiedje, J. M. (2002). Characterization and description of *Anaeromyxobacter dehalogenans* gen. nov., sp. nov., an aryl-halo-respiring facultative anaerobic myxobacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 893–900. doi: 10.1128/AEM.68.2.893
- Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., Hollister, E. B., et al. (2009). Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 7537–7541. doi: 10.1128/AEM.01541-09
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., et al. (2003). Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* 13, 2498–2504. doi: 10.1101/gr.1239303
- Smith, R. J., Jeffries, T. C., Roudnew, B., Fitch, A. J., Seymour, J. R., Delpin, M. W., et al. (2012). Metagenomic comparison of microbial communities inhabiting confined and unconfined aquifer ecosystems. *Environ. Microbiol.* 14, 240–253. doi: 10.1111/j.1462-2920.2011.02614.x
- Smith, R. L., Ceazan, M. L., and Brooks, M. H. (1994). Autotrophic, hydrogen-oxidizing, denitrifying bacteria in groundwater, potential agents for bioremediation of nitrate contamination. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 1949–1955.
- Starr, R. C., and Gillham, R. W. (1993). Denitrification and organic carbon availability in two aquifers. *Ground Water* 31, 934–947. doi: 10.1111/j.1745-6584.1993.tb00867.x
- Tarits, C., Aquilina, L., Ayraud, V., Pauwels, H., Davy, P., Touchard, F., et al. (2006). Oxido-reduction sequence related to flux variations of groundwater from a fractured basement aquifer (Ploemeur area, France). *Appl. Geochemistry* 21, 29–47. doi: 10.1016/j.apgeochem.2005.09.004
- Větrovský, T., and Baldrian, P. (2013). The variability of the 16S rRNA gene in bacterial genomes and its consequences for bacterial community analyses. *PLoS ONE* 8:e57923. doi: 10.1371/journal.pone.0057923
- Weymann, D., Geistlinger, H., Well, R., von der Heide, C., and Flessa, H. (2010). Kinetics of N₂O production and reduction in a nitrate-contaminated aquifer inferred from laboratory incubation experiments. *Biogeosciences* 7, 1953–1972. doi: 10.5194/bg-7-1953-2010
- Wrighton, K. C., Thomas, B. C., Sharon, I., Miller, C. S., Castelle, C. J., VerBerkmoes, N. C., et al. (2012). Fermentation, hydrogen, and sulfur metabolism in multiple uncultivated bacterial phyla. *Science* 337, 1661–1665. doi: 10.1126/science.1224041
- Wyns, R., Baltassat, J.-M., Lachassagne, P., Legchenko, A., Vairon, J., and Mathieu, F. (2004). Application of proton magnetic resonance soundings to groundwater reserve mapping in weathered basement rocks (Brittany, France). *Bull. Soc. Géol. France* 175, 21–34. doi: 10.2113/175.1.21
- Yagi, J. M., Neuhauser, E. F., Ripp, J. A., Mauro, D. M., and Madsen, E. L. (2010). Subsurface ecosystem resilience: long-term attenuation of subsurface contaminants supports a dynamic microbial community. *ISME J.* 4, 131–143. doi: 10.1038/ismej.2009.101
- Zhou, Y., Kellermann, C., and Griebler, C. (2012). Spatio-temporal patterns of microbial communities in a hydrologically dynamic pristine aquifer. *FEMS Microbiol. Ecol.* 81, 230–242. doi: 10.1111/j.1574-6941.2012.01371.x

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2015 Ben Maamar, Aquilina, Quaiser, Pauwels, Michon-Coudouel, Vergnaud-Ayraud, Labasque, Roques, Abbott and Dufresne. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

2. Material and methods of the complementary results

2.1. Sampling and chemical analyses of groundwater samples for the metagenomic approach

Three hard-rocks aquifers in Brittany (Western France) were investigated near the cities of Ploemeur (N47.735°, W-3.427°), Betton (N48.182°, W-1.643°) and Saint-Brice-En-Coglès (N48.411°, W-1.365°). Groundwater samples were collected from mid-June 2013 to the end of September 2013. All wells were analyzed for chemistry and microbial diversity. Sampling was done using a GrundfosTM MP1 pump, after purging the tubing and waiting for stabilization of conductivity, pH, redox potential, temperature and oxygen measurements (typically occurring within 30 minutes). Temperature, conductivity, and oxygen were measured with a WTW315i CondOx probe, pH with a Combined SenTix 50 electrode, and redox potential with a Pt Ag/AgCl electrode (Mettler Pt 4805).

For chemical analyses, approximately 50 ml of groundwater was filtered at 0.22µm into polytetrafluoroethylene (PTFE) acid-rinsed bottles. Cations were measured with an ICP-MS HP 4500, anions were analyzed by ion chromatography (Dionex DX-100), and carbon was analyzed with a Shimadzu TOC 5050A Analyzer at the Chemistry facility of the Observatoire des Sciences de l'Univers de Rennes (OSUR, University of Rennes 1 – CNRS).

2.2. Total DNA extraction and Illumina library preparation for the metagenomic approach

For each groundwater well, triplicate 5 liter samples were filtered onto 0.22µm polyvinylidene fluoride filters (Durapore). Total DNA extractions were performed with a protocol optimized to improve the removal of organic contaminants (Quaiser et al., 2014). DNA extracts obtained were purified before proceeding to its enzymatic fragmentation and realizing Illumina libraries using the NEBNext Ultra DNA Library Prep Kit for Illumina, according to manufacturer's instructions.

2.3. Community sequence filtering and analyses of the metagenomes

Sequence quality filtering

To understand the microbial population structure of groundwater bodies, 30 groundwater samples in three geographically distinct aquifers (Betton, Saint-Brice-En-Coglès and Ploemeur aquifers, Brittany, France) were analyzed using a coupled geochemical and metagenomic approach (see chapter 2 for details on metagenome sequencing and analysis). Metagenomics reads were compared with the DIAMOND-blastx algorithm against a database

CHAPITRE 3

of translated sequences of all genes encoded in 8,234 complete and draft genomes of bacteria, archaea and viruses downloaded from the NCBI ftp site. Based on these comparisons, reads were taxonomically assigned with Megan 5 using default parameters. From these data, the relative abundance of each taxon were then computed as the number of reads assigned to each taxon reported to the total sequence number of each groundwater sample.

Dataset content

Over all the three investigated aquifers, 14 695 238 sequences were collected from which 13 818 223 were assigned at least to a kingdom, or lower taxonomic level. All collected groundwater during discharge period (from mid-June to the end of September 2013) 30 bacterial phyla (13 695 329 sequences) and 3 archaeal phyla (122 894 sequences) were detected with a metagenomic approach on total DNA. Groundwater samples PZ3, F9, F34 correspond to recent groundwater that is younger than 20 years old; MF1 and F38 correspond to middle-aged groundwater that is around 25 years old; and PZ6, FC4, F3, MFT80 and MFT20 represent old groundwater with groundwater residence time superior to 40 years.

PCA analysis of hydrochemical parameters over five years

We used a principal component analysis (PCA) to assess the variability of hydrochemical parameters over a time period of five years of all groundwater samples. Hydrochemical measurements carried out prior 2013 were performed using the same protocol as described in the Material and Methods section of the first paper. The hydrochemical data are available at the website of the H+ network of hydrogeological research (hplus.ore.fr). PCA was performed using hydrogeochemical parameters with correlation coefficients calculated using R-package stats (Becker et al., 1988), and lower than 0.8.

NMDS analysis and environmental fitting

The community structures were compared with non-metric multidimensional scaling (NMDS) after calculating a Bray-Curtis dissimilarity matrix with R-package vegan (Oksanen et al., 2014). The fitting of environmental variables on the ordination plot was performed with vegan and the significance was obtained with a 10000 permutations test. Parameters tested were NO₃, SO₄, dissolved O₂, dissolved N₂, dissolved N₂O, Mn, Fe, Br, Mg, K, Ca, Cu, Zn, Pb, CH₄, Cd, Cl, Na, Si, Co, Ni, U, Conductivity, Cr, Al, V, Sr, Ba, Ca/Na, Br, Cl, total organic carbon (TOC), and inorganic carbon (IC) concentrations, temperature (T), redox potential (Eh) and pH.

Ternaryplots of dissimilarities in taxa between sites or samples

Ternaryplots were realized to represent most contributing taxa to dissimilarity between samples from different site or within the same site. They were based on the relative abundance of each taxon from each site or each sample. Each taxon is depicted as a circle, circle size corresponds to its relative abundance and circle position reflects taxon contribution

CHAPITRE 3

to each site or sample. Grid lines within ternary plot indicate increments of 20% of contribution to each site or sample. Ternaryplots were realized using the R-package *vcd* (Friendly et al., 2000).

Correlation network

To address more directly how environmental parameters and individual taxon were related, we performed a regularized Canonical Correlation Analysis (rCCA) between relative frequencies of taxa and environmental parameters with the R-package *FRCC* (Cruz-Cano and Lee, 2014). We visualized results of the rCCA analysis using the approach developed by Patel et al. (Patel et al., 2010).

Networks were built so that nodes represent either taxa or environmental parameters, and edges correspond to the dot product between the structural correlations of the first and second dimensions of the rCCA (Patel et al., 2010). Only edges with absolute value weights above 0.5 were used to build the network.

RDA analysis and variation partitioning

To quantify how much the variation of each hydrochemical parameter can explain the variation of each detected taxon, a Redundancy Analysis was performed using the R-package *vegan* (Oksanen et al. 2014). To precise how much concentration of NO₃, O₂, Fe, SO₄, Inorganic carbon and Eh are major controls on detected taxa, a variation partitioning was realized based on each of these parameters and detected taxon variation, using the R-package *vegan*.

3. Complementary Results and Discussion

Following results were obtained one year apart after the 16S rRNA approach, from a metagenomic approach and a different technology (MySeq Technology - Illumina®). This approach was performed on the same groundwater samples as described in Ben Maamar et al., 2015, completed with other samples. Despite the two different taken approaches and technologies, the observed diversity results were very similar. The main results obtained are here summarized. Please refer to the material and methods section (chapter 2) for a summary of the different collected samples, the different names used to describe them, and the analyses they underwent.

3.1. Taxonomic composition in Bacteria from metagenomes

Our datasets demonstrate bacterial phyla belonging to *Actinobacteria*, *Aquificae*, *Armatimonadetes*, *Bacteroidetes*, *Chlorobi*, *Ignavibacteriae*, *Chlamydiae*, *Verrucomicrobia*, *Chloroflexi*, *Cyanobacteria*, *Deinococcus-Thermus*, *Acidobacteria*, *Firmicutes*, *Gemmatimonadetes*, *Nitrospinae*, *Nitrospirae*, *Planctomycetes*, *Proteobacteria*, *Spirochaetes*, *Aminicenantes*, *Candidatus Saccharibacteria*, *Microgenomates*, *Parcubacteria*, Candidate

CHAPITRE 3

Division NC10 (Figure 3.1). The *Proteobacteria* group is dominant in proportion with 30 to 83% of the bacterial sequences. Other abundant phyla are *Nitrospirae*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Planctomycetes*, *Firmicutes*, *Verrucomicrobia*, *Chloroflexi*, *Cyanobacteria* and *Ignavibacteriae*.

Within the *Proteobacteria* phylum, *Betaproteobacteria* largely predominate (from 9 to 66% of bacterial sequences according to the sample) in all samples, but *Alphaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria* and *Gammaproteobacteria* are also well represented (respectively 3 to 30%; 1 to 10% and 4 to 16% of total sequences within Bacteria). The *Deltaproteobacteria* class is more represented in old groundwater samples whereas the *Gammaproteobacteria* and *Alphaproteobacteria* classes are more present in recent groundwater samples. *Epsilonproteobacteria* and *Zetaproteobacteria* are also present but remain minor (respectively 0 to 0.3%; and 0 to 0.2% of total bacterial sequences). The MF1, PZ6 and FC4 samples show a higher proportion of *Nitrospirae*, whereas MF1 and F9 demonstrate a higher proportion of *Acidobacteria*.

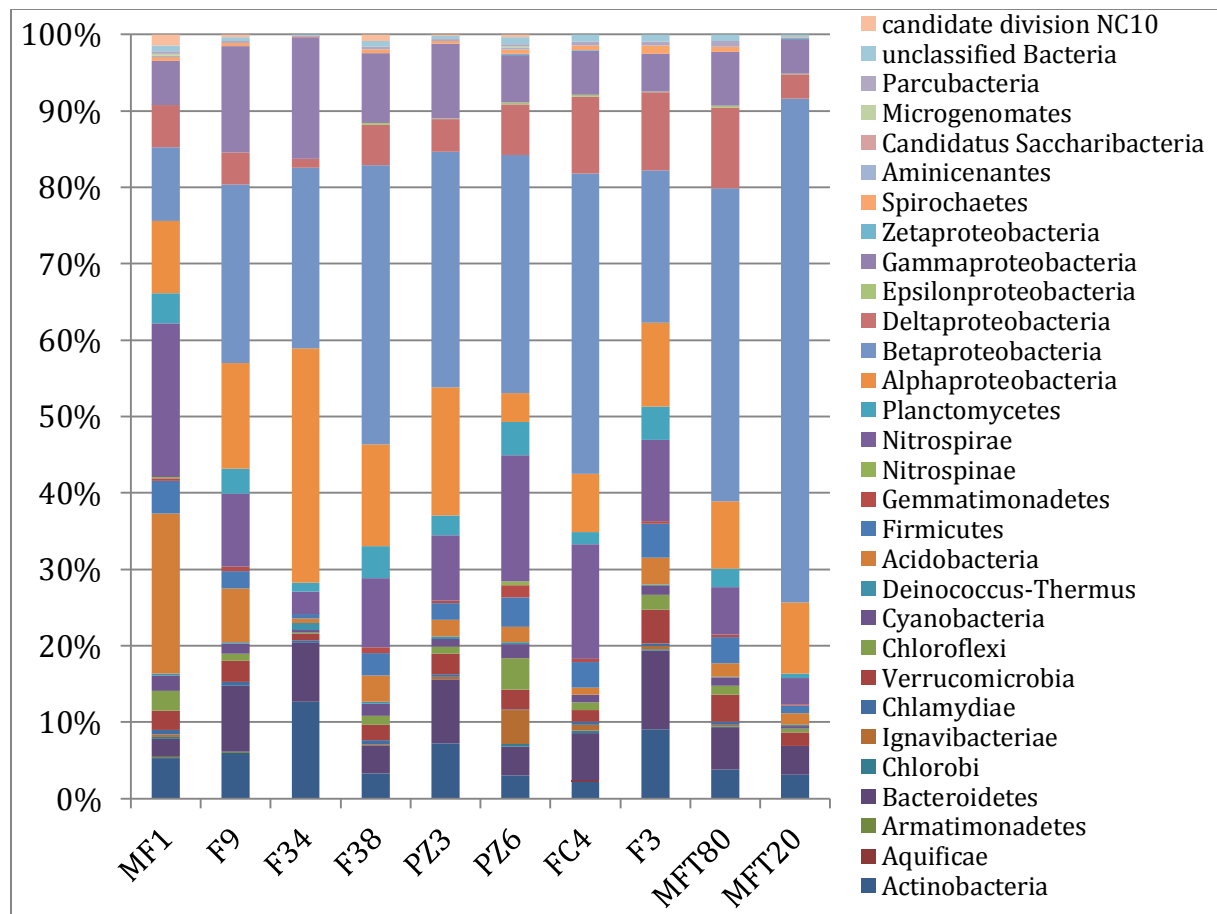


Figure 3.8 Proportions of bacterial phyla reads in investigated samples.

Within *Betaproteobacteria* half of sequences are unknown *Betaproteobacteria*, but a strong difference can be observed between old and recent groundwater samples (Figure 3.2). The families of *Comamonadaceae*, *Oxalobacteraceae* and *Burkholderiaceae* are predominant in recent groundwater samples, whereas *Gallionellaceae* and to a less extent *Comamonadaceae* are predominant in old groundwater samples. *Rhodocyclaceae* are also slightly more abundant

CHAPITRE 3

in old groundwater samples than in recent groundwater samples. Overall, the composition of this total DNA-based dataset is very similar to the one obtained one year apart from 16S rRNA analysis on the same but smaller set of groundwater samples (see first article), and shows differences related to the residence time.

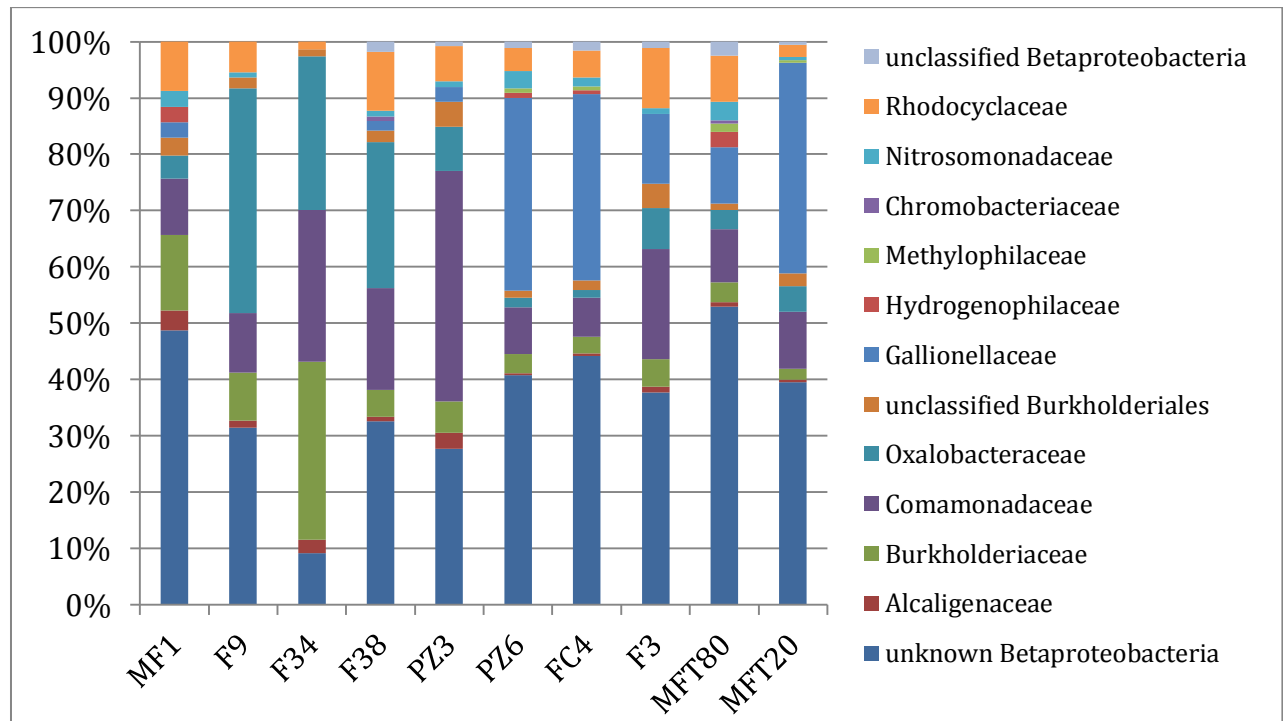


Figure 3.9 Proportions of reads assigned to a Betaproteobacteria family in investigated samples.

3.2. Variability in microbial community structure and hydrochemistry between sites (metagenomes)

Dissimilarity in community structure between the different groundwater samples was analyzed with a Nonmetric-Multi-Dimensional-Scaling (NMDS) (Figure 3.4). This reveals consistent results with the groundwater samples segregation according to residence time already observed in the PCA analysis (Figure 3.3). Based on their microbial community structure, samples gather into two main groups without any distinction of site: a group corresponds to recent groundwater samples with a middle-aged sample (F34, PZ3, F9 and F38); a second group gathers iron-rich old groundwater samples and a middle-aged sample (F3, PZ6, MFT80, FC4, MFT20 and MF1). Within the recent groundwater group, F34 community structure is substantially different from other recent groundwater samples, whereas within the old groundwater samples, MFT20 community structure strongly distinguishes from the others.

In order to determine to which environmental conditions this community structure difference might respond, a redundancy analysis (RDA) was performed between all detected taxa, and physico-chemical parameters included in the NMDS that potentially impact microbial communities (as electron donor/acceptor and carbon source) (Figure 3.5). In total, 9 chemical parameters were tested and could explain 90% (adjusted- R^2) of the variation in taxa

CHAPITRE 3

composition and abundance in all samples. The Figure 3.5 represents 55.2% of the total variance of microbial community composition. In this figure, nine chemical parameters explain the variation in taxa composition and abundance of the different samples: NO_3 and O_2 concentration, redox potential (Eh), characterize F34, PZ3, F9 and F38 microbial community; whereas SO_4 , Inorganic Carbon, Total Organic Carbon, dissolved N_2 , Fe concentrations and pH characterize PZ6, MFT80, FC4 and MFT20 microbial community. Concentration of SO_4 appears related to MF1 microbial community. Among them, redox potential (Eh), SO_4 concentration, NO_3 and O_2 (covariant, $r^2 = 0.94$), Inorganic carbon (IC) and Fe concentrations, explain 69% of the total variance (see Figure 3.10 in Supplementary Material).

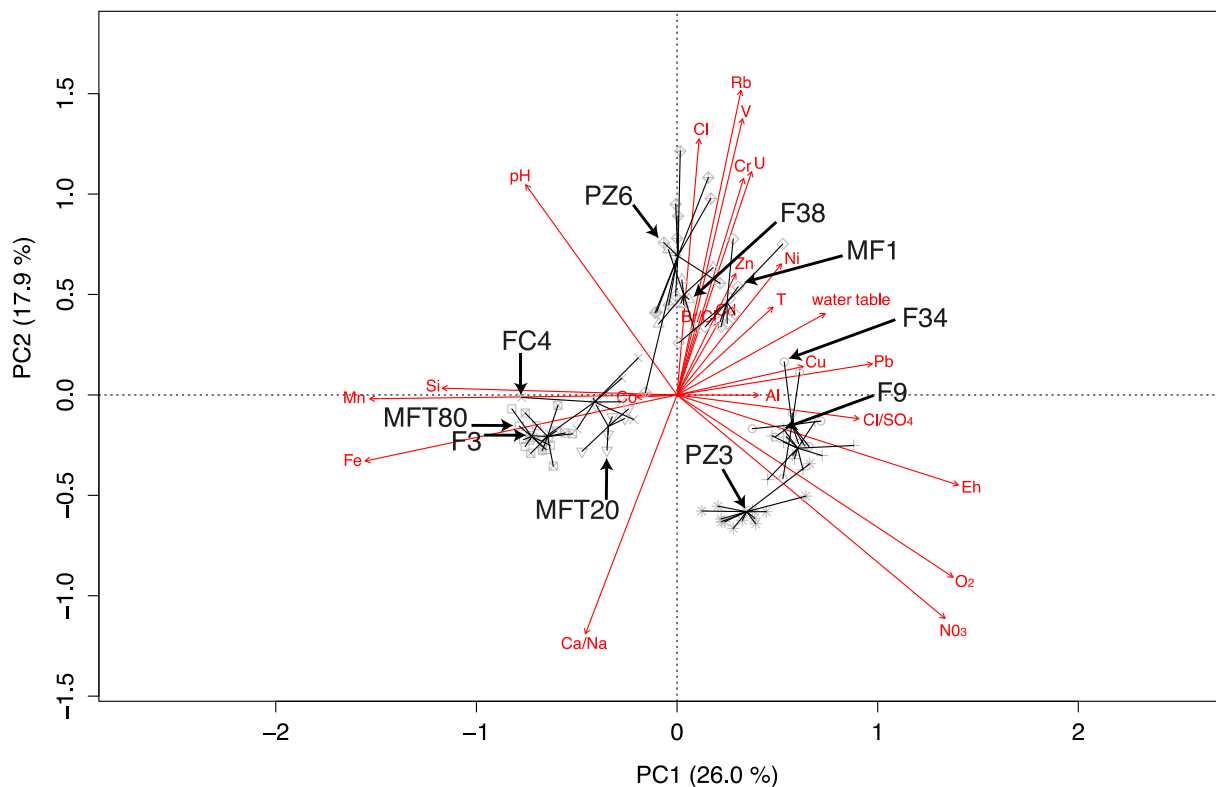


Figure 3.10 Principal Component Analysis (PCA) plot of hydrochemical data measured in ten different groundwater samples from three hard-rock aquifers during 2 to 5 years according to the site. The first and second principal components (PC1 and PC2) account for 26% and 18% of variance respectively. The plot includes groundwater samples from all wells: FC4, F3, MFT80, MFT20, PZ3, PZ6, F9, MF1, F34 and F38. Arrows indicate groundwater samples collected for microbiological investigations.

CHAPITRE 3

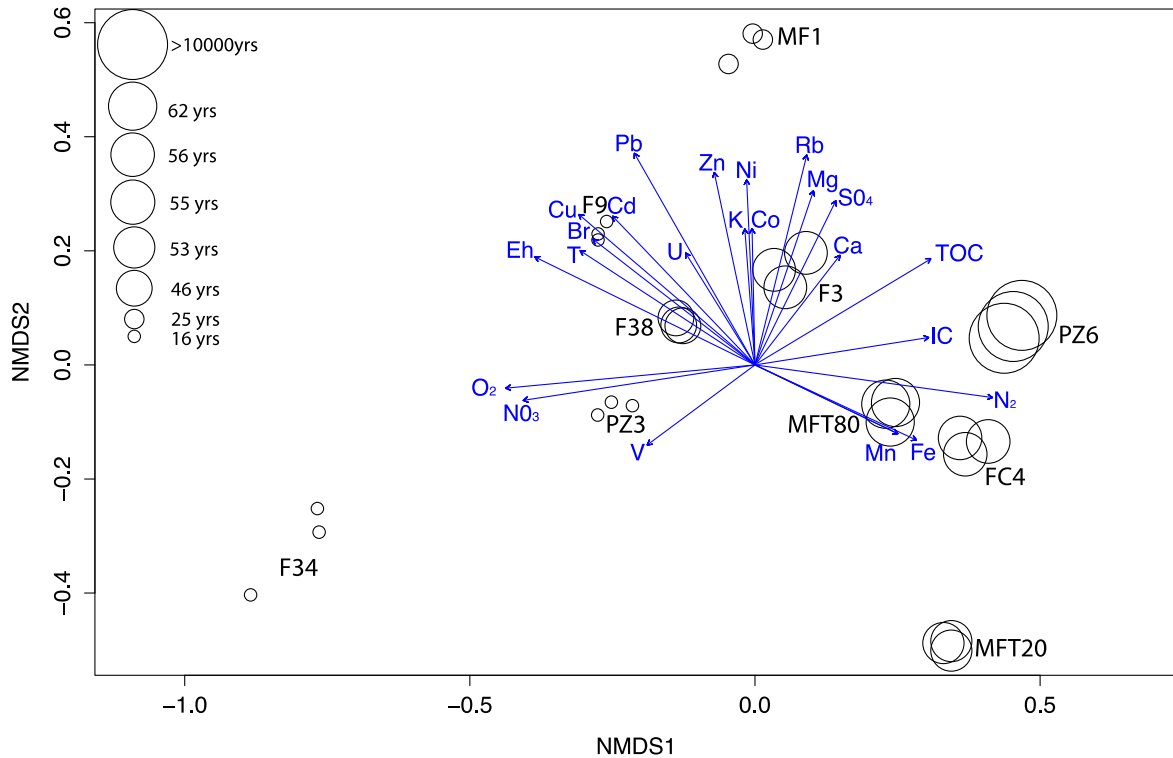


Figure 3.4 Representation of the Non-metric-Multidimensional-Scaling analysis (NMDS) plot of Bray-Curtis dissimilarities between groundwater communities with a vector fitting of hydrogeochemical variables to community ordination. The vector fitting shows positive correlations between microbial community structure and geochemical parameters in all investigated groundwater samples. Arrows represent the gradient of a geochemical parameter and its direction, the correlation with- a sample microbial community structure with a *p*-value inferior to 0.05. Each circle corresponds to one sampling replicate of a groundwater and its size symbolizes the groundwater residence time, as shown in the figure legend. Abbreviations: T, Temperature; O₂d, dissolved oxygen concentration; IC, Inorganic carbon concentration; N₂, dissolved dinitrogen concentration in groundwater; TOC, Total organic carbon concentration.

CHAPITRE 3

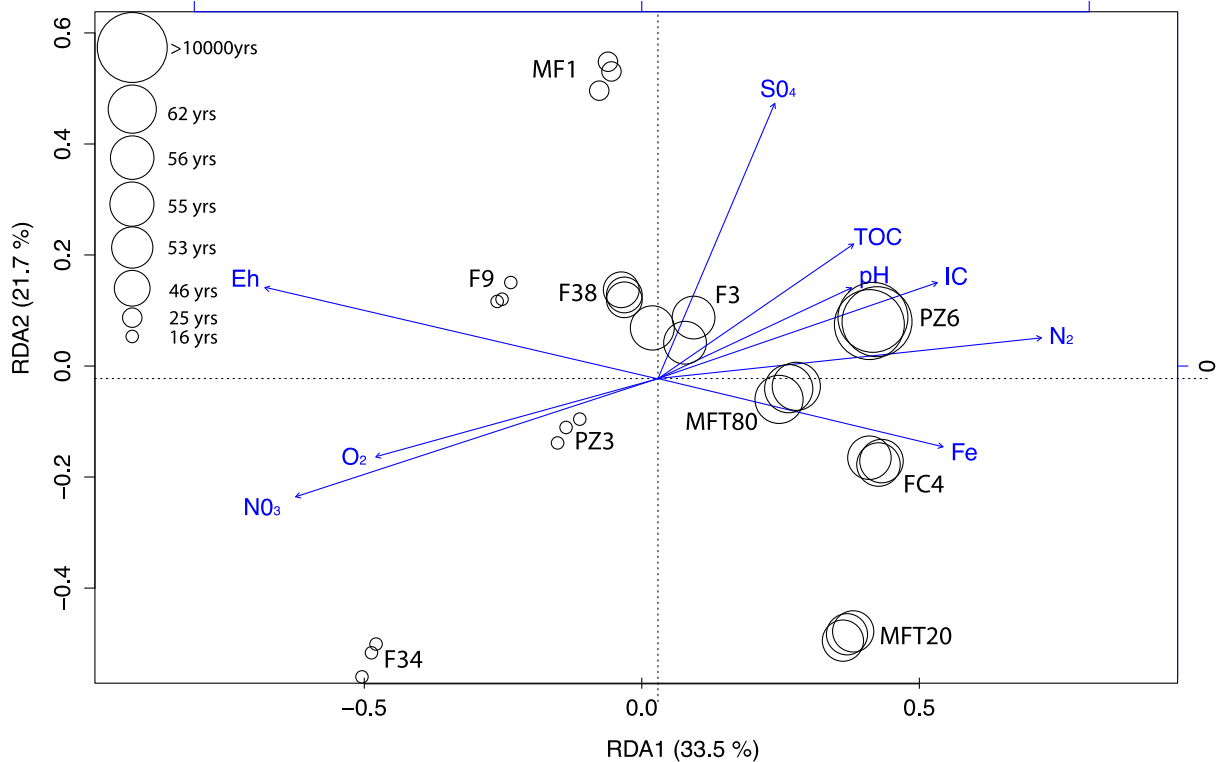


Figure 3.5 Redundancy Analysis (RDA) plot (scaling 2) of groundwater microbial communities (response variables, in circles) according to concentrations of total Fe, inorganic carbon (IC), Total organic carbon, (TOC), SO₄, O₂, NO₃, dissolved N₂ in groundwater, and Eh and pH (explaining variables, as arrows). The first axis (RDA1) of the RDA represents 33.5% of the total variance of all samples microbial communities, whereas the second axis (RDA2) represents 21.7%. Angles between taxa and geochemical parameters, and also between taxa or between geochemical parameters reflect their correlations. Projecting a groundwater sample at right angle on a taxa or a geochemical parameter approximate the value of the groundwater sample along this parameter. Each circle corresponds to one sampling replicate of a groundwater and its size symbolizes the groundwater residence time, as shown in the figure legend.

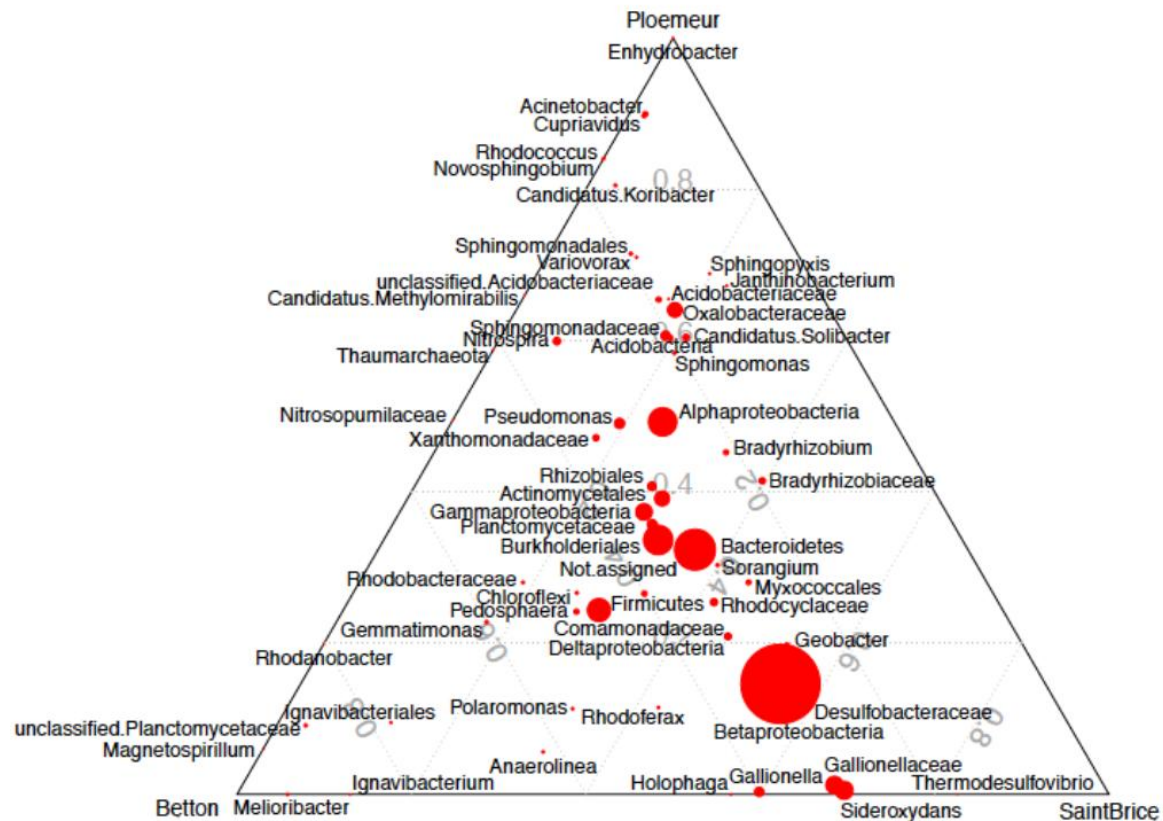
3.3. Taxa composition differences between sites (metagenomes)

To delineate taxa that contribute to dissimilarities between the three investigated aquifers, a SIMPER analysis was realized on pooled samples collected from each site. The results of this analysis are represented in ternary plots presenting all taxa contributing at least to 0.5% of the dissimilarity observed between the investigated sites communities. Each circle represents a taxon, its size the relative abundance of the taxon within the whole dataset, its position the taxon contribution to the different site. Each line of the grid inside a ternary plot indicates an increase of 20% of contribution.

Comparing taxa composition of the different sites allows determining which taxa are common to all sites and those more specific to each site. Betton and Saint-Brice sites are characterized by the predominant iron-oxidizers *Gallionellaceae*, *Gallionella* and *Sideroxydans*, which is consistent with the prevailing amount of iron and sulfate in these sites. Other taxa such as *Comamonadaceae*, *Deltaproteobacteria*, *Chloroflexi*, *Rhodocyclaceae* and *Firmicutes* are observed majorly in Saint-Brice and Betton but can be found in Ploemeur, and might be involved in the sulfur and the nitrogen cycles. Some taxa are clearly common to all samples and gather *Burkholderiales*, *Gammaproteobacteria*, *Actinomycetales*, *Rhizobiales* and

CHAPITRE 3

Planctomycetaceae, often associated to nitrogen cycle and soil. The Ploemur site is characterized by generalists like *Pseudomonas*, *Xanthomonadaceae*, *Alphaproteobacteria*; and aerobes regularly encountered in soils such as *Acidobacteria*, *Acidobacteriaceae*, *Candidatus Solibacter* *Sphingomonas*, *Sphingomonadaceae* and *Oxalobacteraceae*. These aerobes might be involved in sulfur and nitrogen cycles as well as in the degradation of



complex organic compounds.

Figure 3.6 Ternary plot of the dissimilarities in taxa abundance between the three investigated aquifers. Each circle represents a taxon, its size the relative abundance of a taxon in the whole dataset, its position the taxon contribution to each site. Each line of the grid in the background represents an increment of 20% of contribution to a given site.

3.4. Taxa distribution within the Saint-Brice site samples (metagenomes)

The Saint-Brice samples correspond to a groundwater coming from the same fracture, flowing from the deep to the surface, showing a chemical gradient from the anoxic deep to the suboxic surface and which was collected at different depths. Differences in taxonomic composition all along the fracture were represented in a ternary plot. As FC4 and MFT80 samples show similar taxa composition they were pooled together.

The MFT20 sample was dominated by iron-oxidizers such as *Gallionella*, *Gallionellaceae*, *Sideroxydans*, and some heterotrophs and potential nitrate reducers such as *Comamonadaceae*, *Oxalobacteraceae* and *Burkholderiales*. Taxa common to all samples include many nitrogen fixing microorganisms as well as potential nitrate reducers or

CHAPITRE 3

ammonium-related taxa such as *Bradyrhizobium*, *Bradyrhizobiaceae*, *Rhizobiales*, *Opitutus*, *Rhodocyclaceae*, *Pseudomonas*, *Sphingobium* among others. On the opposite F3 and FC4-MFT80 samples show a predominance of taxa apparently associated to sulfur oxidation and sulfate reduction such as *Deltaproteobacteria* *Desulfomonile*, *Desulfobulbus*, *Desulfobulbaceae*, *Desulfobacteraceae*, *Planctomycetaceae*, *Candidatus Solibacter*, and *Clostridiales* among others. Altogether, this plot shows a gradient of taxa from surface dominated by iron-oxidizers, to the deep characterized by potential sulfur oxidizers and sulfate reducers, with taxa linked to the nitrogen cycle.

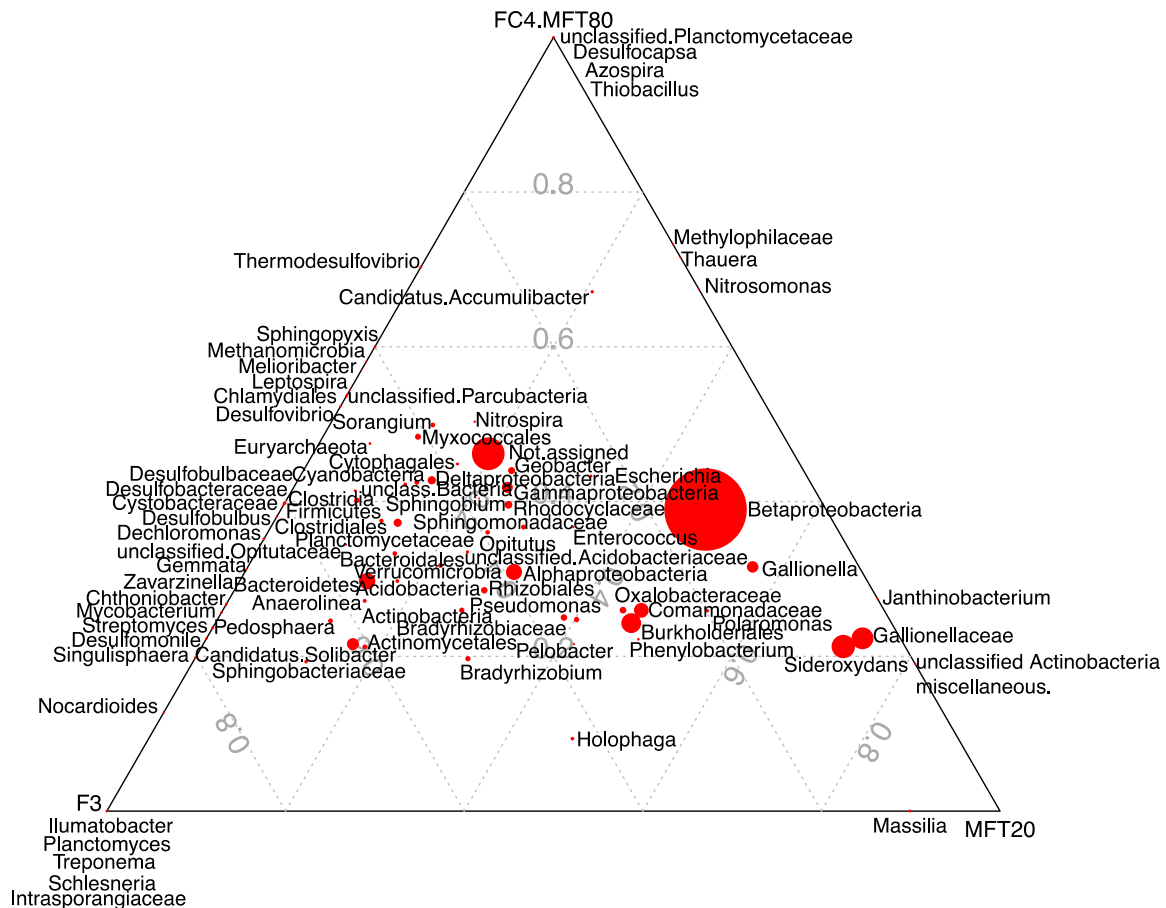


Figure 3.7 Ternary plot of the dissimilarities in taxa abundance between St-Brice-En-Coglès most distant samples in taxa composition. Samples FC4 and MFT80 were pooled together as they show similar taxa composition. Each circle represents a taxon, its size the relative abundance of a taxon in the whole dataset, its position the taxon contribution to each site. Each line of the grid in the background represents an increment of 20% of contribution to a given sample.

3.5. Taxa distribution within the Ploemur site samples (metagenomes)

To determine if a gradient of taxa could be observed among recent groundwater samples in the Ploemur site, taxa composition of the Ploemur samples was compared in a ternary plot, in which F9 and F38 samples similar in taxa composition were pooled (Figure 3.8).

The MF1 sample shows rather specifically *Thiobacillus*, *Desulfobacteraceae*, *Acidobacteriaceae*, *Ignavibacteriales*, *Candidatus Solibacter* and *Candidatus Koribacter* among others. They can be found in soil and may be potential sulfur oxidizers or sulfate

CHAPITRE 3

reducers consistently with the high sulfate concentration and the isotopic data showing dissolution of mineral sulfur in MF1. The F34 sample demonstrates taxa that can degrade complex organic carbon like *Sphingomonadales*, *Sphingomonadaceae*, *Sphingomonas*, *Novosphingobium*, *Variovorax*, *Sphingopyxis*, coherently with the contamination in volatile organic compounds noticed in F34. The F38-F9 samples have in common with F34, the occurrence of aerobic heterotrophs able to reduce nitrate (e.g. *Janthinobacterium*, *Oxalobacteraceae*, *Acinetobacter*, *Burkholderiales*, *Comamonadaceae*, *Bradyrhizobiaceae*); and in common with MF1 potential nitrate reducers or ammonium-related taxa (e.g. *Nitrospira*, *Rhodobacteraceae*, *Rhizobiales*, *Rhodocyclaceae*, *Nitrosopumilaceae*) and sulfate reducers (e.g. *Pedospaera*, *Firmicutes*, *Planctomycetaceae*).

Globally, a gradient of taxa is observed from the F34 sample richer in gaseous organic compounds, nitrate and oxygen, to the more anoxic, nitrate-poor and sulfate-rich MF1 sample.

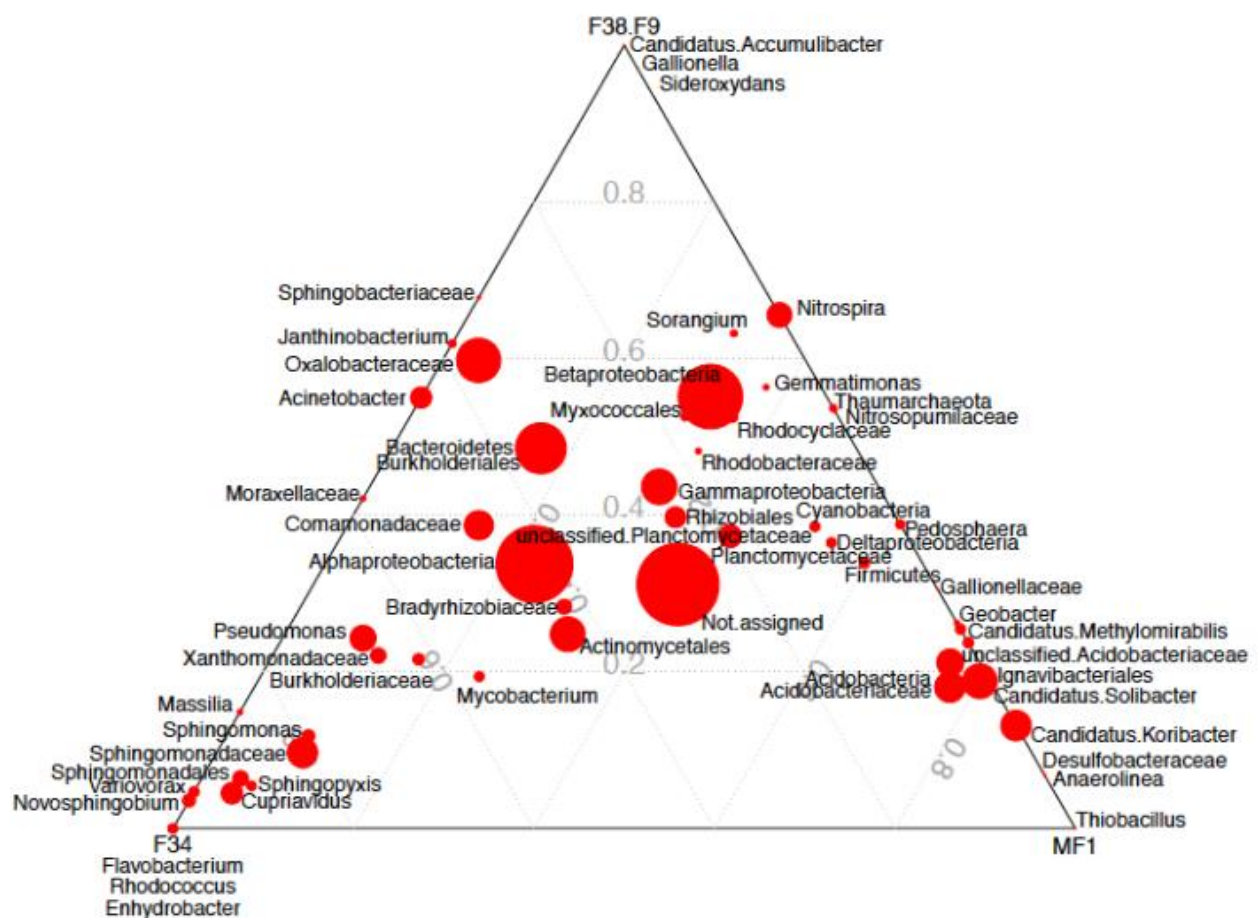


Figure 3.8 Ternary plot of the dissimilarities in taxa abundance between Ploemur most distant samples in taxa composition. Samples F38 and F9 were pooled together as they show similar taxa composition. Each circle represents a taxon, its size the relative abundance of a taxon in the whole dataset, its position the taxon contribution to each site. Each line of the grid in the background represents an increment of 20% of contribution to a given sample.

3.6. Positive correlations between taxa and environmental parameters (metagenomes)

A correlation network was built to plot correlations between taxa and environmental parameters showing a significant effect according to RDA results. The correlation network is organized into three main modules: modules 1 and 2 are linked together while module 3 is independent (Figure 3.9). Module 1 gathers mostly taxa found abundantly in the old groundwater of Saint-Brice-En-Coglès (MFT20, MFT80, F3 and FC4) and correlated to pH, Fe and Mn concentrations. Module 2 corresponds to taxa mainly detected in sulfate-rich PZ6 and MF1 samples and demonstrates correlation with SO₄ and Inorganic Carbon concentrations. Module 3 is constituted of taxa majorly found in the recent groundwater samples PZ3, F9, F34 and F38 and shows correlations with NO₃, O₂ concentrations, Temperature and Eh. Interestingly, the dissolved N₂ concentration is found at the intermediate between taxa correlated to Fe and Mn, and taxa correlated to Inorganic Carbon and SO₄ concentrations, suggesting nitrogen cycle might interact with iron and sulfur cycles.

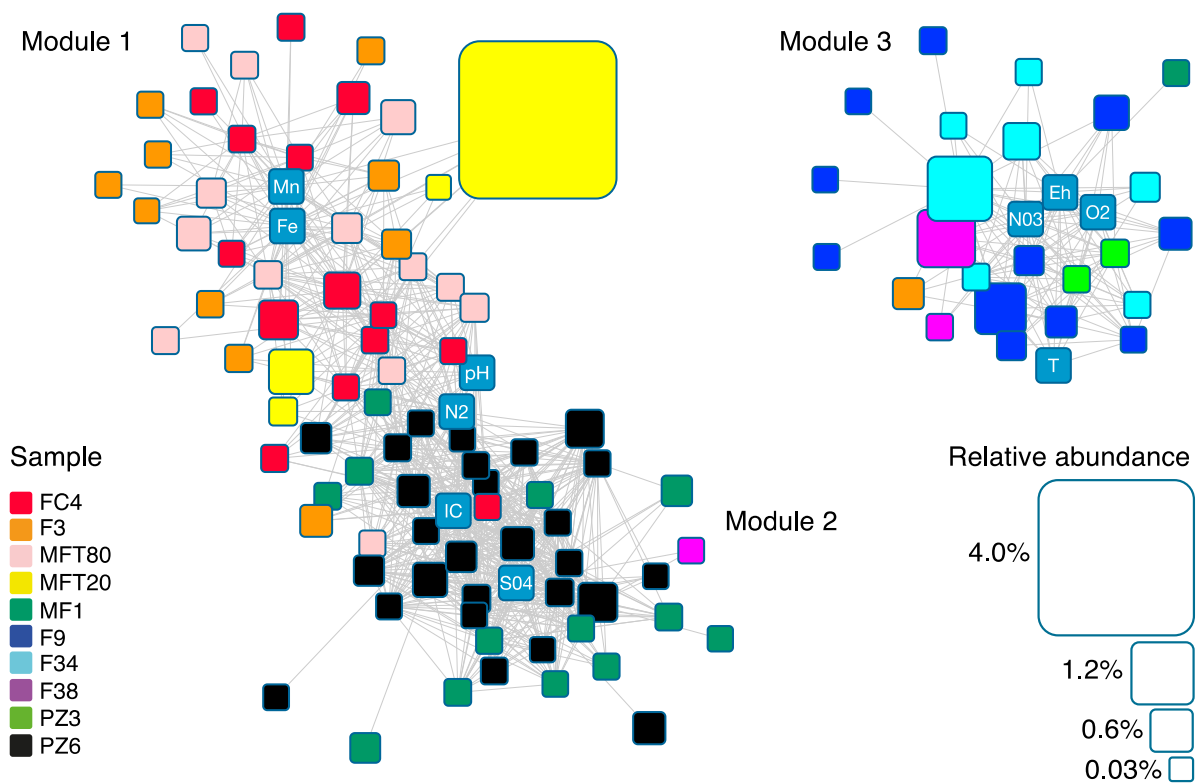


Figure 3.9 Network of structural correlations between and among taxa and hydrogeochemical variables. Edges represent positive and significant correlations. Nodes depicted as black squares represent hydrogeochemical variables. The other nodes are the 116 taxa with relative abundances $\geq 0.001\%$ included in the network. Additional information is mapped onto taxa nodes and in the figure legends to facilitate interpretation of the network: node size is the maximum abundance of the taxon over all samples; node color represents samples where the taxon is the most prevalent.

4. Conclusion

In this chapter, results showed the effects of the hydrological functioning of hard-rock aquifers on microbial communities. The heterogeneous hydrologic circulation highly constrains groundwater residence time, hydrochemistry and nutrients input. Both high-throughput sequencing approaches (16S rRNA amplicons sequencing and metagenomics) used here to study diversity in combination with a large range of environmental factors showed the influence of groundwater circulation on the microbial community composition. The microbial composition observed on a first small set of groundwater samples (six samples) were confirmed on a bigger set of samples (six identical samples and four others) collected one year apart, even using two different high-throughput technologies. Throughout all the groundwater samples collected along hydrological loops in three contrasted hard-rock aquifers, microbial community composition was found related to groundwater residence time and groundwater sample position in the hydrological loop.

In recent groundwater from the recharge zone or from the surficial zone of the aquifer, surficial water input generates a high nitrate concentration and a dominance of potential denitrifiers. Although denitrification process doesn't significantly decrease nitrate concentrations due to low dissolved organic carbon concentrations, nitrate input strongly impacts microbial community composition. In addition some taxa potentially related to organic fertilizers use was noticed.

In old and isolated groundwater, a Fe(II)/Fe(III) and S/SO₄ cycling based ecosystem was observed up to several hundred meters below surface according to the redox potential. In the deeper part of aquifers, microbial communities showed iron-oxidizers bacteria belonging to Gallionellaceae family were predominant. These bacteria seem associated to old groundwater with high Fe(II) concentrations and a low but non-null recent groundwater proportion generating oxygen concentrations below 2.5 mg/L.

These two kinds of microbial community compositions were observed over three sites independently of site geology or aquifer geometry, which demonstrates hydrologic circulation exercise a substantial control over microbial communities.

Supplementary Material

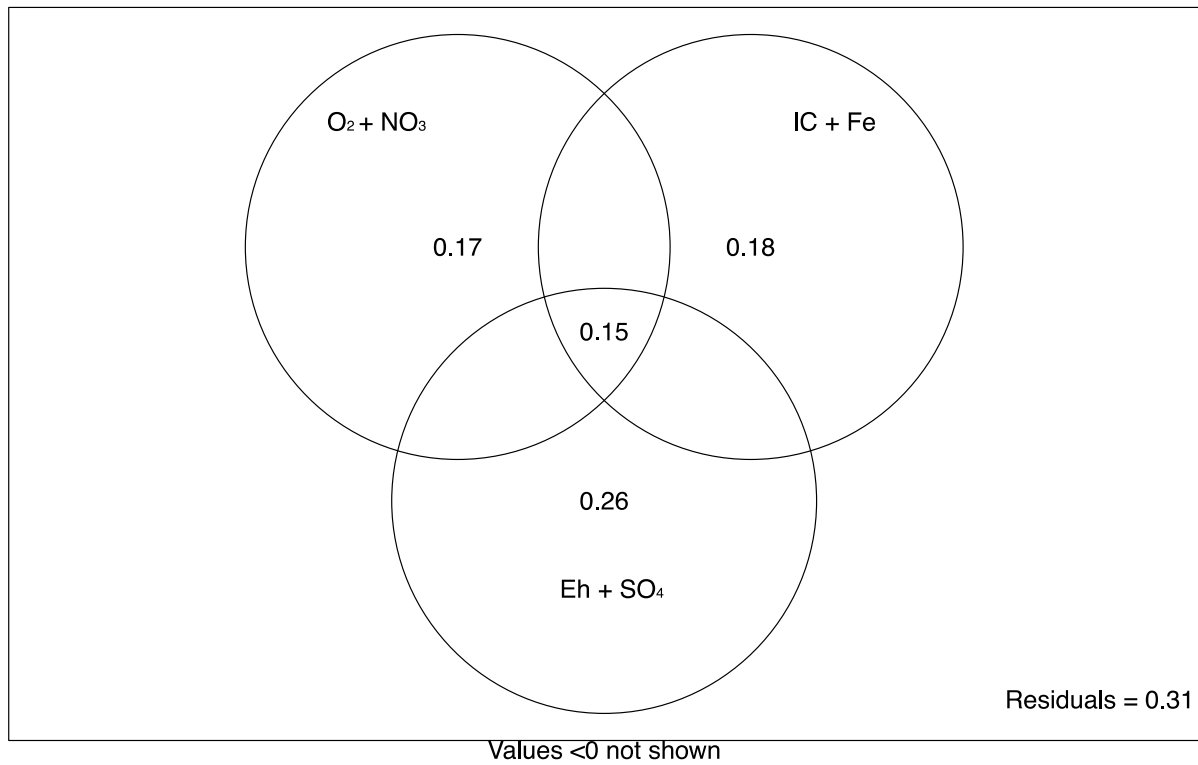


Figure 3.10 Variation partitioning analysis plot. Each circle represents a couple of chemical parameters tested in the analysis. The number in each circle indicates proportion of the variance of the microbial community of all samples that can be attributed to a couple of chemical parameters. Intersection of two or three circles indicates proportion of the total variance that can be attributed to the interaction of two or three couples of chemical variables. A proportion of 31% of the total variance remains not attributed to one of the chemical parameters couple. The chemical couples were determined according to their correlation observed in the RDA plot (Figure 3.5).

TABLE DES MATIERES

CHAPITRE 4 - CONTROLES HYDROGEOCHIMIQUES ET MICROBIENS SUR LES CYCLES REDOX DU FER ET DU SOUFRE DANS L'EAU SOUTERRAINE A TEMPS DE RESIDENCE ELEVE DES AQUIFERES DE SOCLE.

Dans le second chapitre, nous avons analysé la diversité présente dans les aquifères fracturés en comparant les structures de communautés microbiennes prélevées le long d'une boucle hydrogéologique. Le séquençage massif d'amplicons d'ARNr 16S et de métagénomes a montré que les Bétaprotéobactéries de la famille des Gallionellaceae constituent probablement un groupe majeur au sein des communautés microbiennes dans les eaux anciennes riches en fer. Ces bactéries autotrophes présentent la particularité d'avoir un métabolisme très spécialisé puisqu'elles utilisent quasi-exclusivement l'oxydation du fer pour produire de l'ATP et les équivalents réducteurs nécessaires à la conversion du carbone inorganique en matière organique. Ainsi, les résultats présentés dans le chapitre 3 suggèrent que l'oxydation biologique du fer ferreux dissous est le métabolisme énergétique dominant dans les eaux anciennes. De plus, de par leur métabolisme autotrophe, les Gallionellaceae pourraient avoir un rôle fondamental en tant que principaux producteurs primaires dans les eaux anciennes.

L'oxydation biologique du fer ferreux par les Gallionellaceae ne peut se faire qu'au niveau d'interfaces entre des conditions oxiques et anoxiques où ces bactéries peuvent rencontrer à la fois une concentration élevée en Fe(II) réduit et une faible concentration en O₂. Dans le cas des aquifères de socle, nous faisons l'hypothèse que ce type d'interface se forme grâce au mélange d'une eau ancienne réductrice, riche en Fe(II) dissous, avec de l'eau récente apportant de l'oxygène. Ceci suggère la possibilité d'un contrôle étroit de la distribution des Gallionellaceae par les circulations hydrologiques connectant les eaux récentes à faible temps de résidence et les eaux anciennes plus isolées.

Dans les eaux souterraines pauvres en oxygène, les micro-organismes présents peuvent également utiliser les composés soufrés (sulfure, soufre élémentaire, sulfate) comme donneur ou accepteur d'électrons. Plusieurs aquifères étudiés dans cette thèse sont caractérisés par une forte concentration en sulfate dont l'origine pourrait être liée à l'oxydation de minéraux soufrés telle que la pyrite (disulfure de fer). Ce minéral est rencontré couramment dans les roches des aquifères étudiés ici. En plus de produire du sulfate, la dissolution de la pyrite libère du Fe(II) et ce processus pourrait expliquer en partie les fortes concentrations en Fe(II) observés.

Dans ce chapitre, nous avons tout d'abord cherché à caractériser plus précisément la géochimie du fer et du soufre dans les aquifères de socle. La forte réactivité de ces deux éléments fait qu'ils ont une influence majeure sur la chimie des eaux souterraines mais aussi sur la diversité des micro-organismes présents. Nous avons ensuite testé l'hypothèse que le mélange hydrologique influence la distribution des Gallionellaceae (bactéries spécialisées dans l'oxydation microaérobie du fer) et *in fine*, via l'activité des Gallionellaceae, les concentrations en fer et en oxygène. Enfin, nous avons cherché à identifier les micro-

CHAPITRE 4

organismes pouvant être impliqués dans le cycle redox du soufre dans ces aquifères pour mieux contraindre les processus à l'origine des concentrations en sulfate mais aussi en fer.

Dans cette partie, les analyses portent principalement sur les eaux à temps de résidence élevé où les Gallionellaceae présentent leur abondance maximale, c'est à dire celles issues du piézomètre PZ6 à Betton et des quatre piézomètres du site de Saint-Brice-En-Coglès (FC4, F3, MFT80 et MFT20). L'ensemble de ces piézomètres permet d'accéder à un gradient de concentrations en Fe(II) dissous et en oxygène. Il n'y a pas de point équivalent pour le site de Ploemeur, le forage le plus profond F38 présentant une forte proportion d'eau récente.

Du fait de leurs caractéristiques géochimiques particulières, les échantillons d'eau des piézomètres MF1 et F38 à Ploemeur ont été utilisés pour mettre en évidence le lien entre les processus d'oxydo-réduction du soufre et les communautés microbiennes.

Hydrogeochemical and microbial controls of iron and sulfur redox cycles in high residence-time groundwater of hard-rock aquifers.

Abstract

Biogeochemical cycles and ecosystem functioning in aquifer groundwater are poorly understood. Hard-rock aquifers are oligotrophic environments showing multiple gradients (hydrological, geological and hydrochemical) from the surficial to the deeper parts of the aquifer. These gradients are propitious to the development of specific microbial communities that are suspected to respond to the progressive change of the available sources of carbon and electrons (acceptors and donors) along the groundwater flowpaths. Iron and sulfur are often reported as the sole energetic sources in groundwater with high residence time, in which other electron acceptors such as nitrate and oxygen are drastically low.

Here, we try to assess the interplay of hydrogeochemical and biological controls that are exerted on iron and sulfur redox cycles in isolated groundwater of hard-rock aquifers. First of all, we characterized the geochemistry of iron in high residence time groundwater. Then, we tested the hypothesis that the hydrological mixing of old and recent groundwaters influences the distribution of iron-oxidizers and eventually the concentrations of iron and oxygen. Finally, we attempt to identify microorganisms that might ensure the oxidation of sulfides in these aquifers.

Relative abundances of microorganisms were deduced from the sequencing and analyses of metagenomes (see chapter 3). Our results demonstrate that the gradient of abundance of iron-oxidizing bacteria of the Gallionellaceae family is correlated to the mixing rate of recent groundwater with old groundwater. Mixing rate also allowed us computing “consumed” oxygen and iron quantities, i.e. quantities of compound which have been involved in biogeochemical processes. Both parameters are linearly related to the Gallionellaceae abundances. In the deep aquifer conditions, hydrogeological connection to the surface controls the oxygen supply and the Gallionellaceae activity. This activity in turns controls the oxygen concentration and potential Fe(II) conversion to Fe(III) and precipitation.

Chemical and isotopic evidences suggest the existence of a sulfur oxidation process in some groundwater bodies. However we did not find any evidence of this process in the microbial composition. Observations of autotrophic denitrification coupled to sulfide minerals oxidation in these aquifers imply that sulfur oxidizers might still ensure this process despite being in low abundance, acting as keystone species.

1. Introduction

Aquifer ecosystems are characterized by a large range of biogeochemical processes carried out by a broad diversity of microorganisms (Griebler et al., 2009; Handley et al., 2013). Some of these processes mainly characterize surface aquifers where pollutants may influence the ecosystem. In the deeper part of the aquifers, biogeochemical processes are more specific. Among them, iron and sulfide minerals oxidation as well as iron and sulfate reduction appear as major processes. Although potentially supporting key functions in deep aquifers, the nature of the iron and sulfur cycles and their control through hydrogeological, geochemical and biological processes is not well characterized.

Growth yield based on iron oxidation at circumneutral pH is poor with only 90kJ by mole of Fe(II) (Emerson et al., 2010). Nevertheless, a broad diversity of bacteria has been described as capable of lithotrophic iron oxidation at circumneutral pH. Among described microbial iron-oxidizers are the iconic betaproteobacterial genera *Sideroxydans* and *Gallionella* (Gallionellaceae) as well as *Leptothrix* (Comamonadaceae). Diversity analyses based on 16S rRNA amplicon and metagenome sequencing showed a predominance of sequences affiliated to the Gallionellaceae family (Betaproteobacteria) in iron rich, isolated groundwater flowing in the fractured layer in three different hard rock aquifers (Ben Maamar et al., 2015). *Gallionella* and *Sideroxydans* are mainly neutrophilic iron-oxidizers, which are only able to thrive at oxic-anoxic interfaces. In hard-rock aquifers, such interfacial habitat it can be created through the mixing of old, iron-rich groundwater with recent oxygenated groundwater. This suggests the possibility of a tight control of the distribution of Gallionellaceae by hydrological circulations connecting the recent and old groundwater bodies.

In oxygen depleted conditions, microorganisms also use sulfur compounds as donor or electron acceptors. Many aquifers studied in this thesis are characterized by a high concentration of sulfate whose origin may be linked to the oxidation of sulfur-containing minerals such as pyrite (iron disulfide). This mineral is commonly encountered in rock aquifers studied here. In addition to producing sulfate, dissolution of pyrite releases Fe(II) and this process could partly explain the high concentrations of dissolved Fe(II) observed. Microorganisms that oxidize sulfide use NO_3^- or O_2 as chemical oxidants. Biogenic sulfur oxidation processes are more efficient than the abiotic process in oxidizing sulfide as they show more rapid kinetics. Aerobic chemolithotrophic sulfide oxidation rates are at least three orders of magnitude higher than abiotic rates (Luther et al., 2011). Microorganisms commonly involved in a sulfur oxidation process are often members of the Deltaproteobacteria class, such as *Desulfovibrio*, *Desulfomicrobium*, *Desulfurivibrio*, *Desulfobulbus*, *Desulfocapsa* and *Desulfobacula* for instance. Some famous sulfur-oxidizers are also found among Gammaproteobacteria such as *Acidithiobacillus*, *Thioalkalivibrio*, *Allochromatium*, *Thioploca*, and in the Betaproteobacteria such as *Thiobacillus*, *Sulfuricella*, and *Sulfuritalea*.

Iron and sulfur cycles were already reported to co-occur in aquifers, and seem to be intrinsically related (Jakobsen and Postma, 1999). For instance Flynn et al. in 2013 (Flynn et al., 2013) noticed co-occurrence of iron reduction and sulfate reduction in groundwater

CHAPITRE 4

samples of the Mahomet aquifer. Interactions between iron and sulfur cycles remain however poorly documented in aquifer groundwater.

Hard rock aquifers, although representing about 30% of the earth surface are less exploited than porous aquifers. This is particularly true for the deeper part of these aquifers, below the altered layer typically of several tens meters thick, where microbial functioning is thus poorly understood. Within these aquifers, a depth-gradient of oxygen and nitrate is observed in many areas characterized by intensive agricultural activities. High oxygen and nitrate concentrations are observed in the altered layer and more anoxic conditions are observed below. However, both layers are interconnected and the deeper layer might receive nutrients from the surface. Hard rock aquifers thus represent an interesting system to investigate transitional conditions from oxic to anoxic systems where iron and sulfate oxidation may prevail and how these processes might stratify along the depth profile.

Here, we investigate the complex interplay of hydrogeochemical and biological processes controlling the iron and sulfur cycles in isolated groundwater of hard-rock aquifers. Based on a multi-year chemical monitoring of hard-rock aquifers, we characterize the geochemistry of Fe- and S-compounds in old groundwater. We then test the hypothesis that the hydrological mixing of old and recent groundwaters influences the distribution of Gallionellaceae and eventually the concentrations of iron and oxygen. Finally, we attempt to identify microorganisms that may be involved in the redox cycle of sulfur in these aquifers to better constrain the origin of sulfate and iron concentrations.

2. Materials and Methods

2.1. Hydrogeological setting

All groundwater samples were collected between June 18th and September 30th 2013, and were analyzed both for their geochemical and microbial composition.

In this chapter, we focus on “old” groundwater. In the Betton site, this corresponds to the PZ6 sample. In the St-Brice-En-Coglès site, four points (FC4, F3, MFT80 and MFT20) also present “old” groundwater characteristics with slightly variable geochemical parameters. No true “old” groundwater could be characterized in the Ploemeur site as the deepest and older well F38 presented a high proportion of recent water when sampled for metagenomics analysis in 2013. A surface point from the Ploemeur site, MF1, is however used in the analyses devoted to the sulfur cycle as it presents very striking characteristics. Although close to the surface, this well is drilled in altered and poorly permeable materials and thus presents higher residence time than other surface wells in the Ploemeur site (see chapter 2 for further details).

Collected groundwater samples correspond to groundwaters that have been hydrochemically monitored during 2 years at the Saint-Brice-En-Coglès aquifer and for 5 years at the Ploemeur and Betton aquifers.

2.2. Community structure

To understand the microbial population structure of groundwater bodies, 21 groundwater samples in three geographically distinct aquifers (Betton, Saint-Brice-En-Coglès and Ploemeur aquifers, Brittany, France) were analyzed using a coupled geochemical and metagenomic approach (see chapter 2 for details on metagenome sequencing and analysis). Metagenomics reads were compared with the DIAMOND-blastx algorithm against a database of translated sequences of all genes encoded in 8,234 complete and draft genomes of bacteria, archaea and viruses downloaded from the NCBI ftp site. Based on these comparisons, reads were taxonomically assigned with Megan 5 using default parameters. From these data, the relative abundance of *Gallionella*, *Sideroxydans* and Gallionellaceae (which correspond to sequence reads without any further assignation thus excluding *Gallionella* and *Sideroxydans*) were then computed as the number of reads assigned to each taxa reported to the total sequence number of each groundwater sample.

2.3. Hydrogeochemical and isotopic data

Collected groundwater samples correspond to groundwaters that have been hydrochemically monitored during 2 years at the Saint-Brice-En-Coglès aquifer and for 5 years at the Ploemeur and Betton aquifers. Analyses of major and trace elements concentration in groundwater were realized according to the protocol described in Ayraud et al., 2006 (Ayraud et al., 2006) in the Observatoire des Sciences de l’Univers de Rennes (OSUR) geochemical analysis facility (centre commun analytique). Dissolved gases (major and minor gases as well as anthropogenic gases CFCs and SF6) were also analyzed several times during the monitoring

CHAPITRE 4

periods according to the Condote-Eau laboratory protocols (Ayraud et al., 2008). Median concentrations of these monitoring were used in this study.

In order to investigate the relationships between microbial diversity and the sulfur cycle, we differentiated marine and non-marine sulfate and computed their respective contributions to the total SO₄ concentration. Median SO₄ and Cl concentrations were computed from the hydrochemical monitoring of the sites. From the median Cl concentration, a « marine » SO₄ was computed, assuming a Cl to SO₄ ratio identical to modern seawater. A non-marine origin was considered for the SO₄ derived from the total SO₄ minus the marine SO₄, according to:

$$C_{nm} = C_{Tot} - C_{ma} \quad (1)$$

With C_{nm} : non marine SO₄ concentration (mmol/L)
 C_{Tot} : total SO₄ concentration in sample (mmol/L)
 C_{ma} : marine SO₄ concentration (mmol/L)

$$C_{ma} = \frac{Cl C_{sp}}{Cl C_{sw}} * \frac{SO_4 C_{sw}}{Cl C_{sw}} \quad (2)$$

With $Cl C_{sp}$: Cl concentration in sample (mmol/L)
 $SO_4 C_{sw}$: SO₄ concentration in modern seawater (mmol/L)
 $Cl C_{sw}$: Cl concentration in modern seawater (mmol/L)

In most cases, non-marine SO₄ can be considered as derived from sulfide minerals. Such assumption is valid as no evaporites are present in the geological formations of the Armorican basement. However, it may be less valid in the case of deep saline fluids such as those of the Betton site where the SO₄ origin may be complex (Aquilina *et al.*, 2015).

$\delta^{34}S$ -SO₄ measurements were also used. S-SO₄ isotopic ratios have been measured in the BRGM laboratory according to standard methods. Sulfate isotopic compositions were determined using a Delta S mass spectrometer (Thermo Finnigan). The $\delta^{34}S$ of sulfate was measured from SO₂ obtained from CdS precipitated after sulfate reduction. The Canon Diablo Troilite standard was used for S isotope with uncertainty about +/- 0.3‰.

2.4. Mixing ratios

Old groundwater bodies are considered from a hydrogeologic point of view as relatively isolated. They present very high residence time (from several decades to thousand years, see chapter 2). However, they are not fully closed systems as regularly; a small volume of modern groundwater from surface aquifers is introduced into the old groundwater body. As this modern groundwater introduction controls the nutrient fluxes to these old groundwaters, a proxy of the isolation degree has been defined as the mixing degree between surface modern groundwater and deeper old groundwater in each site. The proportion of surficial groundwater present in old groundwater samples was based on the ratio of the mean CFC content of old groundwater sample to the mean CFC content of shallow groundwater in the same site. In each site, a shallow groundwater was taken as a reference for the mean CFC content of the surface end-member: PZ3 groundwater for Betton site (Ayraud et al., 2008); F9 groundwater for Ploemeur site and T4 very shallow (less than 10 m) groundwater in the altered compartment for Saint-Brice-En-Coglès site (not included in the diversity analysis) (Roques et al., 2014). From this ratio, a percentage of mixing with a shallow groundwater or « mixing rate » was deduced in each old groundwater sample. From a hydrogeologic point of view, the

CHAPITRE 4

mixing rate is a proxy of the connectivity of the deep part of the fractured aquifers. It has however to be considered carefully as the hydrogeologic functioning is not always comparable from one site to another.

Following the mixing definition, we consider that samples result from the mixing between a deep and old groundwater without oxygen and a surface oxygen-rich end-member. From this mixing ratio, we define a “mixing” oxygen which represents the oxygen concentration resulting from a pure mixing i.e. a non-reactive concentration. Mixing O_2 is defined as:

$$C_m^i = C_s * MR^i$$

where C_m^i is the O_2 concentration in the old sample i resulting from pure mixing
 C_s is the O_2 concentration in the surface end-member
 MR^i is the mixing rate in sample i

Using the mixing O_2 concentration, we define a “consumed” oxygen concentration as the difference between C_m^i and measured O_2 concentration. This computation represents the O_2 mass that was lost by the system and integrates both biological and chemical consumption.

2.5. Generalized Linear Models (GLM) and general Linear Model (LM)

In order to screen for the geochemical parameters that have the most significant effect on the Gallionellaceae, *Gallionella* and *Sideroxydans* relative abundance, Generalized Linear Model (GLM) were used. General Linear Model allows assessing the effect of a constraining parameter (here a geochemical parameter) on the variance of a given variable (here a taxon relative abundance). The GLM is based on a transformation of a “variable to explain” through a “link function”, which allows linearizing the variable distribution. Several link functions (identity, logarithmic, inverse...) exist for each kind of distribution type (Gaussian, Binomial, Gamma, Poisson...etc). Once the variable to explain is linearized, the constraining parameters are tested simultaneously in order to determine which parameters can explain the most significantly the variable variance. Prior to build a GLM, the distribution of the taxon relative abundance over the entire set of groundwater samples has to be assessed. *Gallionellaceae*, *Gallionella* and *Sideroxydans* read abundances show a Gaussian type distribution. A GLM that shows a Gaussian distribution is equivalent to a simple general Linear Model (LM). The LM has the advantage on the GLM to give in addition an adjusted R^2 -value defining the percentage of the variance of the variable to explain that is effectively explained by all the constraining parameters included in the LM. We thus performed a LM using stats R-package (Chambers, 1992; Wilkinson et al., 1973) on each of taxa abundance on “old” groundwater samples.

2.6. Redundancy analyses (RDA)

A first RDA was used to define the relationships between *Gallionella*, *Sideroxydans* and Gallionellaceae relative abundance (response variables) and environmental parameters (explanatory variables) identified with the GLM analyses. Redundancy analysis is a constrained multivariate canonical ordination analysis that aims to visualize trends between environmental parameters and specific taxa. RDA distance triplots show concomitantly how specific taxa, environmental parameters and groundwater samples ordinate according to each

CHAPITRE 4

other. Taxa proportions were transformed with all the detected taxa in all groundwater samples with a Hellinger transformation prior to the analysis. RDA was realized with the vegan R-package (Van den Wollenberg, 1977; Ter Braak and Looman, 1994). Groundwater samples are depicted as dots in RDA triplots.

A second RDA was carried out with specific taxa to investigate taxa associated to sulfide oxidation and nitrate reduction. Taxa included in the RDA were chosen according to their repertoires of protein-coding genes as described in the KEGG pathway database (Kanehisa et al., 2014; Kanehisa et al., 2000). We considered as potential sulfur oxidizers all taxa presenting the complete set of genes coding for the SOX (Sulfide OXidation) system (Kanehisa et al., 2014; Kanehisa et al., 2000). Similarly taxa were considered as nitrate reducers when possessing the complete set of genes involved in denitrification.

3. Results

3.1. Iron and Sulfur geochemistry

In this study, a focus is made on groundwater samples showing total Fe concentrations superior to 0.5 mg/L. The median total Fe concentrations in the Betton (5 years monitoring) and Saint-Brice-En-Coglès (2 years monitoring) sites are presented in Table 4.I. The groundwater samples show a large gradient total Fe concentration ranging from 0.88 mg/L in MFT20 to 6.11 mg/L in F3. A punctual assessment of the proportions of Fe(II) and Fe(III) forms of the total Fe concentration realized in September 2015 shows the Fe(II) form is highly dominant in all groundwater samples with proportions of 100% in three samples and 94.2 and 92.7% in samples F3 and PZ6 (data not shown).

| Sample | Site | Value type | O ₂ | Fe | SO ₄ | Eh | pH | Mixing |
|--------|--------------------|--------------------|----------------|------|-----------------|--------|------|--------|
| PZ6 | Betton | median value | 0.30 | 1.13 | 294.85 | -29.00 | 7.33 | 2.30 |
| | | standard deviation | 0.85 | 0.10 | 86.80 | 88.88 | 0.47 | 4.00 |
| MFT20 | St-Brice-en-Coglès | median value | 0.45 | 0.88 | 50.36 | 95.5 | 6.12 | 25.00 |
| | | standard deviation | 0.53 | 1.00 | 8.09 | 32.12 | 0.42 | 20.50 |
| MFT80 | St-Brice-en-Coglès | median value | 0.52 | 5.82 | 26.23 | 17.00 | 6.17 | 9.00 |
| | | standard deviation | 0.50 | 0.46 | 1.91 | 25.33 | 0.30 | 5.20 |
| F3 | St-Brice-en-Coglès | median value | 0.26 | 6.11 | 25.91 | 6.00 | 6.08 | 8.00 |
| | | standard deviation | 0.82 | 0.39 | 0.70 | 39.20 | 0.22 | 4.30 |
| FC4 | St-Brice-en-Coglès | median value | 0.45 | 1.41 | 22.59 | 51.00 | 6.66 | 14.00 |
| | | standard deviation | 0.17 | 1.04 | 0.63 | 87.58 | 0.36 | 10.30 |

Table 4.I Geochemical parameters of the “old groundwater”. Median values of O₂, total Fe, SO₄ are given in mg/L, Eh in mV and mixing rate in %.

Punctual representative concentrations of marine and non-marine forms of SO₄ are presented in Table 4.II. Old groundwaters from the Saint-Brice-En-Coglès site present non-marine SO₄ ranging from 19 to 35 mg/L, higher than surface groundwater except MF1 (5 to 13 mg/L, and 159 mg/L in MF1). The Betton PZ6 sample presents a much higher value (188 mg/L). The MF1 sample representing a shallow groundwater (20m depth) also presents a very high non-marine sulfate concentration (159 mg/L). The hydrochemical monitoring over several years of MF1 shows that SO₄ concentration increased from 70 mg/L in 1996 to 160 mg/L in 2001 and remains high until now (median SO₄ concentration is 165 mg/L, data not shown). As Cl concentration has remained more or less constant during this period, the SO₄ concentration increase is mainly attributed to non-marine SO₄. Concentration of NO₃ in MF1 is stable and very low since 1996 (median NO₃ concentration is 3.7 mg/L, data not shown). As MF1 is a shallow well, low NO₃ and O₂ concentration in MF1 is unexpected (median O₂ concentration of 1 mg/L, data not shown) in comparison to other surface wells located near-by in the same site, showing median NO₃ concentrations of 45 to 50 mg/L and median O₂ concentration of 5 to 7 mg/L (data not shown). These chemical observations show that MF1 has a specific geochemical composition, characterized by a mineral SO₄ source.

CHAPITRE 4

| Groundwater type | Site | Sample | Total SO ₄ | Non-marine SO ₄ | Marine SO ₄ | δ ³⁴ S-SO ₄ | 1/Non-marine SO ₄ | Cl |
|-----------------------------|--------------------|--------------------|-----------------------|----------------------------|------------------------|-----------------------------------|------------------------------|--------|
| Old groundwaters | Betton | PZ6 | 284.12 | 187.86 | 96.26 | 22.3 | 0.005 | 686.89 |
| | St-Brice-En-Coglès | MFT20 | 38.22 | 35.01 | 3.21 | 4.8 | 0.029 | 22.90 |
| | | MFT80 | 25.95 | 22.18 | 3.77 | 4.3 | 0.045 | 26.92 |
| | | F3 | 24.60 | 21.57 | 3.04 | 4.6 | 0.046 | 21.70 |
| | | FC4 | 22.11 | 19.00 | 3.12 | 4.6 | 0.053 | 22.23 |
| Shallow recent groundwaters | Ploemeur | F34 | 14.78 | 7.05 | 7.72 | 10.1 | 0.142 | 55.12 |
| | | F9 | 11.65 | 5.11 | 6.54 | 16.4 | 0.196 | 46.65 |
| | Betton | MF1 | 165.91 | 159.38 | 6.53 | -7.4 | 0.006 | 46.59 |
| | | PZ3 | 20.10 | 13.47 | 6.63 | 11 | 0.074 | 47.33 |
| | | St-Brice-En-Coglès | T5 | 24.41 | 7.89 | 16.41 | 10 | 0.127 |

Table 4.II Punctual representative SO₄ concentrations and δ³⁴S isotopic ratios of the different groundwater samples. Punctual concentrations of SO₄ and Cl are given in mg/L. Isotopic results are from Pauwels et al. (Pauwels et al., 2010) and Roques et al. (Roques et al., 2014).

In order to better identify the origin of SO₄ concentration, the inversed SO₄ concentration is plotted against the δ³⁴S in Figure 4.2. In this figure, various extents of the dissolution of sulfur mineral as well as mixing processes appear as arrows. The domain for low-SO₄ shallow groundwater is also presented in the figure. Within this domain, the SO₄ concentration results from atmospheric deposition and fertilizers and soil transformation (see Pauwels et al., 2010 for further explanations). Part of recent shallow groundwater also shows higher SO₄ concentrations, which might be related to Sulfur dissolution (Pauwels et al., 2010) and are also presented in Figure 4.2. Indeed, sulfur minerals in plutonic or metamorphic rocks have relatively low δ³⁴S ranging from +5 down to -10‰ that influence shallow groundwater isotopic ratios. Low δ³⁴S values tend to indicate Sulfur dissolution.

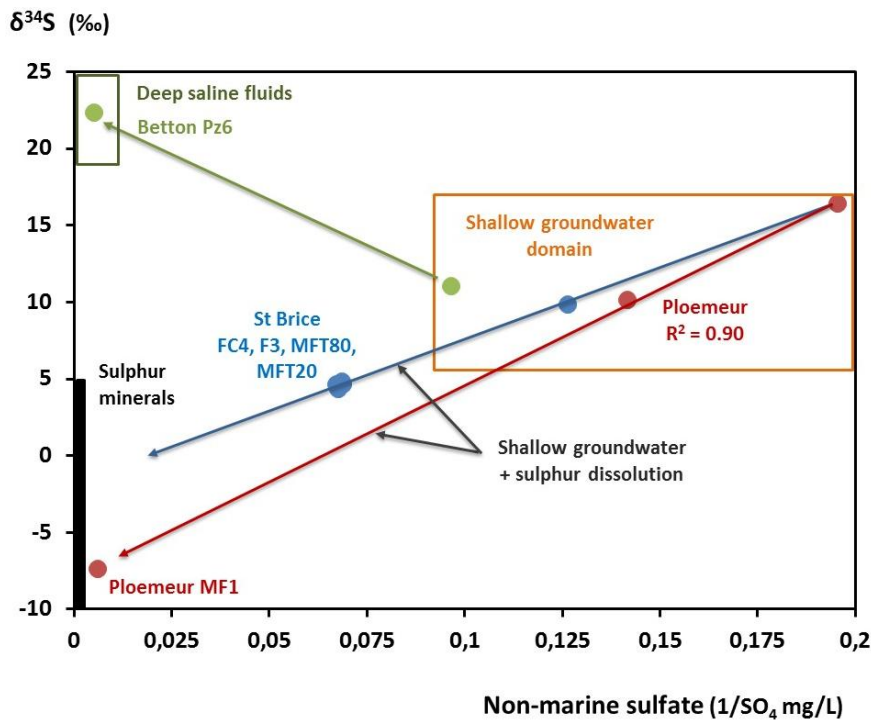


Figure 4.1 δ³⁴S of groundwater as a function of the inverse of non-marine sulfate.

3.2. Relationships between Gallionellaceae, *Gallionella* and *Sideroxydans* and environmental parameters in groundwater

Gallionella, *Sideroxydans* and Gallionellaceae relative abundances in “old” groundwater samples are plotted in Figure 4.2. A gradient of the relative abundance of these three taxa is observed. In F3, *Sideroxydans*, *Gallionella* and Gallionellaceae read proportion is altogether 0.6% of the total sequence read number. It is of 1%, 3.2%, 4.2% and 10.4% respectively in MFT80, PZ6, FC4 and MFT20, which shows the highest value. All these groundwaters exhibit high total Fe concentrations (0.85-6.11 mg/L) and low O₂ concentrations (below 0.5 mg/L) (Table 4.I).

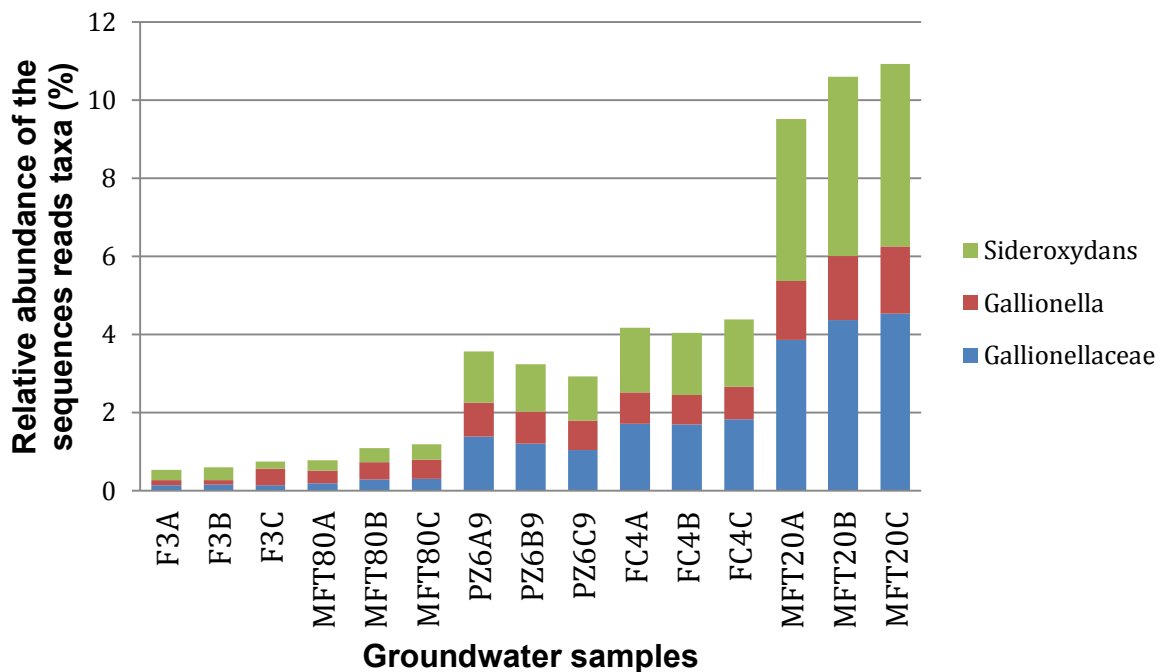


Figure 4.2 Relative abundance of Gallionellaceae *Gallionella* and *Sideroxydans* in all old groundwater samples.

The relative abundance of all Gallionellaceae (summed relative abundance of *Gallionella*, *Sideroxydans* and Gallionellaceae, named total Gallionellaceae hereafter) was plotted against median concentration of total dissolved Fe (Figure 4.3). Abundance was negatively related to Fe concentration according to a trend curve of power type ($R^2 = 0.90$). Total Gallionellaceae relative abundance was maximal in MFT20 samples which have the lowest median total Fe concentration (0.9 mg/L). Abundance decreased very rapidly with median total Fe concentration between 1 mg/L and 1.6 mg/L and was minimal in samples with concentrations higher than 5 mg/L. Standard deviations associated to the median total Fe concentration in each sample are on the average higher in samples where higher relative abundances of total Gallionellaceae are found, like in MFT20 and FC4.

CHAPITRE 4

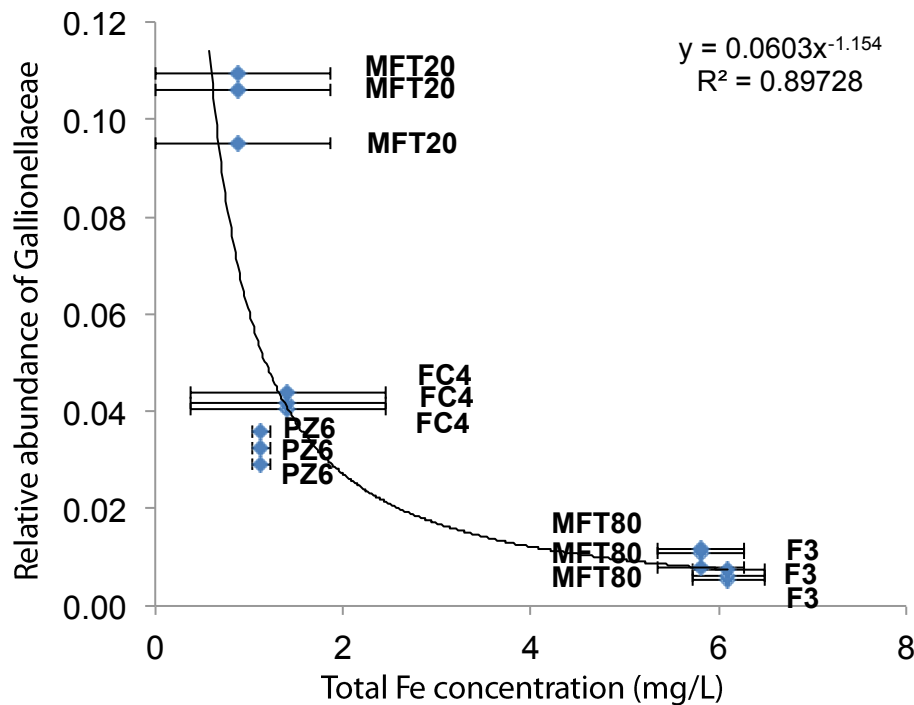


Figure 4.3 Relative abundance of total Gallionellaceae as a function of the median total Fe concentration.

In order to identify the chemical parameters influencing the relative abundance of *Gallionella*, *Sideroxydans* and Gallionellaceae we used Generalized Linear Model (GLM) to test the effect of environmental parameters. The abundance distribution of these three taxa is of Gaussian type, we thus built for each taxon a Linear Model (LM). A summary of the results of the LM performed for *Gallionella*, *Sideroxydans* and Gallionellaceae relative abundances on all samples and on old groundwater samples only is given in Table 4.III.

The LM performed on all samples showed with their *p*-values that concentrations of SO₄, NO₃, O₂, total Fe, total organic carbon and mixing are the six very significant parameters common to all three *Gallionella*, *Sideroxydans* and Gallionellaceae (Table 4.III). Among them, concentrations of NO₃ and total organic carbon were not to our knowledge reported to clearly impact *Gallionella*, *Sideroxydans* or Gallionellaceae abundance in environment. Concentrations of NO₃ and total organic carbon characterize recent groundwater samples where the lowest abundances of *Gallionella*, *Sideroxydans* and Gallionellaceae were detected, which explain their high significance.

In a LM, only a maximum of (number of groundwater samples - 1) parameters can be tested at the same time. As they are very significant and relevant parameters to explain *Gallionella*, *Sideroxydans* and Gallionellaceae abundance in the five old groundwaters, LM were performed on old groundwater samples with solely mixing rate, concentrations of O₂, total Fe, inorganic carbon or SO₄ (Table 4.III). According to the *p*-values, the concentration of total Fe and O₂ and the mixing rate are in all cases the three parameters with the highest effect on Gallionellaceae, *Gallionella* and *Sideroxydans* abundances in old groundwater samples. Concentrations of SO₄ and inorganic carbon show also very significant effect, but to a less extent compared to mixing rate, total Fe, and O₂ concentrations. Concentrations of O₂, total Fe, and mixing rate explain alone respectively 84.6%, 91.1% and 93.2% of the variance of *Gallionella*, *Sideroxydans* and Gallionellaceae in old groundwater samples (data not shown). When SO₄ or inorganic carbon concentration is added, the four parameters explain

CHAPITRE 4

respectively 95.7%, 99.2% and 98.7% of the variance of *Gallionella*, *Sideroxydans* and Gallionellaceae in old groundwater samples (see Adjusted-R² in Table 4.III).

| Taxon | Samples | Tested parameters in the Linear Model | Pr(>F) value | Significance | Adjusted R-squared |
|--------------|------------------|---------------------------------------|--------------|--------------|--------------------|
| Gallionella | all | SO4 | 1.212e-14 | *** | 97.9% |
| | | O2 | 1.730e-14 | *** | |
| | | NO3 | 6.948e-13 | *** | |
| | | Mixing | 1.548e-11 | *** | |
| | | Total organic carbon | 3.968e-09 | *** | |
| | | Fe | 1.792e-07 | *** | |
| | | Inorganic carbon | 0.01667 | * | |
| | | pH | 0.27824 | | |
| | N2 | 0.70055 | | | |
| | old groundwaters | Mixing | 8.390e-07 | *** | 95.7% |
| | | O2 | 3.851e-06 | *** | |
| | | Fe | 2.759e-06 | *** | |
| | | Inorganic carbon | 0.0002954 | *** | |
| | old groundwaters | Mixing | 8.390e-07 | *** | 95.7% |
| O2 | | 2.759e-06 | *** | | |
| Fe | | 3.851e-06 | *** | | |
| SO4 | | 0.0002954 | *** | | |
| Sideroxydans | all | SO4 | <2.2e-16 | *** | 99.4% |
| | | O2 | <2.2e-16 | *** | |
| | | NO3 | <2.2e-16 | *** | |
| | | Mixing | <2.2e-16 | *** | |
| | | Fe | 1.459e-15 | *** | |
| | | Total organic carbon | 1.320e-13 | *** | |
| | | Inorganic carbon | 9.649e-07 | *** | |
| | | pH | 7.035e-09 | *** | |
| | N2 | 0.2655 | | | |
| | old groundwaters | Mixing | 3.312e-11 | *** | 99.2% |
| | | Fe | 6.129e-09 | *** | |
| | | O2 | 9.218e-09 | *** | |
| | | Inorganic carbon | 1.172e-06 | *** | |
| | old groundwaters | Mixing | 3.312e-11 | *** | 99.2% |
| Fe | | 6.129e-09 | *** | | |
| O2 | | 9.218e-09 | *** | | |
| SO4 | | 1.172e-06 | *** | | |

Significance Codes for Pr: ***'0.001'0.01'0.05'0.1

Table 4.III Different Generalized Linear Models realized on the relative abundance on *Sideroxydans* and *Gallionella* in all samples and in old groundwater samples.

CHAPITRE 4

| Taxon | Samples | Tested parameters in the Linear Model | Pr(>F) value | Significance | Adjusted R-squared |
|------------------|------------------|---------------------------------------|--------------|--------------|--------------------|
| Gallionellaceae | all | SO4 | <2.2e-16 | *** | 99.1% |
| | | NO3 | <2.2e-16 | *** | |
| | | Mixing | 4.048e-16 | *** | |
| | | O2 | 5.398e-16 | *** | |
| | | Fe | 1.824e-14 | *** | |
| | | Total organic carbon | 5.294e-12 | *** | |
| | | Inorganic carbon | 1.665e-05 | *** | |
| | | pH | 1.689e-05 | *** | |
| | N2 | 0.2676 | | | |
| | old groundwaters | Mixing | 3.946e-10 | *** | 98.7% |
| | | Fe | 2.624e-08 | *** | |
| | | O2 | 5.125e-08 | *** | |
| | | Inorganic carbon | 4.218e-05 | *** | |
| | | Mixing | 3.946e-10 | *** | |
| O2 | | 5.125e-08 | *** | | |
| old groundwaters | Fe | 2.624e-08 | *** | | |
| | SO4 | 4.218e-05 | *** | | |

Significance Codes for Pr: 0.001***, 0.01**, 0.05, 0.1

Table 4.III (continued) Different Generalized Linear Models realized on the relative abundance of Gallionellaceae (*Sideroxydans* and *Gallionella* included) in all and in old groundwater samples.

In order to detail how *Gallionella*, *Sideroxydans* and Gallionellaceae abundance respond specifically to the variation of the total Fe and O₂ concentration and mixing rate, a Redundancy Analysis (RDA) was performed with these three taxa and three chemical parameters (Figure 4.4). The first two axes explain almost 98.9% of the variance of *Gallionella*, *Sideroxydans* and Gallionellaceae sequence abundance through the three constraining parameters. The first axis (RDA1, 97.1%) shows that total Fe concentration is opposed to mixing rate, and O₂ concentration. The correlation of the different groundwater samples with chemical parameters within the RDA plot is coherent with their chemical composition. The median total Fe concentration is anti-correlated to the median mixing rate and to the median O₂ concentration, whereas the median mixing rate and the median O₂ concentration are not correlated to each other as their arrows are directed at right angle. Indeed, MFT80 and F3 samples have the highest median total Fe concentration and the lowest mixing rates, MFT20 the lowest total Fe concentration and the highest mixing rate, and PZ6 and FC4 intermediary total Fe concentration (Table 4.I). Results of the RDA show that relative abundances of *Gallionellaceae*, *Gallionella* and *Sideroxydans* reads can be explained almost entirely by the relation with median concentrations of total Fe, O₂ and the mixing rate. The relation is negative with the concentration of total Fe and positive with the concentration of O₂ and the mixing rate.

CHAPITRE 4

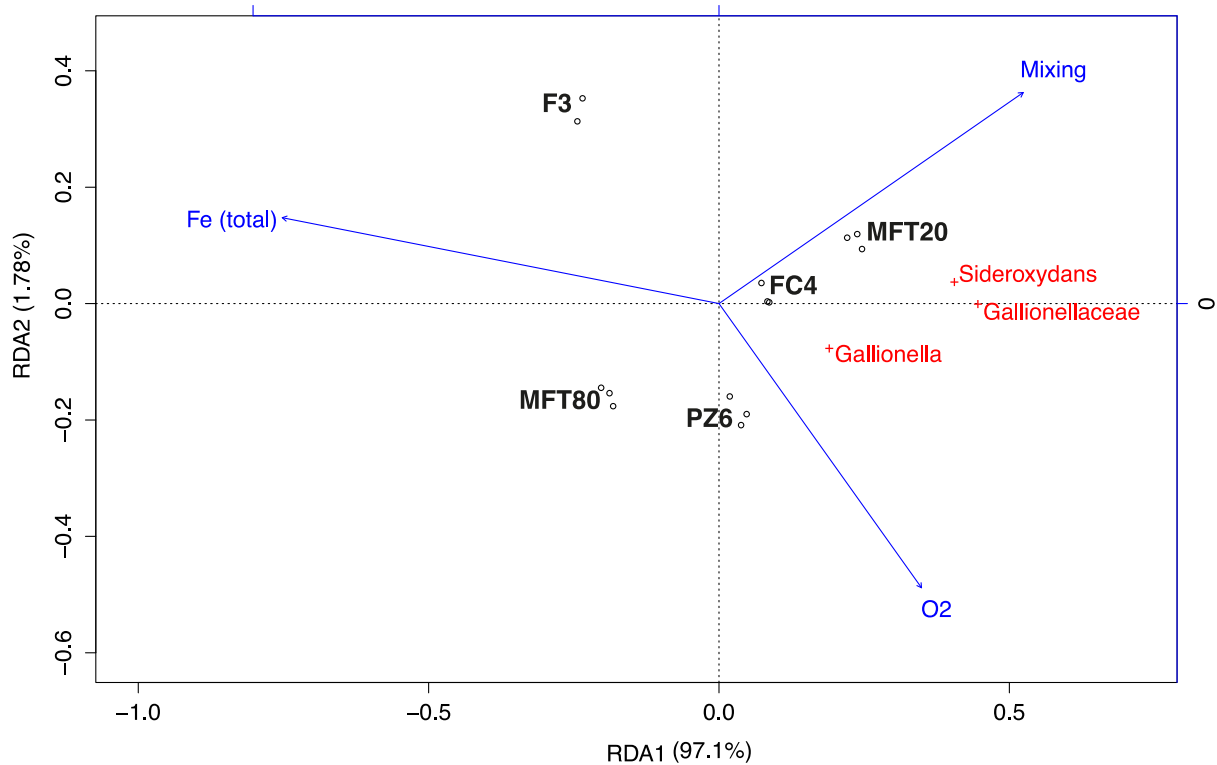


Figure 4.4 Triplot of RDA of groundwater samples with relative abundance of *Gallionellaceae*, *Gallionella* and *Sideroxydans* response variables) depicted as + symbols and geochemical parameters (explanatory variables) depicted as blue arrows. Angles between taxa and geochemical parameters, and also between taxa or between geochemical parameters reflect their correlations. Projecting a groundwater sample at right angle on a taxa or a geochemical parameter approximate the value of the groundwater sample along this parameter.

We further investigated the relationships between the total *Gallionellaceae* relative abundance and the mixing rate. Figure 4.5 shows that, although the Betton site (PZ6) was not included in the analysis as it is not related to the Saint-Brice-En-Coglès samples, the mixing rate is linearly correlated ($R^2 = 0.99$) to the relative abundance of total *Gallionellaceae* for groundwater samples collected in Saint-Brice-En-Coglès.

CHAPITRE 4

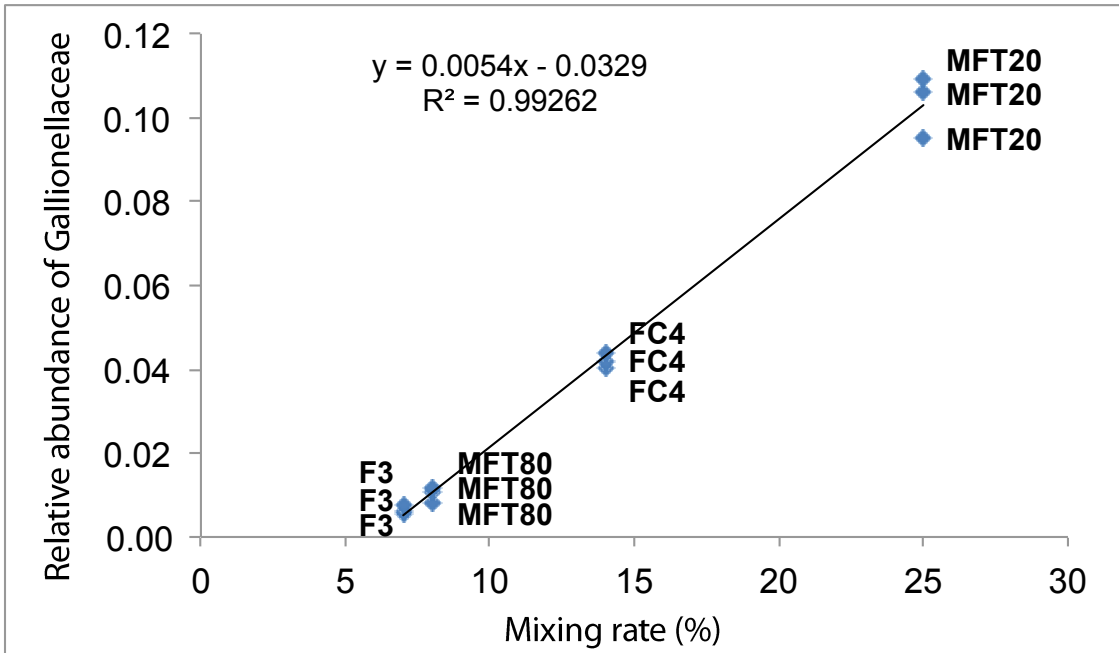


Figure 4.5 Relative abundance of total Gallionellaceae in function of the median mixing rate for the St Brice groundwater samples.

The “consumed” oxygen has been defined in the Materials and Methods section as the difference between the oxygen brought to the old groundwater through mixing and the observed oxygen. Consumed oxygen shows a very clear linear relationship to the total Gallionellaceae relative abundance (Figure 4.6).

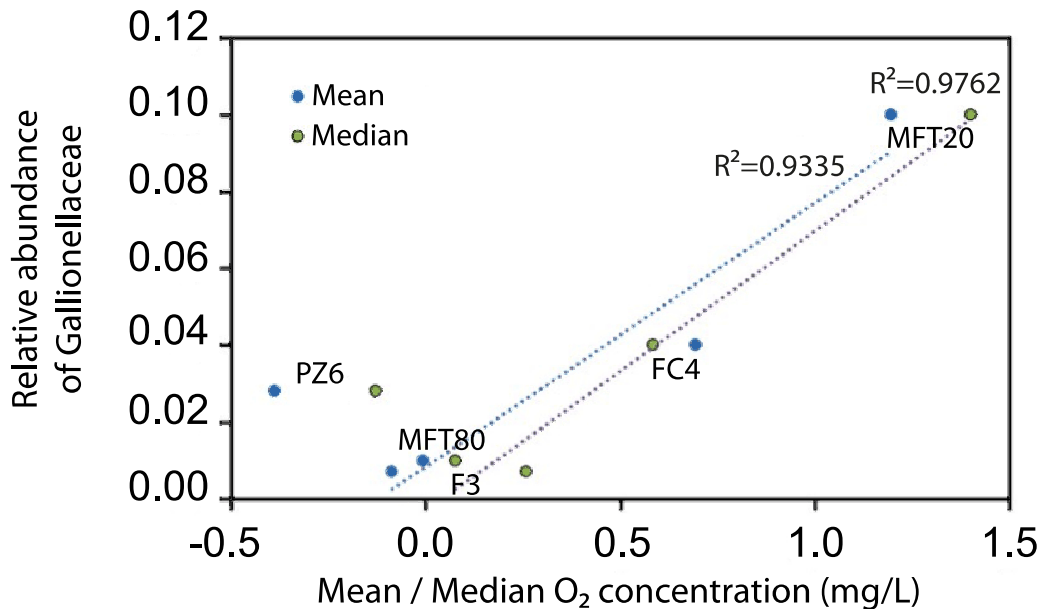


Figure 4.6 “Consumed” oxygen (mg/L) versus total Gallionellaceae relative abundance.

3.3. Micro-organisms involved in sulfur cycle

The high proportion of “non-marine” sulfate and the $\delta^{34}\text{S}$ proportion showed evidences of sulfur oxidation potentially coupled to nitrate reduction in MF1. We consequently searched

CHAPITRE 4

for clues of microbially-mediated sulfide oxidation coupled to nitrate reduction in the structure of microbial communities sampled in MF1 groundwater. Despite the clear geochemical and isotopic signals, none of the taxa which were dominant in MF1 could be related to either of these processes. Indeed, compared to all the other groundwater samples, MF1 was specifically characterized by a much higher proportion of reads assigned to Acidobacteria with an average relative abundance of 5.6% (proportions ranged from 0.3 to 1.8% in all other samples). More specifically, reads assigned to Acidobacteria were mainly attributed to two genera of chemo-organotrophes with no known capacity in sulfide oxidation or sulfate reduction: *Candidatus Solibacter* (average proportion 1.4 % of the total number of reads) and *Candidatus Koribacter* (average proportion 1.3 %). Both were also found in most other samples with smaller proportions (reaching up to 0.2 % in PZ3 for *Candidatus Koribacter*). Moreover, the distribution of taxa known to be involved in the sulfur redox cycle such as some members of the Beta-, Delta- and Gammaproteobacteria as well as Nitrospirae, showed no obvious pattern hinting to a relationship between microbial community composition and sulfur redox processes.

In order to look for a potential microbial evidence of sulfur oxidation and nitrate reduction processes in MF1 and the other wells, we also performed a Redundancy Analysis (RDA) with relative abundance genera potentially able (i) oxidize sulfides, (ii) reduce nitrate. No iron or sulfate reducers were investigated as geochemical conditions are too oxidant to allow such processes. Median concentrations of NO_3 , O_2 , total dissolved Fe(II), median mixing rate, and punctual $1-\delta^{34}\text{S}$ values (low $\delta^{34}\text{S}$ i.e. positive values of $1-\delta^{34}\text{S}$ are indicative of a mineral sulfur oxidation process) were included as explanatory variables. The axes of the RDA represent a moderate percentage (57%) of the taxa relative abundance variance (Figure 4.9). The different groundwater samples included in the redundancy analysis allowed distinguishing samples according to their geographic origin (site). MF1 samples seem to be slightly positively correlated to a higher $1-\delta^{34}\text{S}$ value and higher NO_3 concentration. This is coherent with the chemical characteristics of this groundwater sample as compared to old groundwater.

Results of the RDA indicate that, no clear segregation of sulfide-oxidizers (in red and orange, Figure 4.9) among the different groundwater samples could be observed. Similarly, potential nitrate reducers (in green and orange) were not found associated to any groundwater sample.

CHAPITRE 4

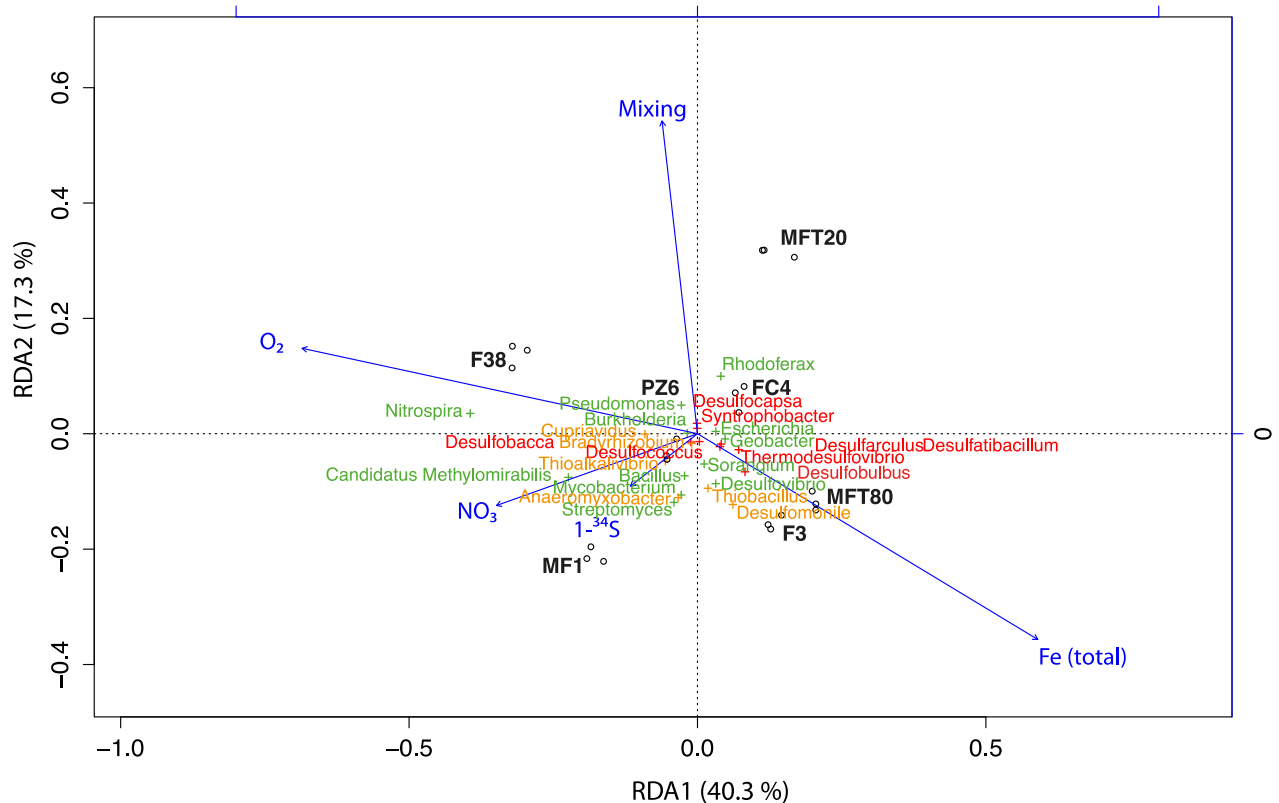


Figure 4.7 Triplot of RDA of the taxa related to sulfur oxidation and nitrate reduction and related environmental parameters. In the plot, are presented relative abundances of taxa potentially able to do sulfide oxidation (in red +, response variables), nitrate reduction (in green +, response variables) and both nitrate reduction and sulfide oxidation (in orange +, response variables). The constraining chemical parameters of the RDA include the median concentration (in mg/L) of O_2 , total Fe, NO_3 and median mixing rate over several years, and punctual $1-\delta^{34}S$ (plotted as "1-34S") values (blue vectors, explanatory variables).

4. Discussion

4.1. Geochemical processes

The global geochemical analysis distinguishes modern groundwater, usually close to the surface (10-20m) or at greater depth (>30m) in the recharge zone of the aquifers, with high oxygen and nitrate concentrations. These groundwater bodies have high mixing rates and are highly influenced by agricultural activities. Below this section of the aquifer, groundwater presents more reducing conditions with high total Fe concentrations. This is particularly true for Saint-Brice-En-Coglès and Betton sites (see chapter 2). These groundwater samples present low mixing rates, below 25%. Such mixing rates indicate that the groundwater renewal is slow which also implies low flow velocity. Detailed geochemical studies (Armandine-Les-Landes et al., 2015; Aquilina et al., 2015) indicate that part of the solutes contained in the investigated groundwater bodies might have resided for several thousand years. This result indicates that diffusion is important in these conditions and that slow water-rock interactions might control groundwater geochemistry.

Water-rock interactions within hard-rock aquifers allow minerals release from rocks into groundwater either through biotic and/or abiotic reactions. Iron-bearing minerals such as pyrite or biotite are largely widespread in hard-rock aquifers. Dissolution processes have led

CHAPITRE 4

to the almost complete transformation of pyrite and silicates to clay minerals in the upper weathered part of the aquifer (Pauwels et al., 2010). A reaction front is suspected at the limit between the weathered and the fractured zones (Ayraud et al., 2008). Within the fractured part of the aquifer, pyrite, biotite and other silicate minerals are still present. Chemical rock analysis from a Ploemur cored-well indicates that biotite; a high iron-bearing mineral, represents about 1 to 6.5% of the rocks. Pyrite is also observed as a trace mineral in these rocks. Pyrite dissolution through O₂ oxidation is well established but remains unlikely in reduced conditions. Autotrophic denitrification may also account for pyrite dissolution, as well as oxidation coupled to Fe(III) reduction. Silicate minerals such as biotite may also be dissolved through both O₂ and CO₂ reactivity.

Fe concentrations in the investigated sites indicate that iron dissolution is a major process as it leads to Fe concentrations higher than 1mg/L. But geochemical conditions of these groundwaters depend on the concentration of dissolved O₂. Oxygen concentrations remain low but some oxygen is introduced in these groundwaters when recent groundwater mixes up with older groundwater during the annual recharge process. Such conditions are met in MFT20, FC4 and PZ6 groundwater samples as they correspond to slowly circulating groundwater with high iron concentrations that have a minimal and transitory connection with surficial water, enhanced during the recharge process. Slow and limited recharge processes (i.e. slow mixing rates) lead to a gradient of dissolved O₂ and NO₃ concentrations in groundwater, and a concomitant dissolution of iron-bearing minerals into Fe(II) form. Such geochemical conditions do not depend on depth but rather on the hydrogeological position (Ben Maamar et al., 2015). Investigations in the studied sites indicate such conditions may extend to 200m depth, thus including a large section of the aquifer.

Sulfur processes show a more complex pattern. The Ploemur site shows a clear trend between recent groundwater in recharge zones that plot within the shallow groundwater domain and the MF1 sample. MF1 well, although relatively shallow represents alterites with low permeability and high residence time. The sulfur isotopic ratio and the SO₄ concentration clearly indicate sulfide mineral dissolution that is characterized by low 1/SO₄ ratios and low δ³⁴S. The position of the Saint-Brice-En-Coglès samples also indicates that sulfide dissolution contributes to the total SO₄ concentration but to a much lower extent. These geochemical data clearly indicate that sulfide dissolution is an important process in groundwater. A similar conclusion was derived from regional Cl/SO₄ ratio measurements (Aquilina et al., 2015). The MF1 sample in Ploemur shows a clear evidence for an extensive dissolution process.

On the opposite, Betton PZ6 sample presents high δ³⁴S. Such very high isotopic ratios have been interpreted, along with other geochemical parameters, as resulting from a marine origin (Aquilina et al., 2015 ; Pauwels et al., 2010). Such fluids may be ubiquitous in the Armorican basement and represent relicts of paleotransgressions 2 to 5 Myrs old. The δ³⁴S in such fluids is close to Mio-Pliocene seawater but slightly above this one. The SO₄ to Cl ratio however does not reflect seawater ratio, showing higher SO₄ concentrations. This non-marine SO₄ may have two potential origins: *i*) it might represent sulfide minerals dissolution or *ii*) it might reflect non-typical seawater introduction in the basement. Mio-Pliocene transgressions may represent rather than open sea environments, closed continental environments such as marsh and lagunas where potential evaporation/dissolution cycles may operate and lead to δ³⁴S higher than initial seawater. Conversely, sulfur from sulfide minerals dissolution would lower

CHAPITRE 4

$\delta^{34}\text{S}$. This hypothesis is thus not favored by the observed $\delta^{34}\text{S}$. However both hypotheses are not exclusive and the observed $\delta^{34}\text{S}$ could result from the addition of marine SO_4 derived from initial lagoonal environments and from posterior sulfide dissolution in the host rock. This uncertainty does not allow computing a precise mineral SO_4 in this deep, old and complex sample.

4.2. Relationships between the iron redox cycle and the geochemical niche of *Gallionellaceae* in old groundwater

The Gallionellaceae (*Gallionella* and the *Sideroxydans* genera included) have the particularity to develop at interfaces showing redoxclines conditions, that is environment where exists an opposed gradient of O_2 and Fe(II) concentrations. Such interfaces are typically observed where reduced groundwater seepages come to contact with atmosphere (Brune et al., 2000 ; Megonigal et al., 2004). Gallionellaceae and its two main genera (*Gallionella* and *Sideroxydans*) were thus mainly described in surficial freshwater. By contrast, their distribution within aquifer as well as the influence of groundwater concentrations of dissolved O_2 and Fe(II) remain poorly known. In the investigated groundwaters Gallionellaceae, *Gallionella* and *Sideroxydans* appear to be among the dominant taxa (see also chapter 3).

These three taxa are found with higher reads proportion in groundwater samples with moderate total Fe concentration (around 1 mg/L) and rather high mixing rates with recent groundwater (from 14 to 25%). On the opposite side of the environmental range, these taxa are found with lower reads proportion in groundwater samples showing the highest total Fe concentrations (around 6 mg/L) and the lowest mixing rate (around 8%). In all groundwater samples the O_2 concentration remains always low but not null (between 0.26 to 0.52 mg/L). This is coherent with literature reporting Gallionellaceae Fe(II) oxidation activity is not competitive enough compared to abiotic O_2 -mediated Fe(II) oxidation when O_2 concentration becomes too high at circumneutral pH (superior to 1mg/L of O_2 according to Hanert, 1989). The Linear Models and the RDA analysis realized on Gallionellaceae, *Gallionella* and *Sideroxydans* relative abundance demonstrate that median concentrations of total Fe, O_2 and median mixing rates were the most significant chemical parameters explaining reads abundance of these three taxa. More precisely, the clear relationship between Gallionellaceae abundances and mixing rates indicates that mixing rate indirectly controls the Gallionellaceae abundance through the oxygen supply. It is assumed that iron is not a limiting component in these geochemical conditions. The significant relationships observed in the St-Brice site between Gallionellaceae abundances and “consumed” oxygen and iron concentration constitute a clear indication of the biological control of O_2 and Fe concentrations by the Gallionellaceae. As long as both oxygen and iron are available, Gallionellaceae metabolic activity allows the consumption of O_2 and dissolved Fe. The computed “consumed” O_2 can thus be related to biological activity as well as the conversion of Fe(II) to Fe(III) which precipitates. However, a recent study (Jewell et al., 2016) also demonstrated putative nitrate-dependent Fe(II) and S oxidation activities among nominally microaerophilic Gallionellaceae strains. Potential control of NO_3 and S concentration on Gallionellaceae abundance has thus also to be investigated. This study clearly shows the interaction between physical,

CHAPITRE 4

geochemical and biological processes. Hydrogeological processes induce recharge processes and mixing rates, which govern O₂ supply on one side, and slow groundwater circulation which allows water-rock interaction processes such as iron dissolution on the other side. These interactions provide a global ecological niche with high dissolved Fe and low O₂ concentrations where Gallionellaceae might develop. Within this niche, Gallionellaceae development and/or activity in turn control Fe and O₂ concentration which are at least partly related to the Gallionellaceae abundances.

4.3. Coupling processes and microorganisms acting in the sulfur cycle

Sulfate concentration in MF1 is largely above the concentration of other recent groundwater samples. Isotopic $\delta^{34}\text{S}$ analyses show evidence of sulfur oxidation in MF1. Interestingly, this process seems related to a recent change in the hydrologic circulations due to the exploitation of the Ploemur aquifer for tap water production. Hydrochemical monitoring over the last twenty years of the MF1 groundwater body revealed a progressive increase of the sulfate concentration, from 70 mg/L in 1996 to 160 mg/L in 2001. This increase is probably related to the pumping of the site which began in 1990 (contrary to the pumping well, observation wells were not monitored before 1996). It is assumed that pumping (about one million m³/yr) induced i) an increase of the flow paths with a higher reactivity through the activation of fresh mineral surfaces on the site, and/or ii) an increase of O₂ supply in these flow paths (Tarits et al., 2006). Monitoring of the pumping well also revealed a decrease of nitrate concentration after groundwater pumping was initiated, hinting to the development of an autotrophic denitrification process in response to pumping (Tarits et al., 2006; Pauwels et al., 2010). A similar process was observed in the Saint-Brice-En-Coglès and the Betton sites in the pumping area, directly related to the onset of pumping (Roques et al., 2014; Betton : unpublished data). At last, batch experiments using granite from the Ploemur site with recent groundwater collected in the F34 well also showed a concomitant increase of the sulfate concentration and a decrease of nitrate concentration in groundwater, indicating autotrophic denitrification coupled to sulfide minerals oxidation occurs (PhD theses of Alexandre Boisson and Virginie Ayraud). Thus, batch experiments as well as field observations both indicate that autotrophic nitrate reduction easily develops in the hard-rock aquifer leading to a profound evolution of groundwater chemical composition.

Diversity analyses suggest that taxa ensuring sulfide minerals oxidation, nitrate reduction as well as sulfate reduction, are present in old groundwater. However when looking at the abundance distribution of microbial taxa, we found no clue concerning taxa that might be responsible for these processes, even in MF1 sample. Indeed, Deltaproteobacteria seem to be found ubiquitously in all isolated old groundwater samples, while MF1 sample is mainly dominated by reads of chemo-organotrophs such as *Candidatus Solibacter* or *Candidatus Koribacter* and other Acidobacteria.

Such a discrepancy between the geochemistry and the microbial community structure is puzzling. Diversity analyses of groundwater microbial communities repeatedly showed the strong influence of the geochemical conditions on community richness and composition (Sahl et al., 2008; Lin et al., 2012; Sirisena et al., 2013; Nyssönen et al., 2014). Flynn et al., (Flynn

CHAPITRE 4

et al., 2013) observed that sulfate concentration drives microbial community structure in the Mahomet aquifer (Illinois, US). In particular, they observed that the proportion of sulfate reducers within the attached bacterial community increased with sulfate concentration.

Because of the absence of a clear relationship between microbial community structure and sulfide oxidation in the MF1 groundwater samples, it is tempting to speculate that the inferred biogeochemical processes are purely abiotic. However, the reaction kinetic of the anoxic oxidation of pyrite with nitrate reduction is too low to occur at a significant rate in nature (Jørgensen et al., 2009). As oxygen concentrations remain low, an abiotic oxidation process is also unlikely. If pyrite oxidation is a biologically mediated process, one may assume that it is no longer active and that the current observed chemical concentrations in MF1 represent a relic of a past microbial activity. Monitoring of the Ploemur production well showed a succession of different phases (Tarits et al., 2006 and unpublished data): (1) a sharp Cl and SO₄ concentration increase and NO₃ decrease during the first year following pumping initiation; (2) a second phase where Cl and SO₄ concentrations still increase but much slowly whilst NO₃ concentration remains low (around 4 mg/L) and constant; (3) after 2003, both piezometric level and Cl and SO₄ concentrations remain more or less constant. This third phase represents a relative stabilization of the hydrogeochemical system in the site. The SO₄ concentration stabilization in MF1 takes place at the same time. Although difficult to interpret, this stabilization may represent a final step in the oxidation process.

Finally, microbial data suggest that taxa ensuring sulfide mineral oxidation and nitrate reduction are present in low abundance but are highly active and therefore act as keystone species in MF1 and potentially in old groundwater bodies in Saint-Brice-En-Coglès and Betton sites.

5. Conclusion

We investigated hydrogeochemical and biological controls of the iron and sulfur cycles in high residence time groundwater in hard rock aquifers. These groundwaters are located in the fractured part of these aquifers along hydrogeological loops below the surface aquifers in the weathered materials and/or below recharge zones in the fractured part of these aquifers. High residence time groundwater is mixed with low ratios of surface recent groundwaters. This connection is measured through a mixing rate deduced from anthropogenic gases concentrations. In a large section of these aquifers, from 50 to 250 m depth, geochemical conditions are characterized by high iron concentrations (> 1 mg/L) and low O₂ concentrations (< 1-2 mg/L). Our results show that Gallionellaceae relative abundance is linearly related to the mixing rate. This suggests a control of the microbial abundance by hydrogeological parameters. Using the mixing rate, the consumed quantity of oxygen has been computed. Consumed O₂ and iron concentration are related to the Gallionellaceae read abundances. It is thus deduced that through O₂ supply, hydrogeological mixing of recent groundwaters in the deep ecosystem controls Gallionellaceae activity, which in turn modifies the groundwater geochemistry.

Chemical evidences of sulfur oxidation were found in MF1 groundwater which corresponds to a specific hydrogeological situation. Although close to the surface, this well is

CHAPITRE 4

characterized by poorly permeable weathered material and higher residence time than other surface wells. It is also characterized by high non-marine SO_4 concentrations and very low $\delta^{34}\text{S-SO}_4$. There is thus a strong evidence for a sulfide mineral oxidation process, probably coupled to nitrate reduction. However this process could not be clearly related to specific microorganisms. Some microorganisms able to reduce nitrate and/or to oxidize sulfur were detected in MF1 groundwater but not in high abundance. We thus assume that the process of sulfur oxidation in MF1 took place in the past at the onset of pumping in this site. The relationship between $\delta^{34}\text{S-SO}_4$ and some sulfur-oxidizers and nitrate-reducers suggests the hypothesis that these are keystone species i.e. active taxa occurring in low abundance. Autotrophic denitrification coupled to sulfide-minerals oxidation has been also observed in the Saint-Brice-En-Coglès and Betton aquifers when pumping operations have been carried out. These observations support the idea that sulfide oxidation/nitrate reduction is a key process that might remain always active in these ecosystems, behind iron oxidation.

CHAPITRE 5 – DYNAMIQUE TEMPORELLE DE LA COMPOSITION DES COMMUNAUTES MICROBIENNES DURANT LA TRANSITION HYDROLOGIQUE ENTRE LES PERIODES DE DECHARGE ET RECHARGE, DANS L'AQUIFERE DE SOCLE DE BETTON.

1. Introduction

La recharge d'un aquifère correspond au transfert vertical des eaux météoritiques vers les eaux souterraines plus profondes. Lors de cette période, une hausse du toit de la nappe de l'aquifère survient et l'intensité des écoulements à l'exutoire augmente. En Bretagne, la période de recharge dure en moyenne de 4 à 5 mois (novembre-mars) et laisse place à la période de décharge caractérisée par une baisse progressive du toit de la nappe s'étalant sur le reste de l'année (avril à octobre).

En Bretagne notamment, le phénomène de recharge induit l'incorporation d'eau récente, oxygénée et peu minéralisée, dans l'eau souterraine plus minéralisée et souvent appauvrie en oxygène. Le mélange de ces deux types de masses d'eau aux conditions chimiques bien distinctes est à l'origine d'une dilution chimique. Ce mélange induit également une réactivité entre les éléments dissous de la masse d'eau oxygénée qui arrive et la masse d'eau réduite de l'aquifère, et aussi avec les minéraux des roches. Ce changement est transitoire mais est (peu ou prou) cyclique car répété chaque année. La recharge est le mode de transfert principal des amendements anthropiques du sol tels que les fertilisants, et des polluants tels que les pesticides vers les eaux souterraines.

La recharge influence directement la composition des communautés microbiennes et entraîne souvent un apport de microorganismes du sol, au sein des eaux souterraines (Lin et al., 2012). Il a également déjà été rapportée une baisse drastique de la diversité bactérienne au moment de la recharge, semblable à un phénomène de dilution (Zhou et al., 2012). La dilution et l'apport d'organismes allochtones dans les eaux souterraines induits par la recharge modifient les interactions entre microorganismes, via par exemple l'introduction de nouveaux compétiteurs pour les nutriments, ou de prédateurs de bactéries comme les virus et les protozoaires (Goldscheider et al., 2006 ; Lin et al., 2012). Lors de la recharge, le mélange de masses d'eau aux conditions oxydo-réductrices contrastées établit des gradients redox et des gradients de concentrations favorisant certains taxa microbiens spécifiques des milieux d'interface (Chapitre 4 ; Emerson et al., 2010). De plus, la structure des communautés microbiennes des eaux souterraines qui dépend directement des conditions hydrochimiques (Kölbl-Boelke et Nehr Korn, 1992 ; Takai et al., 2003 ; Nyyssönen et al., 2013 ; Ben Maamar et al., 2015), peut être profondément modifiée et ce, cycliquement. La capacité d'un écosystème à absorber une perturbation et à se réorganiser (Folke et al., 2004) et la magnitude de perturbation qu'un système peut subir avant de réaliser une transition vers un état différent (Holling et al., 1973) sont conceptualisées sous le terme de résilience de l'écosystème.

CHAPITRE 5

La période de recharge permet d'évaluer la réponse des communautés microbiennes naturelles des eaux souterraines à des changements cycliques et importants des conditions oxydo-réductrices. Pourtant, la résilience de l'écosystème microbien des eaux souterraines, en particulier dans le cas des eaux souterraines très isolées, reste encore largement inexplorée. Peu d'études traitent en effet de l'impact de la recharge naturelle d'un aquifère sur la structure des communautés microbiennes des eaux souterraines. De plus, la plupart de ces études ne prennent en compte que les communautés de la partie peu profonde de l'aquifère (jusqu'à environ 20m) qui répond le plus rapidement à la recharge (McGuire et al., 2000, 2005 ; Haack et al., 2004 ; Ayuso et al. 2009 ; Bougon et al., 2012 ; Lin et al., 2012 ; Zhou et al., 2012) et l'impact de la recharge dans la partie profonde de l'aquifère sur la structure des communautés microbiennes reste mal définie. De même, les stratégies utilisées par les communautés microbiennes profondes pour faire face aux perturbations hydrologiques saisonnières restent largement inconnues, et la dynamique temporelle de la composition des communautés microbiennes dans ce type de milieu est peu documentée.

Au cours de ce chapitre, l'impact de la recharge sur les conditions chimiques et la structure des communautés microbiennes dans la partie superficielle et la partie profonde (isolée) d'un même aquifère est évalué. Les transferts verticaux de microorganismes et de polluants ainsi que leur persistance sur une période de cinq mois couvrant la fin de la période de décharge au début de la période de recharge sont estimés. Ensuite, les stratégies adoptées par les communautés microbiennes pour faire face au phénomène saisonnier de recharge et l'intensité et la nature des modifications de l'écosystème microbien en fonction des perturbations hydrologiques sont investiguées.

2. Matériels et méthodes

2.1. Site d'étude

Les échantillons d'eau souterraines prélevées pour les analyses hydrochimiques et microbiologiques proviennent de l'aquifère du Vau-Reuzé (Bretagne, France) situé près de la ville de Betton (N48.182°, W-1.643°). L'aquifère du Vau-Reuzé s'appuie sur un socle de schistes du Protérozoïque. Les deux puits échantillonnés à Betton permettent d'accéder à des eaux souterraines très différentes (Figure 5.1). Le puits PZ3 est peu profond et est alimenté par des masses d'eau présentant des temps de résidence courts et circulant rapidement dans la partie superficielle de l'aquifère vers l'exutoire. Le puits PZ6 intercepte quant à lui des masses d'eau profondes et isolées avec des temps de résidence de plusieurs milliers d'années (Aquilina et al., 2015 ; Armandine Les Landes et al., 2015). Les masses d'eau interceptant PZ6 ont la particularité de présenter de fortes concentrations en SO₄, Na et Cl (270 mg/L ; 520 mg/L et 640 mg/L respectivement).

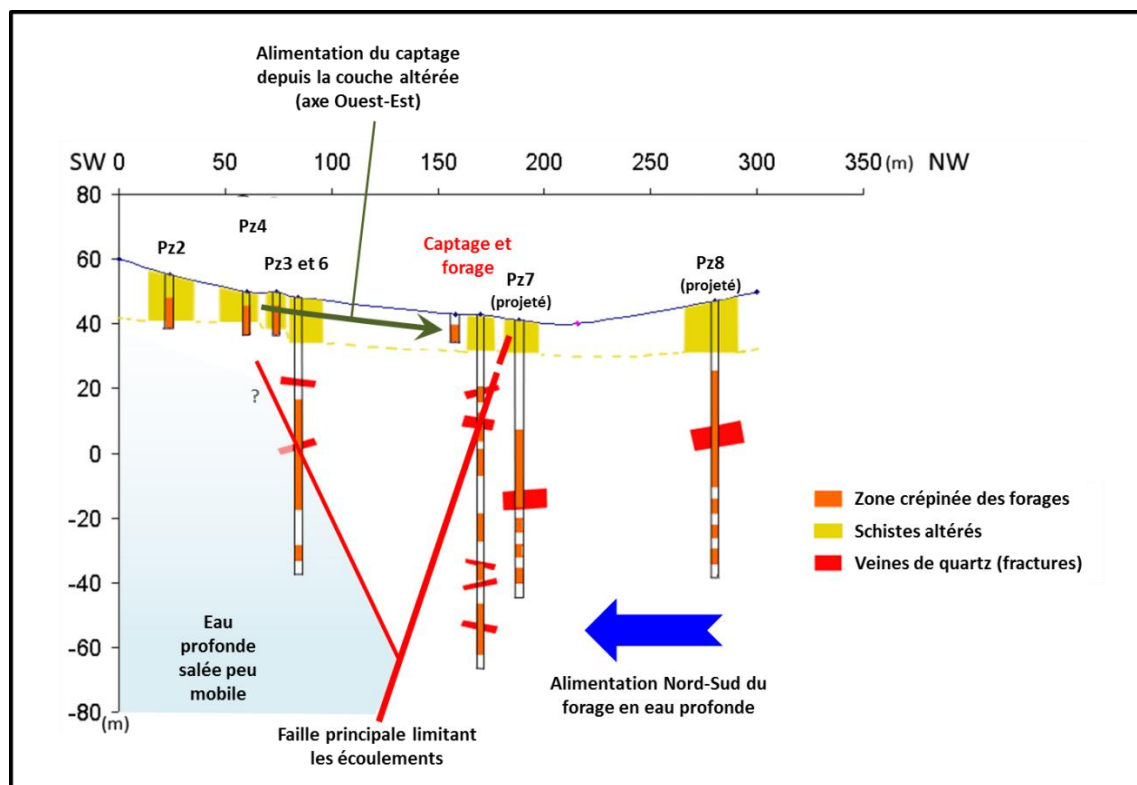


Figure 5.1 : Schéma hydrogéologique interprétatif du site du Vau Reuzé

Une diagraphie des paramètres physico-chimiques réalisée dans le puits Pz6 (Figure 5.2) a mis en évidence une forte rupture de température et de conductivité, avec des eaux à faible salinité au-dessus d'un niveau situé à 50m et des eaux à forte salinité sous ce niveau. Ces dernières restent très homogènes sur toute la colonne d'eau sous cette profondeur. Ces données acquises renseignent la présence de fractures (par exemple à 50m, Figure 5.2) qui

CHAPITRE 5

signe un apport d'eau de nature très différente, ce dernier expliquant le fort contraste observé dans le piézomètre.

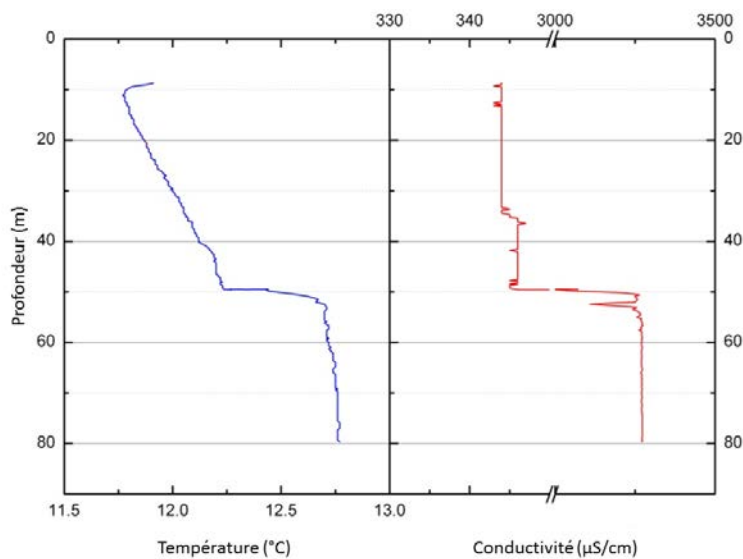


Figure 5.2 : Diagramme physico-chimique réalisée dans le piézomètre Pz6.

2.2. Suivi de la structure des communautés

Les prélèvements d'eau souterraine des puits PZ3 et PZ6 pour les analyses de la composition des communautés microbiennes et pour les analyses hydrochimiques ont été réalisées en même temps que les prélèvements pour les analyses hydrochimiques. Les différents prélèvements s'étalent sur cinq mois et ont été faits le 30/09/2013 ; 17/10/2013 ; le 19/11/2013 ; 11/12/2013 et le 23/01/2014. Pour plus de lisibilité, les échantillons prélevés aux différentes dates seront nommés par le mois de prélèvement tout au long du chapitre (ex. : l'échantillon PZ3 de janvier).

A toutes les dates, l'eau du puits PZ3 a été prélevée à 15m et celle de PZ6 à 70m, sauf à la date du 23/01/2014, où l'eau interceptée dans PZ6 a été prélevée à deux profondeurs : 70 et 80m. Pour chaque prélèvement d'eau souterraine, une purge du puits est réalisée durant au moins 30 minutes à l'aide d'une pompe Grundfoss MP1. Les prélèvements sont réalisés lorsque la conductivité, le pH, le potentiel redox, la température et la concentration en oxygène sont stabilisés et représentatifs de l'eau interceptée habituellement dans chaque puits.

2.3. Suivi hydrochimique, hydrologique et pluviométrique

La température, la conductivité et la concentration en oxygène dissous ont été mesurées avec une sonde WTW315i-CondOx, le pH avec une électrode combinée SenTix 50 et le potentiel redox avec une électrode de platine Ag/AgCl (Mettler Pt 4805). Pour les analyses hydrochimiques, environ 90 mL d'eau souterraine ont été filtrés sur un filtre d'acétate de cellulose de 0,22µm et stockés dans des flacons de polytetrafluoroéthylène (PTFE) rincés à l'acide. Les concentrations en cations ont été mesurées avec un ICP-MS HP 4500, les

CHAPITRE 5

concentrations en anions par chromatographie ionique (Dionex DX-100) et les concentrations en carbone avec un Analyseur Shimadzu TOC 5050A au Centre Commun Analytique de l'Observatoire des Sciences de l'Univers (OSUR, Université de Rennes 1 – CNRS).

Les concentrations en CFC et SF₆ ont été déterminées à partir d'échantillons d'eau par la plateforme CONDATE Eau de l'OSUR en utilisant les procédures analytiques décrites dans les travaux précédents (Roques et al., 2014 ; Ayraud et al., 2008 ; Labasque, 2006).

Le niveau piézométrique a été mesuré dans les deux puits lors de chaque prélèvement. Afin de suivre plus précisément l'effet global de la recharge sur la variation de la hauteur du toit de la nappe, la chronique journalière du niveau piézométrique d'un puits (site de La Petite Noë) situé à environ 4 km du site du Vau-Reuzé de Betton a été utilisé comme référence (données du site de l'ADES). En parallèle, la chronique journalière des précipitations enregistrées sur la station Météo-France de Rennes-Gallet (environ 7 km du Vau Reuzé) a été utilisée pour préciser le début de la recharge.

Afin de comparer les échantillons d'eau en fonction de leur composition chimique, une classification ascendante hiérarchique a été faite avec le package R pvclust (Suzuki et Shimodaira, 2015) en utilisant une mesure de distance euclidienne et un clustering de type UPGMA.

2.4. Détermination des proportions de mélange entre différentes masses d'eau

Le mélange entre une masse d'eau ancienne et une masse d'eau récente est déterminé par le rapport entre la concentration en CFC mesurée dans l'eau ancienne et dans l'eau récente. A partir de ce ratio, un pourcentage de mélange d'une eau ancienne (de type PZ6 à 80m ou 70m), avec une eau récente (de type PZ3) est déduit dans chaque échantillon. D'un point de vue hydrologique, cette mesure est un proxy de la connexion de la partie profonde d'un aquifère fracturé avec la surface.

Dans le suivi hydrochimique pluriannuel (sur dix ans) de PZ6 à 80m et PZ3, la concentration en CFC mesurée dans l'eau de PZ3 a été utilisée comme référence pour représenter les masses d'eau récentes provenant de la surface et qui ont été incorporées dans l'eau de PZ6 à 80m. Le calcul de la proportion de mélange entre PZ3 et PZ6 70m lors du suivi temporel avant et au début de la recharge a été basée sur la concentration en CFC, mais aussi sur les concentrations en certains éléments chimiques (Cl, Na, NO₃, SO₄). La proportion de mélange entre les trois masses d'eau PZ3, PZ6 à 40m et PZ6 à 80m au sein de PZ6 à 70m en décembre a quant à elle été déterminée uniquement sur la base des concentrations en NO₃ et SO₄.

2.5. Analyses métagénomiques des communautés microbiennes

Les extractions d'ADN et la production des bibliothèques de fragments de métagénomiques ont été réalisées selon le même protocole que celui décrit dans les chapitres 2 et 3 de cette thèse. Deux runs de séquençage Illumina MiSeq (sequencing kit V2 2X250 pb) ont été réalisés pour produire les données métagénomiques utilisées dans ce chapitre. Les séquences obtenues ont

CHAPITRE 5

été nettoyées, comparées contre les séquences protéiques et annotées taxonomiquement, comme décrit dans les chapitres 2 et 3.

L'évolution de la structure des communautés au cours du temps dans PZ3 et PZ6 a été représentée avec une analyse NMDS, après avoir effectué une transformation de Chord des données d'abondance relative de chaque taxon et calculé une matrice de dissimilarité avec une distance de Bray-Curtis. L'analyse a été réalisée avec le package vegan de R (Oksanen et al., 2014). Une classification ascendante hiérarchique a aussi été réalisée à partir des mêmes données d'assignation taxonomiques pour obtenir une représentation plus précise des relations entre les structures de communauté des différents réplicats d'échantillonnage d'un même puits aux différentes dates de prélèvement (package pvclust, distance Euclidienne, clustering Ward). Seuls les taxons ayant une abondance supérieure à 1% ont été pris en compte pour ces deux analyses statistiques.

3. Résultats

3.1. Situation des prélèvements chimiques et microbiologiques par rapport à la période de recharge

Afin de situer les différents prélèvements chimiques et microbiologiques effectués durant les cinq mois (du 30/09/2013 au 24/01/2014) dans le déroulement du processus de recharge, les différents niveaux piézométriques collectés ont été reportés sur une chronique de suivi piézométrique d'un aquifère situé à quelques kilomètres du site du Vau-Reuzé, la Petite Noë du 01/03/2013 au 31/08/2014. Parallèlement à la chronique du suivi piézométrique sur le site de la Petite Noë, un suivi journalier du niveau des précipitations sur la station Météo-France de Rennes-Gallet a également été ajouté à la Figure 5.3. La Figure 5.3 montre que le début du phénomène de recharge est clairement visible sur le niveau piézométrique du site de la Petite Noë à partir du 23/12/2013, jour où le niveau maximal de précipitations a été enregistré à Rennes (44mm). Cependant, une hausse du niveau piézométrique est déjà observable dès le 31/10/2013. A partir de la date du 23/12/2013, l'intensité et la fréquence des précipitations augmentent parallèlement au niveau piézométrique de la Petite Noë jusqu'au 05/03/2014, date à laquelle le début de la décharge se met en place. Les différents prélèvements effectués sur le site du Vau-Reuzé (puits superficiel PZ3 et puits profond PZ6) montrent un niveau piézométrique qui baisse durant septembre, octobre et novembre et qui remonte en décembre 2013 et en janvier 2014. Ces mesures sont cohérentes avec les données de pluviométrie et les données piézométriques de la petite Noë et indiquent que les échantillons prélevés à Betton correspondent à la fin de la décharge (septembre et octobre 2013) et au début de la recharge (janvier 2014) ainsi qu'à la période de transition intermédiaire (novembre et décembre 2013).

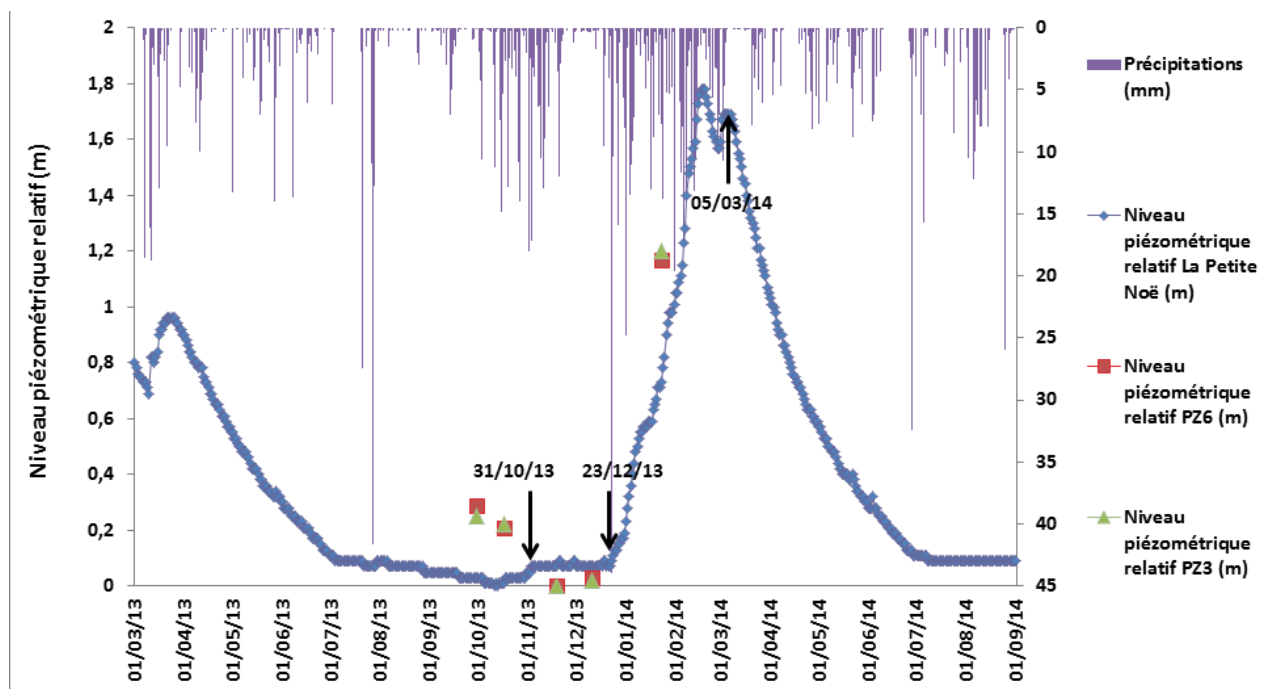


Figure 5.3 Suivi temporel du niveau piézométrique relatif (en m) de la station de la Petite Noë (courbe bleue). Les niveaux piézométriques relatifs (en m) dans PZ3 et PZ6 pour les dates de prélèvements sont également figurés (PZ3 :

CHAPITRE 5

triangles verts ; PZ6 : carrés rouges). Les niveaux piézométriques relatifs correspondent à la différence de niveau piézométrique par rapport à la valeur la plus basse enregistrée entre le 01/03/2013 et le 31/08/2014 pour la station de la Petite Noë, et par rapport au niveau piézométrique du 19/11/2013 (valeur la plus basse relevée) pour les niveaux piézométriques de PZ3 et PZ6. L'histogramme inversé (barres violettes) représente le cumul journalier des précipitations (en mm) mesurées par la station météorologique Météo-France de Rennes-Gallet.

3.2. Suivi des paramètres chimiques de l'eau des puits PZ6 et PZ3 au cours du temps durant la transition hydrologique entre les périodes de décharge et recharge

3.2.1. Suivi hydrochimique pluriannuel de l'eau des puits PZ3 et PZ6

Les données de suivi hydrochimique de PZ6 à 80 m sur une décennie montrent que ce puits est alimenté par une eau dont la composition chimique est très stable au cours du temps (Figure 5.4). La Figure 5.4 le montre l'évolution sur dix ans des concentrations de différents éléments chimiques (Cl, NO₃, O₂, Fer total) et le taux de mélange de PZ6 à 80m avec PZ3. La concentration en O₂ en particulier reste faible et particulièrement stable, autour de 0,5 mg/L ou moins, et la proportion de mélange entre PZ6 et PZ3 reste très faible la plupart du temps (inférieure à 5%). La concentration en Cl reste remarquablement stable et élevée au cours du temps alors que la concentration en NO₃ est dans l'ensemble très faible (< 1mg/L), même si des hausses ponctuelles et modestes (< 7mg/L) sont parfois observées. Dans l'ensemble, l'évolution de ces paramètres en particulier la concentration en O₂, indiquent qu'il existe un apport permanent mais toujours très limité d'eau plus oxygénée au sein de PZ6.

CHAPITRE 5

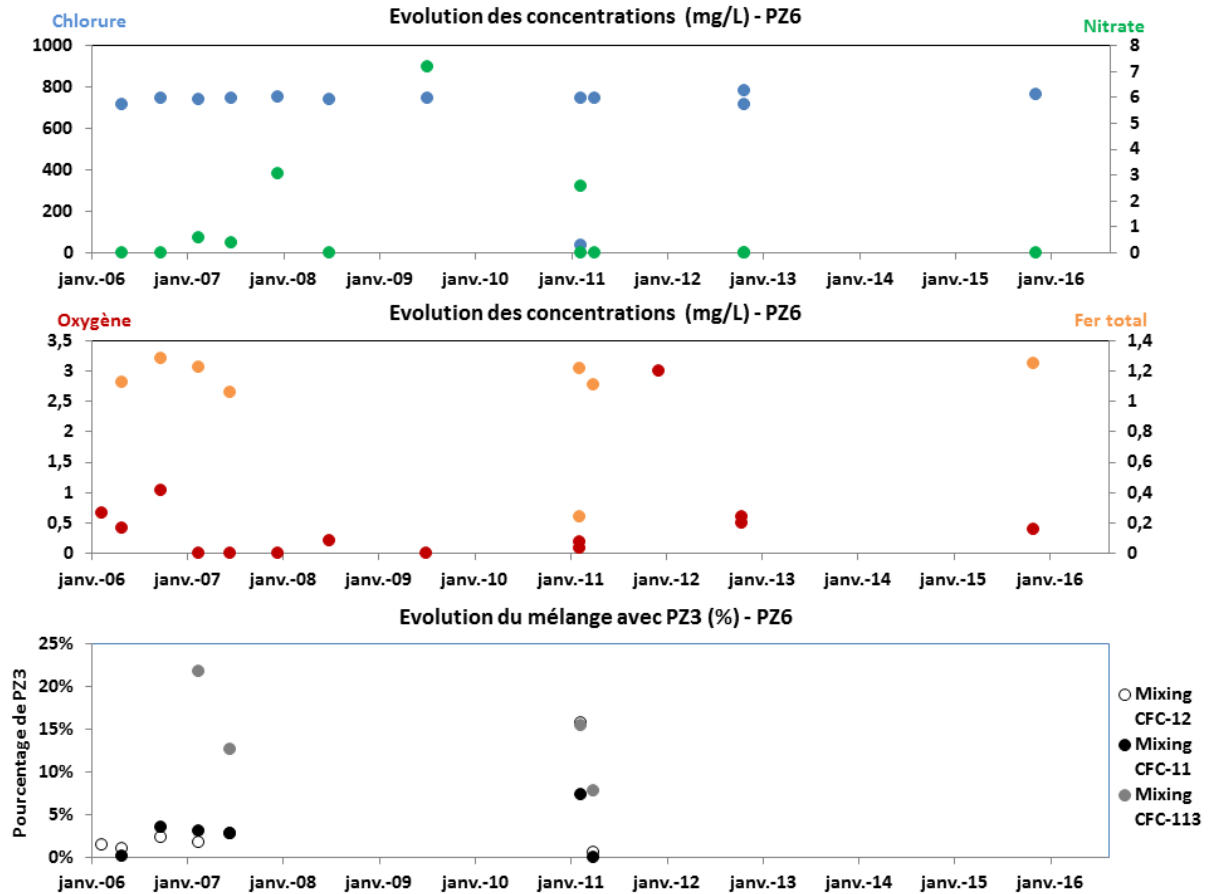


Figure 5.4 Evolution temporelle sur dix ans des concentrations en Cl, NO₃, O₂ et Fer total, et du taux de mélange avec l'eau de PZ3, dans le piézomètre PZ6.

Le suivi hydrochimique sur le long terme de l'eau de PZ3 montre, contrairement à PZ6, que ce puits capte une eau dont la composition chimique est très variable au cours du temps (Figure 5.5). Cette variation au cours du temps semble cyclique comme le montre l'évolution des concentrations en O₂, Cl et NO₃ dans PZ3 sur dix ans. Les concentrations en Fer total dans PZ3 sont très faibles.

CHAPITRE 5

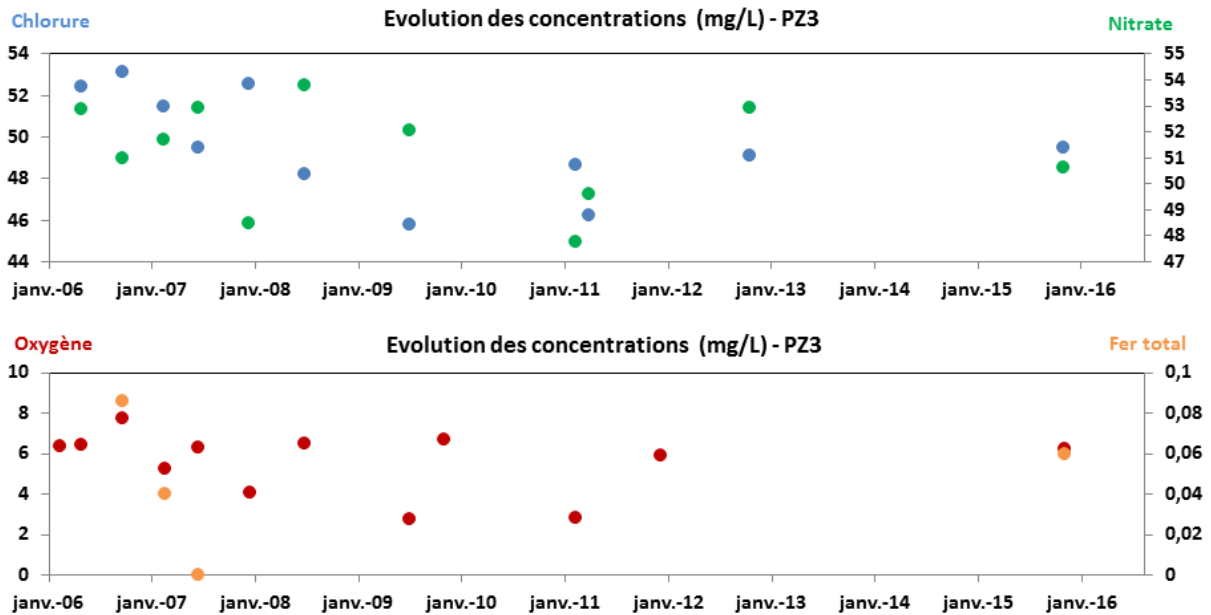


Figure 5.5 Evolution temporelle sur dix ans des concentrations en Cl, NO₃, O₂ et Fer total dans le piézomètre PZ3.

Ces deux suivis démontrent que sur le long terme les conditions chimiques sont très variables dans l'eau de PZ3 alors qu'elles sont très stables dans l'eau de PZ6 à 80m.

3.2.2. Suivi hydrochimique de l'eau des puits PZ3 et PZ6 avant et au début de la recharge

Pour visualiser l'évolution hydrochimique des échantillons d'eau de PZ3 et PZ6 avant et au début de la recharge, la variation des concentrations de éléments chimiques susceptibles d'influencer les communautés microbiennes (NO₃, O₂, Fe total dissous, SO₄, Carbone Organique Total (COT), Carbone inorganique), ou d'informer sur le phénomène de recharge (Na et Cl) est représentée dans la Figure 5.6.

Globalement, les concentrations reflètent bien la différenciation entre PZ3, eau peu minéralisée, plus oxygénée et riche en nitrates, et l'eau de PZ6 qui est beaucoup plus salée, très pauvre en oxygène et en nitrate et qui contient environ 1mg/L de fer total dissous. Dans PZ3 (Figure 5.6A et 5.6B), une baisse de la concentration de tous les éléments (-5% à -150%) sauf du carbone inorganique et du fer total peut être observée entre octobre et novembre 2013. La concentration du carbone inorganique montre une tendance inverse à l'ensemble des autres éléments, alors que la concentration en fer baisse de novembre à décembre (-45%). L'ensemble des éléments montre une augmentation de décembre 2013 à janvier 2014. Les valeurs brutes des concentrations en janvier sont proches ou supérieures à celles des mois d'octobre et septembre. L'augmentation entre décembre et janvier est particulièrement forte pour les concentrations en NO₃, SO₄, Fe, et carbone inorganique (+25 à +250%) qui montrent des valeurs brutes en janvier plus élevées qu'en septembre ou octobre. Dans PZ6, les éléments montrant les concentrations les plus élevées (Figure 5.6C) sont stables tout au long du suivi, sauf en décembre où les concentrations baissent de -50 à -80%. En Janvier, les concentrations de ces éléments redeviennent similaires aux mois de septembre et octobre, voire légèrement supérieures pour le SO₄ et le Cl.

CHAPITRE 5

Les éléments présents en concentrations plus faibles dans PZ6 (Figure 5.6D) montrent des variations différentes. L'oxygène dissous (O_2) et le COT voient leur concentration baisser jusqu'en décembre (-90%) puis augmenter en janvier. La concentration en O_2 augmente fortement en janvier (+70%). Le Carbone inorganique reste relativement stable tout le long du suivi, bien qu'une légère baisse (-10%) soit observée en décembre. Enfin, la concentration en NO_3 est stable jusqu'en novembre puis augmente très fortement en décembre (+4000%). Elle revient à une concentration légèrement inférieure à septembre et octobre en janvier (-15%). Le pic de concentration en NO_3 observée en décembre dans PZ6 est donc transitoire.

L'évolution des concentrations dans l'eau de PZ3 et PZ6 montrent des tendances similaires mais des pourcentages de variations d'ordres différents, ainsi qu'un décalage temporel de l'effet de la recharge sur les conditions chimiques de chaque eau. Dans PZ3, l'effet de la recharge sur les conditions chimiques est observable de novembre à décembre, alors que l'effet dans l'eau de PZ6 n'est visible que transitoirement au cours du mois de décembre.

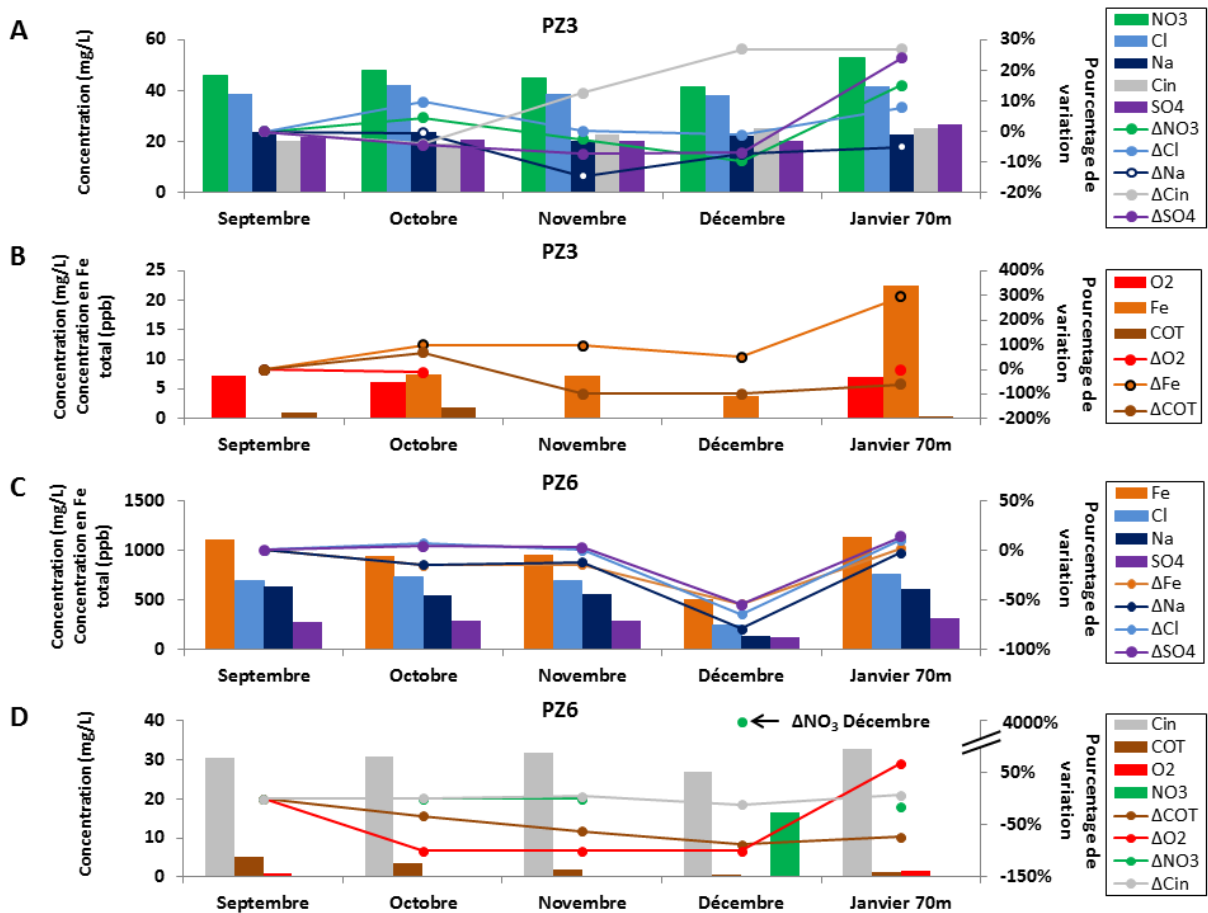


Figure 5.6 Variations temporelles des concentrations des éléments chimiques dans PZ3 et PZ6. Les diagrammes en barres montrent les concentrations (en mg/L pour tous les éléments sauf la concentration pour le fer total dissous qui est en ppb). Les courbes et/ou les points représentent le pourcentage de variation des concentrations au cours du temps par rapport à la première date de prélèvement (les noms des éléments sont précédés par la lettre Δ dans la légende des figures). Pour une question de lisibilité, les éléments sont répartis en 4 groupes représentés séparément. Panneaux A et B : concentrations et pourcentages de variation dans PZ3. Panneaux C et D : concentrations et pourcentages de variation dans PZ6. Pour l'oxygène dans PZ3, seules les mesures de septembre, octobre et janvier sont disponibles. Pour PZ6, seules les valeurs pour le prélèvement à 70m de profondeur sont montrées. Abréviations : Cin = Carbone inorganique, COT : Carbone Organique Total.

CHAPITRE 5

3.2.3. Comparaison de l'évolution des conditions chimiques au cours du temps dans l'eau de PZ3 et PZ6

L'analyse du regroupement des échantillons en fonction de leur similarité chimique (Figure 5.7) montre que les conditions chimiques observées dans PZ3 restent bien distinctes des conditions observées dans PZ6 comme cela a été observé dans la Figure 5.4. Au sein de l'eau de PZ3, les échantillons se regroupent globalement en fonction du temps, sauf l'échantillon de janvier (Figure 5.7, partie gauche, échantillon « PZ3J »). L'échantillon de janvier montre des conditions intermédiaires entre celles observées en novembre et décembre après le début de la recharge, et les conditions observés en septembre et octobre avant la recharge.

Dans PZ6, les échantillons se regroupent aussi en fonction du temps, sauf l'échantillon de décembre qui montre des conditions chimiques bien distinctes de toutes les autres dates. Cet échantillon apparaît être un peu plus proche chimiquement des échantillons de PZ3.

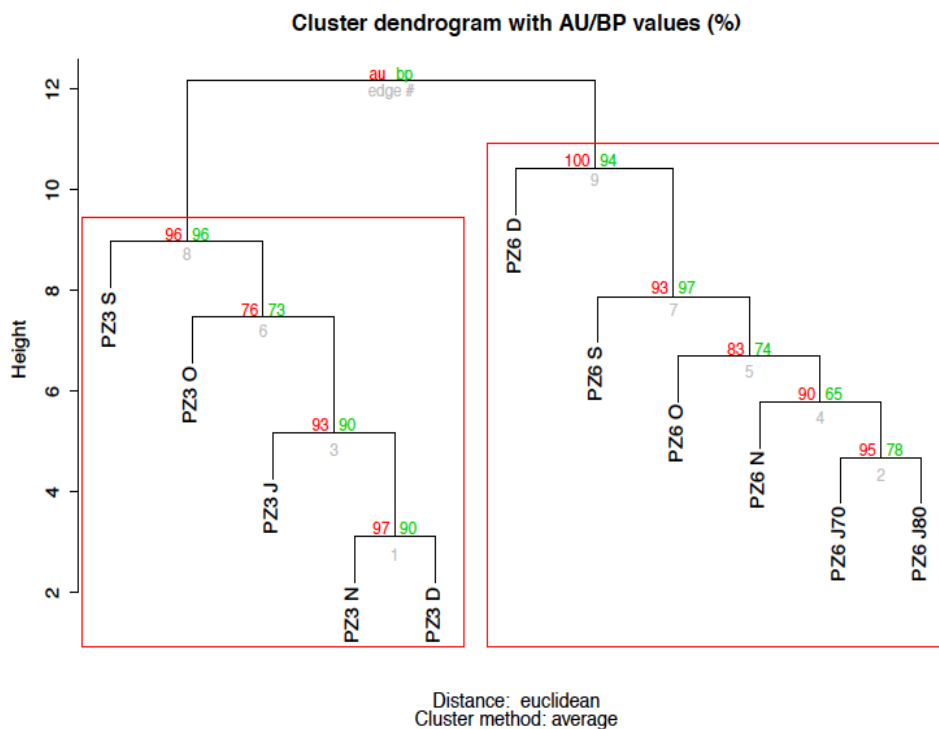


Figure 5.7 Dendrogramme de classification hiérarchique ascendante des différents prélèvements d'eau sur la base des concentrations de tous les paramètres chimiques mesurées dans l'eau des puits de PZ6 et PZ3 de septembre à janvier. Les valeurs au-dessus des nœuds correspondent à des p-values (%) calculées par deux méthodes : la méthode «Approximately Unbiased ('au' en rouge), et la méthode « Bootstrap Probability » (bp en vert). Les cadres rouges indiquent les échantillons d'eau qui se regroupent par similarité avec une p-value de 95% et soulignent que les regroupements obtenus sont fiables. Abréviations : S, prélèvement de septembre (30/09/2013) ; O, prélèvement d'octobre (17/10/2013) ; N, prélèvement de novembre (19/11/2013) ; D, prélèvement de décembre (11/12/2013) ; J70, prélèvement de janvier à 70m (23/01/2014) ; et J80, prélèvement de janvier à 80m (23/01/2014).

CHAPITRE 5

3.2.4. Evolution temporelle de la proportion de mélange de l'eau de PZ6 avec l'eau de PZ3

Le suivi des variations des paramètres hydrochimiques dans PZ6 prélevé en décembre montre une diminution importante des concentrations en éléments chimiques par rapport aux mois précédents et au mois suivant, ce qui indique que le phénomène de recharge engendre un mélange entre l'eau de PZ6 et une ou plusieurs masses d'eaux d'origine différente. A partir des concentrations des gaz anthropiques (CFC) relevées de novembre à janvier dans PZ6 et PZ3, et de certains éléments chimiques présents dans PZ6 en fortes concentrations, la proportion de mélange entre la masse d'eau de PZ6 à 70m et 80m, et une eau de surface de type PZ3 représente environ 60 % considérant les CFC 113 (Figure 5.8). Pour cette estimation, l'échantillon PZ6 du mois de septembre a été pris en référence des concentrations habituellement observées dans PZ6 en dehors de la période de recharge (la proportion de mélange dans PZ6 en septembre est donc nulle). La Figure 5.8 met en évidence une bonne corrélation entre les différents paramètres utilisés pour calculer la proportion de mélange, les estimations basées sur les concentrations en Na, Cl, SO₄ et en CFC-113 étant homogènes. Les concentrations en CFC-11 et CFC-12 basses par rapport au CFC 113 sont vraisemblablement sous-estimées en raison de phénomènes de réaction(s) biogéochimique(s). Le taux de mélange obtenu avant décembre est inférieur à 10% et devient plus faible en janvier à 70m et 80m, alors qu'en décembre le pourcentage de mélange atteint une valeur située entre 60 et 80%.

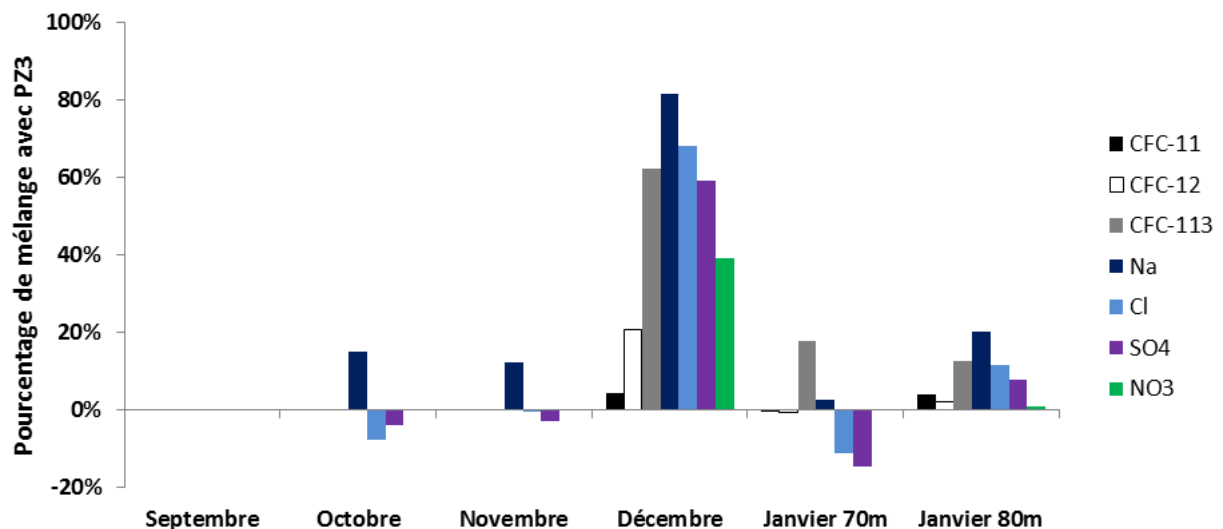


Figure 5.8 Evolution de la proportion de mélange entre l'eau profonde (Pz6 en septembre à 70m) et l'eau de surface (Pz3) au cours du suivi temporel. Les pourcentages indiquent le pourcentage d'eau de PZ3 dans l'eau de PZ6.

Les différentes estimations du pourcentage de mélange manifestent néanmoins des disparités (40 à 80 % de mélange en décembre en excluant les mesures CFC-11 et 12). Malgré ces disparités, toutes les estimations montrent une augmentation importante de la proportion de mélange entre PZ6, PZ3 et d'autres types de masses d'eaux en décembre. Les forts taux de mélange obtenus sur la base de la concentration en NO₃ peut soutenir l'hypothèse d'un

CHAPITRE 5

mélange de PZ6 à 70m avec une eau de surface de type PZ3., alors que les proportions de mélange évaluées à partir des concentrations en Na, Cl et SO₄ tendent à dire que l'eau profonde de PZ6 a aussi subi un mélange avec une masse d'eau autre que celle de PZ3, et ayant déjà transité plus longuement au sein de l'aquifère. Cette masse d'eau pourrait être plus chargée en Na, Cl, SO₄ que l'eau de PZ3, telle que l'eau habituellement retrouvée dans PZ6 à 40m.

L'eau de PZ6 à 40m correspond à une interface avec la masse d'eau salée de PZ6 à 80m et cette zone de transition s'étend jusqu'à une profondeur d'environ 50m. Cette interface a pu subir un abaissement jusqu'à la profondeur de 70m. Une telle anomalie n'a jamais été observée sur PZ6 malgré un suivi hydrologique et chimique sur plusieurs années. L'analyse conjointe des concentrations moyennes en SO₄ et NO₃ au sein des masses d'eau de PZ6 à 40m, de PZ6 à 80m et de PZ3, permet de distinguer la contribution de la partie altérée (eau de type PZ3) et de la partie fissurée (eau de type PZ6 à 40m) dans l'échantillon de PZ6 à 70m en décembre 2013 (Figure 5.9). Sur la Figure 5.9, sont représentées les valeurs moyennes des concentrations en SO₄ et NO₃ issues d'un suivi réalisé depuis 2004 dans PZ3 et dans PZ6 dans la partie non salée (à 40m) et dans la partie salée (à 80m). Ces valeurs moyennes représentent trois pôles de mélange : PZ3, PZ6-40m et PZ6-80m. Les concentrations de SO₄ et NO₃ mesurées durant le suivi temporel dans PZ6 à 70m avant la recharge et au début de la recharge sont comparées à ces concentrations moyennes. On observe clairement que durant le suivi, tous les points de PZ6 à l'exception du point de décembre, se placent proches du pôle PZ6-80m (Figure 5.9). Ceci indique que la partie profonde (≥ 70 m) du puits de PZ6 durant le suivi, sauf au mois de décembre, reste très homogène et représente probablement une alimentation par une eau ayant déjà séjourné longuement dans le milieu fracturé du type de l'eau de PZ6 à 80m. A l'inverse, sur la Figure 5.9 l'échantillon de PZ6 de décembre se place en terme de concentrations en NO₃ et SO₄ à équidistance des trois pôles PZ6-80m ; PZ6-40m et PZ3. Ainsi dans l'échantillon PZ6 de décembre (70 m de profondeur), on observe par rapport aux autres dates du suivi, une forte hausse de la concentration en NO₃ qui traduit une forte influence des eaux de surface récentes du type PZ3, accompagnée d'une diminution de la concentration en SO₄ qui traduit une forte influence des eaux ayant transité plus longtemps dans l'aquifère mais moins chargée en SO₄, du type PZ6-40m. De par la position du point PZ6 de décembre (70m) par rapport à ces trois pôles de mélange, on déduit que les contributions de PZ3, PZ6-40m et PZ6-80m dans l'échantillon PZ6 de décembre correspondrait à 36%, 32% et 32% respectivement. Ces estimations sont cohérentes avec les taux de mélange d'environ 60% calculés à partir des concentrations en Cl, SO₄ et CFC-113 (Figure 5.8) qui montrent un cumul des contributions des pôles PZ6-40m et PZ3 dans PZ6 à 70m. C'est aussi cohérent avec la proportion de mélange de 38% obtenue à partir de de la concentration en NO₃ qui pourrait signer la contribution du pôle PZ3 (Figure 5.8). Ceci peut ainsi expliquer la hausse importante et très ponctuelle de la concentration en NO₃ observée au sein de PZ6 en décembre à 70m.

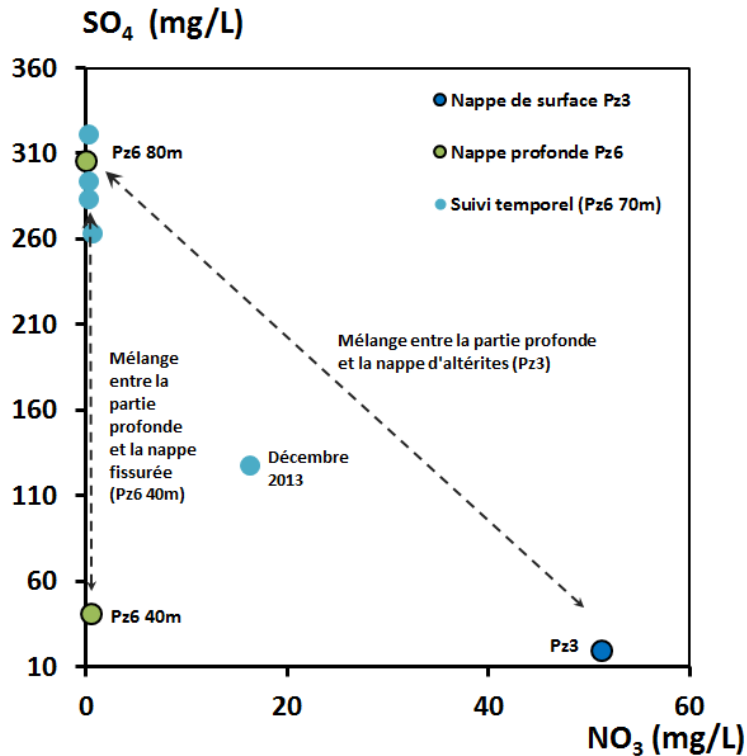


Figure 5.9 Evolution des concentrations en NO₃ et SO₄ durant le suivi microbiologique temporel et comparaison avec les concentrations moyennes relevées sur plusieurs années dans l'eau de PZ6 à 80m, PZ6 à 40m, et dans le piézomètre de surface à Betton PZ3. Chaque point vert ou bleu foncé représente la moyenne d'une masse d'eau entre 2004 et 2016. Les points en bleu clair représentent les prélèvements de PZ6 à 70m au cours du suivi temporel ; les points en bleu foncé les conditions chimiques moyennes des masses d'eau situées dans la zone altérée ; les points en vert les conditions chimiques moyennes des piézomètres puisant dans la nappe profonde. Les doubles flèches en pointillés représentent les droites de mélange binaire entre deux types de masse d'eau.

3.3. Suivi de la composition des communautés microbiennes de l'eau des puits PZ6 et PZ3 au cours du temps durant la transition hydrologique entre les périodes de décharge et recharge

3.3.1. Dynamique de la structure des communautés

Au total, environ 33 150 000 de séquences ont été obtenues dans les différents prélèvements d'eau de PZ6 et PZ3 de septembre à janvier. Parmi ces séquences, environ 14 730 000 sont assignées au règne des bactéries et environ 150 800 au règne des archées. Afin d'examiner les similitudes de structure de communautés des différents points prélevés au cours du temps dans PZ6 et PZ3, une analyse NMDS a été réalisée à partir des abondances relatives des séquences assignées à chaque taxon (Figure 5.10A). Cette analyse montre que les échantillons d'eau de PZ3 restent bien distincts des échantillons d'eau de PZ6. Au sein des échantillons de PZ3, les triplicats d'échantillonnage de chaque échantillon restent plus similaires entre eux qu'entre deux dates. Les différentes dates de prélèvements de l'eau de PZ3 affichent des structures de communautés bien distinctes les unes des autres.

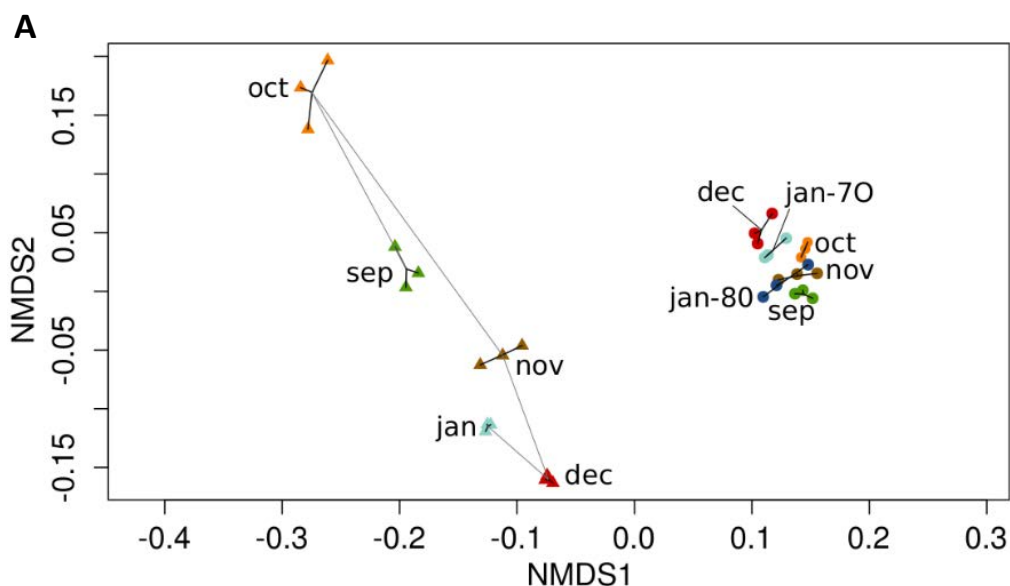
CHAPITRE 5

Au sein des échantillons de PZ6, les échantillons de chaque date sont très similaires entre eux, et il n'est aussi pas possible de distinguer les différences de structure de communautés entre de nombreux répliquats de septembre, octobre, novembre et janvier (prélèvement à 80m). Les échantillons d'eau de PZ6 prélevés en décembre et janvier (à 70m) semblent un peu différents par rapport à ceux de septembre, octobre, novembre et janvier (à 80m). Afin de confirmer et préciser ces résultats, une analyse de classification hiérarchique ascendante (« Hierarchical clustering ») a été réalisée à partir de l'abondance relative des séquences assignées à chaque taxon (Figure 5.10B).

La Figure 5.10B confirme les résultats de l'analyse NMDS et la différenciation des communautés microbiennes entre PZ3 et PZ6. La classification hiérarchique des communautés (Figure 5.11B) montre aussi pour PZ6, deux sous-groupes : l'un regroupant les prélèvements de décembre et janvier-70m, l'autre regroupant les échantillons des quatre autres prélèvements. A l'intérieur de ce deuxième sous-groupe, les communautés semblent avoir des structures très similaires et on ne retrouve pas de structuration temporelle.

Au sein de PZ3, les échantillons prélevés aux différentes dates se distinguent facilement les uns des autres : les répliquats biologiques se regroupent tous par date de prélèvement. Néanmoins, les échantillons prélevés en octobre et décembre sont plus similaires entre eux en termes de structure de communauté, et se rapprochent dans une certaine mesure des prélèvements de PZ3 en janvier.

Ces premiers résultats démontrent donc que la structure des communautés évolue plus sensiblement dans PZ3 que dans PZ6 : la structure de communauté évolue de novembre à janvier dans PZ3, et de décembre à janvier dans PZ6 à 70m.



CHAPITRE 5

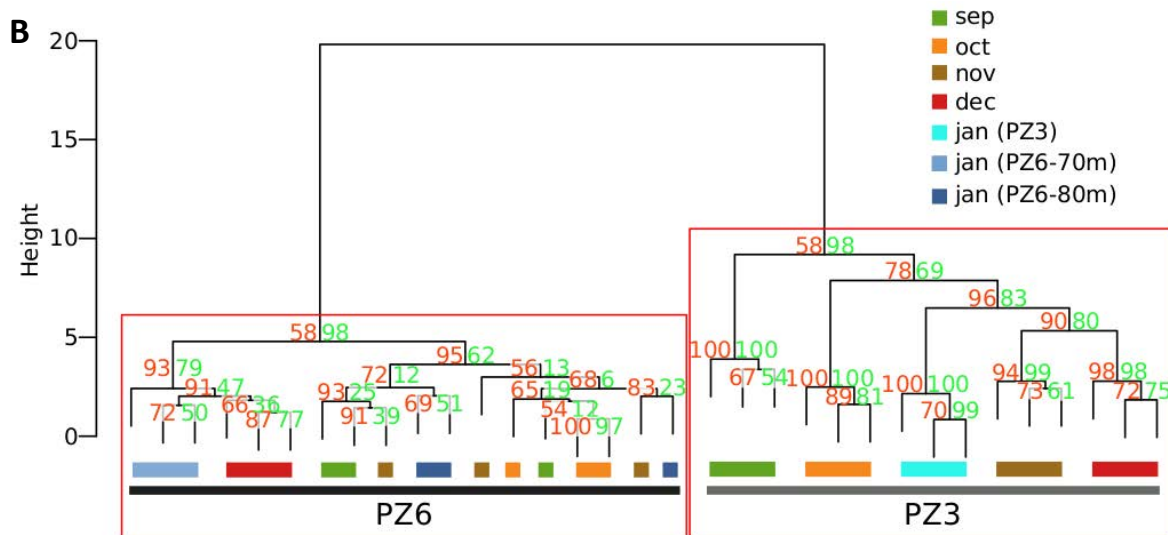


Figure 5.10 A : Évolution temporelle de la structure des communautés microbiennes dans PZ3 et PZ6 (Non Metric Multidimensional Scaling, transformation : Chord ; distance : Bray-Curtis). B : Classification hiérarchique ascendante des échantillons d'eau souterraine basée sur la composition taxonomique des communautés microbiennes (clusterisation hiérarchique ; taxa montrant une proportion > 1‰ dans au moins un échantillon ; transformation de Chord ; distance : euclidienne ; clusterisation : « ward » ; nombres en rouge : *p*-values AU (Approximately Unbiased) ; nombres en vert : *p*-values basées sur du bootstrap avec 100 réplifications ; les rectangles rouges encadrent les deux principaux clusters avec des *p*-values basées sur du bootstrap ≥ 98).

3.3.2. Evolution de la composition taxonomique au cours du temps

Pour décrire la structure des communautés dans les échantillons prélevés, une représentation de la composition des communautés microbiennes dans les échantillons prélevés, de l'abondance relative des séquences assignées à chaque taxon et de leur variation est présentée dans la Figure 5.11. Tous les échantillons de PZ3 et PZ6 présentent une prédominance de Proteobacteria, en particulier de Betaproteobacteria (Figure 5.11A). Les Proteobacteria montrent un pic d'abondance en octobre puis rechutent jusqu'en décembre dans PZ3 et PZ6. Une rupture dans la structure des communautés est observable dans PZ3 entre octobre et novembre alors que cette rupture a lieu entre novembre et décembre dans PZ6. Cette rupture indique un changement des communautés caractérisé par une baisse de l'abondance relative des séquences de Betaproteobacteria, qui est aussi liée à l'augmentation de la proportion de séquences non assignées. Quel que soit l'échantillon, la variation de la proportion de Proteobacteria est aussi liée à l'augmentation de l'abondance relative de séquences sans classification taxonomique (séquences non assignées ou sans correspondance avec la base de données du NCBI) (Médaille de la Figure 5.11A).

La variation des proportions est plus importante dans PZ3 que dans PZ6 (Figure 5.11B) : l'amplitude des variations est de -75% à +125% dans PZ3, alors qu'une remarquable stabilité est observée dans PZ6 (Figure 5.11B). Dans PZ3, la variation de l'abondance relative concerne l'ensemble des taxa tandis que dans PZ6 elle ne concerne que les Betaproteobacteria qui varient de -20% à +35%. Dans PZ3, les proportions des différents taxa commencent à varier différemment les uns des autres à partir de novembre alors que les variations restent très homogènes d'un taxon à un autre dans PZ6.

CHAPITRE 5

Ces résultats montrent de manière très claire que la composition taxonomique des communautés et les proportions des différents taxa varient de manière très différente dans PZ3 et PZ6, et que le groupe des Betaproteobacteria est le plus affecté par la recharge dans PZ6. Les échantillons de PZ6 présentent une composition des communautés stable dans le temps.

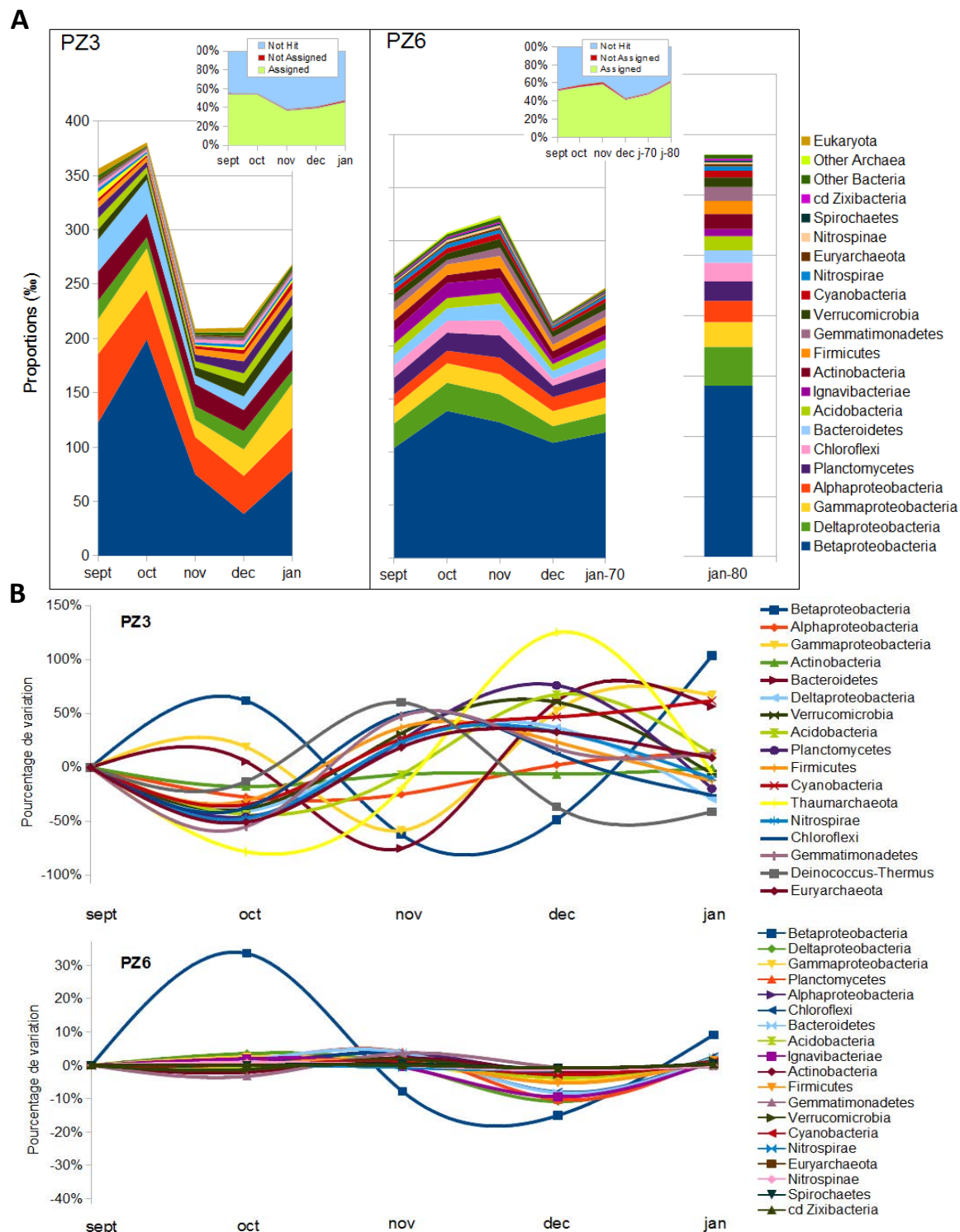


Figure 5.11 A : Variation de la proportion moyenne (en %) des principaux phyla de micro-organismes dans les métagénomes. Seuls les phyla dont la proportion est supérieure à 1 ‰ du nombre total de séquences sont représentés. Les autres phyla sont regroupés dans les catégories Other Bacteria, Other Archaea et Eukaryota. En médaillon sont représentés les pourcentages de séquences sans hit (pas de séquence similaire dans la base de données NR), sans assignation taxonomique et avec une assignation taxonomique. Abréviations : j-70

CHAPITRE 5

= janvier 70m, j-80 = janvier 80m. B : Pourcentages de variation de la proportion des principaux phyla de micro-organismes au cours du temps. Seuls les phyla dont la proportion est supérieure à 1 ‰ du nombre total de séquences sont représentés. Pour PZ6, la date de janvier correspond uniquement au prélèvement fait à 70m de profondeur. Pour faciliter la lecture des graphes, les ordonnées ont une échelle différente..

3.3.3. Evolution de la composition en genres au sein des Betaproteobacteria

La Figure 5.12 présente l'abondance relative des différents genres de Betaproteobacteria détectés dans les échantillons de PZ6 et PZ3. Cette figure montre qu'à l'échelle des Betaproteobacteria, les échantillons de PZ3 sont très différents des échantillons de PZ6 de septembre à janvier (Figure 5.12A et 5.12B). Elle démontre aussi que la composition taxonomique des Betaproteobacteria varie beaucoup dans PZ3 par opposition à PZ6, tout comme la proportion globale des Betaproteobacteria.

Au niveau de l'évolution de la composition taxonomique des échantillons de PZ3, les échantillons de septembre et octobre montrent des similitudes avec une prédominance de *Rhodoferrax* et la présence de *Curvibacter*. L'échantillon de novembre s'en rapproche par la présence de *Rhodoferrax*. Il diffère aussi par une proportion importante de *Microvirgula*. L'échantillon de PZ3 en décembre diffère de tous les autres : il présente le plus faible nombre de genres et une forte proportion de *Burkholderia*, *Polaromonas*, *Variovorax* et *Sulfuritalea*.

La composition taxonomique des Betaproteobacteria des différents échantillons de PZ6 est très similaire d'une date à une autre : tous les échantillons présentent une très grande proportion de Gallionellaceae (formés par l'ensemble *Sideroxydans*, *Gallionella* et *Ferriphasselus* qui représentent de 48% à 60% des séquences). Les différentes dates se distinguent principalement par la variation de la proportion de Gallionellaceae : celle-ci est maximale en septembre, elle décroît jusqu'en décembre, puis retrouve le même niveau qu'en septembre en janvier à 70m. La proportion de *Sulfuritalea* dans PZ6 est moins importante et évolue inversement à la proportion de Gallionellaceae : elle est de 7% en septembre et augmente à 15% en décembre, puis retombe à environ 8% en janvier à 70m et 80m. D'autres taxa sont également présents dans PZ6 en proportion plus faible, et ne varient pas ou très peu dans le temps comme *Burkholderia*, *Polaromonas*, *Sulfuricella* et *Candidatus Accumulibacter*.

CHAPITRE 5

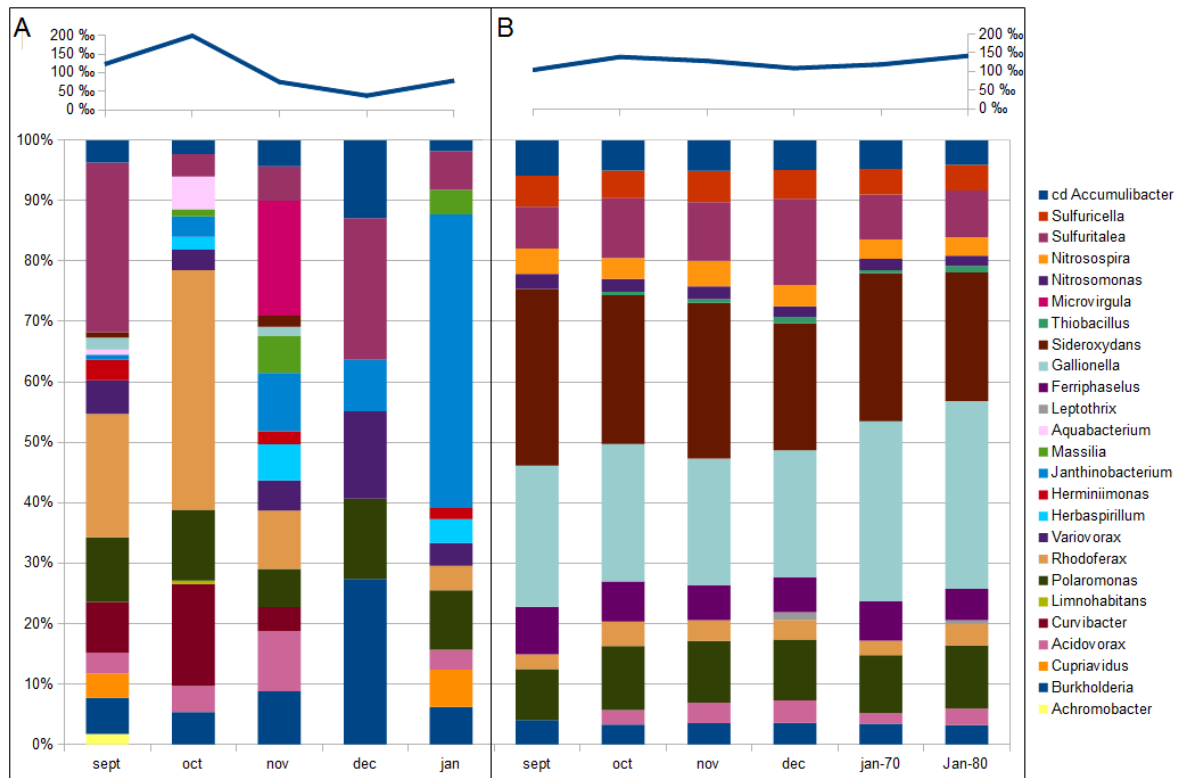


Figure 5.12 Evolution temporelle de la proportion (en % par rapport au nombre de séquences de Betaproteobacteria) des différents genres de Betaproteobacteria détectés dans les métagénomes issus de PZ3 (A) et PZ6 (B). La courbe bleue montre la proportion de séquences assignées aux Betaproteobacteria. Abréviations : cd Accumulibacter désigne *Candidatus Accumulibacter*.

4. Discussion

4.1. Variations hydrochimiques au cours du temps

Les résultats présentés dans ce chapitre démontrent que la durée pendant laquelle la recharge a un effet visible sur les conditions chimiques est plus courte dans PZ6 (décembre) que dans PZ3 (novembre à décembre). L'effet de la recharge est aussi visible de façon décalée dans le temps, puisqu'il est d'abord visible dans PZ3 puis dans PZ6. Ces différences traduisent une exposition retardée et ponctuelle de la partie profonde de l'aquifère de Betton à l'arrivée d'eaux de surface, alors qu'elles suggèrent des apports d'eau de surface quasi-immédiats et réguliers, voire continus dans la partie peu profonde des aquifères.

A l'échelle du suivi temporel de septembre à janvier, l'amplitude avec laquelle les éléments chimiques varient au cours du suivi est plus importante dans PZ6 (70m) par rapport à PZ3, en particulier en décembre. Les pourcentages de variation moins importants des éléments chimiques suite à l'arrivée d'eau de surface dans PZ3 peuvent être reliés aux circulations continues et importantes d'eau dans la zone altérée de l'aquifère où se situe PZ3. Ces circulations peuvent en effet permettre un mélange permanent et important entre la masse d'eau déjà présente dans les altérites et l'eau de surface nouvellement incorporée à l'aquifère. Dans la partie fracturée de l'aquifère où se situe PZ6, les arrivées importantes d'eau de surface sont plus ponctuelles et donc plus visibles au niveau des conditions chimiques de PZ6 à 70m. En dehors de ces arrivées importantes d'eau de surface et de la période de recharge, des apports beaucoup plus limités (< 5% d'eau récente) mais plus réguliers semblent survenir. Le phénomène de recharge semble donc modifier les apports d'eau de surface dans la partie profonde.

Que ce soit dans l'eau de PZ3 ou de PZ6, les conditions chimiques en janvier redeviennent relativement similaires aux conditions de septembre, en dépit du changement hydrochimique important observé en décembre. Ce retour aux conditions initiales pourrait être lié dans PZ3 à la saturation du sol en eau à partir du mois décembre, lorsque les précipitations s'intensifient. Cette saturation du sol permettrait en effet le transfert dans l'eau souterraine de solutés du sol qui s'y sont concentrés pendant toute la période de décharge. Dans PZ6, d'autres phénomènes tels que l'apport plus important au sein de PZ6 de masse d'eau souterraine ayant déjà transité relativement longtemps dans l'aquifère, pourraient aussi expliquer le retour à des conditions chimiques proches de celles de septembre.

Les résultats présentés permettent d'argumenter que la partie profonde de l'aquifère de Betton constitue un système relativement fermé mais qui n'est pas complètement isolée des eaux de surface. Par opposition les variations hydrochimiques dans PZ3, confirme que cette masse d'eau fait partie d'un système de circulation rapide, très connecté avec la surface et qui subit de forts renouvellements au cours des recharges annuelles.

4.2. Interprétation des changements de structures de communauté microbienne au cours du temps

La composition des communautés microbiennes aux différentes dates de prélèvement a montré dans PZ3 et PZ6 une diversité de fonctions potentielles.

Dans l'eau de PZ3, plusieurs processus ont sans doute lieu en même temps et des microorganismes potentiellement dénitrifiants (e.g. *Microvirgula*, *Burkholderia*) et/ou hétérotrophes (*Janthinobacterium*, *Herbaspirillum*, *Massilia*) sont détectés en fortes proportions tout au long du suivi. Des travaux précédents (Vergnaud, 2005 ; Vergnaud et al., 2006) ont montré qu'un processus de dénitrification autotrophe peut avoir lieu dans les altérites de l'aquifère de Betton. Ce processus de dénitrification autotrophe serait lié à une oxydation du soufre. Néanmoins, après la perturbation des conditions chimiques liée à la recharge dans PZ3, la baisse des NO₃ de septembre à décembre et l'augmentation des concentrations en fer dissous et SO₄ en janvier suggèrent un processus de réduction des NO₃ puis d'oxydation du soufre et du fer dans PZ3, ces derniers étant liés à l'apport d'O₂ par le processus de recharge. Au sein de PZ3, des microorganismes régulièrement identifiés dans des processus d'oxydation du soufre sont retrouvés comme *Sulfuritalea* et *Sulfuricella* (Watanabe et al., 2014). La succession des processus de réduction des NO₃ puis d'oxydation du soufre et d'oxydation du fer via une dissolution de pyrite, pourrait permettre la mise en place de conditions favorables au développement de microorganismes capables d'oxyder le Fer(II) tels que les Gallionellaceae. Les Gallionellaceae sont présentes en faibles proportions dans l'eau de PZ3 en septembre et novembre mais ne sont plus détectés à partir de décembre jusqu'en janvier.

Au sein de PZ6, la perturbation chimique liée au phénomène de recharge est importante mais ponctuelle et transitoire, elle n'est visible chimiquement qu'en décembre. L'évolution des communautés microbiennes au cours du suivi temporel dans PZ6 montre qu'en dépit du changement important des conditions chimiques et de l'origine de l'eau (phénomène de mélange avec l'eau de PZ6 à 40m et l'eau de type PZ3), l'abondance des Gallionellaceae – spécialisées dans l'oxydation du Fer(II) et largement prédominantes dans PZ6 - semble peu affectée. De façon intéressante, l'abondance des Gallionellaceae au cours du suivi temporel dans PZ6 tend à diminuer progressivement lorsque la concentration en O₂ devient nulle (octobre à décembre) et réaugmente avec l'augmentation de la concentration en O₂ en janvier à 70m. Cette tendance indique qu'une concentration en O₂ trop faible ou nulle dans PZ6 pourrait être un élément transitoirement limitant pour le développement des Gallionellaceae. Le phénomène de recharge est susceptible de provoquer une intrusion d'eau de surface plus oxygénée dans PZ6, ainsi le taux de mélange avec PZ3 calculé dans PZ6 (70m) en décembre est de 36%. Pourtant on peut noter les faibles concentrations en O₂ dans PZ6. Cet O₂ étant une espèce chimiquement très réactive, ces faibles concentrations pourraient être le résultat de processus d'oxydation abiotique telle que l'oxydation du fer. Si un tel processus avait lieu transitoirement dans PZ6, il pourrait également expliquer la diminution progressive de l'abondance des Gallionellaceae au cours du suivi temporel de septembre à décembre. En effet, l'oxydation abiotique du fer via l'O₂ est plus compétitive que l'oxydation biotique du fer par les Gallionellaceae.

CHAPITRE 5

La dynamique des communautés microbiennes au sein de PZ3 et PZ6 reflète bien le constat que l'eau de PZ3 et l'eau de PZ6 appartiennent à des systèmes de circulation complètement différents. Dans PZ3 la structure des communautés change nettement dès novembre, qui est le mois marquant les premiers apports de la surface dans PZ3. Dans PZ6, la rupture dans la structure de la communauté microbienne n'est observée qu'au mois de décembre durant lequel les changements chimiques majeurs sont constatés. Le décalage temporel et la différence de durée pendant laquelle l'effet de la recharge est observé sur la structure des communautés dans PZ6 et PZ3, va bien dans le sens d'un système relativement ouvert, avec des circulations hydrologiques suffisamment rapides pour modifier rapidement les masses d'eau dans PZ3 ; et d'un système plus isolé dans PZ6.

Par ailleurs, une différence notable entre la dynamique temporelle des communautés observées dans PZ3 et dans PZ6 est la différence de structure de communauté entre septembre et janvier. Dans l'eau de PZ3, la structure de la communauté microbienne en janvier, en particulier au niveau des Betaproteobacteria, reste très différente de la communauté observée en septembre alors que l'amplitude de la variation des conditions chimiques de septembre à janvier dans PZ3 est moins importante que dans PZ6. Les éléments chimiques montrant les plus grandes variations en janvier par rapport à septembre et décembre sont les éléments chimiques réactifs : NO_3 , SO_4 , carbone inorganique, carbone organique total et fer dissous, constituant potentiellement des sources d'énergie ou de carbone pour les microorganismes. Ces variations vues comme contraintes de forçage environnementales pourraient expliquer les différences dans la structure des communautés entre septembre et janvier. Les différences observées dans les communautés entre septembre et janvier est aussi une conséquence de changements qui s'accumulent à chaque pas de temps lié certes aux conditions environnementales (modification de la composition des masses d'eaux), mais aussi potentiellement aux interactions biotiques au sein de la communauté de microorganismes et aux processus de régulation virale.

Les différences de structure de communauté dans PZ3 au cours du temps sont cohérentes avec les résultats de l'étude de Lin et al, (Lin et al., 2012) sur la dynamique des communautés dans la zone altérée d'un aquifère durant dix mois. Cette étude a en effet montré comme dans PZ3, que la structure des communautés au cours du temps ne ressemblait pas ou peu aux structures de communautés observées aux dates précédentes.

Par opposition à PZ3, la structure des communautés affiche une plus grande stabilité temporelle dans PZ6 à 70m. La communauté microbienne observée en janvier est proche de celle de septembre. Les structures de communautés de PZ6 au cours du temps manifestent ainsi une stabilité, avec une communauté qui rejoint son état initial (structure de communauté de septembre) après la perturbation (structure de communauté de janvier). Les mélanges de masses d'eaux mis en évidence affectent de manière modeste la structure des communautés dans PZ6 notamment quand on considère l'abondance des Gallionellaceae. Les Gallionellaceae semblent parvenir à maintenir une certaine stabilité et résistent aux variations brutales et ponctuelles des conditions chimiques dans PZ6.

Ainsi, les microorganismes composant l'écosystème dans la zone fracturée à Betton semblent très adaptés aux contraintes locales de l'environnement. Ceci suggère qu'il pourrait s'agir de microorganismes spécialistes très compétitifs pour coloniser ce milieu particulier. Comme le

CHAPITRE 5

milieu profond est assez constant dans ses contraintes une variation ponctuelle assez courte dans le temps et un retour aux conditions initiales peut expliquer la résistance observée de l'écosystème. Néanmoins, nous ne pouvons pas exclure qu'un grain d'échantillonnage plus fin (hebdomadaire par exemple) pourrait mettre en évidence des modifications profondes de communauté en lien avec le phénomène de recharge et dans ce cas les observations que nous avons réalisées pourraient être une conséquence d'un phénomène de résilience de l'écosystème microbien (retour à un état proche de l'état initial avant perturbation).

5. Conclusion

Cette étude a permis de montrer que les eaux souterraines constituent des environnements relativement stables chimiquement à l'échelle de plusieurs années, mais qui sont cycliquement exposés à des perturbations au cours du temps notamment lors du phénomène de recharge. La modification des flux hydrologiques entraîne des perturbations telles que des variations chimiques dans les eaux souterraines. Ces variations impactent directement la composition et la structure des communautés microbiennes des eaux souterraines.

Dans la zone altérée, l'eau souterraine fait partie d'un système de circulation ouvert et subit des renouvellements fréquents. Les communautés microbiennes retrouvées dans cette zone semblent très changeantes, leur composition et l'abondance des différents taxa semble changer complètement au plus fort de la variation des conditions chimiques. Cependant une fraction des taxa semble subsister après la perturbation, suggérant une stratégie de type généraliste (niche écologique large) conférant une capacité à faire face aux changements fréquents et à se maintenir dans le milieu.

Dans la zone fracturée, l'eau souterraine fait partie d'un système plus fermé mais pas complètement hermétique. L'eau souterraine dans cette zone semble percevoir régulièrement des apports très limités d'eau de surface en dehors de la période de recharge. Dans la zone fracturée au début de la recharge, un changement des conditions chimiques ponctuel mais important a lieu, pourtant la structure des communautés dominée par les Gallionellaceae montre une certaine stabilité entre le début et la fin du suivi. La proportion importante des Gallionellaceae dans cette zone fracturée indique que l'oxydation biotique du Fer(II) y constitue un processus majeur, vraisemblablement à la base de l'écosystème qui s'y développe.

CHAPITRE 6 – DISCUSSION, CONCLUSION ET PERSPECTIVES

1. Importance de l'étude de l'écosystème microbien au sein des eaux souterraines en Bretagne

En Bretagne, les nappes d'eau exploitées sont en grande majorité des eaux souterraines peu profondes : 70% des puits recensés ne dépassent pas 12m de profondeur. L'intensification de l'agriculture et la spécialisation de la région dans l'élevage porcin sont à l'origine des forts taux de pollution observés dans les eaux souterraines peu profondes. La pollution azotée au travers des épandages de fertilisants organiques (lisier, fumier,...) constitue la pollution diffuse la plus importante en Bretagne, et elle est souvent accompagnée d'autres pollutions diffuses comme les résidus de pesticides (atrazine par exemple). Le sous-sol breton est particulièrement vulnérable aux pollutions car composé d'un socle à roche dure dans lequel l'eau circule principalement au travers de fractures. Ces fractures peuvent dans certains cas permettre un transfert rapide du polluant vers la partie profonde de l'aquifère. L'apport régulier ou non de nitrate et/ou de carbone organique en quantité importante dans les eaux souterraines est susceptible de perturber les cycles du carbone et de l'azote, ainsi que la composition et l'abondance des espèces microbiennes naturellement présentes dans les aquifères. A partir des années 90, la mise en place et l'exploitation de forages profonds (supérieurs à 100m) ont rendu possible les recherches et la compréhension du fonctionnement hydrologique et géochimique de cette partie profonde des aquifères. L'exploration de l'écosystème microbien souterrain n'en est aujourd'hui qu'à ses débuts, et les eaux souterraines d'aquifères sont régulièrement rapportées comme étant de grands réservoirs de biodiversité, avec une fraction importante de microorganismes encore jamais décrits (Jägevall et al., 2011 ; Wrighton et al., 2012 ; Nyysönen et al., 2013 ; Castelle et al., 2013). Aujourd'hui de nombreuses questions concernant cet écosystème restent en suspens :

- la biodiversité de l'écosystème des eaux souterraines et les facteurs qui la contrôlent à grande échelle sont encore très mal caractérisés, à l'état naturel comme dans le cas des pollutions diffuses et *a fortiori* dans la partie profonde des aquifères.

comprendre le fonctionnement de l'écosystème souterrain et les stratégies assurant son maintien dans les eaux souterraines permettraient la compréhension du processus d'atténuation des polluants par les communautés microbiennes naturelles des eaux souterraines. Aujourd'hui l'exposition et la vulnérabilité de l'écosystème microbien dans les eaux souterraines profondes des aquifères (au-delà de 70m de profondeur) aux fortes concentrations en nitrate des eaux souterraines moisis profondes demeurent inconnues.

- l'influence des apports cycliques de solutés du sol notamment lors de la recharge, sur la composition et l'abondance dans le temps des taxons microbiens de l'eau souterraine plus ou moins profonde est peu documentée. En outre, la résilience de cet écosystème face à ces perturbations régulières d'ampleur variable reste à évaluer.

2. Apport de nos travaux à la connaissance de l'écosystème microbien des eaux souterraines d'aquifères

L'ensemble des travaux réalisés au cours de cette thèse constituent la première caractérisation des communautés microbiennes des eaux souterraines de trois aquifères bretons géographiquement distants : Betton, Ploemeur et Saint-Brice-En-Coglès (Chapitre 3). Ces trois aquifères ont montré une grande diversité d'OTU malgré l'isolement avec la surface et l'oligotrophie. Ces aquifères sont caractérisés par des lithologies et des circulations hydrologiques bien distinctes, et pourtant des similitudes significatives dans la structure des communautés microbiennes ont pu être observées. Ces similitudes sont retrouvées par deux approches différentes aussi bien au niveau des communautés microbiennes actives (approche basée sur l'analyse des ARNr extraits) qu'au niveau des communautés microbiennes totales (approches basées sur l'ADN total extrait). Sur la base des similitudes entre les différentes structures de communautés microbiennes, deux types de structure de communauté ont pu être distingués :

- Une structure de communauté correspondant à des eaux dites « anciennes » présentant un temps de résidence supérieur à 40 ans, des concentrations en fer dissous supérieure à 0,5mg/L, et en oxygène dissous inférieures à 0,5mg/L

- Une autre structure correspondant à des eaux dites « récentes » présentant un temps de résidence inférieur à 20 ans, des concentrations en nitrate généralement supérieures à 40mg/L et en oxygène dissous supérieures à 3mg/L.

Les conditions hydrochimiques et tout spécialement les concentrations en oxygène dissous, en fer dissous et en nitrates se sont révélées être des contrôles majeurs du type de communautés observé au sein des eaux souterraines investiguées, surtout dans le cas des communautés actives. La concentration en sulfate pourrait également jouer un rôle sur la structure des communautés de certaines eaux, comme celle du puits MF1 à Ploemeur. Cette eau peu profonde quasi-anoxique et qui présente un temps de résidence plus long que ces homologues de surface (environ 25 ans), présente des caractéristiques intermédiaires entre les eaux récentes et anciennes, et a été le siège passé d'une dénitrification autotrophe basée sur une oxydation du soufre selon des données isotopiques ($\delta^{34}\text{S}$). Cependant le cycle du soufre, souvent cryptique dans l'environnement du fait des nombreuses formes très réactives et des sources diverses (minérale, marine, météoritique) du soufre, n'a pu être démontré par notre approche microbiologique dans les eaux souterraines investiguées.

Toutes les eaux analysées sur les trois aquifères présentent en grande proportion de bactéries appartenant à la classe des β -proteobactéries. Cependant, les β -proteobactéries identifiées dans les eaux récentes n'appartiennent pas aux mêmes familles que les β -proteobactéries identifiées dans les eaux anciennes. Les eaux récentes sont dominées par les familles des Comamonadaceae et Oxalobacteraceae, versatiles et capables de réduire les nitrates, alors que

CHAPITRE 6

les eaux anciennes présentent spécifiquement une proportion importante de Gallionellaceae, microaérophiles et spécialisées dans l'oxydation du fer ferreux.

L'abondance particulière de potentiel réducteurs de nitrates dans les eaux récentes exposées à de fortes contaminations en nitrate semble indiquer que la pollution en nitrate contraint considérablement les communautés microbiennes des eaux souterraines peu profondes. A l'inverse, les faibles concentrations en nitrate et l'abondance plus faible de potentiels réducteurs de nitrate dans les eaux souterraines anciennes semblent confirmer que la partie profonde des aquifères reste relativement préservée des pollutions en nitrate.

La proportion des mêmes spécialistes de l'oxydation du fer dans les zones profondes d'aquifères différents suppose une modification des donneurs d'électron en profondeur, aboutissant à une lithoautotrophie basée sur le fer. Cette lithoautotrophie pourrait constituer la base de l'écosystème profond, cependant elle est soumise à une arrivée minimale d'eau plus riche en oxygène afin de soutenir l'oxydation du fer (Chapitre 4). Le taux de mélange entre les masses d'eaux récentes oxygénées s'écoulant de la surface et les masses d'eaux anciennes anoxiques et minéralisées, a montré une forte corrélation positive avec l'abondance des oxydants du fer dans les eaux anciennes, jusqu'à un certain taux de mélange (20% d'eau récente au maximum). Le taux de mélange de ces masses d'eaux et donc la connexion de la zone profonde de l'aquifère avec la surface pourrait ainsi être un des leviers du maintien de l'écosystème microbien profond dans les aquifères. Ces deux chapitres laissent donc supposer que les flux hydrologiques représentent un forçage particulier induisant des gradients d'accepteurs et de donneurs d'électrons qui seraient moteurs, au moins en partie, de l'assemblage des communautés observées (Figure 6.1).

Le phénomène de recharge annuelle pourrait être un des mécanismes assurant une arrivée cyclique (au moins annuelle) de donneurs et accepteurs d'électrons via l'incorporation d'une fraction d'eau récente oxygénée (potentiellement contaminée en nitrate) dans la partie profonde et plus isolée des aquifères (Chapitre 5). Les travaux présentés dans le chapitre 5 ont permis de mettre en évidence une certaine résilience au niveau des structures de communauté microbienne dans la partie profonde et isolée des aquifères durant la transition entre les périodes de décharge et de recharge. L'écosystème de PZ6, situé dans la partie fracturée de l'aquifère de Betton, est dominé par les Gallionellaceae et reste relativement stable malgré des perturbations transitoires fortes au moment de la recharge (jusqu'à 60% d'autres masses d'eau dans PZ6 à 70m en décembre 2013). Les Gallionellaceae résistent aux variations chimiques dans PZ6, peut-être via la formation d'un biofilm. Etant donné la forte proportion de Gallionellaceae tout au long du suivi temporel, la zone fracturée de l'aquifère de Betton est probablement le siège d'un processus d'oxydation du fer.

Dans la zone altérée des aquifères, la structure des communautés est très changeante, elle change presque entièrement même si quelques taxa montrent une certaine résistance à la perturbation. La variation au cours du temps de la composition taxonomique dans PZ3, qui est un puits situé dans la zone altérée de l'aquifère de Betton, pourrait constituer une variation adaptative de la communauté aux conditions chimiques fluctuantes de ce milieu. Par ailleurs, dans PZ3 même lorsque la communauté microbienne change, les taxa majoritairement rencontrés restent des microorganismes hétérotrophes et potentiellement dénitrifiants. Des travaux précédents ont montré que la zone altérée à Betton est le siège d'un processus de

CHAPITRE 6

dénitrification. Que ce soit dans la zone altérée (PZ3) ou dans la zone fracturée (PZ6) de l'aquifère de Betton, plusieurs taxons sont susceptibles d'accomplir les mêmes fonctions : *Gallionella*, *Sideroxydans*, *Ferriphaselus* dans la zone fracturée peuvent tous oxyder le Fer(II) ; *Burkholderia*, *Sulfuritalea*, *Polaromonas* dans la zone altérée peuvent tous dénitrifier. Cette observation montrent que les écosystèmes de la zone altérée et de la zone fracturée dans l'aquifère de Betton présentent des taxa qui pourraient assumer le même rôle (donc redondants) et éventuellement permettre à la communauté de s'adapter aux changements du milieu.

Les travaux du chapitre 5 ont donc permis de montrer que les circulations hydrologiques représentent bien un forçage qui contrôle directement la structure des communautés à l'échelle locale. Ces circulations hydrologiques induisent : soit un changement rapide et relativement fréquent des conditions chimiques et des communautés dans la zone altérée des aquifères, car les circulations y sont rapides et continues ; soit des changements beaucoup plus ponctuelles et transitoires mais potentiellement importants des conditions chimiques dans la partie fracturée des aquifères, où les circulations sont beaucoup plus lentes et discontinues, ce qui permet l'instauration d'une structure de communauté plus stable dans le temps et capable de supporter ces changements ponctuels importants.

Le temps de résidence est le reflet des conditions hydrochimiques des eaux souterraines, de leur connexion avec la surface, et de leur vitesse de circulation. Nos travaux montrent que la structure des communautés microbiennes répond à un gradient de temps de résidence des eaux souterraines et donc à la circulation hydrologique de l'eau dans les aquifères. Les communautés associées à des eaux souterraines qui reflètent différents stades de la circulation de l'eau le long d'une boucle hydrologique, semblent répondre à la succession d'accepteurs et de donneurs d'électrons et de source de carbone le long du trajet de l'eau, dans l'aquifère et à l'échelle de la région Bretagne. La composition des différentes communautés microbiennes se succédant le long d'une boucle hydrologique (Figure 6.1), rappelle la succession écologique des processus microbiens redox.

CHAPITRE 6

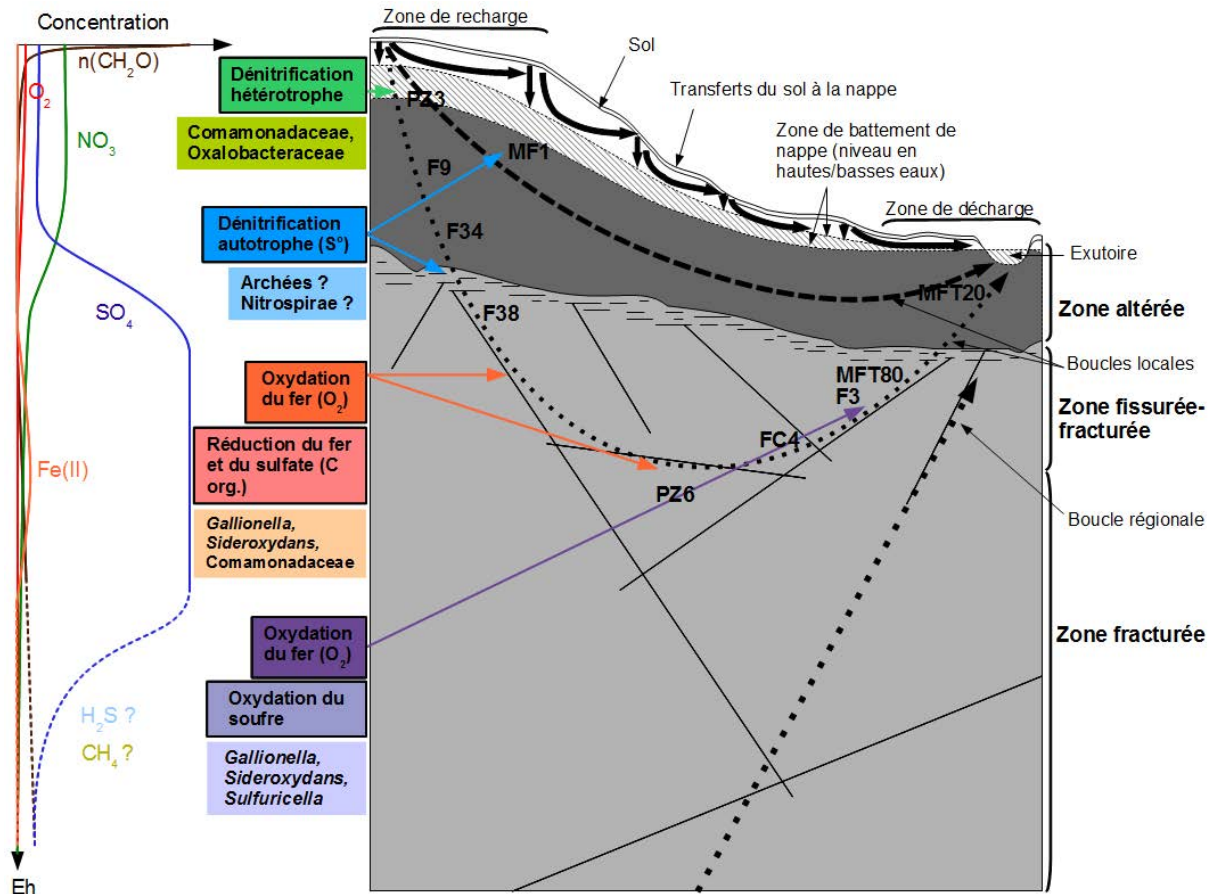


Figure 6.11 Modèle conceptuel de la succession des processus microbiens et des taxa probablement impliqués, le long d'une voie de circulation hydrologique dans un aquifère de socle. A gauche : succession des accepteurs d'électron en fonction du potentiel d'oxydo-réduction, les courbes en pointillés et les composés suivis d'un point d'interrogation correspondent aux potentiels accepteurs d'électron dans la partie très profonde de l'aquifère non investiguée dans cette thèse. Au milieu : succession des processus microbiens et taxon probablement impliqués le long de la boucle hydrologique. A droite : coupe d'un aquifère de socle et position des différents échantillons d'eau souterraine analysés au cours de ces travaux le long d'une boucle hydrologique. La partie très profonde des aquifère n'a pu être examinée lors de ces travaux faute de forages très profonds (> 250 m).

3. Perspectives

Ces travaux relativement pionniers dans leurs approches moléculaires de l'analyse de la diversité et de la richesse en espèce des microorganismes, offrent de nombreuses perspectives. Je propose dans cette partie organisée en 2 sous-parties, d'aborder dans un premier temps des perspectives appliquées concernant le diagnostic écologique des aquifères puis dans second temps, des perspectives fondamentales relatives à la compréhension fonctionnelle et évolutive de ces écosystèmes très particuliers que sont les aquifères.

3.1. Applications possibles de la connaissance des microorganismes dans les aquifères

3.1.1. Diagnostic de qualité d'eau : état de la qualité de l'eau

Comme rappelé précédemment, la ressource en eau douce est fragile et présente en quantité limitée. La qualité de cette eau douce représente un enjeu majeur de santé publique et un enjeu économique. La caractérisation de la qualité de l'eau est évaluée par la concentration en éléments minéraux et composés organiques mais intègre aussi la qualité bactériologique (absence de bactéries fécales notamment).

Dans l'étude menée ici un aspect inattendu concerne la quantité de microorganismes et leur composition des communautés originale dans les aquifères étudiés. Les méthodes moléculaires mises en œuvre au cours de cette thèse (analyses d'amplicons et analyses métagénomiques) visaient à caractériser de manière fine et globale cette diversité de microorganismes. Ainsi, a été réalisé ici un 'diagnostic' exploratoire de la composition microbiologique des eaux étudiées. Une perspective appliquée intéressante associée à ce travail serait la possibilité d'extraire les signatures génomiques de présence de pathogènes connus, sans doute dans une approche de diagnostic automatisable en terme d'analyse de données de séquences avec comme clé majeure à cette analyse l'existence d'une base de données de référence *ad hoc*.

3.1.2. Diagnostic de présence de contaminants potentiels : la métagénomique comme outil prospectif

Les analyses métagénomiques permettent, en théorie, d'accéder à l'ensemble des gènes des organismes présents dans le milieu étudié et de prédire les fonctions de ces gènes. La prédiction à partir des séquences de la présence d'un gène donné signe la présence de la fonction prédite. Par exemple, la présence de gènes impliqués dans le processus de nitrification permet d'émettre l'hypothèse d'un processus de nitrification dans le milieu étudié. La métagénomique peut donc devenir prospective puisqu'elle permet de déterminer sans *a priori* la possibilité qu'une fonction particulière puisse être exprimée par le cortège de microorganismes présents. Dans une situation où un polluant est présent dans un aquifère particulier mais n'a pas été recherché, l'analyse métagénomique permettrait de mettre en lumière la présence de ce polluant par la présence de séquences impliquées dans la

CHAPITRE 6

dégradation du polluant considéré, par exemple, signatures génomiques de gènes impliqués dans le catabolisme d'hydrocarbure aromatique polycyclique (HAP). On utilise ainsi la métagénomique comme un outil bioindicateur de pollution. La nature des aquifères, leur accès difficile et les chemins de pollution rendent sans doute ce type d'application particulièrement utile. Il s'agit là de développer une étude métagénomique préventive qui permettrait de mettre en évidence des voies de catabolisme bioindicatrice. Là encore, une stratégie d'automatisation de ce type d'analyse pourrait être envisagée avec comme condition l'usage de bases de données de séquences appropriées.

3.1.3. Avantages et inconvénients de ces diagnostics moléculaires

Un avantage majeur à ce type de méthode est leur aspect exploratoire qui permet la réalisation d'analyses sans *a priori* et qui donc permet des études sur de très larges spectres de fonctions bioindicatrices. Quand la présence d'un bioindicateur particulier, par exemple des séquences codant pour la voie de biodégradation de HAP est mis en évidence, des analyses chimiques pourraient alors être mises en œuvre pour déterminer la présence et le cas échéant la concentration du (des) polluant(s) et d'établir un suivi du polluant.

L'inconvénient principal est la difficulté de mettre en place ce type d'analyse métagénomique comme routine. Des développements de bases de données et d'analyses automatisées sont requis. La mise en place de pipelines automatisés nécessite le développement de travaux à l'interface entre recherche publique et acteurs privés.

3.2. Les pistes de recherche fondamentale

Dans les matrices complexes telles que le sol ou beaucoup de carbone est disponible au voisinage des racines et une forte hétérogénéité de la disponibilité en eau et en nutriments existe. Cette hétérogénéité constitue une importante mosaïque de niches écologiques. Par conséquent, ces niches écologiques supportent une richesse de microorganismes très élevée : 1 kg de sol contient en moyenne 10^{13} microorganismes soit un chiffre approximativement 100 fois supérieur au nombre d'étoiles contenues dans notre galaxie, la voie lactée (Curtis et Sloan, 2005). Plus intéressant encore est le fait que 10 g de sol 'pristine' puisse contenir 10^7 taxons distincts de procaryotes (Curtis et Sloan, 2005), majoritairement composé d'espèces rares. Cette estimation de 10^7 taxons est à mettre en relief par rapport au nombre d'espèces décrites de procaryotes, environ 10000, ce qui veut dire que 10g de sol contiendrait une richesse de taxons 1000 fois supérieure à nos connaissances globales actuelles des espèces procaryotiques. Cette richesse spécifique microbienne peut donc être considérée comme une boîte noire (Gans et al., 2005) qu'il est difficile de se représenter tant elle est immense et qu'il est difficile d'étudier tant elle est complexe.

On peut supposer les aquifères comme un milieu beaucoup plus homogène que ne l'est le sol, donc un milieu contenant un nombre réduit de niche écologiques. Par conséquent, dans les aquifères, on peut s'attendre à observer une richesse spécifique réduite de microorganismes en lien avec des phénomènes de compétition qui conduit à l'exclusion compétitive. De plus, les

CHAPITRE 6

aquifères sont des milieux souvent oligotrophes, notamment en raison de la quantité de carbone disponible. Un milieu oligotrophe suppose une limitation de la croissance de la biomasse globale et suppose aussi des adaptations particulières à ce milieu. Même si la richesse spécifique que nous avons observée dans ce travail est plus faible que dans le sol, nous observons néanmoins une surprenante richesse spécifique de microorganismes, structurée en fonction de la circulation hydrologique (Chapitre 3). On peut proposer l'hypothèse d'une spécialisation de niche (microorganismes spécialistes) ou les microorganismes sont particulièrement efficaces pour une niche considérée.

3.2.1. Transferts et maintien de microorganismes de la surface vers la partie profonde de l'aquifère

Les résultats présentés chapitre 3 ont démontré une influence des communautés du sol sur la composition des communautés des eaux souterraines peu profondes. Des transferts de microorganismes du sol (Firmicutes notamment) vers les eaux souterraines peu profondes sont envisagés mais la subsistance de ces micro-organismes dans cet environnement n'a pu être établie. Ces microorganismes sont pour la plupart des taxa généralistes capables de supporter de fortes variations environnementales telles que le passage d'un milieu très riche en carbone, le sol, à un milieu montrant comparativement de très faibles concentrations en carbone organique, l'eau souterraine peu profonde. De plus, l'eau souterraine constitue un milieu beaucoup plus homogène que le sol. Les fortes abondances observées de généralistes hétérotrophes capables de réduire les nitrates, et les fortes concentrations en nitrate dans les eaux peu profondes sont probablement en grande partie imputables aux transferts importants au niveau de l'interface sol/nappe (Bougon et al., 2012 ; Legout et al., 2007). De plus, étant donné les faibles concentrations en carbone organique dans l'eau peu profonde, le processus hétérotrophe de réduction des nitrates reste probablement faible en dépit des réducteurs de nitrate très abondants. Ces résultats posent donc la question de la capacité des microorganismes généralistes du sol à se maintenir dans l'eau souterraine peu profonde.

Le plus souvent quand une espèce étrangère est introduite dans un écosystème, même si elle est bien adaptée au biotope, elle ne parvient pas à se maintenir dans une biocénose où elle était auparavant inconnue (ex. : microorganismes transférés du sol vers l'eau souterraine). Ainsi, dans les eaux peu profondes où les perturbations environnementales sont fréquentes et où les microorganismes sont relativement redondants, c'est-à-dire capables de réaliser les mêmes rôles dans l'écosystème, la compétition entre taxa est probablement grande et une espèce ne parviendra à s'imposer dans l'écosystème que si elle est capable de proliférer rapidement avant la prochaine perturbation. Dans la partie profonde de l'aquifère la colonisation du milieu par un taxon généraliste semble peu probable étant données les conditions chimiques actuelles très particulières (anoxie, oligotrophie, fortes concentrations en fer). La partie profonde constitue un milieu très hétérogène et un taxon généraliste (niche large) ne va survivre que si son aire de répartition est suffisamment vaste c'est-à-dire si son milieu est suffisamment connexe pour permettre le déplacement du taxon de territoire favorable en territoire favorable, et éventuellement le repeuplement d'une région. Cependant la connexion des fractures dans la partie profonde est aléatoire et tend à se raréfier avec la

CHAPITRE 6

profondeur. Un des mécanismes de survie dans la partie profonde hétérogène des aquifères, en particulier dans les eaux isolées, pourrait être la création de refuges permettant le maintien de population de petite taille qui peut éventuellement repeupler la zone (hypothèse de l'Arche de Noë, développée dans l'introduction). Dans la zone profonde, les microorganismes occupent probablement une mosaïque de territoires favorables disjoints entre lesquels des taxa peuvent être déplacés grâce au flux d'eau et à des stratégies de dissémination (formation de biofilm floculant qui se détache).

3.2.2. Lithoautotrophie associée au fer dans la partie profonde et évolution des Gallionellaceae

Nos résultats ont montré une abondance élevée de bactéries spécialisées dans l'oxydation du fer dans la partie profonde des trois aquifères investigués. Le processus microbien lithoautotrophique d'oxydation du fer en profondeur pourrait constituer une production primaire de biomasse constituant la base de l'écosystème microbien profond. L'abondance des Gallionellaceae dans les eaux souterraines semble être corrélée à la proportion d'eau récente se mélangeant à une d'eau ancienne (Chapitre 4), et pourrait servir de bioindicateur de la connexion d'une masse d'eau ancienne avec la surface. Cependant, l'origine des oxydants du fer, principalement les Gallionellaceae, dans ce milieu profond reste énigmatique : (1) elle pourrait provenir des transferts ponctuels d'eau récente depuis la surface. Les eaux récentes potentiellement incorporées dans les eaux profondes isolées, ont montré dans nos analyses des abondances de Gallionellaceae relativement faibles. Néanmoins on ne peut exclure qu'une fois que les Gallionellaceae atteignent des eaux anciennes relativement stables et présentant de bonnes conditions pour leur développement, celles-ci ne colonisent à terme les eaux anciennes (2) dans le cas d'eaux très isolées en profondeur, une connexion peut subsister avec la surface mais sur des temps beaucoup plus longs. Dans ce cas, les Gallionellaceae pourraient avoir été introduites depuis des temps très longs (supérieurs à 1000 ans).

Plusieurs auteurs (Barghoorn et Tyler, 1965 ; Planavsky et al., 2009 ; Cloud et al., 1965) ont rapporté l'existence de traces de rubans torsadés, structures organo-minérales produites par les bactéries microaérophiles oxydant le fer, dans des couches de roches siliceuses datant de 1,89 Ga. La présence de bactéries microaérophiles oxydant le fer telles que les Gallionellaceae environ 100 Ma après la formation de l'atmosphère actuelle riche en dioxygène, pourrait attester de la présence de fer dissous et de faibles concentrations en oxygène dans les océans du Protérozoïque. D'autres auteurs (Picard et al., 2015) n'excluent pas que des oxydants du fer aient pu même être présents avant 1,9 Ga. Ces études permettent de comprendre la persistance des Gallionellaceae et la gestion de leur dépendance à la concentration en oxygène dissous dans une eau profonde et très isolée comme PZ6 à Betton. L'eau de PZ6 se situe dans des schistes du Protérozoïque et contient une composante d'eau très ancienne qui attribue à cette eau un âge de 10 000 ans (datation au ^{14}C). Cette composante d'eau très ancienne pourrait avoir été en partie à l'origine de l'introduction des Gallionellaceae dans PZ6. L'introduction des Gallionellaceae dans cette eau pourrait donc provenir des faibles afflux annuels d'eau de surface mais aussi pour partie d'une eau très

CHAPITRE 6

ancienne incorporée dans l'aquifère il y a plusieurs milliers d'années. Une étude de la diversité phylogénétique des Gallionellaceae retrouvées au sein des différentes eaux souterraines pourraient ainsi apporter un éclairage nouveau sur leur origine évolutive potentielle.

3.2.3. Stratégies de colonisation, de maintien et de compétition

Afin de coloniser et se maintenir dans un nouveau milieu, un taxon microbien peut adopter deux types de stratégies démographiques : la stratégie *r* et la stratégie K (MacArthur et Wilson, 1967 ; Pianka, 1970).

La stratégie *r* concerne des taxa microbiens qui s'imposent dans un écosystème grâce à leur grande vitesse de multiplication, et qui sont donc en forte compétition entre eux. De ce fait, beaucoup de taxa finissent par disparaître ou devenir très minoritaires. Cette stratégie caractérise donc les populations en expansion et principalement limitées par la ressource. Les taxa adoptant une stratégie *r* montrent typiquement une abondance fluctuante car cette stratégie se manifeste dans des environnements instables, caractérisés par des enrichissements ou des renouvellements périodiques du milieu. De plus, les taxa à stratégie *r* sont souvent opportunistes, capables de profiter rapidement d'une niche vacante. Ils constituent souvent les espèces pionnières qui vont coloniser un nouveau milieu ou un milieu perturbé comme lors de pollution. Enfin ces espèces sont souvent résistantes, capables de tolérer de fortes fluctuations de l'environnement, généralistes et ubiquistes, ce qui leur permet de coloniser facilement un milieu. Nos résultats ont montré que dans la zone peu profonde des aquifères, particulièrement exposée aux fluctuations environnementales hydrologiques et chimiques, les taxa microbiens rencontrés correspondent en très grande majorité à des généralistes. Les microorganismes généralistes détectés sont versatiles : ils sont capables de réduire les nitrates et une large gamme d'accepteurs d'électrons, de dégrader la matière organique récalcitrante, et présentent des temps de génération courts (< 10h). Dans un milieu hétérogène en perpétuel changement comme la zone peu profonde des aquifères, ces microorganismes semblent particulièrement aptes à faire face aux variations du milieu. Bien qu'ils soient capables d'utiliser plusieurs voies métaboliques, ces microorganismes vont privilégier la voie métabolique avec l'accepteur d'électron le plus rentable énergétiquement, afin de rester le plus compétitif possible. L'ensemble de ces observations évoquent des microorganismes qui pourraient se maintenir dans ce milieu grâce à une stratégie démographique *r*, caractéristique d'un biotope perturbé. Cependant, des analyses restent à mener pour savoir si ces microorganismes adoptent réellement une stratégie *r*, en déterminant notamment si elles constituent les taxa pionniers de cet écosystème.

La stratégie K réfère quant à elle aux taxa microbiens qui s'imposent et persistent dans un écosystème grâce à la stabilisation de son abondance à une valeur maximale, en assurant une protection et une bonne adaptation à son milieu de la biomasse produite. Les taxa maintiennent leur abondance en misant sur des mécanismes de protection et de survie qui permettent une adaptation optimale aux conditions environnementales. Ils n'ont pas un mécanisme de multiplication rapide et nécessitent donc moins d'énergie, et sont souvent

CHAPITRE 6

caractéristiques des écosystèmes matures, où les taxa pionniers ne sont plus les plus abondants. Leur présence entraîne une spécialisation de la niche écologique et donc la diversification et la ségrégation des niches, ainsi la richesse spécifique tend à augmenter. De fait, les taxa adoptant cette stratégie sont en faible compétition avec les autres car ils correspondent à des spécialistes peu tolérants aux changements, qui préfèrent les environnements stables et qui n'exigent pas les mêmes ressources, évitant ainsi la compétition. Le développement de ces taxa entraînent souvent une modification de la niche et une exclusion compétitive des autres taxa de la niche, ces taxa sont donc antagonistes aux taxa généralistes. Les spécialistes apparaissent souvent après les taxa pionniers généralistes et opportunistes colonisant le milieu, et les supplantent par la suite même s'ils se multiplient moins vite. Ils entretiennent une certaine homéostasie pour créer des conditions qui leur sont favorables dans le biotope. Les taxa pionniers généralistes restent toujours présents mais en faible abondance, ils sont redondants afin d'éventuellement recoloniser le milieu lors de perturbations par exemple. Nos résultats ont indiqué de façon claire une prédominance dans les eaux souterraines isolées de différents aquifères, de taxa appartenant aux Gallionellaceae spécialisés dans l'oxydation du fer. Dans ces eaux isolées, des taxa généralistes appartenant aux Comamonadaceae sont également présents mais en plus faible abondance, alors qu'ils sont détectés en grande abondance dans les eaux souterraines peu profondes et récentes. Les Comamonadaceae, capables de réduire les nitrates en oxydant le fer, ont pu être des taxa pionniers qui ont colonisé les eaux isolées avant d'être supplantés par des spécialistes de l'oxydation du fer, les Gallionellaceae. Les Gallionellaceae ont les caractéristiques des taxa à stratégie K : (1) elles ont un temps de multiplication plus long que la plupart des généralistes (environ 18h en culture, Hanert et al., 1989) ; (2) elles oxydent le fer alors que ce processus est peu rentable énergétiquement ; (3) elles utilisent le CO₂ comme source de carbone et ont mis en place des mécanismes leur permettant par exemple d'éviter l'encroutement dans des oxydes de fer lors de la respiration du fer, ce qui les rend particulièrement aptes à se développer dans des eaux oligotrophes, très anoxiques et riches en fer ; (4) elles sont très sensibles aux faibles variations de la concentration d'oxygène dissous ; (5) elles tendent à se développer en biofilm attaché à la roche afin de maintenir une certaine homéostasie et leur permettre d'éventuels déplacements sous forme de flocules vers des milieux plus favorables (ex. : concentration en oxygène trop élevée). Les Comamonadaceae détectés en plus faible abondance dans les eaux isolées pourraient constituer une « réserve » de taxa généralistes capables de recoloniser le milieu en oxydant le fer et en réduisant les nitrates en cas d'arrivée importante d'eau récente plus oxygénée. Dans ce dernier cas le milieu deviendrait moins propice aux Gallionellaceae car l'oxydation abiotique du fer via l'oxygène est plus compétitive que l'oxydation biotique du fer par les Gallionellaceae.

3.3. Observer le vivant dans les aquifères

3.3.1. Impact des hétérogénéités du milieu

Les différents travaux menés au cours de cette thèse ont montré des similitudes inattendues de composition des communautés microbiennes entre différents aquifères géographiquement distants. Nos résultats ont aussi démontré qu'à l'échelle du bassin versant le mélange entre des masses d'eau récentes et anciennes, et donc la connexion des eaux anciennes isolées avec la surface exerce un contrôle sur la structure des communautés microbiennes via la disponibilité des accepteurs d'électrons. Cependant, malgré les mélanges des masses d'eaux les aquifères demeurent des milieux hétérogènes à plusieurs titres, en particulier dans leur partie profonde. Plusieurs types d'hétérogénéités peuvent être soulignées : en particulier (1) une hétérogénéité géologique : de par la distribution spatiale aléatoire des fractures et des connexions qui les lient entre elles ; (2) une hétérogénéité chimique : la distribution des temps de résidence contraint le temps d'interaction eau-roche et l'exposition à des polluants, et l'eau souterraine peut présenter des origines différentes (marine, minéral, météoritique) ce qui génère des conditions chimiques variées ; (3) une hétérogénéité d'habitat : les aquifères présentent deux phases de support de la biodiversité : une phase mobile, l'eau souterraine ; et une phase immobile, la roche. Des communautés microbiennes bien distinctes se développent dans l'eau souterraine, ou sous forme de biofilm au contact de la roche dans les macro et microfractures. (4) une hétérogénéité de flux hydrologiques : la connexion variable et aléatoire des masses d'eau avec la surface reflète l'hétérogénéité des flux (distance, quantité, vitesse et fréquence des circulations) dans les aquifères. L'eau constitue le lien entre les différentes niches de l'aquifère, et contrôle directement par sa circulation l'aire des niches.

Ces différentes hétérogénéités engendrent une variété de niches plus ou moins grandes. En macroécologie on relie l'hétérogénéité et la richesse d'espèces, et il est proposé que lorsque l'hétérogénéité augmente, l'aire de la niche de chaque espèce diminue. Ainsi, au-delà d'un seuil d'hétérogénéité, la richesse d'espèce finit par diminuer et des espèces peuvent disparaître (Allouche et al., 2012) (Figure 6.2). Ainsi une hétérogénéité spatiale trop importante peut provoquer une réduction de la diversité par une réduction de l'aire de la niche. Cet effet pourrait donc, dans la partie profonde très hétérogène des aquifères, aboutir à une diminution de la diversité et éventuellement à une dominance de quelques espèces spécialisées bien adaptées au milieu.

CHAPITRE 6

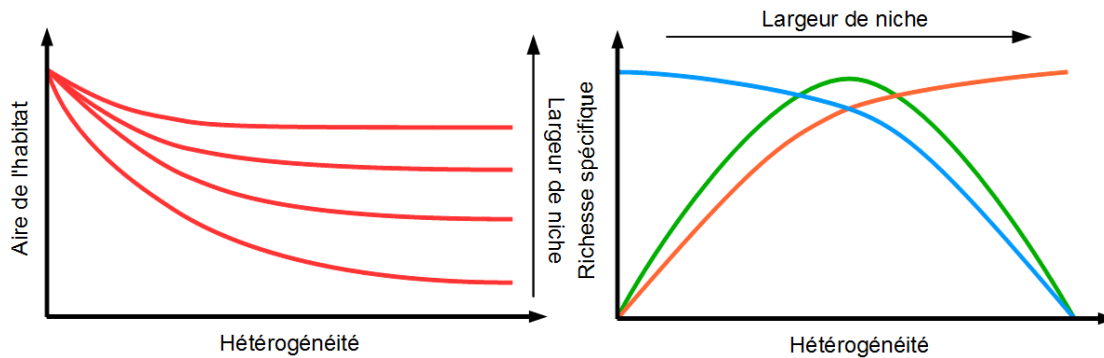


Figure 6.2 Concept du compromis entre l'hétérogénéité spatiale de la niche, l'aire de l'habitat et la richesse spécifique. A gauche : Effet de l'augmentation de l'hétérogénéité sur l'aire de l'habitat. A droite : Compromis entre l'hétérogénéité spatiale et la largeur de la niche selon le modèle de Allouche et al., 2012. La courbe orange représente l'effet d'une hétérogénéité spatiale non excessive sur la richesse spécifique : l'hétérogénéité augmente la largeur de la niche, ce qui permet une augmentation de la richesse spécifique ; la courbe orange montre l'effet d'une hétérogénéité spatiale qui devient excessive : la largeur de la niche augmente donc la richesse spécifique augmente jusqu'à ce que l'aire de l'habitat devienne trop faible ; la courbe verte représente le compromis entre les courbes orange et bleue. D'après Allouche et al., 2012.

A cette forte hétérogénéité spatiale, s'ajoute également des contraintes de forçage sur les communautés microbiennes telles que le caractère souvent oligotrophe des eaux souterraines (faible concentration en carbone organique dissous) (Bougon et al., 2012). Ce caractère oligotrophe implique des adaptations particulières pour les microorganismes qui vivent dans ces milieux (par des phénomènes de spécialisation de niche comme développé précédemment). Enfin, l'hétérogénéité spatiale des aquifères dépend largement de l'échelle d'observation du système : à l'échelle du grain de sable, d'une micro ou macrofracture ou à l'échelle des bassins versants d'une région, l'hétérogénéité ne sera pas la même et il est donc important de tenir compte de l'échelle d'observation.

3.3.2. Effet de l'échelle d'observation

La description de la diversité taxinomique dépend directement de l'échelle temporelle et spatiale à laquelle on la mesure. Elle ne représente souvent qu'une image figée à un temps donné et sur un espace donné de la diversité. La question de la représentativité des échantillonnages d'eau souterraine pour étudier l'écosystème microbien des aquifères est cruciale, d'autant plus que les aquifères présentent deux phases : une mobile et une immobile, toutes deux avec de fortes hétérogénéités. Dans nos travaux, seule la phase mobile a été étudiée car elle constitue la phase la plus accessible de l'aquifère. Ainsi pour la phase mobile, plus le volume d'eau échantillonné sera grand, plus il représentera une portion importante de l'aquifère qui inclue plus de causes d'hétérogénéités et donc présentera une diversité taxinomique plus élevée. Cependant, un échantillonnage ne reflète pas nécessairement les communautés réelles car une partie des espèces rares échappe à l'échantillonnage ou à la détection, et les espèces rares ne sont souvent pas les mêmes d'un échantillonnage à un autre. De même l'échelle temporelle sur laquelle est évaluée la diversité taxinomique impacte la vision de la composition de la communauté car les espèces microbiennes dans les eaux se déplacent au grès des flux. Une solution pour minimiser le biais d'échantillonnage est de

CHAPITRE 6

multiplier les répliqués d'échantillonnages dans l'espace et dans le temps pour permettre une meilleure description des communautés.

Depuis peu, des travaux de recherche se développent sur la description des communautés microbiennes des aquifères à différentes échelles, comme celle du grain et du pore, ou de la fracture ou encore du bassin versant (Ebrahimi et Or, 2015 ; Starek et al., 2011 ; Smith et al., 2015). La multiplication des échelles d'études est particulièrement importante dans les aquifères, car toutes ces échelles sont imbriquées les unes dans les autres, elles font partie d'un super-système (l'aquifère) constitué de sous-systèmes interconnectés (fractures et pores). Ces différentes échelles constituent des interfaces entre deux ou plusieurs écosystèmes interagissant entre eux, et forment donc des écotones. De même, de plus en plus d'études de diversité couvrant des événements périodiques sur plusieurs échelles de temps dans les aquifères commencent à émerger. Ces échelles varient d'une estimation ponctuelle dans le temps, à un suivi à l'échelle saisonnière comme lors de la période de recharge des aquifères, jusqu'à l'étude pluriannuelle couvrant plusieurs cycles de recharge et décharge. Ces événements périodiques sont importants car ils agissent sur la composition des communautés microbiennes et permettent l'apport de nouvelles sources d'électrons.

D'un point de vue purement écologique, il existe plusieurs niveaux d'investigation de la diversité possible. Pour aborder la compréhension de la richesse spécifique et de la diversité des microorganismes dans un milieu donné, l'échelle hiérarchique écologique adoptée est nécessairement la communauté. Dans les travaux d'écologie microbienne, ce niveau d'étude est systématiquement envisagé pour permettre une description des microorganismes en présence. Pour décrire la communauté, il est nécessaire de déterminer les espèces en présence. Comme indiqué précédemment, l'écrasante majorité des microorganismes de la biosphère n'est pas identifiée. On utilise donc des outils moléculaires pour séparer et classer les microorganismes en présence sur la base de similarité entre séquences. En règle générale, on utilise comme cible le gène codant pour l'ARNr 16S (Bactéries et Archées) ou l'ARNr 18S pour les microorganismes eucaryotes. Cette région de l'ADN offre plusieurs avantages : (1) présence chez tous les êtres vivants, connus et inconnus ; (2) information phylogénétique de qualité (peu de problème d'homoplasie) ; (3) peu de problème d'évolution hétérologue (généralement, on trouve plusieurs copie du gène qui code l'ARNr 16S sur un génome, mais compte tenu du tempo évolutif très lent pour ce gène les copies sont identiques ou très fortement homologues) ; (4) bases de données de référence existantes. L'étude des séquences du gène de l'ARNr 16S permet de discriminer des 'espèces moléculaires', appelées OTUs. Mais l'application et l'adoption de ce concept d'espèce induit certaines limites qu'on ne peut ignorer.

3.4. Approfondissements possibles de ces travaux

Les bactéries oxydant le fer étant directement en compétition avec le processus abiotique d'oxydation du fer par l'oxygène, la tolérance des Gallionellaceae aux fluctuations de la concentration en oxygène dissous via le processus de mélange reste à déterminer plus précisément. Par ailleurs, la part de fer précipité associé à un processus d'oxydation abiotique

CHAPITRE 6

ou à un processus biotique reste à définir. Pour répondre à ces questions, des expériences en batch peuvent être envisagés pour contrôler la concentration en oxygène et évaluer le développement des Gallionellaceae associés. Pour connaître la part d'oxydation du fer d'origine abiotique, on peut envisager des incubations de biofilms de Gallionellaceae dans de l'eau souterraine présentant une concentration en fer dissous bien déterminée. On peut alors suivre l'évolution de la concentration en fer dissous pendant une durée déterminée, à l'issue de laquelle le biofilm est collecté et sa teneur en oxydes de fer mesurée. La quantité de fer oxydée abiotiquement est déduite de la teneur en oxydes de fer retrouvés dans biofilm et de la concentration de fer dissous subsistant dans l'eau.

Les Gallionellaceae semblent être de bons indicateurs de la connexion d'une eau ancienne avec la surface. Connaître la connexion avec la surface d'une zone de l'aquifère permet de mieux comprendre les circulations hydrologiques locales et d'estimer la vulnérabilité de cette partie de l'aquifère face aux pollutions anthropiques. Pour cela une bonne estimation de l'abondance des Gallionellaceae dans les différentes eaux souterraines analysées est nécessaire, par exemple par PCR quantitative. Par ailleurs, l'étude la diversité phylogénétique des Gallionellaceae pourrait permettre de mieux déterminer leur origine dans les eaux souterraines anciennes.

Le sol et le toit de la nappe constituent un écotone. Pour évaluer à la fois les transferts de polluants et de microorganismes entre ces deux entités, notamment au moment de la recharge, un amendement du sol en carbone marqué (pour marquer les microorganismes hétérotrophes du sol) et nitrate marqué (pour évaluer le transfert des nitrates du sol aux eaux souterraines) (Stable Isotope Probing) peut être envisagé. Ce marquage, associé à une approche métagénomique des populations microbiennes et un suivi hydrochimique à l'interface sol-nappe, pourrait permettre de mieux comprendre la structure des communautés des eaux souterraines peu profondes.

Afin de déterminer les réseaux trophiques de l'écosystème souterrain, une approche basée sur l'analyse des protéines produites par les communautés microbiennes (méta-protéomique) le long d'une boucle hydrologique dans l'eau souterraine et dans les sédiments peut être envisagée. Les données obtenues par cette approche seraient complémentaires des données obtenues par une approche métagénomique, et fournirait des clés sur les fonctions potentielles et les fonctions réellement exprimées au sein des communautés étudiées.

Enfin la détermination de l'identité et des fonctions de la fraction importante des microorganismes inconnus dans les aquifères notamment à des profondeurs plus grandes, peut être réalisée avec une approche de séquençage de génome entier de ces microorganismes via la technologie single-cell en plein essor. Cette technologie permet de faire le lien entre l'organisme considéré et les fonctions qu'il réalise, et donne accès à la variabilité populationnelle. Elle nécessite cependant qu'une cellule soit isolée d'un échantillon environnemental ou d'une culture d'enrichissement afin d'en extraire son ADN total, il faut donc que le microorganisme en question soit en abondance suffisante dans l'échantillon pour être isolé. Une autre alternative peut être alors d'adopter une approche de métagénomique pour séquencer les fragments de génomes de microorganismes inconnus dans un échantillon environnemental, mais avec une grande profondeur de séquençage pour permettre l'assemblage de ces multiples fragments de génomes différents en génomes entiers. Cette

CHAPITRE 6

approche est délicate mais des laboratoires se sont spécialisés dans cette approche (groupe de Jillian Banfield, UC Berkeley).

L'ensemble de ces travaux a ainsi permis d'apporter des éléments de réponse aux questions posées en introduction de cette thèse, mais pose également de nombreuses nouvelles questions afin de parvenir à une connaissance plus large et plus approfondie des forces qui régissent les communautés et les processus microbiens au sein des aquifères de socle fracturés. A plus long terme ces travaux pourraient contribuer à une meilleure préservation des eaux souterraines d'aquifères face aux pollutions d'origine agricole en Bretagne.

REFERENCES

REFERENCES

- Albertsen, M., Hugenholtz, P., Skarshewski, A., Nielsen, K. L., Tyson, G. W., and Nielsen, P. H. (2013). Genome sequences of rare, uncultured bacteria obtained by differential coverage binning of multiple metagenomes. *Nat. Biotechnol.* 31, 533–8. doi:10.1038/nbt.2579.
- Alfreider A., Vogt C., Hoffmann D. & Babel W. (2003) Diversity of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase /oxygenase large-subunit genes from groundwater and aquifer microorganisms. *Microbial Ecology*, 45, 317–328.
- Allouche, O., Kalyuzhny, M., Moreno-Rueda, G., Pizarro, M., and Kadmon, R. (2012). Area-heterogeneity tradeoff and the diversity of ecological communities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 17495–500. doi:10.1073/pnas.1208652109.
- Aquilina, L., Vergnaud, V., and Labasque, T. (2015). Bilan sur les fortes concentrations en Fer observées sur le forage profond du Vau-Reuzé. Rennes.
- Aquilina, L., Vergnaud-Ayraud, V., Les Landes, A. A., Pauwels, H., Davy, P., Pételet-Giraud, E., Labasque, T., Roques, C., Chatton, E., Bour, O., et al. (2015). Impact of climate changes during the last 5 million years on groundwater in basement aquifers. *Sci. Rep.* 5, 14132. doi:10.1038/srep14132.
- Armandine Les Landes, A. (2014). Impact des variations climatiques sur les ressources hydrogéologiques. *Univ. Rennes I.*
- Armandine Les Landes, A., Aquilina, L., Davy, P., Vergnaud, V., and le Carlier, C. (2015). Time scales of regional circulation of saline fluids in continental aquifers (Armorican massif, Western France). *Hydrol. Earth Syst. Sci. Discuss.* 19, 1413–1426. doi:10.5194/hessd-11-6599-2014.
- Araujo, M., Sueiro, R. A., Gómez, M. J., and Garrido, M. J. (2004). Enumeration of *Clostridium perfringens* spores in groundwater samples: Comparison of six culture media. *J. Microbiol. Methods* 57, 175–180. doi:10.1016/j.mimet.2003.12.010.
- Ayraud, V. (2005). Détermination du temps de résidence des eaux souterraines : application au transfert d'azote dans les aquifères fracturés hétérogènes. *Univ. Rennes I.*
- Ayraud, V., Aquilina, L., Pauwels, H., Labasque, T., Pierson-Wickmann, A.-C., Aquilina, A.-M., and Gallat, G. (2006). Physical, biogeochemical and isotopic processes related to heterogeneity of a shallow crystalline rock aquifer. *Biogeochemistry* 81, 331–347. doi:10.1007/s10533-006-9044-4.
- Ayraud, V., Aquilina, L., Labasque, T., Pauwels, H., Molenat, J., Pierson-Wickmann, A.-C., Durand, V., Bour, O., Tarits, C., and Le Corre, P. (2008). Compartmentalization of physical and chemical properties in hard-rock aquifers deduced from chemical and groundwater age analyses. *Appl. Geochemistry* 23, 2686–2707. doi:10.1016/j.apgeochem.2008.06.001.

REFERENCES

- Baker P.W., Futamata H., Harayama S. & Watanabe K. (2001) Molecular diversity of pMMO and sMMO in a TCE-contaminated aquifer during bioremediation. *FEMS Microbiology Ecology*, 38, 161–167.
- Baker B.J., Moser D.P., MacGregor B.J. et al. (2003) Related assemblages of sulphate-reducing bacteria associated with ultradeep gold mines of South Africa and deep basalt aquifers of Washington State. *Environmental Microbiology*, 5, 267–277.
- Barghoorn, E. S., and Tyler, S. S. (1965). Microorganisms from the Gunflint Chert. *Science* (80-). 147, 563–575.
- Becker, Richard A. and Chambers, John M. and Wilks, A. R. (1988). *The New S Language: A Programming Environment for Data Analysis and Graphics*. Monterey, CA, USA: Wadsworth and Brooks/Cole Advanced Books & Software.
- Ben Maamar, S., Aquilina, L., Quaiser, A., Pauwels, H., Michon-Coudouel, S., Vergnaud-Ayraud, V., Labasque, T., Roques, C., Abbott, B. W., and Dufresne, A. (2015). Groundwater isolation governs chemistry and microbial community structure along hydrologic flowpaths. *Front. Microbiol.* 6, 1–13. doi:10.3389/fmicb.2015.01457.
- Blöthe, M., and Roden, E. E. (2009). Microbial iron redox cycling in a circumneutral-pH groundwater seep. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 468–473. doi:10.1128/AEM.01817-08.
- Boisson, A. (2011). Etude multi-échelles des réactions de dénitrification dans les aquifères hétérogènes : Approches expérimentales. *Univ. Eur. Bretagne*.
- Boivin-Jahns V., Bianchi A., Ruimy R., Garcin J., Daumas S. & Christen R. (1995) Comparison of phenotypical and molecular methods for the identification of bacterial strains isolated from a deep subsurface environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 3400–3406.
- Bougon, N., Aquilina, L., Molénat, J., Marie, D., Delette, Y., Chancerel, E., and Vandenkoornhuyse, P. (2012). Influence of depth and time on diversity of free-living microbial community in the variably saturated zone of a granitic aquifer. *FEMS Microbiol. Ecol.* 80, 98–113. doi:10.1111/j.1574-6941.2011.01273.x.
- Bouhnik-Le-Coz, M., Petitjean, P., Serrat, E., and Gruau, G. (2001). Validation d'un protocole permettant le dosage simultané des cations majeurs et traces dans les eaux douces naturelles par ICP-MS. *Les cahiers techniques de Géosciences Rennes*.
- Bowman J.P., Jimenez L., Rosario I., Hazen T.C. & Sayler G.S. (1993) Characterization of the methanotrophic bacterial community present in a trichloroethylene- contaminated subsurface groundwater site. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 2380–2387.
- Brown, C. T., Hug, L. a, Thomas, B. C., Sharon, I., Castelle, C. J., Singh, A., Wilkins, M. J., Wrighton, K. C., Williams, K. H., and Banfield, J. F. (2015). Unusual biology across a group comprising more than 15% of domain Bacteria. *Christopher*. doi:10.1038/nature14486.

REFERENCES

- Brune, A., Frenzel, P., and Cypionka, H. (2000). Life at the oxic-anoxic interface : microbial activities and adaptations. *FEMS Microbiol. Rev.* 24, 691–710.
- Buchfink, B., Xie, C., and Huson, D. H. (2014). Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. *Nat. Methods* 12, 59–60. doi:10.1038/nmeth.3176.
- Busenberg, E., and Plummer, N. (1992). Use of Chlorofluorocarbons (CC13F and CC12F2) as Hydrologic Tracers and Age-Dating Tools' The Alluvium and Terrace System of Central Oklahoma. *Water Resour.* 28, 2257–2283.
- Caccavo, F., Lonergan, D. J., Lovley, D. R., Davis, M., Stolz, J. F., and McInerney, M. J. (1994). *Geobacter sulfurreducens* sp. nov., a hydrogen- and acetate-oxidizing dissimilatory metal-reducing microorganism. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 3752–3759. doi:0099-2240/\$04.00+0.
- Carn-Dheilly, A., and Thomas, E. (2008). RAPSODI- Recherche d'aquifères profonds dans le socle du département de l'Ille et Vilaine. *Rapport interne du BRGM.*
- Castelle, C. J., Hug, L. A., Wrighton, K. C., Thomas, B. C., Williams, K. H., Wu, D., Tringe, S. G., Singer, S. W., Eisen, J. A., and Banfield, J. F. (2013). Extraordinary phylogenetic diversity and metabolic versatility in aquifer sediment. *Nat. Commun.* 4, 2120. doi:10.1038/ncomms3120.
- Chambers, J. M. (1992). "Linear models," in *Statistical Models in S*, eds. J. M. Chambers and T. J. Hastie (Wadsworth & Brooks/Cole).
- Clobert, J., Le Galliard, J.-F., Cote, J., Meylan, S., and Massot, M. (2009). Informed dispersal, heterogeneity in animal dispersal syndromes and the dynamics of spatially structured populations. *Ecol. Lett.* 12, 197–209. doi:10.1111/j.1461-0248.2008.01267.x.
- Cloud Jr, P. E. (1965). Significance of the Gunfit (Precambrian) Microflora. *Science (80-)*. 148, 27–35.
- Cruz-Cano, R., and Lee, M.-L. T. (2014). Fast regularized canonical correlation analysis. *Comput. Stat. Data Anal.* 70, 88–100. doi:10.1016/j.csda.2013.09.020.
- Curtis, T. P., and Sloan, W. T. (2005). Exploring Microbial Diversity— A Vast Below. *Science (80-)*. 39, 2004–2006. doi:10.1126/science.1118176.
- Dar, S. A., Tan, H., Peacock, A. D., Jaffe, P., N'Guessan, L., Williams, K. H., and Strycharz-Glaven, S. (2013). Spatial Distribution of Geobacteraceae and Sulphate-Reducing Bacteria during In Situ Bioremediation of Uranium-Contaminated Groundwater. *Remediat. J.*, 31–49. doi:10.1002/rem.
- DeLeo PC, Baveye P (1997) Factors affecting protozoan predation of bacteria clogging laboratory aquifer microcosms. *Geomicrobiol. J.* 14(2), 127–149.
- Detmers J., Schulte U., Strauss H. & Kuever J. (2001) Sulfate reduction at a lignite seam: microbial abundance and activity. *Microbial Ecology*, 42, 238–247.

REFERENCES

- Detmers J., Strauss H., Schulte U., Bergmann A., Knittel K. & Kuever J. (2004) FISH shows that *Desulfotomaculum* spp. are the dominating sulfate-reducing bacteria in a pristine aquifer. *Microbial Ecology*, 47, 236–242.
- Dong, Y., Kumar, C. G., Chia, N., Kim, P.-J., Miller, P. a, Price, N. D., Cann, I. K. O., Flynn, T. M., Sanford, R. a, Krapac, I. G., et al. (2014). *Halomonas sulfidaeris*-dominated microbial community inhabits a 1.8 km-deep subsurface Cambrian Sandstone reservoir. *Environ. Microbiol.* 16, 1695–708. doi:10.1111/1462-2920.12325
- Dunlap W.J., McNabb J.F., Scalf M.R. & Cosby R.L. (1977) Sampling for organic chemicals and microorganisms in the subsurface. EPA-600/2-77-176, US-EPA Report, Environment Protection Technology Series, Ada, OK, 27.
- Ebrahimi, A., and Or, D. Hydration and diffusion processes shape microbial community organization and function in model soil aggregates. doi:10.1002/2015WR017565.
- Emerson, D., and Moyer, C. (1997). Isolation and characterization of novel iron-oxidizing bacteria that grow at circumneutral pH. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 4784–4792.
- Emerson, D., Fleming, E. J., and McBeth, J. M. (2010). Iron-oxidizing bacteria: an environmental and genomic perspective. *Annu. Rev. Microbiol.* 64, 561–583. doi:10.1146/annurev.micro.112408.134208.
- Essén, S. a, Johnsson, A., Bylund, D., Pedersen, K., and Lundström, U. S. (2007). Siderophore production by *Pseudomonas stutzeri* under aerobic and anaerobic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 5857–64. doi:10.1128/AEM.00072-07.
- Fabisch, M., Beulig, F., Akob, D. M., and Küsel, K. (2013). Surprising abundance of *Gallionella*-related iron oxidizers in creek sediments at pH 4.4 or at high heavy metal concentrations. *Front. Microbiol.* 4, 1–12. doi:10.3389/fmicb.2013.00390.
- Fleming, E. J., Cetinić, I., Chan, C. S., Whitney King, D., and Emerson, D. (2014). Ecological succession among iron-oxidizing bacteria. *ISME J.* 8, 804–15. doi:10.1038/ismej.2013.197.
- Flynn, T. M., Sanford, R. A., and Bethke, C. M. (2008). Attached and suspended microbial communities in a pristine confined aquifer. *Water Resour. Res.* 44, 1–7. doi:10.1029/2007WR006633.
- Flynn, T. M., Sanford, R. A., Ryu, H., Bethke, C. M., Levine, A. D., Ashbolt, N. J., and Santo Domingo, J. W. (2013). Functional microbial diversity explains groundwater chemistry in a pristine aquifer. *BMC Microbiol.* 13, 146. doi:10.1186/1471-2180-13-146.
- Flynn, T. M., O’Loughlin, E. J., Mishra, B., DiChristina, T. J., and Kemner, K. M. (2014). Sulfur-mediated electron shuttling during bacterial iron reduction. *Science (80-.)*. 344, 1039–1042. doi:10.1126/science.1252066.
- Folke, C., Carpenter, S., Walker, B., Scheffer, M., Elmqvist, T., Holling, C. S., and Gunderson, L. (2004). Regime Shifts, Resilience, and Biodiversity in Ecosystem

REFERENCES

- Management. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 35, 557–581. doi:10.1146/annurev.ecolsys.35.021103.105711.
- Fredrickson J.K. & Onstott T.C. (2001) Biogeochemical and geological significance of subsurface microbiology. In: *Subsurface Microbiology and Biogeochemistry* (Eds J.K. Fredrickson & M. Fletcher), pp. 3–37. Wiley-Liss, New York, NY.
- Friendly, M. (2000). *Visualizing Categorical Data*.
- Gans, J., Wolinsky, M., and Dunbar, J. (2005). Comment on “Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil”. *Science* 313, 918; author reply 918. doi:10.1126/science.1126853.
- Gibert J., Dole-Olivier M.J., Marmonier P. & Vervier P. (1990) Surface water – groundwater ecotones. In: *The Ecology and Management of Aquatic-Terrestrial Ecotones* (Eds R.J. Naiman & H. De ‘camps), pp. 199–225. UNE-SCO Paris and Parthenon Publishing Group, Carforth.
- Gold T. (1992) The deep, hot biosphere. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89, 6045–6049.
- Goldscheider, N., Hunkeler, D., and Rossi, P. (2006). Review: Microbial biocenoses in pristine aquifers and an assessment of investigative methods. *Hydrogeol. J.* 14, 926–941. doi:10.1007/s10040-005-0009-9.
- Griebler C., Mindl B., Slezak D. & Geiger-Kaiser M. (2002) Distribution patterns of attached and suspended bacteria in pristine and contaminated shallow aquifers studied with an in situ sediment exposure microcosm. *Aquatic Microbial Ecology*, 28, 117–129.
- Griebler, C., and Lueders, T. (2009). Microbial biodiversity in groundwater ecosystems. *Freshw. Biol.* 54, 649–677. doi:10.1111/j.1365-2427.2008.02013.x.
- Haack, S. K., Fogarty, L. R., West, T. G., Alm, E. W., McGuire, J. T., Long, D. T., Hyndman, D. W., and Forney, L. J. (2004). Spatial and temporal changes in microbial community structure associated with recharge-influenced chemical gradients in a contaminated aquifer. *Environ. Microbiol.* 6, 438–448. doi:10.1111/j.1462-2920.2003.00563.x.
- Hallbeck, L., and Pedersen, K. (1990). Culture parameters regulating stalk formation and growth rate of *Gallionella ferruginea*. *J. Gen. Microbiol.* 136, 1675–1680. doi:10.1099/00221287-136-9-1675.
- Hallbeck, L., and Pedersen, K. (2008). Characterization of microbial processes in deep aquifers of the Fennoscandian Shield. *Appl. Geochemistry* 23, 1796–1819. doi:10.1016/j.apgeochem.2008.02.012.
- Handley, K. M., VerBerkmoes, N. C., Steefel, C. I., Williams, K. H., Sharon, I., Miller, C. S., Frischkorn, K. R., Chourey, K., Thomas, B. C., Shah, M. B., et al. (2013). Biostimulation induces syntrophic interactions that impact C, S and N cycling in a sediment microbial community. *ISME J.* 7, 800–16. doi:10.1038/ismej.2012.148.

REFERENCES

- Hanert, H. H. (1989). "Genus Gallionella," in *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 3., eds. J. T. Staley, M. P. Bryant, N. Pfennig, and J. G. Holt (Baltimore), 1974–1979.
- Hanert, H. H. (1989). "Budding and/or appendaged bacteria.," in *In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, eds. J. T. Staley, M. P. Bryant, N. Pfennig, and J. G. Holt (Baltimore), 1974–1979.
- Hemme, C. L., Deng, Y., Gentry, T. J., Fields, M. W., Wu, L., Barua, S., Barry, K., Tringe, S. G., Watson, D. B., He, Z., et al. (2010). Metagenomic insights into evolution of a heavy metal-contaminated groundwater microbial community. *ISME J.* 4, 660–72. doi:10.1038/ismej.2009.154.
- Herrick J.B., Stuart-Keil K.G., Ghiorse W.C. & Madsen E.L. (1997) Natural horizontal transfer of a naphthalene dioxygenase gene between bacteria native to a coal tar-contaminated field site. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 2330–2337.
- Hirsch P., Rades-Rohkohl E., Kölbl-Boelke J. & Nehrkorn A. (1992) Morphological and taxonomic diversity of ground water microorganisms. In: *Progress in Hydrogeochemistry*, (Eds G. Matthes, F.H. Frimmel, P. Hirsch, H.D. Schulz & E. Usdowski), pp. 311–325. Springer Verlag, Berlin.
- Holling, C. S. (1973). Resilience and Stability of Ecological Systems. *Annu.Rev.Ecol.Syst.* 4, 1–23. doi:10.1146/annurev.es.04.110173.000245.
- Hoos E. & Schweisfurth R. (1982) Untersuchungen über die Verteilung von Bakterien von 10 bis 90 Meter unter Bodenoberkante. *Vom Wasser*, 58, 103–112.
- Hug, L. a, Thomas, B. C., Brown, C. T., Frischkorn, K. R., Williams, K. H., Tringe, S. G., and Banfield, J. F. (2015). Aquifer environment selects for microbial species cohorts in sediment and groundwater. 9, 1–11. doi:10.1038/ismej.2015.2.
- Huson, D. H., Auch, A. F., Qi, J., and Schuster, S. C. (2007). MEGAN analysis of metagenomic data. 377–386. doi:10.1101/gr.5969107.
- Hyman M.R., Russell S.A., Ely R.L., Williamson K.J. & Arp D.J. (1995) Inhibition, inactivation, and recovery of ammonia-oxidizing activity in cometabolism of trichloroethylene by *Nitrosomonas europaea*. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 1480–1487.
- Itävaara, M., Nyssönen, M., Kapanen, A., Nousiainen, A., Ahonen, L., and Kukkonen, I. (2011). Characterization of bacterial diversity to a depth of 1500 m in the Outokumpu deep borehole, Fennoscandian Shield. *FEMS Microbiol. Ecol.* 77, 295–309. doi:10.1111/j.1574-6941.2011.01111.x.
- Jägevall, S., Rabe, L., and Pedersen, K. (2011). Abundance and diversity of biofilms in natural and artificial aquifers of the Äspö Hard Rock Laboratory, Sweden. *Microb. Ecol.* 61, 410–22. doi:10.1007/s00248-010-9761-z.

REFERENCES

- Jakobsen, R., and Postma, D. (1999). Redox zoning, rates of sulfate reduction and interactions with Fe-reduction and methanogenesis in a shallow sandy aquifer, Romo, Denmark. *Geochim. Cosmochim. Acta* 63, 137–151. doi:10.1016/S0016-7037(98)00272-5.
- Jewell, T. N.M., Karaoz, U., Brodie, E. L., Williams, K. H., Beller, H. R.. (2016). Metatranscriptomic evidence of pervasive and diverse chemolithoautotrophy relevant to C, S, N and Fe cycling in a shallow alluvial aquifer. *ISME J.* 10, 2106–17. doi:10.1038/ismej.2016.25.
- Jimenez-Martinez, J., Longuevergne, L., Le Borgne, T., Davy, P., Russian, A., and Bour, O. (2014). Temporal and spatial scaling of hydraulic response to recharge in fractured aquifers: Insights from a frequency domain analysis. *Water Resour. Res.* doi:10.1002/wrcr.20260.
- Jørgensen, C. J., Jacobsen, O. S., Elberling, B., and Aamand, J. (2009). Microbial oxidation of pyrite coupled to nitrate reduction in anoxic groundwater sediment. *Environ. Sci. Technol.* 43, 4851–4857. doi:10.1021/es803417s.
- Kanehisa, M., and Goto, S. (2000). KEGG: Kyoto Encyclopaedia of Genes and Genomes. *Nucl. Acids Res.* 28, 27–30. doi:10.1093/nar/28.1.27.
- Kanehisa, M., Goto, S., Sato, Y., Kawashima, M., Furumichi, M., and Tanabe, M. (2014). Data, information, knowledge and principle: back to metabolism in KEGG. *Nucleic Acids Res.* 42, D199–D205. doi:10.1093/nar/gkt1076.
- Keddy, P. a. (1992). Assembly and response rules: two goals for predictive community ecology. *J. Veg. Sci.* 3, 157–164. doi:10.2307/3235676.
- Kleikemper J., Schroth M.H., Sigler W.V., Schmucki M., Bernasconi S.M.&Zeyer J. (2002) Activity and diversity of sulfate-reducing bacteria in a petroleum hydro- carbon-contaminated aquifer. *Applied and Environ- mental Microbiology*, 68, 1516–1523.
- Kölbel-Boelke, J., Tienken, B., and Nehr Korn, A. (1988). Microbial Communities in the Saturated Groundwater Environment I: Methods of Isolation and Characterization of Heterotrophic Bacteria. *Microb. Ecol.* 16, 17–29.
- Kölbel-Boelke J., Anders E.M. & Nehr Korn A. (1988) Microbial communities in the saturated groundwater environment. II. Diversity of bacterial communities in a pleistocene sand aquifer and their in vitro activities. *Microbial Ecology*, 16, 31–48.
- Kölbel-Boelke J. & Nehr Korn A. (1992) Heterotrophic bacterial communities in the Bocholt aquifer system. In: *Progress in Hydrogeochemistry* (Eds G. Matthess, F.H. Frimmel, P. Hirsch, H.D. Schulz & E. Usdowski), pp. 378–390. Springer Verlag, Berlin.
- Korom, S. F. (1992). Natural Denitrification in the Saturated Zone: A Review. *Water Resour. Res.* 28, 1657–1668.
- Kotelnikova S. & Pedersen K. (1997) Evidence for methanogenic Archaea and homoacetogenic Bacteria in deep granitic rock aquifers. *FEMS Microbiology Reviews*, 20, 339–349.

REFERENCES

- Krepiski, S. T., Hanson, T. E., and Chan, C. S. (2012). Isolation and characterization of a novel biomineral stalk-forming iron-oxidizing bacterium from a circumneutral groundwater seep. *Environ. Microbiol.* 14, 1671–1680. doi:10.1111/j.1462-2920.2011.02652.x.
- Kyle, J. E., Eydal, H. S. C., Ferris, F. G., and Pedersen, K. (2008). Viruses in granitic groundwater from 69 to 450 m depth of the Aspö hard rock laboratory, Sweden. *ISME J.* 2, 571–4. doi:10.1038/ismej.2008.18.
- Labasque, T. (2006). Analyse des CFC dans les eaux souterraines. *Les cahiers techniques de Géosciences Rennes.*
- Laurencelle, M. (2010). Influence des processus de mélange sur la chimie des eaux souterraines : application au site de Ploemeur. *Rapport interne Géosciences Rennes.*
- Le Borgne, T., Bour, O., de Dreuzy, J. R., Davy, P., and Touchard, F. (2004). Equivalent mean flow models for fractured aquifers: Insights from a pumping tests scaling interpretation. *Water Resour. Res.* 40, W03512. doi:10.1029/2003WR002436.
- Ledin, M., and Pedersen, K. (1996). The environmental impact of mine wastes - Roles of microorganisms and their significance in treatment of mine wastes. *Earth-Science Rev.* 41, 67–108. doi:10.1016/0012-8252(96)00016-5.
- Legout, C., Molenat, J., Aquilina, L., Gascuelodoux, C., Faucheux, M., Fauvel, Y., and Bariac, T. (2007). Solute transfer in the unsaturated zone-groundwater continuum of a headwater catchment. *J. Hydrol.* 332, 427–441. doi:10.1016/j.jhydrol.2006.07.017.
- Lehman, R. M., Colwell, F. S., and Bala, G. a (2001a). Attached and unattached microbial communities in a simulated basalt aquifer under fracture- and porous-flow conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2799–809. doi:10.1128/AEM.67.6.2799-2809.2001.
- Lehman, R. M., Roberto, F. F., Earley, D., Bruhn, D. F., Brink, S. E., O’Connell, S. P., Delwiche, M. E., and Colwell, F. S. (2001b). Attached and Unattached Bacterial Communities in a 120-Meter Corehole in an Acidic, Crystalline Rock Aquifer. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2095–2106. doi:10.1128/AEM.67.5.2095-2106.2001.
- Lin, X., McKinley, J., Resch, C. T., Kaluzny, R., Lauber, C. L., Fredrickson, J., Knight, R., and Konopka, A. (2012). Spatial and temporal dynamics of the microbial community in the Hanford unconfined aquifer. *ISME J.* 6, 1665–76. doi:10.1038/ismej.2012.26.
- Luther, G. W., Findlay, A. J., MacDonald, D. J., Owings, S. M., Hanson, T. E., Beinart, R. A., and Girguis, P. R. (2011). Thermodynamics and kinetics of sulfide oxidation by oxygen: A look at inorganically controlled reactions and biologically mediated processes in the environment. *Front. Microbiol.* 2, 1–9. doi:10.3389/fmicb.2011.00062.
- MacArthur, R. H., and Wilson, E. O. (1967). *The Theory of Island Biogeography*. NJ: Prince. Princeton.

REFERENCES

- Martin, Marcel (Department of Computer Science, T. D., and Germany) (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal* 17.1, 5–7.
- McGuire, J. T., Smith, E. W., Long, D. T., Hyndman, D. W., Haack, S. K., Klug, M. J., and Velbel, M. A. (2000). Temporal variations in parameters reflecting terminal-electron-accepting processes in an aquifer contaminated with waste fuel and chlorinated solvents. *Chem. Geol.* 169, 471–485. doi:10.1016/S0009-2541(00)00223-0.
- McGuire, J. T., Long, D. T., and Hyndman, D. W. (2005). Analysis of recharge-induced geochemical change in a contaminated aquifer. *Ground Water* 43, 518–530. doi:10.1111/j.1745-6584.2005.0040.x.
- Megonigal, J. P., Hines, M. E., and Visscher, P. T. (2004). Anaerobic Metabolism: Linkages to Trace Gases and Aerobic Processes. *Biogeochemistry*, 317–424.
- Melton, E. D., Swanner, E. D., Behrens, S., Schmidt, C., and Kappler, A. (2014). The interplay of microbially mediated and abiotic reactions in the biogeochemical Fe cycle. *Nat. Rev. Microbiol.* 12, 797–809. doi:10.1038/nrmicro3347.
- Nyysönen, M., Hultman, J., Ahonen, L., Kukkonen, I., Paulin, L., Laine, P., Itävaara, M., and Auvinen, P. (2013). Taxonomically and functionally diverse microbial communities in deep crystalline rocks of the Fennoscandian shield. *ISME J.*, 1–13. doi:10.1038/ismej.2013.125.
- Nyysönen, M., Hultman, J., Ahonen, L., Kukkonen, I., Paulin, L., Laine, P., Itävaara, M., and Auvinen, P. (2014). Taxonomically and functionally diverse microbial communities in deep crystalline rocks of the Fennoscandian shield. *ISME J.* 8, 126–38. doi:10.1038/ismej.2013.125.
- Oksanen, A. J., Blanchet, F. G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P. R., Hara, R. B. O., Simpson, G. L., Solymos, P., and Stevens, M. H. H. (2014). Package “vegan.” at <http://cran.r-project.org>, <https://github.com/vegandevs/vegan>. 1–14.
- Ortiz, M., Legatzki, A., Neilson, J. W., Fryslie, B., Nelson, W. M., Wing, R. a, Soderlund, C. a, Pryor, B. M., and Maier, R. M. (2013). Making a living while starving in the dark: metagenomic insights into the energy dynamics of a carbonate cave. *ISME J.*, 1–14. doi:10.1038/ismej.2013.159.
- Pagani, I., Lapidus, A., Nolan, M., Lucas, S., Hammon, N., Deshpande, S., Cheng, J.-F., Chertkov, O., Davenport, K., Tapia, R., et al. (2011). Complete genome sequence of *Desulfobulbus propionicus* type strain (1pr3). *Stand. Genomic Sci.* 4, 100–110. doi:10.4056/sigs.1613929.
- Papke R.T., Ramsing N.B., Bateson M.M. & Ward D.M. (2003) Geographical isolation in hot spring cyanobac- teria. *Environmental Microbiology*, 5, 650–659.
- Patel, P. V, Gianoulis, T. A., Bjornson, R. D., Yip, K. Y., Engelman, D. M., and Gerstein, M. B. (2010). Analysis of membrane proteins in metagenomics: networks of correlated

REFERENCES

- environmental features and protein families. *Genome Res.* 20, 960–971. doi:10.1101/gr.102814.109.
- Pauwels, H., Ayraud-Vergnaud, V., Aquilina, L., and Molénat, J. (2010). The fate of nitrogen and sulfur in hard-rock aquifers as shown by sulfate-isotope tracing. *Appl. Geochemistry* 25, 105–115. doi:10.1016/j.apgeochem.2009.11.001.
- Pedersen K. (1997) Microbial life in deep granitic rock. *FEMS Microbiology Reviews*, 20, 399–414.
- Pedersen, K. (2012). Influence of H₂ and O₂ on sulphate-reducing activity of a subterranean community and the coupled response in redox potential. *FEMS Microbiol. Ecol.* 82, 653–65. doi:10.1111/j.1574-6941.2012.01434.x.
- Pedersen, K. (2013). Metabolic activity of subterranean microbial communities in deep granitic groundwater supplemented with methane and H₂. *ISME J.* 7, 839–49. doi:10.1038/ismej.2012.144.
- Pedersen, K., Arlinger, J., Eriksson, S., Hallbeck, A., Hallbeck, L., and Johansson, J. (2008). Numbers, biomass and cultivable diversity of microbial populations relate to depth and borehole-specific conditions in groundwater from depths of 4–450 m in Olkiluoto, Finland. *ISME J.* 2, 760–75. doi:10.1038/ismej.2008.43.
- Petitjean, P., and Hénin, O. (2004). Dosage du carbone organique dissout dans les eaux douces naturelles. Intérêt, principe, mise en oeuvre et précautions opératoires. *Les cahiers techniques de Géosciences Rennes*.
- Phelps T.J., Fliermans C.B., Garland T.R., Pfiffner S.M. & White D.C. (1989) Methods for recovery of deep terrestrial subsurface sediments for microbiological studies. *Journal of Microbiological Methods*, 9, 267–279.
- Phelps T.J., Murphy E.M., Pfiffner S.M. & White D.C. (1994) Comparison between geochemical and biological estimates of subsurface microbial activities. *Microbial Ecology*, 28, 335–349.
- Pianka, E. R. (1972). r and K Selection or b and d Selection? *Am. Nat.* 106, 581–588. doi:10.1086/282798.
- Picard, A., Kappler, A., Schmid, G., Quaroni, L., and Obst, M. (2015). Experimental diagenesis of organo-mineral structures formed by microaerophilic Fe(II)-oxidizing bacteria. *Nat. Commun.* 6, 6277. doi:10.1038/ncomms7277.
- Picioareanu, C., Vrouwenvelder, J. S., and van Loosdrecht, M. C. M. (2009). Three-dimensional modeling of biofouling and fluid dynamics in feed spacer channels of membrane devices. *J. Memb. Sci.* 345, 340–354. doi:10.1016/j.memsci.2009.09.024.
- Planavsky, N., Rouxel, O., Bekker, A., Shapiro, R., Fralick, P., and Knudsen, A. (2009). Iron-oxidizing microbial ecosystems thrived in late Paleoproterozoic redox-stratified oceans. *Earth Planet. Sci. Lett.* 286, 230–242. doi:10.1016/j.epsl.2009.06.033.

REFERENCES

- Plummer, L., Busenberg, E., and Cook, P. (2006). Use of Chlorofluorocarbons in Hydrology. *Int. At. Energy Agency*, 291.
- Probst, A. J., Weinmaier, T., Raymann, K., Perras, A., Emerson, J. B., Rattei, T., Wanner, G., Klingl, A., Berg, I. a, Yoshinaga, M., et al. (2014). Biology of a widespread uncultivated archaeon that contributes to carbon fixation in the subsurface. *Nat. Commun.* 5, 5497. doi:10.1038/ncomms6497.
- Purkamo, L., Bomberg, M., Nyysönen, M., Kukkonen, I., Ahonen, L., and Itävaara, M. (2014). Heterotrophic Communities Supplied by Ancient Organic Carbon Predominate in Deep Fennoscandian Bedrock Fluids. *Microb. Ecol.* doi:10.1007/s00248-014-0490-6.
- Quaiser, A., Bodi, X., Dufresne, A., Naquin, D., Francez, A.-J., Dheilly, A., Coudouel, S., Pedrot, M., and Vandenkoornhuysse, P. (2014). Unraveling the stratification of an iron-oxidizing microbial mat by metatranscriptomics. *PLoS One* 9, e102561. doi:10.1371/journal.pone.0102561.
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., and Glöckner, F. O. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 41, D590–6. doi:10.1093/nar/gks1219.
- Röling W.F.M., van Breukelen B.M., Braster M., Lin B. & van Verseveld H.W. (2001) Relationships between microbial community structure and hydrochemistry in a landfill leachate-polluted aquifer. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 4619–4629.
- Roques, C. (2013). Hydrogéologie des zones de faille du socle cristallin : implications en terme de ressources en eau pour le Massif Armoricaïn. *Univ. Rennes I*.
- Roques, C., Aquilina, L., Bour, O., Maréchal, J.-C., Dewandel, B., Pauwels, H., Labasque, T., Vergnaud-Ayraud, V., and Hochreutener, R. (2014). Groundwater sources and geochemical processes in a crystalline fault aquifer. *J. Hydrol.* doi:10.1016/j.jhydrol.2014.10.052.
- Ross, N., Villemur, R., Marcandella, E., and Deschênes, L. (2001). Assessment of Changes in Biodiversity when a Community of Ultramicrobacteria Isolated from Groundwater Is Stimulated to Form a Biofilm. *Microb. Ecol.* 42, 56–68. doi:10.1007/s002480000085.
- Roudnew, B., Seymour, J. R., Jeffries, T. C., Lavery, T. J., Smith, R. J., and Mitchell, J. G. (2010). Bacterial and Virus-Like Particle Abundances in Purged and Unpurged Groundwater Depth Profiles. *Ground Water Monit. Remediat.* 4, 72–77. doi:10.1111/j1745.
- Ruelleu, S. (2010). Caractérisation hydrogéophysique des milieux fracturés : développement instrumental et modélisation des vitesses d'écoulement en forage.
- Sahl, J. W., Schmidt, R., Swanner, E. D., Mandernack, K. W., Templeton, A. S., Kieft, T. L., Smith, R. L., Sanford, W. E., Callaghan, R. L., Mitton, J. B., et al. (2008). Subsurface microbial diversity in deep-granitic-fracture water in Colorado. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 143–152. doi:10.1128/AEM.01133-07.

REFERENCES

- Santoro A.E., Boehm A.B. & Francis C.A. (2006) Denitrifier community composition along a nitrate and salinity gradient in a coastal aquifer. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 2102–2109.
- Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., Hollister, E. B., Lesniewski, R. A., Oakley, B. B., Parks, D. H., Robinson, C. J., et al. (2009). Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 7537–7541. doi:10.1128/AEM.01541-09.
- Sinclair JL, Alexander M (1989) Effect of protozoan predation on relative abundance of fast-growing and slow-growing bacteria. *Can J Microbiol* 35(5):578–582.
- Sirisena, K. A., Daughney, C. J., Moreau-Fournier, M., Ryan, K. G., and Chambers, G. K. (2013). National survey of molecular bacterial diversity of New Zealand groundwater: Relationships between biodiversity, groundwater chemistry and aquifer characteristics. *FEMS Microbiol. Ecol.* 86, 490–504. doi:10.1111/1574-6941.12176.
- Smith, M. B., Rocha, A. M., Smillie, C. S., Olesen, S. W., Paradis, C., Wu, L., Campbell, J. H., Fortney, J. L., Mehlhorn, T. L., Lowe, K. A., et al. (2015). Natural bacterial communities serve as quantitative geochemical biosensors. *MBio*. doi:10.1128/mBio.00326-15.
- Smith, R. J., Jeffries, T. C., Roudnew, B., Fitch, A. J., Seymour, J. R., Delpin, M. W., Newton, K., Brown, M. H., and Mitchell, J. G. (2012). Metagenomic comparison of microbial communities inhabiting confined and unconfined aquifer ecosystems. *Environ. Microbiol.* 14, 240–253. doi:10.1111/j.1462-2920.2011.02614.x.
- Smith, R. J., Jeffries, T. C., Roudnew, B., Seymour, J. R., Fitch, A. J., Simons, K. L., Speck, P. G., Newton, K., Brown, M. H., and Mitchell, J. G. (2013). Confined aquifers as viral reservoirs. *Environ. Microbiol. Rep.* 5, 725–30. doi:10.1111/1758-2229.12072.
- Starek, M., Kolev, K. I., Berthiaume, L., Yeung, C. W., Sleep, B. E., Wolfaardt, G. M., and Hausner, M. (2011). A flow cell simulating a subsurface rock fracture for investigations of groundwater-derived biofilms. *Int. Microbiol.* 14, 163–171. doi:10.2436/20.1501.01.145.
- Starr, R. C., and Gillham, R. W. (1993). Denitrification and Organic carbon Availability in Two Aquifers. *Ground Water* 31, 934–947.
- Stevens T.O. (1997) Lithoautotrophy in the subsurface. *FEMS Microbiology Reviews*, 20, 327–337.
- Stevens T.O. & McKinley J.P. (1995) Lithoautotrophic microbial ecosystems in deep basalt aquifers. *Science*, 270, 450–454.
- Stim K.P. (1995) A phylogenetic analysis of micro-organisms isolated from subsurface environments. *Molecular Ecology*, 4, 1–10.

REFERENCES

- Stoecker K., Bendinger B., Schöning B., Nielsen P.H., Nielsen J.L., Baranyi C., Toenshoff E.R., Daims H. & Wagner M. (2006) Cohn's Crenothrix is a filamentous methane oxidizer with an unusual methane monooxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 2363–2367.
- Stumm, W., and Morgan, J. J. (1981). *Aquatic chemistry: an introduction emphasizing chemical equilibria in natural waters*. 2nd editio. New York: New York: Wiley-Interscience.
- Suzuki, R., and Shimodaira, H. (2015) Package “pvclust” Hierarchical Clustering with P-Values via Multiscale Bootstrap Resampling. at <http://www.sigmath.es.osaka-u.ac.jp/shimo-lab/prog/pvclust/>. 1–14.
- Takai K., Mormile M.R., McKinley J.P., Brockman F.J., Holben W., Kovacik W.P. & Fredrickson J.K. (2003) Shifts in archaeal communities associated with lithological and geochemical variations in subsurface Cretaceous rock. *Environmental Microbiology*, 5, 309–320. doi:10.1046/j.1462-2920.2003.00421.x.
- Tan, B., Jane Fowler, S., Laban, N. A., Dong, X., Sensen, C. W., Foght, J., and Gieg, L. M. (2015). Comparative analysis of metagenomes from three methanogenic hydrocarbon-degrading enrichment cultures with 41 environmental samples. *ISME J.* 9, 2028–2045. doi:10.1038/ismej.2015.22.
- Tarits, C., Aquilina, L., Ayraud, V., Pauwels, H., Davy, P., Touchard, F., and Bour, O. (2006). Oxido-reduction sequence related to flux variations of groundwater from a fractured basement aquifer (Ploemeur area, France). *Appl. Geochemistry* 21, 29–47. doi:10.1016/j.apgeochem.2005.09.004.
- Ter Braak, C. J. F., and Looman, C. W. N. (1994). Biplots in Reduced-Rank Regression. *Biometrical J.* 36, 983–1003.
- Tilman D (1982) *Resource Competition and Community Structure*. 296 pages. Princeton University Press.
- Torrentó, C., Urmeneta, J., Otero, N., Soler, A., Viñas, M., and Cama, J. (2011). Enhanced denitrification in groundwater and sediments from a nitrate-contaminated aquifer after addition of pyrite. *Chem. Geol.* 287, 90–101. doi:10.1016/j.chemgeo.2011.06.002.
- Van den Wollenberg, A. L. (1977). Redundancy Analysis, an alternative for canonical correlation analysis. *Psychometrika* 42, 207–219.
- Van der Meer J.R., Werlen C., Nishino S.F. & Spain J.C. (1998) Evolution of a pathway for chlorobenzene metabolism leads to natural attenuation in contaminated groundwater. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 4185–4193.
- Van Waasbergen L.G., Balkwill D.L., Crocker F.H., Bjornstad B.N. & Miller R.V. (2000) Genetic diversity among *Arthrobacter* species collected across a heterogeneous series of terrestrial deep-subsurface sediments as determined on the basis of 16S rRNA and *recA* gene sequences. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 3454–3463.

REFERENCES

- Velasco Ayuso, S., Guerrero, M. C., Montes, C., and López-Archilla, A. I. (2009). Spatiotemporal distribution of microbial communities in a coastal, sandy aquifer system (Donana, SW Spain). *Geobiology* 7, 66–81. doi:10.1111/j.1472-4669.2008.00183.x.
- Von der Heide, C., Böttcher, J., Deurer, M., Weymann, D., Well, R., and Duijnisveld, W. H. M. (2008). Spatial variability of N₂O concentrations and of denitrification-related factors in the surficial groundwater of a catchment in Northern Germany. *J. Hydrol.* 360, 230–241. doi:10.1016/j.jhydrol.2008.07.034.
- Vroblecky D.A. & Chapelle F.H. (1994) Temporal and spatial changes of terminal electron-accepting processes in a petroleum hydrocarbon-contaminated aquifer and the significance for contaminant biodegradation. *Water Resources Research*, 30, 1561–1570.
- Watanabe, T., Kojima, H., and Fukui, M. (2014). Complete genomes of freshwater sulfur oxidizers *Sulfuricella denitrificans* skB26 and *Sulfuritalea hydrogenivorans* sk43H: Genetic insights into the sulfur oxidation pathway of betaproteobacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* 37, 387–395. doi:10.1016/j.syapm.2014.05.010.
- Whitaker R.J., Grogan D.W. & Taylor J.T. (2003) Geographic barriers isolate endemic populations of hyper-thermophilic Archaea. *Science*, 301, 976–978.
- Wilkinson, G. N., and Rogers, C. E. (1973). Symbolic descriptions of factorial models for analysis of variance. *Appl. Stat.* 22, 392–399.
- Wilson J.T., McNabb J.F., Balkwill D.L. & Ghiorse W.C. (1983) Enumeration and characterization of bacteria indigenous to a shallow water-table aquifer. *Ground Water*, 21, 134–142. Winderl
- Wrighton, K. C., Thomas, B. C., Sharon, I., Miller, C. S., Castelle, C. J., VerBerkmoes, N. C., Wilkins, M. J., Hettich, R. L., Lipton, M. S., Williams, K. H., et al. (2012). Fermentation, hydrogen, and sulfur metabolism in multiple uncultivated bacterial phyla. *Science* 337, 1661–5. doi:10.1126/science.1224041.
- Wrighton, K. C., Castelle, C. J., Wilkins, M. J., Hug, L. a, Sharon, I., Thomas, B. C., Handley, K. M., Mullin, S. W., Nicora, C. D., Singh, A., et al. (2014). Metabolic interdependencies between phylogenetically novel fermenters and respiratory organisms in an unconfined aquifer. *ISME J.* 8, 1452–63. doi:10.1038/ismej.2013.249.
- Wyns, R., Baltassat, J.-M., Lachassagne, P., Legchenko, A., Vairon, J., and Mathieu, F. (2004). Application of proton magnetic resonance soundings to groundwater reserve mapping in weathered basement rocks (Brittany, France). *Bull. Soc. géol. Fr.* 175, 21–34.
- Zhang, Y.-C., Slomp, C. P., Broers, H. P., Bostick, B., Passier, H. F., Böttcher, M. E., Omeregíe, E. O., Lloyd, J. R., Polya, D. a., and Van Cappellen, P. (2012). Isotopic and microbiological signatures of pyrite-driven denitrification in a sandy aquifer. *Chem. Geol.* 300-301, 123–132. doi:10.1016/j.chemgeo.2012.01.024.

REFERENCES

- Zhang, J., Kobert, K., Flouri, T., and Stamatakis, A. (2014). PEAR: a fast and accurate Illumina Paired-End reAd mergeR. *Bioinformatics* 30, 614–620. doi:10.1093/bioinformatics/btt593.
- Zhou J.-Z. & Tiedje J.M. (1995) Gene transfer from a bacterium injected into an aquifer to an indigenous bacterium. *Molecular Ecology*, 4, 613–618.
- Zhou J., Xia B., Treves D.S., Wu L.Y., Marsh T.L., O'Neill R.V., Palumbo A.V. & Tiedje J.M. (2002) Spatial and resource factors influencing high microbial diversity in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 326–334.
- Zhou, Y., Kellermann, C., and Griebler, C. (2012). Spatio-temporal patterns of microbial communities in a hydrologically dynamic pristine aquifer. *FEMS Microbiol. Ecol.* 81, 230–42. doi:10.1111/j.1574-6941.2012.01371.x.
- Zlatkin I.V., Schneider M., de Bruijn F.J. & Forney L.J. (1996) Diversity among bacteria isolated from the deep subsurface. *Journal of Industrial Microbiology*, 17, 219–227.

ANNEXES

ANNEXES: AUTRES TRAVAUX

Annexe A - Impact of climate changes during the last 5 million years on groundwater in basement aquifers

SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

Impact of climate changes during the last 5 million years on groundwater in basement aquifers

Received: 27 March 2015
Accepted: 13 August 2015
Published: 22 September 2015

Luc Aquilina¹, Virginie Vergnaud-Ayraud¹, Antoine Armandine Les Landes¹, Hélène Pauwels², Philippe Davy², Emmanuelle P etelet-Giraud², Thierry Labasque¹, Clément Roques¹, Eliot Chatton¹, Olivier Bour¹, Sarah Ben Maamar³, Alexis Dufresne³, Mahmoud Khaska^{4,6}, Corinne Le Gal La Salle^{4,6} & Florent Barbecot⁵

Climate change is thought to have major effects on groundwater resources. There is however a limited knowledge of the impacts of past climate changes such as warm or glacial periods on groundwater although marine or glacial fluids may have circulated in basements during these periods. Geochemical investigations of groundwater at shallow depth (80–400 m) in the Armorican basement (western France) revealed three major phases of evolution: (1) Mio-Pliocene transgressions led to marine water introduction in the whole rock porosity through density and then diffusion processes, (2) intensive and rapid recharge after the glacial maximum down to several hundred meters depths, (3) a present-day regime of groundwater circulation limited to shallow depth. This work identifies important constraints regarding the mechanisms responsible for both marine and glacial fluid migrations and their preservation within a basement. It defines the first clear time scales of these processes and thus provides a unique case for understanding the effects of climate changes on hydrogeology in basements. It reveals that glacial water is supplied in significant amounts to deep aquifers even in permafrosted zones. It also emphasizes the vulnerability of modern groundwater hydrosystems to climate change as groundwater active aquifers is restricted to shallow depths.

The last glacial period resulted in drastic modifications of the hydrogeological regime^{1,2}. Sedimentary basins show evidence of glacial recharge^{1,3–8}. The case for fractured aquifers in basements is less clear. Modeling of the hydrogeological regime in the Fennoscandian and Canadian shield during the last 10,000 yrs, has also indicated potential phases of glacial groundwater circulation in the basement^{9,10}. However, whether recharge of glacial water is continuous or not during the last glacial maximum is not known. Furthermore, relationships of recharge with permafrosted areas remain unclear as well as recharge mechanisms^{11–13}.

In recent decades, basement saline fluids have been sampled at great depths (0.5–5 km) in the context of nuclear-waste disposal investigations, and other general research programs. There is now evidence that such fluids are relatively ubiquitous in basements worldwide^{14,15}. However their origin remains difficult to decipher due to intensive water-rock interactions and the extremely long residence-times¹³. In several cases, analyses with geochemical tracers have suggested that the solutes are of marine origin^{16–21}. There is however no clear evidence of a potential marine component in hard rock aquifers. As an example, some

¹OSUR-Géosciences Rennes, Université Rennes 1 - CNRS, 35000 Rennes, France. ²BRGM, Laboratory Department, 3 av C. Guillemin, 45000 Orl ans, France. ³OSUR-ECOBIO, Université Rennes 1 - CNRS, 35000 Rennes, France. ⁴Universit e de N imes, EA 7352 CHROME, 30021 N imes, France. ⁵CNRS/UPS UMR 8148 IDES, Université Paris-Sud, 91400 ORSAY France; P.A. GEOTOP, Université du Québec à Montréal, Montréal Qc, H3C 3P8, Canada. ⁶Aster Team Aix-Marseille Université, CNRS-IRD UM 34 CEREGE, Technopôle de l'Environnement Arbois-Méditerranée, 13545 Aix-en-Provence, France. Correspondence and requests for materials should be addressed to L.A. (email: Luc.aquilina@univ-rennes1.fr)

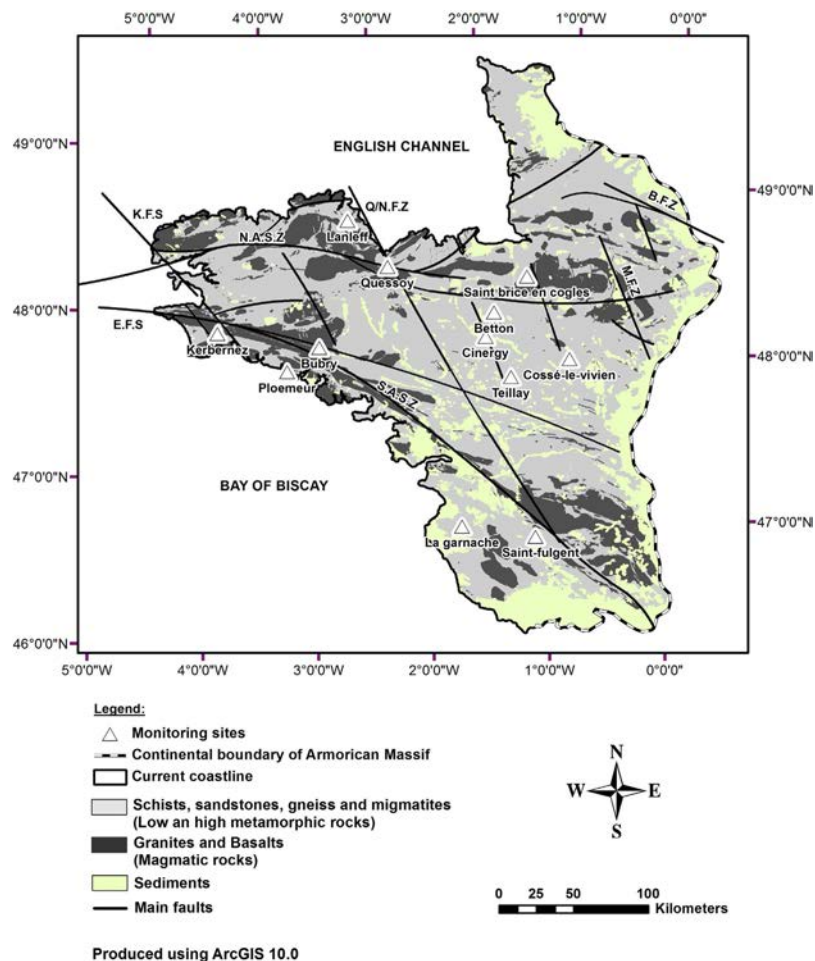


Figure 1. Location map of the sampling sites and geology of the Armorican Massif. Twelve sites showing high Cl concentration were chosen from the ADES national groundwater monitoring database. The well characteristics are presented in the Table S1. Two scientific monitoring sites (Kerbernez—Agrhys observatory and St Brice en Coglès) presenting shallow modern groundwater were also included to get a representative modern end-member. Three main geological domains are separated by large shear zones (South and North Armorican Shear Zones) and divided by more recent N140° fault zones (Elorn, Kerforne, Quessoy/Nort). The geological shapes have been manually created from detailed geological maps available on-line from BRGM (<http://infoterre.brgm.fr>). The coast line has been manually pointed as well as the sampling sites which have been pointed from their GPS coordinates.

of the brines in the Canadian shield are suggested to be of Pleistocene cryogenic origin^{22,23} but are also suggested to be of marine origin, which would require a Devonian age^{19,24,25}.

The mechanisms that could explain how and when marine fluids could be introduced into the basement remain poorly understood^{26,27}. Furthermore, no knowledge of the mechanisms involved in the preservation of marine or glacial fluids and the time length of such preservation has been available until now.

Basement rocks also constitute major groundwater resources which have been little exploited. However, there is now growing pressure for more intensive use of these resources. In recent decades, anthropogenic pressure has resulted in major drawdown and chemical evolution^{28,29}. Such pressure accentuates the modifications induced by modern global warming as temperature increase should limit groundwater recharge in a large part of the earth surface before the end of this century, although groundwater recharge should increase in more restricted areas^{30,31}. Deciphering the effects of climate change on paleo-hydrogeological regimes in basements is therefore of great importance. More precisely, the effects and ages of marine transgression on fluid circulation in basements need to be reliably identified, and the velocity of solute leaching quantified, together with the effects and duration of glacial fluid circulation.

Materials and Methods

Geological and hydrogeological setting. The Armorican basement covers an area of 68,500 km² in western France (Fig. 1). The Armorican Massif is a Variscan basement including some relics of the

Cadomian orogenic belt^{32,33} (Fig. 1). The Armorican basement is made of three major units of Upper Proterozoic to Paleozoic formations separated by major N110E shear zones: the North Armorican Shear Zone (NASZ) and the South Armorican Shear Zone (SASZ). The Armorican basement is made of low and high metamorphic rocks (schist, sandstone, micaschist and gneiss), various plutonic rocks and locally some basaltic rocks. The Armorican basement was further densely fractured (N140E faults) during the Permian–Triassic extension. Some scattered remnants of Mesozoic and Cenozoic sediments are preserved on the Armorican basement. Although the Armorican basement has been thought as mainly continental during the Jurassic and Cretaceous times, it may have been at least partially flooded during this period³⁴. During the Early Eocene global warming, the Armorican basement recorded the development of lateritic weathering several of meters thick, which was followed by semi-arid conditions (Late Eocene to Oligocene) until the Late Miocene cooling and the Mio–Pliocene boundary where the current climatic conditions prevailed across Europe^{35,36}. During these periods, the Armorican Massif was flooded by rising sea-levels during the Early Eocene (Ypresian), the Late Eocene (Bartonian), the early Oligocene (Rupelian) and the Lower to Middle Miocene until about 11 Myrs^{34,37}. According to stratigraphic records studies and to the eustatic sea-level fluctuations³⁸, three main marine transgressions can be identified during most recent periods with three different paleocoastlines: (1) the oldest and the highest, is Mio–Pliocene (Messinian $\sim 5.3 \pm 0.8$ Myr) with sea level +90 m asl, (2) the second is Pliocene (Reuverian $\sim 2.7 \pm 0.3$ Myr) with sea level +60 m asl; and (3) the most recent is Pleistocene (Gelasian/Calabrian $\sim 1.8 \pm 0.2$ Myr) with sea level +30 m asl (Fig. S1 Supporting Information). Although the sea-level fluctuation curve shows three small events including the Pleistocene Gelasian/Calabrian one, sedimentological relicts seem to only characterize one of these events. As the Miocene events occurred more than 10 Myrs in the past, we focus in this study on the more recent Mio–Pliocene to Pleistocene events that are more likely the potential mechanisms for the observed salinization of the aquifers.

The altitudes of the Armorican basement reach 400 m in places but commonly range from 100 to 200 m. The climate is temperate. From a hydrogeological point of view, the weathered layer (0–30 m) constitutes an aquifer which is highly sensitive to diffuse agricultural pollution³⁹. Additional aquifers can be found in the fractured rocks below this aquifer where water circulation is related to fault zones⁴⁰.

More than 1,800 wells designed for groundwater exploitation are recorded in the ADES database for Brittany (<http://www.adeseaufrance.fr/>). This database was used to analyze the spatial distribution of chloride concentrations in wells located further than 1 km from the coast line⁴¹.

Twelve sites in the area with very high chloride concentrations (> 80 mg/L) were selected for geochemical investigation. Groundwater was collected after pumping in the deeper part of the aquifers below the weathered layer at depths of 50 to 150 m. One sample was collected from a deep research well (“Cinergy sample”) which intersected the basement from 405 m down to 675 m below a local sedimentary basin. This was the deepest and most saline sample ($Cl = 1,208$ mg/L). The samples collected, with Cl concentrations ranging from 74 to 144 mg/L, show evidences of mixing with modern and shallow groundwater ($Cl < 50$ mg/L). A sub-group of three sites (Bubry, Betton and Cinergy sites) with the most saline samples ($Cl > 150$ mg/L) is defined from PCA analysis (supporting information, section Sample origin and water-rock interaction). Below we compare these most saline fluids and other mixed samples to groundwater in the shallow weathered zone which contains modern and non saline groundwater. Although the number of saline samples is limited, it appeared clear from the chloride data base that very high chloride concentrations could be observed in various sites. The 12 sites were chosen in order to represent various geological formations as well as various places in the Armorican Massif (see sample location and characteristics Fig. 1 and Table S1, supporting Information). Although limited, this database is thought to be representative of the scale of the whole Armorican basement.

Analytical methods section. Wells were pumped trying to install the pump in front of the most permeable fractures. Physico-chemical parameters (pH, Eh, T°C, Cond.) were monitored until stabilization was reached i.e. about 20 to 30 mn, usually 30 to 50% of the borehole volume. Samples were collected in polyethylene bottles rinsed with ultrapure water and acidified for cation analysis. Anions, cations and trace-elements were analysed in the Geosciences Rennes Laboratory using chromatography (anions) and ICP-MS (cations and trace).

Dissolved gases were collected without air contamination in steel bottles using a specific Grundfoss pump. CFC and SF₆ were measured in the Rennes Condate-Eau analytical laboratory through gas-chromatographic analysis with ECD detector. Ne and Ar gases were measured through gas-chromatographic analysis with a catharometric detector. Uncertainty is about 3% for CFC and SF₆ and about 5% for other gases.

All the isotopic analysis were carried out in the BRGM Laboratory. Water stable isotopes were determined through equilibration with $\delta^{18}O$ and δD uncertainties of ± 0.1 and 0.5‰. Sulphate isotopic compositions were determined using a Delta S mass spectrometer (Thermo Finnigan). The $\delta^{34}S$ of sulphates was measured from SO₂ obtained from CdS precipitated after sulphate reduction and $\delta^{18}O_{SO_4}$ was determined from the CO₂ produced by the reaction of BaSO₄ with C at 1050 °C. The Canon Diablo Troilite and Vienna-SMOW standards were used for S and O isotopes respectively with uncertainty about ± 0.3 ‰. Boron isotopes were determined by positive thermal ionization mass spectrometry on a Finnigan MAT 261 single collector solid source mass spectrometer. Values are reported on the δ scale

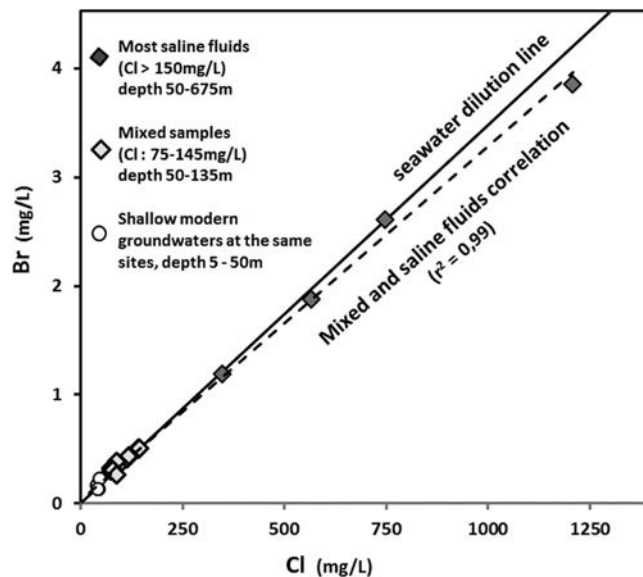


Figure 2. Bromide to chloride mass ratios. Three groups are distinguished on the basis of a PCA analysis (supporting information): (1) Shallow modern groundwater from the investigated sites and two monitoring sites, (2) samples showing mixing between deep saline samples and modern shallow groundwater, (3) three saline sites.

relative to NBS951 boric acid standard. The long-term external reproducibility based on replicate analysis is $\pm 0.4\%$. The internal error is often better than 0.2% .

$^{36}\text{Cl}/^{35}\text{Cl}$ ratio was measured by AMS at the French national ASTER facility. Chemical separation of Cl was conducted based on the protocol of Conard *et al.* (1986)⁴². To prevent S isobaric interferences, BaSO_4 was precipitated by adding BaNO_3 and was removed by filtration. Next, AgCl was precipitated by adding AgNO_3 and recovered by centrifugation. To improve SO_4 removal, the AgCl precipitate was dissolved in NH_4 before repeating the procedure. AgCl is then precipitated again by adding NH_4OH . A blank solution was prepared with Merck Standard NaCl 99.91%. The measured blanks provided $^{36}\text{Cl}/^{35}\text{Cl}$ ratios that were less than 10^{-15} at/at.

The carbon species (i.e. CO_2 , TDIC and carbonates) were converted into CO_2 by direct acidification, and the ^{13}C contents were measured by mass spectrometry (SIRA) at the IDES Laboratory (University of Paris Sud). The ^{13}C content is reported using δ (‰) notation, as a deviation from the V-PDB (Vienna-Belemnite from the Pee Dee formation, North Carolina, USA). Graphite sources for ^{14}C analyses were prepared from TDIC in the IDES Laboratory, and measured using accelerator mass spectrometry (UMS LMC14, Gif-sur-Yvette, France). The ^{14}C contents are expressed as a percentage of modern carbon (pmC). Analytical errors, including laboratory errors, are of $\pm 0.2\%$ vs V-PDB for the $\delta^{13}\text{C}$, and between 0.1 and 0.3 pmC for the A^{14}C .

Results

Solute origin. Whereas the Cl/Br mass-ratio range in the shallow and modern groundwater (<30 m depth) was very large (100 to 600) the Cl/Br mass-ratio of the saline fluids ($\text{Cl} > 80 \text{ mg/L}$) collected in the Armorican basement was 283 ± 16 (Fig. 2). This ratio is very close to that of seawater (288). The linear Br to Cl relationship ($R^2 = 0.957$) closely matches a dilution line ranging from the deepest, most saline fluid (Cinergy sample) to the most dilute shallow ones. This relationship is equal to the dilution line between the most dilute shallow samples and a modern seawater end-member. The boron isotope value for the more saline fluid (Cinergy) was $+40.7\%$, which is very similar to the isotopic composition of boron in seawater ($+39\%$). The boron isotope ratios in all the other saline fluids were close to this signature except in one sample where the ratios were lower, possibly as a result of interaction with clay minerals.

Modern and shallow groundwater present a wide range of SO_4/Cl mass-ratios (0.3 to 1.8 Fig. 3), generally far above the marine mass-ratio (0.14) and the SO_4/Cl mass-ratio in local precipitation (0.44 ± 0.3). Oxidation of sulphide minerals such as pyrite, ubiquitous in igneous or metamorphic rocks increases the sulphate concentrations in the shallow groundwater. Furthermore, nitrate constitutes a major electron acceptor in modern agricultural catchments, which enhances sulphide oxidation whereas the oxidation mechanisms in groundwater that are not anthropogenically influenced are much more limited^{43,44}. The sulphate concentrations in all the collected saline samples were high (mean concentration = 105 mg/L) with SO_4/Cl mass-ratios ranging from 0.04 to 0.4 with a mean of 0.2 ± 0.14 when Cl concentrations are greater than 150 mg/L , close to the ratio found in seawater (0.22).

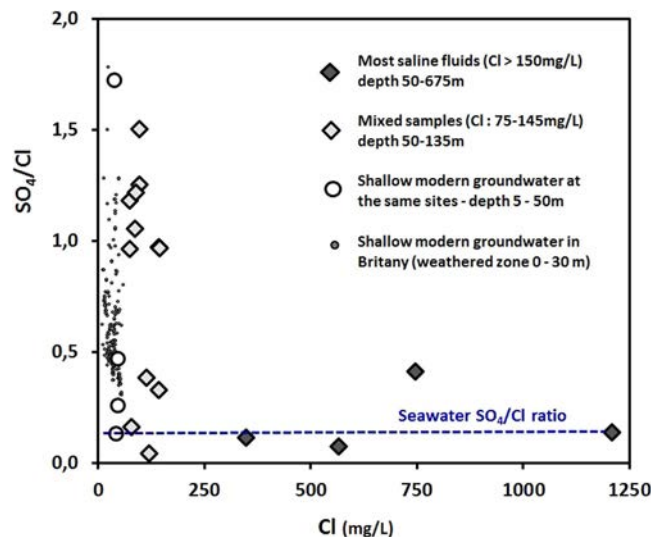


Figure 3. Sulphate to chloride mass ratios. A large modern groundwater data set (depth ranging from 5 to 25 m) from the Agrhys observatory (Kernernez site in Fig. 1) is presented.

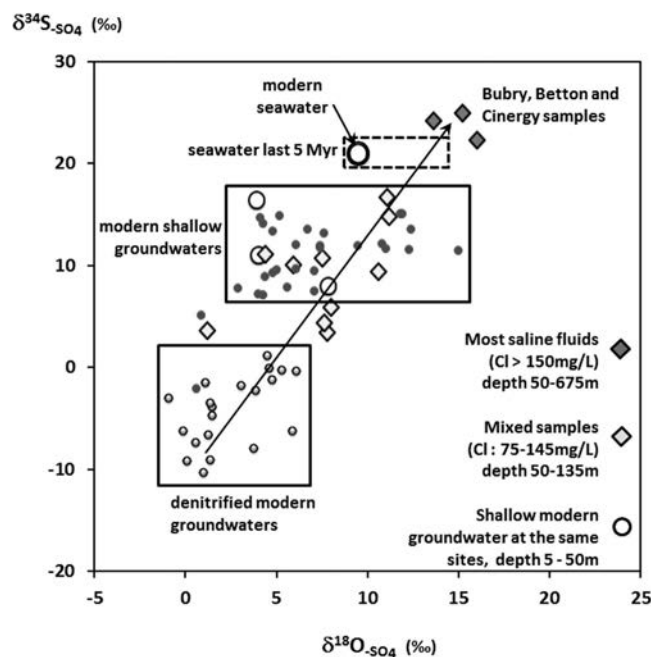


Figure 4. Sulphate isotopic ratios. A framework of interpretation is provided from previous data (Pauwels *et al.*, 2010). Two domains are identified: modern shallow groundwater and sites where autotrophic denitrification is assumed, i.e. groundwater showing low nitrate and high sulphate concentrations. Miocene (Paytan *et al.*, 1998; Turchyn *et al.*, 2006) and modern seawater signature is presented. Arrow represents a potential mixing line between the denitrified groundwater, mixed groundwater and saline groundwater.

Different domains within the $\delta^{18}\text{O}_{\text{SO}_4}$ vs $\delta^{34}\text{S}_{\text{SO}_4}$ plot can be observed (Fig. 3). The $\delta^{34}\text{S}_{\text{SO}_4}$ values for shallow groundwater, particularly nitrate-contaminated groundwater (i.e. $\text{NO}_3 > 5 \text{ mg/L}$), are within the range of +8 to +16‰. Groundwater influenced by sulphide dissolution present lower isotopic ratios (down to -10‰) as the isotopic ratios for sulphide $\delta^{34}\text{S}_{\text{SO}_4}$ are usually negative⁴⁵. $\delta^{34}\text{S}_{\text{SO}_4}$ of the most saline fluids ($\text{Cl} > 150 \text{ mg/l}$), ranges from +23 to +25‰. The other saline fluids can be plotted along a mixing line (arrow in Fig. 4) between two end-members: (1) a ^{34}S depleted end-member containing sulphate originating from sulphide oxidations (denitrified fluids in Fig. 4) and (2) the fluids with the highest salinity. Both $\delta^{34}\text{S}_{\text{SO}_4}$ (+22 to +25‰) and a $\delta^{18}\text{O}_{\text{SO}_4}$ (+13 to +16‰) of the most saline fluid exceed that of present day seawater (around +21‰ and 9.5‰, respectively). Subsequent 0.8‰ and 6‰

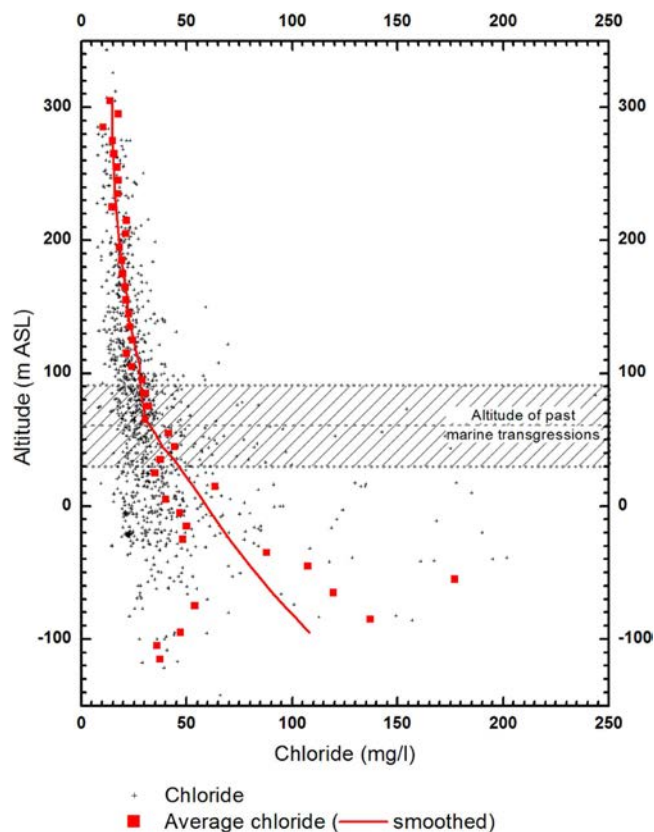


Figure 5. Vertical distribution of chloride concentrations. Chloride concentrations from 1,800 wells in the Armorican Massif recorded in the ADES national database are presented versus the well mean altitude above sea level. The paleo-coastlines of the three last transgressions are presented. A mean chloride concentration for each 5m layer is computed.

decline of both $\delta^{34}\text{S}_{\text{SO}_4}$ and $\delta^{18}\text{O}_{\text{SO}_4}$ marine sulphate have taken place over the last 3 Myrs^{46,47}. Therefore, the dataset indicates values for saline fluids slightly above those reported for 2 to 5 Myr seawater. However the slight difference can be explained either by a diagenetic reduction of sulphates within the first few centimeters of the sediment column, inducing a sulphate isotope fractionation or the occurrence of transitional environments such as lagoons and marshes.

Chloride vertical distribution. The chloride concentrations of all the Brittany wells in the ADES database have been plotted against altitude (asl) in Fig. 5. A 10 m depth-average is also presented (red curve). An increase of the chloride range and clear concentration increase with depth is observed, especially below 100 m asl. The mean chloride concentrations in the highest 250 m (i.e. above 100 m asl), vary between 15 and 30 mg/L. Such concentrations are indicative of meteoric and anthropogenic sources⁴¹. The sharp chloride increase observed below 100 m requires a third source. A more detailed investigation revealed that the chloride concentrations precisely reflect the last three transgression events⁴¹. This result strongly supports a marine origin for the water solutes below 100 m depth, whatever the site.

Recharge temperature. The stable isotopes in the most saline fluids can all be plotted along the local meteoric water line (LMWL) and represent meteoric continental waters (Supporting information, stable isotopes section). Only the composition of the deepest and most saline Cinergy-sample differs from the LMWL. When possible, the most saline fluids were compared with shallow groundwater at the same location. A systematic shift towards more negative values was observed along the LMWL. Such a shift indicates that the recharge conditions were colder than modern ones. This shift is correlated to both the chloride concentration and the recharge temperature (Supporting information, stable isotopes and noble gas section). These correlations favor the temperature interpretation to other potential explanations (altitude, continental effect, cloud internal fractionation) although the extent of the shift is lower than expected from recharge temperatures. As atmospheric conditions may have evolved along with temperature from the last glacial maximum to modern conditions, the stable isotope shift is only used as a temperature indication.

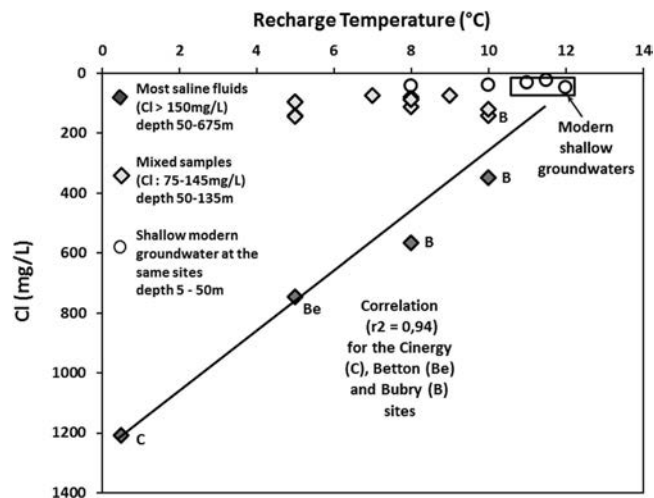


Figure 6. Recharge temperature deduced from noble gases vs chloride concentration. Paleo recharge temperature is deduced from the Ar and Ne content and is presented against the chloride concentration in the 12 sites investigated.

Recharge temperatures were deduced, using an inverse model, from the Ar and Ne concentrations⁴⁸ (supplementary information, stable isotopes and noble gas section). The recharge temperatures for the collected fluids ranged from 5 to 10 °C, except for the deepest and most saline Cinergy sample which presented a recharge temperature close to 0 °C and also extremely high excess air. The present-day recharge temperature in Brittany is about 12 °C and the noble gas measurements in shallow groundwater agree with such temperatures⁴⁰. It is thus clearly apparent from the recharge temperatures that the recharge conditions were colder than today. This is particularly true for the deepest and most saline Cinergy sample, which would have required glacial or immediately post-glacial recharge conditions.

A clear correlation was observed between recharge temperature and chloride concentrations (Fig. 6). The three sites with most saline samples display a linear correlation between surface shallow groundwater and the deepest and most saline Cinergy sample.

Groundwater dating. CFC, tritium and SF₆ groundwater dating shows that modern groundwater presents residence times close to 20 yrs in the weathered part of the aquifers (0–30 m) and 20 to 50 yrs and more in the deeper part^{33,40} (with uncertainties \pm less than 2 yrs). All the saline fluids present CFC concentrations close to the detection limits which is interpreted as “old” fluids (>50 yrs) mixed with a limited amount of modern surface waters. On the basis of the nitrate and CFC content, the amount of modern surface fluids contained in the samples ranges from less than 1% to 15% (see supporting information for end-member used, mixing section and Table S2). ³⁶Cl and ¹⁴C analysis were carried out within 3 samples including the two most saline ones (Cinergy sample Cl = 1,208 mg/L; Betton sample Cl = 700 mg/L). A detailed interpretation of these data is provided in supporting information (Section Groundwater dating, figure S2 and Tables S4 and S5). ³⁶Cl in these samples is close to the equilibrium with the neutron production of the Proterozoic formations where the waters have been collected. This equilibrium process requires residence times of at least 10⁶ yr. Conversely, ¹⁴C indicates residence times of 17,100 to 17,600 yrs for the two most saline fluids. The ³⁶Cl and ¹⁴C data are interpreted as representing two different events as presented below. The chemical basis for the scenario is also given in supplementary information (mixings section).

Discussion

A two-phase evolution. As already suggested by several studies of old, saline fluids, the solute and water may have different origins and represent different phases of fluid circulation corresponding to geologic or global climatic changes^{15,16,19}. They will therefore be discussed separately. The agreement between chloride vertical distribution and the altitudes of the last transgressions, from 5.3 to 2 Myrs old, supports a marine origin of the solutes in groundwater below 100 m asl. High Cl concentrations, requiring a marine contribution, are observed throughout the Armorican basement except in the zones preserved from past transgressions at altitudes higher than 90 m asl where the Cl concentrations remain below 50 mg/L. This correlation is also supported by the geochemical relationships, Br/Cl and SO₄/Cl mass-ratios, as well as the B and S isotopic ratios. The marine signature of the solutes from saline fluids in the basement thus represents the generalized influence of transgressions prior to the glacial period at the scale of the Armorican basement. ³⁶Cl data that suggest secular equilibrium are in good agreement with the transgression timing.

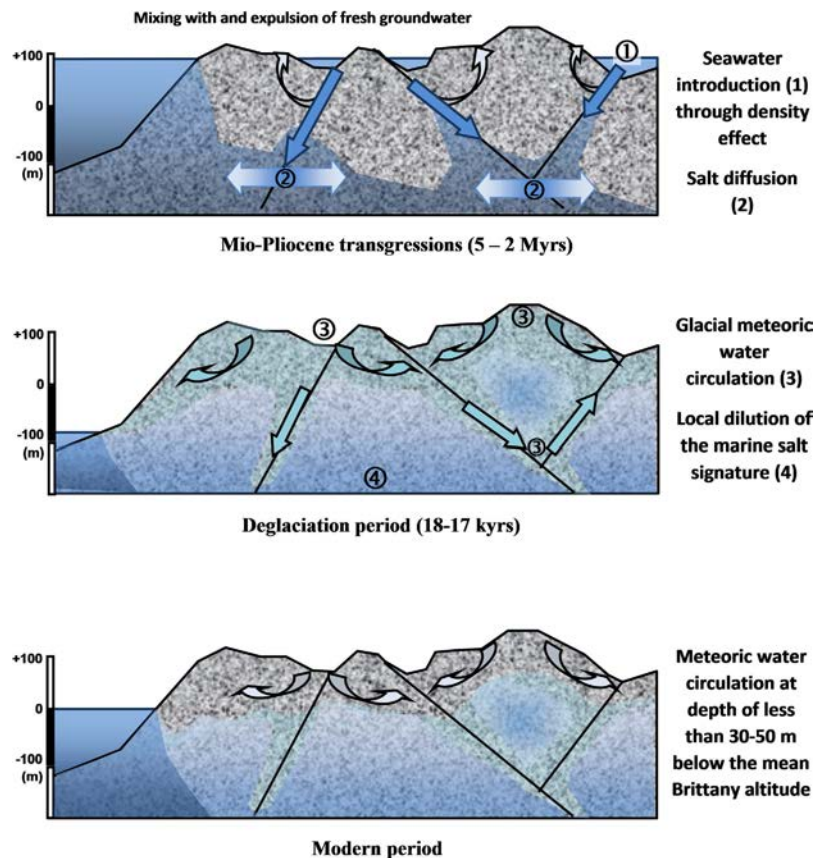


Figure 7. Hydrogeological model derived from the geochemical data. The hydrogeological model presents the three steps that have been established through the geochemical data. The first stage represents the introduction of seawater in the basement through density-driven process within major faults. Seawater is introduced in the lower parts of the basement where it is mixed with freshwater. Following introduction which is spatially focused, seawater is introduced in the rock matrix (micro-porosity) through a slow diffusion process. During the second stage, permafrost breakthrough induces the introduction of cold freshwater within the same major faults. This introduction is induced by large hydrogeological loops that occur probably during a relatively short period (less than a few thousand years). The third stage represents the modern period where the hydrogeological loops are less extended towards depth which allows for the preservation of the previous signatures below 100 m depth. Figure is original and has been drawn by L.A.

It was concluded in several earlier studies of saline fluids worldwide that the solutes were of marine origin^{16–21}. However it was difficult to confirm this due to intensive water-rock interactions. In contrast, this signature is clearly apparent in the Armorican aquifers for various solutes (Cl, SO₄, Br, Cl/Br and Cl/SO₄ ratios, B and S isotopic ratios). This may be related to the very short time since the last transgression (1.8 ± 0.2 Myrs).

On the contrary, the noble gases and water stable isotopic ratios clearly demonstrate that the water in these saline fluids is of meteoric origin and that recharge occurred during glacial or immediately post-glacial conditions. Glacial water strongly diluted the older seawater already contained in the basement rocks. We interpret this contradiction as reflecting a two-stage evolution namely: (1) Introduction of seawater-derived fluids into the basement 5.3 to 2 Myrs ago, which constitute the source of the solutes collected in most of the wells below 100 m asl in the Armorican basement. (2) Recharge of cold meteoric water. Glacial melt water introduction follows the end of the last glacial maximum 19,000 yrs ago at the onset of deglaciation of the permafrost in northwestern Europe 18 to 17,000 yrs ago⁴⁹. Although it might be possible that glacial recharge has occurred several times during the past, following the various glaci-ation cycles, ¹⁴C ages mainly agree with a limited period at the onset of the last deglaciation.

A hydrogeological model based on these observations is depicted in Fig. 7 and presents this two-phased circulation and the very different modern hydrogeological regime. These 3 situations are discussed below.

Seawater introduction into the basement. The attribution of a marine signature to several deep saline samples worldwide may indicate that the mechanisms responsible for seawater introduction into basements occur in various places through geological time. The introduction of saline fluid into basements requires drivers. These may be upward fluxes related to basin brine expulsion. A typical example

of such mechanisms is the fluid migration responsible for MVT-type metal deposits. However, such fluid circulation seems to be mainly restricted to the basin/basement interface^{16,50}. As transgression occurs, the simplest mechanism of seawater introduction into the basement is by gravity- and density-driven displacement of former fresh groundwater by seawater. Such a process may account for saline fluid circulation at relatively great depth in the most permeable fractures. However, this mechanism cannot explain the relatively ubiquitous occurrence of saline fluids throughout the Armorican basement. Furthermore, the most saline fluids were collected in the Cinergy well at a depth of 405–750 m below a small Mesozoic sedimentary basin, away from the border faults of this grabben. These elements require that the process was thorough and efficient, allowing the saline fluid to penetrate all the scales of porosity and not only the major structures.

Diffusion may account for the penetration of marine fluid within the whole basement rocks. Molecular diffusion can be estimated from the diffusion of water molecules in water D_m , which is about $10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ for typical groundwater temperatures. The diffusion length scale⁵¹ – i.e. the length of the mixed zone – is about $\sqrt{\theta \cdot D_m \cdot t}$, where t is the time since recharge, and θ is the porosity ranging from 0.01 to 0.1, leading to a mixing length of about 20 to 60 m for 1 Myr, and from 2 to 6 m for 10 kyr. It would seem from these estimates that the marine chlorides are probably well mixed at the scale of the investigation, i.e. a few hundred meters. As seawater has been introduced into the basement at higher time-scales than the million years diffusion scale, it should have diffused throughout the hard rock porosity. Even the immobile water in the microporosity could contain marine solutes. This does not mean that the concentration is constant throughout the aquifer since (1) the flow is likely rapidly renewed in the upper part of the geological section, and (2) an increase in concentration, due to the density effect, should still be observed as the time required for complete homogeneous diffusion of the entire domain exceeds several Myrs. In particular, a depth gradient should be observed as the density-driven flow should result in a greater influence at depth.

Glacial recharge. In contrast, glacial meteoric recharge presents the characteristics of a relatively intensive and short process. First, the deepest and most saline Cinergy sample contains extremely high excess air. Such excesses are thought to be characteristic of rapid recharge of glacial melt^{3,52}, which would agree with the low recharge temperatures. This trapping of excess air implies a rapid recharge event. Second, the preservation of these glacial signatures in all the fluids investigated indicates a generalized process which has not been erased by further mixing with modern groundwater. Third, the Cinergy sample indicates that glacial fluids have penetrated at great depth which may occur as *i*) glacial groundwater has a high density and *ii*) seawater level increase is slower than permafrost melt. It is interpreted as a succession of rapid recharge events which occurred during a short period between 18 and 17,000 yrs ago after the glacial maximum. This period corresponds to the first retreat of northwestern glaciers and could also correspond to the breakthrough of the permafrost in Brittany⁴⁹. Resumption of recharge processes have also been observed in sedimentary aquifers in northwestern Europe at a similar period⁵³. During this period, the sea level was about 80 m below its present level, which has allowed deeper penetration than the modern groundwater regime.

Hydrodynamic dispersion, which is the second process that might have diluted the original glacial or marine signal, is classically modeled by a diffusion equation. The diffusion coefficient in this equation is the product of the average flow velocity v by the hydrodynamic dispersivity length A . The dispersion length is thus equal to \sqrt{Ax} , where x is the distance of flow since recharge. The distance from recharge zones is reasonably between 100 m and 1000 m for most groundwater samples. Hydrodynamic dispersivity values of between 10^{-2} and 10^3 m have been reported in field scale studies but the reliability of values greater than 1 is poor⁵⁴. The resulting estimated dispersion length is between 1 and 30 m. In contrast with molecular diffusion, the mixing length scale is only dependent on the flow distance and not on the time since the recharge event. This back-of-the-envelope calculation explains why we can have in the same place relatively high chloride concentrations, signatures of marine transgressions during warmer climates, as well as a glaciation recharge signature.

In contrast to the marine signature, the signature of the last glaciations has not been diluted at a distance of more than two meters from fracture zones allowing recharge fluid circulation. Although glacial water may exchange solutes with the microporosity at a local scale, it did not have time to equilibrate through diffusion with the surrounding rocks. Major fractures allow water circulation and microporosity acts as a reservoir for solutes. If water circulation is slow, the water in the fracture may equilibrate through diffusive processes with solutes from the microporosity immediately around the fracture without modifying the water signature^{16,55}. However, the glacial signature will remain much more heterogeneously distributed than the much older marine signature.

The correlation between recharge temperature and chloride concentrations also supports this interpretation even though these parameters are related to two distinct processes (marine transgression and glacial melting). It shows that the last major circulation events were triggered by conditions extremely different to present conditions. Density-gravity-driven circulation is required to inject marine solutes at depth and the glacial recharge may be related to a much lower sea level and much deeper piezometric levels in the continent. Such lowering of the water table could have allowed efficient recharge as it limits the river network extension and increases the distance with the watershed surface. As the groundwater

could not be discharged into the river network deeper flow i.e. regional loops could have been promoted. The most saline and deepest samples present the highest salinity and the coldest recharge temperature, as the original zones of marine signature, and also reflect the most rapid and active circulation of post-glacial water with high excess air and low recharge temperatures.

Recent modeling of groundwater infiltration during the glacial cycle in Canada indicated that major infiltration occurred below the glacier during the ice sheet progression whilst it remained limited in the permafrost areas⁵⁶. A transient groundwater discharge regime also seemed to dominate during the deglaciation period. Geochemical observations may however indicate more complex processes in the periglacial areas²⁷. The Armorican basement is considered to have been a discontinuous periglacial permafrost area during the last glacial cycle⁴⁹. The evidence of ubiquitous glacial water about 17,000 yrs ago rather indicates a continuous permafrost and a massive breakthrough at the onset of the glaciers retreat before the generalized deglaciation.

Modern recharge. Although the salinities are not high, in comparison to the original seawater, the homogeneous preservation of salinity throughout the Armorican basement and the clear increase with depth indicates the limited downward circulation of modern groundwater. Circulation loops are mainly constrained by potential discharge zones. The depth of groundwater penetration is limited both by the surface hydrological network and the high sea level (as compared to during the glacial period). The non-existence of high elevation recharge zones within the Armorican basement, which could have flushed the deep saline fluids, has allowed the signatures of both the marine transgression and the glacial circulation events to be preserved.

Conclusion

Investigation of a large database of chloride concentrations in the groundwater of hard rock aquifers in the Armorican basement in western France, revealed higher chloride concentrations below 100 m as than could be expected from meteoric and anthropogenic sources. Twelve sites presenting chloride concentrations higher than 80 mg/L were investigated for isotopic, geochemical and dissolved gases analyses.

These data are interpreted as reflecting: (1) Introduction of marine seawater during the last transgressions 5.3 to 2 Myrs ago through gravity- and density-driven infiltration. This introduction was followed by diffusion of the marine solutes throughout the entire hard rock domain at the scale of several hundred meters, and exchanges with the rock microporosity. (2) Rapid recharge of meteoric water immediately following the last glacial maximum. Glacial water circulated in the main active fluid circulation zones. This water may have equilibrated with the surrounding rocks during the last 17,000 yrs thus allowing a single sample to contain both marine solutes and meteoric glacial solutes. (3) Following these two phases, modern groundwater circulation seems to be depth-limited as no dilution of these signatures has occurred.

This study indicates that marine transgression leads to a generalized introduction of seawater into hard rock aquifers. Diffusion allows the marine signature to be present throughout the area. It should thus be quite a common component of groundwater in hard rock aquifers. Conversely glacial recharge seems a rapid event, related to a restricted period related to the breakthrough of the permafrost. It indicates that glacial water may circulate even in permafrost areas, at least during short time periods. The presence of a glacial signature throughout the Armorican basement indicates that glacial water, probably permafrost melt water, has a huge impact on groundwater even if it represents a time-limited event.

As compared to saline fluids in basement elsewhere, the Armorican fluids agree with the overall depth-salinity relationship⁴¹. The most striking difference is the relatively shallow depth of these fluids, probably induced by the lack of relief, and the relatively recent age of the transgressions. These two points have allowed both the marine and glacial signatures to be preserved, however the scenario described should have a large applicability, at least as test hypothesis, in crystalline rocks worldwide. The Armorican saline fluids thus confirm that fluid signatures in basements may record the various signatures of geologic and climatic events. They can be considered as archives of “crisis” events at the geological scale, which are recorded in the basement aquifers. It also emphasizes the role of fault-zones in the fluid transfer at depth. Our results also indicate that the extent of hydrogeological circulation of fresh water has been limited to less than 50 to 100 m during the last 17,000 yrs. Thus our findings emphasize the high sensitivity of groundwater resources to global climate changes as well as to anthropogenic pressure. They provide time-constraints for groundwater modeling under various climatic scenarios.

References

1. McIntosh, J. C., Garven, G. & Hanor, J. S. Impacts of Pleistocene glaciation on large-scale groundwater flow and salinity in the Michigan Basin. *Geofluids* **11**, 18–33 (2011).
2. Person, M., McIntosh, J., Bense, V. & Remenda, V. H. Pleistocene hydrology of North America: The role of ice sheets in reorganizing groundwater flow systems. *Rev. Geophys.* **45**, 1–28 (2007).
3. Klump, S., Grundl, T., Purtschert, R. & Kipfer, R. Groundwater and climate dynamics derived from noble gas, C-14, and stable isotope data. *Geology* **36**, 395–398 (2008).
4. McMahon, P. B., Bohlke, J. K. & Christenson, S. C. Geochemistry, radiocarbon ages, and paleorecharge conditions along a transect in the central High Plains aquifer, southwestern Kansas, USA. *Appl. Geochemistry* **19**, 1655–1686 (2004).
5. McIntosh, J. C. C. & Walter, L. M. M. Paleowaters in Silurian-Devonian carbonate aquifers: Geochemical evolution of groundwater in the Great Lakes region since the Late Pleistocene. *Geochim. Cosmochim. Acta* **70**, 2454–2479 (2006).

6. Edmunds, W. M. & Smedley, P. L. Residence time indicators in groundwater: the East Midlands Triassic sandstone aquifer. *Appl. Geochemistry* **15**, 737–752 (2000).
7. Stute, M. *et al.* Cooling of Tropical Brazil (5°C) During the Last Glacial Maximum. *Science* **269**, 379–83 (1995).
8. Ntosh, J. C. M. C. I. *et al.* Pleistocene recharge to midcontinent basins: Effects on salinity structure and microbial gas generation. *Geochim. Cosmochim. Acta* **66**, 1681–1700 (2002).
9. Lemieux, J.-M., Sudicky, E. A., Peltier, W. R. & Tarasov, L. Simulating the impact of glaciations on continental groundwater flow systems: 2. Model application to the Wisconsinian glaciation over the Canadian landscape. *J. Geophys. Res.* **113**, F03018 (2008).
10. Lemieux, J.-M., Sudicky, E. A., Peltier, W. R. & Tarasov, L. Simulating the impact of glaciations on continental groundwater flow systems: 1. Relevant processes and model formulation. *J. Geophys. Res.* **113**, F03017 (2008).
11. Chen, Z., Qi, J., Xu, J., Ye, H. & Nan, Y. Paleoclimatic interpretation of the past 30 ka from isotopic studies of the deep confined aquifer of the North China plain. *Appl. Geochemistry* **18**, 997–1009 (2003).
12. Castro, M. C., Hall, C. M., Patriarche, D., Goblet, P. & Ellis, B. R. A new noble gas paleoclimate record in Texas - Basic assumptions revisited. *Earth Planet. Sci. Lett.* **257**, 170–187 (2007).
13. Stotler, R. L., Frappe, S. K. & Shouakar-Stash, O. An isotopic survey of delta Br-81 and delta Cl-37 of dissolved halides in the Canadian and Fennoscandian Shields. *Chem. Geol.* **274**, 38–55 (2010).
14. Bucher, K. & Stober, I. Fluids in the upper continental crust. *Geofluids* **10**, 241–253 (2010).
15. Frappe, S. K., Blyth, A., Blomqvist, R., McNutt, R. H. & Gascoyne, J. in *Surf. Gr. Water, Weather, Soils, Treatise Geochemistry*. (Eds. Drever, J. I., Holland, H. D., & Turekian, K. K.) 541–580 (Elsevier, 2003).
16. Aquilina, L. & Dreuzy, J.-R. De. Relationship of present saline fluid with paleomigration of basinal brines at the basement/sediment interface (Southeast basin – France). *Appl. Geochemistry* **26**, 1933–1945 (2011).
17. Aquilina, L., Genter, A., Elsass, P. & Pribnow, D. in *Hydrogeol. Cryst. rocks* (eds. Stober, I. & Bucher, K.) (Kluwer, 2000).
18. Beaucaire, C., Gassama, N., Tresonne, N. & Louvat, D. Saline groundwaters in the hercynian granites (Chardon Mine, France): geochemical evidence for the salinity origin. *Appl. Geochemistry* **14**, 67–84 (1999).
19. Bottomley, D. J., Gregoire, D. C. & Raven, K. G. Saline groundwaters and brines in the Canadian shield: geochemical and isotopic evidence for a residual evaporite brine component. *Geochim. Cosmochim. Acta* **5**, 1483–1498 (1994).
20. Bottomley, D. J. *et al.* The origin and evolution of Canadian Shield brines: evaporation or freezing of seawater? New lithium isotope and geochemical evidence from the Slave craton. *Chem. Geol.* **155**, 295–320 (1999).
21. Louvat, D., Michelot, J. L. & Aranyosy, J. F. Origin and residence time of salinity in the Aspö groundwater system. *Appl. Geochemistry* **14**, 917–925 (1999).
22. Starinsky, A. & Katz, A. The formation of natural cryogenic brines. *Geochim. Cosmochim. Acta* **67**, 1475–1484 (2003).
23. Herut, B., Starinsky, A., Katz, A. & Bein, A. The role of sea-water freezing in the formation of subsurface brines. *Geochim. Cosmochim. Acta* **54**, 13–21 (1990).
24. Bottomley, D. J. *et al.* Iodine-129 constraints on residence times of deep marine brines in the Canadian Shield: Comment and Reply - Reply. *Geology* **31**, 94–94 (2003).
25. Katz, A. & Starinsky, A. Iodine-129 constraints on residence times of deep marine brines in the Canadian Shield: Comment and Reply - Comment. *Geology* **31**, 93–94 (2003).
26. Greene, S., Battye, N., Clark, I., Kotzer, T. & Bottomley, D. Canadian Shield brine from the Con Mine, Yellowknife, NT, Canada: Noble gas evidence for an evaporated Palaeozoic seawater origin mixed with glacial meltwater and Holocene recharge. *Geochim. Cosmochim. Acta* **72**, 4008–4019 (2008).
27. Stotler, R. L. L. *et al.* The interglacial-glacial cycle and geochemical evolution of Canadian and Fennoscandian Shield groundwaters. *Geochim. Cosmochim. Acta* **76**, 45–67 (2012).
28. Galloway, J. N. *et al.* Nitrogen cycles: past, present, and future. *Biogeochemistry* **70**, 153–226 (2004).
29. Custodio, E. Aquifer overexploitation: what does it mean? *Hydrogeol. J.* **10**, 254–277 (2002).
30. Green, T. R. *et al.* Beneath the surface of global change: Impacts of climate change on groundwater. *J. Hydrol.* **405**, 532–560 (2011).
31. Scibek, J., Allen, D. M., Cannon, A. J. & Whitfield, P. H. Groundwater-surface water interaction under scenarios of climate change using a high-resolution transient groundwater model. *J. Hydrol.* **333**, 165–181 (2007).
32. Ballevre, M., Bosse, V., Ducassou, C. & Pitra, P. Palaeozoic history of the Armorican Massif: Models for the tectonic evolution of the suture zones. *Comptes Rendus Geosci.* **341**, 174–201 (2009).
33. Chantraine, J. *et al.* The Cadomian active margin (North Armorican Massif, France): a segment of the North Atlantic Panafrikan belt. *Tectonophysics* **331**, 1–18 (2001).
34. Bessin, P., Guillocheau, F., Robin, C., Schroetter, J.-M. & Bauer, H. Planation surfaces of the Armorican Massif (western France): Denudation chronology of a Mesozoic land surface twice exhumed in response to relative crustal movements between Iberia and Eurasia. *Geomorphology* **233**, 75–91 (2015).
35. Zachos, J. C., Dickens, G. R. & Zeebe, R. E. An early Cenozoic perspective on greenhouse warming and carbon-cycle dynamics. *Nature* **451**, 279–283 (2008).
36. Mosbrugger, V., Utescher, T. & Dilcher, D. L. Cenozoic continental climatic evolution of Central Europe. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 14964–14969 (2005).
37. Brault, N. *et al.* Mio-Pliocene to Pleistocene paleotopographic evolution of Brittany (France) from a sequence stratigraphic analysis: relative influence of tectonics and climate. *Sediment. Geol.* **163**, 175–210 (2004).
38. Hardenbol, J. *et al.* Mesozoic and Cenozoic sequence chronostratigraphic framework of European basins. *Society of Economic Paleontologists and Mineralogists, Special Publication* **60**, 3–11 (1998).
39. Aquilina, L. *et al.* Nitrate dynamics in agricultural catchments deduced from groundwater dating and long-term nitrate monitoring in surface and ground waters. *Sci. Total Environ.* **435**, 167–178 (2012).
40. Ayraud, V. *et al.* Compartmentalization of physical and chemical properties in hard-rock aquifers deduced from chemical and groundwater age analyses. *Appl. Geochemistry* **23**, 2686–2707 (2008).
41. Armandine Les Landes, A., Aquilina, L., Davy, P., Vergnaud, V. & Le Carlier, C. Time scales of regional circulation of saline fluids in continental aquifers (Armorican massif, Western France). *Hydrol. Earth Syst. Sci.* **19**, 1413–1426 (2015).
42. Conard, N. *et al.* The chemical preparation of AgCl for measuring Cl-36 in polar ice with accelerator mass-spectrometry. *Radiocarbon* **28**, 556–560 (1986).
43. Tarits, C. *et al.* Oxido-reduction sequence related to flux variations of groundwater from a fractured basement aquifer (Ploemeur area, France). *Appl. Geochemistry* **21**, 29–47 (2006).
44. Böhlke, J. K., Denver, J. M. & Böhlke, J. K. Combined use of groundwater dating, chemical, and isotopic analyses to resolve the history and fate of nitrate contamination in two agricultural watersheds, Atlantic coastal plain, Maryland. *Water Resour. Res.* **31**, 2319–2339 (1995).
45. Pauwels, H., Ayraud-Vergnaud, V., Aquilina, L. & Molénat, J. The fate of nitrogen and sulfur in hard-rock aquifers as shown by sulfate-isotope tracing. *Appl. Geochemistry* **25**, 105–115 (2010).
46. Paytan, A., Kastner, M., Campbell, D. & Thiemens, M. H. Sulfur isotopic composition of Cenozoic seawater sulfate. *Science* **282**, 1459–1462 (1998).

47. Turchyn, A. V. & Schrag, D. P. Cenozoic evolution of the sulfur cycle: Insight from oxygen isotopes in marine sulfate. *Earth Planet. Sci. Lett.* **241**, 763–779 (2006).
48. Aeschbach-Hertig, W., Peeters, F., Beyerle, U. & Kipfer, R. Interpretation of dissolved atmospheric noble gases in natural waters. *Water Resour. Res.* **35**, 2779–2792 (1999).
49. Jiráková, H., Huneau, F., Celle-Jeanton, H., Hrkál, Z. & Le Coustumer, P. Insights into palaeorecharge conditions for European deep aquifers. *Hydrogeol. J.* **19**, 1545–1562 (2011).
50. Boiron, M. C. *et al.* Fluid transfers at a basement/cover interface Part II. Large-scale introduction of chlorine into the basement by Mesozoic basinal brines. *Chem. Geol.* **192**, 121–140 (2002).
51. Grathwohl, P. Diffusion in natural porous media: Contaminant transport, sorption/desorption and dissolution kinetics. (Springer, 1998).
52. Alvarado, J. A. C., Leuenberger, M., Kipfer, R., Paces, T. & Purtschert, R. Reconstruction of past climate conditions over central Europe from groundwater data. *Quat. Sci. Rev.* **30**, 3423–3429 (2011).
53. Corcho Alvarado, J. A., Leuenberger, M., Kipfer, R., Paces, T. & Purtschert, R. Reconstruction of past climate conditions over central Europe from groundwater data. *Quat. Sci. Rev.* **30**, 3423–3429 (2011).
54. Gelhar, L. W., Welty, C. & Rehfeldt, K. R. A critical review of data on field-scale dispersion in aquifers. *Water Resour. Res.* **28**, 1955–1974 (1992).
55. Waber, H. N. N. & Smellie, J. A. T. Characterisation of pore water in crystalline rocks. *Appl. Geochemistry* **23**, 1834–1861 (2008).
56. Lemieux, J.-M. M., Sudicky, E. a., Peltier, W. R. & Tarasov, L. Dynamics of groundwater recharge and seepage over the Canadian landscape during the Wisconsinian glaciation. *J. Geophys. Res. Surf.* **113**, F01011 (2008).

Acknowledgments

Financial support was provided by the CNRS through the EC2CO—AQUADIV project. Financial support was also provided by the EU-RDF INTERREG IVA France (Channel)—England program, (Climawat project). The investigations also benefited from the support of INRA and CNRS (Environmental Research Observatories H+ and AgrHys) and of INSU-CNRS and CEA (LMC14) Artemis accelerator facilities for ¹⁴C analyses as well as the water agencies Cap Lorient and Collectivité eau du basin rennais. Kevin Hiscock and Lee Gum (East Anglia Univ.) are thanked for the Betton Pz6 sample noble gas analysis within the Climawat project. The ASTER Team (M. Arnold, G. Aumaître, D. Bourlès, K. Keddadouche, University of Aix-Marseille, CEREGE, CNRS-IRD UM 34) is thanked for the ³⁶Cl analysis. Diana Warwick is warmly acknowledged for detailed English editing. The first author (L.A.) is indebted to W.A. Mozart piano concertos for healing musical support.

Author Contributions

L.A., V.V., T.L., A.A. and H.P. established the original research project. A.A., V.V., T.L., C.R., S.B.M., M.K., C.L.G.L.S., E.P.G. and F.B. made the geochemical analysis. L.A., H.P., V.V., T.L. and F.B. interpreted the geochemical analysis. A.A., P.D. and L.A. interpreted the physical mechanisms described in the paper. L.A., P.D., A.A., V.V. and H.P. wrote the initial version of the paper. E.P.G., T.L., C.R., O.B., C.L.G.L.S., A.D., E.C. and F.B. reviewed the manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <http://www.nature.com/srep>

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

How to cite this article: Aquilina, L. *et al.* Impact of climate changes during the last 5 million years on groundwater in basement aquifers. *Sci. Rep.* **5**, 14132; doi: 10.1038/srep14132 (2015).



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

ANNEXES

Annexe B - Microorganisms persist at record depths in the subseafloor of the Canterbury Basin

ORIGINAL ARTICLE

Microorganisms persist at record depths in the subseafloor of the Canterbury Basin

Maria-Cristina Ciobanu^{1,2,3}, Gaëtan Burgaud^{4,8}, Alexis Dufresne^{5,8}, Anja Breuker⁶, Vanessa Rédou⁴, Sarah Ben Maamar¹, Frédéric Gaboyer^{1,2,3}, Odile Vandennebeele-Trambouze^{1,2,3}, Julius Sebastian Lipp⁷, Axel Schippers⁶, Philippe Vandenkoornhuyse⁵, Georges Barbier⁴, Mohamed Jebbar^{1,2,3}, Anne Godfroy^{1,2,3} and Karine Alain^{1,2,3}

¹Université de Bretagne Occidentale (UBO, UEB), IUEM—UMR 6197, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes (LMEE), Plouzané, France; ²CNRS, IUEM—UMR 6197, LMEE, Plouzané, France; ³Ifremer, UMR6197, LMEE, Plouzané, France; ⁴Université de Brest, UEB, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et d'Ecologie Microbienne EA 3882, IFR148 SFR ScInBioS, ESIAB, Plouzané, France; ⁵Université de Rennes I, CNRS, UMR 6553 ECOBIO, Rennes, France; ⁶Bundesanstalt für Geowissenschaften und Rohstoffe (BGR), Hannover, Germany and ⁷Organic Geochemistry Group, Department of Geosciences and MARUM Center for Marine Environmental Sciences, University of Bremen, Bremen, Germany

The subsurface realm is colonized by microbial communities to depths of > 1000 meters below the seafloor (m.b.sf.), but little is known about overall diversity and microbial distribution patterns at the most profound depths. Here we show that not only *Bacteria* and *Archaea* but also *Eukarya* occur at record depths in the subseafloor of the Canterbury Basin. Shifts in microbial community composition along a core of nearly 2 km reflect vertical taxa zonation influenced by sediment depth. Representatives of some microbial taxa were also cultivated using methods mimicking *in situ* conditions. These results suggest that diverse microorganisms persist down to 1922 m.b.sf. in the seafloor of the Canterbury Basin and extend the previously known depth limits of microbial evidence (i) from 159 to 1740 m.b.sf. for *Eukarya* and (ii) from 518 to 1922 m.b.sf. for *Bacteria*.

The ISME Journal (2014) 8, 1370–1380; doi:10.1038/ismej.2013.250; published online 16 January 2014

Subject Category: Microbial population and community ecology

Keywords: deep biosphere; subsurface life; eukaryote; record depth

Introduction

In addition to terrestrial and marine near-surface habitats, the deep biosphere is considered to be a third realm for microbial life. Subseafloor sediments provide a habitat for large numbers of microbial cells, as revealed by cell counts (Parkes *et al.*, 2000) or CARD-FISH (Schippers *et al.*, 2005). Although recent data have shown that the global biomass in subseafloor sediments is smaller than given by earlier estimates, the deep subseafloor biosphere still constitutes a large fraction (2.9×10^{29} cells) of Earth's living biomass (Kallmeyer *et al.*, 2012).

The subsurface microbiota is diverse and complex, hosting metabolically active communities down to depths of > 1000 meters below the seafloor (m.b.sf.), as revealed by molecular, metagenomic and meta-transcriptomic studies (Lipp *et al.*, 2008; Roussel

et al., 2008; Biddle *et al.*, 2011; Pawlowski *et al.*, 2011; Orsi *et al.*, 2013a). It harbors representatives from the three domains of life, for example, numerous endemic and/or as yet uncultured *Archaea* and *Bacteria* (for example, Inagaki *et al.*, 2006; Orcutt *et al.*, 2011), in addition to bacterial endospores (Lomstein *et al.*, 2012), protists and fungi belonging to *Eukarya* (Schippers and Neretin, 2006; Edgcomb *et al.*, 2011; Orsi *et al.*, 2013a,b). Occurrence of capsid-encoding organisms has also been confirmed (Engelhardt *et al.*, 2011). Although in subsurface sediment shallower than 1000 m.b.sf. background molecular data on bacterial and archaeal lineages exists (for example, Inagaki *et al.*, 2006; Orcutt *et al.*, 2011), most deep-subsurface microorganisms detected so far were refractory to cultivation (Sass and Parkes, 2011). The diversity of deeply buried microorganisms remains untapped, as subseafloor prokaryotic culturability in most studies is < 0.1% of all microscopically detected cells (D'Hondt *et al.*, 2004). Remarkably, when wide enrichment collections targeting different physiological groups such as fermenters, sulfate-reducers and methanogens were performed using different subseafloor sediments, these often led to the isolation of the

Correspondence: K Alain, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes (LMEE), UMR 6197 CNRS-UBO-Ifremer, Plouzané, France.

E-mail: Karine.Alain@univ-brest.fr

⁸These authors contributed equally to this work.

Received 23 August 2013; revised 16 December 2013; accepted 16 December 2013; published online 16 January 2014

same few 'generalist' bacteria (for example, Batzke *et al.*, 2007). In most cases, the retrieved bacterial genera were adapted to a broader spectrum of environmental conditions (for example, broad temperature range for growth) compared with their surface counterparts (Sass and Parkes, 2011).

So far, within seafloor sediments, active *Bacteria* have been identified down to 518 m.b.s.f. (Bale *et al.*, 1997), active *Archaea* down to 1626 m.b.s.f. (Roussel *et al.*, 2008) and active microeukaryotes down to 159 m.b.s.f. (Orsi *et al.*, 2013a), but we are still eager to know the depth limit of the deep subsurface biosphere. Limits to microbial habitability in seafloor sediments are set by a variety of physical and chemical parameters like temperature, pH, pressure, salinity, porosity, availability of energy, nutrients and water and maybe also by age as there was water exchange within the sediment pores. The present study site is not characterized by particularly extreme conditions but stands out from sites previously examined by its depth and low porosity. The depth limit of the deep biosphere remains an important issue to place bounds on the volume of the seafloor biosphere and to guide the search for deep life capabilities/adaptation and the role of microorganisms in global nutrient cycles. We hypothesized that life could exist in even deeper sediments if pore space was sufficient.

In this study, we investigated the subsurface microbial communities from a core of 1927 m length collected in the Canterbury Basin (344 m water depth), off the coast of New Zealand at site U1352, which was drilled during the Integrated Ocean Drilling Program (IODP) Expedition 317 with DS *Joides Resolution*. Our purpose was to investigate vertical distribution of microbial communities, abundance and evenness of taxa above and below 1000 m.b.s.f. depth. We developed a highly stringent massive parallel tagged-amplicon sequencing of 16S–18S hypervariable regions of small-subunit (SSU) rRNA gene (Supplementary Figures S1 and S2; Supplementary Tables S1–S3), coupled with cell counts, real-time PCR (phylogenetic and functional genes) and cultivation approaches. This rigorous method was applied to sediment/carbonate rocks spanning epochs from the Holocene to late Eocene.

Materials and methods

Site description and sampling

Three holes (A, B and C) were drilled at Site U1352 (44°56'26.62''S; 172°1'36.30''E), reaching a total depth of 1927.5 m CSF-A, and thus spanning the Holocene to late Eocene epochs. Fluorescent microspheres were used as tracers for contamination during drilling. Sampling was processed under strict contamination controls onboard and offshore, and only samples with no detectable contamination were used for this study (Fulthorpe *et al.*, 2011).

Onboard, only the center parts of unconsolidated sediments and intact pieces of rocks that had been exposed to ultraviolet radiation after washing were kept for microbiological analyses, as reported elsewhere (Expedition 317 Scientists, 2011). Subsamples were immediately frozen at -80°C for onshore molecular analyses, stored at 4°C under an anaerobic gas phase for later cultivation and stored at 4°C in a 3% NaCl/3% formalin solution for cell counting. Detailed information on sampling/subsampling of sediment, on contamination controls and on depth scale terminology are provided in Supplementary Text.

Lithological, physical and geochemical data

Environmental data were acquired onboard during IODP Expedition 317, as reported elsewhere (Fulthorpe *et al.*, 2011).

DNA extraction, PCR amplification and contamination controls

DNA extractions were made from 16 samples collected all along the core. In order to avoid contamination, all handling was carried out in a PCR cabinet exclusively dedicated to low biomass sediment samples (PCR cabinet; CaptairBio, Erlab, Val de Reuil, France), using Biopur 1.5 ml Safe-Lock micro test tubes (Eppendorf, Le Pecq, France), ultrapure PCR water (Ozyme, St Quentin en Yvelines, France) and ultraviolet-treated (>40 min) plasticware and micropipettes. Negative controls (reaction mixture without DNA) were included in each set of PCR reactions. In addition, a negative control (for example, negative DNA extraction) was prepared for each work stage, to ensure that no contamination with exogenous amplifiable DNA occurred during the different stages of sample treatment. The FastDNA Spin Kit for Soil (No. 6560-200, MP Biomedicals, Strasbourg, France) was used to perform DNA extractions, with few modifications. Detailed information on DNA extractions and PCR amplifications are provided in Supplementary Information. Primer sequences used in this study are detailed in Supplementary Table S2, and primer sets for direct and nested PCR amplifications are detailed in Supplementary Figure S2.

454-Pyrosequencing

For each DNA extract, four independent 25- μl PCR amplifications were run with fusion primer pairs specific for *Bacteria*, *Archaea* and *Eukarya*, as detailed in Supplementary Table S3. PCR products were pooled two by two, so as to have two independent replicates for pyrosequencing. Potential contaminants from lab reagents were excluded through the sequencing of negative-control samples and the removal of operational taxonomic units (OTUs) containing sequences retrieved in negative controls. Detailed information on 454-pyrosequencing, quality filtration,

trimming, clustering and taxonomic affiliation are provided in Supplementary Text.

Cell counts

Total prokaryotic cells were enumerated in triplicate from 13 uncontaminated sediment samples collected all along the core, using the cell extraction protocol (protocol FCM-A) described by (Morono *et al.*, 2011) until step 9. Then, all supernatants containing extracted cells were filtered onto 0.2- μm filters (Anodisc, Whatman, Versailles, France) and stained with SYBRGreen I (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), as described elsewhere (Noble and Fuhrman, 1998). Filters were counted in epifluorescence mode, with an Olympus BX60 microscope (Rungis, France) (objective $\times 100$, pH3, WIB filter; details in Supplementary Text).

Real-time PCR measurements

Quantifications of different lineages and diverse functional genes were performed all along the core by quantitative, real-time PCR. Quantifications of *Bacteria*, *Archaea*, *Eukarya*, JS1-*Chloroflexi* and *Geobacteriaceae* were performed using previously described quantitative PCR assays based on the detection of 16S or 18S rRNA (Schippers *et al.*, 2012). These assays were carried out using the TaqMan or SYBRGreen chemistries. DNA copy numbers were also determined for the following functional genes: *mcrA* for alpha subunit of the methyl coenzyme M reductase, *dsrA* for the alpha subunit of the sulfite (bi)reductase, *aprA* for the alpha subunit of the adenosine-5'-phosphosulfate reductase and *cbbL* for the large subunit of the enzyme ribulose-1.5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RubisCO, form I 'red-like'), as described elsewhere (Schippers *et al.*, 2012).

Cultures and approaches used for their analysis

A sediment slurry membrane system was used for cultivation (Ferrari *et al.*, 2008) (Supplementary Figure S8; details in Supplementary Information). Different anaerobic metabolisms found in the subsurface biosphere were targeted in culture: fermentation, sulfate reduction and methanogenesis/acetogenesis. Media, culture conditions, viability and identification procedures of cells are described in Supplementary Text.

Statistical analyses

Principal component analysis was used to help in visualization of high-dimensional data. An order abundance matrix was combined with environmental parameters, using XLSTAT, to assess relationships between microbial taxa and ecological variables (Addinsoft USA, New York, NY, USA). A second complementary approach was based on regularized canonical correlation analyses, which were

performed to highlight correlations between the order abundance matrices (X) and the environmental parameters (Y) using the R software CCA package.

Results and discussion

Core description

The core lithology was characterized by horizontal gradual layers, from unconsolidated sediments (clay, marl) to carbonate rocks (Figure 1). The core was composed of three lithological units (UI, UII and UIII). Unit I (0–711 m CSF-A, meters of core depth below seafloor computed by conventional method A, corresponding to m.b.sf. (see 'IODP depth scale terminology' at www.iodp.org/program-policies/) was predominantly characterized by a transition from mud-rich sediment to marl. Unit II (711–1853 m CSF-A) consisted of hemipelagic/pelagic sediment from calcareous sandy mud to sandy sandstone. Unit III (1853–1924 m CSF-A) was characterized by a sharp change (Marshall unconformity: ~ 12 Ma are missing) that occurred at 1853 m CSF-A and was formed of hemipelagic to pelagic foraminifer-bearing nannofossil limestone of early Oligocene to late Eocene age (Figure 1). The temperature at the bottom of the hole was estimated to be in the range of 60 °C–100 °C on the basis of thermal conductivity measurements and geochemical results (Fulthorpe *et al.*, 2011). Below 1000 m CSF-A, sediments were replaced by consolidated sedimentary calcium carbonate rocks with porous horizons of glauconite. Porosity decreased with depth and mean pore size was around 2–4 μm at the hole bottom. In carbonate rocks, numerous fractures and stylolites were observed (Supplementary Figure S3). Organic carbon content was low (<0.6 wt %), with only a few samples having >1 wt % total organic carbon (Figure 1). The organic matter quality changed from relatively labile volatile material in the shallower sediments to more stable protokerogen with increasing depth. Methane and ethane both occurred below 11.7 and 18.2 m CSF-A, and the relative ethane content increased with increasing burial depth and temperature (Figure 1). Low but increasing concentrations of C3–C5 and occasionally C6 alkanes were also measured with depth. pH values were close to 7.5 and stable from the surface to 1164 m CSF-A. Sulfate concentration decreased gradually in the first meters of the core and reached the detection limit at ~ 16 m CSF-A (the SMTZ (sulfate–methane transition zone), was placed between 15.2 and 16.6 m CSF-A), then it remained close to the detection limit (~ 0.85 mM) down to 1433 m CSF-A (Figure 1).

Vertical distribution of cells

We analyzed and compared cell abundances and cell concentrations reported for different geographic sites using a standardized procedure based on cell extraction and dissolution of silicates (Noble and Fuhrman,

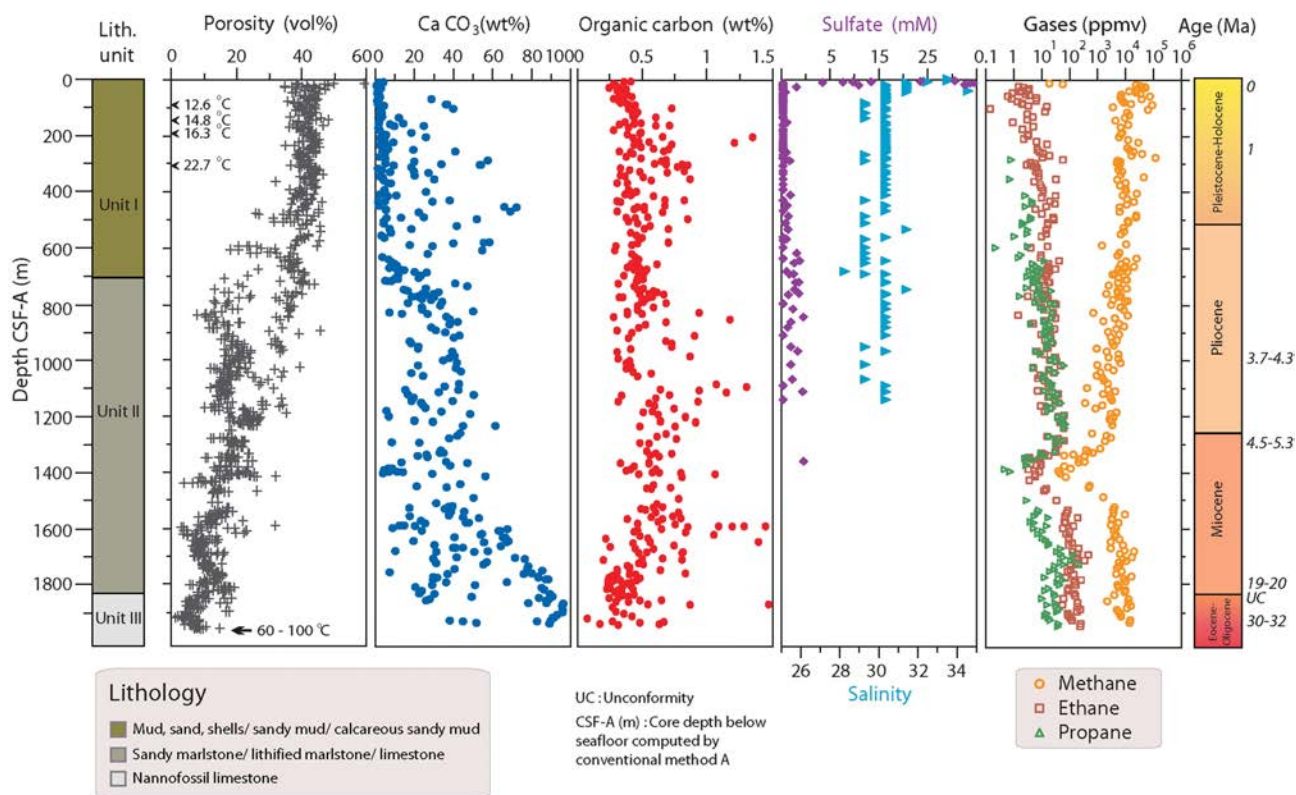


Figure 1 Main physical-chemical characteristics of the studied core. Black arrows indicate measures of *in situ* temperatures used to calculate a thermal gradient of $46\text{ }^{\circ}\text{C km}^{-1}$. This thermal gradient, together with the interpretation of the thermal maturity gradient defined by T_{max} measurements, allowed estimating a bottom-hole temperature comprised between $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ and $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Source: IODP report 317) (Fulthorpe *et al.*, 2011).

1998; Kallmeyer *et al.*, 2008; Morono *et al.*, 2011) (Figure 2). Mean cell numbers decreased with depth from about $1.5 \times 10^6 \pm 4.7 \times 10^4\text{ cells cm}^{-3}$ ($n=8$) at the surface (3.76 and 15.1 m CSF-A) to $2.5 \times 10^4 \pm 4.9 \times 10^3\text{ cells cm}^{-3}$ ($n=7$) within the deepest samples (1911 and 1922 m CSF-A). The detection limit, calculated in our conditions (Kallmeyer *et al.*, 2008), was $2.94 \times 10^3\text{ cells cm}^{-3}$. The depth profile (down to 600 m CSF-A) was consistent with the general depth distribution of prokaryotic cells from other subsurface sediments (Kallmeyer *et al.*, 2012).

Vertical distribution of microbial taxa

It is not clear what controls abundance of *Bacteria* and *Archaea* within deep marine sediments (Schippers *et al.*, 2005; Lipp *et al.*, 2008; Schippers *et al.*, 2012). Here, a real-time PCR approach was applied to quantify representatives of the three life domains. Calculated detection limits for *Bacteria*, *Archaea* and *Eukarya* were respectively 1.6×10^4 , 1.1×10^3 and 2.9×10^3 SSU rRNA gene copies per gram of sediment (wet weight). *Archaea* were the most abundant within the first meters, while *Bacteria* dominated the rest of the core (Figure 2). Archaeal SSU rRNA gene copy numbers strongly decreased with depth (from 1.8×10^6 to 1×10^3 gene copies g^{-1} , corresponding roughly to 1×10^6 to $6 \times$

10^2 cells g^{-1}) and were no longer detectable below 650 m CSF-A. A similar depth distribution was observed for eukaryotic SSU rRNA gene copy numbers, but abundances were relatively constant with depth ($\sim 10^4$ copies g^{-1}). Bacterial SSU rRNA gene copy numbers were low ($\sim 10^6$ copies $\text{g}^{-1} \approx 2.5 \times 10^5\text{ cells g}^{-1}$) at the surface and decreased with depth up to 1600 m CSF-A (8×10^4 copies $\text{g}^{-1} \approx 2 \times 10^4\text{ cells g}^{-1}$).

Along with these measures, deep sequencing allowed the detection limits to be lowered and masked lineages to be revealed. We pyrosequenced bacterial (V4-V5), archaeal (V1-V3) and eukaryotic (V1-V3) SSU rRNA gene amplicons from 16 depth horizons and one negative control, pooled together in one single data set with two PCR replicates per sample to overcome PCR and sequencing errors (Supplementary Figure S1). Sequences were grouped into OTUs with a 97% identity threshold. Sequence composition of the OTUs was then analyzed, and OTUs entirely composed of sequences that had appeared in a single PCR only were excluded from the diversity analyses. All the sequences kept appeared at least twice independently. Potential contaminants from laboratory reagents were excluded through the sequencing of negative-control samples and the removal of OTUs containing sequences retrieved in negative controls.

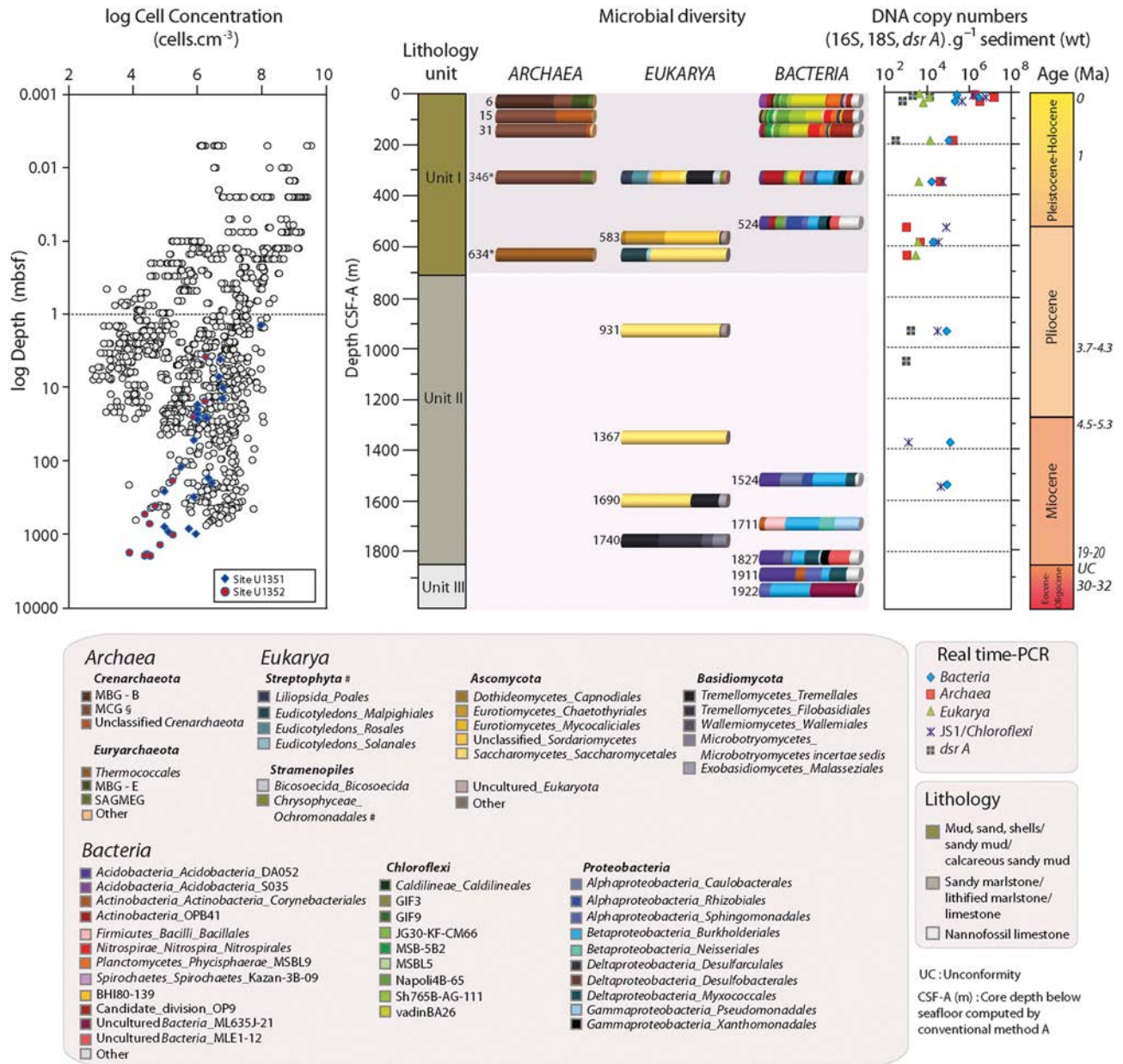


Figure 2 Lithological structure and age of lithological deposits at site U1352 in the Canterbury Basin compared with depth distribution of cell counts, 16S/18S rRNA gene-tag sequences and DNA copy numbers of genetic markers and functional genes. On the left, cell concentrations counted at site U1352 (red dots) and neighboring site U1351 (blue squares), according to depth (m CSF-A), compared with the general depth distribution of cells (grey dots) in subseafloor sediments (Kallmeyer et al., 2012). In the center, Phylum Class_Order distribution of archaeal, eukaryotic and bacterial 16S/18S rRNA gene-tag sequences (based on SILVA111 classification) from OTU containing ≥ 100 sequences (the remaining sequences were grouped into 'Other'). On the right, copy numbers of the disulfite reductase genes A, of the 18S rRNA genes from total Eukarya and of the 16S rRNA genes from total Bacteria, Archaea and JS1/Chloroflexi-related bacteria. *Geobacteriaceae* were detected only up to 15 m CSF-A ($\sim 5 \times 10^3$ copies per g). No amplification from greater depth was shown. The functional genes *mcrA*, *aprA* and *cbbL* were not detected at all. § In other classifications, MCG affiliate with the *Thaumarchaeota*. #Lineages of plants and algae. *Depth horizons where ≥ 100 reads of plants and Chrysophyceae were detected.

The remaining OTUs were used to calculate non-parametric diversity indices (Figure 3, Supplementary Figures S4 and S6) and compared with the SILVA 111 database for taxonomic affiliation. Pyrosequencing results were congruent with the data discussed above. Archaeal sequences could not be amplified and sequenced for samples < 634 m CSF-A, as observed with real-time PCR analyses. The

non-detection of archaeal 16S rRNA genes < 650 m CSF-A using two different amplification methods suggests that *Archaea* are likely rare or absent at great depths in the Canterbury Basin. Eukaryotic sequences were detected down to 1740 m CSF-A, and bacterial sequences were found up to the maximal depth of 1922 m CSF-A. The observed species richness (that is, number of OTUs) was

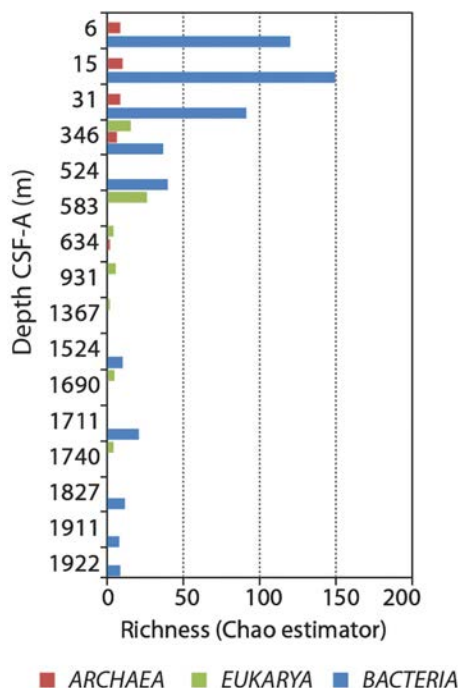


Figure 3 Community richness (Chao1 non-parametric estimator) for archaeal, eukaryotic and bacterial sequences making up the OTUs (calculated by MOTHUR at 3% difference between OTUs).

extremely low in comparison with other microbial habitats investigated so far, including extreme environments (for example, Roalkvam *et al.*, 2012). Indeed, only 198, 16 and 40 unique bacterial, archaeal and eukaryotic OTUs, at 3% dissimilarity level, were detected in the entire cored sequence (Supplementary Figure S4, Supplementary Tables S4 and S5). Chao1 estimator revealed a vertical decrease in microbial richness with increasing depth (Figure 3). Richness estimates for *Archaea* and *Eukarya* dropped off gradually with depth and reached only two and four OTUs, respectively, at the deepest depth for which a PCR signal was obtained. Beta diversity estimators (that is, diversity among samples) revealed a strong differentiation between communities with depth and a strong vertical structuration (Supplementary Figure S5).

Archaeal diversity showed high abundances of MBG-B (Marine Benthic Group B) and MCG (Miscellaneous Crenarchaeotal Group), two archaeal groups typically found in subseafloor sediments (Lloyd *et al.*, 2013). Representatives of the as-yet-uncultured lineages MBG-B, MBG-E (Marine Benthic Group E) and MCG were the predominating taxa in surficial layers, while MCG was the most consistently detected archaeal lineage down to 346 m CSF-A (Figure 2). MBG-B and MCG members are heterotrophic *Archaea* frequently found in surficial marine sediments (Biddle *et al.*, 2006; Lloyd *et al.*, 2013). *Thermococcales* dominated archaeal diversity of the sediment horizon at 634 m CSF-A. Methanogens and anaerobic methanotrophs were not detected, in agreement with the real-time

PCR analysis for *mcrA*. Their absence from the data set might be due to the intervals sampled, which do not correspond to the SMTZ.

In *Eukarya*, few protist OTUs (Stramenopiles and uncultured *Eukaryota*) were detected down to 583 m CSF-A. Sequences affiliated with the bacterivorous protists *Bicosoecida* were detected at 346 m CSF-A, raising the question of the existence of a subsurface complex trophic web. In agreement with recently published papers (Edgcomb *et al.*, 2011; Orsi *et al.*, 2013a,b), fungi appeared to be the most frequently detected eukaryotes in the Canterbury Basin, with 56–100% of the SSU rRNA gene sequences. Different shifts between *Ascomycota* and *Basidiomycota* were observed along the core (Figure 2). *Tremellomyces* (order *Tremellales*), *Sordariomycetes* and *Eurotiomycetes* dominated shallow depths while *Saccharomycetes* were detected at depths between 630 and 1365 m CSF-A. Deeper layers were dominated by *Wallemiomycetes*, *Microbotryomycetes* and *Tremellomyces* (order *Filobasidiales*, not found at shallow depths). These heterotrophic fungi have been described in deep sediments of other locations (for example, Nagano and Nagahama, 2012; Richards *et al.*, 2012) and demonstrated to be active members of microbial communities (Orsi *et al.*, 2013b). So, fungi represent an important component of sediment ecosystems through their impact on nutrient cycling and mineral weathering.

Bacteria were dominated by *Chloroflexi* and *Proteobacteria*, two heterotrophic bacterial groups well represented in subsurface sediments (Figure 2). They comprised 67% of the sequences and 69% of the OTUs in total. However, the abundances of the two phyla were negatively correlated. *Chloroflexi* dominated microbial communities at shallow depths (>600 m CSF-A), and their abundances and richness decreased rapidly. Reciprocally, *Proteobacteria* were found all along the core, but their relative abundance showed a sharp increase <343 m CSF-A. Among the other lineages observed in this study, *Planctomycetes*, *Nitrospirae* and the candidate division OP9 were major contributors of the amplicon pool at shallow depths. Below 600 m CSF-A, *Acidobacteria*, *Firmicutes* (a phylum containing spore-formers) and two loosely defined groups of uncultured *Bacteria* (ML635J-21 and MLE1-12) were the most consistently detected lineages. Real-time PCR quantification of the JS1-*Chloroflexi* group confirmed these results as $\sim 10^3$ – 10^6 SSU rRNA gene copies g^{-1} were detected between the sediment surface and 1532 m CSF-A. *Deltaproteobacteria* were detected above the SMTZ and at great depths. Genes encoding a functional dissimilatory sulfite (bi)reductase (*dsrA*), a key enzyme of dissimilatory sulfate reduction frequently encountered among *Deltaproteobacteria*, was quantified above the SMTZ and in layers up to 1000 m deep in the sediment. The gene became undetectable below this depth, either because it may decrease below the detection limit or because the detected *Deltaproteobacteria* cannot respire sulfate.

Diversity and environmental factors

Principal component analyses coupled with regularized canonical correlation analyses were performed to visualize relationships between environmental factors and microbial taxa. We first evaluated the relationships between all environmental parameters measured (that is, depth, pH, salinity, porosity, alkalinity and concentrations of calcium, calcium carbonate, ammonium, magnesium, sulfate, inorganic carbon, organic carbon, methane and ethane) to design a network of correlations. Only the six most explanatory variables were kept (Supplementary Figure S6). This complementary analysis reinforced the conclusion about microbial distribution pattern and vertical community composition, depth being defined as a main factor explaining diversity changes (Supplementary Figure S7).

Handling deeply buried microorganisms

Cultivation approaches allowed prokaryotic and eukaryotic strains to be grown, corresponding to a fraction of the microbial communities detected all along the core, underlining that these microorganisms were viable. Fungal strains were obtained at 21–765 m CSF-A, using elevated hydrostatic

pressure to mimic *in situ* conditions (Figures 4a–c, Supplementary Table S6). Sequencing of the ITS1 rRNA regions allowed identification of a *Cadophora* representative that had already been found in extreme environments, that is, Antarctic environments (Tosi *et al.*, 2002) and deep-sea hydrothermal vents (Burgaud *et al.*, 2009) (Supplementary Table S6). Fifty-seven anaerobic fungi, currently under description, have also been isolated from these sediments (Rédou and Burgaud, unpublished data). In addition to the important finding that living fungi could be cultivated from the sediment samples, microbial colonies were grown anaerobically at 60–70 °C from calcareous chalk/limestone samples collected at 1827 and 1922 m CSF-A (Figures 4d and e), using a microcultivation method (Supplementary Figure S8). The microcolonies were successfully transferred to liquid media and subcultured. From the different tests performed, it was impossible to grow true methanogens and true sulfate-reducers. Only bacterial fermentative strains degrading the organic compounds supplied (that is, low quantity of yeast extract) have grown. Within these subcultures, mean cell densities were low, around 4×10^5 cells ml⁻¹ and growth rates were slow (in 2.5 years of culture, only 6–9 subcultures at 1/40 or 1/50 have been

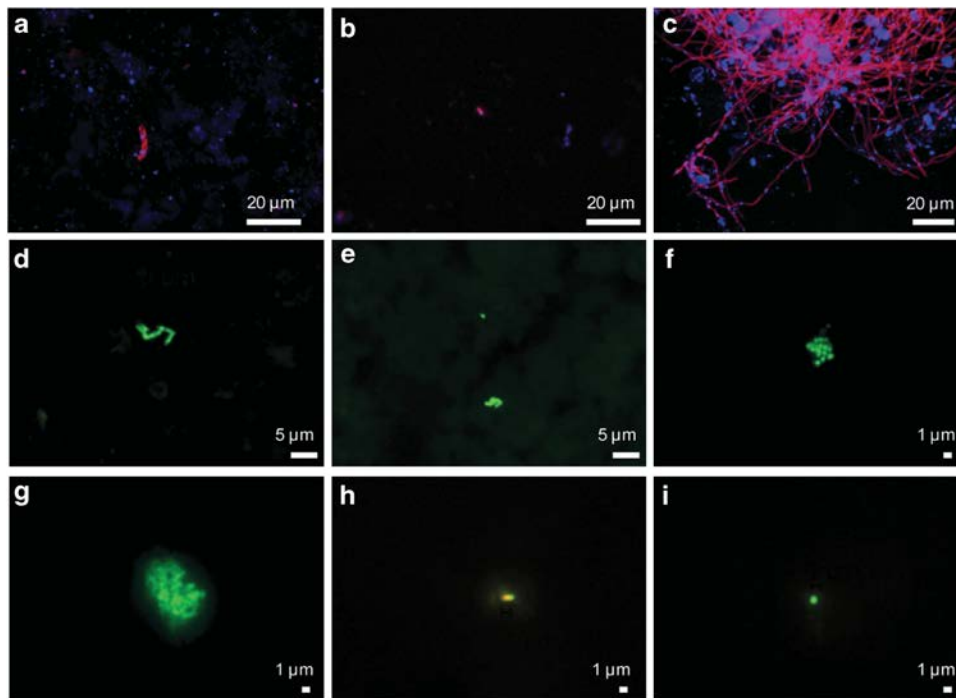


Figure 4 Epifluorescence microphotographs of initial enrichment cultures and subsequent liquid subcultures hybridized with the Cy3-labelled probe Euk516 (staining of nuclei with DAPI) (top panel) or stained with SYBRGreen 1 (middle panel + g) or with the dual staining LIVE/DEAD Bacterial Viability Kit (h and i). (a–c) Identification of fungus-like eukaryotic cells with fluorescently labeled 18S rRNA oligonucleotide probes in initial enrichment cultures with sediments from 21 m CSF-A on PDB 3% at 4 MPa (a), with sediments from 37 m CSF-A on PDB 3% at 11 MPa (b) and with sediments from 765 m CSF-A on PDB 0% at 11 MPa (c). (d, e) Microcolonies observed on polycarbonate membranes (initial enrichment cultures) after 15 days of incubation with sediments from 1922 m CSF-A on H₂/CO₂ + YE. (f, g) Cellular aggregates observed in the seventh liquid subcultures performed after the initial enrichment with sediments from 1827 m CSF-A on YE + peptone + casamino acids. (h, i) Cell structural integrity was observed in the seventh liquid subcultures performed after the initial enrichment with sediments from 1827 m CSF-A on acetate + YE (h) and with sediments from 1922 m CSF-A on YE + peptone + casamino acids (i). YE, yeast extract; PDB, potato dextrose broth.

performed). Cells were able to grow at atmospheric pressure and at the estimated *in situ* pressure (22 MPa). They were composed of viable very small rods, coccobacilli and cocci of 300–800 nm in diameter, often forming aggregates (Figures 4f–i). These small sizes and this cellular organization as consortia raises questions about the living conditions of these cells and their (in)dependence with regard to other cells. The smallest diameter of a cell that assures its viability was calculated as ~200 nm (Velimorov, 2001). The major lineages identified in DNA and RNA libraries from these subcultures

belonged to *Alpha-, Beta-, Gamma-proteobacteria, Actinobacteria* and *Armatimonadetes* (Figures 5). With the exception of *Armatimonadetes*, all these taxa were detected from pyrosequencing in crude samples from 1827 to 1922 m CSF-A. The majority of the sequences had relatives recovered from environments with similar physical–chemical characteristics (Lin *et al.*, 2006; Mason *et al.*, 2010; that is, hot and reduced habitats) compared with the Canterbury subseafloor. Considering the ‘ubiquity’ of these taxa, one can hypothesize that they are generalist bacteria, which would have been

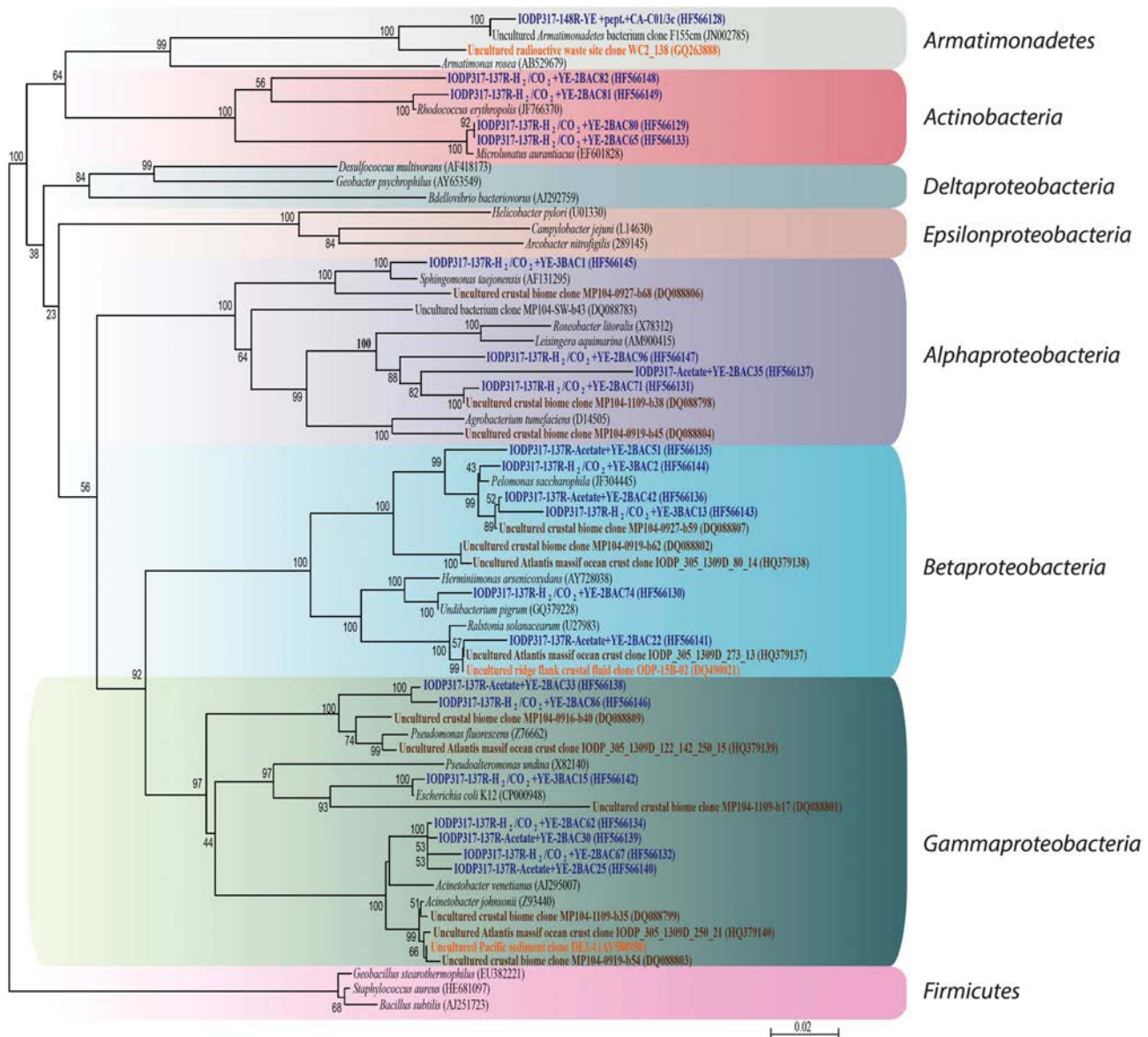


Figure 5 Phylogenetic position of the bacterial 16S rRNA gene sequences detected in RNA extracts from the fifth to eighth liquid subculture following the initial enrichment step on a sediment substrate membrane system. The phylogenetic reconstruction was performed using the Neighbor-Joining algorithm. Bootstrap values based on 1000 replications are indicated at the branch nodes. Representative bacterial 16S rRNA gene sequences of H₂/CO₂ + yeast extract (YE)-based cultures and acetate + YE-based cultures from the 137R section (1827 m CSF-A), as well as YE + peptone (pept.) + casamino acids (CA)-based culture from the 148R section (1922 m CSF-A) are shown in bold blue letters. Sequences from basalt or an underground aquifer where the temperature is high (52 < T < 80 °C) are shown in brown; sequences from environments rich in hydrocarbons or radioactive metals are shown in orange. Accession numbers are given in brackets.

maintained during progressive burial of sediments or by transportation through circulating fluids. They might have acquired metabolic capabilities enabling them to resist the associated environmental changes. However, this hypothesis needs to be analyzed in detail. Furthermore, similar SSU rRNA gene sequences do not automatically correspond to identical physiologies, identical phenotypes or similar functions.

Impact of potential contaminants on native microbial populations

Contamination is a crucial issue when working with subsurface sediments. In general, contamination during drilling is still difficult to predict. During IODP Expedition 317, the level of contamination during drilling was evaluated by using fluorescent microspheres, and only samples with no detectable contamination were kept for microbiological analyses. Nevertheless, samples without microspheres are not necessarily uncontaminated (Smith *et al.*, 2000). Contamination generally decreases from the exterior to the interior of both sediment and rocks cores (for example, Lever *et al.*, 2006). In consequence, only the interior of sediment cores and intact pieces of rocks that had been exposed to ultraviolet light after washing were used for the analyses. In addition, for molecular experiments deeply frozen samples of >1 cm in diameter were sterilized by flaming. Afterwards, all possible contaminations during the wet-lab steps have been strictly controlled and minimized (see Supplementary Text). The cutting-edge strategy applied for the pyrosequencing and bioinformatic analyses allowed removing potential spurious sequences and OTUs likely to contain contaminants by sequencing of negative controls, a duplicate procedure and an associated bioinformatics pipeline. In addition to these precautions, the level of potential contamination of our samples was estimated by calculating the number of contaminating cells per gram of sediment and per gram of sedimentary rock based on the mean contamination values with drilling fluids and mean cell abundances in surface waters reported in the literature. The mean potential contamination was estimated as (i) $0.011 \pm 0.018 \mu\text{l}$ of drilling fluid per gram for unconsolidated sediments drilled using advanced piston coring (APC) and (ii) $0.027 \pm 0.029 \mu\text{l g}^{-1}$ for rocks collected using rotary core barrel (Lever *et al.*, 2006). Considering these levels of contamination, mean cell counts of $5 \times 10^5 \text{ cells ml}^{-1}$ in surface waters in the ocean (Whitman *et al.*, 1998) and average densities of 1.85 g cm^{-3} in sediments and 1.99 g cm^{-3} in sedimentary rocks at site U1352, potential contamination of the interior of the core sample should be expected very low with 5–11 cells g^{-1} of sediment only. A second reported estimate indicates that <50 cells g^{-1} of sediment contaminated APC core centers drilled with *Joides Resolution* and that XCB cores were

generally more contaminated with contamination levels 3–10 times higher in XCB cores than in APC core centers (House *et al.*, 2003). Considering these different estimates of potential contamination, the observed cell counts at site U1352 were 2–5 orders of magnitude higher in the studied samples. If contamination cannot be excluded, in the worst case, non-indigenous cells represent only up to 1% of total cells in the sample. Therefore, it is most likely that >99% of the counted cells are native to the sampled sediment/rocks. This implies that the vast majority of the prokaryotic and eukaryotic DNA subjected to pyrosequencing was therefore derived from the sediment native cells. By extension, assuming that most of the prokaryotic DNA extracted from sediment samples is from native cells, the fact that cultivated bacteria match OTUs abundant in the crude sediment samples supports the idea that these cultivated strains are isolates of native bacteria. Consequently, the potential impact of contaminants on each category of data (cell counts, molecular data and cultures) is likely very low.

Ecological implications and future prospects

We have underlined that the subsurface of the Canterbury basin hosts microorganisms that comprise *Bacteria*, *Archaea* and *Eukarya*. Some of these microorganisms are alive and, at least to a certain extent, revivable. The communities exhibit a quite low phylogenetic diversity, but this does not necessarily correspond to a low functional diversity. This poor diversity could be explained if natural selection has produced (i) taxa adapted to harsh subsurface conditions (that is, specialists), which would be expected in the case of a low connectivity among habitats; and/or (ii) taxa with a broad physiological plasticity, allowing them to survive in a diversity of nutritional and physical–chemical conditions (that is, generalists). In fact, some taxa detected through their 16S/18S rRNA gene sequences are thought to be endemic to subsurface habitats, while others seem ubiquitous and are consistently encountered in common and extreme environments. The bacterial strains in cultures are related to opportunistic or generalist taxa isolated from a broad array of redox environments, which raises the question of the existence of microbial metabolic versatility and also questions the species concept, as behind a given name or a given OTU can lay a variety of microorganisms with different ecological lifestyles. Metabolic versatility has already been demonstrated in well-known taxa. For example, some *Thermococcales* strains, which are usually fermenters that reduce sulfur compounds, can grow in oligotrophic conditions or can oxidize carbon monoxide (Sokolova *et al.*, 2004). Heterotrophy is likely to be the major mode of carbon assimilation within microbial communities of subsurface marine sediments (Batzke *et al.*, 2007). Our culture data support this hypothesis. Genome

and metagenome analyses would allow functions to be predicted on a finer scale to assess and hypothesize the individual ecological functions within the analyzed habitat or ecosystem (Vandenkoornhuys *et al.*, 2010). The detection of fungal sequences at great depths and our success in the cultivation of fungal strains leads us to ask what role they play in deep carbon cycling and what involvement they have in dynamics/regulation of prokaryotic populations, if they are active *in situ*.

The broad polyphasic approach developed in this study provides direct evidence that viable microorganisms can be present in rocks that are hardened but not totally cemented, where stylonites and microfluid circulations exist. Our data demonstrate that the combination of physical, chemical and energetic constraints encountered from 0–1922 m CSF-A in the subsurface of the Canterbury Basin still allow microorganisms to persist down to at least 650, 1740 and 1922 m CSF-A for *Archaea*, fungi and *Bacteria*, respectively. It extends the subsurface sedimentary depths at which subsurface organisms are known to be present to 1740 m for fungi and to 1922 m for *Bacteria*. Nevertheless, one cannot exclude that some of the detected sequences belong to microorganisms in dormancy. More extensive sequencing efforts will be required, that is, direct metatranscriptomics, to describe more directly the microbial communities along with functional signatures and to compile data on biogeochemical processes and fluxes.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

Samples, shipboard facilities and expedition support were provided by IODP. We thank the co-chiefs, crew and shipboard scientific parties of IODP Expedition 317. The Joint Research Unit UMR 6197 (CNRS-Ifremer-UBO), LUBEM, GDR Ecchis, EU program MaCuMBA, DIVVIR project of the FRB and the BGR supported molecular and cultural post-cruise analyses. The study was supported by grants from the French Ministry of Higher Education and Research to MCC, VR and FG; from the Région Bretagne to FG; and from the DFG to AS (Grant SCH535/7-2) and to JSL (Grant HI616/11-1). We thank reviewers for their constructive comments. We thank also C Struckmeyer, M Guégan, H Leclerc, C Argouarch, S Coudouel, A Dheilly and O Quenez for their contribution to this work.

References

Bale SJ, Goodman K, Rochelle PA, Marchesi JR, Fry JC, Weightman AJ *et al.* (1997). *Desulfovibrio profundus* sp. nov., a novel barophilic sulfate-reducing bacterium from deep sediment layers in the Japan Sea. *Int J Syst Bacteriol* **47**: 515–521.

- Batzke A, Engelen B, Sass H, Cypionka H. (2007). Phylogenetic and physiological diversity of cultured deep-biosphere bacteria from equatorial Pacific Ocean and Peru Margin sediments. *Geomicrobiol J* **24**: 261–273.
- Biddle JF, Lipp JS, Lever MA, Lloyd KG, Sørensen KB, Anderson R *et al.* (2006). Heterotrophic Archaea dominate sedimentary subsurface ecosystems off Peru. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 3846–3851.
- Biddle JF, White JR, Teske AP, House CH. (2011). Metagenomics of the subsurface Brazos-Trinity Basin (IODP site 1320): comparison with other sediment and pyrosequenced metagenomes. *ISME J* **5**: 1038–1047.
- Burgaud G, Le Calvez T, Arzur D, Vandenkoornhuys P, Barbier G. (2009). Diversity of culturable marine filamentous fungi from deep-sea hydrothermal vents. *Environ Microbiol* **11**: 1588–1600.
- D'Hondt S, Jørgensen BB, Miller DJ, Batzke A, Blake R, Cragg BA *et al.* (2004). Distributions of microbial activities in deep subsurface sediments. *Science* **306**: 2216–2221.
- Edgcomb VP, Beaudoin D, Gast R, Biddle JF, Teske A. (2011). Marine subsurface eukaryotes: the fungal majority. *Environ Microbiol* **13**: 172–183.
- Engelhardt T, Sahlberg M, Cypionka H, Engelen B. (2011). Induction of prophages from deep-sea subsurface bacteria. *Environ Microbiol Rep* **3**: 459–465.
- Expedition 317 Scientists (2011). Methods, Proc. IODP 317 (Integrated Ocean Drilling Program Management International, Inc; doi:10.2204/iodp.proc.317.102.2011.
- Ferrari BC, Winsley T, Gillings M, Binnerup S. (2008). Cultivating previously uncultured soil bacteria using a soil substrate membrane system. *Nat Protoc* **3**: 1261–1269.
- Fulthorpe CS, Hoyanagi K, Blum P, the Expedition 317 Scientists (2011). Site U1352, Proceedings of the Integrated Ocean Drilling Program 317 (Integrated Ocean Drilling Program Management International, Inc., Tokyo; doi:10.2204/iodp.proc.317.104.2011.
- House CH, Cragg BA, Teske A, Leg 201 Scientific Party (2003). Drilling contamination tests during ODP Leg 201 using chemical and particulate tracers. In: D'Hondt SL, Jørgensen BB, Miller DJ *et al.* (eds). *Proceedings of the Ocean Drilling Program, Initial Reports* vol. 201. Ocean drilling Program: College Station, TX, USA, pp 1–19.
- Inagaki F, Nunoura T, Nakagawa S, Teske A, Lever M, Lauer A *et al.* (2006). Biogeographical distribution and diversity of microbes in methane hydrate-bearing deep marine sediments on the Pacific Ocean Margin. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 2815–2820.
- Kallmeyer J, Smith DC, Spivack AJ, D'Hondt S. (2008). New cell extraction procedure applied to deep subsurface sediments. *Limnol Oceanogr Methods* **6**: 236–245.
- Kallmeyer J, Pockalny R, Adhikari RR, Smith DC, D'Hondt S. (2012). Global distribution of microbial abundance and biomass in subsurface sediment. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**: 16213–16216.
- Lever MA, Alperin M, Engelen B, Inagaki F, Nakagawa S, Steinsbu BO *et al.* (2006). Trends in basalt and sediment core contamination during IODP Expedition 301. *Geomicrobiol J* **23**: 517–530.
- Lin LH, Wang P-L, Rumble D, Lippmann-Pipke J, Boice E, Pratt LM *et al.* (2006). Long-term sustainability of a high-energy, low-diversity crustal biome. *Science* **314**: 479–482.
- Lipp JS, Morono Y, Inagaki F, Hinrichs K-U. (2008). Significant contribution of Archaea to extant biomass in marine subsurface sediments. *Nature* **454**: 991–994.

- Lloyd KG, Schreiber L, Petersen DG, Kjeldsen KU, Lever MA, Steen AD *et al.* (2013). Predominant archaea in marine sediments degrade detrital proteins. *Nature* **496**: 215–218.
- Lomstein BA, Langerhuus AT, D'Hondt S, Jørgensen BB, Spivack AJ. (2012). Endospore abundance, microbial growth and necromass turnover in deep sub-seafloor sediment. *Nature* **484**: 101–104.
- Mason OU, Nakagawa T, Rosner M, Van Nostrand JD, Zhou J, Maruyama A *et al.* (2010). First investigation of the microbiology of the deepest layer of ocean crust. *PLoS One* **5**: e15366.
- Morono Y, Kallmeyer J, Inagaki F, the Expedition 329 Scientists (2011). Preliminary experiment for cell count using flow cytometry. Proceedings of the Integrated Ocean Drilling Program 329 (Integrated Ocean Drilling Program Management International, Inc., Tokyo, <http://dx.doi.org/10.2204/iodp.proc.329.110.2011>).
- Nagano Y, Nagahama T. (2012). Fungal diversity in deep-sea extreme environments. *Fungal Ecol* **5**: 463–471.
- Noble RT, Fuhrman JA. (1998). Use of SYBR Green I for rapid epifluorescence counts of marine viruses and bacteria. *Aquat Microb Ecol* **14**: 113–118.
- Orcutt BN, Sylvan JB, Knab NJ, Edwards KJ. (2011). Microbial ecology of the dark ocean above, at, and below the seafloor. *Microbiol Mol Biol Rev* **75**: 361–422.
- Orsi WD, Edgcomb VP, Christman GD, Biddle JF. (2013a). Gene expression in the deep biosphere. *Nature* **499**: 205–208.
- Orsi W, Biddle JF, Edgcomb V. (2013b). Deep sequencing of subseafloor eukaryotic rRNA reveals active Fungi across marine subsurface provinces. *PLoS One* **8**: e56335.
- Parkes RJ, Cragg BA, Wellsbury P. (2000). Recent studies on bacterial populations and processes in subseafloor sediments: a review. *Hydrogeol Rev* **8**: 11–28.
- Pawlowski J, Christen R, Lecroq B, Bachar D, Shahbazkia RH, Amaral-Zettler L *et al.* (2011). Eukaryotic richness in the abyss: insights from pyrotag sequencing. *PLoS One* **6**: e18169.
- Richards TA, Jones MDM, Leonard G, Bass D. (2012). Marine fungi: their ecology and molecular diversity. *Ann Rev Mar Sci* **4**: 495–522.
- Roalkvam I, Dahle H, Chen Y, Jørgensen SL, Haflidason H, Steen IH *et al.* (2012). Fine-scale community structure analysis of ANME in Nyegga sediments with high and low methane flux. *Front Microbiol* **3**: e216.
- Roussel EG, Cambon Bonavita M-A, Querellou J, Cragg BA, Webster G, Prieur D *et al.* (2008). Extending the sub-sea-floor biosphere. *Science* **320**: 1046.
- Sass H, Parkes RJ. (2011). Sub-seafloor sediments: an extreme but globally significant prokaryotic habitat (taxonomy, diversity, ecology). In: Horikoshi (ed). *Extremophiles Handbook*. Springer: Tokyo, Japan, pp 1016–1036.
- Schippers A, Neretin LN, Kallmeyer J, Ferdelman TG, Cragg BA, Parkes RJ *et al.* (2005). Prokaryotic cells of the deep sub-seafloor biosphere identified as living bacteria. *Nature* **433**: 861–864.
- Schippers A, Neretin LN. (2006). Quantification of microbial communities in near-surface and deeply buried marine sediments on the Peru continental margin using real-time PCR. *Environ Microbiol* **8**: 1251–1260.
- Schippers A, Kock D, Höft C, Köweker G, Siebert M. (2012). Quantification of microbial communities in subsurface marine sediments of the Black Sea and off Namibia. *Front Microbiol* **3**: 16.
- Smith DC, Spivack AJ, Fisk MR, Haveman SA, Staudigel H. (2000). Tracer-based estimates of drilling-induced microbial contamination of deep sea crust. *Geomicrobiol J* **17**: 207–219.
- Sokolova TG, Jeanthon C, Kostrikin NA, Chernyh NA, Lebedinsky AV, Stackebrandt E *et al.* (2004). The first evidence of anaerobic CO oxidation coupled with H₂ production by a hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Extremophiles* **8**: 317–323.
- Tosi S, Casado B, Gerdol R, Caretta G. (2002). Fungi isolated from Antarctic mosses. *Polar Biol* **25**: 262–268.
- Vandenkoornhuysen P, Dufresne A, Quaiser A, Gouesbet G, Binet F, Francez AJ *et al.* (2010). Integration of molecular functions at the ecosystemic level: breakthroughs and future goals of environmental genomics and post-genomics. *Ecol Lett* **13**: 776–791.
- Velimirov B. (2001). Nanobacteria, Ultramicrobacteria and starvation forms: a search for the smallest metabolizing bacterium. *Microb Environ* **16**: 67–77.
- Whitman WB, Coleman DC, Wiebe WJ. (1998). Prokaryotes: the unseen majority. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 6578–6583.

Supplementary Information accompanies this paper on The ISME Journal website (<http://www.nature.com/ismej>)

Résumé

Les aquifères de socle fracturés recouvrent la majeure partie de la Bretagne. Ces formations géologiques dites hétérogènes sont aquifères et compartimentées. La zone altérée, en surface, est plus ou moins épaisse, elle est constituée de roches altérées et est variablement saturée par l'eau souterraine qui y circule rapidement des hauts topographiques du bassin versant vers l'exutoire. L'eau y présente des temps de résidence courts (<20 ans) et est souvent polluée par les nitrates. La zone fracturée située plus en profondeur est constituée de roches dures impactées par des réseaux de fractures. L'eau circule lentement et exclusivement au travers de ces fractures, le temps de résidence de l'eau y est long (>40 ans). En Bretagne, l'eau dans la zone fracturée est plus minéralisée et souvent riche en fer. Ces différentes circulations d'eau induisent des conditions chimiques contrastées entre les zones altérée et fracturée, mais leur effet sur l'écosystème microbien des eaux souterraines n'a jamais été exploré. Cette étude montre que les circulations hydrologiques influencent à l'échelle régionale et locale la structuration des communautés microbiennes au sein des eaux souterraines des aquifères de socle. La localisation au sein des « boucles hydrologiques » contrôle directement la structure des communautés microbiennes via le contrôle de la succession des donneurs et accepteurs d'électrons disponibles. Les communautés microbiennes analysées montrent une prédominance de *Betaproteobacteria*. Dans l'eau souterraine récente (<20 ans) donc principalement dans la zone altérée, les *Betaproteobacteria* sont surtout des *Comamonadaceae* et *Oxalobacteraceae*, microorganismes versatiles et capables de dénitrifier. Dans l'eau souterraine ancienne (>40 ans), ce sont en grande majorité des *Gallionellaceae*, microorganismes microaérophiles spécialisés dans l'oxydation du fer(II). La prédominance des *Gallionellaceae* dans la zone fracturée suggère un écosystème profond basé sur l'oxydation du fer(II). Cependant, ce processus suppose une arrivée minimale d'oxygène dans la partie profonde, via par exemple un mélange avec une masse d'eau récente oxygénée. La proportion de *Gallionellaceae* dans les différentes eaux analysées montre une corrélation positive avec le degré de mélange des eaux anciennes avec des eaux récentes, jusqu'à une limite de 20% d'eau récente. Le suivi temporel de la dynamique des communautés d'un aquifère avant et au début de la recharge a montré dans la zone altérée des conditions chimiques très fluctuantes et une communauté microbienne très changeante mais toujours constituée de nombreux potentiels dénitrifiants. Dans la zone fracturée, la communauté dominée par les *Gallionellaceae* est relativement stable, malgré des changements chimiques ponctuels substantiels et un degré de mélange transitoire important (jusqu'à 60% d'eau récente) au début de la recharge. Les *Gallionellaceae* semblent donc capables de résister à des changements ponctuels et importants des conditions chimiques. Les eaux souterraines de la partie profonde des aquifères, restent relativement connectées à la surface ce qui permet probablement le maintien de l'écosystème microbien profond.

Mots-clés : Aquifères, eaux souterraines, écosystème microbien, circulations hydrologiques, *Gallionellaceae*, fer, nitrates

Abstract

Hard-rock aquifers cover the major part of Brittany. They are heterogeneous geological structures very that have the property to store groundwater and that are compartmentalized. These aquifers are often made of a weathered zone and a fractured zone. The weathered zone, surficial, is a layer more or less thick, it is constituted of weathered rocks variably saturated in groundwater, which circulates rapidly from the upper parts of the watershed to the aquifer outlet. In this zone, groundwater shows short groundwater residence time (< 20y) and is often polluted by nitrates. The fractured zone is located deeper and is composed of fresh rocks crossed by fractures network. Groundwater flows exclusively through fractures with a very slow velocity, and groundwater residence time in this zone is long (>40 y). In the fractured zone, groundwater is much more mineralized and often rich in iron, in Brittany. The difference of flow velocities in the weathered and the fractured zones are responsible for contrasted chemical conditions between these two zones, but the influence of groundwater flow velocity on the microbial ecosystem in groundwater remains largely unexplored. This work shows hydrologic circulations influence the microbial community structuration in hard-rock aquifer groundwater at regional and local scales. Position of a groundwater within a hydrologic flowpath or "hydrological loop" directly controls microbial community structure through the control of the successively available electron donors and acceptors. The analyzed microbial communities show a predominance of *Betaproteobacteria*. In recent groundwater (< 20y) thus particularly in the weathered zone, *Betaproteobacteria* are mainly *Comamonadaceae* and *Oxalobacteraceae*, which are generalists able to denitrify. In old and isolated groundwater (> 40y) thus particularly in the fractured zone, *Betaproteobacteria* are mainly *Gallionellaceae*, which are microaerophilic iron-oxidizer. The predominance of *Gallionellaceae* in the fractured zone suggests a deep ecosystem based on iron oxidation. However, this process implies a minimal input of oxygen in the deeper part, for instance via mixing with recent oxygenated groundwater. Proportion of *Gallionellaceae* in the different analyzed groundwater shows a positive correlation with the degree of mixing between old and recent groundwater, up to a limit of 20% of recent groundwater. The temporal microbial community dynamics in a single aquifer, before and during the beginning of recharge, demonstrated in the weathered part very fluctuant chemical conditions and a shifting microbial community that remains always composed of numerous potential denitrifiers. In the fractured part, microbial community is dominated by *Gallionellaceae* and remains rather stable, despite the punctual but substantial changing of the chemical conditions and degree of mixing (up to 60% of recent groundwater) at the beginning of the recharge. *Gallionellaceae* seem thus able to resist to important and punctual chemical conditions changings. Groundwater in the deeper part of aquifers, even isolated, remains relatively connected to surface, likely allowing the deep microbial ecosystem to maintain.

Keywords: Aquifers, groundwaters, microbial ecosystem, hydrologic flowpaths, *Gallionellaceae*, iron, nitrates