



**HAL**  
open science

**Etude de l'impact écologique de faibles bruits de fond radioactifs renforcés naturellement (NORM) ou par une activité humaine (TE-NORM) : Les diatomées, modèle pertinent pour explorer l'effet chronique de la radioactivité parmi d'autres facteurs stressants dans les biotopes aquatiques.**

Lory-Anne Baker

► **To cite this version:**

Lory-Anne Baker. Etude de l'impact écologique de faibles bruits de fond radioactifs renforcés naturellement (NORM) ou par une activité humaine (TE-NORM) : Les diatomées, modèle pertinent pour explorer l'effet chronique de la radioactivité parmi d'autres facteurs stressants dans les biotopes aquatiques.. Sciences agricoles. Université Clermont Auvergne, 2023. Français. NNT : 2023UCFA0021 . tel-04534138

**HAL Id: tel-04534138**

**<https://theses.hal.science/tel-04534138v1>**

Submitted on 5 Apr 2024

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

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

Thèse en vue de l'obtention du **Doctorat de l'Université Clermont-Auvergne**  
**Ecole doctorale des sciences de la vie, santé, agronomie et environnement**  
**Spécialité: Microbiologie**

---

**Etude de l'impact écologique de faibles bruits de fond radioactifs renforcés naturellement (NORM) ou par une activité humaine (TE-NORM): Les diatomées, modèle pertinent pour explorer l'effet chronique de la radioactivité parmi d'autres facteurs stressants dans les biotopes aquatiques.**

---

Présentée par

**Lory-Anne BAKER**

Sous la direction d'Aude BEAUGER et de Pradeep Angia SRIRAM

Au sein des laboratoires UMR UCA/CNRS 6023 – LMGE

et UMR UCA/CNRS 6042 – GEOLAB

Soutenue publiquement le 04 avril 2023

Composition du jury :

**Bart Van de Vivjer** Professeur, Université d'Anvers, (Anvers, Belgique), Examineur, Président du jury

**Virginie Chapon** Chercheuse HDR, BIAM, CEA (Cadarache), Rapportrice

**Soizic Morin** Directrice de recherche, INRAE (Bordeaux), Rapportrice

**Aude BEAUGER** Ingénieur de Recherche, GEOLAB, CNRS (Clermont-Ferrand), encadrante de thèse

**Pradeep Angia SRIRAM** Chargé de Recherche HDR, LMGE, CNRS (Aubière), directeur de thèse



## Remerciements

Je remercie Aude et David, pour l'opportunité qu'ils m'ont donné de faire ma thèse sous leur direction. Je les remercie pour l'encadrement de qualité et d'écoute dont j'ai bénéficié auprès d'eux. Malgré les nombreux rebondissements durant les trois ans et demi de ma thèse, ce fut une expérience enrichissante à bien des égards. J'ai découvert une façon de travailler dans un contexte interdisciplinaire avec des scientifiques de domaines différents. Toutes les études qui ont émergées dans le cadre de la ZATU, notamment du projet TIRAMISU sont très intéressantes ; il y a tellement encore à découvrir chez les diatomées. tellement à faire pour étudier les populations naturelles et l'influence de facteurs environnementaux sur ces dernières. Travailler sur les diatomées a été une expérience enrichissante.

Je suis contente d'avoir pu travailler sur les sources d'Auvergne et sur l'ancienne mine de Rophin. Cela m'a permis de découvrir la recherche de terrain que j'apprécie particulièrement. Je ne peux envisager mon avenir professionnel, sans faire du terrain.

De façon plus individuelle, je tiens à remercier mes directeurs de thèse.

J'ai une pensée particulière pour David G. Biron qui a été mon directeur de thèse. La vie peut-être tellement courte... Je n'ajouterai pas de nouveaux mots, mis à part le discours que j'ai eu le jour de ses funérailles. Ils ont été choisis avec soin et je tiens à les inscrire dans mon manuscrit de thèse :

« C'est avec émotion que j'ai écrit ces quelques mots. Je prie pour avoir le courage d'aller jusqu'au bout. David était mon directeur de thèse, un mentor et aussi un ami. Son départ brutal a été un choc pour moi, une source de tristesse. En tant que doctorante, j'ai été aux bénéfices de son encadrement et ainsi de toutes ses qualités scientifiques et humaines. Je garde et garderai en mémoire, le souvenir d'un excellent scientifique, rigoureux, perspicace et pédagogue, d'une personne dotée d'une grande ouverture d'esprit, bienveillante et de bons conseils. David était très à l'écoute et plein d'humour. Quand je penserai à David, je me souviendrai d'une personne dotée de grandes qualités humaines appréciables auprès de tous ceux qui l'ont côtoyé. J'aimerais terminer sur ces quelques mots, lors de ses derniers jours je crois que David a choisi la bonne part et j'ai la conviction qu'actuellement son âme repose en paix, c'est là mon réconfort. Je pense à Nadège, sa conjointe et lui témoigne mon soutien et mon affection en ce moment difficile. »

Puis, je tiens à remercier particulièrement Aude Beauger. Je la remercie pour son encadrement, pour la pleine autonomie qu'elle m'a accordée et son ouverture d'esprit. Je garde en mémoire tous nos échanges lors de sorties de terrain, dans la salle paléo pendant les comptages. Je suis reconnaissante d'avoir travaillé auprès d'elle car je reconnais en elle, une femme forte, bosseuse, courageuse, pleine d'esprit et une scientifique accomplie. Elle est toujours disponible pour les étudiants qu'elle encadre avec bienveillance. Je lui souhaite le meilleur tant professionnellement que personnellement.

Je remercie Pradeep Angia Sriram d'avoir accepté d'être mon directeur de thèse après le décès de David. Je le remercie pour sa disponibilité et pour m'avoir donné l'occasion de travailler sur les virus dans les sources minérales.

Mes remerciements à toute l'équipe BIOADAPT qui m'a accueilli durant ma thèse. Je remercie Marie-Françoise Charpin pour sa disponibilité ainsi qu'Isabelle Mary pour

m'avoir accordé du temps en effectuant une relecture et la correction de mon manuscrit de thèse et pour ses remarques pertinentes. J'ai apprécié partager le bureau avec Anne-Catherine Lehours et Johan Artigas. Je pense à Anne-Hélène avec qui j'ai pu avoir des discussions enrichissantes et encourageantes.

Une pensée pour les doctorants Fanny Noirmain, Antoine Vergne, Eric Olo Ndela, Clémentin Bouquet à qui je souhaite la réussite et de belles découvertes dans leur projet de thèse.

Je tiens également à remercier nos collègues du LPC : Vincent Breton avec qui j'ai apprécié discuter de sciences mais également de foi (je le remercie pour ses encouragements), Patrick Chardon et Sofia Kolovi.

J'ai également une pensée de sympathie et d'encouragements pour les doctorants ayant fait partie du projet TIRAMISU comme moi-même. Il s'agit de Sofia Kolovi, de Guillaume Holub et de Yihua He. Je leur souhaite également la réussite.

Je remercie également les membres du laboratoire GEOLAB qui m'a accueilli également durant ma thèse et particulièrement à Johannes qui est un directeur de laboratoire consciencieux, qui a contribué au bon déroulement de ma thèse.

J'ai une pensée pour Irène Till-bottraud, Anne Bonis (qui a été dans mon comité de thèse), Elisabeth Allain (pour tous nos échanges), Olivier Voldoire (pour nos échanges et son sérieux dans son travail que j'ai apprécié), Emmanuelle Defive, Ana Ejarque, Inga Koudir.

J'ai apprécié partager le bureau avec les autres doctorants et post-doctorants de GEOLAB : Arthur Ancrenaz, Magali Weissgerber, Anaïs Arfeuillere, Benjamin Allard, Géraud De Bouchard D'Aubeterre, Anaïs Tahiri, Julie Crabot et Antoine Brias.

Je remercie également particulièrement Nadège Astier pour tous les moments que nous avons pu partager ensemble. Nadège fait partie également des personnes que j'ai beaucoup apprécié rencontrer. C'est une femme forte, curieuse et pleine de connaissances. Je la remercie pour tout le temps qu'elle a accordé à la relecture et la correction de mon manuscrit de thèse. Je salue la pertinence de ses commentaires et son envie d'en apprendre toujours plus sur un sujet.

Indubitablement, je suis profondément reconnaissante envers ma famille et ne pourrai me contenter de leur dédier que deux ou trois lignes uniquement. Merci à mes parents Elise et Daniel Baker pour leur soutien émotionnelle, financier durant mes études. Pour avoir cru en moi, pour m'avoir encouragée malgré tout, pour leur écoute et leur bienveillance. Je pense aussi à ma sœur Anne-Laure Baker, je la remercie d'avoir été là et lui souhaite un parcours de formation riche en belles expériences professionnelles et humaines et lui témoigne tout mon amour.

Je remercie mes tantes ou mes trois autres mères : Maguy Aline, Emire Eustache et Marie-Hélène Tom. Je vous rassure l'ordre de vos noms n'a aucune importance. Je vous remercie pour le soutien infailible que vous m'avez témoigné. C'est drôle parce que chacune à une période de ma vie précise, vous avez joué un rôle particulier. Les appels pour m'encourager, les repas et toutes leurs belles attentions.

Une pensée pour ma grand-mère Marie-Rose Eustache, qui a été un soutien particulier pour moi et qui malheureusement ne pourra pas assister à la fin de ce parcours au cours duquel, elle m'a tant encouragé.

Je remercie également mon oncle Pierre Tom pour sa bienveillance et toutes ses belles attentions envers moi, mon oncle et ma tante Victor et Nicole Eustache, pour ma tante Nelly Baker. Je leur dis merci pour leur soutien, leur bienveillance et la générosité de leur cœur.

Une dernière pensée à mes cousin(e)s, mes ami(e), ma famille de cœur : Corinne, Maëlle, Estelle, Nancie et Neline Eustache, Julian et Florian Tom, Sarah Barrel, Aurélie et Andrew Goma, Abirami Baleswaran, Carla Barbosa-Spinola, Gwladys et Nicolas Prudent, Armelle, Liliane Bini, Anaïs Arnaud, Samuel et Michaëlle Comsel, Elisabeth, Gregory Senneville, Yannick et Daryl Gauthierot, Jimmy, Samantha, Sébastien Coute, Charlène et Manuel Bocti, Ivan et Mélanie Laleye, Fabien et Lydie Mignard, Nathaniel et Anne-Sophie, Kevin et Ruth Miscoria et Gwenaëlle, Mathilde et Yaëlle Jean, Ruth et Lionel Montet.

Un remerciement particulier pour Jimmy et Carla qui ont relu l'abstract de ma thèse.



## Résumé

La vie a évolué sur Terre pendant des millions d'années en présence de bruits de fond naturellement radioactifs. Ces rayons ionisants ont probablement contribué à façonner les formes de vie actuelles. Cependant, il existe peu d'études sur les effets de ces bruits de fond radioactifs sur les organismes. Ainsi, l'objectif principal de la thèse était de comprendre l'influence de bruits de fond radioactifs naturels ou renforcés par une activité humaine sur les paramètres écologiques (richesse, composition taxonomique et structure) des communautés de diatomées benthiques. Dans le premier volet de la thèse, nous nous sommes focalisés sur l'impact de la radioactivité, dans vingt-six sources minérales du Massif central (France), sur les diatomées benthiques via des approches morphologiques et génétiques (metabarcoding). Toutefois, dans un premier temps, comme les sources possèdent différents substrats à proximité de leur émergence, nous avons testé si l'échantillonnage de ces différents substrats avait un impact sur les paramètres écologiques des diatomées. De fait, nous avons pu prouver que l'influence du substrat sur la structure des communautés est négligeable par rapport à la localisation géographique des sources (cf. conditions environnementales). Puis, nous avons démontré que la radioactivité (notamment l'uranium 238 et le radon 222) est un facteur qui influence encore la structuration des communautés de diatomées benthiques dans les sources minérales. Nous avons également démontré que l'espèce *Planothidium frequentissimum* est particulièrement associée aux sources avec les niveaux les plus élevés en uranium 238 ou en radon 222. Cette observation fait de cette espèce, un potentiel bioindicateur de concentrations élevées en ces deux radioéléments. De plus, parmi les sources étudiées, il se trouvait la source bitumineuse de la Poix qui est une particularité géologique avec une eau extrêmement minéralisée. Les paramètres singuliers qui la caractérisent n'ont pas permis de l'inclure dans nos analyses statistiques mais ont conduit à l'étude de sa diversité inédite. Le cortège d'espèces retrouvés à la Poix est principalement composé de taxons marins et d'eau saumâtre. L'étude de cette source souligne le caractère insulaire des sources. Ensuite, nous avons eu l'opportunité de nous intéresser à l'influence de la radioactivité dans les sources minérales sur l'abondance d'autres acteurs des communautés microbiennes: les virus et les procaryotes. A travers ces travaux, nous avons mis en évidence que si la radioactivité a une influence sur l'abondance des phages, elle n'a aucun effet sur celle des procaryotes.

Dans le second et dernier volet de la thèse, nous nous sommes intéressés à l'influence de radioactivité renforcée par une activité humaine telle que l'exploitation minière d'uranium. Pour cela, nous avons étudié les diatomées fossiles de la zone humide sur le site de l'ancienne mine de Rophin (France) via une approche paléo-environnementale. Cette étude a révélé que l'exploitation de la mine d'uranium n'a pas eu d'impact important sur les communautés de diatomées. Mis tous ensemble, les résultats obtenus par les différentes méthodes utilisées apportent des informations supplémentaires sur l'influence de faible bruit de fond radioactif sur des populations de micro-organismes aquatiques, un domaine encore peu exploré.

Enfin, différentes perspectives sont envisagées telle que l'étude de l'influence de bruits de fond radioactifs sur les paramètres physiologiques des communautés de diatomées (photosynthèse, productions pigmentaires photosynthétiques et antioxydantes). *Planothidium frequentissimum* étant une espèce qui a particulièrement retenu notre attention, nous envisageons d'étudier l'influence de fortes doses de



rayonnements ionisants sur la physiologie de cette espèce. Pour finir, nous souhaitons étudier l'évolution de diatomées fossiles enregistrées dans le travertin de la source Montagne, qui est la source la plus radioactive de France, afin de déterminer si ce facteur a eu un effet sur ces organismes à travers les âges.

## Abstract

Life on Earth has evolved over millions of years in the presence of natural background ionising radiation. Exposure to these ionising radiation may have helped to shape present-day life forms. However, little research has been conducted to examine the influence of the radiation on natural populations. The main objective of my thesis was to understand the influence of natural or anthropized radioactive backgrounds on the ecological parameters (richness, taxonomic composition and structure) of benthic diatom communities. In the first part of the thesis, my work was focused on the impact of radioactivity on benthic diatoms in twenty-six mineral springs of the Massif Central (France) has been studied using morphological and genetic (metabarcoding) approaches. Since the springs have different substrates near their emergence, we first tested whether sampling different substrates had an impact on the ecological parameters of the diatoms. Results showed that the influence of the substrate on the structure of the communities is negligible compared to the geographical location of the sources (cf. environmental conditions). Then, radioactivity (in particular uranium 238 and radon 222) has been shown to still influences the structuring of benthic diatom communities in mineral springs. Additionally, the species *Planothidium frequentissimum* is particularly associated with and springs with the highest levels of uranium-238 or radon-222. This species can be considered as a potential bioindicator of high uranium-238 or radon-222 concentrations. Among the springs studied, the bituminous Poi spring is a geological feature with extremely mineralised water. These parameters do not allow us to include this spring in our statistical analyses but have led to the study of its unusual diversity. The range of species found at the Poix is mainly composed of marine and brackish water taxa. The study of this spring underlines the insular character of the springs. In the second part of the thesis, we had the opportunity to study the influence of radioactivity in mineral springs on other microbial communities (viruses and prokaryotes) has been studied. Through this work, it has been noted that radioactivity has an influence on the abundance of viruses but has no effect on the prokaryotes population. Finally, the last part of the thesis focused on the influence of radioactivity reinforced by human activities such as uranium mining. Using the paleoenvironmental approach, we studied the fossil diatoms of the wetland on the site of the former Rophin mine (France). This study revealed that the uranium mine operation did not have a significant impact on diatom communities. This thesis provides additional information on the influence of low radioactive background noise on natural aquatic populations.

As a next step in this research, different perspectives were envisaged such as the study of the influence of radioactive background noise on the physiological parameters of diatom communities (photosynthesis, photosynthetic and antioxidant pigment production). *Planothidium frequentissimum* being a species that particularly attracted our attention, further study can be conducted to identify the effect of high doses of ionising radiation on its physiology. Finally, the evolution of fossil diatoms recorded in the travertine of the Montagne spring, which is the most radioactive in France, may be studied in order to determine whether radioactivity had an effect on these organisms.



# Valorisation de la thèse

## 1. Articles publiés

**Lory-Anne Baker**, David G Biron, Fanny Millan, Olivier Voltaire, Vincent Breton, Elisabeth Allain, Carlos E. Wetzel, Luc Ector and Aude Beauger (2022). The substrate, a key factor or not, to explain the species diversity of diatom communities in mineral springs. *Botany letters* 169(2), 155-165. DOI: 10.1080/23818107.2022.2028186

Aude Beauger, **Lory-Anne Baker**, Carlos E Wetzel, Luc Ector, David Biron (2021). « Thermo-Mineral Springs, Old and Unique Aquatic Ecosystems to Survey and Preserve », *Biodiversity Online Journal*, 1(4).

**Lory-Anne Baker**, Aude Beauger, Carlos E Wetzel, Olivier Voltaire, Christelle Blavignac, Elisabeth Allain, Luc Ector, David G Biron (2022). Brackish species observed at the bituminous Poix spring: an island of curiosity. *BIOM* 3(1), 40-51.

**Lory-Anne Baker**, David G Biron, Aude Beauger, Sofia Kolovi, Jonathan Colombet, Elisabeth Allain, Olivier Voltaire, Vincent Breton, Patrick Chardon, Telesphore Sime-Ngando, Karine David, Gilles Montavon, Hervé Michel, Angia Sriram Pradeep Ram (2023). Viral abundances in freshwater mineral springs along a gradient of naturally enhanced radioactivity. *Hydrobiologia*.

**Lory-Anne Baker**, Aude Beauger, Sofia Kolovi, Olivier Voltaire, Elisabeth Allain, Vincent Breton, Patrick Chardon, Didier Miallier, Céline Bailly, Gilles Montavon, Agnez Bouchez, Frédéric Rimet, Cécile Chardon, Valentin Vasselon, Luc Ector, Carlos E Wetzel., David G Biron. Diatom DNA metabarcoding to assess the effect of natural radioactivity in mineral springs on genetic variants of benthic diatoms communities. *Science of the total environment*.

Aude Beauger, Olivier Voltaire, Elisabeth Allain, Pierre Gosseaume, Christelle Blavignac, **Lory-Anne Baker**, Carlos E. Wetzel. Biodiversity and environmental factors structuring diatom assemblages of the mineral saline springs of the French Massif central. *Diversity*.

## 2. Articles soumis

**Lory-Anne Baker**, Hélène Celle-Jeanton, Olivier Voltaire, Carlos E Wetzel, Elisabeth Allain, Luc Ector, Vincent Breton, David G Biron, Gilles Mailhot, Jean-Luc Devidal, Aude Beauger. Improvement of the knowledge of diatoms ecology by coupling geochemistry and taxa inventory in mineral springs of a volcanic and upland area in south-central France, the Massif Central. *Botany letters* (soumis le 8 février 2023).

### 3. Articles en préparation

**Lory-Anne Baker**, David G Biron D., Olivier Voldoire, Elisabeth Allain, Clément Floquet, Sofia Kolovi, Vincent Breton, Patrick Chardon, Ana Ejarque, Emmanuelle Defive, Franck Donadieu, Angia Sriram Pradeep Ram, Aude Beauger. Investigating the impact of uranium mining activity through analysis of fossilized diatom community of a wetland (Rophin, France). *Journal of monitoring and assessment* (en préparation).

**Lory-Anne Baker**, Wetzel C.E., Breton V., Kolovi S., Voldoire O., Allain E., Ector L., Van de Vijer B., Aude Beauger. *Gedaniella davidbironii* (Bacillariophyta), a new species from French mineral spring with natural radioactivity (Massif Central). *Phycologia* (en préparation).

### 4. Communications orales

**Lory-Anne Baker**. Journée des dispositifs de partenariat en écologie et environnement (DIPEE) de l'INEE, Clermont-Ferrand, France, mars 2020. Les diatomées, des organismes modèles, pour étudier et décrypter le transfert de radionucléides dans des biotopes aquatiques dont la radioactivité est issue d'une activité humaine (TE-NOR).

**Lory-Anne Baker**. 9ème journée des doctorants du LMGE. Visioconférence, Clermont-Ferrand, France, juillet 2020. Les diatomées, des organismes modèles, pour étudier et décrypter le transfert de radionucléides dans des biotopes aquatiques dont la radioactivité est issue d'une activité humaine (TE-NOR).

**Lory-Anne Baker**, Aude Beauger, Sofia Kolovi, Olivier Voldoire, Elisabeth Allain, Vincent Breton, Patrick Chardon, Didier Miallier, Céline Bailly, Gilles Montavon, Agnez Bouchez, Frédéric Rimet, Cécile Chardon, Valentin Vasselon, Luc Ector, Carlos E Wetzel., David G Biron. 39ème édition du colloque de l'ADLaF, Aix-en-Provence, France, septembre 2021. Etude de la biodiversité des communautés de diatomées peuplant des sources minérales radioactives du Massif Central en Auvergne à l'aide du metabarcoding.

**Lory-Anne Baker**. 10ème journée des doctorants du LMGE. Visioconférence, Clermont-Ferrand, France, juillet 2022. Influence de la radioactivité naturelle sur les communautés de diatomées des sources minérales du Massif Central via une approche de metabarcoding

**Lory-Anne Baker**, David Biron†, Olivier Voldoire, Elisabeth Allain, Clément Floquet, Sofia Kolovi, Vincent Breton, Patrick Chardon, Jonathan Colombet, Ana Ejarque, Emmanuelle Defive, Franck Donnadieu, Pradeep Angia Sriram, Aude Beauger. 40ème édition du colloque de l'ADLaF,

Clermont-Ferrand, France, septembre 2022. Etude diachronique de l'impact de l'exploitation de l'uranium sur la diversité des communautés de diatomées dans une ancienne mine d'uranium (Rophin, France).

**Lory-Anne Baker**, Aude Beauger, Sofia Kolovi, Olivier Voldoire, Elisabeth Allain, Vincent Breton, Patrick Chardon, Didier Miallier, Céline Bailly, Gilles Montavon, Agnez Bouchez, Frédéric Rimet, Cécile Chardon, Valentin Vasselon, Luc Ector, Carlos E Wetzel., David G Biron. 40ème édition du colloque de l'ADLaF, Clermont-Ferrand, France, septembre 2022. Influence de la radioactivité naturelle sur les communautés de diatomées des sources minérales du Massif Central via une approche de metabarcoding.

## 5. Posters

**Lory-Anne Baker**, Aude Beauger, Sofia Kolovi, Olivier Voldoire, Elisabeth Allain, Vincent Breton, Patrick Chardon, Didier Miallier, Céline Bailly, Gilles Montavon, Agnez Bouchez, Frédéric Rimet, Cécile Chardon, Valentin Vasselon, Luc Ector, Carlos E Wetzel., David G Biron. Influence de la radioactivité naturellement renforcée (NOR) sur les peuplements de diatomées actuelles et passées des sources minérales. 5ème colloque des Zones Ateliers–CNRS 2000-2020, 20 ans de recherche du Réseau des Zones Ateliers, Tours, France, novembre 2020. (Poster accepté après comité de sélection).

**Lory-Anne Baker**, Aude Beauger, Sofia Kolovi, Olivier Voldoire, Elisabeth Allain, Vincent Breton, Patrick Chardon, Didier Miallier, Céline Bailly, Gilles Montavon, Agnez Bouchez, Frédéric Rimet, Cécile Chardon, Valentin Vasselon, Luc Ector, Carlos E Wetzel., David G Biron. Influence of natural radioactivity on diatoms communities in mineral springs using metabarcoding. 25ème édition des Journées Scientifiques de l'Ecole Doctorale Sciences de la Vie, Santé, Agronomie, Environnement, Mai 2022, Clermont-Ferrand.

## Sommaire

<b>Chapitre I: Synthèse bibliographique .....</b>	<b>16</b>
1. Notions générales sur la radioactivité.....	16
3. Effet de faibles doses de rayons ionisants sur les organismes.....	20
4. Influence de la radioactivité et d'autres facteurs (abiotiques et biotiques) dans les biotopes aquatiques continentaux.....	22
4.1. Variation du bruit de fond radioactif à la surface de la Terre : cas des NORM («Naturally Occurring Radioactive Material»).....	22
4.2. Variation du bruit de fond radioactif à la surface de la Terre : cas des TE-NORM.....	26
5. Les organismes utilisés pour étudier les effets de faibles bruits de fond radioactifs en milieu aquatique .....	29
6. Les diatomées: organismes modèles pour étudier l'influence d'un stress environnemental.....	30
6.1. Caractéristiques générales des diatomées.....	30
6.2. Les diatomées, des organismes modèles.....	31
6.3. Les facteurs influençant les diatomées dans les environnements aquatiques ...	32
6.4. Les diatomées et la radioactivité.....	36
7. Conclusion et présentation du projet.....	37
8. Présentation du dispositif ZATU .....	37
9. Problématique de la thèse .....	41
<b>Chapitre II: Matériel et méthodes .....</b>	<b>44</b>
A. Etude de l'influence de la radioactivité et des paramètres physico-chimiques sur les communautés de diatomées des sources minérales (cas des NORM) .....	44
1. Sources minérales étudiées .....	44
2. Mesures des paramètres physico-chimiques et radiologiques des biotopes .....	49
2.1. Analyses physico-chimiques de l'eau .....	50
2.2. Les analyses radiologiques.....	51
3. Analyses des communautés de diatomées.....	52
3.1. Analyses morphologiques des communautés de diatomées .....	53
3.2. Analyses génétiques des communautés de diatomées : le Metabarcoding .....	54
3.3. Caractérisation de la diversité des communautés.....	56
3.3.1. Mesure de la diversité $\alpha$ .....	56
3.3.2. Mesure de la diversité $\beta$ .....	57

3.4. Ecologie des diatomées .....	58
4. Analyses des abondances virales et procaryotes dans les sources minérales .....	58
B. Etude de l'influence de la radioactivité et d'autres paramètres environnementaux sur les communautés de diatomées d'un ancien site TE-NORM par une analyse paléo-écologique .....	59
1. La zone humide de l'ancienne mine de Rophin .....	60
2. Le carottage de la zone humide de Rophin, description lithostratigraphique et étude des communautés de diatomées.....	61
3. Datation de la carotte .....	64
<b>Chapitre III: Le substrat a-t-il une influence sur la diversité des diatomées dans les sources minérales ? .....</b>	<b>66</b>
Abstract.....	67
Introduction.....	68
Material and methods.....	70
Results .....	74
Discussion.....	82
Conclusion .....	87
<b>Chapitre IV: Les bruits de fond radioactifs renforcés par l'activité naturelle des sources minérales ont-ils une influence sur la diversité des communautés de diatomées ? .....</b>	<b>88</b>
Abstract.....	89
Introduction.....	90
Material and methods.....	92
Results .....	100
Discussion.....	107
Conclusions .....	113
<b>Chapitre V: Etude de l'influence de la radioactivité et du contexte hydrogéochimique des sources sur les communautés de diatomées.....</b>	<b>118</b>
Abstract.....	119
Introduction.....	120
Materials and methods .....	122
Discussion.....	142
Conclusion:.....	148
<b>Chapitre VI: La source de la Poix : un milieu extrême peu radioactif .....</b>	<b>154</b>
Abstract.....	155
Introduction.....	156



Materials and methods .....	157
Results .....	161
Discussion.....	167
Conclusion.....	171
<b>Chapitre VII: Les bruits de fond radioactifs ont-ils une influence sur les abondances virales et procaryotes dans les sources minérales ?.....</b>	<b>174</b>
Abstract.....	175
Introduction.....	176
Materials and methods .....	178
Results .....	183
Discussion.....	189
<b>Chapitre VIII: L'exploitation de l'uranium a-t-il eu un impact sur les communautés de diatomées fossiles de la zone humide de l'ancienne mine de Rophin ? .....</b>	<b>194</b>
Abstract.....	195
Introduction.....	196
Material and methods.....	198
Results .....	203
Discussion.....	215
Conclusion.....	221
<b>Chapitre IX : Discussion et perspectives.....</b>	<b>226</b>
1. Bilan de l'ensemble des chapitres de la thèse .....	226
2. Perspectives .....	235
<b>Références .....</b>	<b>242</b>
<b>Annexes .....</b>	<b>272</b>
Annexe 1: Sources étudiées durant la thèse .....	272



# Chapitre I: Synthèse bibliographique

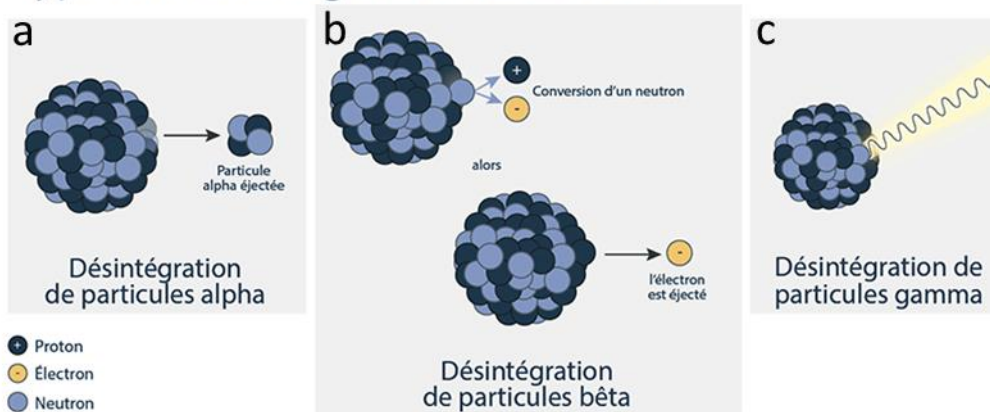
## 1. Notions générales sur la radioactivité

La découverte de la radioactivité a été attribuée à Antoine Henri Becquerel qui fut récompensé par l'obtention du prix Nobel de physique en 1903 grâce à ses travaux sur la phosphorescence des sels d'uranium. Il partagea ce prix avec les physiciens et chimistes français Pierre et Marie Curie qui ont également travaillé sur le rayonnement radioactif. Pour l'anecdote, il s'est avéré que 40 ans avant la découverte d'Henri Becquerel, le physicien et photographe français Claude Félix Abel Niépce de Saint-Victor évoquait déjà dans son rapport à l'Académie des sciences ses observations concernant les rayonnements émis par les sels d'uranium (Habashi, 2001).

Comment peut-on définir la radioactivité ? Il s'agit d'un phénomène physique par lequel des noyaux (nucléides) instables car possédant trop de protons, de neutrons ou les deux à la fois, vont se transformer spontanément en d'autres éléments (désintégration) tout en émettant simultanément des particules de matière (électrons, noyaux d'hélium, neutrons, etc.) et de l'énergie (photons et rayonnement). C'est donc l'énergie expulsée, suite à la modification du noyau, sous la forme d'un rayonnement qui constitue le phénomène de radioactivité. Plus simplement, lorsqu'un noyau instable se casse, sa désintégration est accompagnée de l'émission de différents rayonnements particuliers  $\alpha$  (alpha) ou  $\beta$  (bêta) (Fig. I-1). Elle est souvent accompagnée en plus de libération d'énergie (rayonnement électromagnétique  $\gamma$  (gamma)) (Fig. I-1), Si le noyau « fils » issu de la désintégration du noyau « père » est lui-même instable, il va à son tour se casser en émettant des particules et de l'énergie : une telle chaîne de désintégrations se poursuit jusqu'à atteindre un noyau stable (Fig. I-1).

L'échelle des énergies délivrées par un rayonnement  $\alpha$ ,  $\beta$  ou  $\gamma$  peut être de l'ordre d'un kilo à une dizaine de méga électronvolts ( $10^6$  volts) et chaque rayonnement selon sa nature a une capacité différente de pénétrer la matière (Esnault, 2020) et d'interférer avec elle. Le rayonnement  $\alpha$  est en fait un noyau d'hélium lourd et chargé électriquement ; il va être arrêté par une simple feuille de papier.

## Types de désintégration radioactive



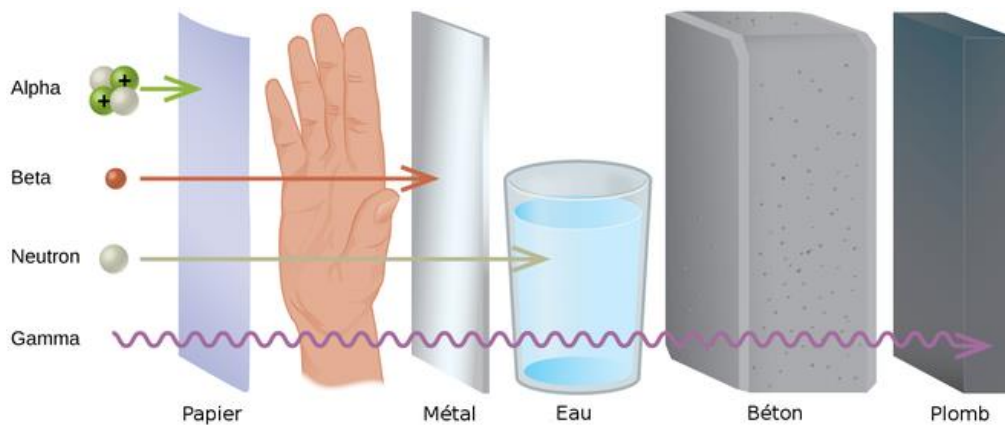
**Figure I-1 : Types de désintégration radioactive.** (a) La désintégration de particules alpha ( $\alpha$ ) correspond à la libération de noyaux d'hélium ( ${}^2\text{He}$ ). (b) La désintégration de particules bêta ( $\beta$ ) correspond à la libération d'électron ( $e^-$ ). (c), la désintégration de particules gamma ( $\gamma$ ) correspond à la libération de particules électromagnétiques. (© Commission canadienne de sûreté nucléaire).

Le rayonnement  $\beta$  est composé d'électrons, particules beaucoup plus légères et chargées électriquement. Il va avoir un pouvoir pénétrant plus important que le rayonnement  $\alpha$  et causer potentiellement plus de dégât mais sa trajectoire pourra être interrompue par une couche de métal.

Enfin, le rayonnement  $\gamma$ , quant à lui, est constitué de particules de lumière : les photons. Son énergie varie de quelques keV à une dizaine de MeV pour la radioactivité naturelle. Ce type particulier de rayonnement suit souvent une désintégration  $\beta$  voire  $\alpha$ , parce que les photons sont neutres électriquement. Son pouvoir pénétrant est supérieur à celui du rayonnement  $\beta$  et il faudra une couche de plomb pour l'arrêter (Fig. I-2). Malgré son pouvoir pénétrant, le rayonnement  $\gamma$  modifie moins les particules qu'il rencontre que les rayonnements  $\alpha$  et  $\beta$  (IRSNa, [www.irsna.fr](http://www.irsna.fr)).

Ainsi, lors de leur libération, les rayonnements vont traverser la matière selon leur capacité puis, entrer en interaction avec les molécules et les atomes qui la composent.

C'est pourquoi les rayonnements émis par les radionucléides sont dits ionisants car ils peuvent arracher des électrons aux atomes de la matière qu'ils rencontrent, conduisant à l'ionisation ainsi qu'à l'excitation de ces derniers. L'impact des rayonnements sur la matière va être particulièrement important lorsque leur source est internalisée dans l'organisme. Par exemple, il sera très facile de se protéger du rayonnement d'un radioélément émetteur de rayons  $\alpha$  à l'extérieur du corps avec une combinaison ou un masque. Par contre, si le même nucléide est ingéré accidentellement, toute l'énergie qu'il dégage reste à l'intérieur du corps et même du tissu où il s'est déposé (IRSNb, [www.irsn.fr](http://www.irsn.fr)).



**Figure II-2** : Limites de la trajectoire des rayons  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  en interaction avec la matière.  
(© wikibook)

## 2. Effets biologiques des rayons ionisants

Les expériences en laboratoire classiques ont permis de mettre en lumière les conséquences des interactions des rayonnements ionisants avec les cellules vivantes. Ces interactions peuvent entraîner la cassure directe des biomolécules traversées tels que les acides nucléiques (cassures simple brin (SSB) ou double brin (DSB)), les protéines et les lipides ou leur rupture indirecte via des radicaux produits par la radiolyse de l'eau. La

radiolyse est un phénomène qui se produit quand une radiation cause une décomposition chimique de l'eau (H<sub>2</sub>O), soit par excitation électronique, soit par ionisation. Lors de l'excitation, les électrons rentrent dans des états énergétiques modifiés, ce qui provoque la rupture des liaisons covalentes, créant ainsi des radicaux qui emportent avec eux un électron célibataire. Ces radicaux libres (appelés «reactive oxygen species» (ROS)) sont très réactifs: OH• étant un puissant oxydant et H• un puissant réducteur. La radiolyse de l'eau est un phénomène majeur étant donné que dans une cellule il y a environ 10<sup>12</sup> molécules d'eau, 10<sup>9</sup> macro-molécules constituant les membranes et divers organites pour une seule molécule d'ADN. Traduit en termes de probabilité d'interaction entre molécule et rayonnement ionisant au sein d'une cellule, l'eau est de très loin dominante avec 1000 fois plus de molécules d'eau que de macromolécules. Par contre, un seul dommage sur une molécule d'ADN peut impacter toute la vie cellulaire (cause d'apoptose ou de mutation) voire de sa descendance.

Les organismes vivants ont développé des mécanismes de résistance pour se protéger des effets néfastes à la suite de l'exposition radioactive. Ces mécanismes incluent des systèmes de réparation de l'ADN, des systèmes de défense antioxydante et de production de métabolites secondaires. On retrouve ces mécanismes de résistance aux rayonnements radioactifs chez des organismes appartenant aux trois domaines du vivant (bactéries, archées et eucaryotes) (Reisz et al., 2014; Debousky et al., 2015; Jung et al., 2017). Par exemple, *Deinococcus radiodurans* possède des systèmes de réparation de l'ADN (recombinaison homologue, etc.), des enzymes spécialisées dans l'élimination des radicaux libres provenant de la radiolyse ainsi qu'un système de transport et d'expulsion de nucléides endommagés (Vukovic-Nagy et al., 1974; Cox & Battista 2005; Krisko & Radman, 2013). Toutefois, une mauvaise réparation des lésions peut entraîner des mutations qui sont des changements dans la séquence génomique des organismes.

La fréquence des mutations ou des autres effets négatifs des rayons ionisants est influencée par plusieurs facteurs, certains directement liés au rayonnement lui-même, d'autres à la cellule. En effet, les photons des rayons  $\gamma$ , tout comme les rayonnements  $\beta$ , sont globalement moins radiotoxiques pour la cellule que des particules lourdes (protons, neutrons et rayonnements  $\alpha$ ) qui, bien qu'arrêtés par une feuille de papier, peuvent être excessivement dangereux dès lors qu'ils pénètrent un organisme (ingestion ou absorption

par exemple). Également, le débit de dose peut jouer sur la gravité des effets (Hall, 1972). Une même dose délivrée pendant un temps très court ou bien étalée sur une longue période n'aura pas les mêmes conséquences car les mécanismes de réparations propres à la cellule auront davantage de temps pour intervenir. Plus globalement, la dose absorbée de rayonnements ionisants reçue est en corrélation directe avec les effets produits (Morgan et al., 1996). A titre d'exemple, Forster et al. (2002) fait le lien entre des niveaux élevés de bruits de fond radioactifs et les grandes fréquences de mutations mesurées parmi des populations humaines de l'état du Kerala, en Inde. Dans cette région, le rayonnement biologique reçu par la population est 10 fois supérieur à la moyenne mondiale. On peut aussi citer une étude sur des conséquences de l'accident nucléaire de Tchernobyl qui a montré que les espèces d'oiseaux avaient des sensibilités différentes aux rayonnements ionisants. En effet, certaines espèces d'oiseaux avaient des densités de population similaires, que ce soit dans les zones où les niveaux de radioactivité sont faibles ou élevés suite à l'accident, tandis que d'autres espèces présentaient des densités réduites dans les zones avec des bruits de fond radiatifs élevés (Møller & Mousseau, 2013). Selon Møller & Mousseau (2007; 2013), Møller et al. (2010), cela résulte du fait que les espèces ont différents seuils de sensibilité aux rayons ionisants.

### **3. Effet de faibles doses de rayons ionisants sur les organismes**

Si les bruits de fond radioactifs élevés ont un effet néfaste avérés sur les cellules, beaucoup de questions demeurent sur l'effet de faibles doses ou faibles bruits de fonds radioactifs. Les faibles doses correspondent à des doses inférieures à 100 mGy (mSv) (Morgan & Bair, 2013). Leurs effets sont prédits à partir de l'extrapolation des données obtenues après exposition à de fortes doses de rayons ionisants. Mais la validité de cette extrapolation pose question. En effet, les faibles doses peuvent aussi affecter la fréquence de mutations des organismes exposés et par conséquent modifier la constitution génétique et la composition des populations. Galván (2014) rapporte une adaptation des oiseaux aux faibles doses de rayonnements ionisants autour de la zone de Tchernobyl par la synthèse de glutathion, un antioxydant. Par ailleurs Castillo et al. (2015) ont mis en évidence que lorsque les cellules des espèces bactéries *Shewanella oneidensis* et *Deinococcus radiodurans* sont exposées à des débits de dose  $\gamma$  de  $0,16 \text{ nGy}\cdot\text{h}^{-1}$ , soit environ

400 fois moins que le rayonnement de fond normal, la croissance et la survie des organismes peuvent être réduites. Ces résultats suggèrent donc que des niveaux de rayonnements inférieurs au bruit de fond peuvent induire une réponse au stress dans les cellules. D'autres études ont montré que les rayons ionisants ont également des effets indirects (dits secondaires) sur les cellules (Morgan & Sowa, 2007; Desouky et al., 2015). Dans leurs expériences, Nagasawa & Little (1992) et Nagasawa et al. (2005) ont irradié des cellules ovariennes de souris ou des fibroblastes de hamster avec de faibles doses de rayonnements ionisants (débit de dose de  $14.7 \text{ cGy.min}^{-1}$  ou  $8.3 \text{ cGy.min}^{-1}$ ) et ont observé que les cellules voisines non irradiées répondaient également au stress en activant leur mécanisme de défense (réparation de l'ADN par recombinaison homologue). Cela démontre premièrement que les faibles doses ont un effet mesurable sur les cellules. Et deuxièmement, cet effet a une portée à l'échelle individuelle mais aussi à l'échelle de la population cellulaire, même pour les cellules qui ne subissent pas directement le stress.

De telles expériences en laboratoire sont essentielles pour comprendre les effets mécanistiques des faibles doses mais ont toutefois leurs limites. Dans l'environnement, les organismes sont exposés à de faibles doses chroniques et non à des doses aiguës comme en laboratoire. Cela donne à la cellule le temps de réagir et de s'adapter aux doses reçues de façon prolongée (Morgan & Bair, 2013). Les effets à l'échelle de la population cellulaire ont également des conséquences sur la population d'espèces. En effet, les organismes font partie d'un ensemble qui présente différentes échelles écologiques tels que la population, la communauté et l'écosystème (Chapin et al., 2002). Il est important de comprendre l'effet de faibles doses chroniques de radioactivité à différentes échelles écologiques. Effectivement, un facteur de stress tel que la radioactivité peut déclencher des effets non linéaires dans la structure et la fonction de l'écosystème. Ces effets ne peuvent être prédits uniquement à partir d'observations sur les organismes individuels (Bradshaw et al., 2014). L'intérêt des analyses de terrain est qu'elles permettent d'appréhender différents scénarios d'exposition réalistes et de déterminer l'influence écologique des rayonnements ionisants, en interaction avec d'autres facteurs environnementaux, sur les populations naturelles (Brechignac et al., 2016). Ces scénarios peuvent être relatifs à des contextes d'exposition naturelle ou de contamination de l'environnement où les populations naturelles peuvent être exposées depuis de courtes ou de longues durées. En effet, les organismes vivants se sont développés en présence de radioactivité variable depuis leur



apparition sur Terre (Martell, 1992; Garzón & Garzón, 2001), et il apparaît légitime de se demander si ceux qui sont exposés depuis de très longues périodes au bruit de fond (passé de 1,6 mGy.an<sup>-1</sup> à 0,66 mGy.an<sup>-1</sup> en 4 milliards d'années) se sont pleinement adaptés à ces conditions ou s'ils continuent à être façonnés par ce stress bien qu'il soit de faible niveau (Lampe et al, 2019).

## **4. Influence de la radioactivité et d'autres facteurs (abiotiques et biotiques) dans les biotopes aquatiques continentaux**

### **4.1. Variation du bruit de fond radioactif à la surface de la Terre : cas des NORM («Naturally Occurring Radioactive Material»)**

Sur Terre, les niveaux de bruit de fond radioactif ont toujours varié spatialement et temporellement à sa surface. Les débits de dose de bruit de fond typiques varient entre 0,01 à 0,30  $\mu\text{Sv.h}^{-1}$  où le Sievert (Sv) (unité de mesure des doses équivalente et efficace) permet de mesurer la dose absorbée par irradiation corrigée de l'effet des différents types de rayonnements sur les êtres vivants. Cependant, dans certaines zones, le bruit de fond radioactif est beaucoup plus élevé: à Ramsar en Iran, le bruit de fond radioactif naturel atteint en moyenne 29,7  $\mu\text{Sv.h}^{-1}$ , mais aussi 22  $\mu\text{Sv.h}^{-1}$  au Brésil, 10  $\mu\text{Sv.h}^{-1}$  en France, 4  $\mu\text{Sv.h}^{-1}$  en Inde (Al-Khawlanly et al., 2018). Ces niveaux naturels sont cependant encore 20 fois inférieurs aux niveaux de rayonnement atteints dans certains secteurs de la zone d'exclusion autour de la centrale de Tchernobyl. Le bruit de fond radioactif peut aussi être modifié par une activité humaine comme c'est le cas pour l'exploitation minière d'uranium. Märten et al. (2015) ainsi que Martin et al. (2020) montrent que cette exploitation, dans des mines en Australie et en France, ont renforcé le bruit de fond radioactif ambiant. Ainsi, le bruit de fond radioactif peut être aussi modifié par un événement catastrophique (accident nucléaire) ou par des activités anthropiques de façon durable.

Si on pense souvent à la radioactivité artificielle tels que les accidents nucléaires de Tchernobyl (1986), de Fukushima (2011), aux essais nucléaires français dans le désert du

Sahara algérien puis dans le Pacifique, aux déchets provenant du fonctionnement des centrales nucléaires, ou encore aux irradiations à visée médicale pour la radiothérapie, il existe de très nombreuses sources naturelles de radioactivité. Effectivement, des radionucléides peuvent être générés par les rayons cosmiques dans l'atmosphère. Ils sont aussi abondamment présents dans le manteau et dans la croûte terrestre.

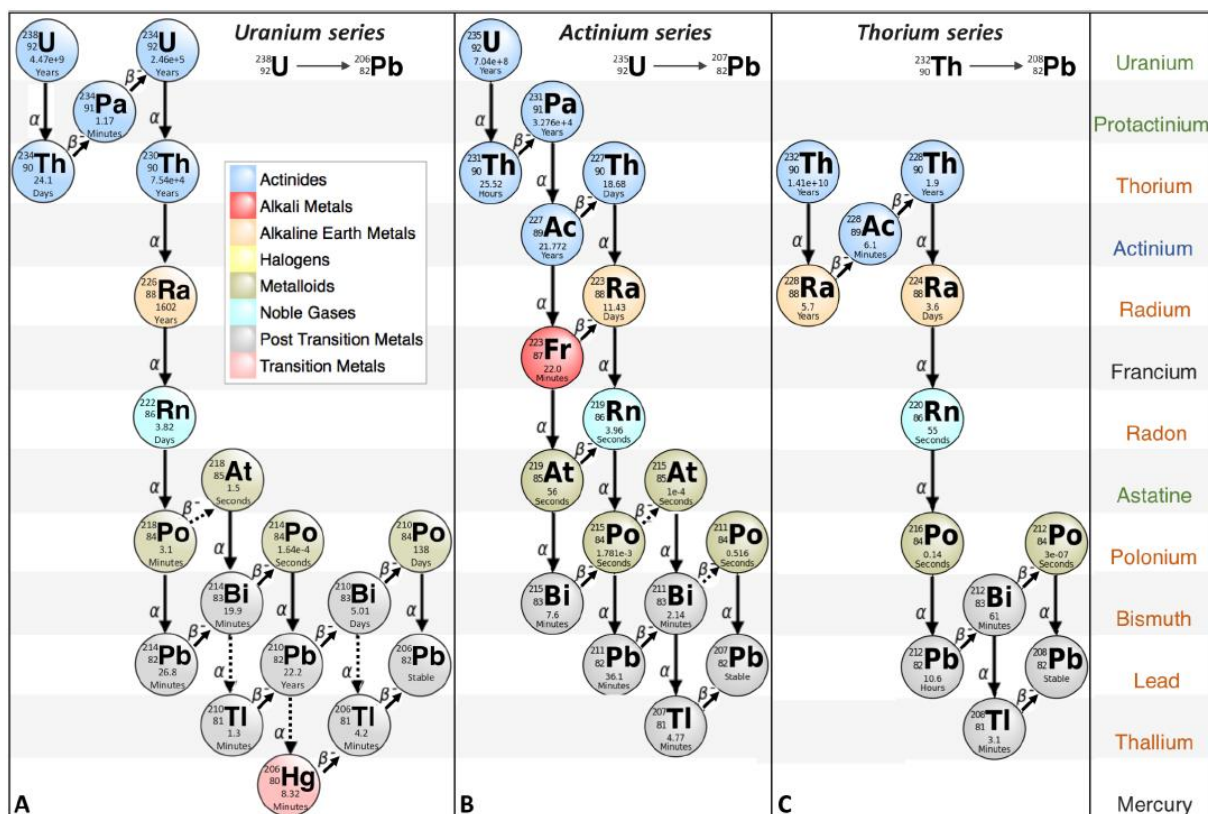
L'uranium 238 ( $^{238}\text{U}$ ) et l'uranium 235 ( $^{235}\text{U}$ ) sont les isotopes d'uranium naturels les plus abondants dans la croûte terrestre (99,28 % et 0,72 % de l'uranium total respectivement). Avec des concentrations pouvant aller de 40 à 60 %, on les retrouve dans des roches tels que les granites, les roches métamorphiques, les sables de monazite mais aussi dans des minerais comme l'uranite, la carnotite, la pechblende et la parsonsite (Cothorn & Lappenbusch, 1993; CEA, 2017). Le thorium 232 ( $^{232}\text{Th}$ ) est 3 à 4 fois plus abondant que l'uranium dans la croûte terrestre. Il est présent dans les granites, dans les basaltes et dans les roches sédimentaires (Henner, 2002). Les roches et les minerais contenant ces éléments radioactifs sont désignés comme «Matériaux naturellement radioactifs» ou «Naturally Occuring Radioactive Materials» (NORM).

Les radionucléides contenus dans ces matériaux et leurs radionucléides «fils» (section 1) vont être présents dans la nature. Ces chaînes sont bien connues et l'ordre de désintégration est immuable (Fig. I-3). Des facteurs géologiques (dynamique des gaz, hydrodynamisme, etc.), la solubilité et la demi-vie des radionucléides vont influencer leur distribution dans la nature. Ils peuvent être transportés à des kilomètres de leur minerai d'origine par des flux d'eau ou par diffusion dans un aquifère (Marikos et al., 1987). Ce phénomène peut conduire à l'émergence de sources d'eau dites «radioactives». Ces eaux vont être enrichies en différents éléments naturellement radioactifs. Dans les sources, on retrouve majoritairement  $^{238}\text{U}$  et ses descendants (le radium 226 ( $^{226}\text{Ra}$ ), le radon 222 ( $^{222}\text{Rn}$ ), le polonium 210 ( $^{210}\text{Po}$ )) (Eróss et al., 2018; Rihs et al., 2000; Morais et al., 2022).

#### **4.1.1. Les sources minérales : des écosystèmes impactés par les NORM**

Il existe différents types de sources, depuis des sources peu minéralisées dites «banales» en tête de bassin versant jusqu'aux sources minérales. Ces eaux souterraines

proviennent principalement des précipitations météoriques qui vont recharger les aquifères locaux et régionaux en s'infiltrant dans le sol le long de cassures géomorphologiques (Stevens, 2020). On estime leur nombre à environ 60 millions (Cantonati et al., 2012) sur toute la planète. Les sources constituent un environnement particulier qui a été diversement classé en fonction de l'hydrologie, de la géologie, de l'hydrochimie, de la température de l'eau, des assemblages biologiques et également des utilisations humaines telles que l'eau en bouteille et les traitements de santé/bien-être (Glazier, 2009; Olivier et al., 2011; Glazier, 2014; Stevens et al., 2021). Il est bien connu que les sources fournissent une ressource en eau potable, et qu'elle sont également mises à profit pour les activités agricoles et industrielles. Elle sont donc importantes d'un point de vue économique (Cantonati et al., 2012).



**Figure I-3:** Chaînes de désintégration de (a) l'uranium 238, (b) l'uranium 235 et (c) du thorium 232. Le nom complet de chaque élément est écrit dans la colonne à droite. Illustration tirée de Tan (2016).

Les sources minérales apparaissent dans des conditions hydrogéologiques variées, liées aux activités volcaniques et tectoniques (actuelles ou quiescentes), et de nombreuses émergences coïncident avec les zones de failles et se forment donc là où l'eau souterraine émerge à la surface de la Terre (Waring, 1965; Risler, 1974; Curewitz & Karson, 1997; Rowland et al., 2008; Keegan-Treloar et al., 2022). Les sources peuvent apparaître en milieu continental mais également en milieu marin. Leurs caractéristiques sont très variables d'une source à l'autre en termes de type, taille, isolement, densité dans le paysage, assemblages biologiques, température de l'eau, utilisations et valorisations humaines, etc. (Stevens, 2020; Glazier, 2009; Olivier et al., 2011; Glazier, 2014; Stevens & al., 2021). Par exemple, il existe des sources chaudes (avec une température supérieure à la moyenne des températures locales de l'air ( $<36,7$  °C) et des sources thermales avec une température  $>36,7$  °C (Pentecost et al., 2003). La température des sources minérales va dépendre de la profondeur d'origine de l'eau et des potentiels mélanges avec les eaux de surface.

Les sources ont toujours joué un rôle majeur dans l'évolution humaine et culturelle (Haynes, 2008 citée dans Stevens, 2020; Cuthbert et al., 2014). L'intérêt pour les sources, dont il reste des témoignages écrits, remonte à environ 330 avant notre ère, où Aristote émettait des hypothèses sur des sources souterraines de Grèce (Stevens, 2020). Dans ses livres d'histoire naturelle, Pline l'ancien (77 après JC) présente les différentes flores qui leur sont associées mais également les potentielles vertus curatives des sources (eaux qui préservent de l'avortement, eaux qui guérissent les plaies, ...) (Bruère, 1953; Stevens, 2020). Cependant, les bases de la recherche sur ces environnements semblent avoir été posées par Perrault en 1674, avec un renforcement des recherches sur l'hydrologie des sources au cours du 20<sup>ème</sup> siècle (Stevens, 2020) bien qu'elles continuent d'apparaître très rarement sur les cartes et les inventaires du paysage.

D'un point de vue écologique, ce sont des écosystèmes considérés comme des hotspots de biodiversité qui abritent des espèces rares, endémiques et souvent menacées (Cantonati et al., 2007 ; Martens et al., 2010 ; Cantonati et al., 2012 ; Cartwright et al., 2020 ; Stevens, 2020 ; Beauger, 2021 ; Stevens, 2021). Elles sont reconnues parmi les écosystèmes terrestres les plus insulaires (Odum, 1957 ; Cantonati et al., 2012). Elles peuvent être des habitats stables à long terme dans lesquels les processus évolutifs de

sélection naturelle, d'isolement et d'adaptation viennent modéliser l'assemblage des espèces locales et où les différentes espèces interagissent à des degrés divers par le biais de différentes relations écologiques (compétition, symbiose, prédation, etc.). Leur structure trophique peut varier de système simple avec quelques espèces à des systèmes plus complexes (Odum, 1957; Stevens, 2020). Toutefois, dans les sources minérales, la chaîne trophique reste courte avec essentiellement des communautés bactériennes et des microalgues (diatomées majoritairement).

Le terme «écosystème ascendant» leur est attribué car leur existence et leur structure découlent de processus physiques liés à l'eau souterraine (Stevens, 2020). En effet, si les caractéristiques radiologiques des sources dépendent de la nature des terrains géologiques traversés par l'eau en émergeant à la surface et de la profondeur d'origine de l'eau, ces paramètres vont également affecter leurs propriétés physico-chimiques (composition ionique, température, conductivité, pH). L'enrichissement en radionucléides dans les sources contribue au renforcement naturel du bruit de fond radioactif dans l'environnement où se situent les sources. Ainsi, il est pertinent de s'intéresser aux sources minérales en tant qu'écosystème pour étudier les biocénoses exposées aux niveaux de radioactivité renforcés sur une longue période de temps. Cependant, ce ne sont pas les seuls environnements où la radioactivité naturelle peut être renforcée.

## **4.2. Variation du bruit de fond radioactif à la surface de la Terre : cas des TE-NORM**

### **4.2.1. Les sites d'anciennes mines impactés par les TE-NORM**

La modification du bruit de fond radioactif peut être également liée à l'accumulation de matériel naturellement radioactif dans l'environnement par une activité telle que l'exploitation minière. En effet, l'extraction et le traitement de minerai vont exposer et concentrer les NORM dans l'environnement. Dans ce contexte, les matériaux exposés sont désignés par le terme «Matériaux naturellement radioactifs technologiquement renforcés» ou «Technologically Enhanced Naturally Occurring Radioactive Materials» (TE-NORM). L'exploitation minière en roche dure est particulièrement concernée par l'exposition de TE-NORM.

Selon l'association mondiale du nucléaire (World Nuclear Association), c'est au cours des années 60 que l'uranium est devenu l'un des minéraux énergétiques les plus importants au monde. Ce minerai est utilisé dans le développement des armes atomiques, le fonctionnement des centrales nucléaires nécessaires pour produire de l'énergie mais également dans le milieu médical. Certaines mines ont des teneurs en uranium pouvant aller jusqu'à 20% comme c'est le cas de quelques mines du Canada, par exemple. Des mines d'uranium sont exploitées dans une vingtaine de pays. Cependant, en 2020, plus de 50% de la production d'uranium provenait de seulement 10 mines réparties dans cinq pays (Canada, Kazakhstan, Namibie, Australie, Niger). Il existe deux types de mines : les mines à ciel ouvert et les mines souterraines. Lorsque les corps minéralisés se trouvent à faible profondeur ou sont à découvert, ils sont accessibles pour une exploitation à ciel ouvert. Dans ce cas, il y a l'aménagement d'une grande fosse, l'enlèvement de beaucoup de roches non-radioactives associées au minerai et de nombreux stériles (produits faiblement radioactifs issus de l'excavation des roches lors de l'exploitation minière). Lorsque les corps minéralisés sont plus profonds, l'exploitation minière se fait dans un contexte souterrain. Cela implique généralement la construction de puits d'accès, de tunnels, et potentiellement moins de stériles sont enlevés. Les mines conventionnelles disposent d'un broyeur où le minerai est concassé et broyé pour libérer les particules minérales, puis lessivé dans des réservoirs avec de l'acide sulfurique pour dissoudre les oxydes d'uranium. La solution est ensuite traitée pour récupérer l'uranium. Parfois, un processus d'enrichissement physique est utilisé pour concentrer le minerai et augmenter sa teneur avant le traitement chimique. Que ce soit dans le cas des mines à ciel ouvert ou souterraines, des volumes substantiels de roches stériles et d'excavations sont exposés dans l'environnement. Ceux-ci sont utilisés pour la réhabilitation des sites d'anciennes mines, façonnés et végétalisés là où ils se trouvent. Cependant, les minéraux d'uranium sont toujours associés à d'autres éléments radioactifs tel que le radium qui résultent des désintégrations radioactives de l'uranium sur des périodes géologiques (section 1.4.1., Fig. I-3). Les déchets solides issus de l'opération de broyage sont des résidus dont les caractéristiques vont des boues aux sables grossiers. Ils comprennent la majeure partie du minerai d'origine et sont également associés à de la radioactivité. L'exploitation minière est généralement considérée comme une utilisation temporaire des terres et, une fois terminée, la zone contenant des stériles, des roches associées au minerai et des

résidus, est recouverte et doit être laissée apte à d'autres utilisations ou à son utilisation d'origine. La gestion des résidus et des eaux de ruissellement, tout comme la réhabilitation des terres sont soumises à la réglementation et à l'inspection du gouvernement notamment du ministère de l'Environnement. Néanmoins, la présence d'éléments radioactifs sur les sites constitue une source de contamination pour les biocénoses à plusieurs échelles.

#### **4.2.2. Les zones humides : des écosystèmes témoins du passé minier**

A proximité des anciens sites miniers, il peut exister des zones humides, ou « wetlands » en anglais. Il s'agit d'habitat où les sols sont saturés d'eau de manière saisonnière ou permanente car la nappe phréatique est presque au niveau de la surface du sol, et, où une végétation adaptée s'est développée (Collin, 2004). Un espace est considéré comme une zone humide par l'article L.211-1 du code de l'environnement dès qu'il présente l'un des critères suivants précisés par l'arrêté du 1 octobre 2009: si les sols correspondent à un ou plusieurs types pédologiques caractéristiques des zones humides ; et/ou si sa végétation est caractérisée par des espèces indicatrices de zones humides ou par des habitats caractéristiques de zones humides. Le terme de zone humide regroupe des milieux très variés, tels que les tourbières, les prairies humides ou encore les marais, qui sont soumis à une pression anthropique importante (Institut français de l'environnement, 2002).

Ces zones sont de potentiels pièges physiques à particules (éléments toxiques) et à métaux. De nombreuses études ont en effet trouvé des concentrations en uranium très élevées dans les zones humides, allant jusqu'à plusieurs milliers de  $\text{mg.kg}^{-1}$ . Ces mesures ont été enregistrées dans des zones affectées par des activités minières (Li et al., 2014; Mangeret et al., 2018; Schöner et al., 2009; Wang et al., 2014). Dans leur étude sur des zones humides naturelles situées dans d'anciennes zones d'extraction d'uranium en Allemagne, Schöner et al. (2009), rapportaient que de l'uranium était retenu dans les zones humides sous une forme chimique chélatée à la matière organique ou soluble dans de l'acide humique. Les mécanismes de piégeage et d'accumulation de l'uranium sont en cours d'exploration, de même que la stabilité à long terme des espèces d'uranium

présentes dans les substrats des zones humides. De cet état de fait, il résulte que les organismes habitant les zones humides affectées par le relargage de radionucléides sont particulièrement exposés à ces derniers.

## **5. Les organismes utilisés pour étudier les effets de faibles bruits de fond radioactifs en milieu aquatique**

Si, généralement, les études sur des environnements aquatiques concernent les zones de Tchernobyl ou encore de Fukushima, qu'en est-il de la recherche de l'influence de faibles bruits de fond sur les biocénoses aquatiques ? Très peu d'études ont été menées sur l'influence de faibles bruits de fond radioactifs sur les organismes aquatiques et il s'agit majoritairement d'études en laboratoire (Sazykina & Kryshev, 2003).

Jha et al. (2005) ont démontré que les débits de dose inférieurs à  $500 \mu\text{Gy}\cdot\text{h}^{-1}$  avaient pu induire des dommages génétiques chez les moules. Kudryashev (2015) a mis en évidence que des bactéries bioluminescentes avaient une réponse adaptative (effet d'hormèse) suite à l'exposition à de faibles doses de rayonnements  $\alpha$  et  $\beta$ . Cassidy et al. (2007) suggèrent que les cellules de saumon sont moins sensibles aux faibles doses de rayonnement  $\gamma$  que les cellules humaines et de mammifères. Song (2020) a étudié l'effet de faibles doses de rayonnement  $\gamma$  sur le métabolisme des daphnies (*Daphnia magna*) et a montré que de multiples voies de toxicité sont impliquées dans la réponse aux rayons ionisants tels que l'hyperpolarisation mitochondriale. Bolsunovsky et al. (2017) ont observé que la croissance de l'élodée (*Elodea canadensis*) est réduite par de faibles doses de rayonnement  $\gamma$ . Enfin, dans un contexte différent, Murphy et al. (2011) ont démontré que les faibles doses de radioactivité dans les lacs contaminés de Tchernobyl n'ont pas d'effet sur la diversité des communautés d'invertébrés.

Concernant les sources minérales, Lovrić & Strohal (1972) ont analysé les quantités de radionucléides accumulés chez quelques espèces d'escargots et d'algues dans des sources chaudes radioactives en Yougoslavie tandis que Anitori et al. (2002) ont étudié la diversité communautés bactériennes d'une source chaude riche en radon d'Australie et n'ont pas reporté la présence de bactéries connues pour être résistantes à



la radioactivité. Puis, en milieu marin, Charmasson et al. (2009) se sont intéressés aux organismes pluricellulaires (mollusques, vers, etc.) dans les cheminées hydrothermales profondes (Pacifique et Atlantique) qui présentent des niveaux de radioactivité élevés. Tazaki (2013) a étudié la biominéralisation bactérienne de l'uranium dans différents environnements au Japon telles que des sources chaudes radioactives.

Ainsi, peu d'études ont été réalisées sur l'effet de faibles bruits de fond radioactifs naturels sur la diversité des communautés aquatiques. Pourtant, l'utilisation d'organismes modèles telles que les bactéries ou les microalgues qui appartiennent à des domaines ou des groupes d'organismes bien représentés dans les environnements aquatiques est intéressante pour les études de terrain car cela permet de caractériser les doses reçues par les biotes (Bradshaw et al., 2014). Cette approche permet aussi de comparer les différents scénarios d'exposition et de disposer d'informations complémentaires sur l'exposition des organismes à la radioactivité. Ainsi, dans le cadre de ma thèse, nous proposons d'utiliser des algues microscopiques, les diatomées, en tant que modèle pour étudier l'effet de faibles bruits de fond radioactifs sur les biocénoses.

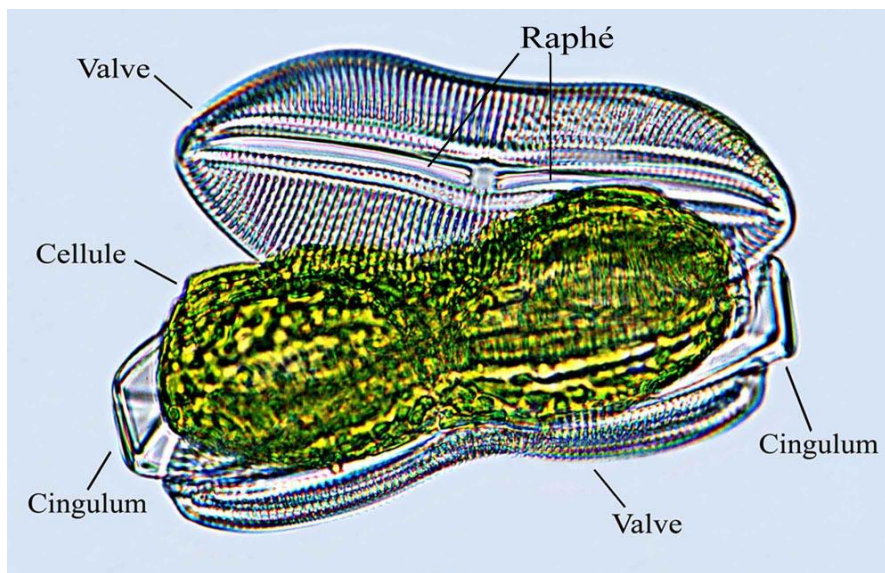
## **6. Les diatomées: organismes modèles pour étudier l'influence d'un stress environnemental**

### **6.1. Caractéristiques générales des diatomées**

Les diatomées ou Bacillariophyta sont des eucaryotes unicellulaires classés dans le groupe des protistes ou des microalgues. Ces organismes sont photosynthétiques. Ils sont constitués d'une cellule protégée par une enveloppe en silice, le frustule (Fig. I-4). Cette enveloppe se présente comme une boîte avec un fond et un couvercle appelés valves. Ces valves possèdent une forme et des ornements spécifiques à chaque espèce et indépendantes du cycle de développement. Ces caractéristiques permettent d'identifier plus facilement les espèces lors des analyses. A ce jour, il existe environ 100 000 espèces connues (et plus de 780 genres) (actuelles et passées) dans les eaux douces et saumâtres (Mann & Vanormelingen, 2013).

## 6 .2. Les diatomées, des organismes modèles

Les diatomées sont des organismes modèles pour étudier l'influence du stress environnemental. Si on les retrouve dans le sol, un fort intérêt est porté pour les diatomées des milieux aquatiques. Ces organismes sont importants d'un point de vue écologique car ils font partie du groupe des producteurs primaires (20 % de la production d'O<sub>2</sub> atmosphérique) et jouent un rôle essentiel dans les réseaux trophiques en étant à la base de la chaîne alimentaire (Mayer & Likens 1987).



**Figure I-4** : Photographie d'une diatomée dont le frustule s'est ouvert et laisse apparaître la cellule à l'intérieur. (©www.diatomloir.eu)

Comme beaucoup de microorganismes, ils régulent les cycles biogéochimiques. D'ailleurs, dans la plupart des environnements aquatiques, les biofilms sont dominés par les diatomées. Avec un temps de génération court (quelques heures à quelques jours selon les espèces), ils réagissent rapidement à tout changement des conditions environnementales et sont classiquement utilisés comme indicateurs. De plus, les diatomées sont un constituant extrêmement important du périphyton et de nombreux indices, basés sur ces organismes, ont été proposés pour la biosurveillance de

l'eutrophisation et des polluants (NF T 90-354, Afnor 2014). En effet, leur sensibilité au stress environnemental est spécifique à chaque espèce. De plus, le frustule peut se déformer sous l'effet des pollutions par des métaux lourds et la fréquence d'individus déformés dans les communautés de diatomées est un critère qui permet d'obtenir une information temporelle et quantitative sur la contamination (Lavoie et al., 2017, Falasco et al., 2021).

En outre, les frustules peuvent être préservés dans les sédiments si les conditions sont favorables et enregistrer conséquemment l'histoire de l'habitat (modifications des conditions physico-chimiques de l'eau, hauteur d'eau, etc.) (Stevenson et al., 2010).

Un autre argument soulignant l'intérêt des diatomées comme organismes modèles est que ces microalgues sont connues pour absorber de plus grandes concentrations de radionucléides que la plupart des autres organismes à exposition égale (Coughtrey & Thorne, 1983; Snoeijs & Notter, 1993). L'influence de la radioactivité sur les diatomées peut être étudiée à trois niveaux d'organisation écologique : individuel, populationnel et communautaire (Stevenson, 2014; Pandey et al., 2017). La communauté de diatomées regroupe l'ensemble des espèces de diatomées ayant colonisé un habitat. Les espèces composant la communauté relative à un habitat sont les plus adaptées et les plus représentatives des conditions du milieu parce qu'elles ont été sélectionnées par ces dernières (Keddy, 1992).

### **6.3. Les facteurs influençant les diatomées dans les environnements aquatiques**

Dans les différents biotopes telles que les sources minérales ou les zones humides, les diatomées vont être affectées par différents paramètres ou facteurs. Ces paramètres vont donc moduler la composition des communautés et leurs activités. Il s'agit principalement de la luminosité, de la vitesse du courant, des nutriments disponibles, de la température, du pH mais également des interactions avec les autres organismes.

- La luminosité:

La lumière est un facteur essentiel dans les systèmes aquatiques. Elle peut pénétrer l'eau jusqu'à une profondeur de 200 m au plus selon la turbidité de l'eau (la lumière bleue va pénétrer plus loin si la turbidité est faible avec une longueur d'onde de 380 et 450 nm). Ce paramètre fluctue notamment en fonction des saisons. C'est un facteur important pour les organismes photosynthétiques et donc pour la production primaire (Rich & Maier, 2015). La fluctuation et la qualité de la lumière vont induire des changements de photosynthèse. Une variation dans la photosynthèse induit potentiellement des changements dans la croissance et la structure des communautés. Selon les espèces de diatomées, les différentes réponses à la luminosité vont être associées aux divers pigments photosynthétiques et aux membranes. La plupart des taxons semblent avoir un optimum de croissance à certaines intensités lumineuses propre à chaque espèce (Lavoie et al., 2010).

- La vitesse du courant:

La vitesse du courant va affecter les communautés benthiques car il peut, par sa force, détacher le biofilm de son support. Cela peut également dépendre de l'âge du biofilm. Le courant exerce un renouvellement constant du milieu en oxygène (O<sub>2</sub>) et en substances nutritives qui sont essentiels pour les organismes. On distingue les espèces limnophiles qui se développent dans des eaux plutôt calmes des espèces rhéophiles davantage présentes dans les eaux courantes.

Comme pour les macroinvertébrés, la capacité des algues à rester attachées au substrat lors d'une perturbation causée par le débit varie en fonction de l'efficacité de leur mode de fixation au substrat mais aussi de leur taille et de leur morphologie (Lavoie et al., 2010). Certaines diatomées ont développé des adaptations afin de pouvoir résister à des courants rapides en produisant un mucilage afin de s'accrocher à leur support. Les *Cocconeis* et les *Cymbella* sont reconnues pour leur grande résistance au courant (Cox, 1996).

- La température:

La température influence plusieurs paramètres physico-chimiques de l'eau (par exemple : l'oxygène dissous, la viscosité de l'eau, la solubilité et la diffusion des

composantes chimiques, les nutriments, la conductivité), ce qui rend le rôle de cette variable plutôt difficile à étudier de façon indépendante (Lavoie et al., 2010). Des températures élevées auront tendance à diminuer la concentration en O<sub>2</sub> dans l'eau. En effet, si on se réfère au taux d'oxygène dissous à saturation, valeur qui indique la concentration d'oxygène dissous dans l'eau à l'équilibre avec l'air atmosphérique à pression barométrique normale, on sait que ce taux vaut 14,6 mg.L<sup>-1</sup> à 0 °C mais plus que 8,3 mg.L<sup>-1</sup> à 25 °C (Truesdale et al., 1974).

Certaines espèces de diatomées sont inféodées à des eaux froides et d'autres comme *Craticula lecohui* vont se développer dans les eaux de sources minérales très chaudes (>50°C) (Beauger et al., 2017). Enfin, il est bien connu que ce paramètre influence la multiplication et le métabolisme cellulaire des diatomées (Lavoie et al., 2010).

- Le pH:

Le pH est une variable qui a une influence importante sur la composition taxonomique quel que soit le groupe considéré. Ainsi, les espèces présentes en milieu acide, comme la majorité de celles du genre *Eunotia*, ne seront pas celles retrouvées en milieu basique (Lange-Bertalot et al., 2011). Le pH contrôle plusieurs processus chimiques et biochimiques telles que la disponibilité des nutriments, l'activité d'enzymes, etc. Chez les diatomées, il joue un rôle important au niveau de la production d'énergie par la chaîne respiratoire, de la perméabilité membranaire et des échanges (Lavoie et al., 2010).

- Les substances dissoutes:

Les substances dissoutes peuvent correspondre à la fois à des substances inorganiques naturellement rencontrées dans l'eau (calcium, lithium, magnésium, bore, etc.) et à des contaminations ou pollutions de l'eau (matière organique, pesticides, métaux lourds, etc.). Chaque organisme a des exigences propres en ce qui concerne sa tolérance à la quantité de substances dissoutes et donc à la salinité. Par exemples, certaines espèces ne supportent généralement pas des quantités ou des variations importantes en sels dissous (De Villers et al., 2005), contrairement à d'autres espèces adaptées à des milieux très minéralisés comme les sources minérales. Certaines espèces telles que *Crenotia thermalis* ou *Navicula sanctamargaritae*, vont se développer uniquement dans les sources minérales

(Beauger et al., 2015; 2020; Lai et al.2019). La conductivité électrique (EC) est un paramètre qui permet de déterminer la minéralisation de l'eau. Mesurée, il s'agit d'une expression numérique de la capacité d'une solution à conduire le courant électrique. La plupart des sels minéraux en solution sont de bons conducteurs. Plus la conductivité est importante, plus l'eau est chargée en sels (De Villers et al., 2005).

- Le substrat :

Le substrat est également un élément qui peut affecter les communautés dans les écosystèmes aquatiques. Certaines espèces peuvent coloniser n'importe quel type de substrat allant des sédiments fins (vase, litière) aux substrats durs (galets par exemple) ou encore des substrats vivants tels que les plantes ou les animaux, alors que d'autres vont avoir des préférences strictes pour un type de substrat. Certains auteurs démontrent que les espèces de diatomées ont des préférences pour le substrat (Round, 1991) alors que d'autres auteurs concluent le contraire (Sullivan, 1982; Millie & Lowe 1983; O'Quinn & Sullivan 1983). Leur maintien sur les substrats va dépendre des capacités des organismes à se fixer sur ce dernier. Ainsi, Round (1991) a classifié les diatomées selon leur substrat préférentiel: les diatomées épilithiques se fixent sur les roches, celles qui sont épipéliques vivent sur la surface du limon, les épipsammiques ont colonisé la surface du sable, les épiphytiques vivent sur les plantes et les épidendriques sont attachées au bois.

- Le biofilm:

Les bactéries, les archées et les algues sont souvent les seuls habitants des sources (Rich & Maier, 2015). De manière générale, ces organismes peuvent créer des biofilms qui sont des communautés complexes et structurées vivant étroitement ensemble dans une matrice composée de substances polymériques extracellulaires (matrice EPS). Ces EPS sont principalement produites par des microalgues dont les diatomées (Romani, 2009; Mora-Gomez et al., 2016). Ce biofilm est surtout une structure de protection pour les organismes qui y vivent. Néanmoins, l'exposition à des substances toxiques peut altérer la physiologie et la structure des biofilms, entraînant des changements dans la fonction de l'écosystème et les relations trophiques.

Au sein des biofilms on retrouve également des relations écologiques tels que le parasitisme (interaction durable unilatérale de nature antagoniste obligatoire où le parasite dépend de son hôte pour assurer sa survie), la symbiose (interaction durable indirecte ou directe de nature bénéfique pour les deux organismes, comme par exemple les bactéries vivant sur les diatomées et constituant la phycosphère (Amin et al., 2012; Johansson et al., 2019)), la compétition (interaction indirecte ou directe de nature antagoniste qui implique une concurrence pour une ou plusieurs ressources), la prédation (interaction directe de nature antagoniste unilatéralement où une espèce prédatrice va entraîner la mort de l'espèce proie pour assurer sa survie) et la lyse virale (interaction combinant le parasitisme et la prédation où un virus (notamment des phages) prend le contrôle d'une espèce hôte pour assurer sa reproduction). Ces relations vont également influencer sur l'abondance des espèces dans les écosystèmes (Amblard et al., 1998). Ainsi, le biofilm est une structure importante dans les écosystèmes influençant la composition des communautés d'organismes dont les diatomées.

#### **6.4. Les diatomées et la radioactivité**

De rares études ont permis d'étudier l'influence de la radioactivité sur les communautés de diatomées. Ces études sont majoritairement relatives à des milieux pollués par des radioéléments naturels (TE-NORM) ou à des expériences en laboratoire. Ainsi, Gross et Koczy, (1946) (cités dans Driver, 1994) ont signalé une forte réduction de la survie des cultures de diatomées dans un milieu radioactif contenant 1 mg/L d'uranium. Par ailleurs, des études ont déjà été menées pour étudier l'impact de la radioactivité sur les communautés de diatomées dans les eaux résiduelles (Ruggles, 1979 cité dans Driver, 1994), dans les eaux saumâtres (Snoeijs & Notter, 1993) et dans les rivières (Herlory et al., 2013). Une seule étude a été réalisée en prenant en compte la radioactivité naturelle dans des sources minérales (Millan et al., 2019). Cette étude a montré que des taux élevés de déformations des frustules de diatomées benthiques sont corrélés à des niveaux élevés d'activité du radon 222 ( $^{222}\text{Rn}$ ).

Ces quelques résultats suggèrent que les diatomées peuvent résister à des niveaux élevés de radioactivité mais aucune n'a permis de définir si la radioactivité avait un effet sur la structure des communautés de diatomées.

## **7. Conclusion et présentation du projet**

Au travers de la littérature, il apparaît que la radioactivité est connue pour avoir des effets le plus souvent néfastes sur les organismes. Ces effets ont été étudiés sur différents organismes modèles et ont permis de comprendre les mécanismes cellulaires qui entrent en jeu et permettent aux cellules de résister plus ou moins aux rayons ionisants. Si les effets à fortes doses sont bien connus, les effets de faibles doses radioactives le sont moins. Or, dans l'environnement, les écosystèmes sont parfois exposés à de faibles bruits de fond radioactifs chroniques mais dont l'intensité varie. Ainsi, il y a un manque conséquent de données concernant l'influence de faibles bruits de fond sur la diversité des communautés microbiennes aquatiques et particulièrement en milieu naturel. Les études en laboratoire présentent des limites car elles ne représentent pas la réalité des différentes conditions d'exposition possibles en contexte naturel. Il est donc important de mener des études de terrain afin de rassembler des informations supplémentaires sur l'influence des faibles doses sur les biotes. Les écosystèmes aquatiques telles que les sources minérales et les zones humides sont de bons exemples pour étudier cette influence car ils permettent de confronter les populations naturelles dans un contexte d'exposition réel. Ils permettent également d'approfondir les différentes relations biotiques et abiotiques qui influencent les biocénoses dans le milieu.

Afin d'analyser l'effet de faibles bruits de fond radioactifs sur les communautés microbiennes, il est nécessaire de choisir des organismes qui sont des acteurs clés des écosystèmes et qui peuvent être étudiés en laboratoire comme le sont les communautés de diatomées de par leurs caractéristiques morphologiques, écologiques et génétiques.

## **8. Présentation du dispositif ZATU**



Le dispositif de la Zone Atelier Territoire Uranifère (ZATU) fait partie du Réseau des Zones-Ateliers labellisé par l'Institut écologie et environnement du CNRS. Elle rassemble un consortium interdisciplinaire de scientifiques (biologistes, chimistes, géologues, physiciens, radiochimistes, sociologues...) qui étudient l'effet de faibles bruits de fond radioactifs naturels sur les écosystèmes ([www.zatu.org](http://www.zatu.org)). Différents projets structurent la ZATU comme le projet translationnel TIRAMISU et le projet TERROIR.

Au cœur du volet «Interaction Vivant et radionucléides» de la ZATU, le projet translationnel TIRAMISU (biodiversiTy In RAdioactive MIneral Springs of the aUvergne region) est dédié à l'étude de la biodiversité dans les sources minérales radioactives (Fig. I-5). Ce projet rassemble une collaboration de biologistes, écologues, physiciens et radiochimistes autour de quatre axes principaux :

- A. Identifier et caractériser radiologiquement des sources naturellement radioactives
- B. Analyser les communautés microbiennes en termes de diversité et de structuration
- C. Etudier les interactions entre les radionucléides et les microorganismes
- D. Conduire une analyse multiparamétrique des données d'observation et modéliser les doses reçues par les organismes vivant dans les différents compartiments des sources (eau, sédiments, paroi).

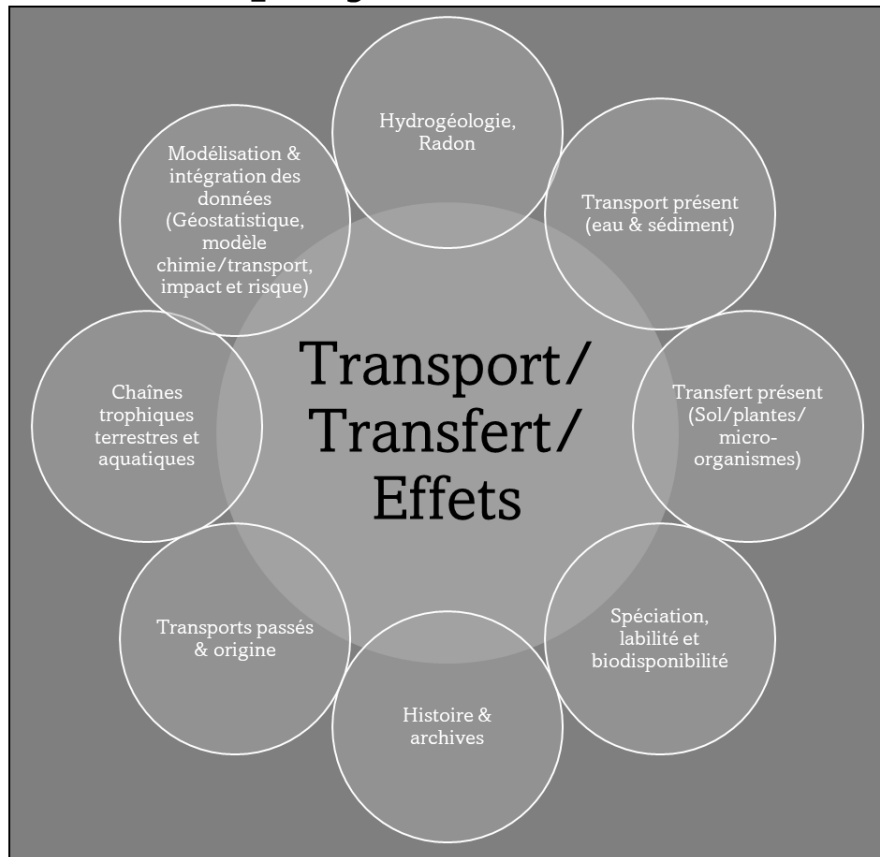
# Le projet TIRAMISU



**Figure I-5:** Schématisation des axes de recherche du projet TIRAMISU. Source: [www.zatu.org](http://www.zatu.org)

La ZATU s'intéresse aussi au devenir des anciens sites miniers et particulièrement de l'ancienne mine de Rophin à travers le projet TERROIR (Fig. I-5). Ainsi, les laboratoires LMGE, GEOLAB, SUBATECH, LPC, IPHC et CENBG ont mis en place un programme de recherche destiné à comprendre les mécanismes de contamination d'une zone humide située en aval de l'ancienne mine de Rophin. Dans ce contexte, la ZATU vise à faire converger des approches pluridisciplinaires et fédère des recherches menées en laboratoire et sur les sites naturels pour établir la portée des impacts écologiques liés aux activités d'extraction de minerais radioactifs comme l'uranium.

# Le projet TERROIR



**Figure I-6:** Schématisation des axes de recherche du projet TERROIR. Source : [www.zatu.org](http://www.zatu.org)

Pour le monde académique (LMGE, GEOLAB, SUBATECH, LPC, IPHC et CENBG), le rôle de la ZATU est aussi de créer un lien scientifique étroit entre les acteurs du nucléaire (IRSN, ASN, CEA) et hors nucléaire (BRGM, INRAE) en vue d'améliorer les protocoles d'évaluation des risques de contaminations associés à la manipulation et au transport des éléments radioactifs. La ZATU permet également de déterminer des processus de « réparation » des sites contaminés et la gestion, à plus long terme, des matériaux radioactifs.

## 9. Problématique de la thèse

La réalisation de ma thèse s'inscrit dans les axes principaux B et D du projet TIRAMISU. Les objectifs principaux sont (1) d'analyser la biodiversité des communautés de diatomées habitants des sources minérales du Massif central qui présentent un très fort gradient de bruit de fond radioactif, (2) de définir statistiquement si le bruit de fond radioactif, parmi d'autres facteurs abiotiques des écosystèmes aquatiques, a une influence sur la richesse, la composition taxonomique et la structure des communautés exposés chroniquement à la radioactivité depuis de longues périodes; (3) d'analyser si ces bruits de fond ont également un effet sur d'autres acteurs des écosystèmes des sources tels que les virus et les procaryotes. Enfin, un dernier objectif de ma thèse est rattaché au projet TERROIR et nous permet de (4) d'analyser si le relargage de radionucléides par l'exploitation d'une mine d'uranium a eu un effet sur les paramètres écologiques des communautés de diatomées. Ce dernier objectif porte sur les diatomées fossiles présentes dans la zone humide située à l'aval de l'ancienne mine de Rophin.

Ce travail de thèse s'articule en 8 chapitres suivis d'un chapitre de conclusion. Ces chapitres correspondent aux analyses menées pour répondre aux différents objectifs présentés ci-dessus. Les chapitres ont été écrits sous forme de publications scientifiques répondant aux exigences des journaux internationaux à comité de lecture. Le **chapitre III**, publié dans *Botany Letters*, vise à comprendre si l'échantillonnage de substrats différents entre les sources pourrait avoir un effet sur les communautés de diatomées échantillonnées et créer un biais pour tester l'influence de la radioactivité sur les communautés. Ce chapitre démontre que l'influence du substrat est négligeable et que l'échantillonnage du substrat dominant n'introduit pas de biais pour les analyses statistiques des communautés.

Ensuite, le **chapitre IV** vise à explorer statistiquement si les bruits de fond radioactifs plus élevés dans les sources minérales ont une influence sur la diversité  $\alpha$  (richesse),  $\beta$  (diversité ou structure) et la composition taxonomique des communautés de diatomées. Les communautés de différentes sources minérales présentant un gradient de radioactivité ont été analysées via une approche de Metabarcoding. Cette approche génétique rapide permet de capturer un aperçu des espèces présentes dans les

échantillons et d'analyser les paramètres écologiques tels que la diversité  $\alpha$  et  $\beta$  en interaction avec les paramètres physico-chimiques et radiologiques des sources. Les résultats de cette étude ont été publiés dans la revue *Science of the Total Environment*.

Puis, le **chapitre V** tend à compléter la première étude et à analyser, par une approche hydrogéologique, l'influence de la radioactivité et d'autres facteurs abiotiques (telle que l'origine de l'eau) sur les paramètres de diversité et la composition des communautés de diatomées. Les résultats de cette étude sont originaux et apportent conséquemment de nouvelles informations sur l'écologie des diatomées. Cet article a été soumis à la revue *Botany letters*.

Enfinement, le **chapitre VI** est dédié à la biodiversité diatomiques de la source de la Poix, un site exceptionnel. En effet, parmi les sources étudiées dans cette thèse, il y a la source de la Poix, qui est une source bitumineuse à Clermont-Ferrand, et qui est considérée comme une curiosité géologique. Elle présente une conductivité très élevée comprise entre 53 300 et 123 200  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  mais n'est pas radioactive. Cette source n'a pas pu être introduite dans nos analyses statistiques sur l'influence de la radioactivité naturelle car elle s'est avérée être un point extrême. Nous avons donc décidé d'analyser la biodiversité des communautés de diatomées de cette source à part et de publier les données concernant la riche et rare biodiversité de ce milieu. L'étude a été publiée dans la revue *BIOM*.

De plus, les communautés microbiennes des sources minérales sont peu connues. Lors de ma thèse, nous avons eu l'opportunité de travailler sur les virus dans les sources afin d'apporter de nouvelles informations sur ces particules. En effet, le LMGE s'est spécialisé dans l'exploration de la diversité microbienne et virale. Nous avons ainsi souhaité ouvrir cette thèse à l'étude d'autres acteurs des communautés microbiennes. Ainsi, après avoir étudié les communautés de diatomées, le **chapitre VII** aborde l'effet de la radioactivité des sources minérales sur les abondances virales et procaryotes. L'étude a été publiée dans le journal *Hydrobiologia*.

Enfin, comme il est intéressant de comprendre si la modification du bruit de fond radioactif par une activité humaine peut avoir un effet sur les communautés de diatomées, le **chapitre VIII** est dédié à l'étude des communautés de diatomées fossiles de la zone

humide de l'ancienne mine de Rophin. Elles y ont été analysées via une approche de paléo-écologie. Ces travaux vont être soumis à la revue *Environmental Monitoring and Assessment*.

## **Chapitre II: Matériel et méthodes**

Ce chapitre a pour objectif de présenter l'ensemble des matériels et des méthodes utilisés pendant la réalisation des différents travaux de la thèse. Il est découpé en deux parties distinctes. Dans la première sont présentées les caractéristiques des nombreux sites étudiés et les moyens d'investigation employés pour étudier l'influence du bruit de fond radioactif renforcé par le fonctionnement hydrogéologique des sources minérales sur les communautés de diatomées. A cette fin, elle regroupe les diverses méthodes d'analyses qui ont servi pour la caractérisation physico-chimique et radiologique des sources étudiées ainsi que les méthodes d'échantillonnage et d'analyse des communautés de diatomées qui ont été utilisées dans les sites d'études. La seconde partie, quant à elle, reprend les matériels et méthodes déployés pour l'étude de l'influence du bruit de fond renforcé par une activité humaine (cas de l'ancienne mine de Rophin) sur les communautés de diatomées d'une zone humide, située à l'aval de l'ancienne zone d'exploitation.

### **A. Etude de l'influence de la radioactivité et des paramètres physico-chimiques sur les communautés de diatomées des sources minérales (cas des NORM)**

#### **1. Sources minérales étudiées**

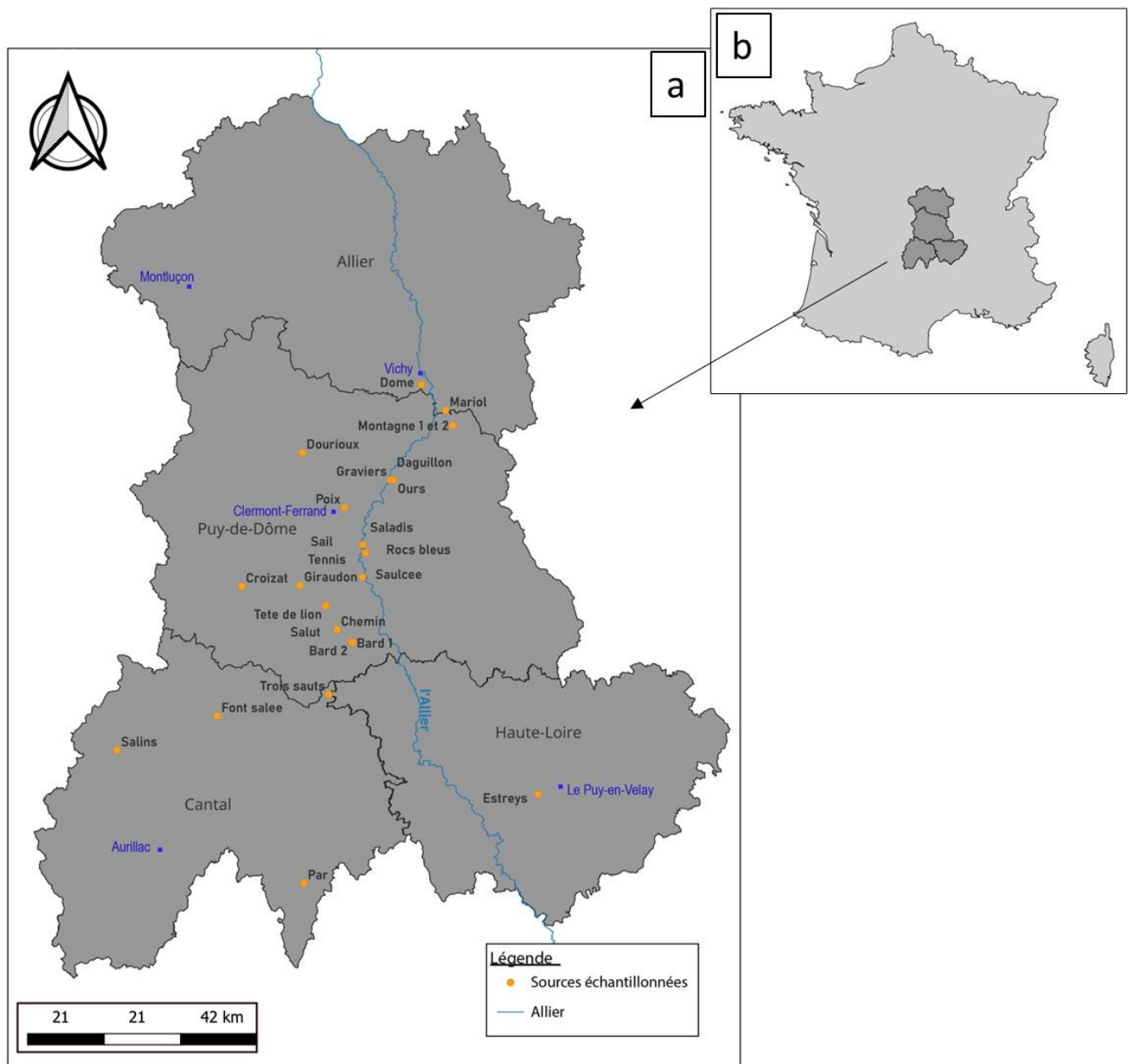
Le Massif central est défini comme une région géologique de plus de 85 000 km<sup>2</sup> ce qui représente environ 15 % du territoire de la France métropolitaine, et s'étend sur 22 départements tout en débordant sur 6 autres. C'est un ensemble de reliefs et de plateaux où affleure le socle hercynien (Risler, 1974) formé il y a environ 500 millions d'années (Paléozoïque). Le Massif central est essentiellement composé de roches granitiques et métamorphiques. Le soulèvement du socle cristallin à l'Est par la surrection des Alpes (au Paléogène) et au Sud par celle des Pyrénées est à l'origine de nombreuses cassures ainsi que d'effondrements le long des failles (graben) qui ont, par exemple, donné naissance à la plaine de la Limagne. A cela se sont ajoutés de très nombreux phénomènes volcaniques

qui remontent à seulement quelques milliers d'années. Tous les types de volcanismes connus sont représentés dans le Massif central (hawaïen, péléen, strombolien). Ces volcans peuvent couvrir de grandes surfaces et être géologiquement complexes (stratovolcan des monts du Cantal ou des Monts Dore) ou au contraire former des reliefs isolés (volcans monogéniques) comme dans la Chaîne des Puys. On peut aussi trouver de grands plateaux basaltiques (Aubrac, Cézallier), résultant de l'étalement d'une lave fluide. Enfin, nous pouvons mentionner la présence de grands plateaux calcaires au sud (les Causses), formés pour l'essentiel au Jurassique et exondés à l'ère tertiaire par un jeu de failles, entrecoupés de gorges très profondes (gorges du Tarn).

Les sources minérales sont situées en presque totalité à l'est du sillon houiller, faille normale d'une longueur de 250 kilomètres qui traverse le Massif central de part en part, du bassin de Noyant-d'Allier au Nord à celui de Decazeville au Sud (Quenardel et al., 1991). Elles se répartissent le long de structures parallèles à l'une des trois grandes directions volcano-tectoniques : N-S, N.W-S.E, N.E-S.W ou parfois à l'intersection de deux de ces directions. Il existe une corrélation spatiale étroite entre les volcans et les sources car les émissions volcaniques utilisent les fractures décrites ci-dessus (Boineau & Maisonneuve, 1972). Ces sources sont donc liées à la présence de grandes fractures dans le socle qui atteignent les zones profondes de l'écorce et sont connues pour la plupart depuis l'époque Gallo-Romaine (Boineau & Maisonneuve, 1972).

Le Massif central est considéré comme une province bicarbonatée sodique car de nombreuses eaux minérales et thermales locales ont une minéralisation où prédominent les ions bicarbonates et sodium (Risler, 1974). Cependant certaines sources présentent des faciès hydrochimiques différents selon le contexte géologique traversé par l'eau lors de sa remontée vers la surface. Globalement, on peut dire que les facteurs qui vont influencer les caractéristiques des sources sont la tectonique, le volcanisme ainsi que la lithologie des roches du socle et de la couverture. Enfin, le Massif central est une région granitique (roche riche en Uranium) et il existe des filons d'Uranium intra-granitique qui se sont constitués au fil des millénaires. Ces derniers vont modifier la teneur en radioéléments de l'eau des sources qui les traverse (Michel, 1978).





**Figure II-1:** carte des 26 sources échantillonnées dans le Massif central. (A) carte des sources dans l'Auvergne. (B) carte de la France situant l'Auvergne

Vingt-six sources appartenant au fossé d'effondrement de la Limagne et des failles bordières dominantes N.S ont été étudiées dans le cadre de ma thèse (Fig. II-1 et annexe 1). Cette sélection a été faite suite au travail d'inventaire des sources minérales d'Auvergne d'A. Beuger (GEOLAB) commencé en 2014 dans le but d'avoir un gradient du bruit de fond radioactif. Certaines sources étaient déjà connues pour être radioactives comme les sources Montagne à Châteldon (Annexe 1, A). Ce sont des sources qui jaillissent dans la vallée du Vauziron, à peu de distance de la faille Est de la Limagne, qui fait buter les sédiments tertiaires contre les granites des monts Forez. Ces sources sont réunies en un seul captage appelé source de la Montagne, qui est caractérisé par une eau froide peu minéralisée avec un faible débit. Un premier point d'échantillonnage appelé Montagne 1 a été prélevé dans l'ancien bâtiment de captage. Un deuxième point d'échantillonnage, appelé Montagne 2, est situé à l'extérieur, de l'autre côté du chemin forestier, qui amène à la source. Ce sont les eaux naturelles les plus radioactives connues en France métropolitaine avec une activité en radon 222 ( $^{222}\text{Rn}$ ) de 3885 Bq.L<sup>-1</sup> selon Jacquet (1929) et comprise entre 4000 Bq.L<sup>-1</sup> et 5000 Bq.L<sup>-1</sup> selon Millan et al. (2019). Rappelons qu'une activité de 1 Becquerel (Bq) représente une désintégration par seconde.

La source du Sail (Annexe 1, C) est, toujours selon Jacquet (1929), la deuxième source la plus radioactive d'Auvergne (après la source de La Montagne) avec des activités en radon atteignant 3145 Becquerel par litre (Bq.L<sup>-1</sup>). La source de Dourieux (Annexe 1, B), peu minéralisée, a été identifiée par V. Breton (physicien au LPC) (communication personnelle) comme présentant des teneurs en  $^{222}\text{Rn}$  comparable à celle de la Montagne. La source des Estreys (Polignac, Annexe 1, B) est une source radioactive qui avait déjà été étudiée en 1925 (Batisse, 1925) (données de radioactivité non disponibles). A environ 6 km de la source de la Montagne, on retrouve la source Mariol (Annexe 1, A), dans la commune du même nom. Cette source ne présente pas le caractère radioactif des sources de Châteldon mais fait partie des sources du bassin de Vichy. L'activité en  $^{222}\text{Rn}$  est d'environ 150 Bq.L<sup>-1</sup> (Millan et al., 2019).

Parmi les sources sélectionnées pour notre étude, certaines sont gérées par le Conservatoire des Espaces Naturels d'Auvergne (CEN). Compte-tenu de leur fréquentation par le grand public, le conservatoire a sollicité des analyses radiologiques afin de mettre en place des mesures d'accès et de gestion le cas échéant. Le CEN

souhaitait également avoir des informations sur la biodiversité algale. Parmi les sources gérées par le CEN et intégrées dans notre étude, nous pouvons citer les sources salées de Joze (Daguillon, Les Graviers, Ours, Annexe 1, F) qui émergent dans un contexte de sédiments oligocènes, sur la rive droite de l'Allier. Ces sources sont notamment caractérisées par une concentration élevée de radium (de l'ordre de 30 Bq.g<sup>-1</sup>) dans les sédiments (Millan et al. 2019). Les sources Rocs bleus et Saladis (Les Martres-de-Veyre, Annexe 1, D) ont également été retenues, cette dernière étant réputée pour soigner les maladies de peau. Elles proviennent directement du granite porphyroïde mais ne sont pas radioactives selon Jacquet (1929). Celle de Trois sauts (Leyvaux, Annexe 1, C), est une source salée située dans le Cézaillier. Elle se trouve sur le socle composé d'orthogneiss et est associée à une faille directionnelle NS (Thonat et al., 2014). La source appartient au groupe des eaux bicarbonatées sodiques et a une forte teneur en CO<sub>2</sub> avec un bouillonnement intense à l'émergence. La source est caractérisée par une abondante précipitation d'hydroxyde ferrique (formant des boues rouges) proche de l'émergence. L'eau s'écoule alors sur des dépôts carbonatés sur une pente assez raide. L'activité du <sup>226</sup>Ra mesurée dans la source du « ruisseau des trois sauts » est de 143 mBq.L<sup>-1</sup> (Rihs et al., 1997). Elle présente une flore halophile et est également gérée par le CEN. C'est aussi le cas de la source du Tennis (Sainte-Marguerite, commune de St Maurice-es-Allier, Annexe 1, E) qui a même été embouteillée, comme nombre des sources précédemment citées. Enfin, la source Tête de lion (Saint-Floret, Annexe 1, F) issue d'un niveau gneissique du socle hercynien, en limite du bassin d'effondrement de la Limagne, fortement chargées en carbonates, est responsable de la formation du dépôt de travertin le plus important de la région. A Boudes, les sources Bard 1 et Bard 2 (Annexe 1, D) qui émergent du socle primitif granitique, de dépôts d'argiles et de grès ferrugineux (Tudesque, 2011) ont également été ajoutées aux sites d'échantillonnage. Les sources Chemin et Salut (Annexe 1, E), sont des sources froides qui émergent dans les gneiss et qui sont faiblement radioactives (Baubron et al., 1979).

Afin d'enrichir le panel de conditions physico-chimiques (température, minéralisation) étudiées, nous avons incorporé dans nos études des sources chaudes (Annexe 1, G) comme celle de Par (Chaudes-Aigues) qui est la plus chaude d'Europe avec 82°C, la source de Dôme à Vichy (65,5°C) ou encore celles de Croizat (Mont-Dore) (34°C) et Giraudon (Saint-Nectaire) (30°C). La source du Dôme est captée dans une vasque en

hauteur et fait partie des sources bicarbonatées sodiques qui émergent de formations marneuses ou marno-sableuses d'âge oligocène. Cette source présente une teneur élevée en fluor liée à la province hydrochimique de Vichy-St Yorre. Des autorisations auprès de la compagnie des Eaux de Vichy (obtenues en 2020) ont été nécessaires pour l'étudier car cette source n'est pas accessible afin de la protéger car elle est utilisée pour la préparation des boues de kaolin dans les thermes de Vichy. Nous avons également retenue une particularité géologique, à savoir la source de la Poix, à Clermont-Ferrand (Annexe 1, H). Elle est décrite comme un suintement très minéralisé de faciès chloruré-sodique accompagné de dépôts de bitume et de dégagements gazeux riches en méthane et à forte odeur d'hydrogène sulfuré (Risler, 1974). Enfin, nous avons ajouté la source Font salée (Apchon, Annexe 1, A) qui est une source miroir de la source Montagne, peu minéralisée et non radioactive ( $9 \text{ Bq.L}^{-1}$ ) (Millan et al., 2020), les source les Salins (Drugeac, Annexe 1, H) et la Saulcée (Coudes, Annexe 1, E) qui sont des sources froides, minérales et gazeuses dont les habitants des villages font une consommation régulière.

## **2. Mesures des paramètres physico-chimiques et radiologiques des biotopes**

Les analyses physico-chimiques et radiologiques ont été très importantes dans mon travail de thèse car elles ont permis de caractériser les différents paramètres abiotiques des sources. Les analyses physico-chimiques ont été effectuées dans différents laboratoires tels que le Laboratoire de Géographie Physique et Environnementale (GEOLAB, Clermont-Ferrand, France), le laboratoire Hydroisotop (Allemagne), le Laboratoire Sciences Pour l'Environnement (SPE, Corse, France) et le laboratoire Chrono-environnement (Besançon, France). Les analyses radiologiques, pour leur part, ont été faites par le Laboratoire de physique de Clermont (LPC, Aubière, France), l'Institut de Chimie de Nice (ICN, Nice, France) et le Laboratoire de physique subatomique et technologies de Nantes (SUBATECH, Nantes, France). Une campagne d'échantillonnage a été réalisée du 15 au 30 octobre 2019 sur l'ensemble des sources (sauf la source du Dôme) et une campagne complémentaire a été réalisée sur 12 sources entre le 25 mai et le 1<sup>er</sup> juillet 2020 (incluant la source du Dôme).

## 2.1. Analyses physico-chimiques de l'eau

Pour chaque source, la température ( $^{\circ}\text{C}$ ), le pH et la conductivité ( $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) ont été mesurés in-situ avec une sonde multiparamétrique WTW 340i (VWR International, Radnor, PA, USA). Les mesures ont été prises en immergeant la sonde aussi près que possible du point d'émergence de chaque source. Le pourcentage d'oxygène dissous a été mesuré avec l'oxymètre Ysi ProODO (Yellow Springs Instruments, OH, USA). Un échantillon d'eau de 200 ml a été prélevé sur chaque site puis filtré en laboratoire à l'aide de filtres en microfibre de verre Whatman GF/C, afin de mesurer les concentrations en ions majeurs ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Les mesures ont été faites par chromatographie ionique à GEOLAB. Les ions mesurés sont les indicateurs géologiques : lithium ( $\text{Li}^+$ ), sodium ( $\text{Na}^+$ ), ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ), potassium ( $\text{K}^+$ ), magnésium ( $\text{Mg}^{2+}$ ), calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ), fluor ( $\text{F}^-$ ), chlore ( $\text{Cl}^-$ ) mais également les ions marqueurs d'anthropisation : nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ), nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) et phosphate ( $\text{PO}_4^{3-}$ ). A noter que les carbonates ( $\text{HCO}_3^-$ ) ont été mesurés par titration alcalimétrique à l'aide d'un kit Hach.

Des mesures physico-chimiques complémentaires ont été effectuées afin d'étudier l'effet des contextes hydrogéologiques sur les communautés de diatomées. Pour cela des échantillons d'eau supplémentaires ont été prélevés sur 12 sources entre le 25 mai et le 1er juillet 2020. Les concentrations de carbone 13 ( $^{13}\text{C}$ ) et de strontium (Sr) ont été mesurées par spectrométrie de masse à rapport isotopique tandis que les concentrations de rubidium (Rb) l'ont été par spectrométrie de masse à ionisation thermique. Le rapport Rb/Sr et la concentration de  $^{13}\text{C}$  ont été utilisés comme marqueurs de l'origine des eaux et des mélanges. Le Rb est un marqueur du réservoir profond et n'est que peu sensible au mélange avec les eaux de surface et au refroidissement des eaux thermo-minérales lors de la remontée. Enfin le rapport Rb/K a été calculé pour étudier l'altération des éléments profonds par des eaux plus superficielles et/ou par l'interaction avec les roches qui peuvent délivrer plus ou moins de K ou de Rb selon leur nature minéralogique. Les éléments traces ont été déterminés par spectrométrie de masse plasmatique à couplage inductif (ICP-MS). Les concentrations de solide dissous (TDS) ont été calculées en faisant la somme de toutes les concentrations des ions mesurés ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) à l'aide du logiciel DIAGRAMMES (Simler, 2009; version 6.59).

## 2.2. Les analyses radiologiques

Dans le but de caractériser l'environnement radiologique auquel sont exposées les communautés de diatomées, les activités des radionucléides ont été mesurées dans l'eau des sources et dans leurs sédiments lorsque des dépôts étaient présents. Cette activité représente le nombre de désintégrations par unité de temps. L'activité des radionucléides par unité de volume ou de masse est exprimée en  $\text{Bq.l}^{-1}$  pour la colonne d'eau et en  $\text{Bq.g}^{-1}$  pour les sédiments où un Becquerel correspond à une désintégration par seconde. Ces mesures ont été effectuées pour les radionucléides naturellement présents dans les sources et faisant partie des chaînes de décroissance de l'uranium 238 ( $^{238}\text{U}$ ), de l'uranium 235 ( $^{235}\text{U}$ ) et du thorium 232 ( $^{232}\text{Th}$ ) (voir Fig. I-3). La configuration de certaines sources telles que les sources du Bard 1, Croizat et Par ne permettent pas l'accumulation de sédiments. Dans ces sources, seules les concentrations de radionucléides dans l'eau ont été mesurées.

### 2.2.1. Analyses radiologiques de l'eau

Des échantillons d'eau (1L) ont été prélevés à l'émergence de chaque source à l'aide d'un bécher Marinelli afin de mesurer l'activité en  $^{222}\text{Rn}$  ( $\text{Bq.L}^{-1}$ ). En laboratoire, les mesures ont été faites par spectrométrie  $\gamma$  à l'aide d'un détecteur au germanium par le LPC.

Des échantillons supplémentaires de 500 ml d'eau ont été prélevés à l'émergence des sources pour mesurer l'activité des autres radioéléments présents. Après acidification des échantillons, les différents radionucléides ont été quantifiés en utilisant plusieurs techniques d'analyse. Les isotopes de l'uranium ont été analysés par Spectrométrie de masse quadripolaire à plasma à couplage inductif (ICP-QMS). Le radium a été mesuré par Spectrométrie de masse plasmatique à couplage inductif à haute résolution (HR-ICP-MS) alors que le polonium l'a été par Spectrométrie  $\alpha$ . Ces analyses ont permis de mesurer l'activité ( $\text{Bq.l}^{-1}$ ) de ces radionucléides dans l'eau. Les concentrations (ppb) des éléments traces tels que le chrome (Cr), le manganèse (Mn), le fer (Fe), le cuivre (Cu), le nickel (Ni), l'arsenic (As), le rubidium (Rb), le strontium (Sr), le césium (Cs), le baryum (Ba) et le plomb

(Pb) ont également été mesurées dans les échantillons d'eau par ICP-QMS. Ce sont les laboratoires Subatech et l'ICN qui ont procédé à ces analyses.

### **2.2.2. Analyses radiologiques des sédiments**

L'analyse des concentrations ( $\text{mg.g}^{-1}$  de sédiments) et des activités ( $\text{Bq.g}^{-1}$  de sédiments) ont été réalisées après une étape de séchage des sédiments à haute température ( $105^\circ\text{C}$ ).  $^{226}\text{Ra}$  et  $^{228}\text{Ac}$  ont été analysés par spectrométrie  $\gamma$ . Ces mesures ont été faites 4 semaines après le scellement du conteneur d'échantillon pour assurer l'équilibre entre  $^{226}\text{Ra}$ ,  $^{222}\text{Rn}$ ,  $^{214}\text{Pb}$  et  $^{214}\text{Bi}$ .  $^{238}\text{U}$  et  $^{232}\text{Th}$  ont été mesurés par Spectrométrie de masse quadripolaire à plasma à couplage inductif par le laboratoire Subatech. Les mêmes éléments traces cités dans la partie 2.2.1 ont été également mesurés dans les sédiments.

## **3. Analyses des communautés de diatomées**

Sur le terrain, les diatomées benthiques ont été échantillonnées par des méthodes adaptées en fonction du substrat dominant dans les différentes sources. Ainsi, le biofilm a été collecté soit en brossant la surface en contact avec l'eau de la source (Bard 1, Chemin, Daguillon, Dôme, Croizat, Mariol, Par, Saladis, Salins, Salut, Saulcée, Tennis) soit en récupérant le biofilm sur les cailloux immergés (les Estreys, Montagne 2) ou encore en raclant les premiers centimètres de sédiments immergés près de l'émergence des sources directement avec un flacon (Bard 2, Dourieux, Font salée, Giraudon, Graviers, Montagne 1, Ours, Rocs bleus, Sail, Tête de lion, Trois sauts). Pour la source de la Poix, les diatomées ont été collectées en récupérant l'eau à l'aide d'une pipette dans les creux formés par le bitume à l'émergence de la source. Les biofilms ont été prélevés dans des flacons de 100 ml hermétiques à double couvercle, et fixés avec de l'éthanol à une concentration finale de 70% comme il est requis par les protocoles européens de monitoring (Afnor, 2014). Deux approches complémentaires ont été choisies pour identifier et quantifier les

communautés de diatomées dans les sources minérales : par analyses morphologiques et par Metabarcoding (Fig. II-2).

### **3.1. Analyses morphologiques des communautés de diatomées**

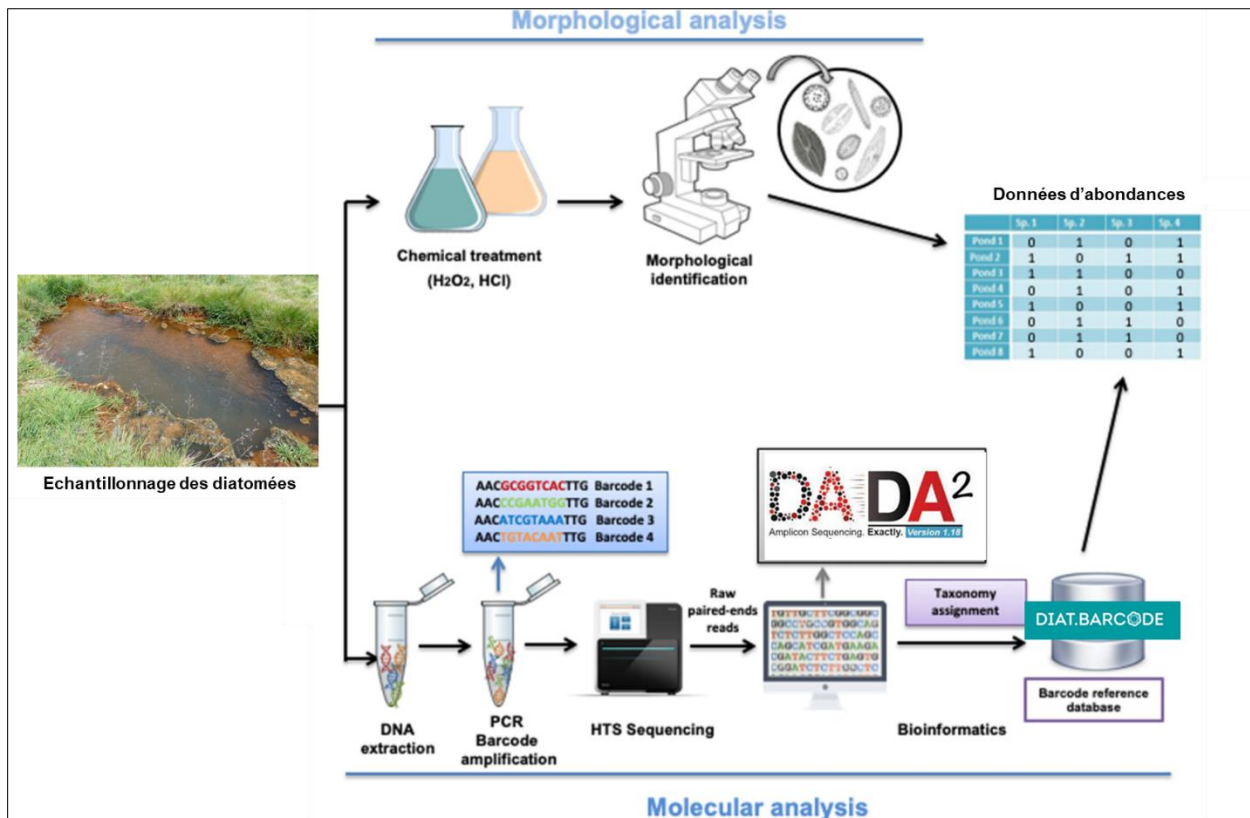
L'analyse morphologique des diatomées repose sur l'observation de différents individus d'un échantillon au microscope optique (Fig. II-2). Cette étape réalisée au laboratoire GEOLAB est basée sur une connaissance fine de la taxonomie des diatomées. Les échantillons de biofilm ont été traités selon la méthode décrite dans Prygiel & Coste (2000) pour l'observation microscopique des frustules de diatomées une fois débarrassés de leur contenu cellulaire. Le contenu organique des échantillons a été détruit avec de l'eau oxygénée (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 35%) et de l'acide chlorhydrique (HCl, 37%). Les échantillons ont ensuite été rincés plusieurs fois avec de l'eau distillée après des phases de décantations. Les frustules purifiés ont été dilués afin d'avoir une concentration optimale pour l'observation au microscope. Puis, une goutte de matériel dilué a été déposée sur une lamelle en verre et laissée évaporer. L'inclusion des diatomées a été faite avec de la résine de Naphrax (indice de réfraction de 1,73) pour une meilleure observation au microscope. Enfin, le montage entre la lame et la lamelle a été effectué et a permis l'observation au microscope optique. Les observations en microscopie optique et les mesures morphométriques ont été effectuées à l'aide d'un microscope Leica® DM2700M équipé d'un objectif à immersion 100x utilisant un contraste interférentiel différentiel. Des photographies ont été prises avec une caméra Leica® DMC2900.

Les déterminations taxonomiques des espèces ont été faites à l'aide des atlas et des articles Beauger et al. (2015; 2016; 2017; 2018), Krammer & Lange-Bertalot (1997a; 1997b; 2000a; 2000b; 2004), Krammer (2000; 2002; 2003), Lange-Bertalot (2001), Wetzel et al. (2015), Lange-Bertalot et al. (2017). Afin de déterminer l'abondance des différentes espèces présentes sur les lames, un total de 400 individus a été compté (nombre classiquement utilisé, selon la norme Afnor NF T 90-354) pour chaque échantillon. Les abondances absolues ont été converties en abondances relatives pour les analyses statistiques.



### 3.2. Analyses génétiques des communautés de diatomées : le Metabarcoding

Le Metabarcoding est une méthode d'analyse moléculaire qui permet d'identifier un assemblage d'espèces grâce à l'analyse de l'ADN présent dans un échantillon (Fig. II-2). Grâce au développement de séquenceurs de nouvelle génération (NGS), le Metabarcoding est une méthode d'identification et d'évaluation assez rapide. Cette méthode est un puissant outil en écologie et permet d'avoir accès à la richesse, à la composition, et à la diversité des communautés de diatomées dans les échantillons (Piredda et al., 2018; Mortágua et al., 2019; Kelly et al., 2020).



**Figure II-2:** Schématisation des approches méthodologiques choisies pour étudier les communautés de diatomées des sources minérales. Illustration modifiée de Nistal-García et al. (2021).

L'UMR CARRETEL (INRAE, Thonon les bains, France) utilise le Metabarcoding en routine. Ce laboratoire développe des protocoles pour améliorer la qualité des analyses en Metabarcoding pour les diatomées et également une base de données génétiques qui sert à identifier les différentes espèces dans les échantillons. Pour cette méthode, les ADN des échantillons ont été extraits à partir des biofilms fixés dans l'éthanol à l'aide du kit Nucleospin for Soil (Macherey-Nagel, Düren, Germany) à l'UMR CARRETEL. Puis un ADN cible a été amplifié à l'aide d'un couple d'amorces spécifiques (Tableau II-2). L'ADN cible est appelé «barcode» et correspond à une région de 312 pb du gène chloroplastique *rbcL* (codant pour la RUBISCO, autrement appelée ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase).

**Tableau II-2:** Amorces Forward et Reverse utilisés pour amplifier la région de 312pb dans les échantillons de sources minérales (Valentin et al., 2017).

Diat_rbcL_708F_1_P5	CTT TCC CTA CAC GAC GCT CTT CCG ATC TAG GTG AAG TAA AAG GTT CWT ACT TAA A
Diat_rbcL_708F_2_P5	CTT TCC CTA CAC GAC GCT CTT CCG ATC TAG GTG AAG TTA AAG GTT CWT AYT TAA A
Diat_rbcL_708F_3_P5	CTT TCC CTA CAC GAC GCT CTT CCG ATC TAG GTG AAA CTA AAG GTT CWT ACT TAA A
R3_1_P7	GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC TCC TTC TAA TTT ACC WAC WAC TG
R3_2_P7	GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC TCC TTC TAA TTT ACC WAC AAC AG

Ce « barcode » permet d'avoir une bonne résolution d'identification spécifique pour les diatomées (Mann et al., 2010; Kermarrec et al., 2014; Bailey et al., 2020). La création d'une librairie de fragments *rbcL* amplifiés a été faite en suivant le protocole décrit par Vasselon et al. (2017). Pour optimiser la profondeur de séquençage, les librairies ont été construites à partir de dupliquas techniques de chaque échantillon. Cette phase est suivie de deux groupes de triplicats par dupliquas techniques qui ont été amplifiés puis «poolés» ensemble. Les librairies ont été séquencées avec la technologie Illumina MiSeq runs (2x250 bp paired-end V3) par la plateforme GenoToul GeT-PlaGe (INRAE Genomics, Toulouse, France). Les données de séquençage ont été analysées avec le package R

DADA2 (Callahan et al., 2016). DADA2 permet de déduire les séquences d'amplicons exactes dans les échantillons (regroupement des séquences identiques) appelés ASV (Amplicon Sequence Variant). Cette méthode de traitement des données de Metabarcoding permet d'avoir moins de séquences erronées dans les analyses et permet d'avoir des analyses comparables entre les campagnes d'échantillonnage. Les séquences ont été assignées taxonomiquement avec Diat.barcode V10 (Rimet et al., 2021) qui est une base de données *rbcL* spécifique aux diatomées. (<https://data.inrae.fr/dataset.xhtml?persistentId=doi:10.15454/TOMBYZ>)

### 3.3. Caractérisation de la diversité des communautés

#### 3.3.1. Mesure de la diversité $\alpha$

La diversité  $\alpha$  est la diversité locale, mesurée à l'échelle d'un habitat. Plusieurs indices quantitatifs ont été créés pour mesurer la richesse en espèces des communautés (McIntosh, 1967). La richesse «S» donne simplement le nombre d'espèces présentes dans un échantillon. L'un des biais de l'échantillonnage est qu'il ne capture qu'une partie de la diversité des communautés. C'est pourquoi, pour contrebalancer ce manque, certains indices ont été créés afin de pouvoir estimer la diversité manquante. L'Indice de Shannon ( $H'$ ) est couramment utilisé :

$$H' = \sum_{i=1}^S p_i \log_2 p_i$$

où  $p_i$  = l'abondance proportionnelle ou pourcentage d'abondance d'une espèce présente ( $p_i = n_i/N$ ) avec  $n_i$  = le nombre d'individus dénombrés pour une espèce présente,  $N$  = le nombre total d'individus dénombrés, toutes espèces confondues ;  $S$  = le nombre total ou cardinal de la liste d'espèces présentes.

L'équitabilité de Pielou «e» de la distribution des espèces représente la mesure du degré de régularité dans l'abondance relative des effectifs des diverses espèces d'un échantillon.

$$e = \frac{H'}{H'_{\max}} \text{ avec } H'_{\max} = \log_2 S$$

où  $H'$  est la diversité selon Shannon et  $S$  est le nombre total d'espèces présentes dans l'échantillon. Cet indice varie donc entre 0 et 1. S'il tend vers  $e = 1$ , alors les espèces présentes dans la communauté ont des abondances identiques. S'il tend vers  $e = 0$ , alors nous sommes en présence d'un déséquilibre où une seule espèce domine toute la communauté.

### 3.3.2. Mesure de la diversité $\beta$

La diversité  $\beta$  mesure la dissimilarité entre les communautés de différents habitats. Il existe plusieurs indices de diversité, cependant il a été choisi d'utiliser les mêmes indices pour l'ensemble des études qui composent cette thèse. L'indice de Jaccard (Jaccard, 1901) est un indice fréquemment utilisé, facile à interpréter et adapté aux échantillons de grande taille (indice très sensible aux petites tailles d'échantillon). Il peut être utilisé dans le cadre des études morphologiques et génétiques. Cet indice est défini pour  $n$  communautés et compte la proportion d'espèces qu'elles partagent. Sa formule est la suivante :

$$J(S_1, S_2, \dots, S_n) = \frac{(S_1 \cap S_2 \cap \dots \cap S_n)}{(S_1 \cup S_2 \cup \dots \cup S_n)}$$

Où  $S_n$  représente la richesse des  $n$  communautés comparées.

L'indice de Jaccard a été modifié afin de considérer les abondances des espèces pour comparer les communautés. Il s'agit de l'indice ab.jaccard «Jabd» (Chao et al., 2005) dont la formule est la suivante:

$$J_{abd} = \frac{UV}{U + V - UV}$$

Où  $U$  et  $V$  représentent les abondances totales des espèces partagées dans les communautés 1 et 2.

### **3.4. Ecologie des diatomées**

Les données d'autoécologie des différentes espèces de diatomées ont été collectées à partir des ouvrages cités précédemment et du logiciel OMNIDIA (Lecointe et al., 1993) en utilisant les traits écologiques décrits par Van Dam et al. (1994).

## **4. Analyses des abondances virales et procaryotes dans les sources minérales**

D'autres acteurs écologiques tels que les virus et les procaryotes ont été analysés. Leur abondance a été obtenue par leur détection et leur énumération via la cytométrie en flux. Cette technique a été acceptée en routine pour analyser les micro-organismes dans les échantillons aquatiques (Olson et al., 1991; Marie et al., 1999; Gruden et al., 2004; Duhamel & Jacquet, 2006). Elle permet de différencier et d'énumérer les différentes populations planctoniques d'un échantillon de façon rapide à l'aide de leurs caractéristiques moléculaires, physiques et de marqueurs moléculaires telles que TOTO-1, YOYO-1, PicoGreen et SYBR Green-I (Marie et al., 1997). Les virus présents dans les colonnes d'eau ont déjà été mesurés dans plusieurs études (Marie et al., 1999; Chen et al., 2001; Jacquet et al., 2002 ; Thomas et al., 2011; Pradeep Ram et al., 2019). La cytométrie en flux a été démontrée comme plus efficace que les autres techniques utilisées pour le comptage des virus dans les échantillons environnementaux telle que la microscopie électronique à transmission ou la microscopie à épifluorescence (Bettarel et al., 2000; Chen et al., 2001). Pour cette analyse, 200 mL ont été prélevés dans la colonne d'eau de 15 sources minérales du Massif central (Bard 1, Bard 2, Croizat, Daguillon, Dourieux, Estreys, Font salée, Gravier, Mariol, Montagne 1, Montagne 2, Ours, Salins, Salut, Trois sauts, fig.I-1). A partir de ces premiers échantillons, 1 mL d'eau a été fixé avec du paraformaldéhyde (concentration finale à 0,5%) puis maintenus à l'obscurité à 4°C. Les échantillons ont été filtrés et dilués puis colorés au SYBR-Green-I. Ce composé est un marqueur des acides nucléiques qui a une forte affinité pour l'ADN double brin. Son affinité pour l'ADN simple brin et pour l'ARN est plus faible. Par la suite, les échantillons ont été

passés au cytomètre où les cellules (ou particules virales en suspension) ont défilé une à une devant un ou plusieurs faisceaux laser de différentes longueurs d'onde. Les détecteurs du cytomètre captent les signaux émis par chaque cellule et particule virale. Ces signaux sont :1) la lumière diffusée aux petits angles (Forward Scatter, FSC) qui renseigne sur la taille des particules et 2) la lumière diffusée à 90 degrés (Side Scatter – SSC) qui renseigne sur la forme, la structure interne et la granularité des particules. Il capte également les signaux de fluorescence émis par la cellule elle-même (Adan, 2016). En effet, lorsque les ADN bactériens et viraux vont être marqués au SYBR-Green I et être excités à des longueurs d'onde de 495nm et 530nm respectivement, ils vont émettre un signal de fluorescence distinct qui va permettre de les discriminer suite à un traitement informatique avec le logiciel CellQuest Pro (BD Biosciences, San Jose, CA, USA; version 4.0). Plus il y a de signaux de fluorescence, plus il y a de l'ADN qui est passé devant les faisceaux. La cytométrie en flux est très utilisée au LMGE pour analyser les échantillons d'eau.

## **B. Etude de l'influence de la radioactivité et d'autres paramètres environnementaux sur les communautés de diatomées d'un ancien site TE-NORM par une analyse paléo-écologique**

La paléoécologie vise à reconstruire les communautés des écosystèmes passés à partir des preuves géologiques et biologiques (fossiles) disponibles (Birks, 2008). Elle s'intéresse à leur(s) changement(s) dans le temps sur des échelles allant de décennies à des centaines de millions d'années (Webb, 2017). Elle tend à préciser les interactions entre les modifications de l'environnement (changement climatique ou autres perturbations) et les communautés fossiles disponibles en se basant sur les ressemblances entre les données taxonomiques et écologiques collectées. La description, l'identification et l'interprétation des diatomées fossiles a connu un essor à partir du milieu du 19<sup>ème</sup> siècle (Bradbury & Krebs, 1995).

Comme l'ancienne mine d'Uranium de Rophin a été exploitée dans les années 1950, nous avons choisi d'effectuer une reconstruction paléo-environnementale pour comprendre l'impact de cette exploitation sur les communautés de diatomées.

## **1. La zone humide de l'ancienne mine de Rophin**

L'ancien site minier de Rophin est situé dans la partie nord-est du département du Puy-de-Dôme (France), à environ 3,4 km de la ville de Lachaux. (Fig. II-3). Le secteur de Lachaux est caractérisé par deux catégories distinctes de formations uranifères : 1) les formations à minerais oxydés (principalement de la parsonsite ( $\text{Pb}_2(\text{PO}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) à l'ouest et, 2) les formations à pechblende situées à l'est du village. La prédominance de parsonsite dans les gisements de Lachaux a permis leur exploitation économique. Ce gisement a été découvert en 1924, par deux géologues : M. Demarty et M. Thave. Mais, c'est en 1946 que le Commissariat à l'Energie Atomique (CEA), alors propriétaire de la concession de Lachaux, décida de l'exploiter et d'en faire l'un de ses premiers chantiers miniers. Des travaux ont été conduits de 1948 à 1952 sur le site. De 1947 à 1957, une usine de traitement du minerai a fonctionné. Enfin, une laverie mécanique a été construite en 1948 afin de pouvoir concentrer les minerais d'uranium provenant d'autres sites miniers à proximité (Fig. II-4). Le minerai était, par la suite, traité à l'usine du Bouchet (département de l'Essonne, France). La laverie n'a été fonctionnelle que de juillet à novembre 1950 (Guiollard, 2002) avant d'être définitivement démantelée en 1959 pour cause de rendement trop faible.

Le site est situé dans un bassin versant et a une superficie de 19,66 km<sup>2</sup>. Il est composé de galeries souterraines dont la plus grande, creusée au-dessous du filon exploité, fait environ 540 m de long. Il existait également des bâtiments et trois bassins de décantation pour retenir les particules d'uranium (Himeur & Andres, 2012) qui ne sont plus visibles aujourd'hui (Fig. II-3). Au total, 400 kg d'uranium ont été produits à partir de 2 000 tonnes de minerai extrait. Des travaux de réaménagement du site (apports de terre, recouvrement des résidus et pose de canalisation) ont été réalisés de 1982 à 1985. De nouveaux travaux consistant en la démolition des anciens vestiges de la laverie,

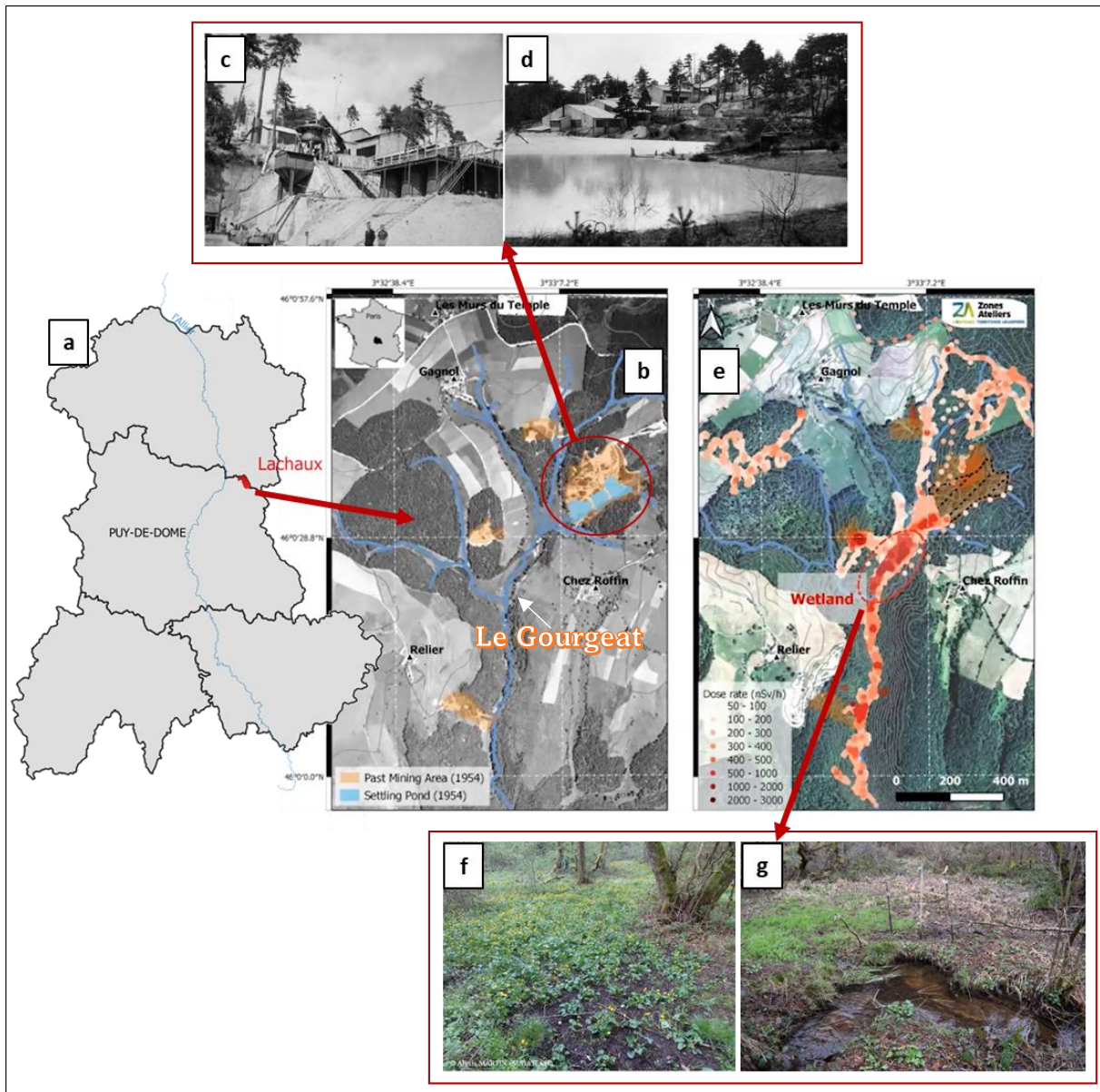
l'installation d'une canalisation raccordée à l'exutoire existant dans le mur de fermeture de l'ancienne galerie, le profilage des terrains et la mise en place d'une couverture végétale ont été effectués en 2002. En 2010, une clôture est placée autour du site de stockage des résidus de traitement. En 2015, des stériles miniers d'autres exploitations ont été ajoutés dans cette zone qui est devenue une Installation Classée Protection de l'Environnement (ICPE) en 2013 sous la gestion d'AREVA. Aujourd'hui, le site de stockage (ICPE) est recouvert d'un sol végétalisé tandis qu'une végétation forestière s'est développée sur le site entier. Des effluents provenant de galeries souterraines situées sous la zone ICPE sont collectés dans une tranchée et rejoignent le ruisseau le Gourgeat qui traverse le site (Fig. II-3). Ce ruisseau contribue à la formation d'une zone humide à 200 m en aval de la zone ICPE. Une précédente étude sur le site de Rophin a mis en évidence la présence de marqueurs de contamination dans cette zone humide (Martin et al., 2020) sous la forme d'une couche blanchâtre limoneuse dans les vingt premiers centimètres de plusieurs carottes de sédiments qui y ont été prélevées. Un niveau de rayonnement gamma allant jusqu'à  $1050 \text{ nSv.h}^{-1}$  et des concentrations d'uranium allant jusqu'à  $1855 \text{ mg.kg}^{-1}$  ont été mesurés dans cette couche blanche issue du flux de résidus de minerai lavés sur place lors du fonctionnement de la mine.

## **2. Le carottage de la zone humide de Rophin, description lithostratigraphique et étude des communautés de diatomées**

Afin de conduire l'analyse paléoécologique des diatomées fossiles de la zone humide de Rophin, un carottage a été effectué au carottier russe 50 cm de long x 5 cm de diamètre le 4 mars 2020. Une carotte de 1,69 m de sédiments (appelée (T2-P1bis) a été extraite de la zone humide (Fig. II-5). L'histoire de la zone (occupation et activités humaines comme l'agriculture, l'activité minière, etc.) peut être reconstruite à partir de la composition lithostratigraphique et diatomique des sédiments. Les différentes couches stratigraphiques de la carotte ont été décrites du point de vue de leur nature sédimentaire tandis que des échantillons de sédiments ont été prélevés afin d'étudier les communautés de diatomées fossiles. Le traitement des échantillons a été réalisé tel que décrit dans la partie 3.1 mais une étape de séchage et de broyage des sédiments a été réalisée au

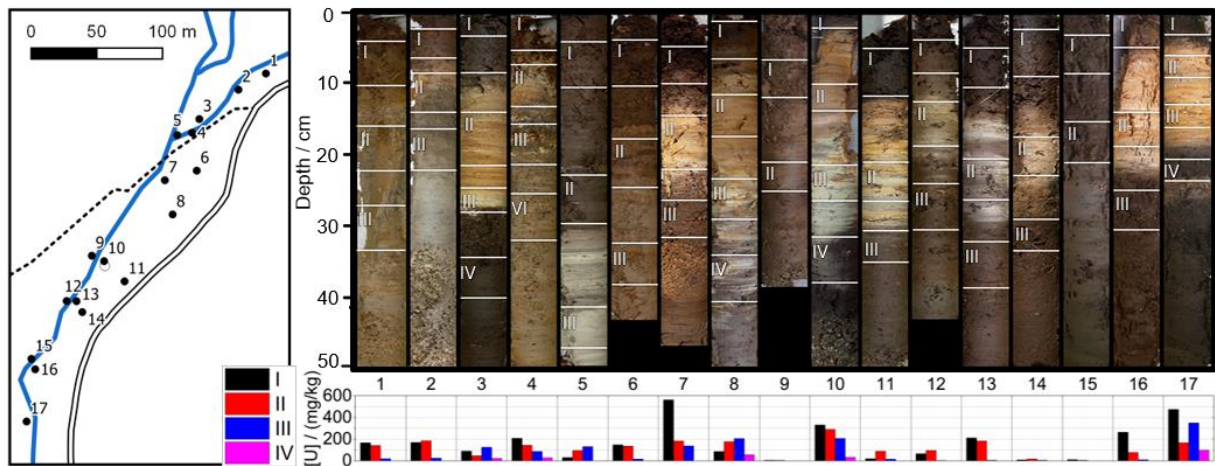


préalable. Après la phase de montage des préparations entre lame et lamelle avec du Naphrax, les observations ont été réalisées en microscopie optique à l'aide du microscope Leica® DM2700M en utilisant les différents atlas cités précédemment ainsi que Kulikovskiy et al. (2010) et Lange-Bertalot (2011).



**Figure II-3 :** Localisation de l'ancienne mine de Rophin et de la zone humide. (a) Localisation de Lachaux, (b) Photographie satellite du site de Rophin en 1954 (fin de l'exploitation), (c) Photographie de la station de lavage mécanique du minerai en 1953 du CEA et des bassins de décantations, (d) Photographie de Rophin récente et localisation de la zone humide, (e) Visualisation des mesures de rayonnement gamma sur le site, (f) Photographie de la zone humide, (g) Photographie de la zone humide.

photographie de la zone humide de Rophin, (g) Photographie d'une partie de la zone humide de Rophin prise le 4 mars 2020. Une partie du chenal du Gourgeat est visible sur la photographie. Les photographies b, c, d, e, f sont été tirées de Martin et al., 2020.



**Figure II-4:** Carottes prélevées sur le site de Rophin montrant la couche blanchâtre argileuse témoin de la période d'exploitation minière. Carottes de série M : carte des emplacements de prélèvement (à gauche), photographies et sélection des sous-échantillons de carottes (en haut) et concentration en uranium du sol humide, en mg.kg<sup>-1</sup>, dans les sous-échantillons mesurés au moyen de la spectrométrie gamma (en bas). Image tirée de Martin et al., 2020.

À la suite des comptages des diatomées effectués sur différents échantillons, un diagramme stratigraphique a été réalisé en utilisant le logiciel C2 version 1.7.2 (Juggins, 2007). Les données sont représentées en fonction de la profondeur de chaque échantillon sur l'axe des ordonnées tandis qu'en abscisse ce sont les espèces dominantes ou les données autoécologiques.

Leur écologie a été déduite à partir des différents atlas de diatomées précédemment cités dans la partie 3.1. Le logiciel OMNIDIA (Lecointe et al., 1993) a

également été utilisé pour collecter les traits écologiques des espèces décrits par Van Dam et al. (1994).



**Figure II-5:** (a) Carottage de la zone humide de Rophin, le 4 mars 2020. (b) Prélèvement des couches sédimentaires de la carotte T2-P1bis pour les analyses morphologiques des diatomées et la datation au carbone 14 ( $^{14}\text{C}$ ).

### 3. Datation de la carotte

Afin de connaître la période historique couverte par la carotte, il a été nécessaire de réaliser des datations. La datation au carbone 14 ( $^{14}\text{C}$ ) est une méthode très répandue en reconstruction paléo-écologique (Denys & De Wolf, 2001; Katsuki et al., 2012; Ejarque et al., 2015). Elle repose sur le fait que le carbone est un élément radioactif qui possède une demi-vie de 5 730 ans. Le dioxyde de carbone ( $\text{CO}_2$ ) est assimilé par les organismes vivants tout au long de leur vie (respiration, alimentation, etc.). Lorsqu'ils meurent, il n'y a plus d'assimilation de  $\text{CO}_2$  et la quantité de  $^{14}\text{C}$  assimilé diminue exponentiellement au cours du temps tandis que la quantité de carbone 12 ( $^{12}\text{C}$ ) reste constante (Anderson et al., 1947). Ainsi, la méthode de datation au  $^{14}\text{C}$  consiste à mesurer les quantités de  $^{12}\text{C}$  et de  $^{14}\text{C}$  dans les échantillons, puis, à estimer l'âge des échantillons via la comparaison du rapport  $^{12}\text{C} / ^{14}\text{C}$  avec celui d'un échantillon standard.

Dans le cadre de ma thèse, 7 échantillons de charbons, de bois et de plantes provenant de la carotte de la zone humide ont été datés au  $^{14}\text{C}$  par les laboratoires Beta Analytic Inc. (Miami, Florida) et DirectAMS (Bothell, Washington).

### **Chapitre III: Le substrat a-t-il une influence sur la diversité des diatomées dans les sources minérales ?**

Cette étude est la première présentée dans ma thèse. Elle fait suite à une question importante évoquée lors de mon premier comité de thèse. Cette question était de savoir si l'échantillonnage de substrats différents entre les sources pourrait influencer les communautés de diatomées collectées et donc, créer un biais pour tester l'influence de la radioactivité sur ces micro-algues. Ainsi, le but de cette analyse a été de tester l'effet du substrat dans deux sources étudiées dans ma thèse: La Montagne 1 (commune de Châteldon) et Mariol (commune de Mariol). La Montagne est la source la plus radioactive des émergences étudiées dans cette thèse (rayonnement  $\gamma$  1500~ nSv.h<sup>-1</sup>) et Mariol, est une source géographiquement proche de La Montagne mais qui ne présente pas des niveaux élevés de radioactivité (rayonnement  $\gamma$  ~ 400 nSv.h<sup>-1</sup>). Pour cela, les données obtenues lors du suivi de ces deux sources pendant 18 mois (par GEOLAB), ont permis: 1) de comparer les communautés de diatomées collectées sur deux types de substrats (sédiments / travertin non induré vs galet); 2) d'évaluer si le substrat était un paramètre majeur influençant la richesse et la diversité des communautés de diatomées. Malheureusement, les mesures de radioactivité dans ces sources (commencées avant le début de ma thèse) n'étant pas régulières, il n'a pas été possible d'ajouter ce paramètre dans cette analyse. Les résultats de cette étude ont été publiés dans la revue *Botany Letters*, Volume 169, Issue 2, Pages 155-165

# The substrate, a key factor or not, to explain the species diversity of diatom communities in mineral springs

Lory-Anne Baker<sup>a,b,\*</sup>, David G. Biron<sup>a,b</sup>, Fanny Millan<sup>c</sup>, Olivier Voldoire<sup>c,b</sup>, Vincent Breton<sup>d,b</sup>, Elisabeth Allain<sup>c,b</sup>, Carlos E. Wetzel<sup>e</sup>, Luc Ector<sup>e</sup> and Aude Beauger<sup>c,b</sup>

<sup>a</sup>Université Clermont Auvergne, CNRS, LMGE, F-63000 Clermont–Ferrand, France; <sup>b</sup>LTSER “Zone Atelier Territoires Uranifères”, F-63000 Clermont-Ferrand, F-63178 Aubière Cedex, France, <sup>c</sup>Université Clermont Auvergne, CNRS, GEOLAB, F-63000 Clermont-Ferrand, France; <sup>d</sup>Université Clermont Auvergne, CNRS/IN2P3, Laboratoire de Physique de Clermont (LPC), UMR6533, F-63178 Aubière cedex, France; <sup>e</sup>Environmental Research and Innovation (ERIN) Department, Luxembourg Institute of Science and Technology (LIST), L-4422 Belvaux, Luxembourg.

\*Lory-Anne Baker, l-anne.baker@etu.uca.fr, Université Clermont Auvergne, CNRS, UMR6023, LMGE, 63178 Aubière Cedex, France

## Abstract

Diatoms colonised most aquatic ecosystems on earth from marine to freshwater ones, and also the springs containing a fairly large and poorly known diversity of diatoms. While investigations on the influence of substrates on diatom assemblages in rivers are relatively well documented, few studies have been done for mineral springs. The purpose of this study was to analyse if the type of substrate on which diatoms grow, influences diatom assemblage’s ecological metrics (i.e. species richness, diversity and evenness) and diatom composition. During 18 months, two minerals springs of Auvergne (France), La Montagne and Mariol were sampled monthly, both epilithic and epipellic diatom communities. A total of 201 taxa were found. Data analysis showed that location (i.e. environmental variables of a site) explained significantly higher portions of variability of diatom composition than substrate. However, substrate have a role in the species abundances as much as the location.

**Keywords:** diversity of diatom community; substrate influence; community drivers; mineral springs

## Introduction

Diatoms are a widely distributed group of unicellular algae that can colonise most of the habitats of aquatic ecosystems (ex.: lakes, rivers, estuaries, seas, oceans, springs) on earth (Mann and Drop 1996). For instance, benthic diatoms can grow in habitats of an aquatic ecosystem by attaching to substrates such as rock (epilithon), silt surface (epipelon), sand (epipsammon), plant (epiphyton) and wood (epidendron) (Round 1991). The assumption on a relationship between the substrate type and the species diversity or assemblage of benthic diatom communities in an aquatic ecosystem was assessed by many surveys in freshwater aquatic ecosystems like rivers and lakes. Some of these studies concluded that the substrate type should influence both species diversity and assemblage of benthic diatom communities in aquatic ecosystems (Cox 1988; Sabater et al. 1998; Soininen et al. 2004; Potapova and Charles 2005; Medlin and Juggins 2018).

Based on previous studies and on their results, Round (1991) suggested that substrate topology could drive the benthic diatom assemblage (community) colonising a given substrate. Therefore, attached diatoms are mostly found on hard surfaces (ex.: rock, wood) while motile ones are predominant on thin particles such as silt. Townsend and Gell (2005) suggested that benthic diatom assemblages were similar on hard substrates such as sand, wood and rock but not for the species abundance. On the other hand, they concluded that benthic diatom assemblages on vegetation substrates were in general dissimilar. Stevenson and Hashim (1989) analysed during two summers the diatom assemblages at two streams of Michigan State in the USA. They observed that the species abundances varied among micro-habitats, and also that the differences of diatom species in studied communities were higher between rivers rather than habitats at a same sampling site. Moreover, many studies observed no significant difference between diatom communities from various substrates for the species composition (Sullivan 1982; Millie and Lowe 1983; O'Quinn and Sullivan 1983). For instance, Jüttner et al. (1996) showed that there were similarities of species diversity between habitats during their surveys on Nepalese streams.

If there are several studies on the influence of substrate types on the species diversity or assemblage of benthic diatom communities in rivers and lakes, few were done on springs. However, these aquatic-terrestrial ecosystems are widespread. The total

number of springs on earth is estimated at more than  $57 \times 10^6$  including approximately 105 thermal springs (Cantonati et al. 2012a). Besides, springs are present in different contexts (Kresic 2010) and have diverse mineral compositions due to their origin and lithology. Some springs were used for medical purposes and also for drinking because of their special mineral composition. Thus, spring water catchment systems were made to collect underground water in many countries. Moreover, springs are also important because of their abundant and peculiar biodiversity (Cantonati et al. 2012a). Usually, springs are physically small biotopes where environmental variables are considered as stable. In fact, their stability depends on the spring type or configuration which can modified their endogenous chemical parameters.

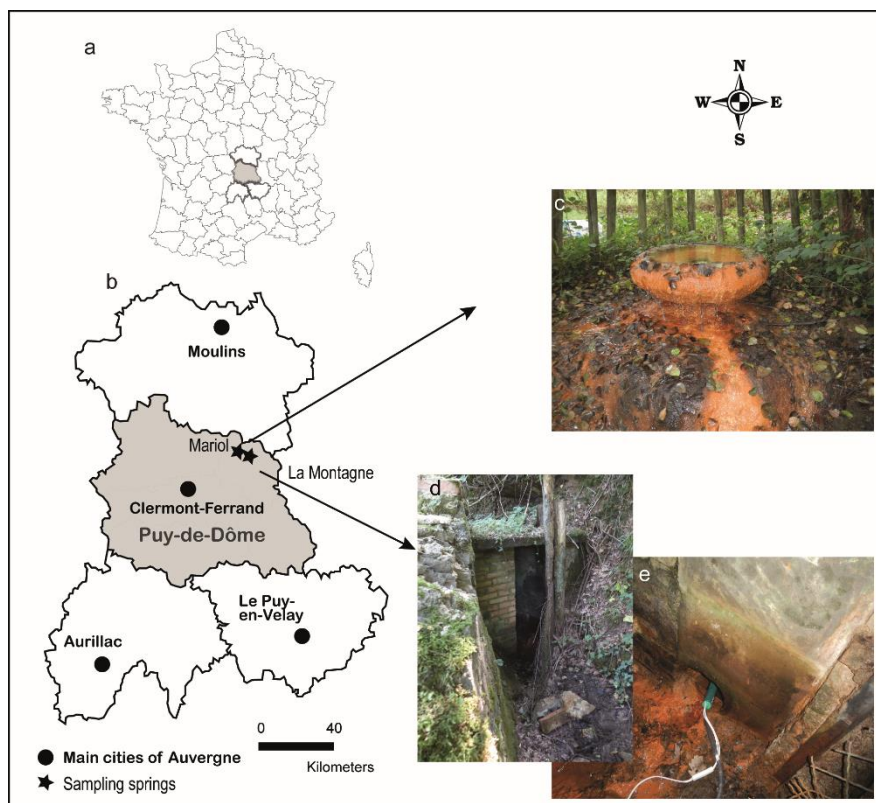
Some authors focus on the influence of substrate on benthic diatom assemblages in springs (Cantonati 1998; Cantonati et al. 2009, 2012b; Wojtal and Sobczyk 2012; Lai et al. 2019b). For their survey at Sardinia (Italy), Lai et al. (2019b) concluded that diatom assemblages in these thermo-mineral springs formed separated clusters and are not similar for three substrates: rock, cobbles and sediments. In contrast, the results of Cantonati (1998) suggested that there were no differences between diatom assemblages growing on rock and plants. Similar conclusion was obtained by Wojtal and Sobczyk (2012) that also highlights that diatom distribution follows environmental variables like pH, salinity, trophic level and physico-chemical parameters. According to these last observations, the study of 16 springs and 5 streams of Dolomiti Bellunesi National Park in Italia determined that environmental variables explained 40% of the variability of diatom species diversity and substrate 3%. Therefore, these results suggest that macrohabitats have more impact on diatom assemblages than microhabitats (Cantonati and Spitale 2009). In order to bring new insights on the influence of substrate on benthic diatom assemblages in mineral springs, the epilithic and epipellic diatom communities of two springs located in Auvergne region were sampled monthly between July 2018 and June 2020 in order to test the spatio-temporal relationships between the substrate type and the species diversity.



## Material and methods

### Sampling sites

Two mineral springs, so called La Montagne and Mariol, were used for this survey (Figure III-1). Both are rich in bicarbonate and sodium, and belong to the springs of Châteldon, Vichy and the Saint-Yorre basins which take origin into the eastern border faults. The first one, La Montagne, is located in Châteldon (E 741086.699, N 6542796.817 in Lambert 93). At this spring, water is taken from the ground and discharged into a former building constructed during the bottling period (1859 - early 1900s). The second spring studied, Mariol, is located in the city of Mariol (E 739134.341, N 6546926.368 in Lambert 93) at 5 km from Châteldon and takes part of the South of Vichy basin. At this site, the water springing in a basin 50 cm above the ground. Both springs are located outside of the protected catchment area of the Vichy hydrotherapy industry and therefore accessible for sampling.



**Figure III-1** : Location (a) in France of the two mineral springs studied in Auvergne Region (b): Mariol (c) and La Montagne (d,e).

## Physical and chemical analyses of water

Eighteen samples were taken between July 2018 and June 2020. Dissolved oxygen (%), conductivity ( $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) and water temperature ( $^{\circ}\text{C}$ ) were measured *in situ* using an Ysi ProODO oxygen probe and a multi-parameter WTW probe FC 340i. The carbonate concentration ( $\text{HCO}_3^-$ ) was also measured using a Hach carbonate kit. Additionally, during each sampling, a water sample was collected for further laboratory chemical analysis using a high pressure ion chromatography technic. First, these samples were filtered using Whatmann GF/C filters. For cation and anion analysis, a Thermo Scientific Dionex ICS1100 and a Thermo Scientific Dionex Aquion system were respectively used to measure concentrations ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) in lithium ( $\text{Li}^+$ ), sodium ( $\text{Na}^+$ ), ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ), potassium ( $\text{K}^+$ ), magnesium ( $\text{Mg}^{2+}$ ), calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ), fluoride ( $\text{F}^-$ ), chloride ( $\text{Cl}^-$ ), nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ), nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ), phosphate ( $\text{PO}_4^{3-}$ ).

## Sampling of diatom communities

Both epipellic (on mud) and epilithic (on pebble) samples were collected from the two springs during 18 months between July 2018 and June 2020. “Mud” is referred to fine sediment with low quantity of silt, and “pebble” is referred to basalt stone (classified particles size: 64-128 mm, Malavoi and Souchon 2002). The epipellic sample depends of the kind of substrate presents on each site. Thus diatoms were sampled from a mix of mud and litter at La Montagne spring and from a mix of organic matter and non-hardened calcium carbonate from the travertine at Mariol spring. For the first site, the sediments were recovered by scraping off the first millimetres of mud directly with the vial, and for the second one, by brushing the non-hardened deposits. Epilithic samples were collected on basalt pebbles previously recovered from Allier river that were sterilised and placed in spring water. Epilithic algal communities were sampled by brushing the attached algae from the upper surface of submerged pebble using Douglas (1958) method.

## **Slide preparation and microscopy**

Small sub-samples of epipelagic and epilithic raw material were prepared for light microscopy (LM) observation according to the method of Prygiel and Coste (2000). Samples were cleaned using hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 35%) and hydrochloric acid (HCl, 37%), and rinsed several times with distilled water. Cleaned material was diluted with distilled water to avoid excessive concentrations of diatom valves on the slides. Then, a drop of dried, clean material was mounted in Naphrax®. LM observations and morphometric measurements were done using a Leica® DM2700M microscope with a 100x oil immersion objective using a differential interference contrast. For each slide, 400 valves were enumerated on random transects. Diatom identification was based on different taxonomical works (Krammer and Lange-Bertalot 1997a, 1997b, 2000a, 2000b, 2004; Krammer 2000, 2002, 2003; Lange-Bertalot 2001; Kulikovskiy et al. 2010; Hofmann et al. 2013; Wetzel et al. 2015; Lange-Bertalot et al. 2017). Once the counting was completed, the relative abundance of diatom species was calculated.

## **Data analysis**

### **Physical and chemical parameters**

Abiotic data do not follow a normal distribution; thus there were standardised using z-score normalisation ((x-mean)/standard deviation) for Principal component analysis (PCA) (Abdi and Williams 2010). This transformation allows also to compare variables that initially had different units. From the 18 months of sampling, a stepwise regression was done in order to retain the most significant environmental variables from the dataset using XLSTAT 2020 3.1 software. As an outcome, conductivity, Cl<sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, F<sup>-</sup> and HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> were retained as the most relevant parameters. Because of their ecological importance in spring ecosystems and on diatoms communities (Patrick 1977): temperature, dissolved oxygen, pH, anthropogenic indicators (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) and a geological indicator (Na<sup>+</sup>) were added to the environment variables selected through the stepwise regression. Then, a PCA was performed on these parameters to detect temporal and local differences among samplings. Statistical difference between Mariol and La Montagne samples was

statistically tested with the non-parametric Kruskal-Wallis test based on the Cartesian coordinates of the PCA samples points.

Related to our observations during the survey, it seems that La Montagne spring could be affected by high precipitation events due to its configuration. To take into consideration the evolution of water conductivity and daily precipitations (data from US1116 AGROCLIM, INRA, Centre de Recherches PACA) during the sampling period, boxplots and graphs were also done with XLSTAT 2020 3.1 version. The correlation between these variables was tested by calculating Pearson correlation coefficient.

### **Statistical analysis of diatom data**

Three diversity indices: Species richness (R), Shannon-Wiener index (H) and Evenness (J), were calculated for each spring. For each index, the comparison between substrate types was done by using the Wilcoxon test to verify the null hypothesis (no effect) of substrate. Further, to compare the composition of the diatom communities between substrates and considering the large sample size, the Jaccard dissimilarity index (Jaccard 1901) was the most appropriate index. This one only takes account of the species shared between the two assemblages and the number of unique species of each assemblage. So, when the matrix of dissimilarities was generated with the function `vegdist` of the R package “vegan” (version 2.5-7), the arguments of the function were configured to convert the species relative abundances matrix into a binary matrix (0: absence, 1: presence) before running the distances matrix. A second matrix with the abundances-based jaccard dissimilarity index “`ab.jaccard`” (or `chao.jaccard`) described in Chao et al. (2006) was also generated. The `ab.jaccard` distances is not present in `vegan` package so the `dist.ldc` function of the package “`adespatial`” version 0.3-14 (Dray et al, 2012) was used to generate a dissimilarity matrix with this index. These matrices were used for a non-metric Multidimensional Scaling ordination analysis (nMDS) performed to explore the similarity of diatom assemblages between the two substrates (pebble or mud) located in a same spring (XLSTAT 2020 3.1 version). Kruskal-Wallis stress was calculated to assess the nMDS adjustment quality (stress>0.20: bad adjustment, 0.10<stress <0.20:

adequate,  $0.05 < \text{stress} < 0.025$ : good,  $\text{stress} < 0.025$ : excellent and  $\text{stress} = 0$ : perfect). To complete the nMDS analysis and validate the significance of the differences between samples, a one-way analysis of similarities (ANOSIM) was used (Clarke 1993). The ANOSIM were also done with Jaccard distances matrix and `ab.jaccard` distances. The percentage of contribution of three factors (location, season, substrate) to the variability of diatom species diversity in springs was determined by using a Non-parametric MANOVA analysis (i.e. ADONIS (Permutational MANOVA)) based on Jaccard or `ab.jaccard` dissimilarity index using the function `Adonis` of the `vegan` R package.

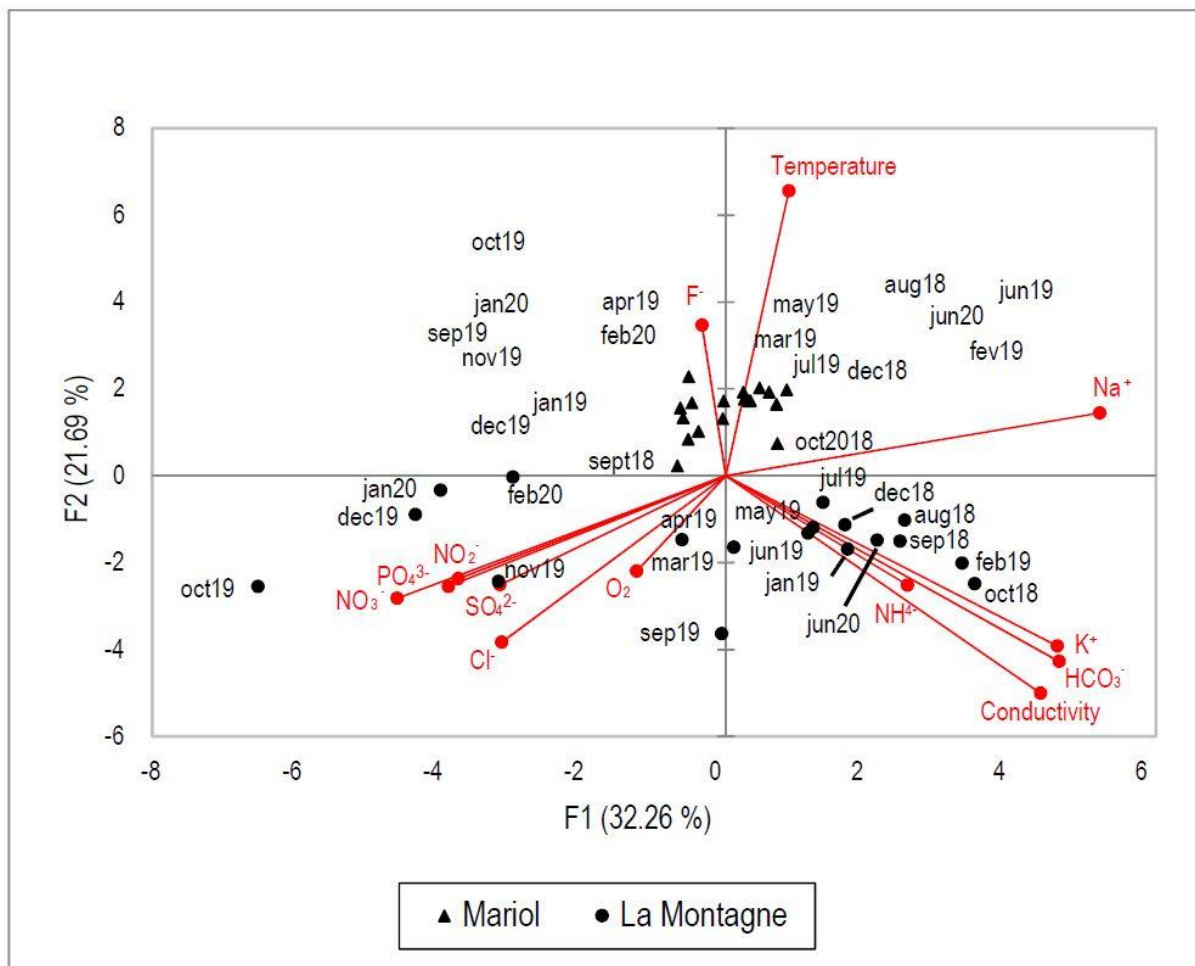
## Results

### Physical and chemical analyses of La Montagne and Mariol springs

The physical and chemical measures done at Mariol and La Montagne springs during the 18 months of sampling are reported in Tables III-1, III-2 and III-3. The PCA (Figure 2) performed on environmental variables explained 53.96 % of the variance (axis 1: 32.26 % and axis 2: 21.69 %). The axis 2 clearly separates La Montagne and Mariol samples in two groups (Kruskal-Wallis test:  $p < 0.0001$ ). Mariol samples were associated with high concentrations of fluoride and high temperatures (upper part of the first factorial plan). Compared to Mariol, La Montagne samples formed a disperse cluster in the lower part of the factorial plan. Samples collected in April 2019, October to December 2019, January and February 2020 are associated with high concentrations of  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^-$ ,  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{PO}_4^{3-}$ . Most of the samples of La Montagne spring are related to high concentrations of  $\text{HCO}_3^-$  and high conductivity. Indeed, La Montagne waters have a conductivity that varies significantly contrary to Mariol (Table 1). While Mariol spring water emerges in a basin 50 cm above the ground, La Montagne spring water flows from a cavity on an abandoned building floor and can merge with streaming waters. As a consequence, we hypothesised that the variations in conductivity of this spring were linked to precipitations leading to spring waters more affected by dilutions.

Figure III-3 shows respectively the evolution of water conductivity and daily precipitations during the 18 months of sampling at La Montagne spring. When the daily

precipitations reach 5.4 mm in April 2019, the water conductivity decreases until 1138  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  while the maximum of water conductivity during the months before was 1849  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ . Since mid-October 2019 to February 2020, a rainy period occurred with daily precipitations high resulting in low conductivity ( $<800 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) except in mid-November. Considering the PCA (Figure III-2), the samples of April 2019, October to December 2019, January and February 2020 correspond to samples associated with this period of low conductivity, increased precipitations (Figure III-3) and also high concentrations of nitrates, phosphates, and sulphates (Figure III-2). However, the correlation between conductivity and precipitations on sampling day indicates that the relationship between these two variables is low (Coefficient of determination:  $R^2=0.231$ ,  $p\text{-value}=0.043$ ).



**Figure III-2.** Principal component analysis (PCA) shows the samples distribution based on physical and chemical variables of the Mariol and La Montagne site, monitored from July 2018 until June 2020. The Kruskal-Wallis test based on Cartesian coordinates of the samples points of the PCA validate statistical difference between samples of Mariol and La Montagne by the axis 2 ( $p < 0.0001$ ).

**Table III-1.** Physical variables (mean  $\pm$  SD) for La Montagne and Mariol springs considering the 18 months sampled.

Sites	Conductivity ( $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ )	pH (pH unit)	Dissolved oxygen (%)	Temperature ( $^{\circ}\text{C}$ )
<b>La Montagne</b>	1342.25 $\pm$ 541.48	6.47 $\pm$ 0.12	4.15 $\pm$ 3.04	17.03 $\pm$ 0.35
<b>Mariol</b>	842.85 $\pm$ 70.09	6.40 $\pm$ 0.11	14.37 $\pm$ 14.60	11.50 $\pm$ 1.48

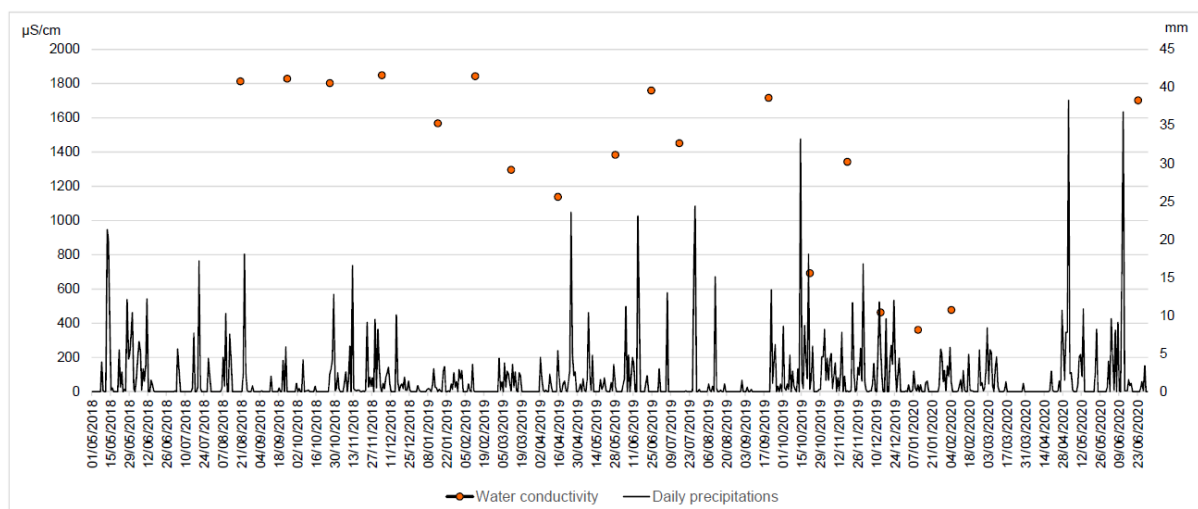
**Table III-2.** Concentrations ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) of ions (indicators of deep water and geological nature) (mean  $\pm$  SD) for each site.

Sites	$\text{Li}^{2+}$	$\text{Na}^{+}$	$\text{K}^{+}$	$\text{Mg}^{2+}$	$\text{Ca}^{2+}$	$\text{F}^{-}$	$\text{HCO}_3^{-}$
<b>La Montagne</b>	0.59 $\pm$ 0.59	118.56 $\pm$ 55.81	16.23 $\pm$ 8.29	27.92 $\pm$ 17.48	153.70 $\pm$ 74.67	1.38 $\pm$ 0.58	822.83 $\pm$ 410.06
<b>Mariol</b>	0.51 $\pm$ 0.02	144.87 $\pm$ 7.15	10.80 $\pm$ 2.69	4.01 $\pm$ 0.44	33.00 $\pm$ 3.33	4.75 $\pm$ 0.43	504.61 $\pm$ 54.15

**Table III-3.** Concentration ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) of pollutant ions (mean  $\pm$  SD) for each site.

Sites	$\text{Cl}^{-}$	$\text{NH}_4^{+}$	$\text{NO}_2^{-}$	$\text{NO}_3^{-}$	$\text{PO}_4^{3-}$	$\text{SO}_4^{2-}$
<b>La Montagne</b>	8.93 $\pm$ 9.00	0.34 $\pm$ 0.40	0.02 $\pm$ 0.00	3.41 $\pm$ 4.93	0.11 $\pm$ 0.07	12.31 $\pm$ 4.05
<b>Mariol</b>	2.82 $\pm$ 0.71	0.40 $\pm$ 0.37	0.02 $\pm$ 0.01	0.08 $\pm$ 0.05	0.04 $\pm$ 0.01	6.73 $\pm$ 0.48



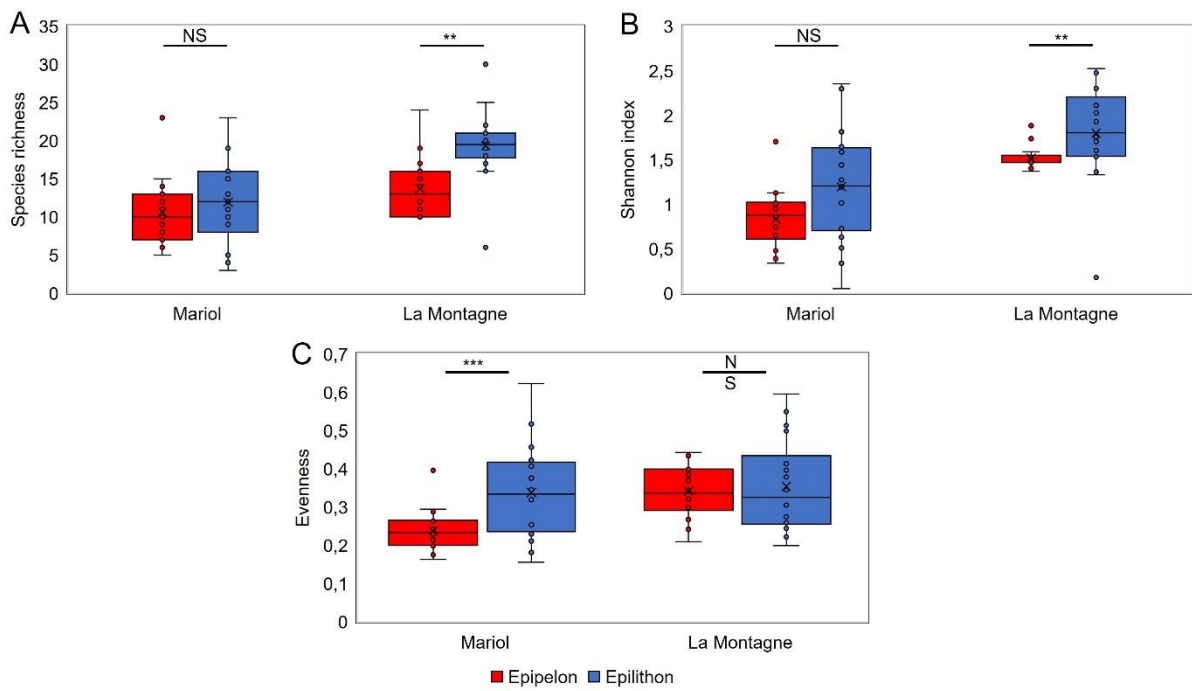


**Figure III-3.** Evolution of the daily precipitations and of water conductivity for the La Montagne mineral spring

### **Influence of substrate on diatom communities' diversity**

A total of 201 diatom taxa were identified on the two sites (Supplementary data 1). Species richness was respectively 168 and 134 for La Montagne and Mariol springs. Average species richness on epipellic samples were respectively 15 and 11 species for La Montagne and Mariol while epilithic richness was respectively, 19 and 12 (Figure III-4).

The results of Wilcoxon test on species richness and on Shannon index indicate significant difference between mud (epipelon) and pebble (epilithon) ( $p$ -value $<0.05$ ) at La Montagne when no difference was detected at Mariol ( $p$ -value $>0.05$ ) (Figure III-4). Diversity index allows to estimate the “uncaptured richness”. Shannon-Wiener diversity index takes into account the species richness and the evenness of diatoms. It varies between 0 and 1: 0 corresponds to a community where one species is totally dominant and 1 to a community where each species has similar repartition (Figure III-4). The results of Wilcoxon test on Evenness index show that there is significant difference between species due to differences of species abundances only at Mariol (Figure III-4).



**Figure III-4.** Boxplot showing (A) Species richness, (B) Shannon, and (C) Evenness diversity index for diatom communities living on two substrates (Epipelon (red) or Epilithon (blue)) at Mariol and La Montagne. Wilcoxon test: \*\*:  $p < 0.05$ , \*\*\*:  $p < 0.005$ , NS: non-significant.

At the two sites, 5 taxa had a relative abundance > 1%. At Mariol, diatom assemblages were dominated by *Planothidium frequentissimum* Lange-Bertalot, *Crenotia angustior* (Grunow) Wojtal and *Achnanthyidium rivulare* Potapova & Ponader (Table III-4). At La Montagne, the dominant species were *Planothidium frequentissimum*, *P. lanceolatum* (Brébisson ex Kützing) Lange-Bertalot, *Humidophila perpusilla* (Grunow) R.L.Lowe, Kociolek, J.R.Johansen, Van de Vijver, Lange-Bertalot & Kopalová and *Crenotia angustior* (Table III-4).

**Table III-4.** Relative abundances of the dominant species with an abundance >1% in at least one sample for Mariol and La Montagne springs.

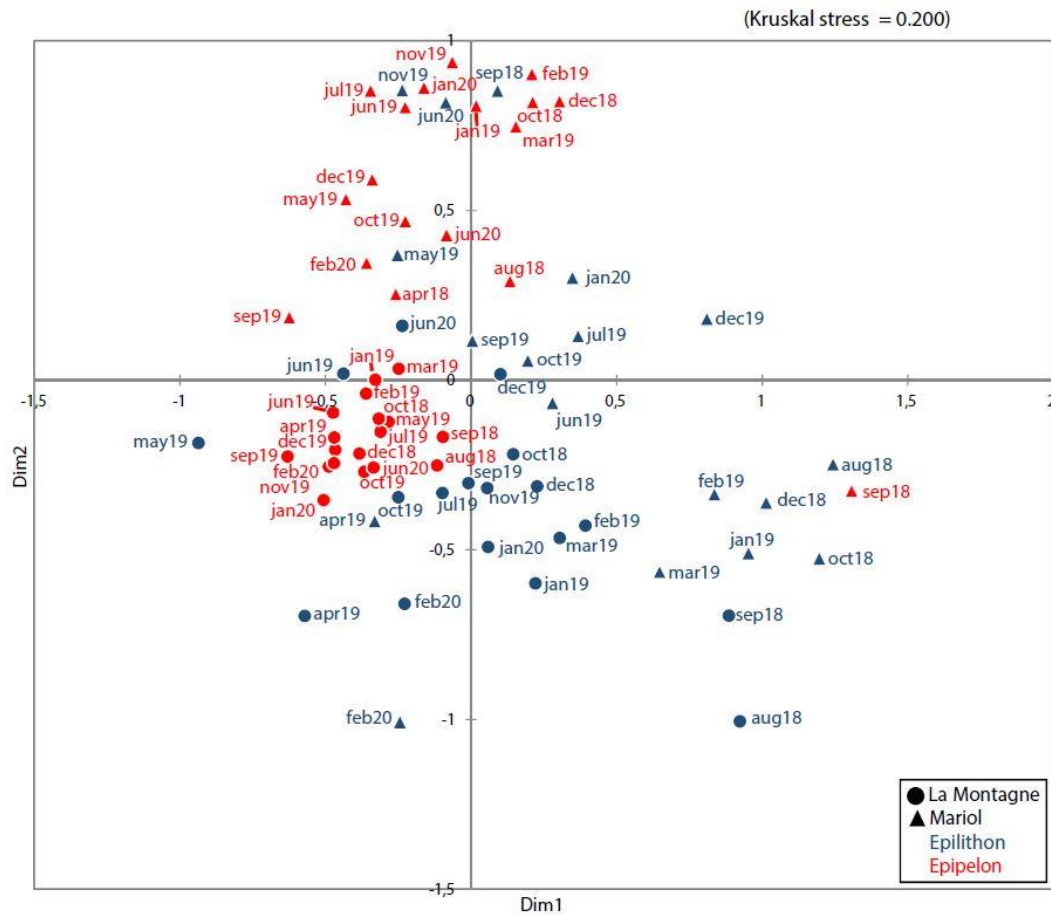
Species	La Montagne		Mariol	
	Epipelon	Epilithon	Epipelon	Epilithon
<i>Achnanthyidium rivulare</i>	-	-	-	12.0 %
<i>Crenotia angustior</i>	17.0 %	21.1 %	17.0 %	4.4 %
<i>Humidophila perpusilla</i>	23.0 %	11.3 %	-	-
<i>Planothidium frequentissimum</i>	45.4 %	11.3 %	71.6 %	40.0 %
<i>Planothidium lanceolatum</i>	3.7 %	-	-	-

The nMDS (Figure III-5) was performed based on ab.Jaccard matrix with species. Samples were projected in two dimensions and those with similar community structures are spatially close. Graphically, there is no clear distinction between the assemblages from pebble and mud. ANOSIM tests show a weak difference (\*:  $p \leq 0.05$ , \*\*:  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ ) between pebble and mud at La Montagne ( $R=0.28^{***}$  (jaccard) and  $R=0.32^{***}$  (ab.jaccard)), and also a similar result was obtained at Mariol ( $R=0.31^{***}$  (jaccard) and  $0.25^{***}$  (ab.jaccard)).

The Adonis tests (Table III-5) considering La Montagne or Mariol springs and both were performed to determine the percentage of variability explained by each factor. Significance of the ADONIS test results was indicated by \*:  $p \leq 0.05$ , \*\*:  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ . The analysis shows that the substrate factor contributed to 10.56 % \*\*\* (jaccard) or 30.72 %\*\*\* (ab.jaccard) of the variability at La Montagne, and 9.4 %\*\*\* (Jaccard) and 25.74%\*\* (ab.jaccard) at Mariol (Table III-5). The contribution of season factor was 12.15 %\* (jaccard) and 14.30 % (ab.jaccard) for La Montagne, and 8.5 % (jaccard) and 8.39 % (ab.jaccard) for Mariol. When the samples of Mariol and La Montagne were analysed together, location explained 10.14 % \*\*\* (jaccard) and 19.74%\*\*\* (ab.jaccard) when substrate explained 6.14 %\*\*\* (jaccard) and 18.47 %\*\*\* (with ab.jaccard) of the variability (Table III-5). Percentages of contribution of seasonality are similar when analysis were performed with jaccard distances (5.8% \*) or ab.jaccard distance (5.32 %) (Table III-5).

**Table III-5.** NPMANOVA (Adonis) results for unifactorial analysis of substrate, location and season variables made with Jaccard (JD) and ab.jaccard (ab.J) distances for Montagne and Mariol springs or the springs together performed on taxa with an abundance >1% in at least one sample. The significance of the results is indicated by (\*)  $p < 0.05$ , (\*\*)  $p < 0.01$ , (\*\*\*)  $p < 0.001$ .

Sites	La Montagne and Mariol		La Montagne		Mariol	
	R <sup>2</sup> (J)	R <sup>2</sup> (ab.J)	R <sup>2</sup> (J)	R <sup>2</sup> (ab.J)	R <sup>2</sup> (J)	R <sup>2</sup> (ab.J)
<b>Substrate (2 modalities)</b>	6.14 % ***	18.47 % ***	10.56 % ***	30.72 % ***	9.4 % ***	25.74 % **
<b>Season (4 modalities)</b>	5.85 % *	5.32 %	12.15 % *	14.30 %	8.5 %	8.39 %
<b>Location (2 modalities)</b>	10.14 % ***	19.74 % ***	-	-	-	-



**Figure III-5.** Non-metric multidimensional scaling (nMDS) ordination plot based on species composition of diatom communities for two substrates (Epilithon (blue) or Epipelon (red)) at Mariol and La Montagne springs. The matrix distances is based on ab.jaccard distances.

## Discussion

### Mariol and La Montagne are two different springs

The environmental variables measured at La Montagne and Mariol springs clearly reveals the specificity of each spring which is in accordance with their origin (Figure III-2). Mariol is characterised by high concentration of fluoride (Risler 1974). This observation is in line with the composition of the Vichy basin, where the fluoride concentration can reach  $9 \text{ mg.L}^{-1}$ . The Vichy basin springs are originated from the same deep reservoir where

the temperature is estimated at 135-150°C (Risler 1974). In contrast, higher carbonate concentrations are detected in La Montagne spring. This is a particularity of the Massif Central where there is a preponderance of bicarbonate rich waters (Risler 1974). Related to the high conductivity of La Montagne, this spring is more mineralised than Mariol. Considering the different variables, this last spring appears more stable. Indeed, the waters catchment in an elevated bowl leads to a more stable environment across the time at the spring emergence. At La Montagne, conductivity varies significantly over time linked to the precipitations. Indeed, when large episodes of precipitations as for example between October 2019 and February 2020 lead to decrease of conductivity due to spring water dilution. Furthermore, the increase of anthropogenic indicators ( $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ) in the samples from October 2019 to February 2020 shows that La Montagne is affected by human activities. In fact, Châteldon is an area where there are some agricultural lands. The configuration of La Montagne site is favourable to the mixing of spring water and the watershed that hosts livestock farming. The watershed upstream of La Montagne emergence appears to have a great influence on its water. According to the observations and measures at the two springs, La Montagne and Mariol are two springs with different characteristics and represent two distinct biotopes.

### **Substrate influence on richness**

In this study, two types of substrates were considered: epilithic communities were collected from pebble as hardened substrate, and epipelic communities from a mix of mud and litter (La Montagne) or a mix of travertine and litter (Mariol) as non-hardened. Previous works done on the influence of substrate on diatom communities suggest that specific richness was lower on pebble (Cantonati 1998; Cantonati and Spitale 2009; Lai et al. 2019b). However, at La Montagne the specific richness (S) is higher on epilithic communities (S=19) than epipelic ones (S=15) while it is similar on both substrates at Mariol. La Montagne and Mariol springs are two different biotopes with distinct configurations. As quoted before, La Montagne is a spring characterised by time-dependent physico-chemical properties due to disturbance by precipitations. The speculation that can be made is that in absence of great changes of physical and chemical

parameters, species richness seems to be more similar between substrates. Otherwise, when the biotope is less stable, the richness is higher on hard substrate than on non-hardened ones. This can be related to the topography of the substrate. For example, in La Montagne mud can be more sensitive to the water flows than pebbles. Close relationship between richness and the degree of biotope disturbance is documented in the literature (Odum and Barrett 1971; Dudgeon et al. 2006; Cantonati et al. 2012a). Additionally, there are more species at La Montagne than at Mariol which seems to be inconsistent with this last observation. In fact, heterogeneity of the environment is another parameter that needs to be taken into account. Stable and homogeneous environment displays less diversity (Ramade 2009). At Mariol, the absence of fluctuations of physical and chemical variables and its configuration suggest that this spring represents a stable and homogeneous biotope. This can explain the lower diversity observed at this spring.

### **Substrate influence on diatom communities**

At La Montagne spring, the diatom communities were mostly dominated by *Planothidium frequentissimum*, *Humidophila perpusilla*, *Crenotia angustior* and *P. lanceolatum*. *Planothidium frequentissimum* and *C. angustior* were also dominant at Mariol with *Achnantheidium rivulare*. The two springs show similarities through their dominant species. When studying the diatom communities of some springs in Auvergne (France) and Sardinia (Italy), Lai et al. (2019a) reported that *P. frequentissimum* was found in others springs of Auvergne and was also counted among the most abundant species in some of them. *Crenotia angustior* was present in springs of Europe like the Mofette spring which is in the south of Poland (Noga et al. 2018). *Humidophila perpusilla* colonised environment with low light intensity (Lange-Bertalot et al. 2017). *Achnantheidium rivulare* has affinity for water with relatively low calcium and high chloride concentrations (Potapova and Ponader 2004). *Achnantheidium rivulare* have different ecological preferences but is abundant in rivers with low-alkalinity and low phosphorus concentration (Potapova and Ponader 2004; Lange-Bertalot et al. 2017).

The nMDS was done on a dissimilarity matrix based on ab.jaccard index. No clear distinction of substrate samples was observed. In agreement with this result, the ANOSIM analyses completed with samples from the springs, show that there is a low difference between samples from different substrates. These results are similar to Potapova and Charles (2005) that demonstrates that algal assemblages are similar on hard substrate (rocks and wood) and soft substrates (sediments) in 551 Russian rivers samples. Stevenson and Hashim (1989) also demonstrate that there is no significant difference between epipellic, epipsammic and epiphytic diatom communities of two rivers in northern Michigan.

The Adonis test that consists in a permutation multivariate ANOVA (PMANOVA) completes the first results and determines which factors explain the best the communities variability. Location and season which are spatial and temporal factors known to influence the diversity were taken into account in a same ADONIS test. Jaccard dissimilarity index is used to compare taxonomic composition of two assemblages of community. Its operates with the number of species shared between the two assemblages and the number of unique species of each assemblage. The ab.jaccard distances (or Chao.jaccard) considers not only the taxonomic composition but also the species abundances and thus, evaluates similarities between samples diversity. Considering only the taxonomic composition of samples, substrate explained 6.14 % of the variance when location explained 10.1%. Location is the factor that better explained the difference of diatom assemblages composition between springs. As mentioned above, physical and chemical variables are different at Mariol and La Montagne springs making two different biotopes (Figure 2). The link between the PCA and the Adonis test suggests that environmental variables of the studied sites explained more the variability of diatom assemblages than the type of substrate. Cantonati and Spitale (2009) observed that environmental parameters explain 42% of the diatom assemblage variabilities when substrate explains only 3%. The sampling of 21 springs and streams in this study increases the statistical power and allows to conclude that macrohabitat which is the ecosystem's location and its abiotic factors have more impact on the variability of diatom assemblages than microhabitat such as the substrate type. Several studies have shown that environmental and spatial variables have more influence on diatom community variations than substrate (Soininen et al. 2004; Soininen 2007). Moreover, Sabater and Roca (1990) concluded that ionic composition of



spring is the major factor that determines diatom diversity as well as temperature, conductivity, alkalinity that reinforces the results. Season is the parameter that explains the variability the least well. The same conclusion was reached when Moresco and Rodrigues (2014) analysed periphytic diatoms of two Brazilian streams. The addition of species abundances allows the consideration of abundant and rare species in the samples dissimilarity computation. Interestingly, in this case, substrate explained 18.74 % and location 19.74 % of the variability. The percentage of contribution of each of these two factors increases with the addition of species abundances but location remains the factor that explains the most the variability between diatom communities. Also, the contribution percentages of these two factors became closer. This suggests that substrate can explain the difference between diatom communities' diversity as much as location. Townsend (2005) observed that communities were similar between rock and sand but abundances were different according to the substrate. These results suggest that substrate has less impact on diatom communities composition than location but has influence on species abundances. The comparison of species distributions at each site allowed to estimate the contribution of season and substrate in diatom communities' distribution.

However, several studies reported that species richness is higher during spring and summer. But others assume less seasonal effect (Cantonati and Pipp 2000). Seasonal effects on benthic diatoms were studied in river and led to the conclusion that the change of river flow related to season affects diatom community (Martínez de Fabricius et al. 2003). At La Montagne, seasonal effect was higher than at Mariol particularly with the jaccard index. Seasonality seems to contribute more than substrate to diatom assemblages composition. This could be related to the disturbance of La Montagne water by precipitations. The relation between precipitation frequency and season can explain the result that was obtained with the Adonis test. When comparing communities by taking account of the species abundances, season didn't contribute more than substrate to diatom community structuration. This observation is similar for the two springs studied.

## **Conclusion**

La Montagne and Mariol springs are two different biotopes and this is reflected in their diatom communities composition. Their physico-chemical particularities are linked to the geological origin of the underground water. Mariol is a more stable spring than La Montagne due to the absence of great fluctuations of physical parameters. In contrast, La Montagne spring shows conductivities that highly vary due to precipitations. Thus, this spring shows less stability of its waters. At La Montagne and Mariol springs, low difference between epipelagic and epilithic diatom communities is underlined. The variability of composition in diatom communities was better explained by the factor (location). When comparing the diversity of diatom communities, location is the factor that explained most of the variabilities between communities. Thus, environmental variables (summarised by Location) have significantly higher importance as drivers of diatom taxonomic composition than season and substrate, but the substrate seems to have influence on the species abundances as much as the location.

## **Acknowledgements**

This study was funded by a grant from the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS, NEEDS, project Acronym: DISCOVER). L.A.B. was supported by a Ph. D. grant from the CNRS. Funding for this research was partly provided to C.E.W. and L.E. in the framework of the project DIATOMS (LIST – Luxembourg Institute of Science and Technology). We acknowledge financial support from CNRS-INEE within the context of the Zone Atelier Territoires Uranifères. We also acknowledge the anonymous reviewer and Patrick Gasqui (INRAE, UR EpiA - Unité de Recherche d'Épidémiologie Animale, France) for their help and advises for the statistical analyses of the results.

## **Chapitre IV: Les bruits de fond radioactifs renforcés par l'activité naturelle des sources minérales ont-ils une influence sur la diversité des communautés de diatomées ?**

Au travers du chapitre précédent, il a été démontré que le choix du substrat collecté n'induit pas de biais pour étudier l'influence de la radioactivité sur les communautés de diatomées. Il a donc été possible de mener toute une série de travaux tels qu'envisagés initialement sans avoir à tenir compte de ce facteur. Le chapitre IV vise à explorer statistiquement si les bruits de fond radioactifs plus élevés dans les sources minérales ont une influence sur la diversité  $\alpha$  (richesse),  $\beta$  (diversité ou structure) et la composition taxonomique des communautés de diatomées.

Pour cela, les communautés de diatomées de 16 sources minérales du Massif central présentant un gradient de radioactivité ont été échantillonnées en octobre 2019. Ces communautés ont été analysées via une approche de metabarcoding en utilisant comme barcode une région de 312pb du gène chloroplastique *rbcL*. Cette approche rapide permet de connaître les amplicons de variants de séquences (ASV) présents dans les échantillons. Une fois ces données obtenues, il a alors été possible d'analyser les paramètres écologiques tels que la diversité  $\alpha$  et  $\beta$  en interaction avec les paramètres physico-chimiques et radiologiques des sources. Les résultats de cette étude ont été publiés dans la revue *Science of the Total Environment*, Volume 873, 162270.

# **Diatom DNA metabarcoding to assess the effect of natural radioactivity in mineral springs on ASV of benthic diatom communities.**

Lory-Anne Baker<sup>1,2,3\*</sup>, Aude Beauger<sup>2,3</sup>, Sofia Kolovi<sup>3,4</sup>, Olivier Voldoire<sup>2,3</sup>, Elisabeth Allain<sup>2,3</sup>, Vincent Breton<sup>3,4</sup>, Patrick Chardon<sup>3,4</sup>, Didier Miallier<sup>4</sup>, Céline Bailly<sup>5</sup>, Gilles Montavon<sup>3,5</sup>, Agnès Bouchez<sup>6</sup>, Frédéric Rimet<sup>6</sup>, Cécile Chardon<sup>6</sup>, Valentin Vasselon<sup>7</sup>, Luc Ector<sup>8 †</sup>, Carlos E. Wetzel<sup>8</sup>, David G. Biron<sup>1,3 †</sup>

<sup>1</sup> Université Clermont Auvergne, CNRS, LMGE, F-63000 Clermont–Ferrand, France ; <sup>2</sup> Université Clermont Auvergne, CNRS, GEOLAB, F-63000 Clermont-Ferrand, France ; <sup>3</sup> LTSER “Zone Atelier Territoires Uranifères”, Clermont-Ferrand, France <sup>4</sup> Université Clermont Auvergne, CNRS/IN2P3, Laboratoire de Physique de Clermont (LPC), UMR 6533, F-63178 Aubière cedex, France <sup>5</sup> Laboratoire SUBATECH, UMR 6457, IN2P3/CNRS/IMT Atlantique/Université de Nantes, 4, rue Alfred Kastler, BP 20722, 44307 Nantes cedex 3, France; <sup>6</sup> Université Savoie Mont-Blanc, INRAE, UMR CARTELE, 75 bis avenue de Corzent, FR-74200 Thonon-les-Bains, France; <sup>7</sup>Science-Management Interface for Biodiversity Conservation (SCIMABIO Interface),74200 Thonon-les-Bains, France<sup>8</sup>Luxembourg Institute of Science and Technology (LIST), Department Environmental Research and Innovation (ERIN), Observatory for Climate, Environment and Biodiversity (OCEB), 4422 Belvaux, Luxembourg;

\*Lory-Anne Baker, l-anne.baker@etu.uca.fr, Université Clermont Auvergne, CNRS,

UMR6023, LMGE, 63178 Aubière Cedex, France

## **Abstract**

Little is still known about the low dose effects of radiation on the microbial communities in the environment. Mineral springs are ecosystems than can be affected by natural radioactivity. These extreme environments are, therefore, observatories for studying the influence of chronic radioactivity on the natural biota. In these ecosystems we find diatoms, unicellular microalgae, playing an essential role in the food chain. The present study aimed to investigate, using DNA metabarcoding, the effect of natural

radioactivity in two environmental compartments (i.e. spring sediments and water) on the genetic richness, diversity and structure of diatom communities in 16 mineral springs in the Massif Central, France. Diatom biofilms were collected during October 2019, and a 312 bp region of the chloroplast gene *rbcL* (coding for the Ribulose Bisphosphate Carboxylase) used as a barcode for taxonomic assignation. A total of 565 amplicon sequence variants (ASV) were found. The dominant ASV were associated with *Navicula sanctamargaritae*, *Gedaniella* sp., *Planothidium frequentissimum*, *Navicula veneta*, *Diploneis vacillans*, *Amphora copulata*, *Pinnularia brebissonii*, *Halamphora coffeaeformis*, *Gomphonema saprophilum*, and *Nitzschia vitrea*, but some of the ASVs could not be assigned at the species level. Pearson correlation failed to show a correlation between ASV' richness and radioactivity parameters. Non-parametric MANOVA analysis based on ASVs occurrence or abundances revealed that geographical location was the main factor influencing ASVs distribution. Interestingly,  $^{238}\text{U}$  was the second factor that explained diatom ASV structure. Among the ASVs in the mineral springs monitored, ASV associated with one of the genetic variants of *Planothidium frequentissimum* was well represented in the springs and with higher levels of  $^{238}\text{U}$ , suggesting its high tolerance to this particular radionuclide. This diatom species may therefore represent a bio-indicator of high natural levels of uranium.

**Keywords:** diatom diversity, mineral springs, naturally occurring radioactivity, *rbcL*, metabarcoding, genetic variants

## Introduction

Since the formation of the Earth some 4.5 billion years ago, background radiation levels have varied spatially and temporally in the habitats of the planet (Karam, 2005). For at least 3.5 billion years, life has been evolving and adapting in ecosystems with different levels of natural radioactivity (Martell, 1992; Garzón, 2001). Currently, there are regions on the Earth where natural radioactivity can reach very high levels, such as India (Mohanty, 2004), Iran (Khodashenas, 2012) and Brazil (Oliveira, 1994). In Europe, median concentration of uranium in soils is estimated to be around  $2 \text{ mg.kg}^{-1}$ , with a range of

variation from less than 0.1 to more than 50 mg.kg<sup>-1</sup> (De Vos et al., 2006). In France, the highest concentrations are found in the Massif Central (a mountain range in the middle of France), where it can reach hundreds of mg.kg<sup>-1</sup> in granitic soil (Garnier-Laplace, 2010).

In the Massif Central, several mineral springs show significant levels of natural radioactivity (Jacquet, 1929; Boineau, 1972; Risler, 1974; Ielsch, 2017). This natural radioactivity comes from <sup>40</sup>K and the decay chains of three primordial radioelements <sup>235</sup>U, <sup>238</sup>U and <sup>232</sup>Th that are naturally present in the Earth's crust, especially in granitic rocks (Métévier, 2001). Because of its longer half-life (4,47 billion years), <sup>238</sup>U and its nuclear decay products (<sup>226</sup>Ra, <sup>222</sup>Rn, <sup>210</sup>Po) are today the most dominant radionuclides in mineral springs (Eróss et al., 2018; Rihs et al., 2000; Morais et al., 2022). They are  $\alpha$ -particle emitters, the most mutagen ionising radiation involved in radioactive stress mainly related to internal irradiation in cells. Thus, mineral springs in the French Massif Central are not only extreme environments due to their significant mineralisation levels, but also their high level of natural radioactivity.

Living organisms that inhabit these extreme environments have been evolving and adapting to these conditions. Such mineral springs are therefore interesting 'natural laboratories' in which to study the influence of mineralisation and natural radioactivity on biodiversity. These ecosystems are characterised by short food webs which could be interesting to study the effects of natural radioactivity on primary producers. Diatoms are part of the phytobenthos, and one of the main groups of primary producers in aquatic ecosystems, including mineral springs. Algae are known to be good indicator for radionuclides in aquatic environments and show differences in radionuclides tolerances between species due to their ecological variations (Pradhan, 2019; Banerjee, 2022).

The influence of radioactivity on diatoms can be studied at three ecological organizational levels, *viz.* individual, population and community levels (Stevenson, 2014; Pandey, 2017). Gross and Koczy, (1946) (cited in Driver, 1994) reported a severe reduction of diatom survival in a radioactive and experimental medium. In addition, some surveys have already been conducted to study the impact of radioactivity on the communities of diatoms in tailing waters (Ruggles, 1979 cited in Driver, 1994), brackish waters (Snoeijs and Notter, 1993), and in rivers (Herlory, 2013) and mineral springs (Millan, 2019). High

diatom species richness (>50) was found in springs with significant levels of radioactivity by Millan et al. (2019). This study also showed that high levels of  $^{222}\text{Rn}$  activities in mineral springs are correlated with higher rates of benthic diatom frustule deformations. All of these studies suggest that diatoms can resist high radioactivity levels but did not provide any information on the effect of radioactivity on the structure of diatom communities themselves.

In the present study, and in order to bring new insights at both population and community levels, DNA metabarcoding was employed to assess the effect of enhanced natural radioactivity of water and sediments on benthic diatom communities in several mineral springs of the Massif Central. To this end, a 312 bp region of the chloroplast gene *rbcL* (encoding for the Ribulose Bisphosphate Carboxylase Large) was used as a barcode for diatom species identification (Vasselon, 2017), a convenient marker for such discriminations (Mann, 2010; Kermarrec, 2014; Bailet, 2020). Following on from earlier published results of Millan et al. (2019), where species richness was high even in radioactive mineral springs, our main working hypothesis was that radioactivity is not a major factor that influences diatom genetic richness. Furthermore, because microbial species have different levels of resistance to ionising radiation (Shuryak, 2019), our second hypothesis was that radioactivity can influence diatom community structure because ionising radiation can shape the microbial community. In this light, a series of studies were performed in order to test these ideas empirically.

## **Material and methods**

### **Study sites and sampling**

The sampling campaign took place in autumn from the 15<sup>th</sup> to the 30<sup>th</sup> October 2019, where diatom samples were collected from a total of 16 mineral springs distributed in the Auvergne region of the French Massif Central (Fig. IV-1). The French Massif Central (over 85,000 km<sup>2</sup>) is influenced by oceanic, continental, and Mediterranean climates. It is composed of mountain reliefs, plateaus, and volcanoes (quiescent), where the Hercynian platform appears at the surface, surrounded by different sedimentary basins. Classically,

the many faults in the massif allow the circulation of water in the rocks and the emergence of this having travelled some distance across the earth's crust. The study sites (mineral springs) present a diversity of physical, chemical, and radiological characteristics including a three orders of magnitude gradient of natural radioactivity.

### **Sampling of diatom communities**

Benthic diatom samples were collected in the 16 mineral springs (Fig. IV-1). Since it was earlier demonstrated that the substrate has little influence on benthic diatom composition in mineral springs (Baker, 2022), the biofilm was recovered and considered to be the dominant substrate, representative of each of the springs sampled. In some springs, biofilm was collected by scrubbing the upper surface of rocks over which water flowed with a clean toothbrush. In others, biofilm was sampled by scraping the first millimetre or so of sediments from the spring basin. For each sample, the suspension in the was fixed with using  $\geq 70\%$  ethanol as required by European protocols for diatom metabarcoding procedures (CEN, 2018).

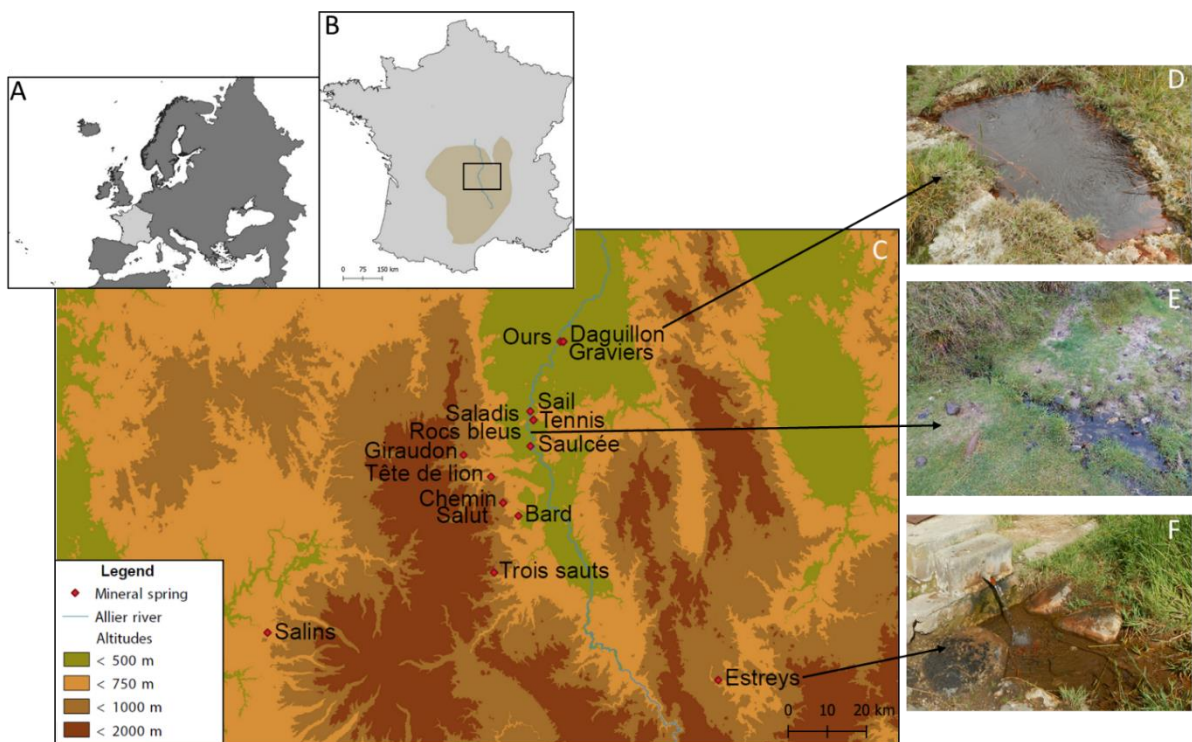
### **Physical and chemical analyses**

At the 16 spring sampling sites, water temperature ( $^{\circ}\text{C}$ ), conductivity ( $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) and pH (pH unit – Sorenson scale) were measured with a multi-parameter WTW probe FC 340i (VWR International, Radnor, PA, USA) by submerging the probe in the water. The percentage of dissolved oxygen (DO) was obtained with an Ysi ProODO oxygen probe (Yellow Springs Instruments, OH, USA). For chemical analyses, 200 mL of water was initially filtered with Whatman GF/C filters. For cation and anion analysis, a Thermo Scientific Dionex ICS1100 and a Thermo Scientific Dionex Aquion systems were used, respectively, to measure concentrations of the following ions (expressed as  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ): lithium ( $\text{Li}^+$ ), sodium ( $\text{Na}^+$ ), ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ), potassium ( $\text{K}^+$ ), magnesium ( $\text{Mg}^{2+}$ ), calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ), fluoride ( $\text{F}^-$ ), chloride ( $\text{Cl}^-$ ), nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ), nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) and phosphate ( $\text{PO}_4^{3-}$ ).



## Radiological and trace elements characterization

The activity of dissolved  $^{222}\text{Rn}$  in water samples collected using 1 L Marinelli beakers was measured on a well-shaped Germanium detector (GCW3523, Canberra, 35% relative efficiency) operated at Clermont Physics Laboratory (University Clermont Auvergne, Aubière, France) upon returning from the field. For other radiological analyses, water, and sediment samples were collected in clean vials from the water-column either near the emergence or at its outlet. Samples were transported to the laboratory under cold conditions in refrigerated boxes protected from light and heat.



**Figure VI-1:** Location map of the study sites. (A) Map of Europe, (B) Map of the Massif Central in France, (C) Map of the 16 mineral springs monitored in the Massif Central; photographs of some mineral springs (D, E, F). monitored.

Analyses were conducted at Subatech (Nantes, France) and ICN (Nice, France) laboratories. After PTFE filtration (0.45 $\mu$ m) and acidification of water samples (HNO<sub>3</sub> or HCl for Po analysis), uranium was analysed by ICP-QMS (Xseries 2, Thermo Electron). Ultra-trace concentrations of <sup>226</sup>Ra were measured without chemical purification by HR-ICP-MS in low-resolution mode (Element XR, Thermo Scientific) with an APEX-Q high sensitivity desolvating sample solution introduction system. In order to remove major polyatomic interferences from the spectrum of <sup>226</sup>Ra in low-resolution mode thereby potentially leading to inaccurate assessment of concentrations of this the commonest isotope of this highly radioactive element, preliminary water sample solution analyses were also performed in medium resolution mode where major interferences can be resolved. The observed consistency of <sup>226</sup>Ra activity measured in both low and middle resolution modes showed no significant evidence of the production of major interferences (Verlinde, 2019). Preference for use of the low-resolution mode was characterised by a high sensitivity (4.7 $\times$ 10<sup>5</sup> CPS/Bq. mL<sup>-1</sup>) and a low instrumental detection limit (0.8 mBq.L<sup>-1</sup>) for <sup>226</sup>Ra. Pb and Bi-based polyatomic interferences unresolved in low and medium resolution modes were not considered in the present study due to low signal intensities measured for Pb (< 60,000 CPS) and Bi (< 1 000 CPS). Lastly, <sup>210</sup>Po was measured after spontaneous deposition onto a silver disc, by alpha spectrometry using dual alpha spectrometers EG&G Ortec 576A equipped with boron-implanted silicon detectors (Le, 2019).

Sediment samples were sieved to 2mm and dried at 105°C. <sup>226</sup>Ra and <sup>228</sup>Ac were analysed using a  $\gamma$ -Spectrometer with coaxial hyperpure Ge detector (GX4519, Mirion, >45% relative efficiency at 1.33 MeV between 10 keV to 10 MeV) according to NF EN ISO 18589-3. Measurements were conducted at least four weeks after the sealing of the sample container to ensure the secular equilibrium between <sup>226</sup>Ra, <sup>222</sup>Rn, <sup>214</sup>Pb and <sup>214</sup>Bi. The data were then processed via LabSOCS™ Calibration Software. <sup>238</sup>U, <sup>232</sup>Th and trace elements were measured by ICP-QMS (Xseries 2, Thermo Electron) after microwave digestion (Ethos Easy Milestone) with concentrated HNO<sub>3</sub>, centrifugation at 2650g during 10 min, then PTFE filtration (0.45 $\mu$ m).

## **DNA extraction and PCR amplification for amplicons library preparation**

For each mineral spring, two sub-samples (duplicates) of 2 mL of biofilm were taken for DNA extraction. After homogenization by manually shaking of the raw material, samples were centrifuged at 13 000 rpm for 30 min. at 4°C to remove the supernatant (ethanol). Total genomic DNA was extracted from the pellet with the commercial DNA extraction kit Nucleospin for Soil (Macherey-Nagel, Düren, Germany). DNA quality of the samples was assessed by spectrophotometry using the NanoDrop ND-1000 (Nanodrop Technologies, Wilmington, Delaware). From each extraction duplicate, PCR amplifications targeting a 312 bp fragment of the marker gene *rbcL* were done on two groups of triplicates. Amplification was performed using the primers as described in Vasselon et al. (2017). Each PCR product group was pooled to provide a PCR duplicate per extraction replicate. In summary, four replicates per mineral spring were obtained. Library pools were sequenced on four Illumina MiSeq runs (2x250 bp paired-end V3) by GenoToul GeT-PlaGe platform (INRAE Genomics, Toulouse, France).

## **Analysis of diatom communities**

The sequencing platform performed the demultiplexing and provided two fastq files per mineral spring, one corresponding to forward reads (R1) and reverse reads (R2), respectively. The R package DADA2 was used for the amplicon sequence variant (ASV) from the demultiplexed MiSeq following the method described by Callahan et al. (2016). An average of 132,420 sequences per sample were obtained before using DADA2 to filter the sequences. Primers were removed from the R1 and R2 reads using CutAdap (Martin, 2011). Based on their quality profile, R1 and R2 reads were truncated to 200 and 170 bp, respectively. Reads with ambiguities and errors (maxEE) higher than 2 were eliminated. Then, chimeric sequences were removed from the samples, resulting in an average of 120,364 sequences per sample. Amplicon sequence variants (ASV) detected were assigned to taxa using version 10 of the curated reference database for diatoms Diat.barcode (Rimet, 2021) available at <https://doi.org/10.15454/D7FO2T>. ASV's not classified as Bacillariophyta were removed from the analysis. A total of 565 ASVs was

detected and assigned to the phylum of Bacillariophyta. Several species and genera were not assigned taxonomically to any known sequence, as is frequently the case in metabarcoding analyses (e.g. Rivera et al. 2020). Thus, an internal database of GEOLAB (that will be added to Diat.barcode) allowed the identification of some of the most abundant species belonging to the genus *Navicula* in springs, such as *N. sanctamargaritae* Beauger, using light microscopy.

The diversity data of all samples were exploited using the ‘Phyloseq’ package (McMurdie, 2013) in R version 4.1.2. The files obtained from the DADA2 data processing: ASVs table, taxonomy table and a table with the corresponding spring for each replicate were implemented in R to create a phyloseq object and facilitate data manipulation. Sample  $\alpha$ -diversity indices (ASV richness and Shannon–Wiener’s (Hill, 1973) diversity index) were calculated for each replicate of the biological samples using the function “estimate\_richness” (Fig. IV-2).

Replicates in metabarcoding allow better extrapolation of diatom diversity in mineral springs. To reduce the number of files to be analysed, replicates of the same spring were merged using the function “merge\_sample.” This function allows all ASVs present in the different replicates to be combined as effectively representative of one sample per spring. Relative abundances of species were calculated in each sample, and only species with an abundance  $\gg$  1% and representative of all the studied springs, were retained. The plot of the species composition for all samples was built with the ggplot2 package (Fig. VI-3). The ecology of the diatom species was determined using several diatom atlases, research papers and books (Cleve-Euler, 1953; Carter and Bailey-Watts, 1981; Hartley et al, 1986; Krammer et al, 1997a, 1997b, 2000a, 2000b, 2004; Krammer, 2000, 2002; Potatova and Hamilton, 2007; Lange-Bertalot 1979, 2001; Lange-Bertalot et al, 2011, 2017; Bey and Ector, 2013a, 2013b; Beauger et al, 2015; Levkov et al, 2016; Li et al, 2018).

## Statistical analysis

Prior to performing statistical analyses, radiological measures were modified in order to obtain the contribution of the spring. The limits of detection (LD) are very low and below the environmental background noise. For the statistical study, samples below the LD were set to "0". LD values were subtracted from all results.

Different statistical analyses were performed to test the effect of physical, chemical and radiological variables on the biotic data. As abiotic data (table S1, S2) did not follow a normal distribution, they were standardised using z-score normalisation  $((x - \text{mean}) / \text{standard deviation})$ . This transformation also allows comparison of variables that initially had different units. Forty-nine (49) abiotic variables were available from measures in water and sediments of the mineral springs monitored (Table S1, S2). To increase statistical robustness, collinearity tests were performed in parallel with principal component analyses (PCA), and thus the final dataset was reduced to 16 variables. These analyses were performed on the concentrations of major ions, trace elements and radionuclides. Variables with a cosine of less than 0.4 on both axes of the PCA were not retained. When two variables had a correlation coefficient  $>> 0.9$ , the variable with the higher cosine was retained as presented in Table 1. Thus, in the springs, some radiologic parameters were more important and showed more variation in the spring water or the sediment. Dissolved oxygen, conductivity, pH, and water temperature were added to the dataset due to their ecological importance for diatoms (Patrick, 1977). A final PCA was performed on the main environmental parameters selected in each spring.

The correlation between ASV richness and physico-chemical and radiological variables was tested by calculating Pearson correlation coefficient with XLSTAT 2020 version 5.1, to determine if these elements measured in our study influenced the number of diatom species in mineral springs (Table 2).

In order to extract further information from our analyses, the different diatom communities of mineral springs were compared. A matrix of dissimilarities based on Jaccard dissimilarity index (Jaccard 1901) was generated with the function `vegdist` of the R package "Vegan" (Oksanen et al., 2013, version 2.5–7). This index only takes into

account the absence/presence of species, so a second matrix with the abundance-based Jaccard dissimilarity index “ab.Jaccard” (or chao jaccard) described in Chao et al. (2006) was also generated. The function “dist.lcd” of the package “Adespatial” version 0.3–14 (Dray et al. 2012) was used to generate a dissimilarity matrix with this second index. The individual influence of five environmental and radiological factors such as “Geographical location”, “ $^{238}\text{U}$ ”, “ $^{222}\text{Ra}$ ”, “ $^{210}\text{Po}$ ”, “ $^{228}\text{Ac}$ ” activities level on diatom community diversity in springs were determined (Table S3) with a non-parametric MANOVA analysis [i.e. ADONIS (Permutational MANOVA)] based on Jaccard and “ab. Jaccard” dissimilarity indices using the function Adonis of the vegan R package. The “geographical location” represents not only springs that belong to the same geographical area but also to similar hydrogeological contexts linked to the fault system and the geological layers associated. The radioactivity classes for four radionuclide variables (i.e.  $^{222}\text{Rn}$ ,  $^{238}\text{U}$ ,  $^{226}\text{Ra}$ ,  $^{210}\text{Po}$  level,  $^{228}\text{Ac}$ ) were determined from the orders of magnitude observed for these variables in the sediments of the sampled springs (Table 1). For  $^{238}\text{U}$  and  $^{226}\text{Ra}$  activities, three classes were determined by: Low: activity  $< 0.01 \text{ Bq.L}^{-1}$ ; Medium:  $0.01 \text{ Bq.L}^{-1} \leq \text{activity} \leq 0.1 \text{ Bq.L}^{-1}$ ; High: activity  $> 0.1 \text{ Bq.L}^{-1}$  and Low: activity  $< 0.1 \text{ Bq.g}^{-1}$ ; Medium:  $0.1 \text{ Bq.g}^{-1} \leq \text{activity} \leq 1 \text{ Bq.g}^{-1}$ ; High: activity  $> 1 \text{ Bq.g}^{-1}$  respectively. Similarly,  $^{210}\text{Po}$  activity levels were Low: activity  $< 0.00001 \text{ Bq.L}^{-1}$ ; Medium:  $0.00001 \text{ Bq.L}^{-1} \leq \text{activity} \leq 0.0001 \text{ Bq.L}^{-1}$ ; High: activity  $> 0.0001 \text{ Bq.L}^{-1}$ . For  $^{228}\text{Ac}$  activity levels, the classes were: Low: activity  $< 1 \text{ Bq.g}^{-1}$ ; Medium:  $1 \text{ Bq.g}^{-1} \leq \text{activity} \leq 10 \text{ Bq.g}^{-1}$ ; High: activity  $> 10 \text{ Bq.g}^{-1}$ .

Further correlations between the 14 most abundant species and physico-chemical and radiological variables were computed with XLSTAT 2020 version 5.1. The difference of ASV structure between radioactivity classes (Table S3) was estimated using the Multi-Response Permutation Procedure (MRPP) (Zimmerman, 1985, Mielke, 1991). MRPP is non-parametric, multivariate approach that tests the null hypothesis that two or more predefined groups are not different in species composition (here, predefined groups are geographical location and  $^{238}\text{U}$ ,  $^{226}\text{Ra}$ ,  $^{210}\text{Po}$ ,  $^{228}\text{Ac}$  activities). The computed MRPP statistic delta ( $\delta$ ) represents the overall weighted mean of within-group means of pairwise dissimilarities among plots. In addition, the chance-corrected within-group agreement A statistic was computed (A = 0 means that in-group and out-group heterogeneities are equal; A = 1 means that all members of each group are identical and different from the members of other groups). This analysis was complemented with an Indicator Species

Analysis (ISA) (Dufrêne and Legendre's, 1997; McGeoch and Chown, 1998) again using the vegan R package.

## Results

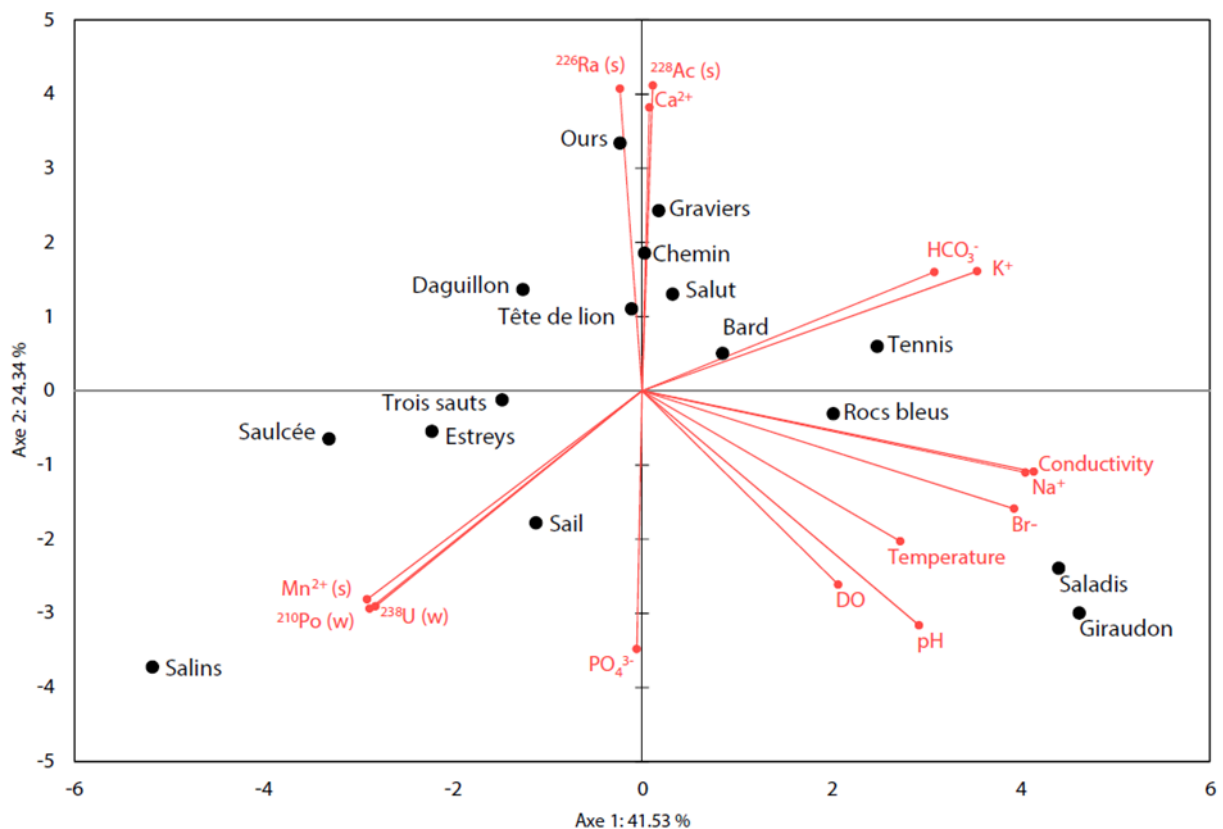
### Environmental variables in mineral springs

The physical, chemical, and radiological characteristics of the studied mineral spring sites are reported in Table VI-1. Conductivity of the mineral springs varied between 3090 and 9680  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  (mean of  $5682.56 \pm 1693.30 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). pH did not display significant variations among the mineral springs (mean  $\pm$  SD:  $6.9 \pm 0.3$ ). The mean water temperature of the studied mineral springs was  $16.6 \pm 3.6$  °C. Mineral springs were not well oxygenated with a mean value of  $22.3 \pm 3.6$  %. Concentrations of  $\text{Na}^+$  and  $\text{HCO}_3^-$  are high in mineral springs with an average of  $939 \pm 361 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  and  $2318 \pm 516 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  respectively. In the water,  $^{238}\text{U}$  activity varied between detection limit ( $2.5 \text{ mBq}\cdot\text{L}^{-1}$ ) and  $0.193 \text{ Bq}\cdot\text{L}^{-1}$  and  $^{210}\text{Po}$  varied between 9 and  $392 \mu\text{Bq}\cdot\text{L}^{-1}$ . In the sediments,  $^{226}\text{Ra}$  activity variation extended on almost two orders of magnitude, from 0.56 to  $52.1 \text{ Bq}\cdot\text{g}^{-1}$ . Lastly, , considering all the springs,  $^{228}\text{Ac}$  varied between detection limit ( $45 \text{ mBq}\cdot\text{L}^{-1}$ ) and  $28.8 \text{ Bq}\cdot\text{g}^{-1}$ .

Analysis of the data sets using PCA (Fig. VI-2) shows the distribution of springs based on their physical, chemical and radiological parameters. Axis 1 and 2 explained, respectively, 41.53 % and 24.34 % of the data variability. Overall, PCA allows identification of four groups. Thus, in the top quadrant, the springs for which the  $^{226}\text{Ra}$  activity is significant, include Daguillon, Graviers, Ours, Tennis and Tête de lion. Also, Chemin, Graviers, Ours, Salut, Saulcée, Tennis and Tête de lion are represented by higher  $^{228}\text{Ac}$  activity. Bard, Saladis, Giraudon and Tennis springs show higher  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{HCO}_3^-$  and  $\text{K}^+$  concentrations. In the lower left quadrant, Estreys, Sail, Salins, Saulcée and Trois sauts show high  $^{210}\text{Po}$ ,  $^{238}\text{U}$  activities and  $\text{Mn}^{2+}$  and  $\text{PO}_4^{3-}$  concentrations. In the lower right quadrant, Giraudon, Rocs bleus, Saladis are associated with higher temperature, conductivity, pH and DO and also with high  $\text{Br}^-$  and  $\text{Na}^+$  concentrations.

## Influence of physical, chemical and radiological factors on ASV richness

A total of 565 ASV were detected. Figure VI-3 shows the number of ASVs observed and Shannon's diversity index obtained for each mineral spring using the four technical replicates. The number of ASVs ranged from 6 and 74 with a mean  $29 \pm 17$ . The mineral spring with the most of ASVs was "Salut" (i.e.  $74 \pm 7$ ) and the lowest "Salins" (i.e.  $8 \pm 1$ ). In terms of Shannon's diversity index, the richest spring was "Chemin" (i.e.  $2.38 \pm 0.04$ ), the poorest "Tennis" (i.e.  $0.18 \pm 0.09$ ). There was no significant correlation between ASV richness and physico-chemical or radiological ( $^{238}\text{U}$ ,  $^{226}\text{Ra}$ ,  $^{210}\text{Po}$ ,  $^{228}\text{Ac}$  activities) parameters (Table 2).



**Figure VI-2:** Principal component analysis (PCA) shows the springs' distribution based on physical, chemical and radiological variables measured in water (w) or sediments (s).

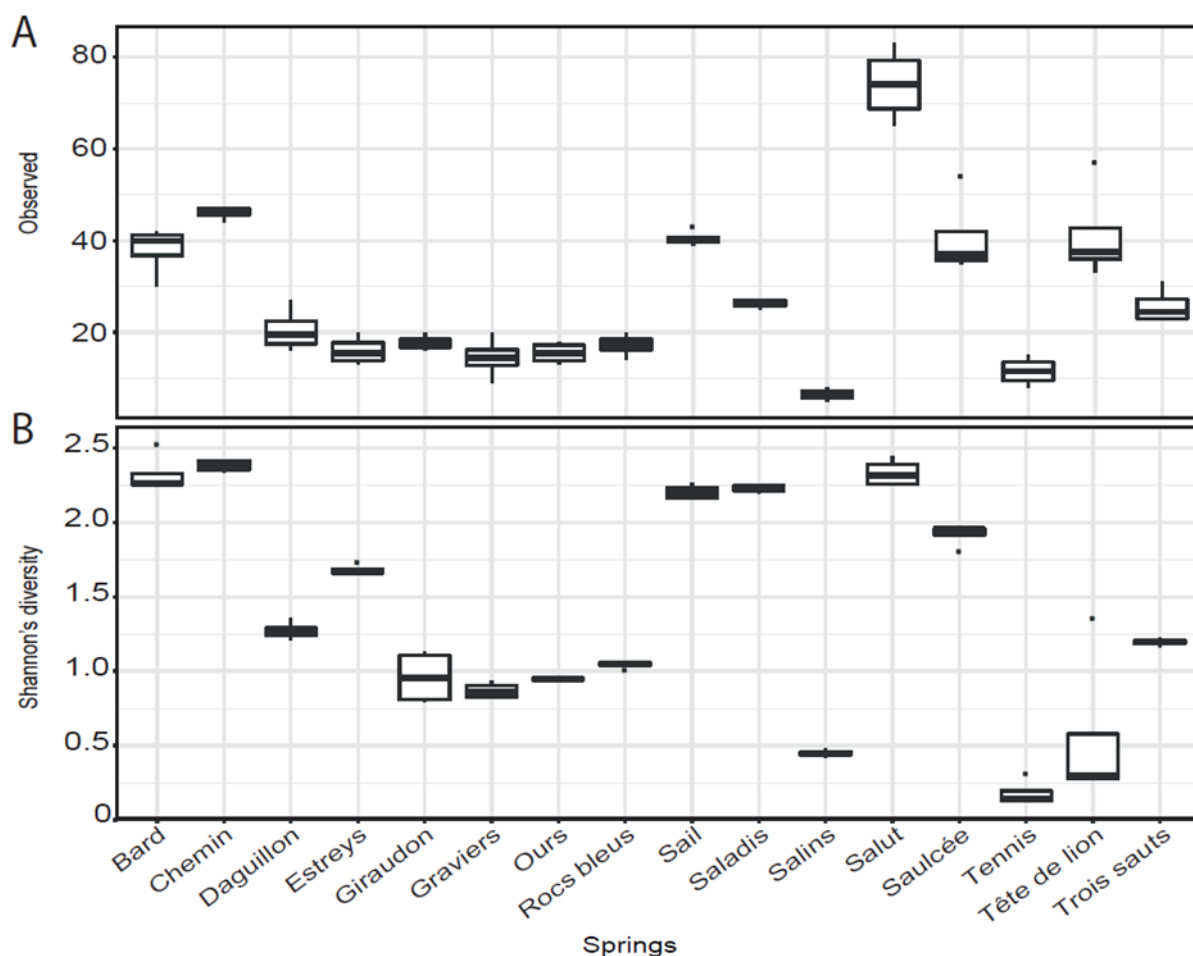


**Table VI-1:** Physical, chemical and radiological variables measured at the mineral springs monitored in the Massif Central (France) after the selection of variables with stepwise followed by the subtraction of detection limits (DL). Cond: conductivity; DO: dissolved oxygen; Temp: Temperature. <sup>238</sup>U; <sup>210</sup>Po <sup>226</sup>Ra; <sup>228</sup>Ac expressed radionuclides activity in spring water (w) or sediments (s).

Springs	Na <sup>+</sup> (mg.L <sup>-1</sup> )	K <sup>+</sup> (mg.L <sup>-1</sup> )	Ca <sup>2+</sup> (mg.L <sup>-1</sup> )	Br <sup>-</sup> (mg.L <sup>-1</sup> )	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (mg.L <sup>-1</sup> )	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg.L <sup>-1</sup> )	Cond (μS.cm <sup>-1</sup> )	pH	DO (%)	Temp (°C)	<sup>238</sup> U (w) (Bq.L <sup>-1</sup> )	<sup>226</sup> Ra (s) (Bq.g <sup>-1</sup> )	<sup>210</sup> Po (w) (μBq.L <sup>-1</sup> )	<sup>228</sup> Ac (s) (Bq.g <sup>-1</sup> )	Mn <sup>2+</sup> (s) (mg.g <sup>-1</sup> )
<b>Bard</b>	1,028.88	185.88	233.76	1.88	0.12	3,012	6,380	6.81	3.1	14.7	0	2.2	0	0.6	0.33
<b>Chemin</b>	990.42	179.01	202.55	1.72	0.09	2,515	4,860	6.41	15.3	14.2	0.002	10.8	0	26.1	0.24
<b>Daguillon</b>	503.16	112.22	297.06	0.56	0.13	2,142	4,030	6.6	29	13.9	0	23.0	0	4.6	0.30
<b>Estreys</b>	504.61	45.10	128.21	1.65	0.11	1,185	3,480	6.38	16.4	16	0.012	1.9	17	0.0	0.40
<b>Giraudon</b>	1,787.50	189.50	151.28	4.91	0.70	2,814	9,201	7.51	54	32.1	0	4.2	0	5.9	0.24
<b>Graviers</b>	823.10	159.59	381.87	1.66	0.13	2,730	5,430	6.69	19.5	14.4	0	26.7	0	17.9	0.39
<b>Ours</b>	713.30	146.24	313.27	1.20	0.16	2,648	5,490	6.72	13.8	13.7	0	52.1	0	28.7	0.11
<b>Rocs bleus</b>	1,396.77	144.23	255.14	3.68	0.06	2,696	8,150	7	9.3	19.2	0	0.6	0	0.1	0.16
<b>Sail</b>	686.62	83.46	85.67	1.13	0.54	1,150	5,390	7.02	9.2	16.6	0.004	0.8	0	0.0	0.32
<b>Saladis</b>	1,813.91	197.52	112.55	4.09	0.05	2,928	9,680	7.82	88.6	16.1	0	1.2	0	0.1	0.17
<b>Salins</b>	291.27	53.52	204.16	0.23	0.53	1,948	3,090	6.83	20.1	13.3	0.193	0.8	382	0.4	9.32
<b>Salut</b>	1,041.30	189.46	179.92	1.67	0.09	2,740	5,850	6.46	11.7	12.1	0	9.5	0	12.8	0.10
<b>Saulcée</b>	464.48	67.75	173.14	0.95	0.05	1,412	3,420	6.66	26	14.4	0.082	19.3	158	11.7	5.35
<b>Tennis</b>	1,408.88	154.92	281.91	3.34	0.09	2,778	8,380	7.05	8.9	27.1	0	21.6	0	11.9	0.11
<b>Tête de lion</b>	768.30	147.04	239.54	1.62	0.08	2,454	4,200	6.99	18.9	14.4	0	15.9	0	12.9	0.41
<b>Trois sauts</b>	803.89	69.23	135.35	0.89	0.06	1,940	3,890	6.66	12.8	13.1	0.004	2.1	0	1.1	0.53

**Table VI-2:** Pearson correlation coefficient (R) between ASV richness of benthic diatom communities and the physical, chemical and radiological variables measured in studied mineral springs of the Massif Central (N=16). ASV: Amplicon sequence variant richness, Cond: Conductivity, DO: Dissolved oxygen, Temp: Temperature, <sup>238</sup>U; <sup>210</sup>Po <sup>226</sup>Ra; <sup>228</sup>Ac expressed radionuclides activity in spring water (w) or sediments (s). Values in bold are significant p-value ( $\alpha = 0.05$ ).

	ASV	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Br <sup>-</sup>	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Cond	pH	DO	Temp	<sup>238</sup> U (w)	<sup>226</sup> Ra (s)	<sup>210</sup> Po (w)	<sup>228</sup> Ac (s)	Mn <sup>2+</sup> (s)
ASV	<b>1</b>	-0.01	0.29	-0.32	-0.15	-0.23	0.01	-0.11	-0.26	-0.15	-0.36	-0.25	-0.15	-0.25	0.18	-0.21
Na <sup>+</sup>	-0.01	<b>1</b>	<b>0.75</b>	-0.13	<b>0.95</b>	0.05	<b>0.68</b>	<b>0.96</b>	<b>0.73</b>	<b>0.53</b>	<b>0.66</b>	-0.49	-0.23	-0.48	-0.08	<b>-0.50</b>
K <sup>+</sup>	0.29	0.75	<b>1</b>	0.27	<b>0.63</b>	-0.12	<b>0.90</b>	<b>0.73</b>	0.40	0.30	0.29	<b>-0.54</b>	0.13	-0.52	0.35	<b>-0.55</b>
Ca <sup>2+</sup>	-0.32	-0.13	0.27	<b>1</b>	-0.12	-0.29	0.48	-0.03	-0.25	-0.32	-0.07	-0.10	<b>0.70</b>	-0.08	<b>0.53</b>	-0.09
Br <sup>-</sup>	-0.15	<b>0.95</b>	<b>0.63</b>	-0.12	<b>1</b>	0.13	<b>0.56</b>	<b>0.93</b>	<b>0.73</b>	<b>0.52</b>	<b>0.78</b>	-0.42	-0.24	-0.41	-0.14	-0.43
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	-0.23	0.05	-0.12	-0.29	0.13	<b>1</b>	-0.17	0.11	0.35	0.15	0.47	0.35	-0.25	0.34	-0.24	0.30
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0.01	<b>0.68</b>	<b>0.90</b>	0.48	<b>0.56</b>	-0.17	<b>1</b>	0.67	0.37	0.22	0.26	-0.35	0.19	-0.33	0.30	-0.36
Cond	-0.11	<b>0.96</b>	<b>0.75</b>	-0.03	<b>0.93</b>	0.11	<b>0.67</b>	<b>1</b>	<b>0.77</b>	0.48	<b>0.68</b>	-0.45	-0.13	-0.43	-0.11	-0.46
pH	-0.26	<b>0.73</b>	0.40	-0.25	<b>0.73</b>	0.35	0.37	<b>0.77</b>	<b>1</b>	<b>0.73</b>	<b>0.56</b>	-0.09	-0.24	-0.08	-0.34	-0.09
DO	-0.15	<b>0.53</b>	0.30	-0.32	<b>0.52</b>	0.15	0.22	0.48	<b>0.73</b>	<b>1</b>	0.26	-0.02	-0.16	-0.01	-0.19	-0.01
Temp	-0.36	<b>0.66</b>	0.29	-0.07	<b>0.78</b>	0.47	0.26	<b>0.68</b>	<b>0.56</b>	0.26	<b>1</b>	-0.20	-0.12	-0.20	-0.13	-0.21
<sup>238</sup> U (w)	-0.25	-0.49	<b>-0.54</b>	-0.10	-0.42	0.35	-0.35	-0.45	-0.09	-0.02	-0.20	<b>1</b>	-0.17	<b>1</b>	-0.20	<b>0.99</b>
<sup>210</sup> Po (w)	-0.25	-0.48	<b>-0.52</b>	-0.08	-0.41	0.34	-0.33	-0.43	-0.08	-0.01	-0.20	<b>1</b>	-0.16	<b>1</b>	-0.19	<b>0.99</b>
<sup>226</sup> Ra (s)	-0.15	-0.23	0.13	<b>0.70</b>	-0.24	-0.25	0.19	-0.13	-0.24	-0.16	-0.12	-0.17	<b>1</b>	-0.16	<b>0.79</b>	-0.14
<sup>228</sup> Ac (s)	0.18	-0.08	0.35	0.53	-0.14	-0.24	0.30	-0.11	-0.34	-0.19	-0.13	-0.20	0.79	-0.19	<b>1</b>	-0.17
Mn <sup>2+</sup> (s)	-0.21	<b>-0.50</b>	<b>-0.55</b>	-0.09	-0.43	0.30	-0.36	-0.46	-0.09	-0.01	-0.21	<b>0.99</b>	-0.14	<b>0.99</b>	-0.17	<b>1</b>



**Figure VI-3:** Boxplot showing the mean of (A) ASV richness corresponding to benthic diatom species richness and (B) Shannon's diversity for each technical replicate (N=4) of the mineral springs monitored in the Massif Central (France).

### **Influence of environmental and radiological factors on diatom communities' structure**

The contribution of several environmental factors, including radiological parameters, to the variability of diatom communities in mineral springs was determined using an Adonis test (Table VI-3). These contributions were calculated by taking into account the ASVs shared between samples (Jaccard) and the abundance of these ASVs (ab.Jaccard). The geographical location of the mineral springs explains, respectively, 47.0 % (Jaccard) and 53.5% (ab.Jaccard) of the ASV variability. For the radiological

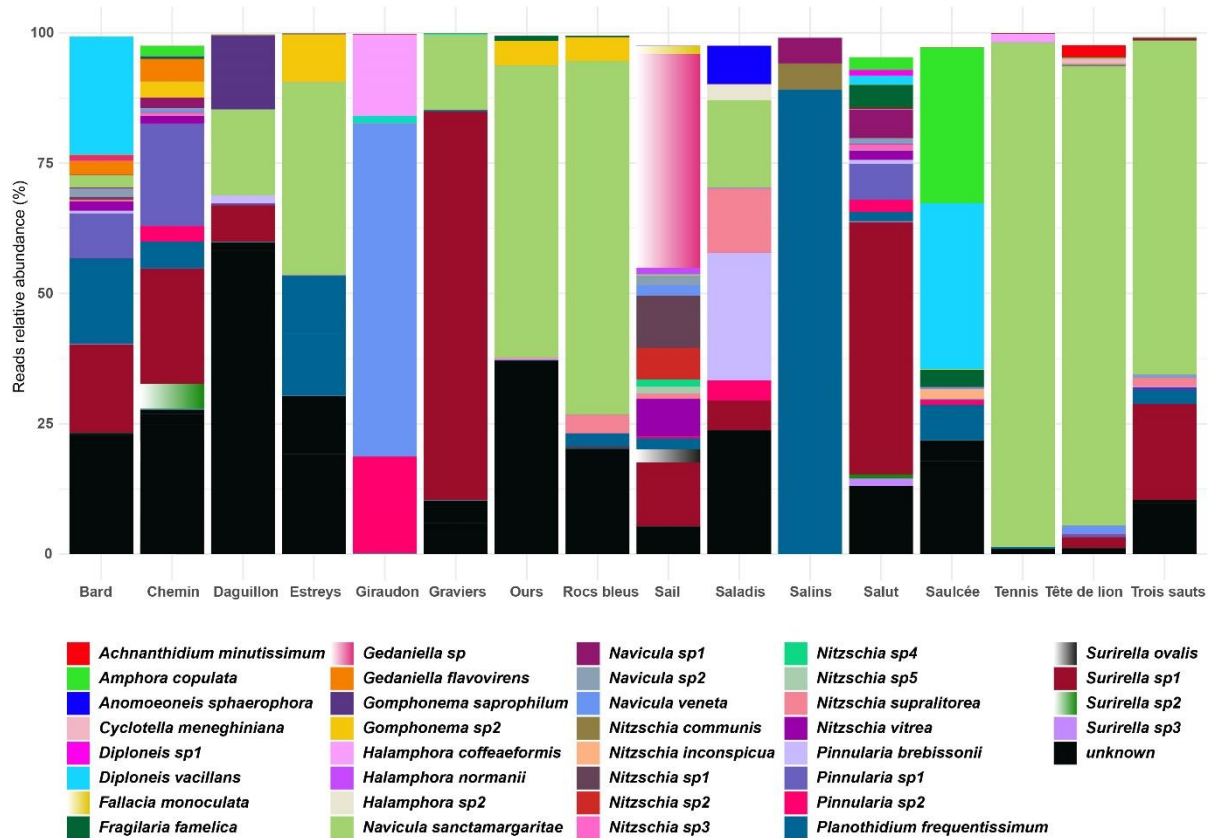
parameters,  $^{238}\text{U}$  activities in the spring water explains 17.2 % (Jaccard) and 38.6 % \* (ab.Jaccard) of the variability while its descendant  $^{226}\text{Ra}$  activity in the spring sediments explains 10.7 % (Jaccard) and 7.7 % (ab.Jaccard).  $^{210}\text{Po}$  activities in the springs' water contributes to 5.6 % (Jaccard) and 0 % (ab.Jaccard) of the variability while  $^{228}\text{Ac}$  activities in the springs sediments explains 13.3 % (Jaccard) and 3.5 % (ab.Jaccard) of this variability.

**Table VI-3:** Non-parametric Multivariate Analysis of Variances (NPMANOVA or Adonis) results for unifactorial analysis of location,  $^{238}\text{U}$ ,  $^{226}\text{Ra}$ ,  $^{210}\text{Po}$  and  $^{228}\text{Ac}$  activity levels in spring water (w) or sediments (s), made with Jaccard (J) and ab.Jaccard (ab.J) distances performed on ASV matrix with relative abundances. The matrix contains only ASV with a relative abundance of more than 2% in at least one sample of the mineral springs monitored in the Massif Central (N=16). Significant p-value is indicated with (\*).

Factors	R <sup>2</sup> (J)	R <sup>2</sup> (ab.J)
<b>Location</b>	47.01 %	53.53 %
<b><math>^{238}\text{U}</math> activity level (w)</b>	17.18 %	38.59 % *
<b><math>^{226}\text{Ra}</math> activity level (s)</b>	10.69 %	7.74 %
<b><math>^{210}\text{Po}</math> activity level (w)</b>	5.64 %	0
<b><math>^{228}\text{Ac}</math> activity level (s)</b>	13.34 %	3.45 %

### **Taxonomic composition of diatom communities in mineral springs**

Sixty percent of the ASVs were assigned to a diatom genus, forty-two percent to a species. Fifty-two genera were determined of which only 22 were associated to ASVs with read



**Figure VI-4:** Taxonomic composition of diatom communities for the mineral springs monitored in the Massif Central based on DNA metabarcoding results for the *rbcL* chloroplast gene. Only species with reads relative abundances above 1% are represented.

abundance > 10 % in all samples. The dominant genera were *Achnantheidium*, *Amphora*, *Anomoeoneis*, *Caloneis*, *Craticula*, *Cyclotella*, *Diatoma*, *Diploneis*, *Epithemia*, *Fallacia*, *Fistulifera*, *Fragilaria*, *Gedaniella*, *Gomphonema*, *Halamphora*, *Mayamaea*, *Navicula*, *Nitzschia*, *Pinnularia*, *Planothidium*, *Sellaphora*, *Surirella*. The most dominant ASV (relative abundance above 1% in at least on sample) were assigned to 32 diatom species (Figure VI-4): 69% of the diatom species are freshwater species, 17% found in both freshwater and marine ecosystems, 7% in brackish water, and 7% in marine habitats. Among the 20 dominant ASVs, some could not be assigned to a species and belong to the genera *Gomphonema*, *Navicula*, *Pinnularia* and *Surirella*. The other dominant assigned species are *Navicula sanctamargaritae*, *Gedaniella* sp., *Planothidium frequentissimum*, *Navicula veneta*, *Diploneis vacillans*, *Amphora copulata*, *Pinnularia brebissonii*, *Halamphora coffeaeformis*,

*Gomphonema saprophilum* and *Nitzschia vitrea*. Different ASVs were assigned to the same diatom species suggesting the presence of genetic variants.

Pearson correlations between the abundance of the 14 dominant ASVs and the physical, chemical and radiological parameters were determined (Table VI-S4). All significant correlations were positive. Na<sup>+</sup> was correlated with *Pinnularia* sp2 (R<sup>2</sup>=0.60), which also correlated with several parameters as PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> (R<sup>2</sup>=0.60), conductivity (R<sup>2</sup>=0.52), pH (R<sup>2</sup>=0.51), DO (R<sup>2</sup>=0.54), temperature (R<sup>2</sup>=0.71). *Navicula veneta* correlated with PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> (R=0.68) and temperature (R<sup>2</sup>=0.76). *Pinnularia brebisonii* with pH (R<sup>2</sup>=0.65) and DO (R<sup>2</sup>=0.83). The genetic variant A of *Planothidium frequentissimum* correlated with <sup>238</sup>U activity in water (R<sup>2</sup>=0.91) and <sup>210</sup>Po activity in water (R<sup>2</sup>=0.91), but no correlation was found for the genetic variant B.

Additional analyses (MRPP; Table VI-4) showed that there is a significant difference in ASV composition between samples with different location (with Jaccard matrix: A=0.146, p=0.002) and different <sup>238</sup>U activity levels (in water) (with ab.Jaccard matrix: A=0.230, p=0.004). No significant differences were found between ASV composition for the different levels of the other radionuclides. The Indicator Species Analysis revealed that the ASV of the genetic variant A of *Planothidium frequentissimum* was associated with high level of <sup>238</sup>U (in water) (R<sup>2</sup>=0.998, p=0.01).

## **Discussion**

This study provides the first analysis of diatom communities living in mineral springs using DNA metabarcoding to assess the influence of enhanced natural radioactivity on these assemblages. These extreme aquatic environments in effect comprise a field laboratory in which to assess the contribution of natural radioactivity through radionuclides' activity on diatom community structure. From this, two hypotheses were posited: (1) that radioactivity is not a factor that particularly influences diatom genetic richness; and (2), that radioactivity is a factor that can influence diatom community structure.

**Table VI-4:** Multiple Response Permutation Procedure (MRPP) results for analysis of differences of community structure between sample group of location,  $^{238}\text{U}$ ,  $^{226}\text{Ra}$ ,  $^{210}\text{Po}$  and  $^{228}\text{Ac}$  activity levels in spring water (w) or sediments (s) made with Jaccard (J) and ab.Jaccard (ab.J) distances performed on ASV matrix with relative abundances. The matrix contains only ASV with a relative abundance of more than 2% in at least one sample of the mineral springs monitored in the Massif Central (N=16). MRPP is based on 999 permutations. ASV: Amplicon sequence variant richness, Cond: Conductivity, DO: Dissolved oxygen, Temp: Temperature.

Distance index	MRPP	Geographic location	$^{238}\text{U}$ Activity	$^{226}\text{Ra}$ Activity	$^{210}\text{Po}$ Activity	$^{228}\text{Ac}$ Activity
(J)	Chance-corrected within-group A	0.146	0.026	-0.049	-0.010	0.005
	Observed $\delta$	0.674	0.768	0.455	0.797	0.785
	Expected $\delta$	0.789	0.789	0.434	0.789	0.789
	Significance of $\delta$	p=0.002	p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05
(ab.J)	Chance-corrected within-group A	0.368	0.230	-0.011	-0.040	0.005
	Observed $\delta$	0.274	0.334	0.797	0.451	0.785
	Expected $\delta$	0.434	0.434	0.789	0.434	0.789
	Significance of $\delta$	p=0.11	p=0.004	p>0.05	p>0.05	p>0.05

### Natural radioactivity did not impact ASV richness

A first parameter to describe the  $\alpha$ -diversity of communities with metabarcoding is ASV richness. Generally, diatom ASV richness was high in the springs monitored and varied greatly between mineral springs with a factor of about 11. No significant correlations were observed between ASV richness and the various radiological parameters, *viz.*  $^{238}\text{U}$ ,  $^{226}\text{Ra}$ ,  $^{210}\text{Po}$ ,  $^{228}\text{Ac}$  activity. These results validate the first hypothesis: radioactivity does not influence diatom community genetic ASV richness. In the literature and to our knowledge, no other study besides the present one has yet been conducted on

the effect of radioactivity on ASV richness of microbial communities. Even so, a negative impact of radioactivity on the species richness of macroorganisms in terrestrial ecosystems are a reduction of species richness, for instance forest birds in an area with high radiation doses around Chernobyl (Moller, 2007; Mousseau 2016). For microorganisms, Shuryak et al. (2018) suggest that diatom richness in some radioactive waterbodies in Russia can be greatly reduced by high radiation levels: in this particular study, a negative correlation of -0.81 was measured between diatoms species richness and the level of radioactive contamination. The result obtained in our study is significantly higher than that observed in the monitored mineral springs because radioactive levels are elevated by a factor of eight in the radioactive reservoirs in Russia. In another study, comparison of bacterial communities in geographically-separated soils affected by caesium releases showed that species richness was lower in the most contaminated soils (Ihara, 2021). However, in aquatic environments, different results are reported: for example, Herlory et al. (2013), revealed that diatom species richness was not affected by the treated uranium mining effluents; Videvall et al. (2022) that radioactivity had no effect on prokaryote richness in Chernobyl wetlands, whilst Murphy et al. (2011) also showed that radioactivity had no effect on macroinvertebrate communities from lakes exposed to Chernobyl-derived ionising radiation. The latter results were obtained in the context of anthropogenic contamination by the addition of radionuclides to the environment, which implies stress on the surrounding organisms due to the introduction of these elements. In the case of radioactive mineral springs, organisms grow in the presence of radioactivity for long periods. Thus, we assume that organisms are adapted to radioactivity in mineral springs where the radioactive level is higher.

### **Uranium activity explained part of diatom community structure**

Geographical location was found to be the main factor explaining diatom community structure in mineral springs considering ASV occurrence. This result is similar to those of Potapova and Charles (2002), Virtanen and Soininen (2012), Soininen et al. (2016) and Baker et al. (2021) that studied benthic diatom assemblages in rivers, streams and springs.  $^{238}\text{U}$  activity was the second parameter that explained the variability of the



diatom communities, whereas the variability of diatom community structure was more poorly explained by  $^{226}\text{Ra}$ ,  $^{210}\text{Po}$  and  $^{228}\text{Ac}$  activities.

In the literature, study of the effects of uranium on communities of various macro- and microorganisms is quite common in the context of anthropogenic contamination or laboratory experiments. Several studies have demonstrated that uranium in water courses and static bodies of water influences the taxonomic composition of microbial communities (Reardon, 2004; Islam, 2011; Brzoska, 2016; Sutcliff, 2017; Suriya, 2017; Zeng, 2018; Chuiyun, 2021; Videvall, 2022). For example, Suriya et al. (2017) showed that increased concentration of uranium in sediments of the Cauvery River in India favour the presence of several Proteobacteria and Gammaproteobacteria species. Exposure of the bacterial community found in anaerobic granular sludge to uranium leads to the modification of the composition of the community (Zeng, 2018). However, there do not seem to be any studies on the effect of naturally occurring uranium in the environment. This study is therefore a pioneer study on diatom community structure in natural radioactive areas. Moreover, uranium contamination (from mining, nuclear accidents, or the release of nuclear waste into the environment) is a relatively recent event, as it is linked to the growing demand for uranium by the domestic and military industries since the Second World War. In the context of mineral springs, microorganisms have been naturally exposed to uranium in a continuous and prolonged manner, and uranium activity seems to have a significant influence on the structure of the communities, especially considering the genetic variants present.

This last view validates the second hypothesis: radioactivity is a factor that can influence diatom community structure. Furthermore, bioaccumulation of  $^{226}\text{Ra}$  by several organisms such as plants, algae, bacteria, plankton and zooplankton is also documented to occur (Iyengar, 1990; Zakeri, 2012; Carvalho, 2014; Heidari, 2017).  $^{226}\text{Ra}$  accumulates in a similar way to calcium in human and animal body tissues, by accumulating on the surface of bones, whilst also leading to the cancers of various kinds (Gad, 2005; Gad, 2014). Diatoms can also absorb and use calcium in their metabolic processes calcium and therefore it is also likely that  $^{226}\text{Ra}$  is accumulated by diatoms and thereby involved in their metabolism too.  $^{210}\text{Po}$  bioaccumulation is well documented in marine environments (Bennett, 1979; Carvalho, 2018; Uddin, 2018), marine phytoplankton (Horowitz, 2020),

and invertebrates from the Baltic sea (Skwarze and Falkowski, 1988). All these radionuclides can be accumulated in cells of living organisms. Brown et al. (2004) observed that  $^{210}\text{Po}$  and  $^{226}\text{Ra}$  are the main contributors of absorbed dose rates when they measured the internal concentration of several radionuclides within marine and freshwater organisms (e.g., phytoplankton, macrophytes). However, in our study,  $^{226}\text{Ra}$  and  $^{210}\text{Po}$  are the two radionuclides that contribute the least to explanation of the community structure of diatoms frequenting natural bodies of water.

### **Taxonomic composition of diatom communities**

The main challenges and limitations of the metabarcoding method as here described are the reference barcoding libraries themselves. Indeed, these reference libraries are often incomplete, and difficult to produce and maintain (e.g. Weigand et al., 2019). Morphological discrimination under a powerful microscope is still found to be necessary for species identification and can in turn be complemented by metabarcoding. The lack of genus and/or species identification could also be explained by the presence of new cryptic taxa due to the insularity of mineral springs. Indeed, springs are biotopes that can be marked by insularity via physical or physico-chemical barriers. Such barriers are characterised by high levels of physical stress related for example to temperature water availability and radioactivity (Cantonati, 2012; Cartwright, 2019). Thus, they present specific biotopes distinct from surrounding ecosystems and as such, may contain novel species due to potential allopatric speciation events.

A large proportion of the taxa herein observed by us could not be identified down to species level, but the general ecology of those that could be so identified demonstrated that most of those colonizing springs are present in various types of environments (freshwater, marine species and brackish water). Furthermore, their distributions are related to some chemical similarities between mineral springs and marine or brackish environment such as high conductivity, high ions contents among others. Also, some diatoms species have large ecological range and inhabited environments with different ecological statue like freshwater, springs and brackish water. Only *Navicula*

*sanctamargaritae* is typical to mineral springs (Beauger et al., 2020). Thus, the observations made in the mineral springs show that some species are well distributed in the mineral springs, but their abundance varies according to the local environmental conditions.

The correlations between the species associated to the 14 most abundant ASVs and physical, chemical and radiological parameters of the springs monitored clearly revealed that one genetic variant of *Planothidium frequentissimum* is particularly abundant in mineral springs with high natural concentrations of the isotope  $^{238}\text{U}$ . This result was confirmed with MRPP and ISA, which revealed interestingly that this species is associated with high  $^{238}\text{U}$  activity. Hence, this finding means that there are clearly genetic variants of the same diatom species that do not have the same distribution and ecological tolerances. This finding agrees with those of Pérez-Burillo et al. (2021), working on the distribution and ecological preferences of four diatom species, who concluded that ecological tolerance of some diatom species resulted from overlapping preferences among genetic variants. These genetic variants individually showed much more restricted preferences and distributions. In a previous study, a higher frequency of deformations in the most radioactive springs had been observed for *P. frequentissimum* (Millan et al., 2019).

Mineral springs with high levels of radioactivity (i.e.  $^{238}\text{U}$  activity) are habitats in which environmental pressure is more important than springs with low levels of radioactivity. If so, it questions the ability of this species to tolerate intracellular accumulation of radionuclides. Indeed, bioaccumulation of radionuclides depends on several environmental factors including external concentrations of these radionuclides in the water. In this context, Snoeijs and Notter (1993), demonstrated that external concentrations of radionuclides and benthic diatom concentrations are related: the higher the radionuclides concentrations, the higher the intracellular concentrations in the diatoms. This thus strongly suggests that in environments with high concentrations of radionuclides, diatom species are able to tolerate high radionuclide concentrations. If this in turn is so, the genetic variant A of *P. frequentissimum* is a potentially a good bio-indicator species for high natural uranium levels in spring water. Lastly, diatoms are the main producers in aquatic environments and the possible high accumulation of radionuclides within the cells implies – importantly – that diatoms are themselves potential vectors of radionuclides in the high levels of the food webs.

## Conclusions

Mineral springs are extreme environments that may have naturally high levels of radioactivity. Such environments are good field ‘laboratories’ to observe and understand the adaptation of organisms in the face of higher levels of natural and chronic background radioactivity. Our present study, the first on diatom community structure in natural radioactive areas, reveals that DNA metabarcoding proves that diatom species are very abundant in the mineral springs of the Massif Central. Radioactivity in the springs has no apparent effect on the diatom ASV richness in these mineral springs. Geographical location is the first factor explaining the structure of diatom communities in the mineral springs, and  $^{238}\text{U}$  the second factor. This radionuclide is known to influence microbial community composition. Very interestingly, one of the genetic variants of *Planothidium frequentissimum* was detected as a bio-indicator of high level of uranium in natural environment (i.e., mineral springs). Lastly, our results show that some diatom species are well distributed in the mineral springs, but their abundance varies according to the environmental conditions found locally. Thus, some species are particularly abundant in mineral springs with a high enhanced level of natural radioactivity. This exemplifies the fact that diatoms are organisms that have a great capacity for tolerance to radionuclides.

## Acknowledgements

We thank François Keck for his expertise and advices in terms of analysis of the metabarcoding data, Hugh D. Loxdale for his English editing, and the two anonymous reviewers for their valuable comments, which have greatly improved the manuscript.

## Funding sources

This study was funded by a grant from the Centre National de la Recherche Scientifique (NEEDS, project Acronym: DISCOVER)) including a CNRS doctoral grant for L.A. BAKER. We acknowledge financial support from CNRS-INEE within the context of the Zone Atelier Territoires Uranifères and the Clermont Auvergne Metropole.

**Supplementary Table VI-S1:** Physical and chemical variables measured in the mineral springs monitored in the Massif Central (France).

N=16

<b>Springs</b>	<b>Na<sup>+</sup> (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>K<sup>+</sup> (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Ca<sup>2+</sup> (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Br<sup>-</sup> (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Cond (μS.cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>pH</b>	<b>DO (%)</b>	<b>Temp (°C)</b>
<b>Bard</b>	1028.88	185.88	233.76	1.88	0.12	3012	6380	6.81	3.1	14.7
<b>Chemin</b>	990.42	179.01	202.55	1.72	0.09	2515	4860	6.41	15.3	14.2
<b>Daguillon</b>	503.16	112.22	297.06	0.56	0.13	2142	4030	6.6	29	13.9
<b>Estreys</b>	504.61	45.10	128.21	1.65	0.11	1185	3480	6.38	16.4	16
<b>Giraudon</b>	1787.50	189.50	151.28	4.91	0.70	2814	9201	7.51	54	32.1
<b>Graviers</b>	823.10	159.59	381.87	1.66	0.13	2730	5430	6.69	19.5	14.4
<b>Ours</b>	713.30	146.24	313.27	1.20	0.16	2648	5490	6.72	13.8	13.7
<b>Rocs bleus</b>	1396.77	144.23	255.14	3.68	0.06	2696	8150	7	9.3	19.2
<b>Sail</b>	686.62	83.46	85.67	1.13	0.54	1150	5390	7.02	9.2	16.6
<b>Saladis</b>	1813.91	197.52	112.55	4.09	0.05	2928	9680	7.82	88.6	16.1
<b>Salins</b>	291.27	53.52	204.16	0.23	0.53	1948	3090	6.83	20.1	13.3
<b>Salut</b>	1041.30	189.46	179.92	1.67	0.09	2740	5850	6.460	11.7	12.1
<b>Saulcée</b>	464.48	67.75	173.14	0.95	0.05	1412	3420	6.66	26	14.4
<b>Tennis</b>	1408.88	154.92	281.91	3.34	0.09	2778	8380	7.05	8.9	27.1
<b>Tête de lion</b>	768.30	147.04	239.54	1.62	0.08	2454	4200	6.99	18.9	14.4
<b>Trois sauts</b>	803.89	69.23	135.35	0.89	0.06	1940	3890	6.66	12.8	13.1

**Supplementary Table VI-2:** Raw data of the radiological parameters and trace elements measured in the mineral springs monitored in the Massif Central (France). NA in the column “<sup>226</sup>Ra (Bq.L<sup>-1</sup>)” specified that this variables could be measured for the sample.

Springs	Water		Sediments		
	<sup>238</sup> U (Bq.L <sup>-1</sup> )	<sup>226</sup> Ra (Bq.L <sup>-1</sup> )	<sup>210</sup> Po (μBq.L <sup>-1</sup> )	<sup>228</sup> Ac (Bq.g <sup>-1</sup> )	Mn <sup>2+</sup> (mg.g <sup>-1</sup> )
<b>Bard</b>		0.922	<10	0.62	0.333
<b>Chemin</b>	0.004428	1.15	<10	26.11	0.237
<b>Daguillon</b>	<2.5E-3	3.221	<10	4.60	0.301
<b>Estreys</b>	<2.5E-3	1.204	27	0	0.400
<b>Giraudon</b>	<2.5E-3	NA	<10	5.91	0.235
<b>Graviers</b>	0.014514	2.331	<10	17.92	0.391
<b>Ours</b>	<2.5E-3	2.621	<10	28.72	0.105
<b>Rocs bleus</b>	<2.5E-3	NA	<10	0.05	0.158
<b>Sail</b>	0.006765	0.472	<10	0	0.321
<b>Saladis</b>	<2.5E-3	2.013	<10	0.07	0.170
<b>Salins</b>	0.195693	0.736	392	0.41	9.323
<b>Salut</b>	<2.5E-3	1.548	<10	12.78	0.097
<b>Saulcée</b>	0.084255	1.438	168	11.65	5.351
<b>Tennis</b>	0.002706	3.338	<10	11.88	0.112
<b>Tête de lion</b>	0.002583	NA	<10	12.87	0.413
<b>Trois sauts</b>	0.00615	<1.4E-1	<10	1.09	0.530

**Supplementary Table VI-3:** Qualitative variables of the mineral springs monitored in the Massif Central indicating geographical location, and activity levels of  $^{238}\text{U}$ ,  $^{210}\text{Po}$ ,  $^{226}\text{Ra}$  and  $^{228}\text{Ac}$  in water (w) or in sediment (s).

<b>Springs</b>	<b>Geographical location</b>	<b><math>^{238}\text{U}</math> level (w)</b>	<b><math>^{226}\text{Ra}</math> level (s)</b>	<b><math>^{210}\text{Po}</math> level (w)</b>	<b><math>^{228}\text{Ac}</math> level (s)</b>
<b>Bard</b>	Boudes	low	medium	low	low
<b>Chemin</b>	Ternant les eaux	medium	high	low	high
<b>Daguillon</b>	Joze	low	high	low	medium
<b>Estreys</b>	Polignac	low	medium	medium	low
<b>Giraudon</b>	Saint-Nectaire	low	medium	low	medium
<b>Graviers</b>	Joze	low	high	low	high
<b>Ours</b>	Joze	low	high	low	high
<b>Rocs bleus</b>	Martes-de-Vevre	low	low	low	low
<b>Sail</b>	Mirefleurs	low	low	low	low
<b>Saladis</b>	Martes-de-Vevre	low	medium	low	low
<b>Salins</b>	Apcher	high	low	high	low
<b>Salut</b>	Ternant les eaux	low	medium	low	high
<b>Saulcée</b>	Coudes	medium	high	high	high
<b>Tennis</b>	Sainte-Marguerite	low	high	low	high
<b>Tête de lion</b>	Saint-Floret	low	high	low	high
<b>Trois sauts</b>	Leyvaux	low	medium	low	medium

**Supplementary table VI-4:** Pearson correlations between the abundance of the 14 dominant species and the radiological parameters  $^{238}\text{U}$ ,  $^{226}\text{Ra}$ ,  $^{210}\text{Po}$ ,  $^{228}\text{Ac}$ , activities and trace element concentration ( $\text{Mn}^{2+}$ ) in the springs monitored in the Massif Central (N=16). Significant p-value are in bold (p<0.05). Species are classified with decreasing their gradient of relative abundances in the mineral. Cond: Conductivity, DO: Dissolved oxygen, Temp: Temperature.

	<b>Na<sup>+</sup></b>	<b>K<sup>+</sup></b>	<b>Ca<sup>2+</sup></b>	<b>Br<sup>-</sup></b>	<b>PO<sub>4</sub><sup>3-</sup></b>	<b>HCO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	<b>Con d</b>	<b>pH</b>	<b>DO</b>	<b>Tem p</b>	<b><sup>238</sup>U (w)</b>	<b><sup>210</sup>Po (w)</b>	<b><sup>226</sup>Ra (s)</b>	<b><sup>228</sup>Ac (s)</b>	<b>Mn<sup>2+</sup> (s)</b>
<i>Navicula sanctamargaritae</i>	0.13	-0.04	0.30	0.16	-0.41	0.15	0.12	0.07	-0.24	0.18	-0.30	-0.30	0.26	0.09	-0.31
<i>Surirella sp1</i>	-0.03	0.31	0.34	-0.16	-0.18	0.25	-0.07	-0.32	-0.17	-0.33	-0.23	-0.23	0.11	0.29	-0.22
<i>Unknown species1</i>	-0.18	-0.12	0.31	-0.17	-0.26	-0.03	-0.10	-0.13	0.12	-0.21	-0.21	-0.21	0.42	0.00	-0.22
<i>Planothidium frequentissimum</i> genetic variant A	-0.41	-0.43	-0.06	-0.36	0.41	-0.19	-0.36	-0.07	-0.07	-0.18	0.91	0.91	-0.26	-0.27	<b>0.85</b>
<i>Navicula veneta</i>	0.49	0.28	-0.21	<b>0.58</b>	<b>0.68</b>	0.20	0.44	0.46	0.39	0.76	-0.10	-0.10	-0.16	-0.07	-0.10
<i>Diploneis vacillans</i>	-0.20	-0.10	-0.06	-0.18	-0.22	-0.14	-0.19	-0.14	-0.11	-0.16	0.22	0.22	0.00	-0.05	0.32
<i>Gedaniella sp.</i>	-0.15	-0.24	-0.41	-0.16	0.45	<b>-0.50</b>	-0.03	0.12	-0.17	0.00	-0.08	-0.10	-0.22	-0.24	-0.09
<i>Pinnularia sp1</i>	0.07	0.41	-0.03	-0.07	-0.20	0.25	-0.06	-0.38	-0.22	-0.22	-0.16	-0.15	-0.12	0.40	-0.16
<i>Amphora copulata</i>	-0.27	-0.29	-0.13	-0.21	-0.21	-0.37	-0.29	-0.18	0.03	-0.14	0.32	0.31	0.13	0.13	0.43
<i>Planothidium frequentissimum</i> genetic variant B	-0.30	-0.40	-0.34	-0.16	-0.25	<b>-0.51</b>	-0.34	-0.46	-0.27	-0.17	-0.00	-0.02	-0.30	-0.24	0.01
<i>Unknown species2</i>	-0.14	-0.01	0.08	-0.06	-0.16	0.00	-0.11	-0.26	-0.25	-0.12	-0.13	-0.13	-0.17	-0.23	-0.15
<i>Pinnularia sp2</i>	<b>0.60</b>	0.41	-0.29	<b>0.65</b>	0.60	0.28	<b>0.52</b>	<b>0.51</b>	<b>0.54</b>	<b>0.71</b>	-0.13	-0.13	-0.20	-0.02	-0.13
<i>Pinnularia brebissonii</i>	<b>0.50</b>	0.33	-0.30	0.41	-0.19	0.27	0.49	<b>0.65</b>	<b>0.83</b>	-0.04	-0.11	-0.10	-0.19	-0.24	-0.12
<i>Gomphonema sp1</i>	-0.15	-0.26	-0.05	0.01	-0.22	-0.26	-0.15	-0.38	-0.22	-0.07	-0.15	-0.16	0.06	0.09	-0.20



## **Chapitre V: Etude de l'influence de la radioactivité et du contexte hydrogéochimique des sources sur les communautés de diatomées**

Dans les écosystèmes aquatiques avec des bruits de fond radioactifs naturellement renforcés, la radioactivité n'est pas le seul facteur qui peut influencer les communautés de diatomées. En effet, plusieurs facteurs biotiques et abiotiques interagissent ensemble et façonnent les communautés locales. Les facteurs abiotiques peuvent être, entre autres, la température et la composition ionique de l'eau, le courant, mais aussi des facteurs hydrogéologiques qui dépendent de l'origine de l'eau. Peu d'études se sont intéressées à l'influence de ces derniers sur la richesse et la diversité des communautés de diatomées. Ce chapitre vise donc à déterminer si parmi les autres facteurs abiotiques susmentionnés, la radioactivité peut avoir une contribution déterminante et mesurable sur la structure des communautés de diatomées.

Pour cette étude, 12 sources minérales du Massif central ont été échantillonnées de mai à juillet 2020. Les communautés de diatomées ont été analysées via une approche morphologique (en microscopie optique). Les résultats de cette étude sont originaux et, outre l'objectif initial, apportent de nouvelles informations sur l'écologie des diatomées. Ce travail sera soumis à la revue *Botany letters*.

# **Improvement of the knowledge of diatoms ecology by coupling geochemistry, radiology and taxa inventory in thermo-mineral springs of a volcanic and upland area in south-central France, the Massif Central**

Lory-Anne Baker<sup>1,2,3\*</sup>, Hélène Celle<sup>4,5</sup>, Olivier Voldoire<sup>2,3</sup>, Carlos E. Wetzel<sup>6</sup>, Elisabeth Allain<sup>2,3</sup>, Luc Ector<sup>6 †</sup>, Vincent Breton<sup>3,7</sup>, David G. Biron<sup>1,3 †</sup>, Gilles Mailhot<sup>5,8</sup>, Jean-Luc Devidal<sup>5,9</sup>, Aude Beauger<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Université Clermont Auvergne, CNRS, LMGE, F-63000 Clermont-Ferrand, France; <sup>2</sup>Université Clermont Auvergne, CNRS, GEOLAB, F-63000 Clermont-Ferrand, France; <sup>3</sup>LTSER “Zone Atelier Territoires Uranifères”, 63000 Clermont-Ferrand, 63178 Aubière Cedex, France; <sup>4</sup>Université de Bourgogne Franche-Comté, CNRS, UMR 6249 Chrono-Environnement, F-25030 Besançon, France; <sup>5</sup>AUVERWATCH, UMS 833 OPGC, F-63178 Aubière, France; <sup>6</sup>Luxembourg Institute of Science and Technology (LIST), Environmental Research and Innovation department (ERIN), Environment and Biodiversity (OCEB), 4422 Belvaux, Luxembourg; <sup>7</sup>Université Clermont Auvergne, CNRS/IN2P3, Laboratoire de Physique de Clermont (LPC); <sup>8</sup>Université Clermont Auvergne CNRS, UMR 6296 ICCF, F-63178 Aubière, France; <sup>9</sup>Université Clermont-Auvergne, CNRS, UMR 6524 LMV, F-63178 Aubière, France.

\*Lory-Anne Baker, l-anne.baker@etu.uca.fr, Université Clermont Auvergne, CNRS, UMR6023, LMGE, 63178 Aubière Cedex, France

## **Abstract**

In connection with its geological history, many thermo-mineral springs are present in the Massif Central. The physico-chemical characteristics of these springs (temperature, mineralization, gas content) result both from their deep circulation and from the geological formations or surface waters with which they interact during their ascent. In mineral springs, the trophic chain being short, it is the microbial communities such as diatoms that are well represented and form a well-developed biofilm.

To date, no study has focused on coupling the origin of water with diatom communities, whether in the Massif Central or in other parts of the world. For this purpose, 12 mineral springs with some of which have high levels of radioactivity were studied in

the Massif Central from a geochemical and ecological point of view via diatoms. The use of geochemistry allowed characterizing the physico-chemical characteristics of water due to deep circulation in the crystalline basement modified to a greater or lesser extent by interactions with superficial geological formations or surface waters during upwelling. The purpose of this study is to cross the information obtained on the water and the diatoms in order to analyze the biodiversity and improve knowledge of the ecology of diatoms. Thus the geochemical facies, the origin of the water and the Total Dissolved Solids influence the taxonomic composition but not the specific richness, Shannon index and Evenness. But  $^{222}\text{Rn}$  is a factor that influence diatom richness and community structure. The water temperature was a factor that influence diatom species distribution however no species was associated with this parameter. Some species appears to be more sensible to the composition of water, such as *Planothidium frequentissimum* which attests to a mixing between deep and surface waters. At last, *Planothidium frequentissimum* was also associated to high values of  $^{222}\text{Rn}$  activity with *Crenotia angustior* and *Sellaphora labernardierei*.

**Keywords:** geochemistry, diatoms inventory, species diversity, thermo-mineral springs, Massif Central

## Introduction

Springs are abundant and present all around the world, “with estimated numbers in the tens of millions” (Stevens et al. 2021). They constitute a peculiar environment that have been variously classified based on hydrology, geology, hydrochemistry, water temperature, biological assemblages and also human uses such as bottled water and health/wellness treatments (Glazier 2009; Olivier et al. 2011; Glazier 2014; Stevens et al. 2021).

Springs that water temperature is 4°C higher than the average annual air temperature are called thermal springs (Schoeller and Schoeller 1977). Mineral and thermal springs occur under a variety of hydrogeological conditions, linked to volcanic

and tectonic activities (actual or quiescent) and many emergences coincide with the fault zones (Waring 1965; Risler 1974; Curewitz and Karson 1997; Rowland et al. 2008; Keegan-Treloar et al. 2022). Thermo-mineral waters may be derived from “subterranean heated aquifers, from shallower meteoric groundwaters, or from mixed shallow and deep source waters” (Owen et al. 2008). Thus, temperatures and ionic compositions of these springs are mainly controlled by lithology, depth of penetration of water into the crust, and the availability of a heat source (Ashton and Schoeman 1984; Nicholson 1993). As springs are fed from thermally buffered underground sources, it shows little variation in temperature (Glazier 2014) but also in other physical and chemical characteristics (Risler 1974; Van der Kamp 1995).

Thermo-mineral springs, known to be groundwater-dependent ecosystems (Kløve et al. 2011), are interesting and unique environments for ecological studies as they are spatially isolated (Cantonati et al. 2012; Bogan et al. 2014). They offer habitats for specific biocenoses with very specific traits and distribution patterns and shelter endemic species able to develop and evolve in these unique spring conditions (Chaouite 1987; Segadelli et al. 2015; Beauger et al. 2015, 2016, 2017; Davis et al. 2017). These chemical conditions have changed very little over the past millennia in these habitats (Cantonati et al. 2012). Thus, they could provide an exceptional window to study the evolution of the springs during a long period and also the climate change and the influence of physical and chemical parameters such as the radioactivity (that is naturally present in the Earth’s crust, especially in granite rocks) on organisms (Métévier 2001; Millan et al. 2020; Cantonati et al. 2012; Stevens et al. 2021).

In mineral springs, the trophic chain being short, the microbial communities are well represented and form a well-developed biofilm (Chaouite 1987; Chaouite & Romagoux 1989; Leira et al. 2017). The diversity of microbial communities in thermo-mineral springs is influenced by the mineral composition and also the water temperature (Sompong et al. 2005; Jonker et al. 2013). Among these communities are microscopic algae: the diatoms. They are part of the phytobenthos and they are one of the main primary producers in aquatic ecosystems including the thermo-mineral springs. Diatoms are able to survive in various ecological niches (Nikulina and Kociolek 2011) and also occur in extreme environments, such as thermal springs (Bourrelly and Manguin 1946;

Mannino 2007; Owen et al. 2008; Fazludinova et al. 2020). Thermo-mineral springs generated by upwellings and surface waters host specific diatom biocenoses adapted to the constraints imposed by the peculiar abiotic characteristics (Wojtal 2013; Beauger et al. 2015, 2016, 2020; Lai et al. 2019a).

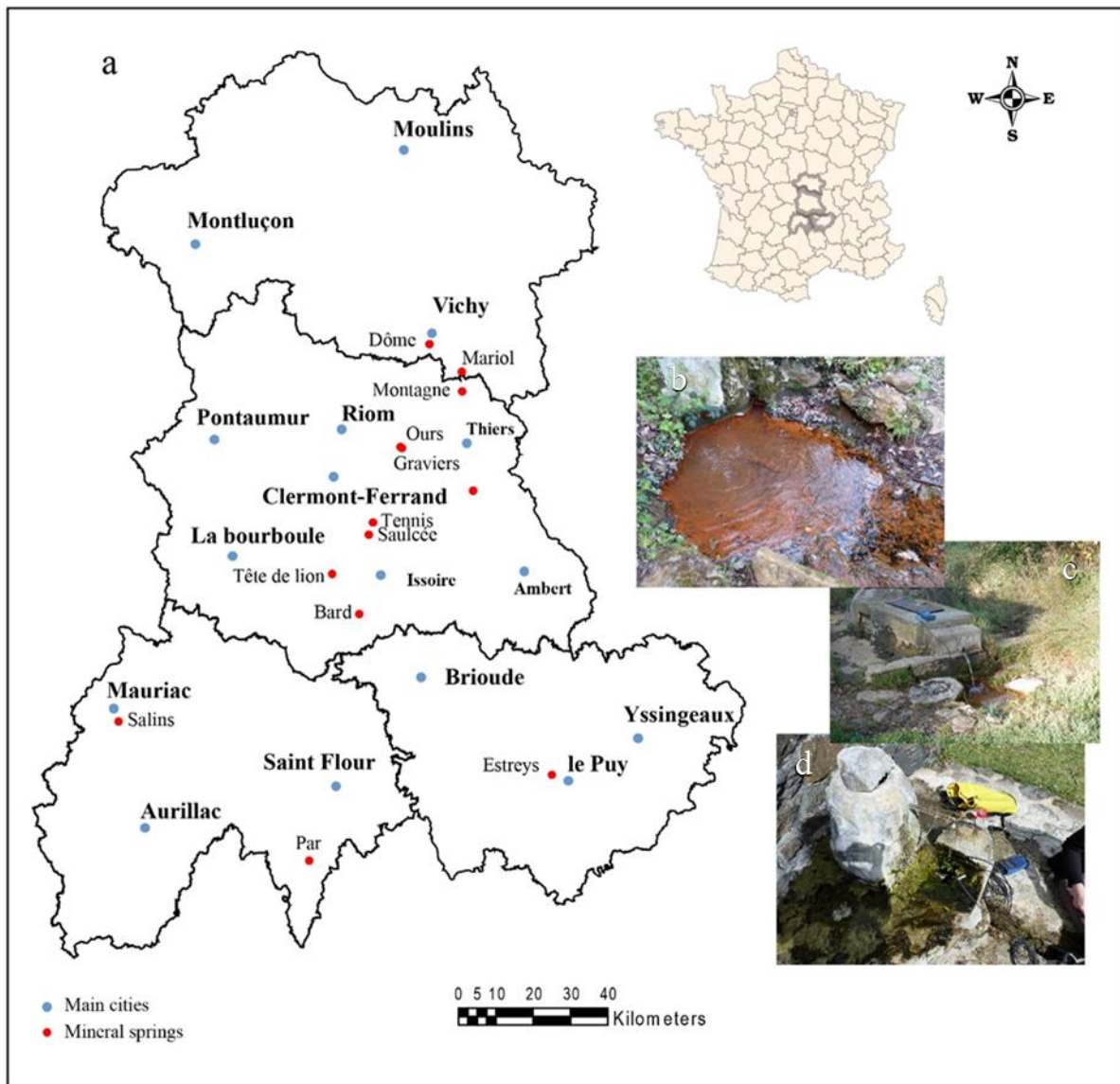
This study focus on the thermo-mineral springs of the Massif Central, well-known around the world for their particular context of emergence and their chemical characteristics (Vichy thermal water). To date, no study has focused on coupling the origins of the water of thermo-mineral springs with diatom communities, whether in the Massif Central or in other parts of the world. Only some studies were done on the biotic–abiotic (including substrates) relationships in thermo-mineral spring environments (Jonker et al. 2013; Massello et al. 2020; Lai et al. 2019b, 2022) but these studies did not include the water origin. This study is an attempt to fill this gap with a cross-investigation on hydrochemistry and diatoms biodiversity and ecology.

## **Materials and methods**

### **Study sites**

The Massif Central is the largest French massif (>85,000 km<sup>2</sup>); it occupies the central region of the southern part of the country. It is made of mountainous reliefs (linked to the Hercynian orogeny during the Paleozoic Era), plateaus, plains and volcanoes (actually quiescent) due to presence of a rift and also the appearance of young mountain ranges such as the Alps during the Paleogene. The uplift of these mountain ranges has led to the dislocation of the basement (Mottet 1999). The geological layers and the many faults occurring in the massif allow the circulation of water into the rocks and the emergence of water, associated with carbon dioxide emission, sometimes after a more or less long travel through the earth's crust. On their way, the waters increase their concentrations in different chemical elements as they cross crystalline (granite or metamorphic rocks), volcanic and sedimentary rocks (limestone and marl) in function of the location.

For this study, 12 springs distributed in the Auvergne region of the Massif Central (Fig. V-1) were retained based on their context of circulation and emergence that influence their physical, chemical and radiological characteristics: crystalline basement for Par and Tête-de-Lion; bedrock/ Tertiary sediment context (Montagne, Bard); Tertiary sediments (Ours, Gravieres, Estreys, Dôme) or Quaternary sediments mainly alluvium (Salins, Saulcée, Mariol, Tennis).



**Figure V-1:** Map of the studied springs (in red). a: general location map of the Auvergne region (in grey) and of the study area where the springs are located (blue points); b-d: photography of the Tête de lion (b), Estreys (c) and Salins (d) springs

## Physical and chemical analyses of water

The sampling campaign has been achieved from 25th may to 1st July 2020. The geographical position of the sampling site was taken using a DGPS Trimble Geo7x, in Lambert 93 (Table V-1). Physical parameters (pH, electrical conductivity, water temperature and dissolved oxygen) were measured using a Ysi ProODO oxygen probe and a WTW 340ia multi-parameter. Alkalinity measurements were also performed using a digital titrator (HACH). Samples for major ions analysis ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  and  $\text{Ca}^{2+}$ ) were collected in two 100 ml polyethylene bottles after filtration through 0.22  $\mu\text{m}$  nitrocellulose membranes. Samples for cations analysis were acidified with ultrapure  $\text{HNO}_3^-$  at 70%. In addition, samples for stable isotopes of the water molecule were achieved in 20mL amber glass bottles. All the bottles were filled air tight with no bubbles and kept at 4 °C until analyses. For carbon-13 analysis, we used stainless steel cells dedicated to sample the gas-only without interaction with ambient air. Chemical analyses were conducted at the GEOLAB laboratory, University of Clermont-Auvergne using Ion Chromatographic System (Thermo Scientific Dionex ICS1100) for major ions. Traces were determined by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS Thermoscientific iCAP RQ). Using these concentrations, Total of Dissolved Solid (TDS in  $\text{mg.L}^{-1}$ ) was calculated by adding all the concentrations in the measured ions. Ionic balance calculations in 95% of the samples were within  $\pm 10\%$ .

**Table V-1:** Location of the mineral springs.

<i>Springs</i>	<i>Cities</i>	<i>Coordinates (Lambert 93)</i>		<i>Altitude (m)</i>
<i>Bard</i>	Boudes	E 713636.28	N 6483162.75	489
<i>Dôme</i>	Abrest	E 732450.54	N 6555511.86	269
<i>Estreys</i>	Polignac	E 764146.87	N 6441270.96	679
<i>Graviers</i>	Joze	E 724338.13	N 6527785.023	297
<i>Ours</i>	Joze	E 724610.93	N 6527929.96	295
<i>Mariol</i>	Mariol	E 739134.34	N 6546926.36	308
<i>Montagne</i>	Châteldon	E 741086.69	N 6542796.81	368
<i>Par</i>	Chaudes-Aigues	E 700205.06	N 6417144.62	772
<i>Salins</i>	Drugeac	E 649314.59	N 6453604.74	584
<i>Saulcée</i>	Coudes	E 716548.86	N 6501455.21	365
<i>Tennis</i>	Sainte-Marguerite	E 717308.22	N 6507698.46	339

Stable isotopes of the water molecule have been determined by UMR 6134 SPE using a EA-IRMS, Isotope Ratio Mass Spectrometry related to VSMOW-Std  $1s = \pm 0.15\text{‰}$ ,  $1s = \pm 1.5\text{‰}$  for d18O and d2H respectively; carbone stable isotope analyses ( $^{13}\text{C}$  in ‰) were performed by Hydroisotop laboratory in Germany using a IRMS (isotope-Ratio Mass Spectrometry) related to VPDB-std  $1s = \pm 0.3\text{‰}$ ; Strontium isotope has been determined by TIMS (Thermal Ionization Mass Spectrometry after fusion and separation matrix/element; uncertainty  $\pm 0.000050$ ).

Rb/Sr ratio was also calculated to evaluate which process during the ascent affects each spring. In geochemistry, the couple Rb/Sr is characterized by a very contrasted geochemical behaviour between rubidium (alkaline element close to potassium) and strontium (alkaline earth element close to calcium). Rb and K concentrations in thermo-mineral waters are related to water/rock interactions at depth, at high temperature (Michard et al. 1976; Ouzounian et al. 1980). Rb is a marker of the deep reservoir and is only slightly sensitive to mixing with surface waters during ascent and cooling of thermo-mineral waters during ascent. However, the Rb/K relationship can be affected by alteration of the deep features by more superficial waters or by interaction with the more superficial host rocks, which can deliver more or less K or Rb depending on the mineralogical nature of these host rocks.

For the measurements of radon ( $^{222}\text{Rn}$ ) activity in each spring, Marinelli beakers (1 L) were used to sample water from the mineral springs. Since the distance of each mineral spring to the laboratory is different, utmost care was taken to transport the samples to the laboratory under cold conditions in refrigerated boxes well protected from light and heat. Then, a well-shaped Germanium detector (Canberra) operated at Clermont Physics Laboratory (Université Clermont Auvergne, Aubière, France) was used to measure the  $^{222}\text{Rn}$  activity.



## **Sampling of diatom communities**

Benthic diatom samples were collected in the 12 mineral springs (Fig. V-1). As it was demonstrated that the substrate has little influence on benthic diatom composition in mineral springs (Baker et al. 2022), diatom sampling was performed on the dominant substrate presents on each site. In some springs, biofilm was collected by scrubbing with a clean toothbrush the upper surface of rocks on which water flows. In others, biofilm was sampled by scraping the first millimetres of sediments from the spring basin.

## **Slide preparation and microscopy**

Small sub-samples of epipellic and epilithic raw material were prepared for light microscopy (LM) observation according to the method of Prygiel and Coste (2000). Samples were cleaned using hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ , 35%) and hydrochloric acid (HCl, 37%), and rinsed several times with distilled water. Cleaned material was diluted with distilled water to avoid excessive concentrations of diatom valves on the slides. Then, a drop of dried and clean material was mounted in Naphrax®. LM observations and morphometric measurements were done using a Leica® DM2700M microscope with a 100x oil immersion objective using a differential interference contrast. For each slide, 400 valves were enumerated on random transects. Diatom identification was based on different taxonomical works (Beauger et al. 2015, 2016, 2017, 2018; Krammer and Lange-Bertalot 1997a, 1997b, 2000a, 2000b, 2004; Krammer 2000, 2002, 2003; Lange-Bertalot 2001; Levkov 2009; Lange-Bertalot et al. 2017). Once the counting was completed, the relative abundance of diatom species was calculated.

## **Statistical analyses**

Species richness (R), Shannon index (H) and evenness (E) were calculated using “vegan” package version 2.6-2 (Oksanen et al. 2013) in R version 4.1.2. The mineral

springs were classified according to their Total of Dissolved Solids (TDS), temperature, geochemical facies, their “water origin” and their  $^{222}\text{Rn}$  activity level to test the difference in species richness, Shannon index and evenness between classes by using the Kruskal-Wallis test. “Water origin” corresponds to the deep circulation without modification or the occurrence of mixing between surface water or interaction with superficial waters after deep circulation of water.

Then, a Canonical Correspondence Analysis (CCA), followed by a Monte Carlo random re-sampling test (999 permutations,  $p < 0.05$ ), was performed to link environmental variables measured in the field with the dominant taxa (relative abundances greater than 1% in at least one sample). We retained different ions in order to characterize the geological origin of the water and the main phenomenon posterior to deep circulation: sodium, potassium, magnesium, calcium, sulphates, bicarbonate, rubidium and strontium concentrations. TDS, water temperature and  $^{222}\text{Rn}$  were also retained for the analysis. Prior to this analysis, benthic diatom abundance data were log-transformed to reduce variation; a value of 1 was added to all abundances to avoid the problem of log 0 being undefined.

Multi-response permutation procedures (MRPP) were done to test if differences between TDS concentration, temperature levels, geochemical facies, the “water origin” and the  $^{222}\text{Rn}$  level of activity occurred (Table V-2). Levels of  $^{222}\text{Rn}$  were categorised based on our data and correspond to low: activity  $< 100 \text{ Bq.L}^{-1}$ ; medium:  $100 \text{ Bq.L}^{-1} < \text{activity} < 1000 \text{ Bq.L}^{-1}$ ; high: activity  $> 1000 \text{ Bq.L}^{-1}$ . MRPP is a nonparametric, multivariate procedure, allows testing whether there is significant difference between two or more groups. The method compares dissimilarities within and among groups.

The output of MRPP includes the test statistic T, which indicates separation among groups (large negative value of T indicates a high separability of groups), and the A statistics that estimates the within-group homogeneity and is a measure of the effect size. When  $A = 1$  there is homogeneity within groups and when  $A = 0$  there is heterogeneity within groups (McCune and Grace 2002). The p-value describes how well the separation between groups is likely due to chance alone (McCune and Grace 2002). For the MRPP, the following options were used: Sorensen distance Measure,  $n/\text{sum}(n)$  weighting of

groups and make pairwise comparison. At last, an Indicator Species Analysis was used to identify the most characteristic species of each group. Statistical significance of each species indicator value was tested using a Monte-Carlo permutation test (999 permutations,  $p < 0.05$ ). Analyses were done using “vegan” package version 2.6-2 in R version 4.1.2 and PC-ORD 7.0 software package (McCune and Grace 2002; Oksanen et al. 2013).

In order to go further in our analyses, the different diatom communities of mineral springs were compared. A matrix of dissimilarities based on Jaccard dissimilarity index (Jaccard 1901) was generated with the function `vegdist` of the R package “Vegan” (Oksanen et al., 2013, version 2.5–7). This index only takes into account the absence/presence of species, so a second matrix with the abundance-based Jaccard dissimilarity index “`ab.Jaccard`” (or `chao.jaccard`) described in Chao et al. (2006) was also generated. The function “`dist.ldc`” of the package “Adespatial” version 0.3–14 (Dray et al. 2012) was used to generate a dissimilarity matrix with this second index. The individual influence of TDS concentration, temperature levels, geochemical facies, and the “water origin” and the  $^{222}\text{Rn}$  level of activity (Table 2) on diatom community diversity in springs were determined with a non-parametric MANOVA analysis [i.e. ADONIS (Permutational MANOVA)] based on Jaccard and “`ab. Jaccard`” dissimilarity index using the function `Adonis` of the `vegan` R package was used.

## **Results**

### **Environmental variables**

The values of the environmental variables measured and analysed for all studied springs are presented in Table V-2. The water temperature varies between 12.2 and 58.0 °C. The highest values were measured at the Par and Dôme springs (72.0 and 58.0 °C respectively). Most of the waters sampled, except for the Montagne and Ours springs, can be qualified as thermal. The pH in the springs is rather acidic to neutral with an average value of  $6.7 \pm 0.5$ . Almost all the waters are carbonated, except for Par and Mariol. It has been demonstrated that gas content of the spring is mainly composed of deep  $\text{CO}_2$  which

origin is attested by isotopic analyses of  $^{13}\text{C}$  from -4.1‰ (Bard) to -8.3‰ (Estreys), as described in the literature (Camus 1993; Batard et al. 1982).

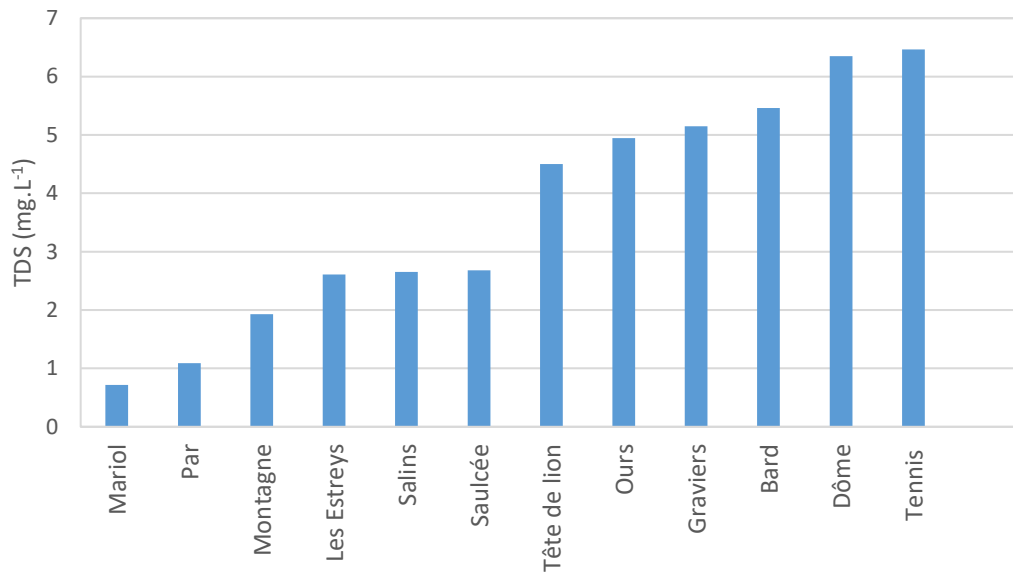
**Table V-2:** Environmental variables measured at the study sites.

<b>Springs</b>	<b>F<sup>-</sup></b> <b>(<math>\mu\text{mol.L}^{-1}</math>)</b>	<b>Cl<sup>-</sup></b> <b>(<math>\mu\text{mol.L}^{-1}</math>)</b>	<b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b> <b>(<math>\mu\text{mol.L}^{-1}</math>)</b>	<b>SO<sub>4</sub><sup>2-</sup></b> <b>(<math>\mu\text{mol.L}^{-1}</math>)</b>	<b>HCO<sub>3</sub><sup>-</sup></b> <b>(<math>\mu\text{mol.L}^{-1}</math>)</b>	<b>Ca<sup>2+</sup></b> <b>(<math>\mu\text{mol.L}^{-1}</math>)</b>	<b>Mg<sup>2+</sup></b> <b>(<math>\mu\text{mol.L}^{-1}</math>)</b>	<b>Na<sup>+</sup></b> <b>(<math>\mu\text{mol.L}^{-1}</math>)</b>	<b>K</b> <b>(<math>\mu\text{mol.L}^{-1}</math>)</b>	<b>B<sup>-</sup></b> <b>(<math>\mu\text{mol.L}^{-1}</math>)</b>	<b>Br<sup>-</sup></b> <b>(<math>\mu\text{mol.L}^{-1}</math>)</b>	<b>Li<sup>+</sup></b> <b>(<math>\mu\text{mol.L}^{-1}</math>)</b>
<b>Bard</b>	46.5	20590.8	1.0	334.1	47541.0	6014.2	5833.7	48026.1	5627.4	1110.0	25.0	878.8
<b>Dôme</b>	406.2	10335.6	0.1	1717.2	60491.8	1112.3	359.2	78791.3	2727.6	231.3	13.8	778.0
<b>Estreys</b>	84.6	17326.8	2.5	627.5	17541.0	3319.5	2890.9	23309.1	1334.0	157.3	21.3	489.8
<b>Graviers</b>	31.5	22332.2	5.3	1269.5	41147.5	11029.9	4871.6	38279.6	4581.1	240.5	21.3	691.5
<b>Mariol</b>	221.3	61.0	1.2	60.5	7639.3	757.7	148.1	6538.7	204.3	4.8	0.0	80.7
<b>Montagne</b>	84.0	104.3	0.8	135.7	22950.8	6105.7	890.5	8061.7	331.5	19.4	0.0	158.5
<b>Ours</b>	37.5	12115.3	1.7	1096.4	46885.3	9824.9	4231.7	33404.4	4930.7	203.5	13.8	648.3
<b>Par</b>	155.8	2146.1	0.9	191.4	10000.0	500.6	238.9	11546.5	728.3	129.5	3.3	118.1
<b>Salins</b>	23.7	173.0.	3.1	565.5	29262.3	5085.5	6799.6	13700.4	1507.2	175.8	0.0	417.8
<b>Saulcée</b>	52.3	10002.2	2.0	607.6	23278.7	4126.2	2951.6	20023.9	1966.7	314.5	11.1	331.4
<b>Tennis</b>	50.5	45909.9	1.5	929.7	41311.5	7073.3	5458.0	65917.4	4243.2	1387.5	42.6	1210.2
<b>Tête de lion</b>	30.5	16431.0	0.4	220.5	40409.8	6057.9	5268.7	35263.5	4538.6	730.7	20.0	619.5

**Table V-2 (second part):** Environmental variables measured at the study sites. TDS: Total Dissolved Solid. DO: Dissolved Oxygen. EC: Electrical conductivity. <sup>222</sup>Rn: <sup>222</sup>Rn activity.

<b>Springs</b>	<b>Rb<sup>+</sup></b> ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ )	<b>Si<sup>2+</sup></b> ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ )	<b>H<sub>4</sub>SiO<sub>4</sub></b> ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ )	<b>Sr<sup>-</sup></b> ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ )	<b><sup>13</sup>C</b> (‰ vs PDB)	<b>TDS</b> ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	<b>CO<sub>2</sub></b> ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	<b>DO</b> ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	<b>EC</b> ( $\mu\text{S.cm}^{-1}$ )	<b>Temperature</b> (°C)	<b>pH</b>	<b><sup>222</sup>Rn</b>
<b>Bard</b>	18.7	736.7	736.7	33.1	-4.1	5463.5	29.0	1.4	6560.0	17.1	6.5	5.9
<b>Dôme</b>	10.7	439.3	439.3	17.1	-6.8	6350.1	14.0	0.8	7100.0	58.0	7.5	
<b>Estreys</b>	3.6	474.0	474.0	14.8	-8.3	2607.7	15.0	1.9	3430.0	16.5	6.4	1438.6
<b>Graviers</b>	11.6	438.0	438.0	29.7	-4.8	5146.9	30.0	3.1	6360.0	15.9	7.5	29.2
<b>Mariol</b>	1.1	641.0	641.0	3.0	-4.9	718.7	7.0	0.2	808.0	17.4	6.6	139.1
<b>Montagne</b>	1.9	565.0	565.0	8.2	-6.2	1930.1	30.0	0.5	1702.0	12.2	6.3	3746.4
<b>Ours</b>	10.2	458.3	458.3	27.4	-4.9	4947.7	35.0	14.3	5480.0	13.9	7.6	18.8
<b>Par</b>	2.3	668.4	668.4	4.3	-6.3	1092.4	5.0	52.8	1319.0	72.4	6.8	2.2
<b>Salins</b>	0.3	410.5	410.5	44.5	-7.8	2651.1	31.0	12.7	3080.0	14.7	6.4	9.1
<b>Saulcée</b>	5.5	481.6	481.6	25.1		2677.8	26.0	7.1	3220.0	15.2	6.1	91.7
<b>Tennis</b>	14.0	779.6	779.6	68.5		6465.8	17.0	11.5	8380.0	27.9	6.5	14.9
<b>Tête de lion</b>	11.7	640.2	640.16	30.8	-5.1	4502.3	24.0	0.3	5070.0	15.6	6.5	30.1

The TDS varies between 0.7 mg.L<sup>-1</sup> and 6.5 g.L<sup>-1</sup> (Fig. V-2). The less mineralized are the springs Mariol (0.7 g.L<sup>-1</sup>) and Par (1.1 g.L<sup>-1</sup>) whereas Tennis and Dôme present a TDS higher than 6 g.L<sup>-1</sup>.

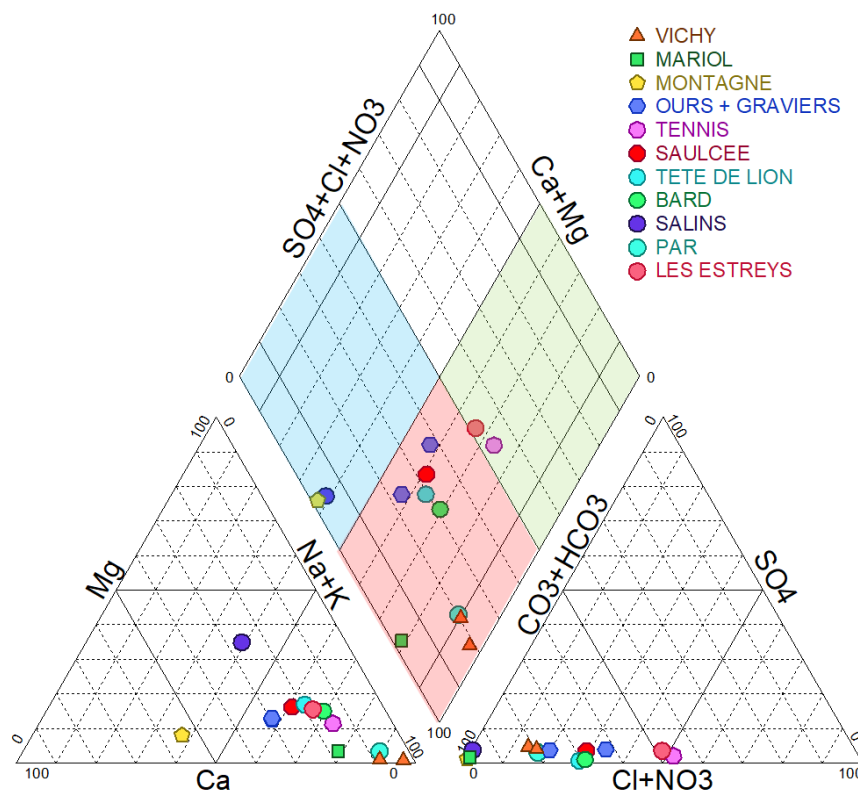


**Figure V-2:** Total of Dissolved Solids calculated for each studied spring.

### Geochemical facies

The Piper diagram allows a representation of anions and cations on two specific triangles whose sides show the relative contents of each of the major ions compared to the total of these ions (cations on the left triangle, anions on the right triangle) (Fig. V-3). The relative position of an analytical result on each of these two triangles makes it possible to specify in the first place the anionic or cationic dominance. To these two triangles is associated a diamond on which is plotted the intersection of the two lines from the points

identified on each triangle. This point of intersection represents the global analysis of the sample, its relative position allows to specify the type of the water concerned. Three water types can be identified (Fig. V-3): Na which is typical of the reservoir at depth or reflects a interaction with evaporates in the more superficial layers; Ca for Montagne and Salins showing the possibility of a mixture with surface water or an interaction with marl-limestone sediments and in between Ca-Na for Par, Dôme and Mariol springs.

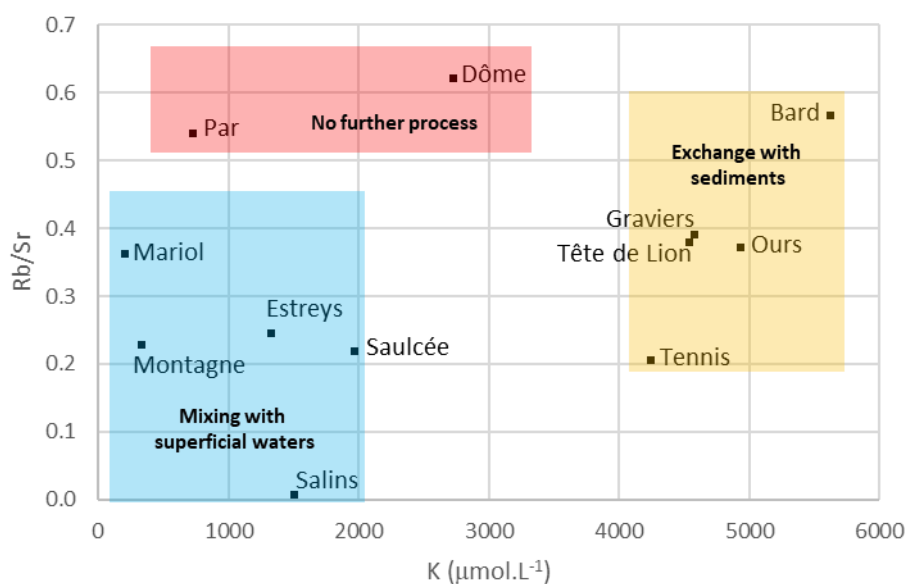


**Figure V-3:** Piper diagram highlighting the main water types of the thermo-mineral springs sampled. The coloured areas specified the main facies of the springs: In blue with  $\text{Na}^+$  facies; in green, springs with  $\text{Ca}^{2+}$  facies; in red, springs with NaCa facies.



## **Water origin and main phenomena posterior to deep circulation**

The groundwater is recharged by rainfall precipitating over the area (demonstrated by stable isotopes of the water molecule). After infiltration these waters circulate deeply in the crystalline basement. This deep circulation is clearly demonstrated by the occurrence of at least one of the following factors in each sampled spring: 1) high temperature evidencing deep circulation; 2) high mineralization demonstrating long and strong water/rock interactions; 3) presence of deep CO<sub>2</sub>. A more or less rapid ascent allows the return of these groundwater towards the surface. During this ascent, subsequent processes can occur. They can be distinguished through a Piper diagram that allow thus the distinction of three groups of water: 1) mixing with surface waters or 2) interaction with sediment layer located above the deep reservoir. Estreys, Mariol, Montagne, Salins and Saulcée are affected by a mixing with superficial waters (Fig. V-4). Rb/Sr and K ratio testify for an exchange with superficial sediments for Bard, Graviers, Ours, Tennis and Tête de lion. The warmest waters (Par and Dôme), affected by a rapid ascent, do not show any sign of a subsequent process to their deep circulation. All these observations are summarized in Table V-3.



**Figure V-4:** Rb/Sr vs K highlighting processes occurring after deep circulation: mixing with surface waters in blue, exchange with sediments in yellow and no further process in pink.

### Diatoms community diversity

A total of 42 species were found in the monitored springs. Species richness varies between 2 and 20 with a mean of  $6 \pm 5$  (Table V-4). The Ours sample is the poorest (2) while the Montagne sample is the richest (20). Shannon index mean is of  $0.73 \pm 0.46$  with the highest index found at Montagne and the lowest at Saulcée. The evenness varies between 0.08 and 0.78. But no significative difference was observed between between the different classes of TDS, temperature, geochemical facies and “water origin” for Shannon index and evenness. Also, no difference in alpha diversity (species richness, Shannon index, evenness) was measured by Kruskal-Wallis tests between the different classes. There is only a significative difference of species richness between springs with low (S mean =5.222) and high levels (S mean =10.333) of <sup>222</sup>Rn activity.

**Table V-3:** Category for Kruskal-Wallis test and MRPP analysis using Total Dissolved Solid (TDS), temperature levels, geochemical facies and the “water origin”. “Water origin” corresponds to the main phenomenon after deep circulation of water and  $^{222}\text{Rn}$  activity level for each spring.

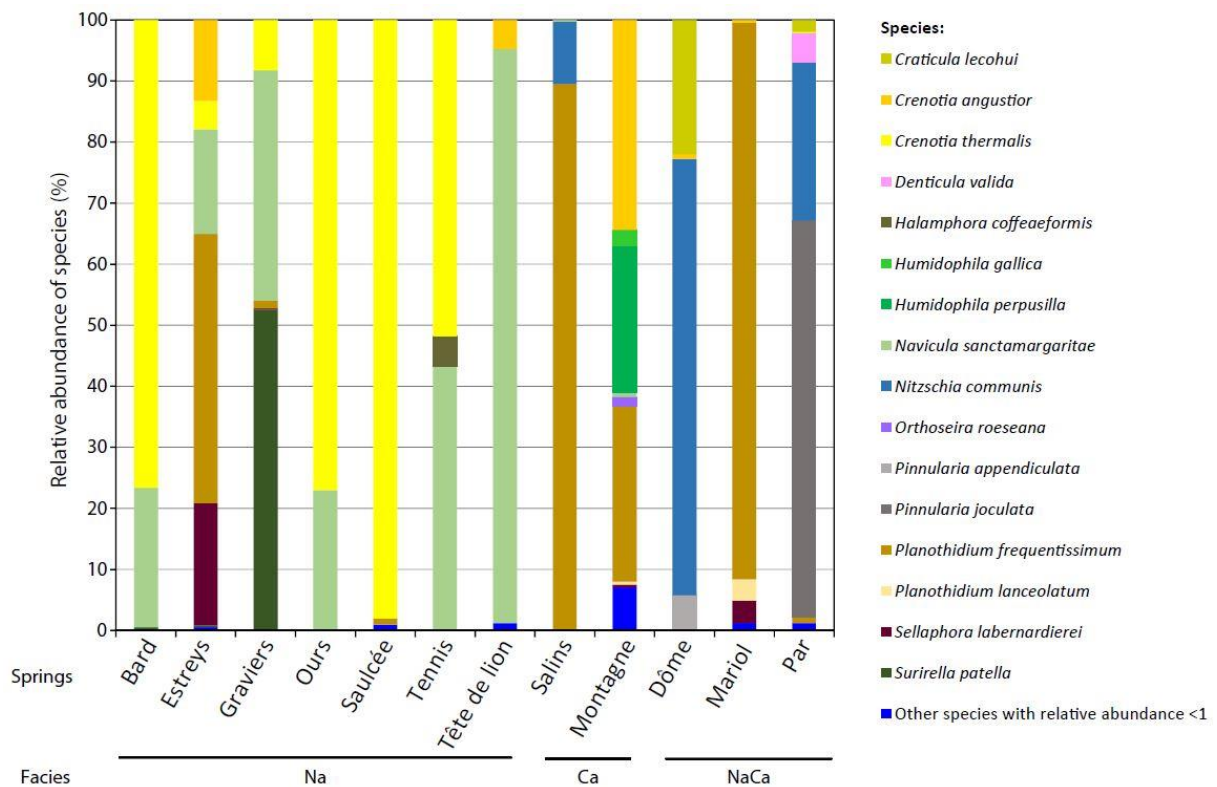
	TDS	Temperature	Geochemical facies	“Water origin” (Main phenomenon posterior to deep circulation)	$^{222}\text{Rn}$ level
<b>Bard</b>	> 3000	< 40°C	Na	exchange with surface formations	low
<b>Dôme</b>	> 3000	> 40°C	NaCa	none	low
<b>Estreys</b>	< 3000	< 40°C	Na	mixtures with surface water	high
<b>Graviers</b>	> 3000	< 40°C	Na	exchange with surface formations	low
<b>Mariol</b>	< 3000	< 40°C	NaCa	mixtures with surface water	high
<b>Montagne</b>	< 3000	< 40°C	Ca	mixtures with surface water	high
<b>Ours</b>	> 3000	< 40°C	Na	exchange with surface formations	low
<b>Par</b>	< 3000	> 40°C	NaCa	none	low
<b>Salins</b>	< 3000	< 40°C	Ca	mixtures with surface water	low
<b>Saulcée</b>	< 3000	< 40°C	Na	mixtures with surface water	low
<b>Tennis</b>	> 3000	< 40°C	Na	exchange with surface formations	low
<b>Tête de lion</b>	> 3000	< 40°C	Na	exchange with surface formations	low

The list of the different taxa present and their relative abundances in springs are given in supplementary table 1. Twenty-four genera of pennate diatoms were found. Sixteen species represent the most abundant (with a relative abundance greater than 1% in at least one sample): *Craticula lecohui*, *Crenotia angustior*, *C. thermalis*, *Denticula valida*, *Halamphora coffeaeformis*, *Humidophila gallica*, *H. perpusilla*, *Navicula sanctamargaritae*, *Nitzschia communis*, *Orthoseira roeseana*, *Pinnularia appendiculata*, *Pinnularia jocolata*, *Planothidium frequentissimum*, *P. lanceolatum*, *Sellaphora labernardierei* and *Surirella patella* (Fig. V-5).

**Table V-4:**  $\alpha$ -diversity index (species richness (R), Shannon (H), evenness (E)) for the 12 monitored springs.

	<b>Richness (R)</b>	<b>Shannon (H')</b>	<b>Evenness (J')</b>
<b>Bard</b>	4	0.57	0.41
<b>Dôme</b>	4	0.77	0.56
<b>Estreys</b>	8	1.44	0.69
<b>Graviers</b>	5	0.98	0.61
<b>Mariol</b>	8	0.42	0.20
<b>Montagne</b>	20	1.67	0.56
<b>Ours</b>	2	0.54	0.78
<b>Par</b>	9	0.83	0.38
<b>Salins</b>	3	0.35	0.31
<b>Saulcée</b>	5	0.12	0.08
<b>Tennis</b>	3	0.85	0.77
<b>Tête de lion</b>	6	0.27	0.15

The springs associated with the Na geochemical facies are characterized by the presence of *C. thermalis* and *Navicula sanctamargaritae*. In Dôme and Par, two springs presenting a Na-Ca facies, *Craticula lecohui*, *Nitzschia communis* and *Pinnularia jocolata* are dominant. All the other springs present a high abundance of *Planothidium frequentissimum*.

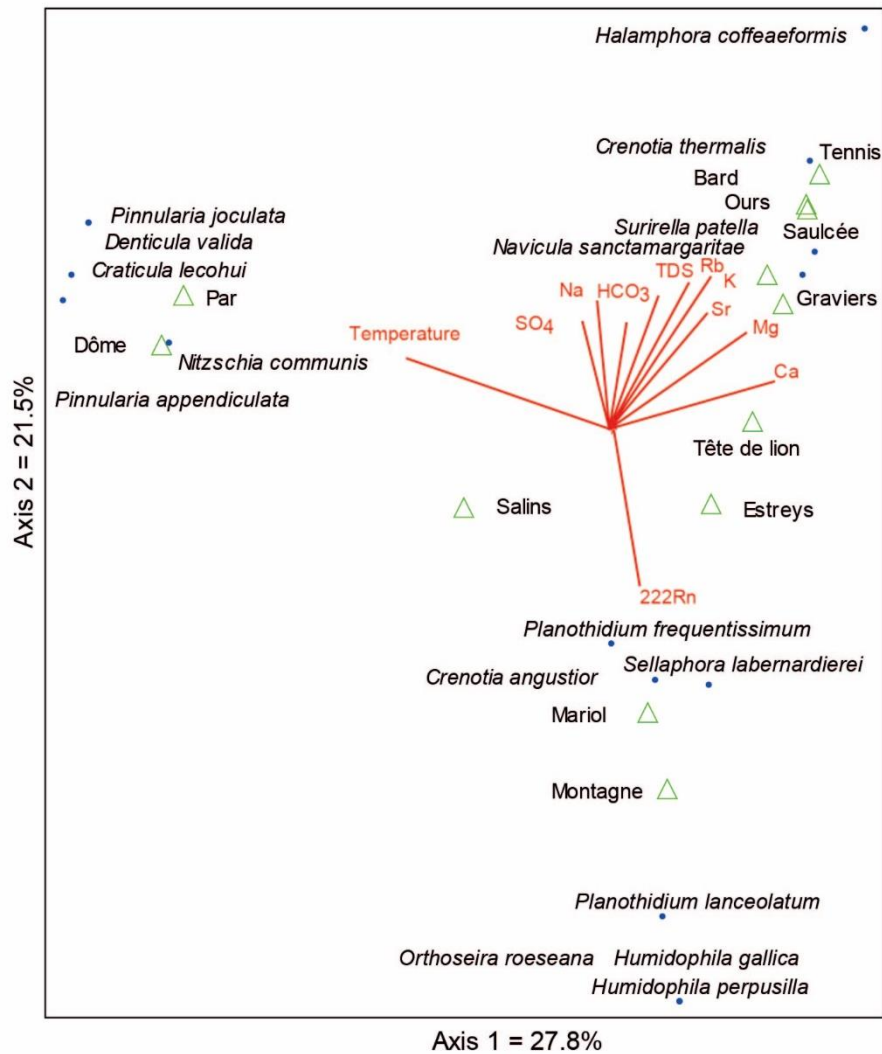


**Figure V-5:** Taxonomic composition of the diatom communities in the studied springs. The springs are classified according to their geochemical facies. Species shown have an abundance greater than 1% in at least one sample.

### Relationship between diatoms species and environmental parameters

A canonical correspondence analysis was used to highlight the correlation between the diatom species, the study sites (i.e. mineral springs) and their physico-chemical parameters (Fig. V-6). A p-value of 0.0090 was obtained with the Monte-Carlo test indicating that the effect of the variables on the observations was significant. 49.3% of the variability of the dataset was captured by the two axes projection. Axes 1 and 2 explained respectively 27.8% and 21.5% of the variability. Temperature was a dominant factor that clearly separated the samples into two groups. The first group on the left of the first factorial plan is constituted by Par and Dôme characterised by temperature above 40°C. The species associated with these springs are *Craticula lecohui*, *Nitzschia communis* and *Pinnularia jocolata*. The second group gather the springs presenting temperatures <40°C and high TDS. The species associated with these springs are *Crenotia thermalis*,

*Halamphora coffeaeformis*, *Navicula sanctamargaritae* and *Surirella patella*. According to their low TDS and temperature and the high level of  $^{222}\text{Rn}$ , a third group can be distinguished (Estreys, Mariol, Montagne and Salins) and is associated with the following species: *Crenotia angustior*, *Humidophila gallica*, *H. perpusilla*, *Orthoseira roeseana*, *Planothidium frequentissimum*, *P. lanceolatum* and *Sellaphora labernardierei*.



**Figure V-6:** Canonical Correspondence Analysis (CCA) diagram showing the ordination of diatom species (in blue dots) and sampling site (i.e springs. in green diamonds) along the first two axes and their correlation with environmental variables (in red arrows). TDS: Total Dissolved Solids.  $^{222}\text{Rn}$ :  $^{222}\text{Rn}$  activity.

MRPPs have been used to test if the TDS classes, temperature levels, geochemical facies, “water origin” and  $^{222}\text{Rn}$  classes induced differences in the diatom communities. Diatom composition is significantly different between the two TDS classes ( $T = -2.8$ ,  $A = 0.11$  and  $p = 0.01$ ), the three different geochemical facies ( $T = -2.1$ ,  $A = 0.12$  and  $p = 0.039$ ), the three different “water origin” ( $T = -3.65$ ,  $A = 0.23$  and  $p = 0.003$ ) and the two  $^{222}\text{Rn}$  classes ( $T = -2.41$ ,  $A = 0.10$  and  $p = 0.026$ ). No difference is observed for the water temperature contrary to the CCA.

Using Indicator Species Analysis, *Navicula sanctamargaritae* is associated with high TDS values ( $\text{TDS} > 3000 \text{ mg.L}^{-1}$ ) while *Planothidium frequentissimum* is associated with the lowest values (Table V-5). *Crenotia thermalis* and *Navicula sanctamargaritae* are observed in groundwaters of Na-geochemical facies. *Navicula sanctamargaritae* is well developed for springs with rapid ascent, that not present any subsequent process after their deep circulation. *Craticula lecohui* and *Nitzschia communis* is characteristic of groundwater affected by an exchange with superficial sediments whereas *Planothidium frequentissimum* is abundant in the mixture between deep and surface waters. At last, *Crenotia angustior*, *Planothidium frequentissimum* and *Sellaphora labernardierei* are associated with the highest values of  $^{222}\text{Rn}$ .

**Table V-5:** lists the indicator species for the two categories of TDS, the three categories of geochemical facies and the three categories of “water origin” having observed indicator value (IV) greater than 50% along with mean standard deviation and p values. Different diatoms were linked to each group.

<b>Indicator species</b>	<b>Observed indicator value (IV)</b>	<b>Mean</b>	<b>S.dev</b>	<b>p*</b>
<b>TDS</b>				
> 3000 mg.L <sup>-1</sup>				
<i>Navicula sanctamargaritae</i>	77.0	50.3	13.40	0.0460
< 3000 mg.L <sup>-1</sup>				
<i>Planothidium frequentissimum</i>	99.5	46.2	13.85	0.0040
<b>Geochemical facies</b>				
Na				
<i>Crenotia thermalis</i>	85.6	44.9	16.67	0.012
<i>Navicula sanctamargaritae</i>	84.5	47.1	15.45	0.01100
Ca				
<i>Craticula lecohui</i>	66.7	29.4	14.70	0.0420
<b>“Water origin”</b>				
None				
<i>Navicula sanctamargaritae</i>	92.4	45.9	14.38	0.0010
Exchange with surface formations				
<i>Craticula lecohui</i>	100.0	30.0	14.76	0.0140
<i>Nitzschia communis</i>	96.0	31.7	16.70	0.0140
<b>Mixtures with surface water</b>				
<i>Planothidium frequentissimum</i>	45.7	45.7	16.97	0.0070
<sup>222</sup> Rn				
Activity>1000 Bq.L-1				
<i>Crenotia angustior</i>	87.3	39.2	15.56	0.0200
<i>Planothidium frequentissimum</i>	81.4	47.3	14.34	0.0220
<i>Sellaphora labernardierei</i>	97.3	35.9	15.14	0.0090

ADONIS analyses were used to determine the percentage contribution of TDS concentration, temperature levels, geochemical facies, the “water origin” and the <sup>222</sup>Rn level of activity in the variability of diatom community structure. These analyses show that when considering only the occurrence of species (Jaccard), temperature, TDS concentration and <sup>222</sup>Rn explain respectively 15.24%\*\* , 13.61%\* and 13.15%\* of the variability. However, when considering the abundance of species, <sup>222</sup>Rn explain, temperature and TDS concentration contribute to 24.44 % \*\*\*, 18.75 % \*\*\*, 17.14 % \*\* respectively. In either case, water origin and geochemical facies explain less than 10% each (Table V-6).



**Table V-6:** Non-parametric Multivariate Analysis of Variances (NPMANOVA or Adonis) results for unifactorial analysis of TDS concentration, temperature levels, geochemical facies, the “water origin” and the  $^{222}\text{Rn}$  level of activity in spring made with Jaccard (J) and ab.Jaccard (ab.J) distances performed on species matrix with relative abundances. The matrix contains only ASV with a relative abundance of more than 1% in at least one sample of the mineral springs monitored. Significant p-value is indicated with (\*\*\*:  $p < 0.001$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*:  $p < 0.05$ )

<b>Factors</b>	<b>R<sup>2</sup> (J)</b>	<b>R<sup>2</sup> (ab.J)</b>
<i>TDS concentration</i>	13.61 % *	17.14 % **
<i>Geochemical facies</i>	7.48 %	8.43 % *
<i>“Water origin”</i>	9.84 %	9.57 % *
$^{222}\text{Rn}$	13.15 % *	24.44 % ***
<i>Temperature</i>	15.24 % **	18.75 % ***

## Discussion

The main objective of this study was to better characterize some thermo-mineral springs of the French Massif central according to their abiotic characteristics linked to the “water origin” and to link this information with the diatom communities. This coupling is intended to improve the knowledge on the ecology of these organisms inhabiting thermo-mineral springs. We mainly focus on the TDS classes, temperature levels, geochemical facies and “water origin” as it is well known that temperature and geochemistry of the lithostratigraphic units (using mineralization of the waters) are key factors of microalgal (diatoms, cyanobacteria, green algae) diversity (Sompong et al. 2005; Jonker et al. 2013). We tested differences not only on species composition but also on species richness, Shannon index, and Evenness.

### Geochemical characteristics of the studied springs

The twelve selected springs constitute a representative panel of the thermo-mineral springs of the Massif Central because they emerge in different and typical contexts

of the region: crystalline basement for Par and Tête-de-Lion; bedrock/ Tertiary sediment context (Montagne, Bard); Tertiary sediments (Ours, Graviers, Estreys, Dôme) or Quaternary sediments mainly alluvium (Salins, Saulcée, Mariol, Tennis). Groundwater is recharged by rainfall over the studied area (showing by stable isotope of the water molecule). After infiltration, the deep circulation of groundwater is demonstrated by the high temperature of springs (local geothermal gradient is of 3.3 to 4°C/100m, Genter et al. 2003). All the thermo-mineral springs are recognized as thermal ( $T > 40^{\circ}\text{C}$  compared to air temperature), Montagne and Ours excepted. The deep circulation is also testified by the presence of deep  $\text{CO}_2$  (prove by stable isotope of the carbon) and a high mineralisation: 11 of the 12 studied springs are characterized by a TDS higher than  $1000 \text{ mg.L}^{-1}$ . The TDS of  $1000 \text{ mg.L}^{-1}$  is the most widely accepted boundary between fresh and mineral water (Krieger 1963). During their ascent, groundwater can be modified by subsequent processes such as dissolution/exchange with sediment layers (Tertiary or Quaternary sediments) or mixing with surface waters. Three geochemical facies can then be distinguished at the emergence points:  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  and Na-Ca.

All these characteristics can have an influence on diatoms ecology. First, several studies focusing on diatom assemblages in springs with high mineral content (conductivity above  $4000 \mu\text{S.cm}^{-1}$ ) allow identifying diversified diatom communities (Beauger et al. 2015, 2016, 2017, 2018, 2020; Angel et al. 2018; Lai et al. 2022). Moreover, the mineral content (chemical composition) in thermo-mineral springs is well known to affect micro-algal diversity (Jonker et al. 2013) and this could influence the growth of diatoms (Mandal and Sarkar 2015; Żelazna Wieczorek et al. 2015). At last, as springs are ecotones that rely on groundwater to surface water (Cantonati et al. 2012), different phenomena could occur after deep circulation as underlined by the Rb/Sr and Rb/K ratio (Michard et al. 1976; Ouzounian et al. 1980). All these phenomena can affect the diatom community's distribution.

### ***Structure of the diatom assemblages***

A total of 42 species was found in the springs considered in this study. However, most studied sites sustained a low richness of diatom species except Montagne, Estreys

and Tête de Lion springs. This observation is the opposite of those obtained in other studies such as Cantonati et al. (2012) and Lai et al. (2022). These authors observed high species-richness values and suggest the influence of the ecotonal nature of springs and of different local abiotic factors. However, when considering the springs considered in this study, the majority of them present a construction created by human around the emergence. This induced low habitat diversity and sometimes low light intensity resulting in a decrease of richness (Beauger et al. 2021). Thus, natural springs present higher richness than Man-made ones such as Estreys and Tête de Lion springs.

No difference in alpha diversity (species richness, Shannon index, Evenness) was measured by Kruskal-Wallis tests between the different classes of TDS, temperature, geochemical facies and “water origin”. This result is on the opposite of those of Lai et al. (2022) who observed higher species richness, diversity, and evenness in hyperthermal and medium-mineral springs and of Pumas et al. (2018), Nikulina and Kociolek (2011) and Delgado et al. (2020) who observe a decreasing diversity with the increase in global water temperature. For Nikulina and Kociolek (2011), the diatom diversity present in springs from Kuril and Sakhalin Islands, decreases significantly when water temperature exceeds 70°C. This assertion is not confirmed by our study, as the hottest spring (Par), sheltered 9 species but it is not the lowest value. The artificialization and anthropization of the habitat (i.e., the conversion of natural environments by human action) at the layout could explain this difference with the other studies. However, interestingly, differences in richness were detected between springs with low levels of  $^{222}\text{Rn}$  activity and those with high levels. This result should be considered with caution as it is linked to the statistical weight of the La Montagne source, which has the highest activity in  $^{222}\text{Rn}$ . But no difference in Shannon diversity and evenness was observed. Although the diversity index as Shannon index are interesting to measure the unseen diversity and compare samples, observed richness is the measure that comes closest to reality. It is also relevant because Millan et al., 2019, had already detected a potential environmental pression of  $^{222}\text{Rn}$  on diatom. Indeed, a correlation between  $^{222}\text{Rn}$  activity and the rate of diatom frustule deformations in some mineral springs of Auvergne was determined.  $^{222}\text{Rn}$  is a alpha-emitters and is known to create negative effect (mutation, cancer) when it is internalized in organisms (Garnier-laplace 2004). Thus, this result suggests that  $^{222}\text{Rn}$  could have a negative effect on diatom richness in mineral springs.

When considering the species, 16 species are dominant (with a relative abundance greater than 1% in at least one sample). *Craticula lecohui*, *Crenotia angustior*, *C. thermalis*, *Denticula valida*, *Halamphora coffeaeformis*, *Humidophila gallica*, *H. perpusilla*, *Navicula sanctamargaritae*, *Nitzschia communis*, *Orthoseira roeseana*, *Pinnularia appendiculata*, *Pinnularia jocolata*, *Planothidium frequentissimum*, *P. lanceolatum*, *Sellaphora labernardierei* and *Surirella patella*. *Craticula lecohui*, is associated with high temperature, as it was present in Par and Dôme springs (Beauger et al. 2017). *Pinnularia appendiculata*, was only present at Dôme spring. This species is typical of mineral waters, salt-rich inland waters with an average to high electrolyte content (Krammer 2000). *Denticula valida*, a saline species (Angel et al. 2018) and *Pinnularia jocolata* were also present in Par spring. *P. jocolata* was observed in other mineral springs (Lai et al. 2019b; Baker et al. 2022) and may be “considered representative of thermal springs and may be considered important biological indicators of geochemical changes induced by volcanic activity” (Quintela et al. 2013). At this spring, some individuals of *Achanthidium exiguum* were observed. This species is representative of the thermal group (Quintela et al. 2013) and is the most abundant species found in fumaroles and saline rivers in the El Tatio Geothermal Field (Altiplano, Chile) (Angel et al. 2018).

The two species of *Crenotia* were present in some thermo-mineral springs except in Dôme, Estreys, Graviers, Mariol, Par, Salins and Tête de Lion. *C. thermalis* occasionally encountered in running waters, is characteristic of electrolyte-rich inland habitats, particularly thermal and mineral springs (Wojtal 2013; Lange-Bertalot et al. 2017). *Halamphora coffeaeformis*, present at Tennis spring, is known to be a brackish species (Levkov 2009). The three species of *Humidophila* were observed in Montagne spring and are typical of low light intensity (Lange-Bertalot et al. 2017). These species were not observed at Saulcée spring maybe due to the absence of sediments in the building.

*Navicula sanctamargaritae* was present in the almost all springs except in those with the highest water temperature (Dôme and Par) and also in Mariol and Saulcée springs. This species is associated with high mineralization levels of water (Beauger et al. 2015; Lai et al. 2019a).

*Nitzschia communis* was present at Salins spring and also in the hottest springs (Dôme with 71% of the relative abundance and Par). It was considered to contribute significantly to the diatom assemblages of the mineral and thermal springs from volcanic environments in São Miguel Island, Azores (Quintela et al. 2013). Moreover, this species is found in calcium-rich waters of moderate-very high specific conductivity, very poor in dissolved oxygen and of very low nitrate concentrations in Polish springs (Wojtal 2013). *Orthoseira roeseana*, was only found in Montagne spring. This species was also observed in carbonated Polish springs associated with acidic waters of very low and low nitrate concentration but broad range of specific conductivity, alkalinity and dissolved oxygen concentrations (Wojtal 2013).

*Planothidium frequentissimum* was also present in a large part of the studied springs except Bard, Tête de Lion, Tennis and Ours. This species was observed in other springs except in those with higher temperature and conductivity (Lai et al. 2019a). *Planothidium lanceolatum* was only observed in Mariol and Montagne springs. This species seems to be a sensitive indicator of calcium ions and nutrient enrichment in Polish springs (Wojtal 2013).

*Sellaphora labernardierei* was only present at Graviers, Estreys Mariol and Montagne and seems associated with the presence of nitrates (Beauger et al. 2016; Lai et al. 2019a). At last, *Surirella patella* was observed in three springs (Bard, Estreys and Graviers reaching 52% of the total abundance). This species observed in other mineral springs of the French Massif central (Beauger et al. 2020), is known to be a brackish water species (Barinova et al. 2011).

### **Environmental variables associated with diatom assemblages**

The observations underlined that the water temperature is a dominant factor that allows separating the samples into two groups in the CCA. This result was highlighted with ADONIS with indicated that temperature is the factor which explain better the community structure variability considering species occurrence. This observation was confirmed by other studies (Mpawenayo et al. 2005; Owen et al. 2008; Jonker et al. 2013; Quintela et al. 2013; Leira et al. 2017, Angel et al. 2018; Pumas et al. 2018; Delgado et al.

2020; Lai et al. 2022) in other areas of the world. However, this result was not confirmed by the MRPP analysis using the two groups of water temperature.

Mineralization is also an important factor that separated the thermo-mineral springs characterized by a high TDS and high concentration in calcium, carbonates, rubidium, strontium, magnesium, sodium and sulphates in the CCA. In previous studies, diatom assemblage composition is clearly influenced by conductivity (Mpawenayo et al. 2005; Owen et al. 2008; Leira et al. 2017; Angel et al. 2018; Pumas et al. 2018) but also by high concentrations of  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{F}^-$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{Cl}^-$ , and  $\text{SO}_4^{2-}$  (Angel et al. 2018; Lai et al. 2022).

ADONIS revealed that TDS concentration is the second factor that explains species distribution between springs. Using the MRPP, the difference between the two groups of TDS is also significant and *Navicula sanctamargaritae* is associated with high TDS values ( $\text{TDS} > 3000 \text{ mg.L}^{-1}$ ) while *Planothidium frequentissimum* is associated with the lowest values (Lai et al. 2019a).

The CCA indicates that  $^{222}\text{Rn}$  is also a dominant factor in diatom community of springs. ADONIS indicated that  $^{222}\text{Rn}$  is the third factor that influence diatoms species distribution. However, interestingly when the ADONIS was performed with species abundances,  $^{222}\text{Rn}$  is the factor that better explains diatom community structure in springs. Its percentage of contribution is higher than that of Temperature and TDS concentration. This result seems to indicate that in springs, radioactivity is always a factor that can influence diatom communities even if they have been exposed to it for long periods. This is the first study that analysed the influence of  $^{222}\text{Rn}$  activity on diatom community structure. Furthermore, *Crenotia angustior*, *Planothidium frequentissimum* and *Sellaphora labernardierei* are associated with the highest values of  $^{222}\text{Rn}$ . *Crenotia angustior* and *Planothidium frequentissimum* were also mentioned in Millan et al. (2019) as the dominant species in the most radioactive springs. Stressful environments are dominated by small organisms with faster metabolism and fast-reproducing when large organism seems to be more sensitive to stress (Odum 1985; Falasco 2009). Thus, *Crenotia angustior*, *Planothidium frequentissimum* and *Sellaphora labernardierei* can be advantage by their small size, for their

persistence in springs with level of  $^{222}\text{Rn}$ . But these species are also the ones with the higher rate of deformities in these springs (Millan et al. 2019).

At last, our analysis underlined that the three different geochemical facies and the three different “water origin” induced different diatom communities. Up to now, only Jonker et al. (2013) had demonstrated that the occurrence of diatoms coincided with specific geological formations and that these algae could act as indicator species of geology: 1) *Crenotia thermalis* and *Navicula sanctamargaritae* are characteristic of Na geochemical facies, 2) *Craticula lecohui* and *Nitzschia communis* occur when there is an subsequent circulation in Tertiary or Quaternary sediments, 3) *Planothidium frequentissimum* is abundant in mixing between ground and surface waters, 4) *Navicula sanctamargaritae* is developed in groundwater with rapid ascent which are not affected by subsequent processes.

## **Conclusion:**

As springs are among the most threatened ecosystems on Earth (Cantonati et al. 2020; Stevens et al. 2021), it is important to have a better knowledge on their abiotic characteristics and on the diatom communities inhabiting these environments in order to protect and restore them. This study underlined that the mineralization, the geochemical facies and the “water origin”, temperature and  $^{222}\text{Rn}$  activity were important to understand the functioning of these habitats and the diatom distribution in these extreme environments as they are significant variables. Some species were indicator not only of low or high mineralization but also of Na geochemical facies. Considering the “water origin”, some particular species were indicator of no phenomenon after deep circulation of water, and also of exchange with surface formations and *Planothidium frequentissimum* of mixtures with surface water. Besides a better knowledge on the ecology of species, this, could allow to characterize easily the “water origin” of other springs not yet studied. Also, species as *Crenotia angustior*, *Planothidium frequentissimum* and *Sellaphora labernardierei* were associated with high level of  $^{222}\text{Rn}$ .

Further investigations on a wider spatial scale could be necessary to construct a robust knowledge framework on relationships between species and abiotic variables such as geochemical facies and “water origin” of thermo-mineral springs. These studies can help to better understand the functioning of thermo-mineral springs and to characterize these peculiar environments and support management approaches for appropriate uses.

## **Acknowledgments**

We acknowledge financial support from CNRS-INEE within the context of the Zone Atelier Territoires Uranifères. We also acknowledge anonymous reviewers.

## **Funding**

Funding for this research was partly provided in the framework of the DIATOMS project (LIST - Luxembourg Institute of Science and Technology), by the Zone Atelier Territoires Uranifères and by the “Fédération des Recherches en Environnement” of Clermont-Ferrand (UBP/CNRS FR 3467/INRA) and by Clermont Auvergne Metropole.



**Supplementary table V-1:** Species composition of diatom communities in mineral springs monitored.

Species	Salins	Par	Saulcé	Tennis	Montagne	Mariol	Ours	Graviers	Tête de lion	Bard	Estreys	Dôme
<i>Achnantheidium exiguum</i> Grunow (Krasske) Czarnecki	0	0.47	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Adlafia minuscula</i> (Grunow) Lange-Bertalot	0	0	0	0	0.48	0	0	0	0	0	0	0
<i>Amphora copulata</i> (Kütz) Schoeman & Archibald	0	0	0.50	0	0.48	0	0	0	0	0	0	0
<i>Caloneis fontinalis</i> (Grunow in Van Heurck) Cleve-Euler	0	0	0	0	0.48	0	0	0	0	0	0	0
<i>Craticula. lecohui</i> Beauger et al	0	1.96	0	0	0	0	0	0	0	0	0	22.0
<i>Crenotia angustior</i> (Grunow) Wojtal	0	0	0	0	34.38	0.49	0	0	4.73	0	13.24	0.75
<i>Crenotia thermalis</i> (Rabenhorst) Wojtal	0	0.25	98.02	51.83	0	0	77.0	8.21	0	76.60	4.66	0
<i>Denticula valida</i> (Pedicino) Grunow in Van Heurck	0	4.66	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Diploneis krammeri</i> Lange-Bertalot & Reichardt	0	0.25	0	0	0.97	0	0	0	0	0	0	0
<i>Diploneis</i> sp. cf. <i>krammeri</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0.50	0	0	0
<i>Diploneis fontanella</i> Lange-Bertalot	0	0	0	0	0.48	0	0	0	0	0	0	0
<i>Diploneis fontium</i> Reichardt & Lange-Bertalot in Reichardt	0	0	0	0	0	0	0	0	0.25	0	0	0
<i>Diploneis oculata</i> (Brebisson in Desmazières) Cleve	0	0	0	0	0.48	0	0	0	0	0	0	0
<i>Epithemia adnata</i> (Kützing) Brébisson	0	0	0	0	0	0.25	0	0	0	0	0	0
<i>Fragilaria famelica</i> (Kützing) Lange-Bertalot var. <i>famelica</i>	0	0	0.25	0	0	0.25	0	0	0	0	0	0
<i>Gomphonema exilissimum</i> (Grun.) Lange-Bertalot & Reichardt	0	0	0	0	0	0.25	0	0	0	0	0	0
<i>Gomphonema parvulum</i> (Kützing) Kützing	0	0	0	0	0.48	0.49	0	0	0	0	0	0
<i>Halamphora coffeaeformis</i> (Agardh) Levkov	0	0	0	4.89	0	0	0	0	0	0	0	0

<i>Halamphora normanii</i> (Rabenhorst) Levkov	0	0	0	0	0.48	0	0	0	0	0	0	0
<i>Hantzschia amphioxys</i> (Ehr.) Grunow in Cleve et Grunow	0	0.25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Humidophila contenta</i> (Grunow) Lowe. Kociolek. Johansen. Van de Vijver. Lange-Bertalot & Kopa	0	0	0	0	0.73	0	0	0	0	0	0	0
<i>Humidophila gallica</i> (W. Sm.) Lowe. Kociolek. You. Wang & Stepane abormal	0	0	0	0	2.66	0	0	0	0	0	0	0
<i>Humidophila perpusilla</i> (Grunow) Lowe. Kociolek. Johansen. Van deVijver. Lange-Bertalot & Kopalová	0	0	0	0	23.97	0	0	0	0	0	0	0
<i>Luticola acidoclinata</i> Lange-Bertalot	0	0.25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Navicula cincta</i> (Ehr.) Ralfs in Pritchard	0	0	0	0	0.73	0	0	0	0	0	0	0
<i>Navicula sanctamargaritae</i> Beauger in Beauger & al.	0.25	0	0	43.28	0.73	0	23.0	37.81	94.03	22.91	17.16	0
<i>Nitzschia microcephala</i> Grunow in Cleve & Moller	0	0	0	0	0	0	0	0	0.25	0	0	0
<i>Nitzschia</i> sp. cf. <i>liebetruthii</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.25	0.25	0
<i>Nitzschia communis</i>	10.17	25.98	0	0	0	0	0	0	0	0	0	71.50
<i>Orthoseira roeseana</i> (Rabenhorst) Pfitzer	0	0	0	0	1.45	0	0	0	0	0	0	0
<i>Pinnularia appendiculata</i> (Agardh) Cleve	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5.75
<i>Pinnularia</i> sp. cf. <i>kuetzingii</i> cf. <i>appendiculata</i>	0	0	0.25	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Pinnularia frauenbergiana</i> Reichardt	0	0	0	0	0.73	0	0	0	0	0	0	0
<i>Pinnularia joculata</i> (Manguin) Krammer	0	64.95	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Pinnularia subrupestris</i> Krammer	0	0	0	0	0.48	0	0	0	0	0	0	0
<i>Planothidium frequentissimum</i> (Lange- Bertalot) Lange-Bertalot	89.58	0.98	0.98	0	28.81	91.13	0	1.24	0	0	44.12	0
<i>Planothidium lanceolatum</i> (Brebisson ex Kützing) Lange-Bertalot	0	0	0	0	0.48	3.45	0	0	0	0	0	0

<i>Pseudostaurosira bardii</i> A. Beuger. C.E. Wetzel. O. Voldoire. A. Garreau et L. Ector	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.25	0
<i>Rhopalodia acuminata</i> Krammer var. <i>acuminata</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.24	0	0	0
<i>Sellaphora labernardierei</i> Beuger. C.E. Wetzel et Ector	0	0	0	0	0.52	3.69	0	0.25	0	0	0	20.10	0
<i>Surirella patella</i> Kützing	0	0	0	0	0	0	0	52.49	0	0.24	0.22	0	0



## **Chapitre VI: La source de la Poix : un milieu extrême peu radioactif**

La source de la Poix fait partie des sources échantillonnées dans cette thèse pour sa minéralisation. Il s'agit d'une particularité géologique du Massif central français. Cette source est apparue comme un cas particulier, peu radioactive dissociée des autres sources dans les analyses statistiques. Les valeurs élevées des paramètres environnementaux impliquent que l'échantillon de La Poix a un poids très important dans les analyses statistiques et est considéré comme un point extrême. De fait, cette source a été retirée du jeu de données global. Cependant, nous avons étudié la biodiversité des assemblages de diatomées de cette source que nous présentons dans ce chapitre. Cet article a été publié dans la revue BIOM en 2022, volume 3, numéro 1, p. 40-51.

# **Brackish diatom species observed at the bituminous Poix spring: an island of curiosity**

Lory-Anne Baker<sup>1,2\*</sup>, Aude Beauger<sup>2,3</sup>, Carlos E. Wetzel<sup>4</sup>, Olivier Voltaire<sup>3</sup>, Christelle Blavignac<sup>5</sup>, Elisabeth Allain<sup>3</sup>, Luc Ector<sup>4†</sup> & David Biron<sup>1,2†</sup>

<sup>1</sup>Université Clermont Auvergne, CNRS, LMGE, F-63000 Clermont-Ferrand, France; <sup>2</sup>LTSER “Zone Atelier Territoires Uranifères”, 63000 Clermont-Ferrand, 63178 Aubière Cedex, France; <sup>3</sup>Université Clermont Auvergne, CNRS, GEOLAB, F-63000 Clermont-Ferrand, France; <sup>4</sup>Luxembourg Institute of Science and Technology (LIST), Environmental Research and Innovation department (ERIN), Environment and Biodiversity (OCEB), 4422 Belvaux, Luxembourg; <sup>5</sup>Centre Imagerie Cellulaire Santé, UCA PARTNER, F-63000 Clermont-Ferrand, France.

\*Lory-Anne Baker, l-anne.baker@doctorant.uca.fr, Université Clermont Auvergne, CNRS, LMGE, F-63000 Clermont-Ferrand, France.

## **Abstract**

The Poix spring is a geological particularity of the French Massif central as it is known to be bitumen associated with salt water, methane and traces of hydrogen sulphide. Between March 2017 and June 2020, three samples were taken by scraping the diatoms on the layer of bitumen. Moreover, the physical and chemical conditions were examined. It appears that the conductivity of the saline water is higher than the one of the ocean leading to the development of some brackish diatom species observed for some of them on the intertidal sediments or estuaries. Even if the abiotic conditions were extreme for these algae, the biodiversity was high and reveals species with high ability to withstand in high salinity concentrations and fluctuations.

**Keywords:** brackish water; biodiversity, diatoms communities, mineral springs

## Introduction

Brackish water is defined as having a chloride content more than 400 mg.L<sup>-1</sup> or an electrical conductivity greater than 1.5 dS.m<sup>-1</sup> (Shevah 2014). Brackish environments are classically observed on coastal areas, estuaries but also in inland habitats. When considering inland areas, these are habitats under the influence of saline waters that accompany the salt deposits, as well as areas exposed to water deficit in dry climate (Reimold & Queen 1974; Poljakoff-Mayber & Gale 1975). These brackish environments are relatively widespread throughout the world and cover ca. 10 % of the land (O’Leary & Glenn 1994; Piernik 2012). Inland salt environments occur in limited areas, mostly on “fossil salt deposits and around salty springs” (Waisel 1972; Piernik 2012).

Among the springs, there is a wide range of physical and chemical conditions with conductivity ranging from 10 to 70,000  $\mu\text{S.cm}^{-1}$  (Sabater & Roca 1992; Angeli *et al.* 2010; Żelazna- Wiczorek 2011; Wojtal 2013; Beauger *et al.* 2015, 2016, 2017, 2019). When the conductivity is the highest with high sodium concentration, springs are associated with halophyte vegetation or micro-organisms adapted to high osmotic pressure. Among these micro-organisms, diatoms are present and distributed in this particular habitat. These microscopic algae are known to have ecological preferences for most of them. So, brackish diatom species are associated and grow in salty springs (Rakowska 1997; Wojtal 2013; Lai *et al.* 2016).

In the French Massif central, there are many salt marshes and among the 500 inventoried mineral springs (Lecoq 1864), some are salty springs that induced this brackish ecosystem. Indeed, an on-going survey on diatoms that began in 2015, reveals that the conductivity of the mineral springs ranges between 37 and 123,200  $\mu\text{S.cm}^{-1}$  with an average of 4800  $\mu\text{S.cm}^{-1}$  (Beauger, personal communication). The Poix spring at Clermont-Ferrand is the mineral spring with the highest conductivity and salinity of this region. Since at least antiquity, this spring has drawn attention particularly for the occurrence of bitumen with water. In 1575, the French author François de Belle-Forêt described the area as a hill where bitumen and spring water flow in the book “La cosmologie universelle de tout le monde”. Later, this spring was also mentioned by the

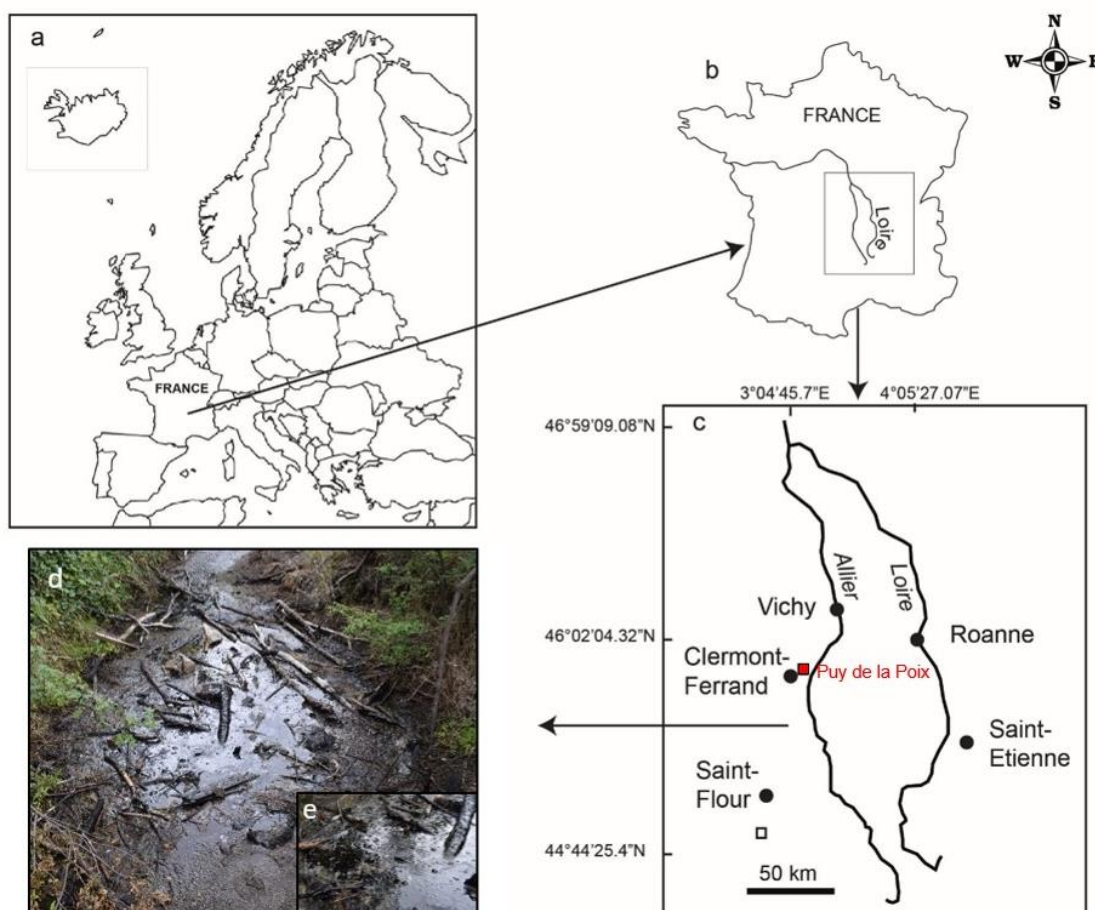
doctor Jean Banc in 1604, the chemist Joseph de Tournefort in 1734, the geologist Jean-Etienne Guettard in 1759 and the famous naturalists Antoine Delarbre in 1749, Georges-Louis Leclerc de Buffon in 1799 and Henri Lecoq in 1864 (Nivet 1846; Truchot 1878; Legrand 2019). Focusing on the mineral Poix spring, the main aim of the study was to estimate the biodiversity associated with these harsh conditions by studying diatom communities during different seasons.

## **Materials and methods**

### **Study site**

The Poix spring is situated in the French Massif central and more particularly in the plain of Limagne near Clermont-Ferrand (Fig. VI-1) (E Lambert 93: 711392.04; N Lambert 93: 6520283.61; altitude: 337m). In the Limagne plain, the Oligocene sediments are naturally rich in hydrocarbons. Indeed, the former lake of Limagne was very rich in life, and the conditions of sedimentation preserved a large part of the organic matter. This organic matter has undergone diagenesis and has partly become bitumen. These hydrocarbons (less dense than the water and the surrounding rocks) rise through the rocks of the Limagne, by following the volcanic vents of the peperitic mini-volcano situated in the area (Thomas 2008). Moreover, this bitumen is associated with salt water, methane and traces of hydrogen sulphide (Gonnard 1906). Lecoq (1864) underlined that out of 82 g of material there is 70 g of sodium chloride, 7 g of de sodium sulphate, 0.1 g of bitumen and organic matter, a small amount of other salts, carbonate of lime, carbonate of magnesia, etc. and finally only traces of sulfur and silica. The place where the spring emerges is not shaded and takes full advantage of the sunshine, which is favourable for the development of diatoms.





**Figure VI-1:** Map of the studied mineral spring. a: map of Europe; b and c: position location of the Poix spring; d: photo of the Poix spring and the bitumen.

### Physical and chemical analyses and diatom sampling

The sampling survey was carried out on the 16th March 2017, on the 22nd October 2019 and on the 8th June 2020 (table 1) in order to make an inventory of the diatom flora of the site. The geographical position of the sampling site was georeferenced using a DGPS Trimble Geo7x, in Lambert 93. In situ, conductivity ( $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ), pH (pH units), water temperature ( $^{\circ}\text{C}$ ) and the dissolved oxygen (%) were measured using respectively a multi-parameter WTW FC probe 340i and an oximeter Ysi ProODO. A water sample was collected for further chemical analysis in the laboratory and was analysed using the high-pressure ion chromatography technique. First, these samples were filtered using Whatman GF/C filters. For the cation analysis, a Thermo Scientific Dionex ICS1100 system was used, whereas for the anions, a Thermo Scientific Dionex Aquion system was

used. The concentrations (mg L<sup>-1</sup>) in lithium (Li<sup>+</sup>), sodium (Na<sup>+</sup>), ammonium (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), potassium (K<sup>+</sup>), magnesium (Mg<sup>2+</sup>), calcium (Ca<sup>2+</sup>), fluoride (F<sup>-</sup>), chloride (Cl<sup>-</sup>), nitrite (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), nitrate (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), phosphate (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) and sulphate (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) were measured in the laboratory. In addition, carbonate concentration (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) was measured using a Hach Carbonate AL-DT kit (Hach, Loveland, CO, USA).

Diatom sampling was possible at certain locations where the bitumen was submerged at the emergence of the spring. The sampling area was equivalent to a 30x30 cm area. Diatoms were collected by scraping the bituminous deposit at the bottom of the spring using a toothbrush and a pipette (Fig. VI-1d). Then, vial was named and dated.

**Table VI-1:** Ionic concentrations (mg.L<sup>-1</sup>), physical and chemical results of the measures done *in-situ* at Puy de la Poix spring.

<b>SAMPLING DATE</b>	<b>16/03/2017</b>	<b>22/10/2019</b>	<b>08/06/2020</b>
<b>LI<sup>+</sup></b>	171.3	56.4	59.5
<b>NA<sup>+</sup></b>	44,295.2	13,748.7	10,583.7
<b>NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b>	2.9	5.4	17.1
<b>K<sup>+</sup></b>	228.0	146.8	107.8
<b>MG<sup>2+</sup></b>	658.0	548.7	294.0
<b>CA<sup>2+</sup></b>	622.1	1,072.9	504.4
<b>F<sup>-</sup></b>	2.5	1.2	0.2
<b>CL<sup>-</sup></b>	60,477.2	22,929.4	17,417.5
<b>NO<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	0.0	0.0	0.0
<b>BR<sup>-</sup></b>	230.5	73.8	56.4
<b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	1.3	0.1	0.1
<b>PO<sub>4</sub><sup>3-</sup></b>	0.1	0.1	1.3
<b>SO<sub>4</sub><sup>2-</sup></b>	5,417.8	2,570.0	2,121.3
<b>HCO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	4,290.0	2,320.0	1,360.0
<b>CONDUCTIVITY (μS.CM<sup>-1</sup>)</b>	123,200	46,260	53,300
<b>PH (PH UNITS)</b>	7.2	6.8	7.5
<b>O<sub>2</sub> (%)</b>	6.3	2.8	7.8
<b>WATER TEMPERATURE (°C)</b>	10.6	12.9	13.6

## Slide preparation, microscopy and analysis

For each sample collected at the Poix spring, a small fraction of the sample (2 ml) was prepared for light microscopy (LM) observation following the method described in Prygiel & Coste (2000). Samples were cleaned using hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 35 %) and hydrochloric acid (HCl, 37 %), and rinsed several times with distilled water. A drop of the diluted cleaned material was dried on coverslips and mounted in Naphrax. LM observations and morphometric measurements were done using a Leica® DM2700M microscope with a 100x oil immersion objective using a differential interference contrast. For each slide, 400 valves were counted. Once the counting was complete, the relative abundances of diatom species were calculated.

Diatom species were identified according to Krammer & Lange-Bertalot (1997a, 1997b, 2000a, 2000b, 2004), Krammer (2000, 2002, 2003), Lange-Bertalot (2001), Werum & Lange-Bertalot (2004), Żelazna-Wieczorek (2011), Wojtal (2013), Levkov *et al.* (2016), Lange-Bertalot *et al.* (2017), associated to further articles (Spaulding & Stoermer 1997; Spaulding *et al.* 1999; Beauger *et al.* 2015, 2016, 2017, 2019; Wetzel *et al.* 2015).

For the scanning electron microscopy (SEM), parts of the oxidized suspensions were filtered with additional deionized water through a 3 or 0.2 µm Isopore polycarbonate membrane filter (Merck Millipore). Filters were mounted on stubs using adhesive carbon tabs and coated with carbon (Quorum Q150 TES). An ultrahigh-resolution analytical field emission (FE) scanning electron microscope, Hitachi SU-70 for the sample taken in 2017 and Hitachi Regulus 8230 (Hitachi High-Technologies Corporation, Japan) for the two other samples, was operated at 2 or 5 kV and 10 mm distance for image analysis. SEM images were taken using the lower (SE-L) and upper (SE-U) detector signal.

Shannon index and evenness were calculated using “vegan” package version 2.6-2 (Oksanen *et al.* 2022) in R version 4.1.2. Ecological traits were calculated according to Van Dam *et al.* (1994) using OMNIDIA 6.0.8 software (Lecointe *et al.* 1993) and Lange-Bertalot *et al.* (2017).

## Results

### Physical and chemical environment

The physico-chemical data of the Poix spring measured during the three campaigns are presented in table VI-1. On the whole the conductivity and all ionic concentrations were very high contrary to the dissolved oxygen. In March 2017, the conductivity was the highest with  $123,200 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  and at this period, the concentration in sodium and chloride was the double compared to 2019 and 2020 with 44,295.2 and 60,477.2  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . In 2019 and 2020, the conductivity was 46,260 and 53,300  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  respectively and other ionic concentrations were comparable except magnesium and calcium.

### Diatom communities

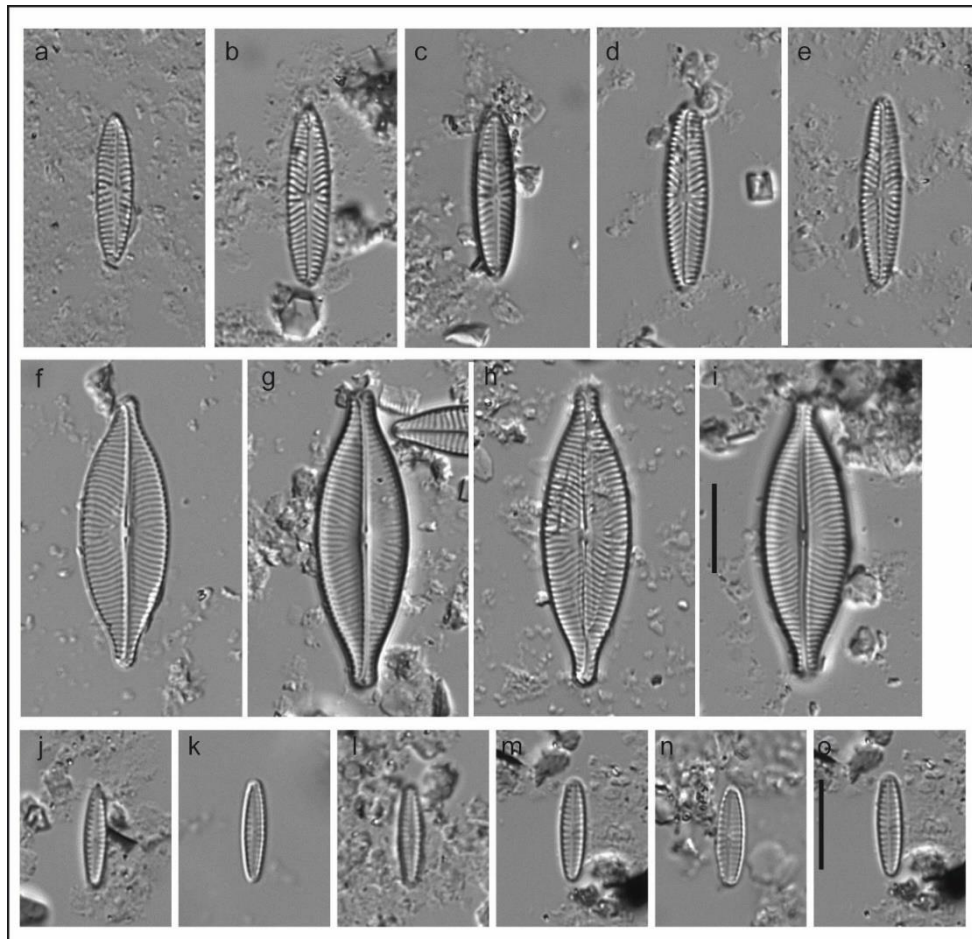
On the whole, thirty-one different species were observed at the Poix spring (Table VI-2) with many species of *Navicula* and *Nitzschia*. The *Navicula* species sampled were *N. cincta* (Ehrenberg) Ralfs in Pritchard, *N. gregaria* Donkin, *N. meulemansii* A.Mertens, Witkowski & Lange-Bertalot (Figs VI-2a-e, 3b), *N. salinarum* Grunow in Cleve & Grunow (Figs VI-2f-i, 3a), *N. salinicola* Hustedt (Figs VI-2j-o, 4a) and *N. veneta* Kützing. The *Nitzschia* species observed were *Nitzschia inconspicua* Grunow (Fig. VI-3c), *Nitzschia* aff. *lacuum* Lange-Bertalot, *Nitzschia pusilla* Grunow (Fig. VI-3d), *Nitzschia* cf. *epithemioides* Grunow in Cleve & Grunow and *Nitzschia* aff. *liebethruthii* Rabenhorst.

As it is shown in Table VI-3, biodiversity was the lowest in 2017 and 2019 with 11 species and there were 26 species in 2020. Shannon index was 1.41 in 2017, 0.75 in 2019 and 2.51 in 2020. Evenness varied between 0.39 and 0.77. In March 2017, the dominant species were *Navicula salinarum* (54.4 %) (Fig. VI-3a), *Nitzschia pusilla* (Fig. VI-3d) (20.5 %) and *Navicula veneta* (9.7 %). In October 2019, it was *Navicula salinicola* (84.0 %) (Fig. VI-4a). At last, in June 2020, *Navicula veneta* (22.5 %), *Navicula cincta* (Fig. VI-4b) (16.7 %), *Nitzschia* cf. *liebethruthii* (11.4 %), *Pinnularia jocolata* (Manguin) Krammer (10.7 %) (Fig. VI-4c), *Navicula meulemansii* (6.8 %) (Fig. VI-3a) and *Crenotia thermalis* (Rabenhorst) Wojtal

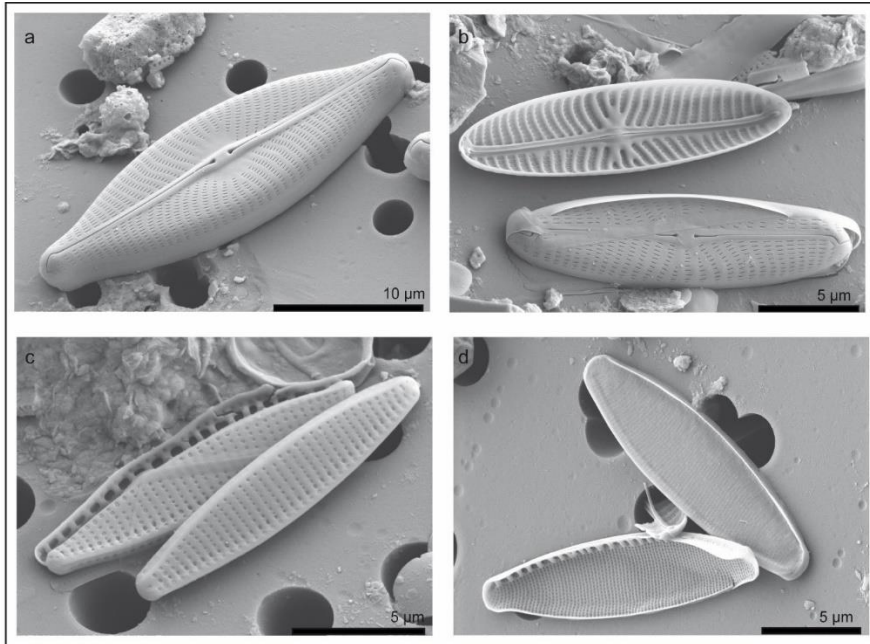
(4.7 %). Some individual of *Muelleria terrestris* (J.B.Petersen) S.A.Spaulding & Stoermer were observed (Fig. VI-5). Some unknown species were also observed such as *Halamphora* sp. and two species of *Pinnularia* undetermined.

**Table VI-2:** Relative abundances of the diatom species observed at each sampling period.

Sampling date	16/03/2017	22/10/2019	08/06/2020
<i>Caloneis fontinalis</i> (Grunow in Van Heurck) A.Cleve	0	0	1.08
<i>Crenotia thermalis</i> (Rabenhorst) Wojtal	0	0	4.73
<i>Gomphonema parvulum</i> Kützing	0	0	0.22
<i>Halamphora</i> sp.	0.72	0	0
<i>Hantzschia amphioxys</i> (Ehrenberg) Grunow in Cleve & Grunow	0	2.74	2.58
<i>Hippodonta subtilissima</i> Lange-Bertalot, Metzeltin & Witkowski	0	1.74	0
<i>Humidophila brekkaensis</i> (J.B.Petersen) R.L.Lowe, Kociolek, J.R.Johansen, Van de Vijver, Lange-Bertalot & Kopalová	0	0	0.22
<i>Humidophila contenta</i> (Grunow) R.L.Lowe, Kociolek, J.R.Johansen, Van de Vijver, Lange-Bertalot & Kopalová	0.24	0.75	1.29
<i>Luticola</i> aff. <i>frequentissima</i> Levkov, Metzeltin & A.Pavlov	0	0	0.86
<i>Luticola ventricosa</i> (Kützing) D.G.Mann in Round <i>et al.</i>	0	0	0.65
<i>Muelleria terrestris</i> (J.B.Petersen) S.A.Spaulding & Stoermer	0	0	0.65
<i>Navicula cincta</i> (Ehrenberg) Ralfs in Pritchard	<b>0.24</b>	<b>0.25</b>	<b>16.77</b>
<i>Navicula gregaria</i> Donkin	<b>5.25</b>	<b>0</b>	<b>0.22</b>
<i>Navicula meulemansii</i> A.Mertens, Witkowski & Lange-Bertalot	<b>4.53</b>	<b>0</b>	<b>6.88</b>
<i>Navicula salinarum</i> Grunow in Cleve & Grunow	<b>54.42</b>	<b>0</b>	<b>1.94</b>
<i>Navicula salinicola</i> Hustedt	0	<b>84.08</b>	<b>5.59</b>
<i>Navicula veneta</i> Kützing	<b>9.79</b>	<b>5.22</b>	<b>22.58</b>
<i>Nitzschia</i> aff. <i>lacuum</i> Lange-Bertalot	0	0	1.94
<i>Nitzschia</i> aff. <i>liebethruthii</i> Rabenhorst	1.67	0	<b>11.40</b>
<i>Nitzschia</i> cf. <i>epithemioides</i> Grunow in Cleve & Grunow	0	0	1.08
<i>Nitzschia inconspicua</i> Grunow	2.39	0	0
<i>Nitzschia pusilla</i> Grunow	<b>20.53</b>	0	2.15
<i>Pinnularia jocolata</i> (Manguin) Krammer	0.24	1.74	<b>10.75</b>
<i>Pinnularia</i> sp.1	0	0	2.15
<i>Pinnularia</i> sp.2	0	0	1.51
<i>Planothidium frequentissimum</i> (Lange-Bertalot) Lange-Bertalot	0.24	0	0
<i>Planothidium lanceolatum</i> (Brébisson ex Kützing) Lange-Bertalot	0	0.75	0.22
<i>Pseudofallacia monoculata</i> (Hustedt) Y.Liu, Kociolek & Q.Wang in Liu <i>et al.</i>	0	0	1.29
<i>Pseudofallacia</i> sp.	0	0	0.86
<i>Sellaphora bacillum</i> (Ehrenberg) D.G.Mann	0	0.50	0
<i>Stauroneis tackei</i> (Hustedt) Krammer & Lange-Bertalot in Kusber <i>et al.</i>	0	0.25	0.43

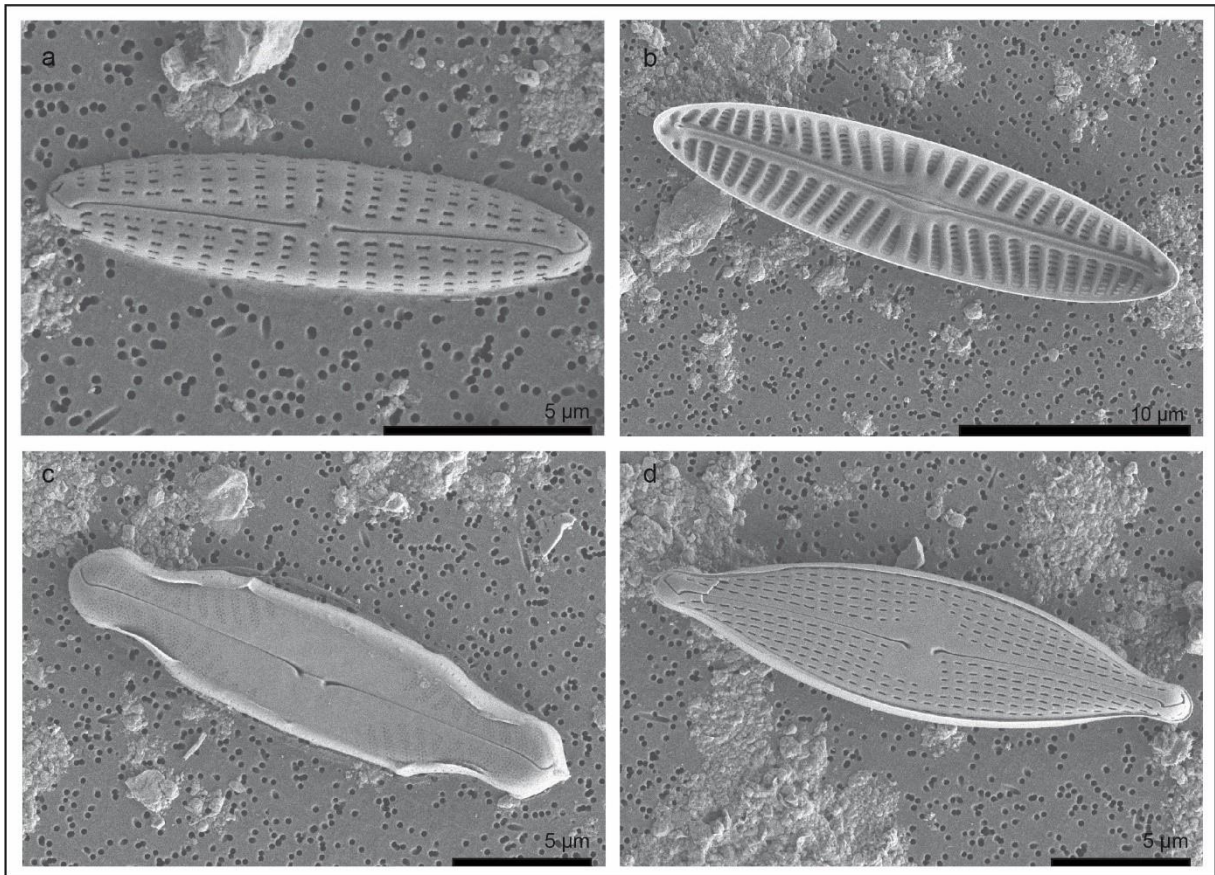


**Figure VI-2:** Some *Navicula* species observed at the Poix spring. *Navicula meulemansii* (**a-e**), *Navicula salinarum* (**f-i**), *Navicula salinicola* (**j-o**). Scale bar = 10  $\mu$ m.

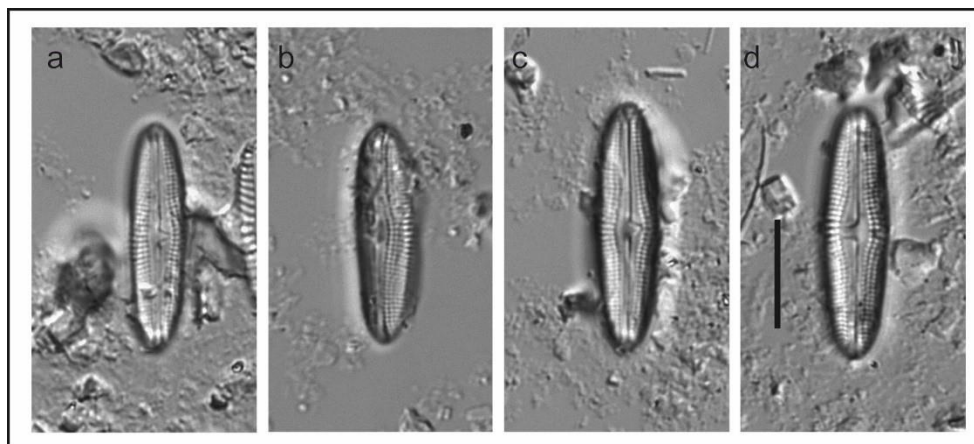


**Figure VI-3:** Photographs at the scanning electron microscopy of some species: *Navicula salinarum* **(a)**, *Navicula meulemansii* **(b)**, *Nitzschia inconspicua* **(c)**, *Nitzschia pusilla* **(d)**.

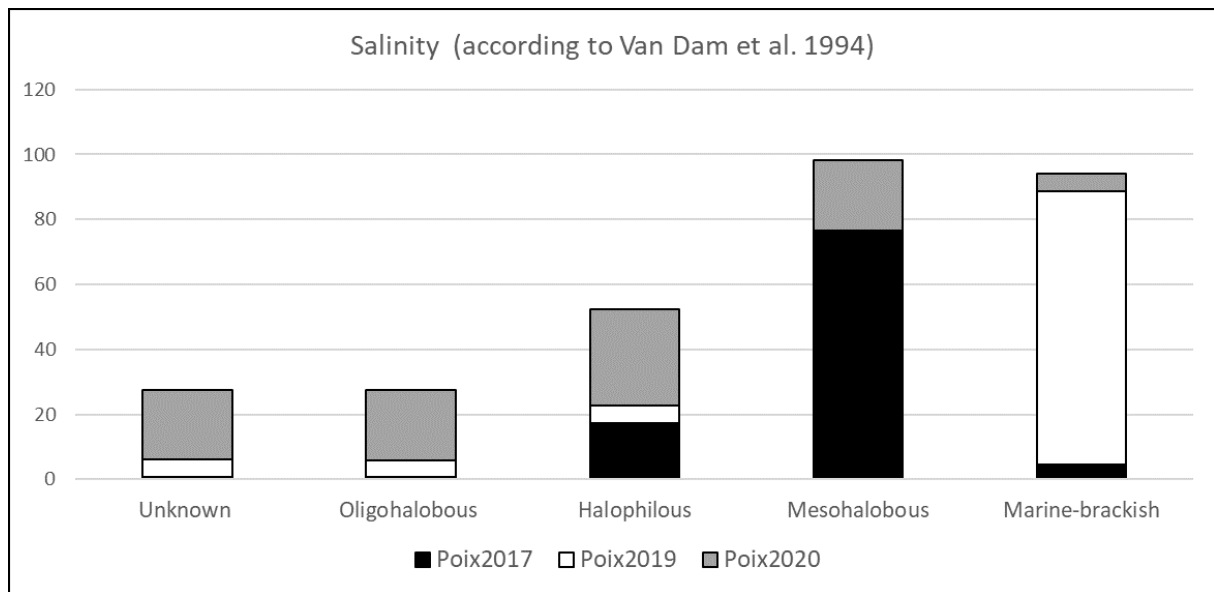




**Figure VI-4:** Photographs at the scanning electron microscopy of some species: *Navicula salinicola* (a), *Navicula cincta* (b), *Pinnularia joculata* (c), *Navicula gregaria* (d).



**Figure VI-5:** (a-d) *Muelleria terrestris* observed at the Poix spring. Scale bar = 10 μm.



**Figure VI-6:** Ecological traits retained: salinity at the Poix spring for the three samples.

Related to the ecological trait “salinity”, the community was dominated by brackish water species such as *Navicula salinarum* in 2017 (Fig. VI-6). In 2019, marine-brackish taxa dominated such as *Navicula salinicola*. At last, in 2020, it was a mix of halophilous, brackish and marine-brackish water species such as *Navicula veneta*.

## Discussion

In the Poix spring, characterized by a high mineralization as underlined the high conductivity and salinity, the pH is about 7 and the oxygenation is low. Moreover, the concentration in Lithium and Bromine underlined the deep origin of the water (Michard 1990). The conductivity ranged between 46,260 and 123,200  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  and is consequently higher than ocean that was evaluated as 32,000  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  by some authors (Schnepf *et al.* 2014; Sabaka *et al.* 2015). Thus, the abiotic conditions lead to an extreme environment where diatoms were living. In such environment, only species with ecological preferences in adequation with the properties of the water could be encountered. Species richness in 2017 and 2019 was 11 and reached 26 in 2020. The estimated richness varies greatly depending on the spring. In Lai *et al.* (2019a), the species richness of mineral springs

sampled in Auvergne and Sardinia varied between 2 and 14. Also in Beauger *et al.* (2020), 17 springs of the Auvergne region were sampled with a richness ranging between 2 and 21 (mean: 9). Lai *et al.* (2019c) sampled several Mediterranean karst springs, the richest spring was Sa Vena Manna-Sedini with 26 species detected while the mean of richness of the 8 springs sampled was 8. When Cantonati *et al.* (2012) collected diatoms in 110 springs of the Alps during summer, species richness ranged between 3 and 36 (mean: 13). These observations suggest that diatoms richness is high during 2020 in the mineral spring of the Poix. Shannon diversity was higher in 2020 and 2017 when evenness was higher also.

Diatom species richness is about twice as high in 2020 as in 2017 and 2019. The first hypothesis made to explain these observations is that it is a seasonal effect, as species richness is classically higher in the warmer seasons (Lavoie *et al.* 2003). Indeed, in 2020 diatoms were sampled in spring whereas in 2017 and 2019 they were sampled in winter and autumn respectively. The second hypothesis is that the stress conditions in the spring have decreased because the conductivity in the spring has decreased from 123,200 to 53,300  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ . However, in 2019, a decrease in conductivity did not lead to an increase in species richness.

The community was mainly dominated by different species of *Navicula* such as *N. cincta*, *N. gregaria*, *N. meulemansii*, *N. salinarum*, *N. salinicola* and *N. veneta* and also by different species of *Nitzschia* such as *N. inconspicua*, *N. aff. lacuum*, *N. pusilla*, *Nitzschia cf. epithemioides* and *Nitzschia aff. liebethruthii*. Moreover, *Crenotia thermalis* in 2020 and *Pinnularia jocolata* at the three campaigns, were also well represented in the diatom community.

The physical and chemical conditions encountered by diatoms in this spring induced the presence of several halophilous to brackish species such as *Crenotia thermalis* and the cosmopolitan *Navicula salinarum*, *N. salinicola* and *N. veneta* (Van Dam *et al.* 1994; Lange-Bertalot 2001). Indeed, the synthetic ecological spectra highlighted the dominance of species that prefer high concentrations of dissolved salts. *Crenotia thermalis* occurred in electrolyte-rich inland habitats, particularly thermal and mineral springs (Wojtal 2013; Lange-Bertalot *et al.* 2017). *Navicula salinarum* was abundant on the coasts, in inland brackish waters, including inland brackish lakes where salts are supplied mainly by rocks

and soil weathering (athalassic ecosystems) such as in Slovenia, where it occurred in the only brackish lake (Krivograd Klemenčič *et al.* 2006). Even if this taxon is not classically encountered in springs, it was observed in some salt springs in Poland (Lange-Bertalot 2001; Wojtal 2013; Źelazna-Wieczorek *et al.* 2015). In athalassic habitats in Poland, *N. salinarum* was observed associated with *N. veneta* and *N. meulemansii* (Źelazna-Wieczorek *et al.* 2015). *Navicula veneta* is common in electrolyte rich to brackish waters (Lange-Bertalot 2001). In Poland, it was observed in the sulphide spring of slightly alkaline water of high specific conductivity but very low dissolved oxygen (Wojtal 2013). Moreover, *N. meulemansii* has a wide geographical distribution in coastal brackish waters (The Netherlands and Germany), European estuaries (Portugal), and the San Francisco Bay (U.S.A.) (Mertens *et al.* 2014). Indeed, it has been identified in samples collected from intertidal sediments from the Jadebusen near Dangast (Witkowski *et al.* 2004), the Tagus estuary (Ribeiro 2010), the San Francisco Bay area, and from inland brackish waters in the Netherlands (Mertens *et al.* 2014).

Among the other dominant species, *N. salinicola* was collected along the coast in brackish waters, in river estuaries, in inland salt springs and in freshwaters with a high electrolyte content (Targett *et al.* 1983; Lange-Bertalot 2001; Guiry & Guiry 2022). *Navicula gregaria* was also observed at the Poix spring (Fig. VI-4d). It is a species that was found on coasts and inland salt springs of different countries (Lange-Bertalot 2001; Owen *et al.* 2008; Źelazna-Wieczorek *et al.* 2015; Leira *et al.* 2017; Angel *et al.* 2018; Lai *et al.* 2019a, 2019b).

*Navicula cincta* was also present in the samples. It is considered as oligohalobous in Van Dam *et al.* (1994) whereas this species lives in electrolyte rich to brackish waters (Lange-Bertalot 2001). *Navicula cincta* was observed in athalassic habitats in Poland and also in mineral springs of a very high specific conductivity, in thermo-mineral springs in Sardinia and in Slovenia (Krivograd Klemenčič *et al.* 2006; Wojtal 2013; Źelazna-Wieczorek *et al.* 2015; Lai *et al.* 2019a, 2019b).

*Nitzschia pusilla* was observed in brackish waters (Krammer & Lange-Bertalot 1997b), saline ponds (Trobajo *et al.* 2011), a hypersaline coastal lagoon (Sylvestre *et al.* 2001), and a saline lake (Taukulis & John 2006).

At last, some taxa living in a wide amplitude of ecological conditions were present at the Poix spring, such as *Planothidium frequentissimum* (Lange-Bertalot) Lange-Bertalot, *P. lanceolatum* (Brébisson ex Kützing) Lange-Bertalot and *Nitzschia inconspicua* (Lange-Bertalot *et al.* 2017) (Fig. VI-3c) that is also known to extend into brackish waters (Kelly *et al.* 2015). *Hantzschia amphioxys* (Ehrenberg) Grunow in Cleve & Grunow that lives in prolongedly dry and only temporarily wetted (aerial) biotopes, such as soils and rock crevices, underlined that the level of water was low at this site (Lange-Bertalot *et al.* 2017). *Muelleria terrestris* was observed in soils (Petersen 1915; Spaulding *et al.* 1999; Foets *et al.* 2021), and on wet mosses in an intermittent spring of a village in Macedonia (Levkov *et al.* 2019). *Muelleria terrestris* was also present in a petrifying *Cratoneurion* spring in Belgium (Denys & Oosterlynck 2015). *Pinnularia jocolata* was described in freshwater (Bourrelly & Manguin 1952; Krammer 2000) and was also observed in mineral springs (Quintela *et al.* 2013; Lai *et al.* 2019b).

Eight species *Humidophila contenta* (Grunow) R.L.Lowe, Kociolek, J.R.Johansen, Van de Vijver, Lange-Bertalot & Kopalová, *Navicula cincta*, *N. gregaria*, *N. meulemansii*, *N. salinarum*, *N. veneta*, *Nitzschia* aff. *liebetruthii*, and *Pinnularia jocolata* were present during the three periods of sampling. These species seem to have great capacity to maintain in extreme environments with high fluctuations of conductivity and ion concentrations suggesting the presence of high salinity tolerance mechanisms named osmoregulation. These mechanisms allow cells to compensate osmotic and ionic stress.

Furthermore, the presence of the eight species and the majority of brackish species in the Poix spring as an isolated environment is remarkable and allows the emergence of a question on the origin of these species. This question was already addressed in the literature. Since 1940s, Remane proposed the idea that brackish species are freshwater or marine species adapted to brackish conditions or descendants of these two categories of species (Remane 1940). He also suggested that there are identifiable brackish assemblages (Cognetti & Maltagliati 2000; Potapova 2011). In contrast, Barnes (1989) suggested the inexistence of specific brackish assemblages but the presence of some populations of thalassogenous species in brackish environments (Cognetti & Maltagliati 2000). Each argument has its value depending on the environment studied. To go further, Round & Sims (1981) support the marine origin of diatoms and the colonisation of

freshwaters by some lineages because of the high number of fossils and genera of marine diatoms found in the early Pliocene (Sims *et al.* 2006). The reconstruction of phylogeny of Thalassiosirales by Alverson *et al.* (2007) revealed more complicated schema and no unidirectional colonization. Indeed, in their study three lineages of Thalassiosirales seems to have colonized freshwater habitats independently. Another interesting result of this study is that there were at least three recolonizations of marine habitats by these lineages that led to speciation events resulting in the presence of these lineages in marine and freshwater habitats. The genus *Navicula* sensu stricto and *Nitzschia* found in the Poix spring are among the species of raphid diatoms that are found in marine and freshwater environments which agrees with Barnes propositions (Barnes 1989).

Thus, to explain the ability of some diatom taxa to live in high salinity concentration and fluctuation environments, Potapova (2011) made the hypothesis of the innate ability of diatoms to adapt to changing salinity or high salinity and the better conservation of this ability by some lineages. Indeed, ocean salinity was not modelled as stable (Hay *et al.* 2006), a great decrease of salinity was estimated during the Mesozoic because of the younger basin after the Pangée breaking. But it seems to have several other decreasing salinity events in the past that suggests that diatoms and other micro-organisms were confronted to several fluctuations of salinity in their evolution.

## **Conclusion**

The studied of the Poix spring is known to be bitumen and associated with salt water, methane and traces of hydrogen sulphide. This environment with a conductivity higher than the ocean could be considered as extreme for diatom species. Moreover, this spring, as others, could be also considered as isolated aquatic ecosystem in the landscape whose conditions have certainly changed very little over the past millennia. The Poix spring showed a relatively high species richness with 31 taxa observed during the three sampling campaigns. The diatom community was mainly dominated by different *Navicula* and *Nitzschia* species. The species are mainly halophilous to brackish such as *Crenotia thermalis*, *Navicula meulemansii*, *N. salinarum*, *N. salinicola* and *N. veneta* observed for some of them in coastal brackish environments or estuaries. Because of their living environment, these species maintain high ability of adaptation of high salinity concentrations and fluctuations which could be the result of well conserved ability of ionic and osmotic stress

resistance. This inland brackish environment is a geological and also ecological particularity of the French Massif central. For these arguments, this type of environment needs to be preserved.

### **Acknowledgements**

This study was funded by a grant from the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS, NEEDS, project Acronym: DISCOVER). Funding for this research was also partly provided by Clermont Auvergne Métropole and in the framework of the DIATOMS project (LIST - Luxembourg Institute of Science and Technology). We thank the Conservatoire des espaces naturels d'Auvergne, which manages the spring.





## **Chapitre VII: Les bruits de fond radioactifs ont-ils une influence sur les abondances virales et procaryotes dans les sources minérales ?**

Les communautés microbiennes des sources minérales sont peu connues. Au cours de ma thèse, nous avons eu l'opportunité de travailler sur les virus et les procaryotes dans les sources afin d'apporter de nouvelles informations sur ces particules dans les sources. En effet, le LMGE s'est spécialisé dans l'exploration de la diversité microbienne et virale. Ainsi après avoir étudié les communautés de diatomées, ce chapitre concerne l'effet de la radioactivité des sources minérales sur l'abondance des particules virales et des procaryotes. Nous avons souhaité ouvrir cette thèse à l'étude d'autres acteurs des communautés microbiennes. L'étude a été publiée dans le journal *Hydrobiologia*.

# **Virus-to-prokaryote ratio in spring waters along a gradient of natural radioactivity**

Lory-Anne Baker <sup>1,2</sup>, David G. Biron<sup>† 1,2</sup>, Aude Beauger <sup>2,3</sup>, Sofia Kolovi <sup>2,4</sup>, Jonathan Colombet <sup>1,2</sup>, Elisabeth Allain<sup>2,3</sup>, Olivier Voldoire <sup>2,3</sup>, Vincent Breton <sup>2,4</sup>, Patrick Chardon <sup>2,4</sup>, Téséphore Sime-Ngando <sup>1</sup>, Karine David<sup>2,5</sup>, Gilles Montavon<sup>2,5</sup>, Hervé Michel<sup>2,6</sup>, and Angia Sriram Pradeep Ram <sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Université Clermont Auvergne, CNRS, LMGE, F-63000 Clermont-Ferrand, France ; <sup>2</sup> LTSER “Zone Atelier Territoires Uranifères”, F-63000 Clermont-Ferrand, 63178 Aubière Cedex, France ; <sup>3</sup> Université Clermont Auvergne, CNRS, GEOLAB, F-63000 Clermont-Ferrand, France ; <sup>4</sup> Université Clermont Auvergne, CNRS/IN2P3, Laboratoire de Physique de Clermont (LPC), UMR 6533, F-63178 Aubière Cedex, France ; <sup>5</sup> Laboratoire SUBATECH, UMR 6457, IN2P3/CNRS/IMT Atlantique/Université de Nantes, 4, rue Alfred Kastler, BP 20722, 44307 Nantes Cedex 3, France ; <sup>6</sup> Institut de Chimie de Nice (ICN), UMR 7272, Université Côte d’Azur, 28 Avenue Valrose, 06108 Nice Cedex 2, France

<sup>†</sup> deceased

\*Angia Sriram Pradeep Ram, [pradeep\\_ram.angia\\_sriram@uca.fr](mailto:pradeep_ram.angia_sriram@uca.fr), Université Clermont Auvergne, CNRS, LMGE, F-63000 Clermont-Ferrand, France

## **Abstract**

Although a strong link between viruses and prokaryotes is commonly known to exist in aquatic systems, few studies have investigated their relationship in spring waters. In the French Massif Central, certain springs are known to exhibit varying levels of naturally occurring radioactivity. Therefore, the aim of this study was to examine the standing stock of viruses together with prokaryotes, and determine the potential environmental factors influencing them in springs characterized by contrasted radioactivity gradient. Among the investigated 15 spring habitats, flow cytometry analyses indicated that both viral (VA) and prokaryotic abundances (PA) varied by an order of magnitude accompanied by virus-to-prokaryote ratio ranging between 8 and 144.2. Significant differences in VA was evident among springs where low abundances (mean  $\pm$

SD:  $21.3 \pm 7.0 \times 10^7$  VLP l<sup>-1</sup>) corresponded to high (mean  $\pm$  SD:  $1911 \pm 814.0$  nGy.h<sup>-1</sup>) gamma ( $\gamma$ ) dose radiation (<sup>222</sup>Rn) and vice versa. Adverse effect of water radioactivity (<sup>222</sup>Rn) on VA could perhaps corroborate our hypothesis of drastic effect of ionizing radiations on viruses, which might explain for lack of significant relationship between PA and VA. In such a scenario of prevailing low VA, the adopted phage life strategies could define their existence in these specialized ecosystems.

**Keywords:** viruses; prokaryotes; virus to prokaryote ratio, mineral springs; naturally enhanced radioactivity; extreme environment.

## Introduction

Viruses are found wherever life occurs, and current estimates suggest that they are the most abundant and diversified biotic agents in aquatic systems (Weinbauer, 2004; Breitbart, 2012; Schweichhart, 2021). Their omnipresence in wide variety of aquatic habitats is undoubtedly through the existence of two major pathways, namely lytic and lysogeny to confront environmental challenges (Suttle, 2007; Sime-Ngando, 2014). Viruses not only play an important role in microbial dynamics and evolution but also influence nutrients and carbon cycles through the release of dissolved organic matter during lysis which is referred to as “viral shunt” (Whitman et al., 1998). This dissolved organic matter is directly available for non-targeted prokaryotic population which stimulates their growth and activity (Wilhelm & Suttle, 1999). In aquatic systems, prokaryotes serve as principle hosts for viruses (bacteriophages) owing to their numerical dominance. As actors of cellular lysis, viruses can directly affect prokaryotic abundances as well as their structure, which probably depends on the contact rates between them (Parikka et al. 2017). Since viruses are entirely dependent on the host cells for their proliferation, a positive correlation between viruses and prokaryotes abundances can be expected. Accordingly, several studies have highlighted the existence of such a significant relationship between them in marine (Bongiorni et al., 2005; Bettarel et al., 2008), freshwater (Peduzzi & Schiemers, 2004; Brum et al., 2005) and glacier environments (Anesio et al., 2007; Rassner et al., 2016). However, some exceptional studies have reported the absence of any

relationship between viruses and prokaryotes abundances (Leff et al., 1999; De Corte et al., 2010; Kyle & Ferris, 2013).

Although viruses are generally accepted as key players in aquatic food web, relatively little is known on the factors (abiotic and biotic) influencing them in spring habitats. A lack of opportunity to document viral ecology in such specialised systems has resulted in paucity of knowledge about these environments. Freshwater springs are small water bodies that act as crucial interfaces within the Earth's Critical Zone. They serve as multiple three-way ecotones that link terrestrial and aquatic habitats, ground and surface waters (Reiss & Chiffard, 2017). To our knowledge virus-prokaryote interactions have been investigated in high temperature environments such as hot springs (Breitbart et al., 2004; Kepner, 2015) and deep-sea hydrothermal vent systems (Williamson et al., 2008) focussing principally on microbial compositions and dynamics. A study carried out in the terrestrial hot fluid system situated in cold environment of Southern hemisphere (French Southern and Antarctic lands) have reported a significant positive relation between viruses and prokaryotes accompanied by a low virus-to-prokaryote ratio (Parikka et al., 2018).

The Auvergne region of the French Massif Central harbours a wide variety of mineral springs that are characterised by diverse groups of microbial communities (Lai et al., 2019, Millan et al., 2019). Due to the presence of high levels of uranium in their granitic ground, some of the mineral springs exhibit enhanced levels of natural radioactivity together with varying physico-chemical conditions. Microbes inhabiting in these environments are highly adapted and known to survive in mineralized and extreme ionizing conditions that are eventually seen as chronic stress for their survival (Shukla et al., 2017). Lethal effects of radioactivity on organisms are real due to their detrimental capability to alter their DNA structure (Ravanat & Douki, 2016). Some micro-organisms, notably prokaryotes have developed biological mechanisms to resist and tolerate high concentrations of radionuclides through DNA repair mechanisms. Genome size is also a parameter implicated in resisting high levels of radiations (Shuryak, 2019). Prokaryotes can accumulate radionuclides either in their intracellular compartment (bioaccumulation) or on their external membrane (biosorption) (Tabak et al., 2005). Henceforth, ionising radiation can induce radiobiological effects that lead to the inactivation of cells or viruses (Lea, 1946; Sullivan et al., 1971). The direct destructive effect of these radiation can

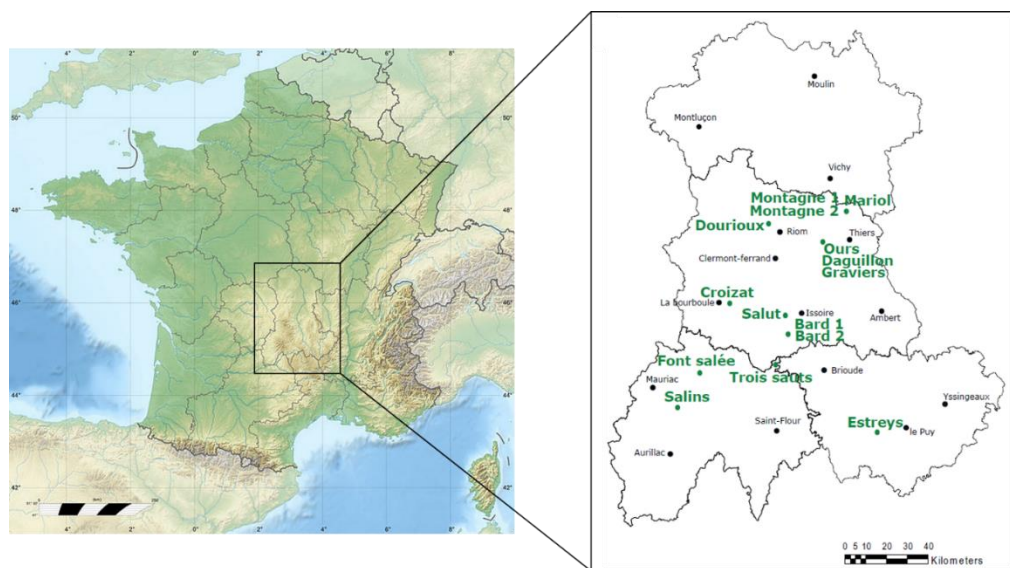
produce simple or double strand breaks in nucleic acid chains (Ravanat & Douki, 2016), whereas the indirect consequence results in the production of reactive oxygen species (ROS) through water radiolysis. A correlation between the size of the virus and inactivation dose was made. The smaller the virus, higher the dose is required to inactivate it (Lea, 1946). Apart from laboratory studies, no effort has been made to determine the abundance and dynamics of naturally occurring environmental phage communities in freshwater springs. Henceforth, we hypothesize viral abundances to decrease with increasing radioactivity due to the effects of ionizing radiation, even if this radiation is of natural origin. The purpose of this study was to gain insight into (1) viral and prokaryotic abundances in a set of mineral springs along a gradient of naturally enhanced radioactivity and (2) to determine the influence of environmental factors, especially  $\gamma$ -ray radiation and activities of radionuclides belonging to the uranium decay chain, on viral and prokaryote abundances. The present study is one of the few which assess virus-prokaryote relation in mineral springs which are characterised with variable levels of naturally occurring radioactivity.

## **Materials and methods**

### **Site description and sampling**

The sampling campaign was carried out in autumn from October to November 2019, where water samples were collected from a total of 15 mineral springs distributed in the Auvergne region of the French Massif Central (Fig. VII-1). At each site, water samples were collected in triplicates (i.e. from three independent sampling procedures). The study sites were chosen based on their physical, chemical and radiological characteristics in order to include an increasing gradient of natural radioactivity. The radioactivity comes from the decay chains of three radioelements  $^{235}\text{U}$ ,  $^{238}\text{U}$  and  $^{232}\text{Th}$  that are naturally present in the earth crust, especially in granite rocks. The disintegration of these radioelements and their daughters result in the emission of ionizing particles including  $\gamma$ -particles that can be detected at spring water surfaces. The sampling at 13 out

of 15 sites was conducted in October, whereas for Montagne 1 and Montagne 2 sites it was done in November (Supplementary Table VII-1).



**Figure VII-1:** Map showing the location of 15 mineral springs (green) in the Auvergne region of French Massif Central

### Physical and chemical analyses

At the 15 sampling sites, water temperature, conductivity and pH were measured with a multi-parameter WTW probe FC 340i (VWR International, Radnor, PA, USA) by submerging the probe in the spring water. Percentage saturation of dissolved oxygen was obtained with a Ysi ProODO oxygen probe (Yellow Springs Instruments, OH, USA). Bicarbonate ( $\text{HCO}_3^-$ ) concentrations were determined using Hach Carbonate AL-DT kit (Hach, Loveland, CO, USA). For chemical analyses, 200 ml of water were initially filtered with Whatman GF/C filters. The filtered samples were then analyzed by high pressure ion chromatography technic, using a Thermo Scientific Dionex ICS1100 system (Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France) for cations [sodium ( $\text{Na}^+$ ), magnesium ( $\text{Mg}^{2+}$ ) and

ammonium ( $\text{NH}_4^+$ )] and a Thermo Scientific Dionex Aquion system (Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France) for anions (chloride ( $\text{Cl}^-$ ) and nitrate ( $\text{NO}_3^-$ )).

### **Radiological characterization**

Gamma ( $\gamma$ -ray) dosimetry measurements were conducted just above the water surface near to the emergence of each spring using a Colibri radiometer (Mirion Technology, CA, USA), as a qualitative indicator of water radioactivity. Dose radiation (DR) measurements were performed for 2 min. and repeated for at least two times in each mineral spring to reduce the statistical uncertainties.

For the measurements of dissolved  $^{222}\text{Rn}$  activity in each spring, Marinelli beakers (1 L) were used to sample water from the mineral springs. A well-shaped Germanium detector (Canberra) operated at Clermont Physics Laboratory (Université Clermont Auvergne, Aubière, France) was used to measure the  $^{222}\text{Rn}$  activity. For other radiological analyses, water samples were collected in clean recipients from the water-column either near the emergence of some springs or at its outlet. Since the distance of each mineral spring to the laboratory was different, utmost care was taken to transport the water samples in refrigerated boxes to the laboratory, where they were processed immediately.

In addition to characterizing the ambient radiation dose and the  $^{222}\text{Rn}$  activity in water, it is also important to determine the possible contribution of radioactivity in relation to dissolved radionuclides. Among those present, we focused on the most abundant long-lived isotope ( $^{238}\text{U}$ ) as well as the descendants of this chain which are known to be highly radiotoxic (alpha particle emitters), i.e.  $^{226}\text{Ra}$  and  $^{210}\text{Po}$ . The analyses were conducted at Subatech (Nantes, France) and ICN (Nice, France) laboratories after PTFE filtration (0.45mm) and acidification. Uranium was analyzed by ICP-QMS (Xseries 2, Thermo Electron). Ultra-trace concentrations of  $^{226}\text{Ra}$  were measured without chemical purification by HR-ICP-MS in low resolution mode (Element XR, Thermo Scientific) with an APEX-Q high sensitivity desolvating sample solution introduction system. In order to remove major polyatomic interferences from  $^{226}\text{Ra}$  spectrum in low resolution mode, preliminary analyses were performed in medium resolution mode, where major

interferences are resolved. The good consistency of  $^{226}\text{Ra}$  concentration measured in both low and medium resolution modes showed evidence of no significant production rate of major interferences (Verlinde et al., 2019). The preference to use low resolution mode for  $^{226}\text{Ra}$  was characterized by a high sensitivity ( $4.7 \times 10^5$  CPS/Bq. ml<sup>-1</sup>) and a low instrumental detection limit (0.8 mBq.l<sup>-1</sup>). Pb and Bi-based polyatomic interferences unresolved in low and medium resolution modes were not considered in the present study due to low signal intensities measured for Pb (< 60,000 CPS) and Bi (< 1 000 CPS). Finally,  $^{210}\text{Po}$  was measured, after spontaneous deposition onto a silver disc, by alpha spectrometry using dual alpha spectrometers EG&G Ortec 576A equipped with boron-implanted silicon detectors (Le et al., 2019).

### **Abundances of viruses and prokaryotes**

For enumeration of viruses (expressed as viral like particles, VLP) and prokaryotes by flow cytometry, 2 ml of water samples were fixed with paraformaldehyde at 0.5% final concentration and transported to the laboratory in quick time (< 2 hours) on ice and in the dark for immediate analysis. The optimized flow cytometry protocol (different sample dilutions, threshold levels, flow rates, etc.) for the enumeration of prokaryotes and viruses from our previous investigations in French Massif Central lakes was adopted (Pradeep Ram et al. 2014). Prior to analysis, samples were diluted with 0.02  $\mu\text{m}$  filtered TE buffer (10 mM Tris-HCl and 1 mM EDTA, pH 8) and stained with nucleic acid-specific green fluorescent dye SYBR Green I (Molecular Probes, Oregon, USA) at a final concentration of  $0.5 \times 10^{-4}$  (for viruses) and  $1 \times 10^{-4}$  (for prokaryotes) dilution of the commercial stock. For viral samples, staining was carried out in the dark at 80 °C for 10 min, whereas for prokaryotic samples it was done at room temperature for 15 minutes. Subsequently, the viral samples were left to cool at room temperature for 5 minutes before analysis. Counts were performed on a FACS Aria Fusion SORP cytometer (BD Sciences, San Jose, CA) equipped with an air-cooled laser providing 50 mW at 488 nm with 502 long pass, and 530/30 band pass filter set-up. Groups were identified and discriminated based on their 488 nm excited right angle light scatter (SSC) and green fluorescence (530 nm wavelength) following the protocol optimized by Brussaard et al. (2010). Flow cytometric data were



analyzed using CellQuest Pro software (BD Biosciences, San Jose, CA, USA; version 4.0). Control blanks consisting of TE buffer with autoclaved 0.2  $\mu\text{m}$  filtered sample at same dilution factor as the natural samples were used before proceeding with sample analysis. Very low coincidence and background fluorescent levels were detected. Identification of viral and prokaryote population via flow cytometry in a mineral spring sample together with a control blank are shown in Supplemental Fig. VII-1.

## **Statistical analysis**

Firstly, all environmental and microbial data (averaged from replicates from each sampled site) which do not follow normal distribution were standardized using the z-score normalization  $[(x-\text{mean})/\text{standard deviation}]$ . This transformation allows to compare variables that initially had different units. Then, a Hierarchical clustering also called ascending hierarchical classification (AHC) based on Pearson correlation was performed to identify the groups of springs that showed environmental similarities. The groups were merged with simple link or nearest neighbor grouping. Secondly, microbial abundances (i.e. prokaryotes and viruses) were log transformed and relationships between environmental and microbial variables were tested using Pearson correlation. We ordinated the relation of microbial variables with abiotic variables through a non-metric multidimensional scaling plots (NMDS) scaling using the 'metaMDS' function with R Package Vegan in R version 2.6-2. Euclidian distance was used to measure distribution between samples.

Finally, the mineral springs were classified according to their radioactivity levels to test the difference in microbial abundances between classes by using the Kruskal-Wallis test. Gamma ( $\gamma$ ) dose radiation (DR) categories were created according to the mean background DR in these sites which ranged between 70 and 250  $\text{nGy}\cdot\text{h}^{-1}$ . The radioactivity classes for four radionuclides variables (i.e.  $^{222}\text{Rn}$ ,  $^{238}\text{U}$ ,  $^{210}\text{Po}$  and  $^{226}\text{Ra}$ ) were determined from the orders of magnitude observed for these variables in the sampled springs (Supplementary Table VII-2).

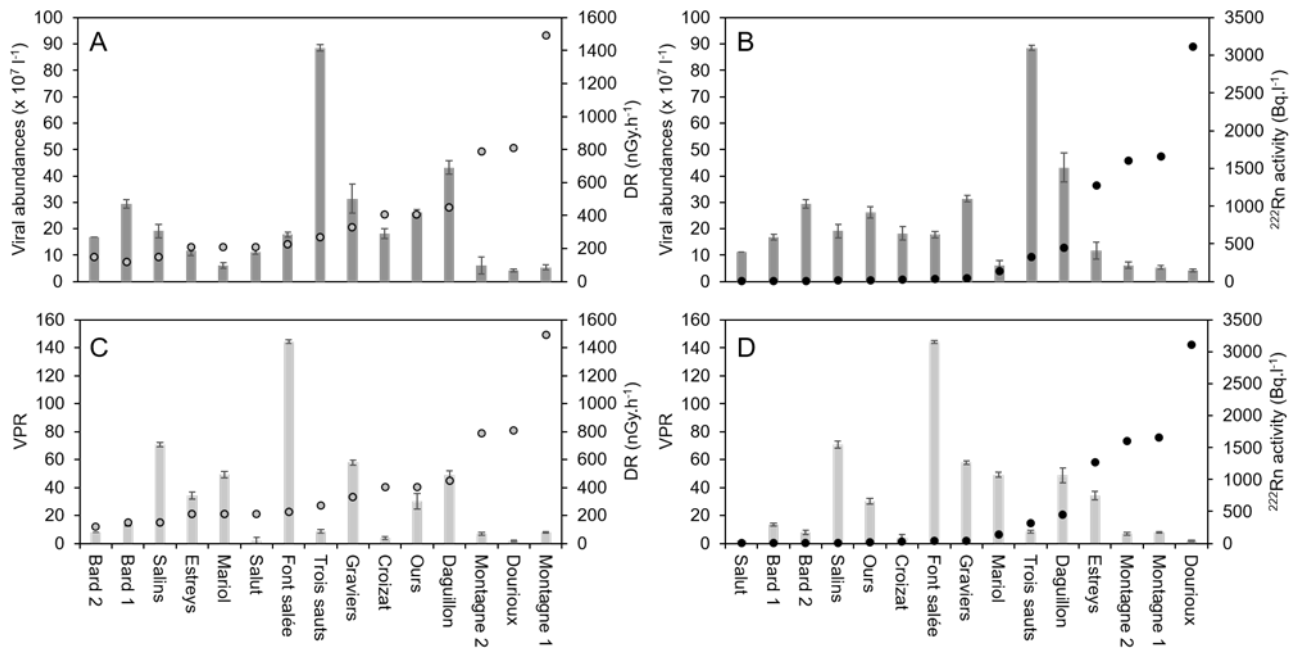
## Results

### Environmental variables

The environmental characteristics of the studied spring sites are shown in supplementary material (Supplementary Table VII-1). The mean  $\pm$  SD conductivity of the springs was  $1369 \pm 2816 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  with a highest value ( $11,830 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) recorded in the most mineralized spring (Croizat). pH did not vary among the springs (Mean  $\pm$  SD =  $6.6 \pm 0.1$ ). Water temperature varied between  $9.9 \text{ }^\circ\text{C}$  and  $36.4 \text{ }^\circ\text{C}$  (Mean  $\pm$  SD =  $14.7 \pm 6.2 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Gamma radiation which presented a natural radioactivity gradient in radiation dose ranged from  $120 \text{ nGy}\cdot\text{h}^{-1}$  (Bard 2) to  $1491 \text{ nGy}\cdot\text{h}^{-1}$  (Montagne 1) with a mean value of  $396 \pm 347 \text{ nGy}\cdot\text{h}^{-1}$ . For the radionuclides activities,  $^{238}\text{U}$  ranged from to  $0.003$  to  $0.196 \text{ Bq}\cdot\text{l}^{-1}$  (Mean  $\pm$  SD =  $0.03 \pm 0.05 \text{ Bq}\cdot\text{l}^{-1}$ ).  $^{222}\text{Rn}$  activity varied between  $5.6$  and  $3,110 \text{ Bq}\cdot\text{l}^{-1}$  (Mean  $\pm$  SD =  $552.6 \pm 897.4 \text{ Bq}\cdot\text{l}^{-1}$ ).  $^{226}\text{Ra}$  had values between  $0.14$  and  $3.2 \text{ Bq}\cdot\text{l}^{-1}$  (Mean  $\pm$  SD =  $1.4 \pm 0.9 \text{ Bq}\cdot\text{l}^{-1}$ ). And finally,  $^{210}\text{Po}$  showed values ranging from  $10$  to  $392 \mu\text{Bq}\cdot\text{l}^{-1}$  (Mean  $\pm$  SD =  $57.1 \pm 101.6 \mu\text{Bq}\cdot\text{l}^{-1}$ ).

### Viral and prokaryotic abundances in mineral springs with variable levels of radioactivity

Both viral (VA) and prokaryotic abundances (PA) were found to vary by an order of magnitude among the mineral springs (Fig. VII-2, Supplementary Table VII-3). VA and PA ranged from  $4.2 \times 10^7$  to  $88.5 \times 10^7 \text{ VLP l}^{-1}$  (mean  $\pm$  SD =  $21.1 \pm 21.1 \times 10^7 \text{ VLP l}^{-1}$ ) and  $3.12 \times 10^7$  to  $20 \times 10^7 \text{ cells l}^{-1}$  (mean  $\pm$  SD =  $3.1 \pm 5.3 \times 10^7 \text{ cells l}^{-1}$ ), respectively. The maxima of VA and PA were observed in different springs (Supplementary Table VII-3). The virus to prokaryote ratio (VPR) varied between  $1.8$  (Salut) and  $144.2$  (Estreys) with a mean  $\pm$  SD of  $30.5 \pm 37.9$ . Interestingly VA showed a significant negative correlation with  $^{222}\text{Rn}$  activity ( $R = -0.56$ ,  $p < 0.05$ ) (Table VII-1). VA and PA were not correlated with the other radionuclides activities ( $^{238}\text{U}$ ,  $^{210}\text{Po}$ ,  $^{226}\text{Ra}$ ) (Table VII-1).



**Figure VII-2:** Histograms showing viral abundances (A) together with dosage radiation, DR and (B)  $^{222}\text{Rn}$  activity and, VPR (virus to prokaryote ratio) with (C) dosage radiation, DR and (D)  $^{222}\text{Rn}$  activity for each spring. On each histogram, the mineral springs are classified with an increasing radioactivity gradient (DR and  $^{222}\text{Rn}$  represented in grey and black circles respectively). Data represent mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ) for each sampled spring.

**Table VII-1** Pearson correlation coefficient (r) between microbial and abiotic parameters (n=15).

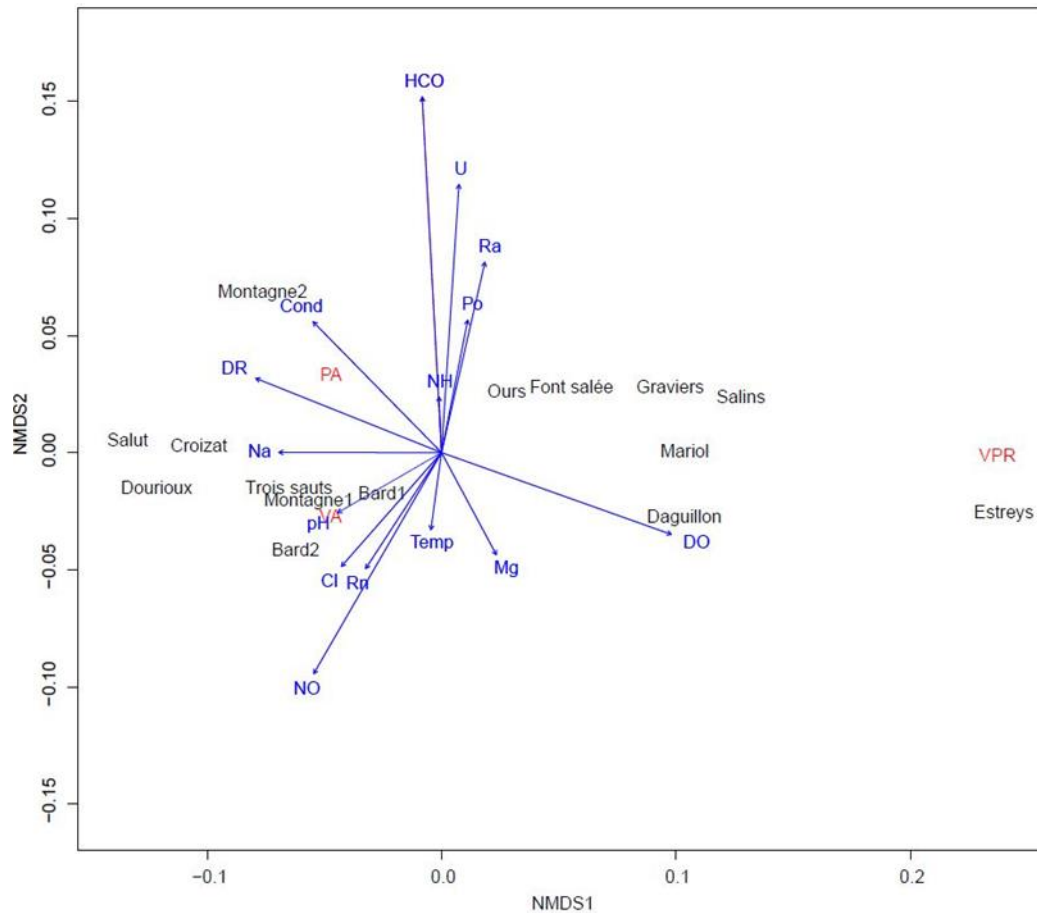
	VA	PA	VPR	pH	DO	Temp	Cond	Na <sup>+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Cl <sup>-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	<sup>238</sup> U	<sup>226</sup> Ra	<sup>222</sup> Rn	<sup>210</sup> Po
VA	<b>1.00</b>	0.12	0.17	0.39	0.51	0.17	-0.02	0.08	0.46	0.20	<b>-0.58</b>	0.38	-0.40	-0.18	0.09	<b>-0.59</b>	-0.17
PA	0.12	<b>1.00</b>	-0.03	0.18	0.12	-0.09	0.05	0.01	0.11	-0.03	-0.36	0.25	0.47	0.41	0.27	-0.30	0.16
VPR	0.17	-0.03	<b>1.00</b>	-0.29	0.45	-0.01	-0.25	-0.21	0.17	-0.16	-0.31	-0.05	-0.25	0.13	0.15	-0.07	0.14
pH	0.39	0.18	-0.29	<b>1.00</b>	0.05	-0.21	-0.26	-0.20	<b>0.60</b>	-0.13	0.05	0.28	-0.22	0.20	-0.22	-0.12	0.17
DO	0.51	0.12	0.45	0.05	<b>1.00</b>	0.15	0.02	0.10	0.25	0.10	-0.12	0.33	<b>-0.52</b>	0.15	0.51	-0.11	0.19
Temp	0.17	-0.09	-0.01	-0.21	0.15	<b>1.00</b>	<b>0.90</b>	<b>0.94</b>	-0.08	<b>0.94</b>	-0.28	0.31	-0.33	-0.02	0.26	-0.32	0.00
Cond	-0.02	0.05	-0.25	-0.26	0.02	<b>0.90</b>	<b>1.00</b>	<b>0.99</b>	-0.27	<b>0.92</b>	-0.11	0.17	-0.06	0.09	0.17	-0.15	0.08
Na <sup>+</sup>	0.08	0.01	-0.21	-0.20	0.10	<b>0.94</b>	<b>0.99</b>	<b>1.00</b>	-0.17	<b>0.96</b>	-0.14	0.26	-0.21	0.04	0.18	-0.20	0.05
Mg <sup>2+</sup>	0.46	0.11	0.17	<b>0.60</b>	0.25	-0.08	-0.27	-0.17	<b>1.00</b>	0.00	-0.45	<b>0.74</b>	-0.33	0.19	-0.06	<b>-0.56</b>	0.21
Cl <sup>-</sup>	0.20	-0.03	-0.16	-0.13	0.10	<b>0.94</b>	<b>0.92</b>	<b>0.96</b>	0.00	<b>1.00</b>	-0.24	0.41	-0.30	-0.09	0.18	-0.29	-0.07
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	<b>-0.58</b>	-0.36	-0.31	0.05	-0.12	-0.28	-0.11	-0.14	-0.45	-0.24	<b>1.00</b>	-0.49	-0.15	-0.02	-0.22	<b>0.89</b>	0.10
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	0.38	0.25	-0.05	0.28	0.33	0.31	0.17	0.26	0.74	0.41	-0.49	<b>1.00</b>	-0.31	-0.06	0.37	<b>-0.69</b>	-0.02
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	-0.40	0.47	-0.25	-0.22	<b>-0.52</b>	-0.33	-0.06	-0.21	-0.33	-0.30	-0.15	-0.31	<b>1.00</b>	0.20	0.02	0.01	-0.04
<sup>238</sup> U	-0.18	0.41	0.13	0.20	0.15	-0.02	0.09	0.04	0.19	-0.09	-0.02	-0.06	0.20	<b>1.00</b>	-0.16	0.06	<b>0.89</b>
<sup>226</sup> Ra	0.09	0.27	0.15	-0.22	0.51	0.26	0.17	0.18	-0.06	0.18	-0.22	0.37	0.02	-0.16	<b>1.00</b>	-0.16	-0.28
<sup>222</sup> Rn	<b>-0.59</b>	-0.30	-0.07	-0.12	-0.11	-0.32	-0.15	-0.20	-0.56	-0.29	<b>0.89</b>	<b>-0.69</b>	0.01	0.06	-0.16	<b>1.00</b>	0.04
<sup>210</sup> Po	-0.17	0.16	0.14	0.17	0.19	0.00	0.08	0.05	0.21	-0.07	0.10	-0.02	-0.04	<b>0.89</b>	-0.28	0.04	<b>1.00</b>

VA: viral abundances, PA: Prokaryotes abundances, Na: Sodium, Mg: Magnesium, Cl: Chlorides, NO<sub>3</sub>: Nitrates, HCO<sub>3</sub>: Carbonates, Cond: Conductivity, DO: Percentage of dissolved oxygen, Temp: Temperature, DR: Gamma (γ) dose radiation, <sup>222</sup>Rn: <sup>222</sup>Rn activity, <sup>238</sup>U: <sup>238</sup>U activity, <sup>210</sup>Po: <sup>210</sup>Po activity, <sup>226</sup>Ra: <sup>226</sup>Ra activity. Values in bold are significant at p value (alpha=0.05).

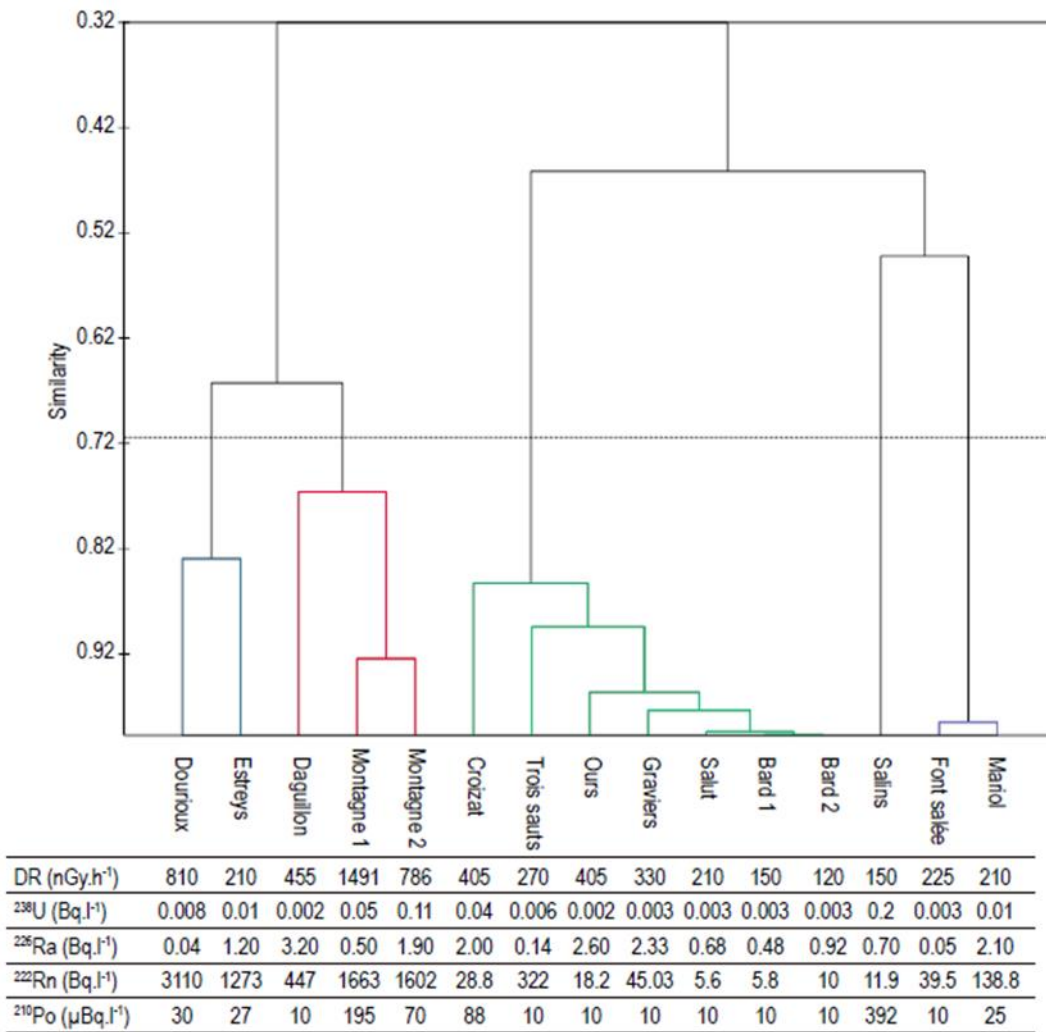
## Relationship of viral and prokaryotic abundances with abiotic variables

The NMDS ordination allowed the samples to be distinguished into two separate groups (Fig. VII-3). PA and VA was clustered by abiotic variables such as conductivity, temperature, DR, pH, Na, Cl, No, HCO and  $^{222}\text{Rn}$  whereas VPR was clustered by abiotic variables such as DO, Mg,  $^{210}\text{Po}$ , U,  $^{226}\text{Ra}$ . However, correlation of microbial abundances with physico-chemical parameters were less robust. VA was weakly correlated ( $p < 0.05$ ) with nitrates ( $\text{NO}_3^-$ ) (0.58,  $p > 0.05$ ), DR (0.52,  $p > 0.05$ ) and  $^{222}\text{Rn}$  (0.59,  $p > 0.05$ ) (Table VII-1). Among the sampled mineral springs, correlation between VA and PA was non-significant ( $r = 0.12$ ,  $p > 0.05$ ) (Table VII-1).

Five clusters which were created by similarity between the samples (Pearson) (Fig. VII-4) was grouped into two major ones. The first cluster (containing the blue and black clusters) was associated with five samples exhibiting high doses of gamma radiation (radiation dose  $\geq 500 \text{ nGy.h}^{-1}$ ) and  $^{222}\text{Rn}$  (activity  $> 400 \text{ Bq.l}^{-1}$ ), whereas the second (containing the green, grey and blue clusters) was predominantly associated with samples that represented lower levels of radioactivity.



**Figure VII-3:** Non-metric multidimensional scaling (NMDS, stress value = 1) illustrating similarity between samples. Relations between biotic and abiotic variables are represented. HCO:  $\text{HCO}_3^-$ ; Na:  $\text{Na}^+$ ; Cl:  $\text{Cl}^-$ ; Mg:  $\text{Mg}^{2+}$ ; NO:  $\text{NO}_3^-$ ; NH:  $\text{NH}_4^+$ ; Cond: conductivity; Temp: temperature; DO: dissolved oxygen;  $\text{U}^{238}$ :U activity; Ra:  $^{226}\text{Ra}$ ; Rn:  $^{222}\text{Rn}$ ; Po:  $^{210}\text{Po}$ ; DR: dose radiation; VA: viral abundance, PA: prokaryote abundance; VPR: viral-prokaryote ratio.

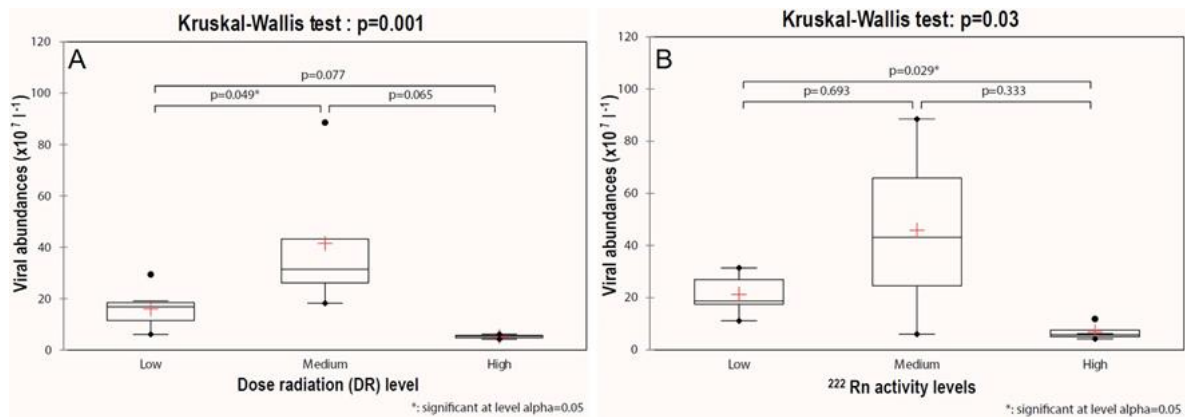


#### Values of radioactive parameters measured in each springs

**Fig. VII-4** Dendrogram based on hierarchical ascendant classification analysis (HAC) of springs performed on physical, chemical and radioactive parameters measured. DR: dose radiation, <sup>222</sup>Rn: <sup>222</sup>Rn activity, <sup>238</sup>U: <sup>238</sup>U activity, <sup>210</sup>Po: <sup>210</sup>Po activity, <sup>226</sup>Ra: <sup>226</sup>Ra activity.

Additionally, Kruskal-Wallis test showed significant differences ( $p < 0.001$ ) between in VA between springs with low (mean  $\pm$  SD=  $16.0 \pm 7.5 \times 10^7$  VLP l<sup>-1</sup>) and medium (mean  $\pm$  SD=  $41.5 \pm 27.8 \times 10^7$  VLP l<sup>-1</sup>) DR (Fig. VII-5A). Low VA were measured in springs with high DR but no significant different was determined by the test. Also, Kruskal-Wallis showed significant differences ( $p < 0.03$ ) in VA between springs with low (mean  $\pm$  SD=  $21.3 \pm 7.0 \times 10^7$  VLP l<sup>-1</sup>) and high (mean  $\pm$  SD=  $6.9 \pm 3.4 \times 10^7$  VLP l<sup>-1</sup>) level

of  $^{222}\text{Rn}$  activity (Fig. VII-5B). Such variations or differences were not observed for PA (Supplementary Fig. VII-2), and VPR.



**Figure VII-5:** Kruskal-Wallis tests on differences in the mean viral abundances in mineral springs classified by (A) gamma ( $\gamma$ ) dose radiation (DR) (3 classes: Low: DR < 250 nGy.h<sup>-1</sup> (7 sites); Medium: 250 nGy.h<sup>-1</sup>  $\geq$  DR  $\leq$  500 nGy.h<sup>-1</sup> (5 sites); High: DR > 500 nGy.h<sup>-1</sup> (3 sites) and (B)  $^{222}\text{Rn}$  activity levels (3 classes: Low: activity < 100 Bq.l<sup>-1</sup> (8 sites); Medium: 100 Bq.l<sup>-1</sup>  $\geq$  activity  $\leq$  1000 Bq.l<sup>-1</sup> (3 sites); High: activity > 1000 Bq.l<sup>-1</sup> (4 sites). Red crosses represent the mean value with SD calculated for each level based on the number of sites. Star indicates significant p value (p<0.05).

## Discussion

The spring waters collected across the study site provided a compelling opportunity to test and evaluate the impact of natural radioactivity through the gamma radiation dose and radionuclides activities on virus-prokaryote relationship.

Flow cytometry enumeration of viral abundances in the mineral springs fell within the lower end of values (10<sup>7</sup>-10<sup>10</sup> VLP l<sup>-1</sup>) as previously reported from environments like aquifers (Roudnew et al., 2013) and hypersaline lakes (Jiang et al., 2004) springs. Large variability in viral and prokaryote abundances by one and two orders of magnitude respectively could be attributed to the prevailing conditions in different springs. Differences and variability in conductivity and temperature are mainly related to the depth



at which groundwater has infiltrated and then, to its speed to reach the surface (Boineau & Maisonneuve, 1972). In fact, the adaptability and flexibility of viruses to survive in the most mineralized spring (Croizat) with a conductivity of  $11,830 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  suggest that phages are an important component of crenic communities. Studies investigating freshwater viromes have attributed to large differences in viral diversity to salinity (Tseng et al. 2013) and conductivity gradients (Roux et al. 2012). Significant relationship of nitrate to viruses rather than to prokaryotes in our study were similar to a report from a freshwater reservoir (Peduzzi and Schiemer, 2004), but however the role of nitrate in influencing viral abundance is unclear and less discussed in literature.

Viruses are host specific and largely rely on the availability of susceptible host cells (mainly prokaryotes) for their proliferation. However, in contrast to reports from other freshwaters systems (Peduzzi and Schiemer 2004, Pradeep Ram et al. 2014), viral and prokaryote abundances obtained in our study were not significantly correlated. Since mineral springs are restrictive and oligotrophic environments (Reiss and Chiffard 2017), it is likely that the nature and dynamics of viral strategy could influence viral and prokaryote counts in such harsh or stressful conditions. The fact that prokaryotes serve as dominant host for viruses always remains a difficult hypothesis to test. The application of recent molecular tools would help to identify specific host–virus relationships and assess their interactions.

Virus-to-prokaryote ratio (VPR) has often been a descriptor of relationship between viruses and prokaryotes in a given environment (Parikka et al. 2017). VPR is the result of a comprehensive balance of factors, such as viral production, transport of viruses through sinking particles, decay rates and life strategies (Wigington et al., 2016). Large variation of VPR by two orders of magnitude among the springs (1.4 to 144) is much higher than reports from hot springs located in Southern Hemisphere (0.1 to 6.0, Parikka et al. 2018), but similar to the reported range in near surface oceans (1.4 to 160, Wigington et al. 2016). The broad distribution of VPR together with a lack of significant relationship between VA and PA in the springs imply that the increase in the former is a poor qualitative predictor of latter. The observed increase in PA along with VPR has been attributed to direct dependence of viral production on PA, thus imposing additionally a possible selective pressure that can lead to a reduced volume of host cells (Hara et al. 1996). Low VPR

observed in some springs could either be as a result of host cell resistance or specific phage adsorption to host when their diversity is low (Maranger et al. 1994, Tuomi et al. 1995). In our study, none of the abiotic factors were found to explain for the variation in VPR which was probably due to the differences in the prevailing environmental parameters among the study habitats. It is more likely that the factor(s) influencing VPR could be specific to each spring.

In the mineral springs,  $^{222}\text{Rn}$  accounted for the highest nuclear activity (number of disintegrations per time unit) compared to others radionuclides. Adverse effect of water radioactivity on viral abundance, as seen by a significant negative correlation between VA and  $^{222}\text{Rn}$  activity could perhaps corroborate our hypothesis on the drastic effect of ionizing radiation on viruses. However, the correlation between VA and the other radionuclides activities ( $^{238}\text{U}$ ,  $^{226}\text{Ra}$  and  $^{210}\text{Po}$ ) was not evident. VA varied between springs with low and medium DR. The low mean value of VA in springs with high  $^{222}\text{Rn}$  activity suggests that viral decay could be more important in these habitats.

Ionizing radiation or exposure to alpha particles from radon is known to generate and induce DNA mutations, chromosomes aberrations and other cellular abnormalities such as protein modification (Robertson et al., 2013; Reisz et al., 2014). Also, viral inactivation has been reported in the context of intense  $\gamma$ -ray irradiation (Sullivan et al., 1971). Irradiation of lambda phage induces DNA strand breakage and lead to the inactivation of phages (Bertram, 1988). The findings from laboratory investigations could perhaps extend support to aquatic microbes, where the presence of high levels of radon might affect viral capsid integrity and prokaryotes membranes. However, phages too can appear to be more resistant to ionising radiations (Lea, 1946). In the case of prokaryotes, their membrane that enables nutrient exchange between the cell and the environment can absorb radionuclides and be subjected to external and internal irradiation. Although it has been previously hypothesized that micro-organisms are known to have colonised the spring ecosystems billions of years ago (Djokic et al. 2017), radioactivity arising from natural origin could be a stressor for them and affect the relationship between these two protagonists. In such a scenario it could be interesting to identify the adaptive strategy of viruses (lytic, lysogeny or pseudolysogeny) under challenging environmental conditions. Therefore, investigations pertaining to viral infection in mineral springs can provide

important information on virus-prokaryote interaction and their mediated biogeochemical processes.

In conclusion, no significant correlation was found between viruses and prokaryotes in the analyzed spring waters. Among different parameters considered for natural radioactivity (radon activity, radiation dose, dissolved radionuclide activity), radon activity appears to be the most influential parameter. Low viral abundances in springs amidst of high levels of  $^{222}\text{Rn}$  activity and vice versa are suggestive of drastic effect of ionizing radiation on viruses which could possibly be linked to viral decay due to DNA damage.



## **Chapitre VIII: L'exploitation de l'uranium a-t-il eu un impact sur les communautés de diatomées fossiles de la zone humide de l'ancienne mine de Rophin ?**

Dans les chapitres précédents, les études ont permis de démontrer que bien que les communautés de diatomées et les virus soient exposées à des bruits de fond radioactif élevés depuis de longues périodes, la radioactivité est un facteur qui ne contribue pas à la richesse des communautés mais bien à leur structuration.

Dans le présent chapitre, nous avons voulu tester si la modification du bruit de fond radioactif par une activité humaine (contexte TE-NORM) pouvait avoir un effet sur les communautés de diatomées. Ainsi, dans ce chapitre, les communautés de diatomées fossiles de la zone humide de l'ancienne mine de Rophin (Lachaux) ont été analysées via une approche de paléo-écologie. Pour cela, une carotte de sédiments a été prélevée et les diatomées fossiles, piégées à l'intérieur, étudiées. La mine de Rophin a été exploitée de 1948 à 1954 pour le minerai d'uranium. L'approche choisie a permis d'évaluer si l'exploitation de la mine, et donc le renforcement du bruit de fond radioactif, a modifié la richesse, la composition et la diversité des communautés de diatomées.

Ces travaux ont été soumis à la revue *Environmental Monitoring and Assessment*.

# **Investigating the ecological impact of uranium mining activity on wetland (Rophin, France) fossil diatom community**

Lory-Anne Baker<sup>1,2</sup>, David Biron<sup>1,2†</sup>, Olivier Voltaire<sup>2,3</sup>, Elisabeth Allain<sup>2,3</sup>, Clément Floquet<sup>3</sup>, Sofia Kolovi<sup>2,4</sup>, Vincent Breton<sup>2,4</sup>, Patrick Chardon<sup>2,4</sup>, Ana Ejarque<sup>5</sup>, Emmanuelle Defive<sup>3</sup>, Franck Donnadiou<sup>6</sup>, Angia Sriram Pradeep Ram<sup>2,3</sup>, Aude Beauger<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Université Clermont Auvergne, CNRS, LMGE, F-63000 Clermont-Ferrand, France ; <sup>2</sup>LTSER “Zone Atelier Territoires Uranifères”, 63000 Clermont-Ferrand, 63178 Aubière Cedex, France ; <sup>3</sup> Université Clermont Auvergne, CNRS, GEOLAB, F-63000 Clermont-Ferrand, France ; <sup>4</sup> Université Clermont Auvergne, CNRS/IN2P3, Laboratoire de Physique de Clermont (LPC), UMR 6533, F-63178 Aubière cedex, France ; <sup>5</sup>ISEM, Univ Montpellier, CNRS, IRD, Montpellier, France ; <sup>6</sup>Laboratoire Magmas et Volcans, CNRS, IRD, OPGC, Université Clermont-Auvergne, F-63000 Clermont-Ferrand, France ; <sup>7</sup>Laboratoire SUBATECH, UMR 6457, IN2P3/CNRS/IMT Atlantique/Université de Nantes, 4, rue Alfred Kastler, BP 20722, 44307 Nantes cedex 3, France

\*Lory-Anne Baker, l-anne.baker@doctorant.uca.fr, Université Clermont Auvergne, CNRS, LMGE, F-63000 Clermont-Ferrand, France.

## **Abstract**

The fate of Uranium former mining sites is a real environmental problematic because mining can have changed the radioactive background and polluted the surrounding biotopes even after the closure of the mines. The Rophin mine (France) operated from 1949 to 1957 by the French Atomic Energy Commission (CEA). Downstream of the mine site, there is a wetland which bears witness to the history of the site. Indeed, a layer of white clay is found in the first 20 cm of the wetland soil, which is an evidence of the active mining period. The aim of this study is to investigate the impact of uranium mining at the Rophin mine on aquatic biocenoses via the diachronic analysis

of diatom communities. To achieve this objective, a core sample was taken from the Rophin wetland and the diversity and structure of fossil diatom communities were analysed along the stratigraphic layers. No significant differences in species richness between the pre-mining, active mining and post-mining periods could be demonstrated by the Kruskal-Wallis test. However, community structure analyses show differences between these periods. The diatom species associated with the active mining and post-mining periods are in the majority indicative of the evolution of the wetland and the input of the stream it. The change in diatom communities in the Rophin wetland suggests that the short period of mining activity at Rophin did not have a significant effect on them.

**Key words:** uranium mining, fossil diatoms community, paleoecology, wetland, monitoring.

## **Introduction**

In the aftermath of the Second World War, there was a nuclear arms race which led to the need of increased quantities of uranium (U). To comply, several uranium mines were established in uranium rich areas. In France, more than 200 mining sites were involved in the exploration, production, processing and storage of uranium ore. Uranium extraction, processing and storage activities have changed the radiological and environmental status of the mining sites by releasing relatively important concentrations of Uranium and its descendants in soil and water even after the end of the mining activities and the rehabilitation of the sites (Abdelouas, 2006; Bister, 2015; Martin, 2019). Thus, the future of former mining sites and their impact on the surrounding natural ecosystems and human populations, has become an environmental concern (IRSN, 2009; Uralbekov, 2015; Ballini, 2020). To assess the present-day and future ecological impact of old mining activity on biocenosis, it is important to monitor the development of local organisms.

Rophin mine, was operational from 1948 to 1957, was used for uranium extraction, processing as well as for the storage of sterile and residues. Following its shutdown, vegetation grew over, and there are only a few visible witnesses of this past activity: notably an Environmentally Protected Facility (ICPE) where residues and sterile were

stocked. These characteristics makes it a special observatory for the development of biological ecosystems following mining activity. A previous study on the Rophin site highlights the presence of markers of contamination on the site and in particular in the wetland downstream of the former mining site (Martin, 2020). Indeed, they observe the presence of a whitish silt loam (WSL) soil layer in the first twenty cm of several cores taken from the wetland. A gamma radiation level of  $1050 \text{ nSv.h}^{-1}$  and uranium concentrations of up to  $1855 \text{ mg.kg}^{-1}$  was associated with this WSL. Cesium 137 ( $^{137}\text{Cs}$ ) measurements indicate that this layer predates the Chernobyl accident of 1986 and corresponds well to the mine's operating period. Moreover, the analysis of satellite photographs taken from 1946 and 2015 clearly show the presence of a whitish deposit at the location of the mine site, which spreads in the Gourageat stream crossing the site, to end up in the wetland downstream of the mine (Martin, 2020). This white layer occurred because of the flow of ore tailings that were washed on site. Also, the presence of peak ratios of radium 226 and uranium 238 ( $^{226}\text{Ra}/^{238}\text{U}$ ), polonium 210 and uranium 238 ( $^{210}\text{Po}/^{238}\text{U}$ ) corresponding to the WSL suggests the contribution of particles of uranium and its descendants in the wetland of Rophin coming from the mining area. These results are in agreement with Shróner et al. 2009 and show that wetland is a real physical trap for radionuclides and metals. Then, the dendroanalysis of oaks around the mine clearly shows that the trees downstream of the mine show peaks of uranium in their tree rings corresponding to the period of exploitation of the mine (Martin, 2020). These results indicate that the uranium released during the operation of the mine was bioavailable and a potential pollution for the surrounding biotopes.

Algae are good indicators for radionuclides presence in aquatic environments. There are differences in radionuclides tolerances between species due to their ecological variations (Pradhan, 2019; Banerjee, 2022). Anthropogenic disturbances of natural environments such as modification of the watershed impacted by mining effluents are a selection pressure for microalgae communities (Garcia-Balboa, 2013). Thus, these modifications will lead to a selection of species that are more tolerant to uranium and its descendants. Among the microalgae bio-indicators, diatoms are able to accumulate radionuclides in proportion to the discharge into the environment which demonstrates their resistance to radioactivity (Snoeijs, 1993). Herlory et al. (2013) used diatoms to evaluate the impact of the discharge of treated uranium effluents originating from a French



former uranium mining sites. In the streams of Ritord, diatoms species showed differences of radionuclide tolerance between species. Moreover, diatoms are interesting organisms because they fossilise due to the presence of their siliceous frustule. The identification of fossil frustules allows the access to past environmental records and their interpretation through diatom species ecology. Thus, observing the evolution of the structure of the fossil diatom communities of the Rophin wetland over temporal scales through paleoecological analysis allowed the impact of mining on these communities to be determined (Foster, 1990). This present study aims to analyse the impact of uranium mining on the diversity and the structure of fossil diatom communities in the Rophin wetland. The presence of contaminants in aquatic environments tends to reduce the richness and diversity of communities (Juttner, 1996). Thus, the first hypothesis of our study is that the exploitation of the Rophin uranium mine led to the decrease in the specific richness of the diatom communities. As mentioned previously, the species have different tolerances to radionuclides, so the introduction of contaminants into natural environments can lead to the selection of the species most tolerant to radionuclides released into the wetland. The second hypothesis of this study is that the structure of the communities should have been modified following the exploitation of the mine. This study is the first to our knowledge that uses paleolimnology (fossil diatoms in particular) to assess the impact of the exploitation of a former uranium mine on aquatic biocenosis.

## **Material and methods**

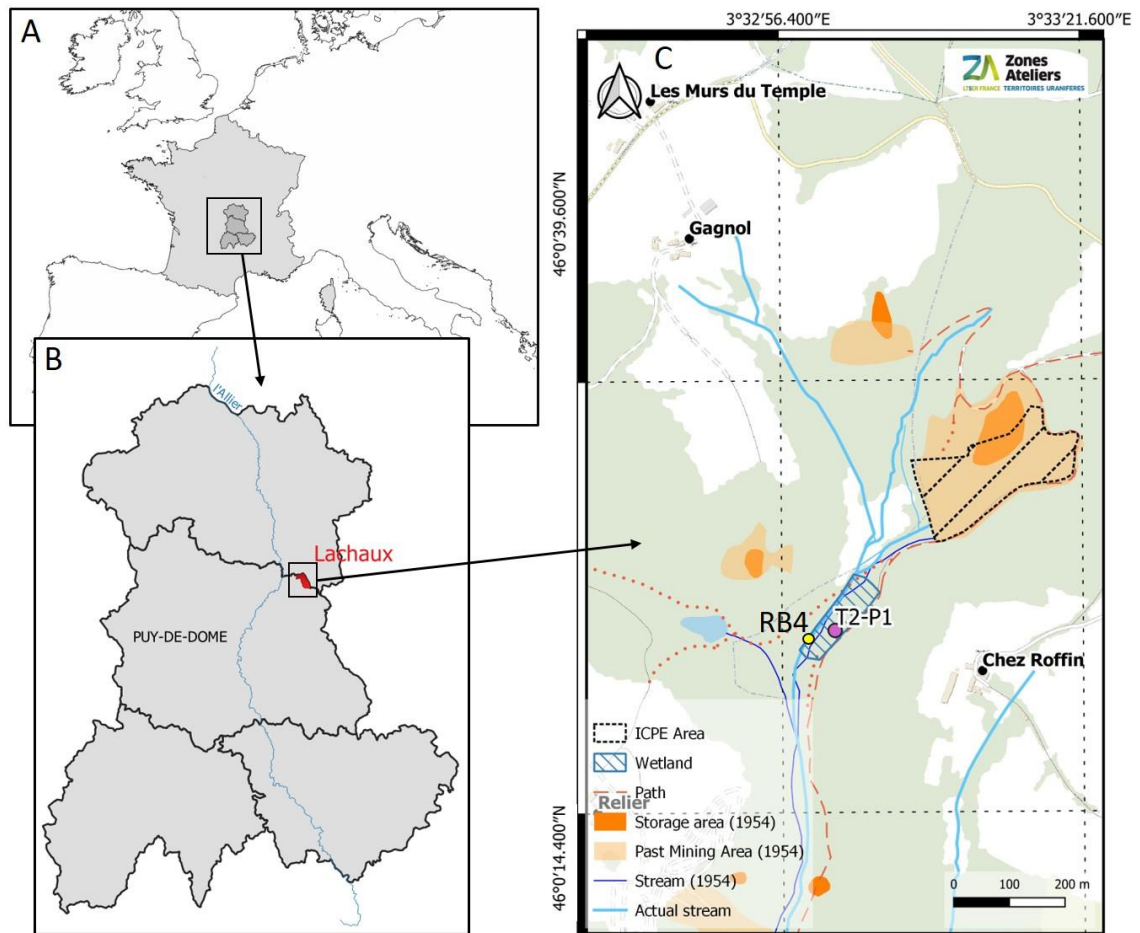
### **Study site**

Located in the north-eastern part of the Puy-de-Dôme department (France) and about 3.4 km from the municipality city of Lachaux, the former mine (Rophin site) is referenced as western ore bodies of Lachaux (Figure VIII-1). Ore bodies of Lachaux are exceptional for the predominance of parsonsite ( $\text{Pb}_2(\text{UO}_2)(\text{PO}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) under a workable deposit. The former mining of Rophin is placed in a small watershed and was composed by underground galleries, buildings and three settling ponds. Ore treatment was

gravimetric with a vibrating table, crushing machines and a flotation circuit that included the settling ponds to retain U particles (Himeur and Andres, 2012). Fewer than 30 tons of U were extracted from mine tailings, at a mean concentration rate of 0.7 %, and then exported as 4.4 % concentrates. Over 30,000 tons of mine and mill tailing waste were stored in an Environmentally Protected Facility (ICPE). Nowadays, the storage site is covered by vegetated soil, and forest vegetation is growing at the top of the mine waste storage heap. In the western part of the Rophin ICPE, effluents coming from the underground galleries above the ICPE are collected in a trench and meet the stream of the Gourgeat stream (Figure 1). This stream which is connected to five local ore bodies in the same watershed. The stream of Gourgeat contributes with another stream (The Gagnol) to form which is 200 m downstream of the mining site of the Rophin wetland, which will be the focus of this study. A biannual control of the uranium and radium concentrations in the effluent waters was set up as part of the ICPE site supervision program. Moderately high aqueous U concentrations have been detected in the trench collecting effluent waters running inside the ICPE, with values at times reaching  $200 \mu\text{g.L}^{-1}$  (Himeur and Andres, 2012).

### **Core and diatoms sampling**

On the 4<sup>th</sup> March 2020, coring was performed at the Rophin wetland using a Russian corer of 50 long x 5 cm of diameter. A core of 169-cm-long and a useful diameter of 23 mm was extracted from the soil ("Rophin\_T2-P1bis", Figure VIII-2). After sampling, the core was refrigerated. Following the opening of the core with an angle grinder, subsampling of the sediments was respectively undertaken according to the lithostratigraphic layers. To cut into samples, knife and laboratory spoon spatula were used. Finally, a sample of sediments near to the wetland, in the Gourgeat stream was also taken on 14<sup>th</sup> October 2019 to observe the diatom species. Biofilm was sampled by scraping the first millimetres of sediments in the bottom of the stream.



**Figure VIII-1:** Geophaphic map of the former mining of Rophin and the core. (A) Map of Europe showing France and the department of Auvergne. (B) Map showing the town of Lachaux in the Puy-de-Dôme. (C) Map with the location of the former Rophin mine, showing the Rophin wetland and the studied sedimentary core T2-P1.

### Slide preparation and microscopy for morphological to the method of diatoms

Raw materials were prepared for light microscopy (LM) observation according to the method of Prygiel and Coste (2000). 20 samples of 1 cm which were collected for diatom analysis were taken in the main stratigraphic zones. Core and stream samples were cleaned using hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ , 35 %) and hydrochloric acid (HCl, 37 %), and rinsed several times with distilled water. Cleaned material was diluted with distilled water to avoid excessive concentrations of diatom valves on the slides. Then, a drop of dried, clean material was mounted in Naphrax®. LM observations and morphometric measurements were done using a Leica® DM2700M microscope with a 100x oil immersion objective using a differential interference contrast. For each slide, at least four

hundred diatom valves or more were counted on random transects. Diatom identification was based on different taxonomical works (Krammer & Lange-Bertalot, 1997a; 1997b; 2000a; 2000b; 2004; Krammer, 2000; 2002; 2003; Lange-Bertalot, 2001; Kulikovskiy et al., 2010; Hofmann et al., 2013; Wetzel et al., 2015; Lange-Bertalot et al., 2017). After completing, the relative abundance of diatom species was calculated and computed by means of OMNIDIA version 6.1 software. This software includes a database of more than 11,000 species (Lecointe, 1993). Most of the taxa have fairly defined ecological characteristics.

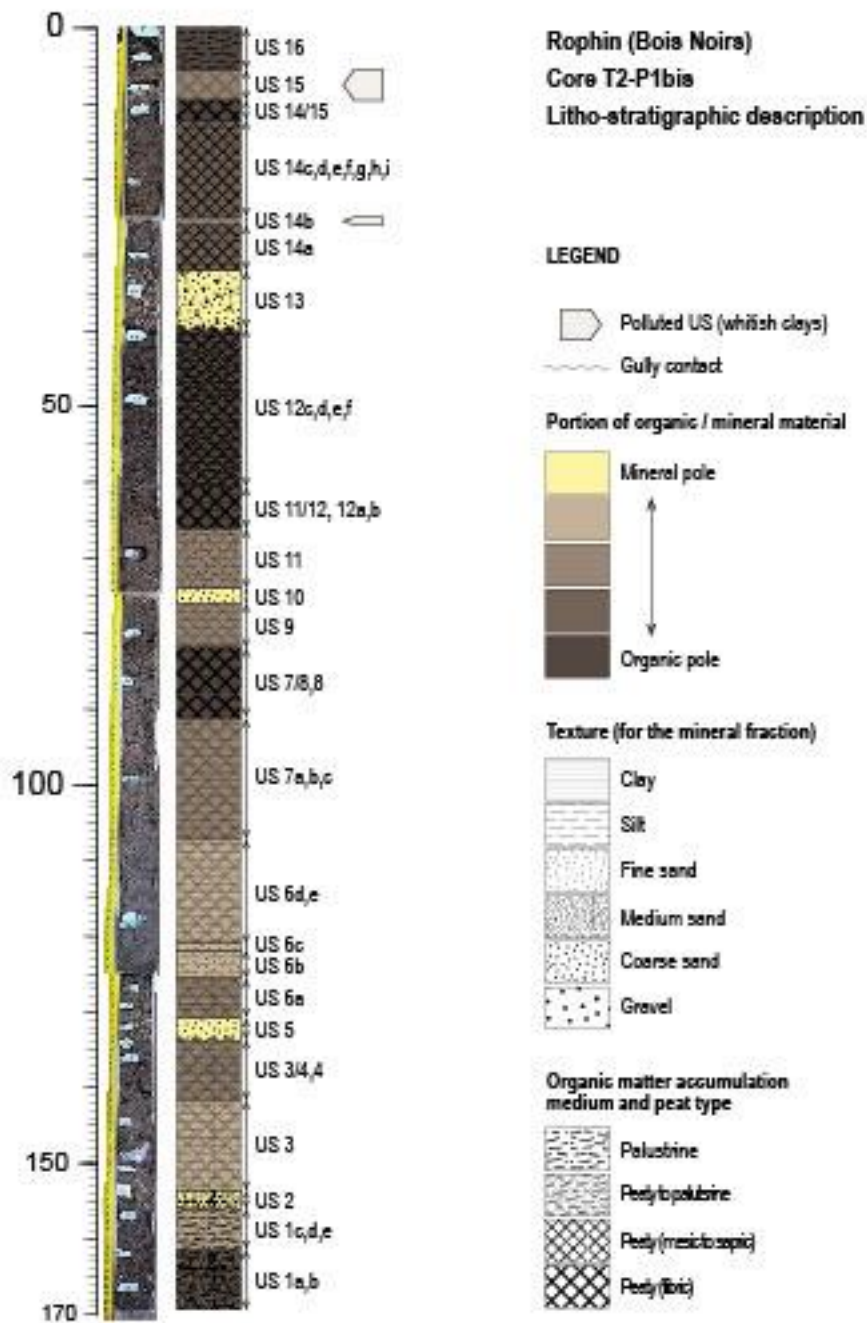
## **Chronology**

Seven accelerator mass spectrometry (AMS)  $^{14}\text{C}$  measurements were performed in the Rophin wetland sedimentary record by Beta Analytic Inc (Miami, Florida) and DirectAMS (Bothell, Washington) using plant remains and charcoals. The chronology of the uppermost part of the record was completed with the surface age, and an historic age. Bayesian age-depth modelling was developed with the R package “Bacon” (Blaauw & Christen, 2011) which applies the IntCal20 calibration curve to calibrate the  $^{14}\text{C}$  ages (Reimer et al., 2020).

## **Statistical analysis of diatoms communities**

Diatom stratigraphic diagrams were produced using C2 software version 1.7.7 (Juggins, 2007). Also, the three samples (“155-154”, “132.5-131.5”, “36-35”) corresponding to specific flood events marked by thick detrital layers (large sandy-gravelly detrital, figure VIII-S1) were removed for the cluster analyses. Diatom biostratigraphical zones were established according to major changes in assemblage composition using the CONstrained Incremental Sum of Square cluster analysis: CONISS (Grimm, 1987). Only taxa with relative abundances superior to 10 % in at least one sample were retained for cluster analysis. Then, a stratigraphic plot of the -50 to 0 fraction was

made to zoom in and to determine the community changes associated with the pre-mining, mining and post-mining periods.



**Figure VIII-2:** Litho-stratigraphic description of the sedimentary sequence cored from the Rophin wetland (169 cm).

Following the stratigraphy which allows the reconstruction of the site paleo-environment, the impact of mining activity on alpha and beta diversity of diatom communities was tested. Firstly, comparison of the total diatom richness between pre-mining, active mining and post-mining zones (A, B, C1, C2 and D) was done by using the Kruskal-wallis test to verify the null hypothesis (no effect) of mining activity on species richness. Following this first analysis, a distance matrix between the samples was calculated with the ab.Jaccard index (Chao, 2006) with the function “dist.ldc” of the package “Adespatial” version 0.3–14 (Dray et al., 2012). This matrix is based on the total diatom community including both dominant and rare species of diatoms. A non-metric multidimensional scaling (nMDS) was done with this ab.Jaccard distance matrix to explore if there are graphical similarities among the samples community structure. Then, the difference of diatom community structures (including both dominant and rare species) between pre-mining, active mining- and post-mining zones was estimated using the Multi-Response Permutation Procedure (MRPP) (Zimmerman, 1985; Mielke, 1991). MRPP is a non-parametric, multivariate approach that tests the null hypothesis that two or more predefined groups are not different in species composition. The computed MRPP statistic delta ( $\delta$ ) represents the overall weighted mean of within-group means of pairwise dissimilarities among plots. In addition, the chance-corrected within-group agreement A statistic was computed ( $A = 0$  means that in-group and out-group heterogeneities are equal;  $A = 1$  means that all members of each group are identical and different from the members of other groups). This analysis was complemented with an Indicator Species Analysis (ISA) (Dufrêne & Legendre 1997; McGeoch & Chown, 1998) using again the vegan R package.

## **Results**

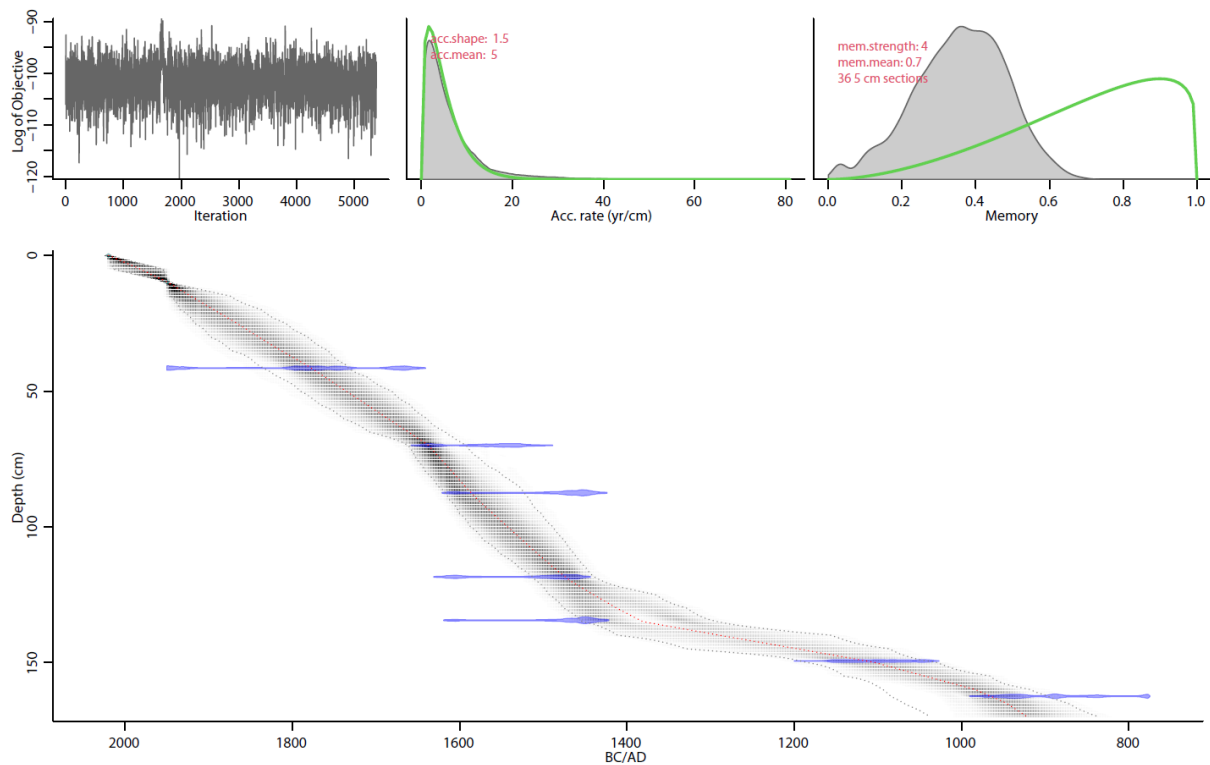
### **General description of the wetland core**

The lithostratigraphic description of the Rophin core is presented in Figure VIII-2. Sixteen stratigraphic units have been determined. The core mainly shows fibric peat sequences and mesic to sapric peat sequences. At its base, we found a first unit with a

palustrine level with gravel and medium sand, rich in organic matter (US 1 a, b) and a peat level, less organic with fine sand (US 1 c, d, e). Towards the surface of the core, we found two layers with whitish clays, a pollution indicator. The oldest and less thick (about 1 cm), US 14b is inserted between two mesic to sapric peat bog sequences. The latest layer and larger one (about 4 cm and 9.75 cm-depth), US 15 is comprised between a peaty, limonous sequence and a palustrine sequence. This unit also corresponds to a polluted level. This white layer (US 15) is well-known to correspond to the period of mining exploitation. A few detrital units (US 2, 5, 10, 13) are present marked by a highly mineral sequence with gravel and coarse sand, generally accompanied by gully contact with the below US. These layers were not retained for the diatom analyses.

### **Age-depth model**

Table VIII-1 summarizes results of  $^{14}\text{C}$  dating and historic ages used to establish the chronology for the upper part of the core. Fig. VII-3 shows the age-depth model, defined by seven  $^{14}\text{C}$  dates and two uppermost historic dates. In addition to the surface age, an age of 1950 AD was assigned to the basal level of US15, which marks the period of Uranium exploitation by the Rophin mine between 1947 and 1959. According to the radiocarbon dates and the age-model the core spans the last ~1100 years, with an estimated basal age of c. 930 cal AD.. Sediment accumulation rate (SAR) has not been constant over time. Below 134 cm-depth, low average SARs of  $\sim 0.1 \text{ cm.yr}^{-1}$  are observed. A marked increase to  $\sim 0.4 \text{ cm.yr}^{-1}$  occurs between 134 and 69 cm-depth, a section where the four obtained  $^{14}\text{C}$  dates generally overlap at the 95 % confidence intervals (Fig. VIII-3). This is followed by a slight decrease of SARs down to  $\sim 0.2\text{-}0.1 \text{ cm.yr}^{-1}$  in the upper sequence.



**Figure VIII-3:** Age-depth model and age distributions of calibrated  $^{14}\text{C}$  dates obtained in the Rophin wetland core. Dotted grey envelope shows 95 % confidence intervals ( $2\alpha$ ) of calibrated dates, and the red dotted line shows the weighted mean of the model. Default settings were used for the memory strength (mem. strength) and memory mean (mem.mean), respectively, set at 4 and 0.7. Mean accumulation (acc.mean) was set to 5  $\text{yr}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

### Diatom stratigraphy

138 species belonging to 37 genera were identified in the wetland core. 33 taxa with a relative abundance superior to 10 % in at least 1 sample were selected (Fig. VIII-4). These taxa belonged to fifteen genera such as *Achnantheidium*, *Aulacoseira*, *Brachysira*, *Encyonema*, *Eunotia*, *Fragilariforma*, *Frustulia*, *Gomphonema*, *Pinnularia*, *Placoneis*, *Planothidium*, *Pseudostaurosira*, *Reimeria*, *Sellaphora* and *Tabellaria* (Fig. VIII-4). Detrital inputs are accompanied by peaks in species richness and increases in the abundance of certain dominant species (Fig. VIII-S1). The oldest one at 155-154 cm (AD 1045-1057) was associated with peaks of *Achnantheidium minutissimum* (Kützing) Czarnecki 1994, *Aulacoseira ambigua* (Grunow) Simonsen, *A. islandica* (O.Müller) Simonsen, *Brachysira*



*confusa* Van de Vijver, R.L.Albert, B.Kennedy & Kusber, *Eunotia* aff. *pseudogroenlandica* Lange-Bertalot & Tagliaventi, *Frustulia vulgaris* (Thwaites) De Toni, *Gomphonema* aff. *minutum* (C.Agardh) C.Agardh, *Sellaphora atomoides* (Grunow) Wetzel & Van de Vijver. Also, input of 133.5-132.5 cm (AD 1394-1400) corresponds to peaks of *A. alpigena* (Grunow) Krammer, *Encyonema silesiacum* (Bleisch) D.G.Mann, *Gomphonema exilissimum* (Grunow) Lange-Bertalot & E.Reichardt and *Planothidium lanceolatum* (Brébisson ex Kützing) Lange-Bertalot. The last one at 36-35 cm (AD 1808-1814) was coupled with *A. minutissimum* (Fig. VIII-S1).

Following the removal of the detrital samples, there were four distinct zones according to the dendrogram produced in the CONISS cluster analysis and diatoms occurrence and abundances (Fig. VIII-S2). Only one zone corresponded to the mining activity period (Zone C2, Fig. VIII-S2).

### **Zone A. 167-151 cm, cal AD 938-1093**

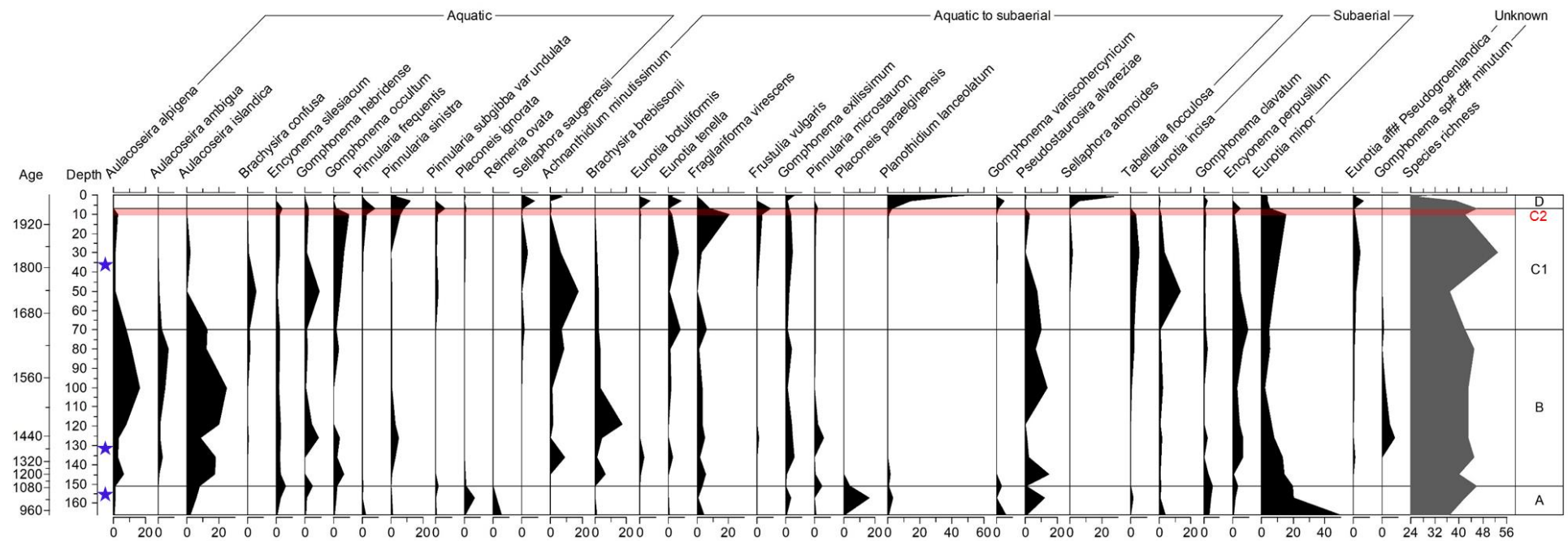
To analyse zone A, three trends in diatom community evolution could be identified. The first trend is related to a slight increase in the abundances of *A. islandica*, *E. silesiacum*, *Gomphonema clavatum* Ehr. and *G. occultum* Reichardt & Lange-Bertalot from the beginning to the end of the zone. It is accompanied with a decrease of the abundance of *Reimeria ovata* (Hustedt) Levkov & Ector (Fig. VIII-4). The second one is visible at 157-158 cm, where there is a change of middle (US 1c, d, e; Fig. VIII-2). Peaks of abundance of the species *G. exilissimum*, *Placoneis ignorata* (Schimanski) Lange-Bertalot, *P. paraelginensis* Lange-Bertalot, *Planothidium lanceolatum*, *Pseudostaurosira alvareziae* Cejudo-Figueiras, E.A.Morales & Ector and *Tabellaria flocculosa* (Roth) Kützing appeared. The third one is characterised by the decrease until 157-158 cm followed by the increase until the end of the zone of some species. These species are *Eunotia incisa* Gregory, *E. minor* (Kützing) Grunow, *Fragilariforma virescens* (Ralfs) D.M. Williams et Round, *G. hebridense* Gregory, *G. variscohercynicum* Lange-Bert. & E.Reichardt, *P. frequentis* K.Krammer, *P. microstauron* (Ehr.) Cleve. These changes in abundance are also accompanied by a change from a peaty to a marshy environment and back to a peaty environment. Thus, the zone A is associated with a decrease of acidophilous, oligotrophic,

oligosaprobic and a slow increase of neutrophilous, eutrophic, beta-mesosaprobic species and a peak of alpha-mesosaprobic species (Fig. VIII-5).

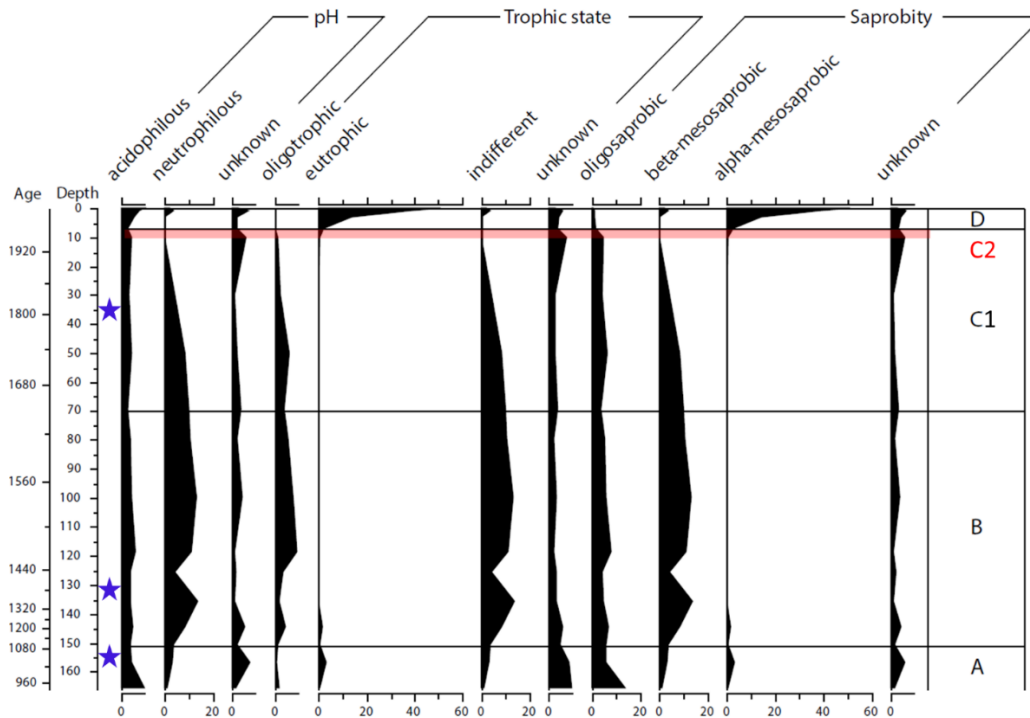
**Table VIII-1:** Results of <sup>14</sup>C dating and historic ages used to establish the chronology for the upperpart of the core

Lab code	Depth (cm)	Age (Historic, <sup>14</sup> C yr BP)	Cal BC/AD (2 σ)	δ13C (‰)	Date type	Material
-	0-1	2020	-	-	Surface	-
-	9,75	1950	-	-	Historic	-
<b>Beta-569687</b>	41-42	200 ± 30	AD 1644 -1950	-25.9 ‰	AMS	Plant remains
<b>DAMS-040240</b>	69-71	301 ± 22	AD 1505-1651	-	AMS	Plant remains
<b>Beta-569688</b>	87-88	420 ± 30	AD 1427-1619	-26.6‰	AMS	Plant remains, charcoal
<b>DAMS-040241</b>	118-119	386 ± 22	AD 1447-1622	-	AMS	Plant remains
<b>Beta-569689</b>	134-135	430 ± 30	AD 1424-1616	-26.3‰	AMS	Plant remains, charcoal
<b>DAMS-040242</b>	149-150	941 ± 20	AD 1036-1158	-	AMS	Plant remains, charcoal
<b>DAMS-038881</b>	162-163	1153 ± 21	AD 775-976		AMS	wood

**Figure VIII-4:** Stratigraphic diagram showing the evolution of the abundance of dominant diatoms species (relative abundances greater than 10 % in at least one sample) in the core of the Rophin wetland. Depth is in cm. The different clusters A, B, C1, C2, D were determined with CONISS and the evolution diatoms community structure. The dates (year cal AD) correspond to mean estimates calculated from the age-model . The mining period (C2) is marked by a red band. Detrital layers removed for data mining are marked by the purple stars



**Figure VIII-5:** Evolution of the ecological status of the dominant diatom species in the core of the Rophin wetland. The mining period is marked by a red band. Detrital layers removed for data mining are marked by the purple stars. Date is in year cal AD and depth in cm.



### Zone B. 151-70 cm, cal AD 1093-1637

This period is associated with peaty sequences that are predominantly silty and thick (Fig. VIII-2). Higher abundances of species belonging to the genus *Aulacoseira* are observed here: *A. alpigena*, *A. ambigua* and *A. islandica*. Continuous decrease of *E. minor* is observed. There some peaks of *A. minutissimum*, *Brachysira brebissonii* R.Ross, *Gomphonema hebridense*, *G. aff. minutum*, *Gomphonema occultum*, *Pinnularia microstauron*, *Pinnularia sinistra* Krammer, *P. alvareziae*. These species are predominantly aquatic or aquatic to subaerial species. A variation of acidophilous, neutrophilous, oligotrophic olisaprobic, beta-mesosaprobic species is observed (Fig. VIII-5).

### **Zone C. 70-7 cm, cal AD 1637-1954**

This zone is divided in two sub-zones. Firstly, the sub-zone C1, from 70 to 11 cm, (cal AD 1637-1924) is associated with variation of species richness. Significant decrease in the abundance of species belonging to the genus *Aulacoseira* was observed simultaneously with the increase in abundance of *E. minor* and *G. occultum*. This sub-zone contains a palustrine sequence of about 20 cm thickness (US12, fig. VIII-2). This sequence is associated with a peak of richness and also with some peaks of *A. minutissimum*, *B. confusa*, *G. hebridense* and *Eunotia incisa*. The presence of siltier peaty sequences in the upper levels of zone C1 (US14, fig. VIII-2) is accompanied by peaks of *Eunotia tenella* (Grunow) Hustedt, *Sellaphora atomoides*, *S. saugerresii* (Desmazières) C.E.Wetzel & D.G.Mann. In this zone, species are mainly acidophilous, neutrophilous, oligotrophic and oligosaprobic to beta-mesosaprobic. Secondly, the subzone C2, from 11 to 7 cm, (AD 1924-1954) starts with a peaty environment which was polluted by a visible whitish layer at 6-10 cm (US15, Fig. VIII-2). This layer is associated with the mining exploitation period.

During this period (C2), there is decrease of *E. minor*, *Fragilariforma virescens* *G. occultum*, *P. alvareziae* and *T. flocculosa*. At 7-8 cm, there is an increase in diatom species richness (Fig. VIII-4 and VIII-6, red band) and in the abundances of *Encyonema silesiacum*, *E. perpusillum* (A.Cleve) D.G.Mann, *Frustulia vulgaris*, *Pinnularia frequentis*, *Pinnularia microstauron* and *Pinnularia subgibba* var. *undulata* Krammer. *P. lanceolatum* appeared slowly in the wetland. In this zone, there is a decrease of acidophilous, oligosaprobic species but the increase of alpha-mesosaprobic.

### **Zone D. 7 to 0 cm, AD 1954-2020**

This zone is described as a palustrine middle (Fig. VIII-2) where there is no species belonging to the genus *Aulacoseira*. *Planothidium lanceolatum* kept increasing in this zone. Between 4 and 3 cm, there are peaks of several species like *E. botuliformis*, *E. aff. pseudogroenlandica*, *E. tenella*, *Gomphenema clavatum*, *G. variscohercynicum*, *Pinnularia sinistra* and *Sellaphora saugerresii*. These species are mainly aquatic to subaerial (Fig. VIII-4 and VIII-6). Then between 2 and 1 cm, there is a decrease of species richness and abundances of *E. aff. pseudogroenlandica*, *E. tenella* and *G. clavatum*. Increase of

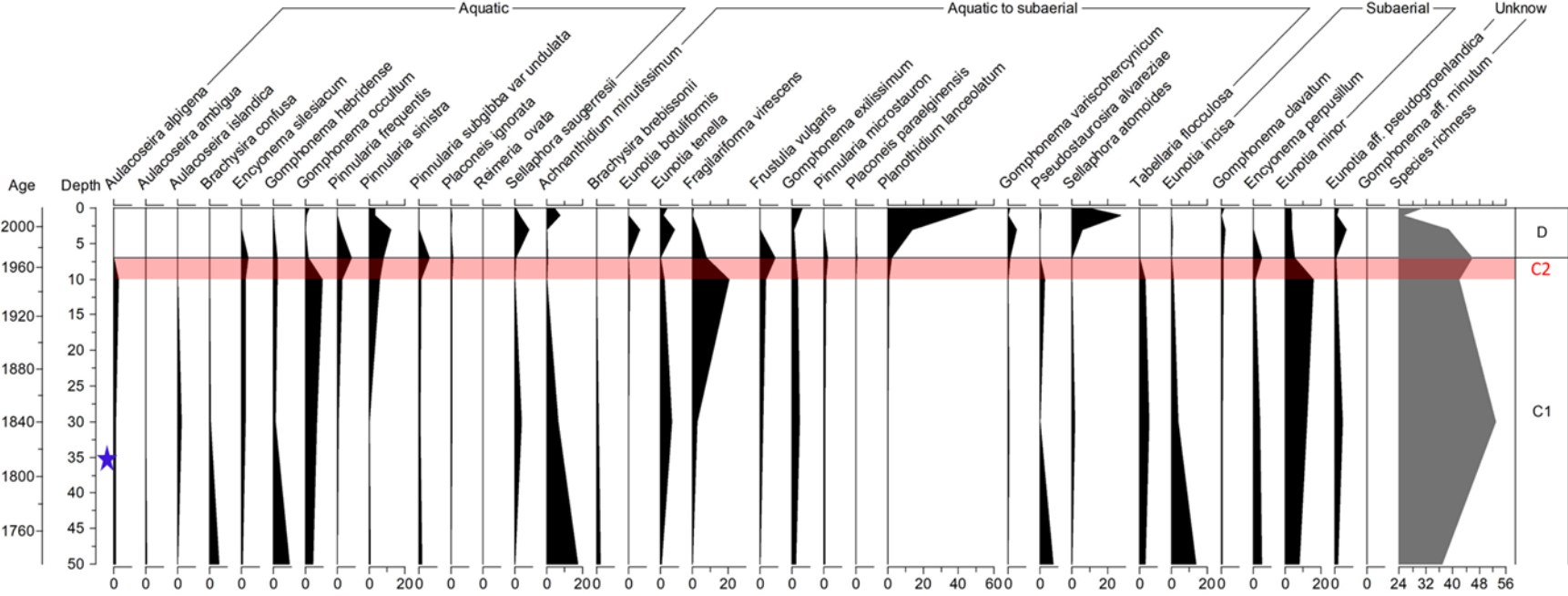
*Achnantheidium minutissimum*, *G. clavatum*, *G. exilissimum* and *Sellaphora atomoides* was recorded. At the surface (1-0 cm) of the core (dated 2020), there was a small increase in diatom species richness. The wetland communities appeared to be composed of *A. minutissimum*, *E. minor*, *E. aff. pseudogroenlandica*, *E. tenella*, *G. clavatum*, *G. exilissimum*, *G. occultum*, *G. variscohercynicum*, *P. sinistra*, *P. lanceolatum*, *S. atomoides* (Fig. VIII-4 and VIII-6). Thus, this zone is associated with an increase of acidophilous, eutrophic and alpha-mesosaprobic (Fig. VIII-5).

### **Influence of mining activity on diatoms community alpha and beta diversity**

The mean of species richness per sample was  $43 \pm 8$  (Fig.VIII-4 and VIII-6). Kruskal-Wallis test showed that there is no difference between the species richness of the zone associated to the active mining or post-period of uranium mining (zone C2 and D) and the pre-mining zones (zones A, B, C1) ( $p > 0.05$ ) despite the continuous decrease in species richness after mining (Fig. VIII-S3).

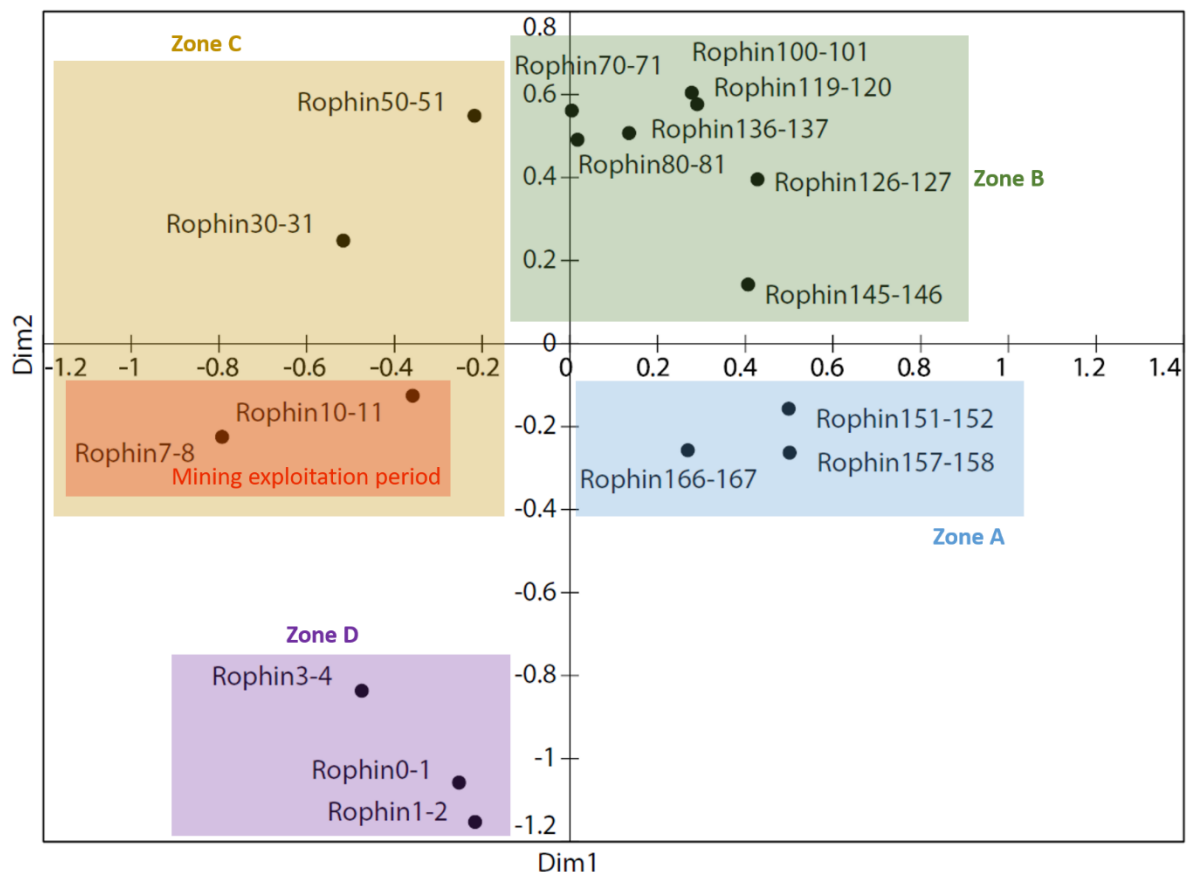
In Figure 7, the results of the nMDS as the distance of the samples based on their diatom community structure is represented in a two dimensional space. The lower right quadrant contains samples Rophin166-167, Rophin157-158 and Rophin151-152 which are part of the zone A. Then, the upper right quadrant contains samples Rophin145-146, Rophin136-137, Rophin126-127, Rophin119-120, Rophin100-101, Rophin80-81 and Rophin70-71 which belong to zone B. Then the upper left quadrant contains the samples Rophin50-51 and Rophin30-31 which belong to zone C (sub-zone C1). The lower left quadrant contains the others from zone C (sub-zone C2) Rophin10-1 and Rophin7-8. The last one sample is associated to the white layer and therefore to the active mining period. Also in this quadrant are grouped the samples that belong to zone D corresponding to the post-mining period, Rophin3-4, , Rophin1-2 and Rophin0-1. Thereafter, the MRPP test showed that there was a significant difference in diatom community structure between the zone associated to the period of uranium mining (zone C2 and D) and the pre-mining zones (zones A, B and C1) with a p-value of 0.001 (Chance corrected within-group agreement A: 0.582, observed delta 0.193 and expected delta 0.462). zones A, B, C1, C2

**Figure VII-6:** Stratigraphic diagram showing the evolution of the abundance of dominant diatoms species (relative abundances greater than 10 % in at least one sample) in the core of the Rophin wetland with a focus on the mining exploitation period. The different clusters C1, C2, D were determined with CONISS and the evolution of diatom structure. The dates (year cal AD) are from 14C estimates. The mining period is marked by a red band. Detrital layers removed for data mining are marked by the purple stars. Depth is in cm.





Indicator species analyses have enabled more precise associations of the diatom species related to the and D (Table VIII-1). The use of these indices allows both dominant and rare species to be taken into account. Only species appearing with a significant p-value for each zone are retained by the calculator. The focus is on the species associated with the active and post-mining period. The active mining period was associated with nine species: *Cavinula cocconeiformis* (Gregory ex Greville) Mann & Stickle in Round Crawford & Mann (p=0.033), *Frustulia vulgaris* (p=0.012), *Fragilariforma virescens* (p=0.001), *Nitzschia terrestris* (p=0.015), *Pinnularia brauniana* (Grunow) Mills (p=0.030), *Pinnularia frequentis* (Petersen) Hustedt (p=0.013). Six species associated with the post-mining period are *Gomphonema productum* (Grunow) Lange-Bertalot & Reichardt (p=0.024), *Meridion constrictum* Ralfs (p=0.042), *Planothidium lanceolatum* (p=0.017) and *Sellaphora atomoides* (p=0.018).



**Figure VII-7:** non-metric multidimensional scaling (nMDS) based on species occurrence and abundances (>1 % in at least one sample) in the sample of the core of Rophin wetland. Distances between samples was calculated with ab.Jaccard. Cluster zone based on

CONNIS results and diatoms species evolution are represented by squares; Blue: zone A, green: zone B, yellow: zone C1, Red: zone C2, purple: Zone D.

### **Actual dominant diatoms species in the stream Le Gorgeat.**

Sixty species were identified in the stream but only 12 were dominant (relative abundance superior to 2 % in at least one sample). The dominant species were *A. minutissimum*, *A. alpigena*, *A. islandica*, *B. brebisonii*, *E. minor*, *E. perpusillum*, *E. botuliformis*, *Planothidium frequentissimum* (Lange-Bertalot) Lange-Bertalot, *P. lanceolatum*, *P. alvareziae*, *S. saugerresii* and *T. flocculosa* (Table VIII-S1).

### **Discussion**

Palaeoecological results obtained in the Rophin wetland allow to study the evolution of diatom communities during the last ~1100 years. This comprises the uranium mining period of Rophin, which allows us to assess the impact of the mining on the diatom community.

### **The core provided access to over 100 years of site history**

The lithostratigraphic analysis of the Rophin wetland's core shows that the wetland is generally a peaty environment with different concentrations of organic matter. There are some palustrine sequences and detrital deposits brought by the flooding of the Gorgeat stream which crosses the site. Peat bogs are excellent archives of paleoecological information (Cubizolle et al., 2004). The white layer indicated as a marker of the exploitation period, as indicated in Martin et al. (2020), was found in the Rophin wetland core between 6-10 cm (US 15 in fig 2). The white layer could have spilled into the wetland during a flood or by slow sedimentation in a layer of mining materials. The potential origin of these deposits correlates with ore bodies containing kaolinitic clays, poor operation and maintenance of settling ponds and turbid white water in the Gorgeat and the surrounding streams. This layer was associated with a gamma radiation of 1050

nSv.h<sup>-1</sup> and uranium concentrations up to 1855 mg.kg<sup>-1</sup> (Martin, 2020). Thus, we consider that the diatom communities observed in this layer at 6-10 cm correspond to diatom community contemporary with the operation of the mine. The layers above this white layer therefore correspond to periods after the mine operation.

## **Fossil diatoms communities testify the evolution of the wetland**

### **Zone A, cal AD 938-1093**

This zone covers the Medieval Warm Period (MWP). There is 155 years accumulated in this area. The basal part of Zone A is dominated by the aerophilic species *Eunotia minor* (Van Dam et al., 1994). This species is known to live in oligotrophic environment with low conductivity and rich in humic acids (Lange-Bertalot et al., 2011).

Furthermore, change of water level seems to be particularly marked at 157-158 cm where there are peaks of abundances of some aquatic to subaerial species such as *Gomphonema exilissimum*, *Placoneis ignorata*, *P. paraelginensis*, *P. lanceolatum*, *P. alvareziae*, *T. flocculosa* (Denys, 1991; Van Dam et al., 1994). Moreover, some of them are associated with eutrophic streams or toleration organic pollution also, such as *P. ignorata*, *P. paraelginensis*, *P. lanceolatum* (Bey, 2013; Lange-Bertalot et al., 2017) and indicators of water flow. The presence of these last three species could be associated to rainfall events and/or winter. The decrease of *Fragilariforma virescens*, *Gomphonema variscohercynicum* until 157-158 cm and their increase until the end of the zone gave supplementary informations. *F. virescens* preferred aerial environments (Lange-Bertalot et al., 2017) while *G. variscohercynicum* is found in peat bog.

At the end of this zone, there is an increased abundance of the planktonic *A. islandica*, and of aquatic species such as *Encyonema silesiacum*, *Gomphonema clavatum* and *G. occultum*. This seems to illustrate the slow increase of water quantity and eutrophication in the wetland. Indeed, *A. islandica*, which is mainly found in lakes (Krammer, 2000a), was also dominant in the area of a lake affected by eutrophication (Vokueva & Denisov, 2021). *E. silesiacum* can tolerate eutrophication in lakes or rivers (Pardo, 2018; Soares, 2007) and

was proposed as an indicator of the ecological states in agricultural eutrophic rivers (Lu et al., 2020). *G. clavatum* is recorded in freshwater with a broad range of variables and also in eutrophic freshwater (Lange-Bertalot et al., 2017). *G. occultum* is found in lakes and running water and also found in eutrophic lakes (Lange-Bertalot et al., 2017). Additionally, *Reimeria ovata* decreased in this zone. This species is known to be associated to oligotrophic waters.

Thus, this suggests between years 940 to 970 the wetland was in rather dry state. Between 970 to 1033, there was a very wet state. Finally, between 1069 and 1093 there was a peaty state, probably with some water spots. A major flood event in the streams of the watershed area appears to have taken place between 1045 and 1057. Moreover, qualitative pollen assessment performed within this zone at 166 and 151 cm-depth suggests the presence of an open woodland environment dominated by beech) and alder (A. Ejarque, personal communication). The latter likely indicates the local presence of a well-developed riparian forest within the wetland catchment area, which is in agreement with the documented increase of water level in this zone. This combination of beech and alder was also documented during the medieval period in a peat bog pollen record from the nearby Livradois-Forez region (Fassion, 2013). Due to the topography of the site inducing a narrow river mobility area, the stream Le Gourgeat must have been more or less in the same place. The stream influenced since this period the studied wetland as underlined by the layers of sand linked to flood.

### **ZONE B, 151-70 cm, cal AD 1093-1637**

This zone is dated from 1093 to 1637. It covers 544 years of history spanning the Late Medieval and Modern periods, and from the end of the MWP (1300) to the Little Ice Age period (LIA). Cooling happened in phases, with an initial drop around 1300 AD and an even colder climate starting around 1560 AD and lasting until 1850 AD (Francou & Vincent, 2010). There is also an increase in rainfall during this period, which increases the flow in the rivers, and probably also the frequency and strength of floods. Globally, this zone is particularly marked by the presence of planktonic species belonging to the genus *Aulacoseira* such as *A. alpigena*, *A. ambigua*, *A. islandica*. These species are mainly found

in lakes. *A. alpigena* could also be found in peat bog and river (Péterfi, 1974; Falasco and Bona, 2011; Herlory et al., 2013; Rodriguez et al., 2022). The variation in abundances of *Pseudostaurosira alvareziae* and *Eunotia minor* suggests hydric fluctuations in the wetland. The amplitude of *Aulacoseira* species seems to indicate a high depth of water in the wetland, may be the maximum level of water known in this area. Also, stagnant water thickness of about 10 cm have already been observed in this area, notably in winter. The presence of *Aulacoseira* could also indicate long period of ice covering in the wetland (Rühland et al., 2008; Garcés-Pastor et al., 2016). Indeed, this period of high abundance of *Aulacoseira* and of decrease of *E. minor* could be associated to the LIA. Peaks of *Achnantheidum minutissimum*, *Brachysira brebisonii* and *G. hebridense* could be associated with inputs of the streams of the watershed. *Gomphonema occultum* is found in lakes or running waters and also in peat bog (Vidaković, 2015). The variations of its abundances and the co-occurrence of *A. islandica* and *E. silesiacum* could be linked to the level of eutrophication of the wetland. At about 1440, there could be a resilience period with the development of *P. sinistra* and *P. microstauron*. These two species prefer oligotrophic and oligosaprobic, acidic water with low mineral content (Krammer, 2000). Moreover, qualitative pollen assessment performed at 119 (cal AD 1470) and 80 cm-depth (cal AD 1608) indicate the existence of an open anthropized environment dominated by grasses and heather shrublands with the recording of cultivated pollen taxa, mainly cereals. Finally, flooding events also occurred resulting in detrital inputs to the wetland as suggested by the diatom analyses.

### **ZONE C, 70-7 cm, cal AD 1637-1954**

The beginning of this period is associated with the end of the LIA. The presence of a palustrine zone (C1) in the core and the peaks of abundances of *A. minutissimum*, *B. confusa*, *G. hebridense* and *Eunotia incisa* as well as the decrease in abundances of species belonging to the genus *Aulacoseira* indicate that the amount of water in the wetland has decreased to a low level. A large detrital input at the 36-35 cm level is evidence of an important flood event and the input from the watershed. The transition to a siltier peaty area is also accompanied by stream species such as *Sellaphora atomoides*, *S. saugeressi* and seems to show also the influence of the stream on the wetland. Then, the period of

exploitation of the mine marked by the white layer seems to have slightly enriched the environment in diatom species (notably in rare species). This may be related to the input of ore from other mining sites into the wash plant or for some other reason. The influence of the stream (increase in *P. alvareziae* and *Pinnularia subgibba* var. *undulata*) and a general decrease in the water table in the wetland suggested by the increase in *E. minor* and *F. virescens* is also observed. Interestingly, *P. lanceolatum* is a running water species but this species is also known in the literature to be tolerant to metals (Sbihi et al., 2012; Sbihi et al., 2014; Cichoń, 2016; Morin et al., 2017; Pocięcha et al., 2020) and to herbicides (Roubeix et al., 2011; Cichon, 2016; Wojtal & Sobczyk, 2012). Its appearance in the wetland corresponds to the presence of the white layer where uranium quantities of up to 1855 mg.kg<sup>-1</sup> have been measured.

#### **ZONE D, 7 to 0 cm, 1954-2020**

The post-mining period also seems to be marked by the influence of the stream, particularly with the presence of *A. minutissimum*, *P. lanceolatum*, *S. saugeressi* and *S. atomoides*. The change in abundance of dominant species in the 1-2 cm level could correspond to the periods of rehabilitation of the site as it is dated between 2002 and 2010 (with an error  $\pm 5.5$  years). As mentioned above, the dominant species seem to indicate the influence of the stream in the wetland. However, the strong decrease in species richness seems to indicate a disturbance of the environment. Also, there are acidophilic species like *E. botuliformis* and species tolerant to metal pollution (*A. minutissimum* and *P. lanceolatum*) and eutrophication (*G. clavatum* and *P. lanceolatum*). There is still an input of uranium ore in the waters of the Gourgeat stream which is altered by the effluent discharged from the ICPE, but the concentrations are lower than those discharged over the last 50 years (Martin et al., 2020).

The comparison of the dominant species present in the stream such as *A. minutissimum*, *A. alpigena*, *A. islandica*, *E. minor*, *E. perpusillum*, *P. lanceolatum* and *P. alvareziae* confirms the previous analyses that show that the stream Le Gourgeat has an influence on the wetland and its taxonomic composition.

## **Influence of mine operations on the species richness of diatom communities**

The Kruskal-Wallis test does not confirm the hypothesis of an effect of uranium mining on diatom species richness because of the non-significance of the result. These results are in accordance with those of Herlory et al. (2013) which show that actual diatoms species richness was not affected by the release of uranium mining effluents in the Ritord. However, Shuryak et al. (2018) suggest that diatom richness in some radioactive waterbodies of Russia can be greatly reduced by high radiation levels.

The MRPP analysis indicates that there is a difference in community structure between the different zones for the pre-mining, active and post-mining periods, and didn't invalidate the hypothesis of that uranium mining has had negative or positive consequences on the structure of diatom communities. The focus was on indicator diatoms related to the active and post-mining periods. Not only the radioactive effect but also the hydro-geomorphological functioning of the area could induce community modifications. Indeed, the diatoms associated with these two large areas seemed to mostly indicate an inflow and the level of the body table/underground water into the wetland from the Le Gourgeat stream. However, among the diatoms associated with zone C2 (active mining period), several species of acidophilic diatoms such as *Frustulia vulgaris*, *Pinnularia brauniana*, or neutral to acidophilic diatoms such as *Cavinula cocconeiformis*, *Fragilariformis virescens* are found (Van Dam, 1994; Czarnecki, 1997). *Fragilariformis virescens* appeared in streams with organic and metallic pollution (Bere, 2016). Also, this genus was also recognised in stream impacted with acid mine drainage (Schowe, 2012). This may suggest an acidification of the environment due to the release of effluents from the mine (contents of the ponds, etc). Indeed, mine tailings contain radioactive elements such as uranium, radium and their descendants, but also heavy metals which, when released into rivers or groundwater, can cause acidification of the water in the environment (Abdelouas, 2006). As mentioned above, zone D appears to be particularly impacted by the presence of diatoms indicative of water flow, i.e. a change in water level in the wetland. However, the results also show that the heavy metal tolerant species *Planothidium lanceolatum* is particularly associated with the post-mining period although this species appears during the active mining period. This species may be a potential

indicator of wetland pollution from uranium mining on the site. Thus, it should be noted that the impact of the mine had not an important effect on the diatom community structure in the Rophin wetland. This low level of impact may be related to the 8-years duration of the Rophin mine, suggesting the importance of the time factor in the anthropogenic disturbance of a natural environment. Furthermore, in his study of several aquatic environments (streams, rivers, ponds) affected by acid mine drainage, Benette (1969) shows that the most polluted environments do not have a higher diatom richness than less polluted environments. It is observed that species present in polluted environments are also found in unpolluted habitats. This suggests that diatoms are highly adaptable to radionuclides and heavy metals. Also, Garcia-Balboa (2013) argues that the modification of a watershed affected by mining effluents constitutes a selection pressure for microalgae communities. They observe the selection of more uranium tolerant species and offspring. But this pressure will also lead to the genetic modification of populations. Indeed, microalgae quickly adapted to the presence of effluents from uranium mining, but this adaptation was not physiological. It was the presence of rare spontaneous mutations produced before exposure to the effluents that allowed certain populations to remain in the environment. At our level of study, it is not possible to study the influence of the mine operation at the level of species populations. However, the use of genetic tools and methods to study fossil samples will help to answer this new question.

## **Conclusion**

The evolution of the diatom communities in the Rophin wetland, located downstream of the Gourgeat stream watershed, reflects the influence of the watershed on the wetland through changes in the water table and the presence of local and / or regional anthropogenic activities (cultivation, grazing). The impact of the exploitation of the Rophin mine does not seem to have had a strong impact on the local diatom communities. Indeed, no significant differences in diatom species richness following the mining period could be statistically proven. While changes in community structure were determined, the species associated with these post-mining structures are not markers of a highly disturbed environment. Only one heavy metal tolerant species is associated with the active and post-



mining periods, *Planothidium lanceolatum*. The low impact of uranium mining activity may be due to the short period of mining and the high adaptability of diatoms.

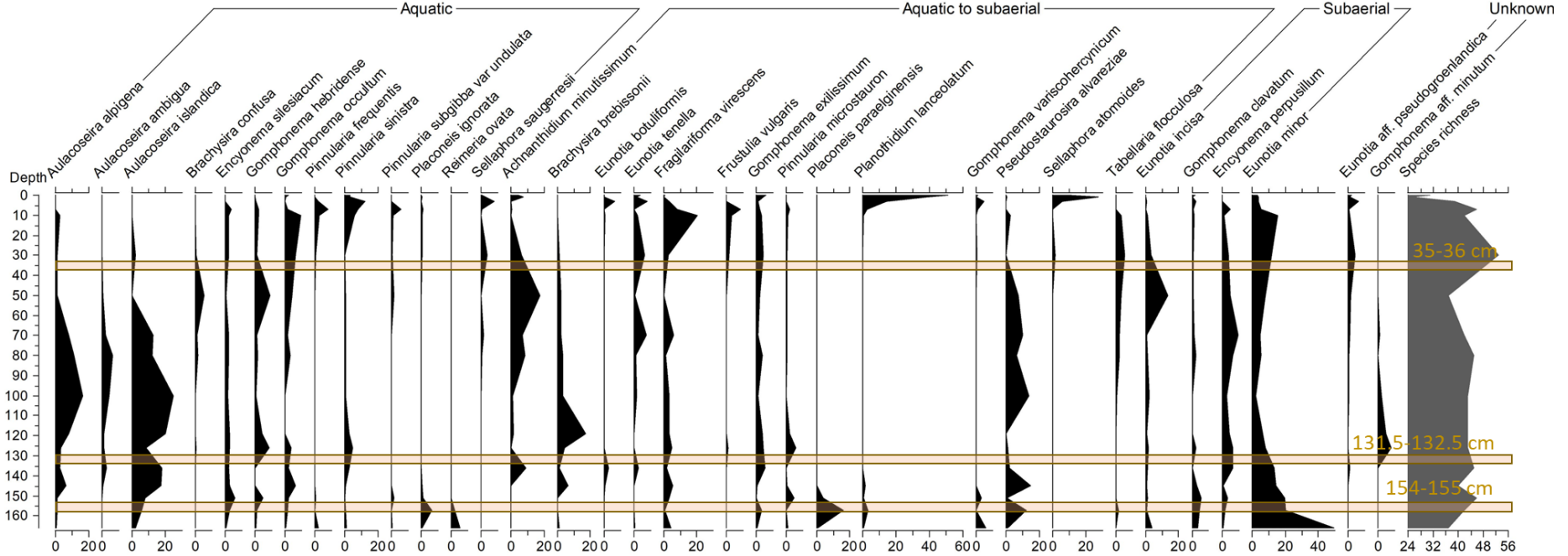
### **Acknowledgements**

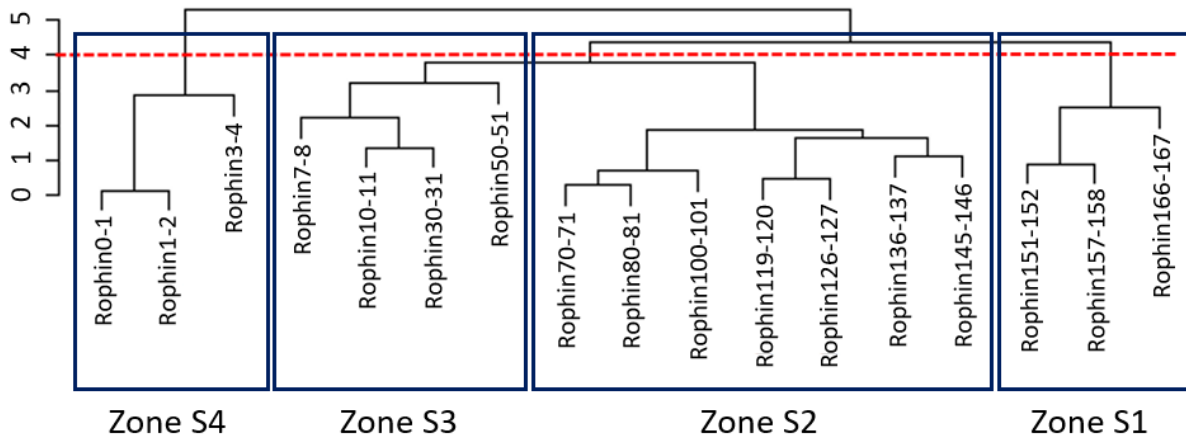
We thank Alexis Martin for its expertise and the information that he provided to better understand the functioning of the wetland and the potential impact of the mining exploitation.

### **Funding sources:**

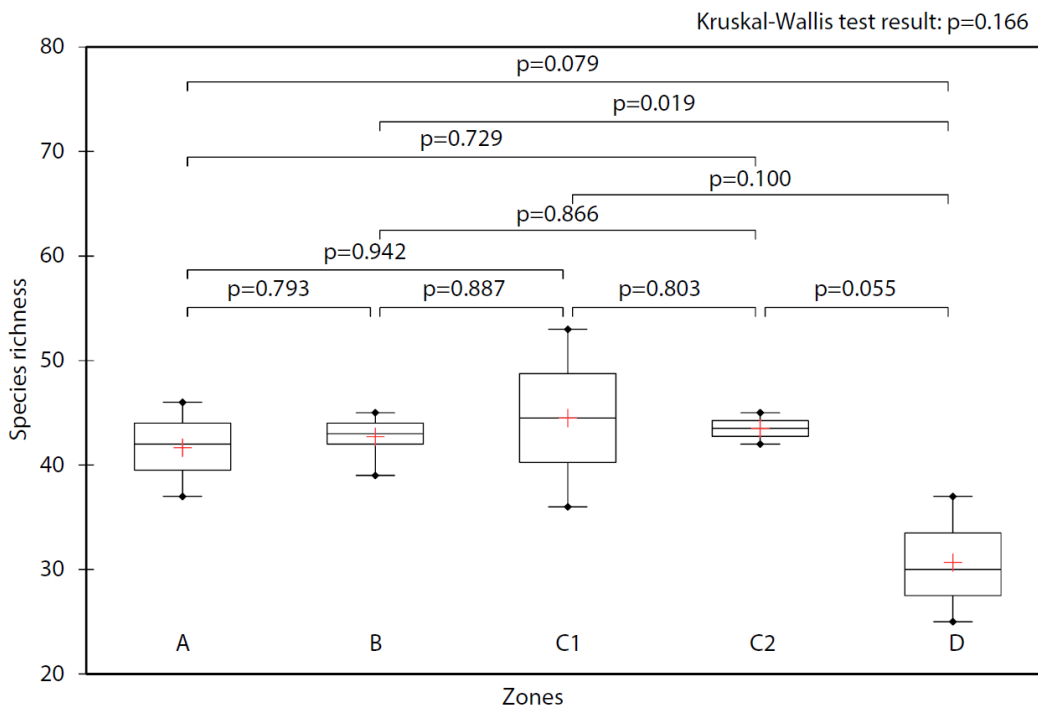
This study was funded by a grant from the Centre National de la Recherche Scientifique (NEEDS, project Acronym: DISCOVER) including a CNRS doctoral grant for L.A. BAKER. We acknowledge financial support from CNRS-INEE within the context of the Zone Atelier Territoires Uranifères.

**Figure VII-S1:** Stratigraphic diagram showing the evolution of the abundance of dominant diatoms species (relative abundances greater than 10 % in at least one sample) in the core of the Rophin wetland. Samples with significant detrital input are marked by rose band. The dates are from <sup>14</sup>C estimates. Date is in year cal AD and depth in cm.





**Figure VIII-S2:** Cluster of samples determined by CONISS based of the dominant diatom species (relative abundances greater than 10 % in at least one sample) in the core of the Rophin wetland.



**Figure VIII-S3:** Result of the Kruskal-Wallis test on the diatom species richness of samples belonging to zones A, B, C1, C2, D. Zone C2 represents the mining period and zone D, the post-mining period.



## **Chapitre IX : Discussion et perspectives**

### **1. Bilan de l'ensemble des chapitres de la thèse**

Les travaux de la première partie de ma thèse ont consisté à déterminer si les bruits de fond radioactifs renforcés par l'activité hydrogéochimique des sources minérales ont un effet sur les différents paramètres écologiques (richesse spécifique, composition taxonomique et structure) caractérisant les communautés de diatomées.

#### **1.1. Influence du substrat sur la richesse, la composition taxonomique et la structure des communautés de diatomées**

Les substrats à proximité de l'émergence des sources minérales dépendent de leur configuration. Nous devons donc en préambule déterminer si l'échantillonnage du substrat dominant pouvait influencer les communautés de diatomées dans les sources étudiées et potentiellement créer un biais lors des analyses concernant l'influence de la radioactivité. En effet, le substrat peut avoir une influence sur les communautés de diatomées. Selon Round (1991), les espèces peuvent présenter une meilleure adaptation à certains substrats plutôt qu'à d'autres. Cependant, Sullivan (1982), Millie & Lowe (1983), O'Quinn & Sullivan (1983) ont démontré le contraire. C'est donc dans ce contexte que nous avons étudié l'influence du substrat sur la richesse, la composition taxonomique et la structure des communautés de diatomées avant de commencer l'échantillonnage des sources minérales retenues dans ma thèse. Les résultats de cette étude ont été présentés dans le chapitre III (pages 69-90).

Dans la littérature, peu d'études se sont intéressées à l'influence du substrat sur les communautés de diatomées dans les sources minérales (Cantonati et al., 1998; Cantonati et al., 2009; 2012b; Wojtal & Sobczyk, 2012; Lai et al., 2019b). De plus, ces études ont abouti à des conclusions contradictoires. Lai et al. (2019b) ont rapporté qu'il y avait des différences de structure entre les communautés de diatomées ayant colonisées des pierres, des graviers ou des sédiments de sources thermo-minérales italiennes. A

contrario, Cantonati et al. (1998) n'ont mis en évidence aucune différence significative entre les diatomées habitant sur les pierres ou les graviers de sources du sud des Alpes. Enfin, Cantonati et al. (2009) ainsi que Wojtal & Sobczyk (2012) ont comparé l'importance de l'influence du substrat sur les communautés par rapport à d'autres facteurs abiotiques dans les sources d'Italie et de Pologne. Ces deux dernières études montrent que l'influence du substrat est négligeable par rapport à celle des paramètres environnementaux tels que les paramètres physico-chimiques (pH, salinité, etc.). Dans le chapitre III (pages 69-90), nous avons démontré, grâce au suivi, pendant une période de 18 mois des communautés de diatomées épipéliques et épilithiques de deux sources minérales (Montagne et Mariol), que le substrat a une influence négligeable sur la structure des peuplements par rapport à la localisation géographique (conditions environnementales locales). Ces résultats sont en accord avec ceux de Cantonati et al. (2009) et Wojtal & Sobczyk (2012).

Cependant, concernant la richesse, deux résultats distincts ont été obtenus. À Mariol, aucune différence significative entre la richesse des communautés épipéliques et épilithiques n'a été mise en évidence tandis qu'à la Montagne, les communautés épilithiques étaient significativement plus riches que les épipéliques. Dans la littérature, les communautés de diatomées épilithiques sont généralement moins riches que les communautés attachées à des substrats non indurés (Cantonati et al, 1998; Cantonati & Spitale, 2009; Lai et al., 2019b).

La source Montagne est une source de faible débit et il apparaît, grâce aux données physico-chimiques et météorologiques, que cette émergence est affectée ponctuellement par un phénomène de dilution. En effet, située dans un thalweg, les précipitations sur le bassin versant vont se concentrer et créer un ruisseau temporaire qui va perturber l'émergence en induisant des changements de hauteur d'eau dans l'ancien bâtiment d'embouteillage de la source et en perturbant le sédiment. Ces événements en font une source avec des conditions physiques et chimiques instables contrairement à la source située à Mariol (cf. description dans le chapitre II, pages 47-68). Ainsi, ces observations ont conduit à l'hypothèse selon laquelle, les perturbations abiotiques pouvaient induire des différences significatives de richesse entre les communautés épilithiques et

épipéliques. A l'inverse, dans des conditions physico-chimiques relativement stables comme à Mariol, le substrat n'a pas d'effet sur la richesse en espèces de diatomées.

En conclusion, échantillonner le substrat dominant dans les sources n'introduira pas de biais méthodologiques et statistiques pour étudier l'influence des variables physico-chimiques et principalement de la radioactivité sur les communautés de diatomées dans les sources minérales. Cette question de l'influence des faibles bruits de fond radioactifs sur ces micro-algues, comme organisme modèle, demeure l'une des questions centrales de la thèse.

## **1.2. Influence du bruit de fond radioactif naturel sur les différents paramètres de diversité des communautés de diatomées des sources minérales**

La radioactivité est un facteur de stress parmi d'autres facteurs abiotiques ou biotiques en interaction dans les écosystèmes aquatiques. Pour comprendre l'effet de la radioactivité sur les paramètres écologiques (richesse, composition taxonomique, structure) des communautés de diatomées, il est nécessaire de comprendre l'importance et le potentiel effet de chacun des facteurs abiotiques individuellement.

Dans les sources, il y a plusieurs émetteurs de radioactivité : ce sont les radionucléides appartenant aux chaînes de l'<sup>238</sup>U, de l'<sup>235</sup>U et du <sup>232</sup>Th. Dans les chapitres IV et V, l'effet de l'activité de ces radionucléides sur les communautés de diatomées a été déterminé statistiquement.

Dans le chapitre IV (pages 91-116), nous nous sommes intéressés à l'influence de la radioactivité naturelle (NORM) présente dans l'eau et les sédiments, sur les communautés de diatomées benthiques des sources via une approche de Metabarcoding. Cette étude est novatrice car elle est la première à utiliser une approche génétique (Metabarcoding) pour étudier l'effet des rayonnements ionisants sur la structuration des peuplements. Jusqu'ici seule l'approche morphologique avait toujours été utilisée dans ce but (Snoeijs & Notter, 1993; Herlory et al., 2013; Millan et al., 2020 ; Zotina, 2021).

Notre étude se base sur les sources échantillonnées lors de la première campagne en 2019. Parmi les sources étudiées dans ce chapitre, les radionucléides présentant les activités les plus élevées dans l'eau des sources était l' $^{238}\text{U}$  (dans l'eau), et dans les sédiments: le  $^{226}\text{Ra}$ , le  $^{210}\text{Po}$  et l' $^{228}\text{Ac}$ . L'effet de chaque radionucléide a été testé parmi d'autres facteurs environnementaux tels que la température, le pH, les concentrations de différents ions majeurs, la localisation géographique des sources, etc. Nous avons mis en évidence qu'aucune de ces variables physico-chimiques ou radiologiques n'avait d'effet sur la richesse en amplicons variant de séquences (ASV) des communautés. Ce travail n'a pu être confronté avec des études de la littérature car ce travail est inédit en sources minérales. En effet, les études disponibles sur l'impact de la radioactivité sur la richesse de communautés d'organismes vivant dans des milieux aquatiques se concentrent sur l'impact d'accident nucléaire. Ainsi, Videvall et al. (2022) n'a observé aucune différence de richesse en espèces procaryotes dans les zones humides de Tchenobyl et Murphy et al. (2011) n'ont pas constaté d'effet sur les communautés de macroinvertébrés de lacs exposés aux radiations dérivées de Tchenobyl. Il est cependant intéressant de noter que ces études constatent pareillement l'absence d'effet sur la richesse des communautés d'organismes de différents niveaux trophiques. Dans un autre contexte, Herlory et al. (2013) a montré que les effluents miniers d'uranium n'ont pas eu d'effet sur la richesse en diatomées.

Concernant les communautés, l' $^{238}\text{U}$  était le deuxième facteur qui explique significativement leur structure après la localisation géographique. Nos résultats vont donc dans le sens d'autres études portant sur des procaryotes et des bactéries. En effet, à l'échelle des biocénoses, plusieurs études démontrent l'influence de l'uranium sur la structure des communautés de procaryotes dans des environnements aquatiques (Reardon et al., 2004; Sutcliffe et al., 2017 ; Suriya et al., 2017 ; Zeng et al., 2018 ; Chuiyun et al., 2021 ; Videvall et al., 2022) et des bactéries de sol (Islam, 2011 ; Mondani, 2011). De plus, des études sur les interactions entre l'uranium et les micro-organismes ont permis de constater que l'uranium en tant que métal lourd est toxique pour les micro-organismes en raison de sa capacité à endommager l'ADN et à réduire les activités enzymatiques (IRSNc, Sheppard et al., 1992). Nous pouvons donc supposer que dans les communautés diatomiques vivant dans les sources radioactives, les espèces présentes sont celles qui se sont adaptées à ces conditions grâce à des mécanismes de résistances (Reisz et al.,



2014; Debousky et al., 2015; Jung et al., 2017). Cette hypothèse est renforcée par la présence de deux variants de séquences appartenant à *Planothidium frequentissimum*. Ces variants ne sont pas distribués de façon similaire dans les sources. Ce résultat fait écho aux études de Pérez-Burillo et al. (2021) et Andersson et al. (2021), qui suggèrent que des variants génétiques d'une même espèce peuvent avoir des préférences écologiques différentes. Cette espèce est un potentiel bioindicateur de la présence de  $^{238}\text{U}$  et de  $^{222}\text{Rn}$ .

Etant donné que les peuplements de diatomées se développent dans les émergences depuis des millénaires (Rihs et al. 2000), ils sont donc exposés de façon chronique à la radioactivité renforcée. Ainsi, le résultat obtenu (ADONIS :  $R^2=38.59\%^*$ ) indique que, malgré l'exposition des communautés de diatomées à la radioactivité (ici,  $^{238}\text{U}$ ) depuis de longues périodes de temps dans les sources, ce bruit de fond naturellement renforcé a toujours une influence sur la structure et notamment la diversité des communautés.

Les travaux présentés dans le chapitre V (pages 121-154) ont permis de comprendre que la radioactivité à travers l'activité en  $^{222}\text{Rn}$  des sources minérales a plus d'impact sur la richesse, la composition taxonomique et la structure des communautés de diatomées que certains facteurs géochimiques. Les facteurs géochimiques testés étaient le faciès, l'origine de l'eau (en lien avec le principal phénomène postérieur à la circulation profonde comme le mélange avec les eaux de surface), le total de solides dissous (TDS) et la température. Cette étude est basée sur les données des sources échantillonnées lors de la seconde campagne d'échantillonnage en 2020 et sur l'analyse morphologique des communautés.

Au regard des résultats obtenus, il existe une différence significative de richesse spécifique entre les sources avec des niveaux d'activité  $^{222}\text{Rn}$  faibles et élevés. Les sources possédant une activité en  $^{222}\text{Rn} > 1000 \text{ Bq.L}^{-1}$  avaient une richesse spécifique moyenne plus forte que celles avec une activité faible. Ce résultat est à considérer avec précaution car il est lié au poids statistique de la source La Montagne, qui possède la plus forte activité en  $^{222}\text{Rn}$  ( $3746,4 \text{ Bq.L}^{-1}$ ) et la richesse en espèces la plus élevée parmi les sources étudiées dans ce chapitre. Ce résultat est aussi contre-intuitif car une richesse moins importante dans la source Montagne que dans les autres sources aurait semblé plus logique au vu des

effets néfastes de la radioactivité à dose élevée sur les cellules. Cependant dans cette source, l'adaptation des organismes et la sélection d'espèces adaptées à de forte concentration en  $^{222}\text{Rn}$  sur le long terme peut expliquer nos observations.

Dans ce chapitre, il est important de remarquer que lorsque l'on a déterminé la contribution des différents facteurs dans la variabilité de la structure des communautés de diatomées, la température et la concentration en TDS étaient les deux facteurs qui expliquaient le mieux la distribution des espèces. L'activité en  $^{222}\text{Rn}$  est le troisième facteur qui explique cette distribution. Cependant, lorsque l'on a considéré l'abondance des espèces, et non seulement leur occurrence, l'activité en  $^{222}\text{Rn}$  est le meilleur facteur parmi les facteurs testés expliquant la variabilité de la structure des communautés.

Cette analyse est très originale car elle est la première à coupler la radioactivité naturelle, la géochimie et les communautés de diatomées des sources minérales. Dans la littérature, les études avaient porté seulement sur l'influence de facteurs physico-chimiques tels que la température ou le pH sur les peuplements de diatomées dans les sources (Celekli et al., (2007); Roy et al., (2011); Jonker et al. (2013); Massello et al. (2020); Lai et al, (2022); Wagaw et al., (2022)). Les résultats du chapitre V confirment que la radioactivité (i.e.  $^{222}\text{Rn}$ ) a un effet important sur la structure des communautés et particulièrement sur les abondances des espèces. Ces résultats confirment ceux de Nayak et al. (2021) qui observait que le radon était un paramètre qui pouvait influencer les communautés microbiennes d'eaux souterraines présentant des activités en radon naturellement élevées.

L'espèce *Planothidium frequentissimum* est également statistiquement associée aux sources avec les concentrations d' $^{238}\text{U}$  élevées (cf. Chapitre IV, pages 91-116). Cependant, outre cette espèce, *Crenotia angustior* et *Sellaphora labernardierei* apparaissent également associées aux eaux avec les concentrations les plus élevées en  $^{222}\text{Rn}$  (Chapitre V, pages 121-154). Dans la littérature, il n'y a pas de données sur la tolérance à la radioactivité ou aux métaux lourds des espèces citées et aucune d'entre elles n'a été associée à des concentrations élevées de radioactivité. Ainsi, les chapitres IV et V ont permis de démontrer que l'espèce *Planothidium frequentissimum* est associée aux sources ayant les activités les plus élevées en  $^{238}\text{U}$  et en  $^{222}\text{Rn}$ , confirmant que ce taxon peut être un

bioindicateur de ces deux éléments. De plus, Millan et al. (2020) avaient démontré que cette espèce présentait des taux significativement élevés d'individus ayant un frustule déformé en corrélation avec la radioactivité ( $^{222}\text{Rn}$ ).

Parmi les sources étudiées, nous avons retenu la source de la Poix, curiosité géologique. Les particularités de cette source (forte conductivité, salinité élevée, remontées bitumineuses) la font apparaître comme un milieu insulaire complètement à part des autres sources minérales. Afin de valoriser nos résultats, nous avons choisi de publier les observations que nous avons faites sur la physico-chimie et sur la biodiversité diatomique dans un article dédié à ce site exceptionnel.

### **1.3. La source de la Poix : un milieu extrême peu radioactif**

Cette source est apparue comme un cas particulier, peu radioactive dissociée des autres sources dans les analyses statistiques. Les valeurs élevées des paramètres environnementaux impliquent que l'échantillon de La Poix a un poids très important dans les analyses statistiques et est considérée comme un point extrême. De fait, cette source a été retirée du jeu de données global. En effet, la chimie est extrême (conductivité variant entre 46000 et 123000  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) et les communautés de diatomées halophiles sont typiques des milieux côtiers pour la majorité d'entre elles. Dans le chapitre VI (pages 155-174), la source de la Poix a montré une richesse spécifique relativement élevée avec 11 taxons observés au cours de la campagne 2019 et 26 taxons en 2020. Nous avons comparé ces résultats avec ceux d'une campagne réalisée en 2017 (A. Beauger, communication personnelle). Les espèces dominantes étaient principalement dominées par des espèces marines (de milieux côtiers ou estuariens) ou d'eaux saumâtres et appartenaient aux genres *Navicula* et *Nitzschia* retrouvés dans ces environnements (Barnes, 1989). Ces espèces sont *Navicula meulemansii*, *N. salinarum*, *N. salinicola*, *N. veneta*, *Nitzschia* aff. *liebethruthii* auxquelles nous pouvons ajouter *Crenotia thermalis*. En raison de leur milieu de vie, ces espèces maintiennent une grande capacité d'adaptation aux fortes concentrations et fluctuations de salinité qui pourraient être le résultat d'une capacité bien conservée de résistance aux stress ioniques et osmotiques.

Afin de compléter cette thèse, nous avons profité des compétences présentes aux LMGE et de l'opportunité de pouvoir utiliser le cytomètre en flux du LMGE afin d'étudier d'autres organismes présents dans les sources à savoir les virus et les procaryotes. Cette étude complète celle des diatomées car les virus et les procaryotes ont été prélevés dans la tranche d'eau sans lien avec le biofilm et les bénéfiques que les organismes s'y développant en retirent.

#### **1.4. Ouverture de l'étude biologique de l'effet de la radioactivité naturelle par l'activité hydrochimiques des sources sur d'autres acteurs des communautés microbiennes : les virus et les procaryotes**

Après avoir étudié les communautés de diatomées, nous nous sommes intéressés dans le chapitre VII (pages 175-194) à l'influence de la radioactivité sur les virus et les procaryotes dans les sources minérales. A travers cette étude, les abondances des procaryotes et des virus ont été mesurées dans les sources minérales. Les analyses ont montré que la radioactivité (rayonnement  $\gamma$  et  $^{222}\text{Rn}$ ) avait un effet négatif sur l'abondance des virus, particules « inertes » ne pouvant pas réparer leur ADN. Aucun effet de la radioactivité n'a été mesuré sur l'abondance des procaryotes dans les sources minérales étudiées. Etant donné que les seules études démontrant l'influence de l'uranium ont porté sur la structure des communautés procaryotes ou bactériennes dans des environnements aquatiques, nous n'avons pas pu comparer nos résultats avec la littérature (Reardon et al., 2004; Sutcliffe et al., 2017 ; Suriya et al., 2017 ; Zeng et al., 2018 ; Chuiyun et al., 2021 ; Videvall et al., 2022). Cette étude est la première portant sur les virus dans les sources minérales radioactives.

Ainsi, si les diatomées sont influencées par la radioactivité, d'autres acteurs des écosystèmes, que sont les virus, sont influencés par ce facteur de stress. En parallèle de nos études, une thèse en cours se concentre sur l'influence de la radioactivité sur les communautés bactériennes dans les sources (Thèse de Guillaume Holub, CENBG, Bordeaux).

Pour compléter ce travail, nous avons étudié l'effet de faibles bruits de fond radioactifs renforcés par une activité humaine (TE-NORM) sur les peuplements de micro-algues. Pour ce faire, nous avons concentré notre attention sur l'ancienne mine d'uranium de Rophin. Cette mine n'existant plus, nous avons effectué une étude paléo-environnementale en carottant la zone humide située à l'aval du site.

### **1.5. Influence du bruit de fond radioactif renforcé par l'exploitation de l'uranium sur les différents paramètres de diversité des communautés de diatomées fossiles de la zone humide de Rophin**

Le chapitre VIII (195-226) visait à comprendre si la modification du bruit de fond radioactif par l'exploitation de l'uranium dans l'ancienne mine de Rophin, peut avoir un effet sur les communautés de diatomées fossiles. Nous avons démontré que l'exploitation de la mine de Rophin ne semble pas avoir eu un fort impact sur les communautés locales de diatomées. En effet, aucune différence significative dans la richesse en espèces de diatomées entre les grandes périodes historiques (avant, pendant et suivant la période d'exploitation) n'a pu être statistiquement établie. Cependant, des changements dans la structure des communautés ont été observés durant la période post-minièrre mais les espèces associées ne constituent pas des marqueurs d'un environnement fortement perturbé. En effet, l'évolution des communautés de diatomées fossiles dans la zone humide reflète principalement l'influence du bassin versant et du ruisseau (traversant ce bassin versant) sur la zone humide. De plus, en combinaison avec les couches sédimentaires, ces données suggèrent des modifications du niveau d'eau de la nappe phréatique de la zone humide. Enfin, la présence d'activités anthropiques locales et/ou régionales (culture, pâturage) a également été détectée.

Ce faible impact de l'exploitation de la mine de Rophin sur les communautés de diatomées de la zone humide peut être lié à la courte durée d'activité de la mine qui n'a été que de 8 ans. Plusieurs études se sont intéressées à l'impact des mines sur les diatomées ou d'autres micro-algues (Herlory et al., 2013; García-Balboa et al., 2013; Baselga-Cervera et al., 2020; Flor, 2022). Selon García-Balboa et al. (2013), les microalgues ayant colonisées un immense bassin d'évaporation de la zone minièrre de Saelices

(Espagne) ainsi que dans un bassin d'effluents miniers de la zone minière de Villavieja (Espagne) se sont rapidement adaptées à la contamination par les effluents miniers. Cela suggère que les diatomées ont pu également s'adapter rapidement à l'introduction de radionucléides dans la zone humide de Rophin. Selon les résultats obtenus par ces auteurs, l'adaptation observée des microalgues ne serait pas liée à l'acclimatation physiologique de ces dernières à l'introduction des radioéléments dans leur milieu mais à l'adaptation. Il s'agirait plutôt d'une adaptation génétique au moyen de mutations spontanées rares qui se sont produites avant l'exposition aux effluents de l'extraction de l'uranium. Ils observaient également que l'adaptation aux conditions les plus extrêmes n'a été possible qu'après recombinaison par reproduction sexuée car l'adaptation nécessite plus d'une mutation. Ils suggéraient donc que les microalgues vivant dans des environnements extrêmes (concentrations en effluents les plus élevées) pourraient être les descendantes de mutants présélectionnés qui possédaient une potentielle adaptation génétique à une contamination extrême telle que celles rencontrées dans les mines. Ceci peut expliquer le faible impact de l'exploitation de la mine observé sur les communautés de diatomées fossiles. De plus, les diatomées sont des organismes qui ont des cycles de génération court, cet avantage leur permet de s'adapter rapidement au stress induit par l'introduction d'effluents miniers dans leur milieu de vie.

## **2. Perspectives**

Des travaux complémentaires à ceux déjà réalisés dans ma thèse, peuvent être envisagés afin de compléter l'influence des bruits de fond radioactifs élevés sur les diatomées.

### **2.1. Etude de l'influence de la radioactivité naturelle sur la physiologie des communautés de diatomées**

Pour aller plus loin, il va être nécessaire d'effectuer des manipulations en laboratoire afin de comprendre l'effet de la radioactivité sur la physiologie des organismes.

Une première étude avait été initiée durant un stage de Master 2 (Mélissa Court, LMGE) afin d'analyser les changements des capacités physiologiques (photosynthèse, productions pigmentaires photosynthétiques et antioxydantes) et des traits phénotypiques à l'échelle populationnelle et communautaire (abondance, taux de déformation, biovolume, taille) de diatomées peuplant des sources minérales présentant un gradient de radioactivité. Cette étude avait permis de montrer une influence du  $^{226}\text{Ra}$  sur la production pigmentaire de caroténoïdes spécifiques aux diatomées (fucoxanthine, diadinoxanthine), ainsi que l'impact du  $^{222}\text{Rn}$  et du rayonnement  $\gamma$  sur des traits phénotypiques des diatomées. Cette étude était très préliminaire.

De plus un focus pourrait être effectué sur l'espèce *Planothidium frequentissimum* que ce soit par des approches de terrain ou en laboratoire avec la mise en culture de cette espèce avec des individus issus d'une source radioactive.

## **2.2. Etude l'influence de la radioactivité sur les populations de *Planothidium frequentissimum***

Les diatomées sont des organismes sensibles au stress environnementaux. Les espèces, de part leur préférences écologiques, sont indicatrices des conditions environnementales de l'habitat qu'elles occupent. Cependant, l'exposition à un stress physique et chimique peut conduire à la déformation de leur enveloppe externe : le frustule (Falasco et al., 2009; 2021 ; Millan et al. 2019). A travers ma thèse, notamment à travers les chapitres IV et V, en accord avec les résultats de Millan et al. (2019), nous avons démontré que l'espèce *Planothidium frequentissimum* est particulièrement associée à la radioactivité dans les sources (i.e.  $^{238}\text{U}$  et  $^{222}\text{Rn}$ ). Cette espèce est donc un potentiel bio-indicateur de la radioactivité dans les sources.

### **2.3. Etude de l'impact des irradiations gamma hautes doses chez une population de *Planothidium frequentissimum*: implication du stress oxydatif**

Pour approfondir nos connaissances sur l'influence de la radioactivité sur les diatomées des sources, le Projet IRADIATOX porté par la ZATU vise à étudier la résistance aux rayons ionisants de *Planothidium* collectés dans la source des Salins. C'est un nouveau projet qui permet dans un premier temps, de mettre au point des milieux de culture pour isoler et cultiver des diatomées collectées dans les sources minérales puis dans un second temps, d'étudier la réponse physiologique (croissance, activité métabolique (photosynthèse et métabolisme basal)) des diatomées à l'exposition aux rayons ionisants (rayons  $\gamma$ ). Cette étude se focalise particulièrement sur les effets du stress oxydatif sur les différents paramètres physiologiques cités précédemment.

#### **2.3.1. Etude de la fréquence de déformation du cavuum dans les sources minérales radioactives**

*Planothidium frequentissimum* présente un cavuum qui est une cavité présente sur la valve sans raphé. Ce cavuum ou spot de fer à cheval (horseshoe spot) semble être un système optique qui peut diffuser ou focaliser la lumière, en fonction de l'indice de réfraction de la matière à l'intérieur de la cavité. Aussi, il semble impliqué dans la diffusion de la lumière vers les chloroplastes (Bukhtiyarova & Lyakh, 2014). Des observations en microscopie électronique à balayage sur des individus issus de la source des Salins, nous a permis de voir que le cavuum présente des degrés d'ouverture différents (cavuum normal, « ouvert », « fermé ») et peu d'auteurs (Potapova, 2010 ; Bukhtiyarova & Lyakh, 2014; Jahn et al., 2017) se sont intéressées à cette caractéristique des diatomées. Le but de cette étude sera d'explorer si la radioactivité dans les sources a un effet sur la fréquence des déformations du cavuum.



### **2.3.2. Etude de l'évolution des communautés de diatomées de la source minérale dite «La Montagne», source la plus radioactive de France et influence de la microtopographie sur l'interprétation des données de carottage**

Pour les chapitres IV et V de la thèse, nous avons choisis d'étudier l'influence de la radioactivité naturelle selon une approche dite synchronique. Cela nous a permis d'étudier l'influence de la radioactivité naturelle sur les communautés de diatomées actuelles dans les sources. Cependant, une autre approche dite diachronique, ou étude paléo-environnementale, consiste à étudier les diatomées fossiles d'un environnement afin de déduire à partir de leur évolution temporelle, l'influence de paramètres environnementaux, comme la radioactivité. Cette étude serait comparable à celle effectuée dans la zone humide de l'ancienne mine de Rophin et permettrait de comparer l'effet d'une exploitation minière sur une courte durée à celle du fonctionnement d'une source sur le temps long.

La source la Montagne est une source carbonatée qui, en ruissellement va déposer des concrétions de carbonate de calcium ( $\text{CaCO}_3$ ), qui vont former une roche appelée «travertin». Les diatomées font partie des communautés se développant sur le travertin (Porter 1861) et elles vont se conserver à l'état fossile dans le travertin ancien (Winsborough, 2000). Ainsi, pour cette étude à venir, nous avons donc choisis d'étudier l'évolution des communautés de diatomées fossiles enregistrée dans le travertin de la source la Montagne. En effet, la source la Montagne est la source la plus radioactive étudiée dans cette thèse. Des niveaux de radioactivité compris entre 4000 et 5000 Bq/L ont été mesurés dans cette source. Bien que ces niveaux de radioactivité soient élevés, nous avons observé qu'ils varient au cours du temps tout comme les autres paramètres physico-chimiques. De ce fait, les diatomées doivent subir des niveaux de radioactivité élevés et variés. Cela peut induire un stress supplémentaire pour ces organismes. Le but de cette étude est donc de déterminer s'il y a des changements de communautés de diatomées fossiles dans le travertin de la source, de déterminer les espèces associées à ces changements et les modifications dans l'environnement (perturbation de l'alimentation en eau du travertin par les écoulements de la source). Cette étude permettra également d'analyser l'effet de la période d'embouteillage de la source sur le développement des micro-algues.

A cet effet, des carottages pourraient être effectués dans la roche en différents endroits du travertin. Ce travail permettrait de reconstituer le développement du travertin à travers les peuplements de diatomées fossiles mais également de comprendre quelles sont les effets de la microtopographie (en lien avec la dissection de l'écoulement sur la roche) sur l'interprétation des données de carottage.

## Conclusion générale

Ce travail multidisciplinaire, s'inscrit dans le cadre de la Zone Atelier Territoire Uranifère (ZATU) qui étudie l'effet de faibles bruits de fond radioactifs naturels sur les écosystèmes à travers deux contextes : NORM et TE-NORM. Les projets TIRAMISU et TERROIR sont deux des projets translationnels structurant la ZATU. Le projet TIRAMISU (NORM) est dédié à l'étude de la biodiversité dans les sources minérales radioactives tandis que le projet TERROIR (TE-NORM) porte sur l'étude de l'ancienne mine d'uranium de Rophin (Auvergne, France).

Le premier volet de ma thèse est inclus dans le projet TIRAMISU en liant avec les sources radioactives. Cette étude est liée particulièrement aux axes de recherche « analyser les communautés microbiennes en termes de diversité et de structuration » et « conduire une analyse multiparamétrique des données d'observation et modéliser les doses reçues par les organismes vivant dans les différents compartiments des sources (eau, sédiments, paroi) » du projet TIRAMISU. En parallèle de mon étude, plusieurs thèses sont en cours dans ce projet et portent sur l'influence de la radioactivité des sources sur les communautés bactériennes (Thèse de Guillaume Holub, CENBG, Bordeaux), la modélisation de l'exposition aux rayonnements des diatomées dans les sources minérales radioactives (Thèse de Sofia Kolovi, LPC, Aubière), les interactions entre les radionucléides (Uranium, Radium) et les diatomées (Thèse de Yihua He, SUBATECH, Nantes).

En résumé, ma thèse a donc permis 1) d'acquérir des premières informations sur la biodiversité (richesse, composition taxonomique et structure) des communautés de diatomées habitants les sources minérales distribuées dans le Massif central selon un gradient de bruits de fond radioactif, 2) de définir statistiquement si le bruit de fond radioactif, parmi d'autres facteurs abiotiques des sources minérales, a une influence sur la richesse, la composition taxonomique et la structure des communautés exposées chroniquement à cette radioactivité naturelle depuis de longues périodes; 3) d'analyser si ces bruits de fond ont également un effet sur d'autres acteurs des écosystèmes des sources tels que les virus et les procaryotes.

Le second volet de ma thèse est inclus dans le projet TERROIR (qui se concentre sur le site de l'ancienne mine de Rophin) et plus particulièrement dans l'axe « analyser les effets de la contamination en radionucléides sur les chaînes trophiques terrestres et aquatiques » de ce projet. Les résultats obtenus ont permis d'analyser l'impact de l'exploitation de la mine d'uranium sur les paramètres écologiques des communautés de diatomées fossiles présentes dans la zone humide de l'ancienne mine de Rophin qui s'est avéré très faible.

Pour conclure, il semblerait que les communautés diatomiques vivant dans les sources minérales dont la radioactivité est naturellement renforcée ou autour de l'ancienne mine d'uranium seraient composées, d'espèces adaptées aux rayons ionisants et à la toxicité des radionucléides dans l'eau. Grâce à cette étude, nous avons également identifié un bioindicateur de la présence de  $^{238}\text{U}$  et de  $^{222}\text{Rn}$  à savoir l'espèce *Planothidium frequentissimum*.

## Références

- Abdelouas, A. (2006). Uranium mill tailings: geochemistry, mineralogy, and environmental impact. *Elements*, 2(6), 335–341.
- Abdi, H., & Williams, L. J. (2010). Principal component analysis. *Wiley interdisciplinary reviews: computational statistics*, 2(4), 433-459.
- Adan, A., Alizada, G., Kiraz, Y., Baran, Y., & Nalbant, A. (2017). Flow cytometry: basic principles and applications. *Critical reviews in biotechnology*, 37(2), 163-176.
- Afnor, (2014). EN 13946. Water quality - Guidance standard for the routine sampling and pretreatment of benthic diatoms from rivers. Afnor 1–17.
- Al-Khawlany, A. H., Khan, A. R., & Pathan, J. M. (2018). Review on studies in natural background radiation. *Radiation Protection and Environment*, 41(4), 215.
- Alverson, A. J., Jansen, R. K., & Theriot, E. C. (2007). Bridging the Rubicon: phylogenetic analysis reveals repeated colonizations of marine and fresh waters by thalassiosiroid diatoms. *Molecular phylogenetics and evolution*, 45(1), 193-210.
- Amblard, C., Boisson, J. C., Bourdier, G., Fontvieille, D., Gayte, X., & Sime-Ngando, T. (1998). Ecologie microbienne en milieu aquatique: des virus aux protozoaires. *Revue des sciences de l'eau*, 11, 145-162.
- Amin, S. A., Parker, M. S., & Armbrust, E. V. (2012). Interactions between diatoms and bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76(3), 667-684.
- Anderson, E. C., Libby, W. F., Weinhouse, S., Reid, A. F., Kirshenbaum, A. D., & Grosse, A. V. (1947). Natural radiocarbon from cosmic radiation. *Physical Review*, 72(10), 931.
- Anesio, A. M., Mindl, B., Laybourn-Parry, J., Hodson, A. J., & Sattler, B. (2007). Viral dynamics in cryoconite holes on a high Arctic glacier (Svalbard). *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences*, 112(G4).
- Angel, A., Vila Pinto, I., Díaz, C., Molina, X., & Sepúlveda, P. (2018). Geothermal diatoms: seasonal variability in the El Tatio geothermal field (Altiplano, Chile).
- Angeli, N., Cantonati, M., Spitale, D., & Lange-Bertalot, H. (2010). A comparison between diatom assemblages in two groups of carbonate, low-altitude springs with different levels of anthropogenic disturbances. *Fottea*, 10(1), 115-128.
- Anitori, R. P., Trott, C., Saul, D. J., Bergquist, P. L., & Walter, M. R. (2002). A culture-independent survey of the bacterial community in a radon hot spring. *Astrobiology*, 2(3), 255-270.
- Ashton, P. J., & Schoeman, F. R. (1984). A preliminary limnological investigation of twelve southern African geothermal waters. *Journal of the Limnological Society of Southern Africa*, 10(2), 50-56.
- Baillet, B., Apothéloz-Perret-Gentil, L., Baričević, A., Chonova, T., Franc, A., Frigerio, J. M., ... & Kahlert, M. (2020). Diatom DNA metabarcoding for ecological assessment: Comparison among bioinformatics pipelines used in six European countries reveals the need for standardization. *Science of the Total Environment*, 745, 140948.
- Baker, L.A., Biron, D.G., Millan, F., Voltaire, O., Breton, V., Allain, E., Wetzel, C.E., Ector, L., Beauger, A., 2022. The substrate, a key factor or not, to explain the species diversity of diatom communities in mineral springs. *Botany Letters*, 169(2), 155-165.

- Baker LA, Beauger A, Wetzel CE, Voldoire O, Blavignac C, Allain E, Ector L, Biron D. 2022. Brackish diatom species observed at the bituminous Puy de la Poix spring: an island of curiosity. *BIOM-Revue scientifique pour la biodiversité du Massif central*, 3(1), 40-51.
- Ballini, M., Chautard, C., Nos, J., Phrommavanh, V., Beaucaire, C., Besancon, C., Boizard, A, Cathelineau, M., Peiffert, C., Vercouter, T., Vors, E., & Descostes, M. (2020). A multi-scalar study of the long-term reactivity of uranium mill tailings from Bellezane site (France). *Journal of environmental radioactivity*, 218, 106223.
- Banerjee, S., Kundu, A., & Dhak, P. (2022). Bioremediation of uranium from waste effluents using novel biosorbents: a review. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 331(6), 2409-2435.
- Barinova, S., KUKHALEISHVILI, L., Nevo, E., & Janelidze, Z. (2011). Diversity and ecology of algae in the Algeti National Park as a part of the Georgian system of protected areas. *Turkish Journal of Botany*, 35(6), 729-774.
- Barnes, R. S. K. (1989). What, if anything, is a brackish-water fauna?. *Earth and Environmental Science Transactions of The Royal Society of Edinburgh*, 80(3-4), 235-240.
- Baselga-Cervera, B., García-Balboa, C., Díaz-Alejo, H. M., Costas, E., & López-Rodas, V. (2020). Rapid Colonization of Uranium Mining-Impacted Waters, the Biodiversity of Successful Lineages of Phytoplankton Extremophiles. *Microbial ecology*, 79, 576-587.
- Bennett, H. D. (1969). Algae in relation to mine water. *Castanea*, 306–328.
- Batisse, A. (1925). *Contribution à l'étude des propriétés chimiques et physiques de la source radioactive des Estreys près Le Puy-en-Velay* (Doctoral dissertation, Imprimerie Bosc Frères et Riou).
- Batard, F., Baubron, J. C., Bosch, B., Marcé, A., & Risler, J. J. (1982). Isotopic identification of gases of a deep origin in French thermomineral waters. *Journal of Hydrology*, 56(1-2), 1-21.
- Baubron, J. C., Bosch, B., Degranges, P., Leleu, M., Marcé, A., Risler, J. J., & Sarcia, C. (1979). Recherches géochimiques sur les eaux thermales de la bordure ouest de la Limagne. *Bulletin de Minéralogie*, 102(5), 676-683.
- Beauger, A., Voldoire, O., Mertens, A., Le Cohu, R., & Van de Vijver, B. (2015). Two new Navicula species (Bacillariophyceae) from Western Europe. *Phytotaxa*.-Auckland, NZ, 2009, currens, 230(2), 172-182.
- Beauger, A., Wetzel, C. E., Voldoire, O., Garreau, A., & Ector, L. (2016). Sellaphora labernardierei (Sellaphoraceae, Bacillariophyta), a new epilithic species from French spring and four new combinations within the genus Sellaphora. *Phytotaxa*, 260(3), 235-246.
- Beauger, A., Wetzel, C. E., Voldoire, O., Garreau, A., & Ector, L. (2017). Morphology and ecology of Craticula lecohui sp. nov. (Bacillariophyceae) from hydrothermal springs (Puy-de-Dôme, Massif Central, France) and comparison with similar Craticula species. *Nova Hedwigia, Beiheft*, 146, 7-22.
- Beauger, A., Wetzel, C. E., Voldoire, O., & Ector, L. (2019). Pseudostaurosira bardii (Fragilariaceae, Bacillariophyta), a new species from a saline hydrothermal spring of the Massif Central (France). *Botany Letters*, 166(1), 3-13.
- Beauger, A., Voldoire, O., Carlos, W., Allain, E., Millan, F., Breton, V., Kolovi, S., Ector, L., 2020. Biodiversity and ecology of diatoms in mineral springs of the area of Sainte Marguerite (Saint-Maurice-ès-Allier, Massif central, France). *BIOM-Revue scientifique pour la biodiversité du Massif central*, 1(1), 21-34.
- Beauger, A., Baker, L. A., Wetzel, C., Ector, L., & Biron, D. (2021). Thermo-mineral springs, old and unique aquatic ecosystems to survey and preserve. *Biodiversity Online Journal*, 1(4).

- Bennett, J. T., & Carpenter, R. (1979). Concentrations and temporal variations of  $^{210}\text{Po}$ ,  $^{210}\text{Pb}$ , and Al in the surf zone ecosystem of Copalis Beach, Washington. *Estuarine and Coastal Marine Science*, 8(2), 127-140.
- Bere, T., Mangadze, T., & Mwedzi, T. (2016). Variation partitioning of diatom species data matrices: Understanding the influence of multiple factors on benthic diatom communities in tropical streams. *Science of the Total Environment*, 566, 1604-1613.
- Bertram, H. (1988). DNA damage and mutagenesis of lambda phage induced by gamma-rays.
- Bettarel, Y., R. Aarfffi, T. Bouvier, M. Bouvy, E. Briand, J. Colombet, D. Corbin & T. Sime-Ngando, 2008. Virioplankton distribution and activity in a tropical eutrophicated bay. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 80: 425-429.
- Bettarel, Y., Sime-Ngando, T., Amblard, C., & Laveran, H. (2000). A comparison of methods for counting viruses in aquatic systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(6), 2283-2289.
- Bey, M. Y., & Ector, L. (2013a). Atlas des diatomées des cours d'eau de la région Rhône-Alpes, Tome 1-6. *DREAL Rhône-Alpes*, 1182.
- Bey, M. Y., Ector, L., 2013b. Atlas des diatomées des cours d'eau de la région Rhône-Alpes. Tome 3.
- Birks, H.J.B. Paleoecology, Editor(s): Sven Erik Jørgensen, Brian D. Fath, *Encyclopedia of Ecology*, Academic Press, 2008, Pages 2623-2634,
- Bister, S., Birkhan, J., Lüllau, T., Bunka, M., Solle, A., Stieghorst, C., Riebe, B., Michel, R., & Walther, C. (2015). Impact of former uranium mining activities on the floodplains of the Mulde River, Saxony, Germany. *Journal of Environmental Radioactivity*, 144, 21-31.
- Blaauw, M., & Christen, J. A. (2011). Flexible Paleoclimate Age-Depth Models Using an Autoregressive Gamma Process 457–474.
- Bogan MT, Noriega-Felix N, Vidal-Aguilar SL, Findley LT, Lytle DA, Gutiérrez- Ruacho OG, Alvarado-Castro JA, Varela-Romero A. 2014. Biogeography and conservation of aquatic fauna in spring-fed tropical canyons of the southern Sonoran Desert, Mexico. *Biodiversity and conservation*, 23, 2705-2748.
- Boineau, R. & J. Maisonneuve, 1972. Les sources minérales du Massif central français et leur cadre géologique. [The mineral springs of the French Massif central and their geological setting.] Rapport BRGM 72-SGN-151-MCE.
- Bolsunovsky, A. Y., Dementyev, D. V., Trofimova, E. A., & Zotina, T. A. (2017, July). New data on the effect of ionizing radiation on the growth of the aquatic plant *Elodea canadensis* in the laboratory. In *Doklady Biological Sciences* (Vol. 475, pp. 157-160). Pleiades Publishing.
- Bongiorni, L., Magagnini, M., Armeni, M., Noble, R., & Danovaro, R. (2005). Viral production, decay rates, and life strategies along a trophic gradient in the North Adriatic Sea. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(11), 6644-6650.
- Bourrelly P, Manguin E. 1946. Contribution à la flore algale d'eau douce des Açores. [Contribution to the Freshwater Algal Flora of the Azores]. *Mémoires de la Société de Biogéographie* 8:447–500.
- Bradbury, J. P., & Krebs, W. N. (1995). Fossil continental diatoms: paleolimnology, evolution, and biochronology. *Short Courses in Paleontology*, 8, 119-138.
- Bradshaw, C., Kapustka, L., Barnthouse, L., Brown, J., Ciffroy, P., Forbes, V., ... & Bréchnignac, F. (2014). Using an ecosystem approach to complement protection schemes based on organism-level endpoints. *Journal of environmental radioactivity*, 136, 98-104.

- Bréchnignac, F., Oughton, D., Mays, C., Barnthouse, L., Beasley, J. C., Bonisoli-Alquati, A., ... & Tsukada, H. (2016). Addressing ecological effects of radiation on populations and ecosystems to improve protection of the environment against radiation: Agreed statements from a Consensus Symposium. *Journal of environmental radioactivity*, 158, 21-29.
- Breitbart, M., Wegley, L., Leeds, S., Schoenfeld, T., & Rohwer, F. (2004). Phage community dynamics in hot springs. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(3), 1633-1640.
- Breitbart, M. (2012). Marine viruses: truth or dare. *Annual review of marine science*, 4, 425-448.
- Bronk Ramsey, C. (1994). Analysis of chronological information and radiocarbon calibration: the program OxCal. *Archaeological Computing Newsletter*, 41(11), e16.
- Brown, J. E., Jones, S. R., Saxén, R., Thørring, H., & i Batlle, J. V. (2004). Radiation doses to aquatic organisms from natural radionuclides. *Journal of Radiological Protection*, 24(4A), A63.
- Bruère, Richard T. "Plaine l'ancien: Histoire naturelle." (1953): 196-198.
- Brum, J. R., Steward, G. F., Jiang, S. C., & Jellison, R. (2005). Spatial and temporal variability of prokaryotes, viruses, and viral infections of prokaryotes in an alkaline, hypersaline lake. *Aquatic Microbial Ecology*, 41(3), 247-260.
- Brussaard, C. P., Payet, J. P., Winter, C., & Weinbauer, M. G. (2010). Quantification of aquatic viruses by flow cytometry. *Manual of aquatic viral ecology*, 11, 102-107.
- Brzoska, R. M., & Bollmann, A. (2016). The long-term effect of uranium and pH on the community composition of an artificial consortium. *FEMS microbiology ecology*, 92(1), fiv158.
- Bukhtiyarova, L. N., & Lyakh, A. M. (2014). Functional morphology of horseshoe spot in frustule of Planothidium species (Bacillariophyta). *Ukrainian Botanical Journal*, 71(2), 223-227.
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature methods*, 13(7), 581-583.
- Camus G., Michard G., Boivin P. 1993. Risques d'éruption gazeuse carbonique en Auvergne. *Bulletin de la Société Géologique de France*, 164(6), 767-781.
- Cantonati, M. (1998). Diatom communities of springs in the Southern Alps. *Diatom research*, 13(2), 201-220.
- Cantonati M, Pipp E. 2000. Longitudinal and seasonal differentiation of epilithic diatom communities in the uppermost sections of two mountain spring-fed streams. *Verh Internat Verein Theor Angew Limnol*. 27(3): 1591–
- Cantonati, M., & Pipp, E. (2000). Longitudinal and seasonal differentiation of epilithic diatom communities in the uppermost sections of two mountain spring-fed streams. *Internationale Vereinigung für theoretische und angewandte Limnologie: Verhandlungen*, 27(3), 1591-1595.
- Cantonati, M., Bertuzzi, E., & Spitale, D. (Eds.). (2007). *The spring habitat: biota and sampling methods*. Museo tridentino di scienze naturali.
- Cantonati, M., & Spitale, D. (2009). The role of environmental variables in structuring epiphytic and epilithic diatom assemblages in springs and streams of the Dolomiti Bellunesi National Park (south-eastern Alps). *Fundamental and applied limnology*, 174(2), 117.
- Cantonati, M., Füreder, L., Gerecke, R., Jüttner, I., & Cox, E. J. (2012). Crenic habitats, hotspots for freshwater biodiversity conservation: toward an understanding of their ecology. *Freshwater Science*, 31(2), 463-480.



- Cantonati, M., Angeli, N., Virtanen, L., Wojtal, A. Z., Gabrieli, J., Falasco, E., Lavoie, I., Morin S., Marchetti, A., Fortin, F., & Smirnova, S. (2014). *Achnantheidium minutissimum (Bacillariophyta) valve deformities as indicators of metal enrichment in diverse widely-distributed freshwater habitats. Science of the Total Environment, 475, 201-215.*
- Cantonati M, Fensham RJ, Stevens LE., Gerecke R, Glazier DS, Goldscheider N, Knight RL, Richardson J S, Springer AE, Tockner K. 2020. Urgent plea for global protection of springs. *Conservation Biology, 35(1), 378-382.*
- Carter, J. R., & AE, B. W. (1980). A taxonomic study of diatoms from standing freshwaters in Shetland.
- Cartwright, J. (2019). Ecological islands: conserving biodiversity hotspots in a changing climate. *Frontiers in Ecology and the Environment, 17(6), 331-340.*
- Cartwright, Jennifer M., et al. (2020). Oases of the future? Springs as potential hydrologic refugia in drying climates. *Frontiers in Ecology and the Environment, 18(5), 245-253.*
- Carvalho, F., Chambers, D., Fernandes, S., Fesenko, S., Goulet, R., Howard, B., Kim, C.K., Martin, P., Moore, W.S, Phaneuf, M., Porceilli, P., Proehl, G., Schmidt, P., Sweeck, L., Vandehove, H., Yankovich, T., (2014). *The environmental behaviour of radium: revised edition.* International Atomic Energy Agency.
- Carvalho, F. P. (2018). Radionuclide concentration processes in marine organisms: A comprehensive review. *Journal of environmental radioactivity, 186, 124-130.*
- Cassidy, C. L., Lemon, J. A., & Boreham, D. R. (2007). Impacts of low-dose gamma-radiation on genotoxic risk in aquatic ecosystems. *Dose-Response, 5(4), dose-response.*
- Castillo, H., Schoderbek, D., Dulal, S., Escobar, G., Wood, J., Nelson, R., & Smith, G. (2015). Stress induction in the bacteria *Shewanella oneidensis* and *Deinococcus radiodurans* in response to below-background ionizing radiation. *International journal of radiation biology, 91(9), 749-756.*
- CEA, (2017). L'essentiel sur l'uranium. <https://www.cea.fr/comprendre/Pages/radioactivite/essentiel-sur-uranium.aspx>
- CEN, 2018. Water quality - CEN/TR 17245 - Technical report for the routine sampling of benthic diatoms from rivers and lakes adapted for metabarcoding analyses. CEN stand., 1–8.
- Celekli, A., & Külköylüoğlu, O. (2007). On the relationship between ecology and phytoplankton composition in a karstic spring (Cepni, Bolu). *Ecological Indicators, 7(2), 497-503.*
- Chao, A., Chazdon, R. L., Colwell, R. K., & Shen, T. J. (2005). A new statistical approach for assessing similarity of species composition with incidence and abundance data. *Ecology letters, 8(2), 148-159.*
- Chao, A., Chazdon, R. L., Colwell, R. K., & Shen, T. J. (2006). Abundance-based similarity indices and their estimation when there are unseen species in samples. *Biometrics, 62(2), 361-371.*
- Chaouite J. 1987. Contribution à l'étude des protistes des eaux minérales et thermo-minérales en Auvergne. [Contribution to the study of protists in mineral and thermo-mineral waters in Auvergne] [dissertation]. Clermont-Ferrand: Université Blaise Pascal de Clermont-Ferrand.
- Chaouite J., Romagoux JC. 1989. La flore diatomique des eaux minérales de Vichy (Allier) et de Chaudes-Aigues (Cantal). [The diatomic flora of the mineral waters of Vichy (Allier) and Chaudes-Aigues (Cantal)]. *Revue des Sciences Naturelles d'Auvergne. 55:7–23.*
- Chapin, F. S., Matson, P. A., Mooney, H. A., & Vitousek, P. M. (2002). Principles of terrestrial ecosystem ecology.

- Charmasson, S., Sarradin, P. M., Le Faouder, A., Agarande, M., Luyen, J., & Desbruyères, D. (2009). High levels of natural radioactivity in biota from deep-sea hydrothermal vents: a preliminary communication. *Journal of environmental radioactivity*, 100(6), 522-526.
- Chen, F., Lu, J. R., Binder, B. J., Liu, Y. C., & Hodson, R. E. (2001). Application of digital image analysis and flow cytometry to enumerate marine viruses stained with SYBR Gold. *Applied and environmental microbiology*, 67(2), 539-545.
- Choudhary, S., Islam, E., Kazy, S. K., & Sar, P. (2012). Uranium and other heavy metal resistance and accumulation in bacteria isolated from uranium mine wastes. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 47(4), 622-637.
- Chuiyun, T., Juan, Z., Ying, L., Mingjiang, Z., Jianlei, W., & Xingyu, L. (2021). The microbial community composition and population change during bioremediation of uranium tailings. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 621, No. 1, p. 012096). IOP Publishing.
- Cichoń, S. (2016). Diatoms in the ecosystem of river contaminated with heavy metals. *Archives of Waste Management and Environmental Protection*, 18(4), 9–14.
- Clarke, K. R. (1993). Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. *Australian journal of ecology*, 18(1), 117-143.
- Cleve-Euler, A., 1953. Die Diatomeen von Schweden und Finnland. Part III. Monoraphideae, Biraphideae 1. K. Sven. vetensk. akad. handl. 4, 1–255.
- Cognetti, G., & Maltagliati, F. (2000). Biodiversity and adaptive mechanisms in brackish water fauna. *Marine pollution bulletin*, 40(1), 7-14.
- Collin P.H., Dictionary of Environment and Ecology, 2004 (Fifth edition), ISBN 0747572011, Bloomsbury, London, 228p.
- Cothorn, R. C., & Lappenbusch, W. L. (1983). Occurrence of uranium in drinking water in the US. *Health physics*, 45(1), 89-99.
- Coughtrey, P. J., & Thorne, M. C. (1983). Radionuclide distribution and transport in terrestrial and aquatic ecosystems. A critical review of data. Vol. 1.
- Cox, E. J. (1988). Has the role of the substratum been underestimated for algal distribution patterns in freshwater ecosystems?. *Biofouling*, 1(1), 49-63.
- Cox, E. J. (1996). Identification of Freshwater Diatoms from Live Material First Chapman and Hall. edition. *London, Melbourne, Madras*.
- Cox, M. M., & Battista, J. R. (2005). *Deinococcus radiodurans*—the consummate survivor. *Nature Reviews Microbiology*, 3(11), 882-892.
- Cubizolle, H., Georges, V., Latour, C., Argant, J., & Serieyssel, K. (2004). La turfigenèse à la fin du Subboréal et au Subatlantique dans les tourbières basses du Massif Central oriental granitique (France): une manifestation de l'action humaine?[Peat inception and peat accumulation at the end of the Sub Boreal and during the Sub-Atlantic in the granitic eastern Massif central (France): an evidence for human activity]. *Quaternaire*, 15(4), 343-359.
- Cuthbert, Mark O., and Gail M. Ashley. "A spring forward for hominin evolution in East Africa." *PloS one* 9.9 (2014): e107358.
- Curewitz, D., & Karson, J. A. (1997). Structural settings of hydrothermal outflow: Fracture permeability maintained by fault propagation and interaction. *Journal of Volcanology and Geothermal Research*, 79(3-4), 149-168.

- Czarnecki, D. B., & Cawley, E. T. (1997). A new species of *Pinnularia* (Pinnulariaceae) from iron rich, highly acidic strip-mined coal pits of south-central Iowa. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*, 111–117.
- Davis, J. A., Kerezszy, A., & Nicol, S. (2017). Springs: conserving perennial water is critical in arid landscapes. *Biological Conservation*, 211, 30-35.
- De Corte, D., Sintes, E., Winter, C., Yokokawa, T., Reinthaler, T., & Herndl, G. J. (2010). Links between viral and prokaryotic communities throughout the water column in the (sub) tropical Atlantic Ocean. *The ISME Journal*, 4(11), 1431-1442.
- Delgado, C., Feio, M. J., Pardo, I., & Almeida, S. F. (2020). Effects of water temperature over benthic diatom communities: insights from thermal springs. *Plant Ecology & Diversity*, 13(3-4), 325-337.
- Denys, L. (1991). *A check-list of the diatoms in the Holocene deposits of the western Belgian coastal plain with a survey of their apparent ecological requirements* (p. 41). Belgium: Ministerie van Economische Zaken.
- Denys, L., & de Wolf, H.E.I.N. (2001). 13 Diatoms as indicators of coastal paleo-environments and relative sea-level change. *The diatoms: applications for the environmental and earth sciences*, 277.
- Denys, L., & Oosterlynck, P. (2015). Diatom assemblages of non-living substrates in petrifying Cratoneurion springs from lower Belgium. *Fottea*, 15(2), 123-138.
- Desouky, O., Ding, N., & Zhou, G. (2015). Targeted and non-targeted effects of ionizing radiation. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 8(2), 247-254.
- De Villers, J., Squilbin, M., & Yourassowsky, C. (2005). Qualité physico-chimique et chimique des eaux de surface: cadre général. Fiche, 2, 158-162.
- De Vos, W., Tarvainen, T., Salminen, R., Reeder, S., De Vivo, B., Demetriades, A., Petersell, V., (2006). Geochemical Atlas of Europe. Part 2. *Interpretation of geochemical maps, additional tables, figures, maps and related publications*. Geological Survey of Finland, Espoo.
- Djokic, T., Van Kranendonk, M. J., Campbell, K. A., Walter, M. R., & Ward, C. R. (2017). Earliest signs of life on land preserved in ca. 3.5 Ga hot spring deposits. *Nature communications*, 8(1), 15263.
- Douglas, B. (1958). The ecology of the attached diatoms and other algae in a small stony stream. *The Journal of Ecology*, 295-322.
- Dray, S., Péliissier, R., Couteron, P., Fortin, M.J., Legendre, P., Peres-Neto, P.R., Bellier, E., Bivand, R., Blanchet, F.G., De Caceres, M., Dufour, A.B., Heegaard, E., Jombart, T., Munoz, F., Oksanen, J., Thioulouse, J., Wagner, H., (2012). Community ecology in the age of multivariate multiscale spatial analysis. *Ecological Monographs*, 82(3), 257-275.
- Dray, S., Blanchet, G., Borcard, D., Guenard, G., Jombart, T., Larocque, G., Clappe, S., Legendre, P., Madi, N., Wagner, H., & Dray, M. S. (2018). Package 'adespatial'. *R package*, 2018, 3-8.
- Driver, C. J. (1994). Ecotoxicity literature review of selected Hanford Site contaminants.
- Dudgeon D, Arthington AH, Gessner MO, Kawabata Z-I, Knowler DJ, Lévêque C, Naiman RJ, Prieur-Richard A-H, Soto D, Stiassny MLJ, Sullivan CA. 2 (2006). Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. *Biological reviews*, 81(2), 163-182.
- Dufrêne, M., & Legendre, P. (1997). Species assemblages and indicator species: the need for a flexible asymmetrical approach. *Ecological monographs*, 67(3), 345-366.

- Duhamel, S., & Jacquet, S. (2006). Flow cytometric analysis of bacteria-and virus-like particles in lake sediments. *Journal of microbiological methods*, 64(3), 316-332.
- Ejarque, A., Beauger, A., Miras, Y., Peiry, J. L., Voldoire, O., Vautier, F., ... & Steiger, J. (2015). Historical fluvial palaeodynamics and multi-proxy palaeoenvironmental analyses of a palaeochannel, Allier River, France. *Geodinamica acta*, 27(1), 25-47.
- Eröss, A., Csondor, K., Izsák, B., Vargha, M., Horváth, Á., & Pándics, T. (2018). Uranium in groundwater—The importance of hydraulic regime and groundwater flow system's understanding. *Journal of environmental radioactivity*, 195, 90-96.
- Esnault, M. A. (2020). La radioactivité et les êtres vivants. Des biomolécules à la biodiversité.
- Falasco, E., Bona, F., Badino, G., Hoffmann, L., & Ector, L. (2009). Diatom teratological forms and environmental alterations: a review. *Hydrobiologia*, 623, 1-35.
- Falasco, E., & Bona, F. (2011). Diatom community biodiversity in an Alpine protected area: a study in the Maritime Alps Natural Park. *Journal of limnology*, 70(2), 157-167.
- Falasco, E., Ector, L., Wetzel, C. E., Badino, G., & Bona, F. (2021). Looking back, looking forward: a review of the new literature on diatom teratological forms (2010–2020). *Hydrobiologia*, 848, 1675-1753.
- Fassion, F. (2013). L'occupation humaine et interactions sociétés-milieu dans les massifs du Livradois-Forez (Massif-Central, France) de la fin du second âge de fer au Haut Moyen-Age. Doctoral dissertation, Université Blaise Pascal-Clermont-Ferrand II.
- Fazludinova, A., Gabidullin, Y., Allaguvatova, R., & Gaysina, L. (2020). Diatoms in Kamchatka's Hot Spring Soils. *Diversity*, 12(11), 435.
- Flor, J. M., Schenberg, A. C. G., do Nascimento, H. D. A. F., & Oliveira, M. J. D. (2022). Analysis of the microalgae community found in acid lake of uranium mine: bioprospecting for evaluation of biotechnological potential.
- Foets, J., Stanek-Tarkowska, J., Teuling, A. J., Van de Vijver, B., Wetzel, C. E., & Pfister, L. (2021). Autecology of terrestrial diatoms under anthropic disturbance and across climate zones. *Ecological Indicators*, 122, 107248.
- Foster, D. R., KSchoonmaker, P., & Pickett, S. T. A. (1990). Insights from paleoecology to community ecology. *Trends in ecology & evolution*, 5(4), 119-122.
- Forster, L., Forster, P., Lutz-Bonengel, S., Willkomm, H., & Brinkmann, B. (2002). Natural radioactivity and human mitochondrial DNA mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(21), 13950-13954.
- Francou, B., & Vincent, C. (2010). Chapitre 3. Le Petit Âge Glaciaire In : Francou, B., & Vincent, C., *Les glaciers à l'épreuve du climat*. (pp. 49-67). IRD Editions.
- Gad, S.C., Radium, 2005, in: Wexler, P. (Eds), *Encyclopedia of Toxicology (Second Edition)*, Elsevier, pp. 615-617
- Gad, S.C., Radium, 2014, in: Wexler, P. (Eds), *Encyclopedia of Toxicology (Third Edition)*, Academic Press, pp. 44-45.
- Galván, I., Bonisoli-Alquati, A., Jenkinson, S., Ghanem, G., Wakamatsu, K., Mousseau, T. A., & Møller, A. P. (2014). Chronic exposure to low-dose radiation at C hernobyl favours adaptation to oxidative stress in birds. *Functional Ecology*, 28(6), 1387-1403.

- Gao, N., Huang, Z., Liu, H., Hou, J., & Liu, X. (2019). Advances on the toxicity of uranium to different organisms. *Chemosphere*, 237, 124548.
- Garces-Pastor, S., Canellas-Bolta, N., Clavaguera, A., Calero, M. A., & Vegas-Vilarrubia, T. (2017). Vegetation shifts, human impact and peat bog development in Bassa Nera pond (Central Pyrenees) during the last millennium. *The Holocene*, 27(4), 553-565.
- García-Balboa, C., Baselga-Cervera, B., García-Sánchez, A., Igual, J. M., Lopez-Rodas, V., & Costas, E. (2013). Rapid adaptation of microalgae to bodies of water with extreme pollution from uranium mining: an explanation of how mesophilic organisms can rapidly colonise extremely toxic environments. *Aquatic toxicology*, 144, 116-123.
- Garnier-Laplace, J., Gilek, M., Sundell-Bergman, S., & Larsson, C. M. (2004). Assessing ecological effects of radionuclides: data gaps and extrapolation issues. *Journal of Radiological Protection*, 24(4A), A139.
- Garnier-Laplace, J., Colle, C., Morello, M., 2010. <sup>238</sup>U 92 radionuclide handbook. Natural Uranium and environment; <sup>238</sup>U 92 fiche radionuclide. Uranium naturel et environnement. Fontenay aux Roses.
- Garzón, L., & Garzón, M. L. (2001). Radioactivity as a significant energy source in prebiotic synthesis. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere*, 31, 3-13.
- Glazier DS. 2014. Springs. Reference module in earth systems and environmental sciences. Waltham, Massachusetts: Elsevier.
- Gonnard F., 1906. Sur le quartz du calcaire bitumineux de la Limagne. *Bulletin de la Société française de Minéralogie*, 29(7): 362-365. <https://doi.org/10.3406/bulmi.1906.2792>
- Grimm, E. C. (1987). CONISS: a FORTRAN 77 program for stratigraphically constrained cluster analysis by the method of incremental sum of squares. *Computers & geosciences*, 13(1), 13-35.
- Glazier DS. 2009. Springs. Encyclopedia of inland waters. Volume 1. Oxford, UK: Academic Press Elsevier.
- Gruden, C., Skerlos, S., & Adriaens, P. (2004). Flow cytometry for microbial sensing in environmental sustainability applications: current status and future prospects. *FEMS microbiology ecology*, 49(1), 37-49.
- Guiollard PC (2002)L'Uranium du Morvan et du Forez.
- Guiry M.D. & Guiry G.M., 2022. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; searched on 2 February 2022.
- Habashi, F. (2001). Niepce de saint-Victor and the discovery of radioactivity. *Bull. Hist. Chem*, 26(2), 105.
- Hall, E. J. (1972). Radiation dose-rate: a factor of importance in radiobiology and radiotherapy. *The British journal of radiology*, 45(530), 81-97.
- Hara, S., Koike, I., Terauchi, K., Kamiya, H., & Tanoue, E. (1996). Abundance of viruses in deep oceanic waters. *Marine Ecology Progress Series*, 145, 269-277.
- Hartley, B., Ross, R., & Williams, D. M. (1986). A check-list of the freshwater, brackish and marine diatoms of the British Isles and adjoining coastal waters. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 66(3), 531-610.
- Hay, W. W., Migdisov, A., Balukhovskiy, A. N., Wold, C. N., Flögel, S., & Söding, E. (2006). Evaporites and the salinity of the ocean during the Phanerozoic: Implications for climate, ocean circulation and life. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 240(1-2), 3-46.

- Heidari, F., Riahi, H., Aghamiri, M. R., Shariatmadari, Z., & Zakeri, F. (2017). Isolation of an efficient biosorbent of radionuclides ( $^{226}\text{Ra}$ ,  $^{238}\text{U}$ ): green algae from high-background radiation areas in Iran. *Journal of Applied Phycology*, *29*, 2887-2898.
- Herlory, O., Bonzom, J. M., Gilbin, R., Frelon, S., Fayolle, S., Delmas, F., & Coste, M. (2013). Use of diatom assemblages as biomonitor of the impact of treated uranium mining effluent discharge on a stream: case study of the Ritord watershed (Center-West France). *Ecotoxicology*, *22*, 1186-1199.
- Hill, M. O. (1973). Diversity and evenness: a unifying notation and its consequences. *Ecology*, *54*(2), 427-432.
- Himeur, N. & Andres, C., (2012). Suivi environnemental du site de Rophin - communes de 778 Lachaux et Ris.
- Hinck, J. E., Linder, G., Finger, S., Little, E., Tillitt, D., & Kuhne, W. (2010). Biological pathways of exposure and ecotoxicity values for uranium and associated radionuclides. *Hydrological, Geological and Biological Site Characterization of Breccia Pipe Uranium Deposits in Northern Arizona. U. S. Geological Survey, Scientific Investigations Report, 5025*.
- Hofmann, G., Lange-Bertalot H., & Werum, M. (2013). Diatomeen im Süßwasser-Benthos von Mitteleuropa: 2 Corrected Edition. Königstein: Koeltz Scientific Books.
- Horowitz, E. J., Cochran, J. K., Bacon, M. P., & Hirschberg, D. J. (2020).  $^{210}\text{Po}$  and  $^{210}\text{Pb}$  distributions during a phytoplankton bloom in the North Atlantic: implications for POC export. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, *164*, 103339.
- Ielsch, G., Cuney, M., Buscail, F., Rossi, F., Leon, A., & Cushing, M. E. (2017). Estimation and mapping of uranium content of geological units in France. *Journal of Environmental Radioactivity*, *166*, 210-219.
- Ihara, H., Kumagai, A., Hori, T., Nanba, K., Aoyagi, T., Takasaki, M., & Katayama, Y. (2021). Direct comparison of bacterial communities in soils contaminated with different levels of radioactive cesium from the first Fukushima nuclear power plant accident. *Science of the Total Environment*, *756*, 143844.
- Institut français de l'environnement (2002). L'environnement en France. Editions la découverte et Institut français de l'environnement, 606p.
- IRSN, (2009). Fiche N°5 études et expertises menées par l'IRSN sur les anciennes mines d'uranium en France.
- IRSNa [www.irsn.fr](http://www.irsn.fr). Les différents rayonnements ionisants : alpha, beta, gamma...
- IRSNb [www.irsn.fr](http://www.irsn.fr). La radioactivité et ses effets.
- Islam, E., & Sar, P. (2011). Molecular assessment on impact of uranium ore contamination in soil bacterial diversity. *International Biodeterioration & Biodegradation*, *65*(7), 1043-1051.
- Iyengar, M. A. R. (1990). The natural distribution of radium. *The environmental behaviour of radium*, *1*, 59-128.
- Jaccard, P. (1901). Étude comparative de la distribution florale dans une portion des Alpes et des Jura. *Bull Soc Vaudoise Sci Nat*, *37*, 547-579.
- Jaccard, P. (1901). Distribution de la flore alpine dans le bassin des Dranses et dans quelques régions voisines. *Bull Soc Vaudoise Sci Nat*, *37*, 241-272.

- Jacquet, C., (1929). Contribution à l'étude de la radioactivité des eaux minérales et du magnétisme des roches volcaniques du département du Puy-de-Dôme [Contribution to the study of mineral waters and magnetism of volcanic rocks in the department of Puy-de-Dôme]. Paris : Les Presses universitaires de France.
- Jacquet, S., Heldal, M., Iglesias-Rodriguez, D., Larsen, A., Wilson, W., & Bratbak, G. (2002). Flow cytometric analysis of an *Emiliana huxleyi* bloom terminated by viral infection. *Aquatic Microbial Ecology*, 27(2), 111-124.
- Jahn, R., Abarca, N., Gemeinholzer, B., Mora, D., Skibbe, O., Kulikovskiy, M., ... & Zimmermann, J. (2017). *Planothidium lanceolatum* and *Planothidium frequentissimum* reinvestigated with molecular methods and morphology: four new species and the taxonomic importance of the sinus and cavum. *Diatom Research*, 32(1), 75-107.
- Jha, A. N., Dogra, Y., Turner, A., & Millward, G. E. (2005). Impact of low doses of tritium on the marine mussel, *Mytilus edulis*: genotoxic effects and tissue-specific bioconcentration. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 586(1), 47-57.
- Johansson, O. N., Pinder, M. I., Ohlsson, F., Egardt, J., Töpel, M., & Clarke, A. K. (2019). Friends with benefits: Exploring the phycosphere of the marine diatom *Skeletonema marinoi*. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1828.
- Jonker, C. Z., Van Ginkel, C., & Olivier, J. (2013). Association between physical and geochemical characteristics of thermal springs and algal diversity in Limpopo Province, South Africa. *Water SA*, 39(1), 95-104.
- Juggins, S. (2007). C2 Version 1.5: software for ecological and palaeoecological data analysis and visualisation.
- Jung, K. W., Lim, S., & Bahn, Y. S. (2017). Microbial radiation-resistance mechanisms. *Journal of Microbiology*, 55, 499-507.
- Jüttner, I., Rothfritz, H., & Ormerod, S. J. (1996). Diatoms as indicators of river quality in the Nepalese Middle Hills with consideration of the effects of habitat-specific sampling. *Freshwater Biology*, 36(2), 475-486.
- Karam, P. A., & Leslie, S. A. (2005). Changes in terrestrial natural radiation levels over the history of life. In *Radioactivity in the Environment* (Vol. 7, pp. 107-117). Elsevier.
- Karpenko, A. A., & Ivanovsky, Y. A. (1993). Effect of very low doses of  $\gamma$  radiation on motility of gill ciliated epithelia of *Mytilus edulis*. *Radiation research*, 133(1), 108-110.
- Karam, P. A., & Leslie, S. A. (1999). Calculations of background beta-gamma radiation dose through geologic time. *Health physics*, 77(6), 662-667.
- Katsuki, K., Lim, J., Nahm, W., & Nakanishi, T. (2012, December). Mid-late Holocene climate and ecology reconstruction around the Lagoon Mae-ho, East Korea based on diatom assemblage. In *AGU Fall Meeting Abstracts* (Vol. 2012, pp. PP41A-1994).
- Keddy, P. A. (1992). Assembly and response rules: two goals for predictive community ecology. *Journal of vegetation science*, 3(2), 157-164.
- Keegan-Treloar, R., Irvine, D. J., Solórzano-Rivas, S. C., Werner, A. D., Banks, E. W., & Currell, M. J. (2022). Fault-controlled springs: A review. *Earth-Science Reviews*, 230, 104058.

- Kelly, M. G., Trobajo, R., Rovira, L., & Mann, D. G. (2015). Characterizing the niches of two very similar *Nitzschia* species and implications for ecological assessment. *Diatom Research*, 30(1), 27-33.
- Kelly, M. G., Juggins, S., Mann, D. G., Sato, S., Glover, R., Boonham, N., ... & Walsh, K. (2020). Development of a novel metric for evaluating diatom assemblages in rivers using DNA metabarcoding. *Ecological Indicators*, 118, 106725.
- Kepner, R. (2015). Influence of Hot Spring Phages on Community Carbon Metabolism: Win, Lose or Draw?. *Advances in Microbiology*, 5(09), 630.
- Kermarrec, L., Franc, A., Rimet, F., Chaumeil, P., Frigerio, J. M., Humbert, J. F., & Bouchez, A. (2014). A next-generation sequencing approach to river biomonitoring using benthic diatoms. *Freshwater Science*, 33(1), 349-363.
- Khodashenas, A., Roayaei, E., Abtahi, S. M., & Ardalani, E. (2012). Evaluation of naturally occurring radioactive materials (NORM) in the South Western oil wells of Iran. *Journal of environmental radioactivity*, 109, 71-75.
- Kløve B, Ala-Aho P, Bertrand G, Boukalova Z, Ertürk A, Goldscheider N, Ilmonen J, Karakaya N, Kupfersberger H, Kvoerner J, Lundberg A, Mileusnić M, Moszczynska A, Muotka T, Preda E, Rossi P, Siergieiev D, Šimek J, Wachniew P, Angheluta V, Widerlund A. (2011). Groundwater dependent ecosystems. Part I: Hydroecological status and trends. *Environmental Science & Policy*, 14(7), 770-781.
- Krammer, K. (2000). Diatoms of Europe. Vol. 1: The Genus *Pinnularia*. Königstein: A.R.G. Gantner Verlag Kommanditgesellschaft.
- Krammer, K. (2002). Diatoms of Europe, Vol. 3: *Cymbella*. Königstein: A.R.G. Gantner Verlag Kommanditgesellschaft.
- Krammer, K. (2003). Diatoms of Europe; Vol.4: *Cymbopleura*, *Delicata*, *Navicymbula*, *Gomphocymbellopsis*, *Afrocymbella*. Königstein: A.R.G. Gantner Verlag Kommanditgesellschaft
- Krammer, K., Lange-Bertalot, H. (1997)a. Bacillariophyceae. 1. Teil: Naviculaceae. In: Ettl H., Gerloff J., Heynig H. & Mollenhauer D. (eds.), Süßwasserflora von Mitteleuropa, 2(1), 2th ed. Stuttgart: Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Krammer, K., Lange-Bertalot, H. (1997)b. Bacillariophyceae. 2. Teil: Bacillariaceae, Epithemiaceae, Surirellaceae. In: Ettl H., Gerloff J., Heynig H. & Mollenhauer D. (eds.), Süßwasserflora von Mitteleuropa, 2(2), 2th ed. Stuttgart: Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Krammer K., 2000. Diatoms of Europe. Vol. 1: The Genus *Pinnularia*. Königstein: A.R.G. Gantner Verlag Kommanditgesellschaft.
- Krammer, K., Lange-Bertalot, H. (2000)a. Bacillariophyceae. 3. Teil: Centrales, Fragilariaceae, Eunotiae. In: Ettl H., Gerloff J., Heynig H. & Mollenhauer D. (eds.), Süßwasserflora von Mitteleuropa, 2 (3), 2th ed. Stuttgart: Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Krammer, K., Lange-Bertalot, H. (2000)b. Bacillariophyceae. 5. Teil: English and French translation of the keys. In: Büdel B., Gärtner G., Krienitz L. & Lokhorst G.M. (eds.), Süßwasserflora von Mitteleuropa, 2(5), Stuttgart: Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.



- Krammer K., 2002. Diatoms of Europe, Vol. 3: *Cymbella*. Königstein: A.R.G. Gantner Verlag Kommanditgesellschaft.
- Krammer, K., Lange-Bertalot, H. (2004). Bacillariophyceae. 4. Teil: Achnantheaceae, kritische Ergänzungen zu *Navicula* (Lineolatae) und *Gomphonema*. In: Ettl H., Gärtner G., Heynig H. & Mollenhauer D. (eds.), Süßwasserflora von Mitteleuropa, 2(4), 2th ed. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Kresic, N. (2010). Types and classifications of springs. In *Groundwater hydrology of springs* (pp. 31-85). Butterworth-Heinemann.
- Krieger, R. A. (1963). The Chemistry of Saline Waters a. *Groundwater*, 1(4), 7-12.
- Krisko, A., & Radman, M. (2013). Biology of extreme radiation resistance: the way of *Deinococcus radiodurans*. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5(7), a012765.
- Krivograd Klemenčič A., Vrhovšek D. & Smolar-Žvanut N., 2006. Contribution on the algal flora of Slovenia, with emphasis on newly recorded algal taxa. *Acta Musei Nationalis Pragae, Series B, Historia Naturalis* **62**, (1-2): 71-80.
- Kudryasheva, N. S., & Rozhko, T. V. (2015). Effect of low-dose ionizing radiation on luminous marine bacteria: radiation hormesis and toxicity. *Journal of Environmental Radioactivity*, 142, 68-77.
- Kulikovskiy, M. S., Lange-Bertalot, H., Witkowski, A, Dorofeyuk, NI, Genkal, S. I. (2010). Diatom assemblages from Sphagnum bogs of the world. I. Nur bog in northern Mongolia. In: *Biblioth Diatomol.* Vol. 55. Germany: Gebrüder Borntraeger Verlag.
- Kyle J. E. & F. G. Ferris, (2013). Geochemistry of Virus-Prokaryote Interactions in Freshwater and Acid Mine Drainage Environments, Ontario, Canada. *Geomicrobiology Journal* 30: 769–778.
- Lai G.G., Padedda B.M., Wetzel C.E., Lugliè A., Sechi N. & Ector L., (2016). Epilithic diatom assemblages and environmental quality of the Su Gologone karst spring (central-eastern Sardinia, Italy). *Acta Botanica Croatica*, **75**(1): 129-143.
- Lai, G. G., A. Beauger, C. E. Wetzel, B. M. Padedda, O. Voldoire, A. Lugliè, E. Allain & L. Ector, (2019). Diversity, ecology and distribution of benthic diatoms in thermo-mineral springs in Auvergne (France) and Sardinia (Italy). *PeerJ*. 7: e7238.
- Lai GG, Padedda BM, Wetzel CE, Cantonati M, Sechi N, Lugliè A, Ector L. (2019b). Diatom assemblages from different substrates of the Casteldoria thermo-mineral spring (Northern Sardinia, Italy). *Bot. Lett.* 166(1):14–31.
- Lai G.G., Padedda, B.M., Ector, L., Wetzel, C.E., Lugliè A., Cantonati, M., (2019c). Mediterranean karst springs: Diatom biodiversity hotspots under the pressure of hydrological fluctuations and nutrient enrichment, *Plant Biosystems*, **154**(5): 673-684.
- Lai GG, Ector L, Wetzel CE, Lugliè A, Padedda BM. (2022). Environmental factors structuring diatom assemblages in thermo-mineral springs of Sardinia, Italy. *Freshw. Sci.*41(1):45–61. doi:10.1086/718555.
- Lampe, N., Marin, P., Coulon, M., Micheau, P., Maigne, L., Sarramia, D., ... & Breton, V. (2019). Reducing the ionizing radiation background does not significantly affect the evolution of *Escherichia coli* populations over 500 generations. *Scientific Reports*, 9(1), 14891.

- Lange-Bertalot H.,(1979). Toleranzgrenzen und Populationsdynamik benthischer Diatomeen bei unterschiedlich starker Abwasserbelastung." Arch. Hydrobiol. Suppl. 56, 184-219.
- Lange-Bertalot, H. (2001). *Navicula sensu stricto*, 10 Genera separated from *Navicula sensu lato* Frustulia. *Diatoms of Europe*. 2. Königstein: A.R.G. Gantner Verlag Kommanditgesellschaft.
- Lange-Bertalot, H., Bak, M., Witkowski, A. & Tagliaventi, N. (2011). *Diatoms of Europe: Diatoms of the European Inland Waters and Comparable Habitats*. Volume 6: *Eunotia* and some related genera. Gantner Verlag, 747 p.
- Lange-Bertalot, H., Hofmann, G., Werum, M., & Cantonati M. (2017). Freshwater Benthic Diatoms of Central Europe: Over 800 Common Species Used in Ecological Assessment. English edition with updated taxonomy and added species. Schmitt-Oberreifenberg: Koeltz Botanical Books.
- Lavoie I., Vincent W.F., Pienitz R. & Painchaud J., (2003). Dynamique temporelle des algues péiphytiques dans une rivière influencée par les activités agricoles. *Revue des sciences de l'eau*, **16**: 55-77.
- Lavoie, I., & Hamilton, P. B. (2008). Guide d'identification des diatomées des rivières de l'Est du Canada. PUQ.
- Lavoie, N., Alexander, M. E., & Macdonald, S. E. (2010). Photo guide for quantitatively assessing the characteristics of forest fuels in a jack pine–black spruce chronosequence in the Northwest Territories.
- Lavoie, I., Hamilton, P. B., Morin, S., Tiam, S. K., Kahlert, M., Gonçalves, S., ... & Taylor, J. C. (2017). Diatom teratologies as biomarkers of contamination: are all deformities ecologically meaningful?. *Ecological Indicators*, *82*, 539-550.
- Lavrinenko, A., Mappes, T., Tukalenko, E., Mousseau, T.A., Møller, A.P., Knight, R., Morton, J.T., Thompson, L.R., Watts, P.C., (2018). Environmental radiation alters the gut microbiome of the bank vole *Myodes glareolus*. *ISME J.* *12*, 2801–2806
- Le, T.H.H., H. Michel & J. Champion, (2019). 210 Po sequential extraction applied to wetland soils at uranium mining sites. *Journal of Environmental Radioactivity* *199*: 1-6.
- Lea, D. E., (1946). The inactivation of viruses by radiations. *The British Journal of Radiology* *19*:
- Leira M, Meijide-Failde R, Torres E. (2017). Diatom communities in thermo-mineral springs of Galicia (NW Spain). *Diatom Res.* *32*:29–42.
- Lecoq, C., Coste, M., & Prygiel, J. (1993). "Omnidia": software for taxonomy, calculation of diatom indices and inventories management. *Hydrobiologia*, *269*(1), 509–513.
- Lecoq H., (1864). Les eaux minérales du massif central de la France, considérées dans leurs rapports avec la chimie et la géologie. J. Rothschild, Paris, 256 p.
- Leff, A. A., L. G. Leff, M. J., Lemke, R. T., Heath & X. Gao, (1999). Abundance of planktonic virus-like particles in Lake Erie subsurface waters. *The Ohio Journal of Science* *99*, 16–18.
- Legrand R., (2019). Note synthétique de gestion. Puy de la Poix (Clermont-Ferrand). Bilan des enjeux, objectifs et actions. Conservatoire d'espaces naturels. CEN Auvergne, Riom, 16 p.
- Leira M., Meijide-Failde R. & Torres E., (2017). Diatom communities in thermo-mineral springs of Galicia (NW Spain). *Diatom Research*, **32**(1): 29-42. <https://doi.org/10.1080/0269249X.2017.1286266>

- Levkov Z. (2009). *Amphora* sensu lato. Diatoms of Europe 5. Königstein: A.R.G. Gantner Verlag Kommanditgesellschaft; p.1–916.
- Levkov, Z., Mitic-Kopanja, D., Reichardt, E., (2016). Diatoms of the European Inland Waters and Comparable Habitats. Volume 08: The diatom genus *Gomphonema* from the Republic of Macedonia. H. Lange-Bertalot Eds.
- Levkov Z., Vidaković D., Cvetkoska A., Mitić-Kopanja D., Krstić S., Van de Vijver B. & Hamilton P.B., (2019). Observations of the genus *Muelleria* (Bacillariophyceae) from the Republic of North Macedonia. *Plant Ecology and Evolution*, **152**(2): 293-312.
- Li, D., Seaman, J. C., Chang, H. S., Jaffe, P. R., van Groos, P. K., Jiang, D. T., ... & Kaplan, D. I. (2014). Retention and chemical speciation of uranium in an oxidized wetland sediment from the Savannah River Site. *Journal of environmental radioactivity*, 131, 40-46.
- Li, C. L., Witkowski, A., Ashworth, M. P., Dąbek, P., Sato, S., Zglobicka, I., Witak, M., Khim, J. S., Kwon, C. J., (2018). The morphology and molecular phylogenetics of some marine diatom taxa within the Fragilariaceae, including twenty undescribed species and their relationship to Nanofrustulum, Opephora and Pseudostaurosira. *Phytotaxa*. 355, 1–104.
- Liu, F., Du, K.J., Fang, Z., You, Y., Wen, G.B., Lin, Y.W., 2015. Chemical and biological insights into uranium-induced apoptosis of rat hepatic cell line. *Radiat. Environ. Biophys.* 54, 207–216.
- Lovrić, G., & Strohal, P. (1972). Radioecological investigations in a thermal spring region. *Limnology and Oceanography*, 17(3), 441-444.
- Lu, X., Liu, Y., & Fan, Y. (2020). Diatom taxonomic composition as a biological indicator of the ecological health and status of a river basin under agricultural influence. *Water*, 12(7), 2067.
- Majlesi, S. (2021). Radioecology for boreal ecosystems: studies on transfer processes and effects on wildlife (Doctoral dissertation, Itä-Suomen yliopisto).
- Malavoi JR., Souchon Y. (2002). Description standardisée des principaux faciès d'écoulement observables en rivière : clé de détermination qualitative et mesures physiques. *Bulletin Français de Pêche et de Pisciculture* 365-366 : 357–372.
- Mandal M, Sarkar N S. (2015). Study of diatom flora in geothermal springs of Bakreswar, West Bengal, India. *RRJoB*. 4(2):6–10.
- Mangeret, A., Blanchart, P., Alcalde, G., Amet, X., Cazala, C., & Gallerand, M. O. (2018). An evidence of chemically and physically mediated migration of <sup>238</sup>U and its daughter isotopes in the vicinity of a former uranium mine. *Journal of environmental radioactivity*, 195, 67-71.
- Mann DG, Droop SJM. (1996). Biodiversity, biogeography and conservation of diatoms. *Hydrobiologia*. 336: 19–32. Doi:10.1007/BF00010816
- Mann, D.G., Sato, S., Trobajo, R., Vanormelingen, P., Souffreau, C., (2010). DNA barcoding for species identification and discovery in diatoms. *Cryptogamie Algologie*.
- Mann, D. G., & Vanormelingen, P. (2013). An inordinate fondness? The number, distributions, and origins of diatom species. *Journal of eukaryotic microbiology*, 60(4), 414-420.
- Mannino AM. (2007). Diatoms from Thermal-Sulphur Waters of Fiume Caldo (North-western Sicily). *Cryptogam., Algol.* 28(4):385–396.

- Maranger, R., Bird, D. F. & Juniper, S. K. (1994). Viral and bacterial dynamics in Arctic sea ice during the spring algal bloom near Resolute, N.W.T., Canada. *Marine Ecology Progress Series* 111, 121–127.
- Marie, D., Partensky, F., Jacquet, S., & Vaultot, D. (1997). Enumeration and cell cycle analysis of natural populations of marine picoplankton by flow cytometry using the nucleic acid stain SYBR Green I. *Applied and environmental microbiology*, 63(1), 186-193.
- Marie, D., Brussaard, C. P., Thyrrhaug, R., Bratbak, G., & Vaultot, D. (1999). Enumeration of marine viruses in culture and natural samples by flow cytometry. *Applied and environmental microbiology*, 65(1), 45-52.
- Marikos, Mark Alan, Robert H. Hansman (1987). *Geologic Causes of Natural Radionuclide Anomalies: Proceedings of the GEORAD Conference, April 21-22, 1987, St. Louis, Missouri, Department of Natural Resources, Division of Geology and Land Survey, 1988 - 180 pages*
- Martell, E. A. (1992). Radionuclide-induced evolution of DNA and the origin of life. *Journal of molecular evolution*, 35(4), 346-355
- Märten, A., Berger, D., Köhler, M., & Merten, D. (2015). The dendroanalysis of oak trees as a method of biomonitoring past and recent contamination in an area influenced by uranium mining. *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 19417-19425.
- Martens, A., O. Richter, and F. Suhling. (2010) "The relevance of perennial springs for regional biodiversity and conservation." *Biodiversity in southern Africa* 2: 70-74.
- Martin, M., (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet j.* 1, 10–12.
- Martin, A., Landesman, C., Lépinay, A., Roux, C., Champion, J., Chardon, P., & Montavon, G. (2019). Flow period influence on uranium and trace elements release in water from the waste rock pile of the former La Commanderie uranium mine (France). *Journal of environmental radioactivity*, 208, 106010.
- Martin, A., Hassan-Loni, Y., Fichtner, A., Péron, O., David, K., Chardon, P., Colombet, J., Ejarque, A., Defive, E., Donnadiou, F., Pradeep Ram, A. S., & Montavon, G. (2020). An integrated approach combining soil profile, records and tree ring analysis to identify the origin of environmental contamination in a former uranium mine (Rophin, France). *Science of the Total Environment*, 747, 141295.
- Martínez de Fabricius AL, Maidana N, Gómez N, Sabater S. (2003). Distribution patterns of benthic diatoms in a Pampean river exposed to seasonal floods: the Cuarto River (Argentina). *Biodivers Conserv.* 12: 2443–2454. doi:10.1023/A:1025857715437
- Massello FL, Chan CS, Chan KG, Goh KM, Donati E, Urbieta MS. (2020). Meta-analysis of microbial communities in hot springs: Recurrent taxa and complex shaping factors beyond pH and temperature. *Microorganisms.* 8:906.
- McCune B, Grace JB. (2002). *Analysis of ecological communities.* Glenden Beach, Oregon (USA): MJM Software Design.
- Mayer, M. S., & Likens, G. E. (1987). The importance of algae in a shaded headwater stream as food for an abundant caddisfly (Trichoptera). *Journal of the North American Benthological Society*, 6(4), 262-269.

- McGeoch, M.A., Chown, S.L. (1998). Scaling up the value of bioindicators. *Trends in Ecology & Evolution*, vol. 13, no 2, p. 46–47.
- McIntosh, R. P. (1967). An index of diversity and the relation of certain concepts to diversity. *Ecology*, 48(3), 392-404.
- McMurdie, P.J., Holmes, S., (2013). phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS one*. 4, e61217.
- Medlin LK, Juggins S. (2018). Multivariate analyses document host specificity, differences in the diatom metaphyton vs. epiphyton, and seasonality that structure the epiphytic diatom community. *Estuar Coast Shelf Sci*. 213: 314–330. doi:10.1016/j.ecss.2018.06.011
- Mera, R., Torres, E., Abalde, J., (2016). Effects of sodium sulfate on the freshwater microalga *Chlamydomonas moewusii*: implications for the optimization of algal culture media. *J. Phycol*, 1, 75–88.
- Mertens A., Witkowski A., Lange-Bertalot H., Ribeiro L. & Rhiel E., (2014). *Navicula meulemansii* sp. nov., (Bacillariophyceae) from brackish waters in Europe and the U.S.A. *Nova Hedwigia*, **98**(1-2): 201-212.
- Métévier, H. (2001). L'uranium de l'environnement à l'homme, EDP sciences, Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire collection.
- Michard G, Stettler A, Fouillac C, Ouzounian G, Mandeville D. (1976). Superficial changes in chemical composition of the thermomineral waters of Vichy basin: geothermal implications. *Geochemical journal*. 10:155–161.
- Michard G., (1990). Behaviour of major elements and some trace elements (Li, Rb, Cs, Sr, Fe, Mn, W, F) in deep hot waters from granitic areas. *Chemical Geology*, **89**(1-2): 117-134.
- Michel M.. L'extraction de l'uranium (1978). In: *Annales de Géographie*, t. 87, n°482, pp. 398-434
- Mielke Jr, P. W. (1991). The application of multivariate permutation methods based on distance functions in the earth sciences. *Earth-Science Reviews*, 31(1), 55–71.
- Millan, F., C., Izere, V., Breton, O., Voldoire, D. G., Biron, C. E., Wetze, D., Miallier, E., Allain, L., Ector & A. Beauger, (2019). The effect of natural radioactivity on diatom communities in mineral springs. *Botany Letters* 8107: 95-113.
- Millie DF, Lowe RL. (1983). Studies on Lake Erie's littoral algae; Host specificity and temporal periodicity of epiphytic diatoms. *Hydrobiologia*. 99: 7–18. doi:10.1007/BF00013712
- Mohanty, A.K., Sengupta, D., Das, S.K., Saha, S.K., Van, K.V., (2004). Natural radioactivity and radiation exposure in the high background area at Chhatrapur beach placer deposit of Orissa, India. *J. Environ. Radioact.* 1, 15–33.
- Møller, A.P., Mousseau, T.A., (2007). Species richness and abundance of forest birds in relation to radiation at Chernobyl. *Biol. Lett.* 5, 483–486.
- Møller, A. P., & Mousseau, T. A. (2007). Determinants of interspecific variation in population declines of birds after exposure to radiation at Chernobyl. *Journal of Applied Ecology*, 44(5), 909-919.
- Møller, A. P., Erritzøe, J., Karadas, F., & Mousseau, T. A. (2010). Historical mutation rates predict susceptibility to radiation in Chernobyl birds. *Journal of Evolutionary Biology*, 23(10), 2132-2142.

- Møller, A. P., & Mousseau, T. A. (2013). The effects of natural variation in background radioactivity on humans, animals and other organisms. *Biological Reviews*, 88(1), 226-254.
- Mondani, L., Benzerara, K., Carrière, M., Christen, R., Mamindy-Pajany, Y., Février, L., ... & Chapon, V. (2011). Influence of uranium on bacterial communities: a comparison of natural uranium-rich soils with controls. *PLoS One*, 6(10), e25771.
- Mora-Gómez, J., Freixa, A., Perujo, N., & Barral-Fraga, L. (2016). Limits of the biofilm concept and types of aquatic biofilms. *Aquatic biofilms: Ecology, water quality and wastewater treatment*, 3-28.
- Morais, V.H.T., de Luna Filho, R.L.C., dos Santos Júnior, J.A., Siqueira, W.N., Pereira, D.R., Lima, M.V., Fagundes Silva, H.A.M., Joacir de França E., dos S.Amaral, R., de Albuquerque Melo, A.M.M., (2022). Use of *Biomphalaria glabrata* as a bioindicator of groundwater quality under the influence of NORM. *J. Environ. Radioact.* 242, 106791.
- Moresco C, Rodrigues L. (2014). Periphytic diatom as bioindicators in urban and rural streams. *Acta Sci Biol Sci.* 36(1): 67–78. doi:10.4025/actasciobiolsoci.v36i1.18175
- Morgan, W. F., Day, J. P., Kaplan, M. I., McGhee, E. M., & Limoli, C. L. (1996). Genomic instability induced by ionizing radiation. *Radiation research*, 146(3), 247-258.
- Morgan, W. F., & Sowa, M. B. (2007). Non-targeted bystander effects induced by ionizing radiation. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 616(1-2), 159-164.
- Morgan, W. F., & Bair, W. J. (2013). Issues in low dose radiation biology: the controversy continues. A perspective. *Radiation research*, 179(5), 501-510.
- Morin, S., Lambert, A. S., Artigas, J., Coquery, M., & Pesce, S. (2012). Diatom immigration drives biofilm recovery after chronic copper exposure. *Freshwater Biology*, 57(8), 1658–1666.
- Morin, S., Lambert, A. S., Rodriguez, E. P., Dabrin, A., Coquery, M., & Pesce, S. (2017). Changes in copper toxicity towards diatom communities with experimental warming. *Journal of hazardous materials*, 334, 223–232.
- Mortágua, A., Vasselon, V., Oliveira, R., Elias, C., Chardon, C., Bouchez, A., ... & Almeida, S. F. (2019). Applicability of DNA metabarcoding approach in the bioassessment of Portuguese rivers using diatoms. *Ecological indicators*, 106, 105470.
- Mottet G. (1999). *Géographie physique de la France*. Paris : Presse Universitaire de France Eds.
- Mousseau, T.A., Møller, A.P., (2011). Landscape portrait: A look at the impacts of radioactive contaminants on Chernobyl's wildlife. *Bulletin of the Atomic Scientists*. 67, 38–46.
- Mpawenayo B, Cocquyt C, Nindorera A. (2005). Les diatomées (Bacillariophyta) et autres algues des sources thermales du Burundi (Afrique Centrale) en relation avec les caractéristiques physiques et chimiques des eaux. [Diatoms (Bacillariophyta) and other algae from the thermal springs of Burundi (Central Africa) in relation to the physical and chemical characteristics of the waters]. *Belg. J. Bot.* 138:152–164.
- Murphy, J.F., Nagorskaya, L.L., Smith, J.T., (2011). Abundance and diversity of aquatic macroinvertebrate communities in lakes exposed to Chernobyl-derived ionising radiation. *J. Environ. Radioact.* 102, 688–694.

- Nagasawa, H., & Little, J. B. (1992). Induction of sister chromatid exchanges by extremely low doses of  $\alpha$ -particles. *Cancer research*, 52(22), 6394-6396.
- Nagasawa, H., Peng, Y., Wilson, P. F., Lio, Y. C., Chen, D. J., Bedford, J. S., & Little, J. B. (2005). Role of homologous recombination in the alpha-particle-induced bystander effect for sister chromatid exchanges and chromosomal aberrations. *Radiation research*, 164(2), 141-147.
- Nayak, T., De, D., Karmakar, P., Deb, A., & Dhal, P. K. (2021). Microbial communities of the drinking water with gradient radon concentration are primarily contributed by radon and heavy metal content. *Frontiers in Environmental Science*, 156.
- Nicholson KN. (1993). *Geothermal Fluids. Chemistry and Exploration Techniques*. Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong: Springer-Verlag.
- Nikulina TV, Kociolek JP. (2011). Diatoms from Hot Springs from Kuril and Sakhalin Islands (Far East, Russia). In: Seckbach J, Kociolek P. (eds) *The Diatom World. Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology*, vol 19. Springer, Dordrecht.
- Nistal-García, A., García-García, P., García-Girón, J., Borrego-Ramos, M., Blanco, S., & Bécares, E. (2021). DNA metabarcoding and morphological methods show complementary patterns in the metacommunity organization of lentic epiphytic diatoms. *Science of The Total Environment*, 786, 147410.
- Nivet V., (1846). Suite du dictionnaire des eaux minérales du département du Puy-de-Dôme. *Annales scientifiques, littéraires et industrielles de l'Auvergne*, **19**: 17-208.
- Noga T, Rybak M, Peszek L, Poradowska A, Kochman-Keędziora N, Solak C. (2018). Mofette spring – unusual environment for microbial life on the example of diatoms. Poster session presented at: 13th International Symposium on Fisheries and Aquatic Sciences (FABA 2018), in Ankara, Turkey.
- Odum, Howard T. (1957) "Trophic structure and productivity of Silver Springs, Florida." *Ecological monographs* 27.1: 55-112.
- Odum E, Barrett GW. (1971). *Fundamentals of Ecology*. Fifth edition., Belmont: Thomson Brooks/Cole CA.
- Odum EP. (1985). Trends expected in stressed ecosystems. *Bioscience* 35(7):419–422. doi:
- Oksanen, J., Simpson, G.L., Blanchet, F.G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P.R., O'hara, R.B., Solymos, P., Stevens, H.H., Szoecs, E., Wagner, H., Barbour, M., Bedward, M., Bolker, B., Borcard, D., Carvalho, G., Chirico, M., De Caceres, M., Durand, S., Evangelista, H.B.A., FitzJohn, R., Friendly, M., Furneaux, B., Hanningan, G., Hill, M.O., Lahti, L., McGlinn, D., Ouellette, M.H., Cunha, E.R., Smith, T., Stier, A., Ter Braak, C.J.F., Weedon, J., , 2022. Package 'vegan'. Community ecology package, version, 2.6-2. <https://github.com/vegandevs/vegan>
- O'Leary J.W. & Glenn E.P., (1994). Global distribution and potential for halophytes. In: Squires V.R. & Ayoub A.T. (eds.), *Halophytes as resource for livestock and rehabilitation of degraded lands. Tasks for Vegetation Science*, **32**: 7-17.
- Oliveira, J., Moreira, S.R.D., Mazzilli, B., (1994). Natural radioactivity in mineral spring waters of a highly radioactive region of Brazil and consequent population doses. *Radiat. Prot. Dosim.* 55, 57–59.

- Olivier J, Venter JS, Jonker CZ. (2011). Thermal and chemical characteristics of hot water springs in the northern part of the Limpopo Province, South Africa. *Water SA* 37:427–436.
- Olson, R. J., Zettler, E. R., Chisholm, S. W., & Dusenberry, J. A. (1991). Advances in oceanography through flow cytometry. In *Particle analysis in oceanography* (pp. 351-399). Springer, Berlin, Heidelberg.
- O'Quinn R, Sullivan MJ. (1983). Community structure dynamics of epilithic and epiphytic diatoms in a Mississippi stream. *J Phycol.* 19(2): 123–128.
- Ouzounian G, Michard G, Fouillac C, Beaucaire C. (1980). Relations entre les concentrations en ions alcalins dans les eaux thermales sulfurées sodiques du midi de la France. [Relations between the concentrations of alkaline ions in the sodium sulphide thermal waters of the south of France]. *Chem. Geol.* 30:317–339.
- Owen RB, Renaut RW, Jones B. (2008). Geothermal diatoms: a comparative study of floras in hot spring systems of Iceland, New Zealand, and Kenya. *Hydrobiologia.* 610: 175–192.
- Pandey, L.K., Bergey, E.A., Lyu, J., Park, J., Choi, S., Lee, H., Depuydt, S., Oh, Y.T., Lee, S.M., Han, T., (2017). The use of diatoms in ecotoxicology and bioassessment: Insights, advances and challenges. *Water Res.* 118, 39–58.
- Pardo, I., Delgado, C., Abraín, R., Gómez-Rodríguez, C., García-Roselló, E., García, L., & Reynoldson, T. B. (2018). A predictive diatom-based model to assess the ecological status of streams and rivers of Northern Spain. *Ecological Indicators*, 90, 519–528.
- Parikka, K. J., M., Le Romancer, N., Wauters & S. Jacquet, (2017). Deciphering the virus-to-prokaryote ratio (VPR): Insights into virus–host relationships in a variety of ecosystems. *Biological Reviews* 92: 1081–1100.
- Parikka, K. J., S., Jacquet, J., Colombet, D., Guillaume & M. Le Romancer, (2018). Abundance and observations of thermophilic microbial and viral communities in submarine and terrestrial hot fluid systems of the French Southern and Antarctic Lands. *Polar Biology* 41: 1335–1352.
- Patrick, R., (1977). Ecology of freshwater diatoms and diatom communities, in: Werner, D., (Eds.), *The biology of diatoms*. Botanical monographs 13, Blackwell Scientific Publications, California, pp. 284–332.
- Peduzzi, P. & F. Schiemers, (2004). Bacteria and viruses in the water column of tropical freshwater reservoirs. *Environmental Microbiology* 6: 707-715.
- Pentecost, A., Jones, B., & Renaut, R. W. (2003). What is a hot spring?. *Canadian Journal of Earth Sciences*, 40(11), 1443-1446.
- Pérez-Burillo, J., Trobajo, R., Leira, M., Keck, F., Rimet, F., Sigró, J., Mann, D. G., (2021). DNA metabarcoding reveals differences in distribution patterns and ecological preferences among genetic variants within some key freshwater diatom species. *Sci. Total Environ.* 798, 149029.
- Péterfi, L., (1974). Preliminary notes on the subfossil and recent diatom flora of the Zánoguța peat bog from the Retezat Mountains. *Stud. Univ. Babeş-Bolyai, Ser. 2., Biol.*, 19: 5–17.
- Petersen J.B., (1915). Studier over danske aërofile alger. *Det Kongelige Danske videnskabernes selskabs skrifter. Naturvidenskabelig og matematisk afdeling, ser. 7*, 12: 272-379, 4 pls.



- Piernik A., (2012). *Ecological pattern of inland salt marsh vegetation in central Europe*. Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu Mikołaja Kopernika, Toruń, 229 p.
- Piredda, R., Claverie, J. M., Decelle, J., de Vargas, C., Dunthorn, M., Edvardsen, B., ... & Zingone, A. (2018). Diatom diversity through HTS-metabarcoding in coastal European seas. *Scientific Reports*, 8(1), 18059.
- Pociecha, A., Wojtal, A. Z., Szarek-Gwiazda, E., Cieplok, A., Ciszewski, D., & Cichoń, S. (2020). Neo-and paleo-limnological studies on diatom and cladoceran communities of subsidence ponds affected by mine waters (S. Poland). *Water*, 12(6), 1581.
- Poljakoff-Mayber A. & Gale J. (eds.), (1975). Plants in saline environments. *Ecological Studies*, **15**. Springer, Berlin, Heidelberg, 219 p.
- Potapova, M.G., Charles, D.F., (2002). Benthic diatoms in USA rivers: distributions along spatial and environmental gradients. *J. Biogeogr.* 29, 167–187.
- Potapova MG, Ponader KC. (2004). Two common north American diatoms, *Achnanthisidium rivulare* sp. nov. and *A. deflexum* (reReimer) Kingston: Morphology, ecology and comparison with related species. *Diatom Res.* 19 (1):33-57.
- Potapova M, Charles DF. (2005). Choice of substrate in algae-based water-quality assessment. *Freshw Sci.* 24(2): 415–427.
- Potapova, M. (2010). *Planolithidium frequentissimum*. Diatoms of the United States.
- Potapova M., (2011). Patterns of diatom distribution in relation to salinity. In: Seckbach J. & Kociolek P. (eds), *The Diatom World. Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology*, **19**: 313-332. Springer, Dordrecht.
- Pradhan, D., & Sukla, L. B. (2019). Removal of Radon from Radionuclide-Contaminated Water Using Microalgae. In: Sukla, L., Subudhi, E., Pradhan, D. (eds) *The Role of Microalgae in Wastewater Treatment* (pp. 75–86). Springer, Singapore.
- Pradeep Ram AS, Palesse S, Colombet J, Thouvenot T & Sime-Ngando T. (2014). The relative importance of viral lysis and nanoflagellate grazing for prokaryotic mortality in temperate lakes. *Freshwater Biology*, 59: 300–11.
- Pradeep Ram, A. S., Keshri, J., & Sime-Ngando, T. (2019). Distribution patterns of bacterial communities and their potential link to variable viral lysis in temperate freshwater reservoirs. *Aquatic Sciences*, 81(4), 1-12.
- Prygiel, J., & Coste, M. (2000) Guide méthodologique pour la mise en oeuvre de l'indice Biologique Diatomées NF T 90-354. Agences de l'Eau - Cemagref de Bordeaux, 134 pp
- Pumas C, Pruetiworanan S, Peerapornpisal Y. (2018). Diatom diversity in some hot springs of northern Thailand. *Botanica*. 24:69–86.
- Quenardel, J. M., Santallier, D., Burg, J. P., Bril, H., Cathelineau, M., & Marignac, C. (1991). Le Massif Central/The central massif. *Sciences Géologiques, bulletins et mémoires*, 44(1), 105-206.
- Quintela A, Almeida SFP, Terroso D, Ferreira da Silva E, Forjaz V, Rocha F. (2013). Diatom assemblages of thermal and mineral waters from volcanic environments in São Miguel Island, Azores. *Diatom Res.* 28:407–417. doi:10.1080/0269249X.2013.822833.

- Rowland JC, Manga M, Rose TP. (2008). The influence of poorly interconnected fault zone flow paths on spring geochemistry. *Geofluids*. 8:93–101.
- Rakowska B., (199. Diatom communities in a salt spring at Pełczyska (Central Poland). *Biologia*, **52**(4): 489-493.
- Ramade F. (2009). *Ecologie fondamentale-Éléments d'écologie*. 4e édition. Paris : Dunod.
- Risler JJ. (1974). Description et classification géologique des sources minérales et thermales du Massif Central. Description and geological classification of the mineral and thermal springs of the Massif Central. Report No : B.R.G.M. 74-SGN-418 MCE. Orléans : Bureau de Recherches Géologiques et Minières, Service des eaux minérales et thermales.
- Rassner SME, Anesio AM, Girdwood SE, Hell K, Gokul JK, Whitworth DE, Edwards A, (2016). Can the bacterial community of a high arctic glacier surface escape viral control? *Frontiers in Microbiology* 7: 956.
- Ravanat, J. L. & T. Douki, (2016). UV and ionizing radiations induced DNA damage, differences and similarities. *Radiation Physics and Chemistry* 128: 92-102.
- Reardon, C.L., Cummings, D.E., Petzke, L.M., Kinsall, B.L., Watson, D.B., Peyton, B.M., Geesey, G.G., (2004). Composition and diversity of microbial communities recovered from surrogate minerals incubated in an acidic uranium-contaminated aquifer. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 6037–6046.
- Reisz, J. A., Bansal, N., Qian, J., Zhao, W., & Furdui, C. M. (2014). Effects of ionizing radiation on biological molecules—mechanisms of damage and emerging methods of detection. *Antioxidants & redox signaling*, 21(2), 260-292.
- Reimer, P.J., Austin, W.E.N., Bard, E., Bayliss, A., Blackweel, P.G., Ramsey, C. B., Butzin, M., Cheng, H., Edwards, R. L., Friedrich, M., Grootes, P. M., Guilderson, T. P., Hajdas, I., Heaton, T. J., Hogg, A. G., Hughen, K. A., Kromer, B., Manning, S. W., Muscheler, R., Palmer, J. G., Pearson, C., van der Plicht, J., Reimer, R. W., Richards, D. A., Scott, E. M., Southon, J. R., Turney, C. S. M., Wacker, L., Adolphi, F., Büntgen, U., Capano, M., Fahrni, S. M., Fogtmann-Schulz, A., Friedrich, R., Köhler, P., Kudsk, S., Miyake, F., Olsen, J., Reinig, F., Sakamoto, M., Sookdeo, A., & Talamo, S. (2020) The IntCal20 Northern Hemisphere radiocarbon age calibration curve (0–55 cal kBP). *Radiocarbon* 62(4): 725–757.
- Reimold R.J. & Queen W.H. (eds), (1974). *Ecology of halophytes*. Academic Press, INC, New York–London, 607 p. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-586450-3.X5001-X>
- Reiss, M. & P. Chiffard, (2017). An opinion on spring habitats within the earth's critical zone in headwater regions. *Water* 9: 645.
- Remane A., (1940). Einführung in die zoologische Ökologie der Nord- und Ostsee. In: Grimpe G. & Wagler E. (eds.), *Die Tierwelt der Nord- und Ostsee*. vol. 1 (Ia). Akademische Verlagsgesellschaft Becker & Erler, Leipzig, 238 p.
- Ribeiro L., (2010). Intertidal benthic diatoms of the Tagus estuary: Taxonomic composition and spatial-temporal variation. PhD Thesis, Universidade de Lisboa, 311 p.
- Rich, V. I., & Maier, R. M. (2015). Aquatic environments. In *Environmental microbiology* (pp. 111-138). Academic Press.

Rimet, F., Chonova, T., Gassiole, G., Kahlert, M., Keck, F., Kelly, M., Kulikovskiy, M., Mann, D., Pfannkuchen, M.A., Baričević, A., Trobajo, R., Vasselon, V., Zimmermann, J., Wetzel, C.E., Bouchez, A., (2021). Diat.barcode: a DNA tool to decipher diatom communities for the evaluation environmental pressures. ARPHA Conference Abstracts 4: e64940.

Rihs, S., Condomines, M., & Fouillac, C. (1997). U-and Th-series radionuclides in CO<sub>2</sub>-rich geothermal systems in the French Massif Central. *Journal of Radioanalytical and nuclear Chemistry*, 226(1-2), 149-157.

Rihs, S., Condomines, M., & Poidevin, J. L. (2000). Long-term behaviour of continental hydrothermal systems: U-series study of hydrothermal carbonates from the French Massif Central (Allier Valley). *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 64(18), 3189-3199.

Risler, J.J., (1974). Description et classification géologique des sources minérales et thermales du Massif Central [Description and geological classification of the mineral and thermal springs of the Massif Central]. Report of B.R.G.M. 74- SGN-418 MCE. Orléans : Bureau de Recherches Géologiques et Minières, Service des eaux minérales et thermales.

Rivera, S.F., Vasselon, V., Bouchez, A., Rimet, F., (2020). Diatom metabarcoding applied to large scale monitoring networks: Optimization of bioinformatics strategies using Mothur software. *Ecol. Indic.* 109 : 105775.

Robertson, A., J. Allen, R. Laney & A. Curnow, (2013). The Cellular and Molecular Carcinogenic Effects of Radon Exposure: A Review. *International Journal of Molecular Sciences* 14: 14024-14063.

Rodriguez, M., Cantonati, M., Spitale, D., & Zaccone, C.: Impact of cattle grazing on peat properties and diatoms, EGU General Assembly (2022), Vienna, Austria, 23–27 May 2022, EGU22-9910,

Romani, A. M. (2009). Freshwater biofilms. *Biofouling*, 137-153.

Roubeix, V., Mazzella, N., Mechin, B., Coste, M., & Delmas, F. (2011). Impact of the herbicide metolachlor on river periphytic diatoms: experimental comparison of descriptors at different biological organization levels. In *Annales of Limnologie-International Journal of Limnology*, 47( 3), 239–249.

Round F.E. & Sims P.A., (1981). The distribution of diatom genera in marine and freshwater environments and some evolutionary considerations. In: Ross, R. (ed.), *Proceedings of the Sixth Symposium on Recent and Fossil Diatoms. Budapest, September 1-5, 1980. Taxonomy Morphology Ecology Biology*. Otto Koeltz, Koenigstein, 301-320.

Round FE. (1991). Diatoms in river water-monitoring studies. *J Appl Phycol.* 3: 129–145.

Roudnew, B., T. J. Lavery, J. R. Seymour, R. J. Smith & J. G. Mitchell, (2013). Spatially varying complexity of bacteria and virus-like particle communities within an aquifer system. *Aquatic Microbial Ecology* 68: 259– 266.

Roux, S., Enault F, Robin A, Ravet V, Personnic S, Theil, S, Colombet J, Sime-Ngando T & Debroas D. (2012). Assessing the diversity and specificity of two freshwater viral communities through metagenomics. *PLoS One.* 7:e33641.

Roy, S., Llewellyn, C. A., Egeland, E. S., & Johnsen, G. (Eds.). (2011). *Phytoplankton pigments: characterization, chemotaxonomy and applications in oceanography*. Cambridge University Press.

- Rühland, K., Paterson, A. M., & Smol, J. P. (2008). Hemispheric-scale patterns of climate-related shifts in planktonic diatoms from North American and European lakes. *Global Change Biology*, 14(11), 2740–2754.
- Sabaka T.J., Olsen N., Tyler R.H. & Kuvshinov A., (2015). CM5, a pre-Swarm comprehensive geomagnetic field model derived from over 12 yr of CHAMP, Ørsted, SAC-C and observatory data. *Geophysical Journal International*, 200(3): 1596-1626.
- Sabater S, Roca JR. (1990). Some factors affecting distribution of diatom assemblages in Pyrenean springs. *Freshw. Biol.* 24(3): 493–507.
- Sabater S. & Roca J.R., (1992). Ecological and biogeographical aspects of diatom distribution in Pyrenean springs. *British Phycological Journal*, 27(2): 203-213.
- Sabater S, Gregory SV, Sedell JR. (1998). Community dynamics and metabolism of benthic algae colonizing wood and rock substrata in a forest stream. *J Phycol.* 34(4): 561–567.
- Salbu, B. and Lind, O.C., (2020). Analytical techniques for charactering radioactive particles deposited in the environment. *Journal of Environmental Radioactivity*, 211, 106078.
- Sazykina, T. G., & Kryshev, A. I. (2003). Effects of ionizing radiation to aquatic organisms. The EPIC database. *Protection of the Environment from the Effects of Ionizing Radiation*, 91.
- Sbihi, K., Cherifi, O., & Bertrand, M. (2012). Toxicity and biosorption of chromium from aqueous solutions by the diatom *Planothidium lanceolatum* (Brébisson) Lange-Bertalot. *American Journal of Scientific and Industrial Research*, 3(1), 27–38.
- Sbihi, K., Cherifi, O., Bertrand, M., & El Gharmali, A. (2014). Biosorption of metals (Cd, Cu and Zn) by the freshwater diatom *Planothidium lanceolatum*: a laboratory study. *Diatom research*, 29(1), 55–63.
- Schnepf N.R., Manoj C., Kuvshinov A., Toh H. & Maus S., (2014). Tidal signals in ocean-bottom magnetic measurements of the Northwestern Pacific: observation versus prediction. *Geophysical Journal International*, 198(2): 1096-1110.
- Schoeller H, Schoeller M. (1977). Caractéristiques et origine des constituants majeurs dissous des eaux thermominérales du Massif Central français. [Characteristics and origin of the main dissolved components of the thermomineral waters of the French Massif Central.] *C.R. Acad.Sc.Paris*, 285(Série D):1407-1410.
- Schöner, A., Noubactep, C., Büchel, G., & Sauter, M. (2009). Geochemistry of natural wetlands in former uranium milling sites (eastern Germany) and implications for uranium retention. *Geochemistry*, 69, 91-107.
- Schöner, A., Noubactep, C., Büchel, G., & Sauter, M. (2009). Geochemistry of natural wetlands in former uranium milling sites (eastern Germany) and implications for uranium retention. *Geochemistry*, 69, 91-107.
- Schowe, K. (2012). Diatom communities across a gradient of acid mine drainage on the West Coast, South Island, New Zealand.
- Schweichhart, J. S. (2022). Prokaryotic Viruses: Intriguing Players in the Aquatic Realm.
- Segadelli, S., Cantonati, M., Bertoni, E., Spitale, D., Angeli, N., & Borsato, A. (2015, June). Can reference spring diatom communities be predicted from simple aquifer and emergence-site

- characteristics. In *9th Use of Algae for Monitoring Rivers and comparable habitats (UAMRIch) and International Workshop on Benthic Algae Taxonomy (InBAT)*. June (Vol. 15, No. 19, p. 2015).
- Sheppard, S. C., Evenden, W. G., & Anderson, A. J. (1992). Multiple assays of uranium toxicity in soil. *Environmental Toxicology and Water Quality*, 7(3), 275-294.
- Shevah Y., 2014. 1.4 - Adaptation to Water Scarcity and Regional Cooperation in the Middle East. In: *Comprehensive Water Quality and Purification 1*, Satinder Ahuja, Elsevier, 40-70. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382182-9.00004-9>.
- Sims P.A., Mann D.G. & Medlin L.K., (2006). Evolution of the diatoms: insights from fossil, biological and molecular data. *Phycologia*, 45(4): 361-402.
- Shukla, A., Parmar, P., & Saraf, M. (2017). Radiation, radionuclides and bacteria: An in-perspective review. *Journal of environmental radioactivity*, 180, 27-35.
- Shuryak, I. (2018). Modeling species richness and abundance of phytoplankton and zooplankton in radioactively contaminated water bodies. *Journal of environmental radioactivity*, 192, 14-25.
- Shuryak, I. (2019). Review of microbial resistance to chronic ionizing radiation exposure under environmental conditions. *Journal of environmental radioactivity*, 196, 50-63.
- Skwarzec, B., & Falkowski, L. (1988). Accumulation of <sup>210</sup>Po in Baltic invertebrates. *Journal of Environmental Radioactivity*, 8(2), 99-109.
- Sime-Ngando, T., & Colombet, J. (2009). Virus et prophages dans les écosystèmes aquatiques. *Canadian journal of microbiology*, 55(2), 95-109. Sime-Ngando, T. (2014). Environmental bacteriophages: viruses of microbes in aquatic ecosystems. *Front Microbiol* 5: 355.
- Simler, R. (2009). DIAGRAMMES: Logiciel d'hydrochimie multilingage en distribution libre. *Laboratoire d'Hydrogéologie d'Avignon, France*.
- Song, Y., Xie, L., Lee, Y., Brede, D. A., Lyne, F., Kassaye, Y., ... & Tollefsen, K. E. (2020). Integrative assessment of low-dose gamma radiation effects on *Daphnia magna* reproduction: Toxicity pathway assembly and AOP development. *Science of the total environment*, 705, 135912.
- Snoeijs, P., & Notter, M. (1993). Benthic diatoms as monitoring organisms for radionuclides in a brackish-water coastal environment. *Journal of environmental radioactivity*, 18(1), 23-52.
- Soares, M. C. S., Huszar, V. L., & Roland, F. (2007). Phytoplankton dynamics in two tropical rivers with different degrees of human impact (Southeast Brazil). *River research and applications*, 23(7), 698-714.
- Soininen, J., Paavola, R., & Muotka, T. (2004). Benthic diatom communities in boreal streams: community structure in relation to environmental and spatial gradients. *Ecography*, 27(3), 330-342.
- Soininen, J. (2007). Environmental and spatial control of freshwater diatoms—a review. *Diatom research*, 22(2), 473-490.
- Soininen, J., Jamoneau, A., Rosebery, J., & Passy, S. I. (2016). Global patterns and drivers of species and trait composition in diatoms. *Global ecology and biogeography*, 25(8), 940-950.
- Sompong, U., Hawkins, P. R., Besley, C., & Peerapornpisal, Y. (2005). The distribution of cyanobacteria across physical and chemical gradients in hot springs in northern Thailand. *FEMS microbiology ecology*, 52(3), 365-376.

- Spaulding S.A. & Stoermer E.F., (199). Taxonomy and distribution of the genus *Muelleria* Frenguelli. *Diatom Research*, 12(1): 95- 113
- Spaulding, S. A., Kociolek, J. P., & Wong, D. (1999). A taxonomic and systematic revision of the genus *Muelleria* (Bacillariophyta). *Phycologia*, 38(4), 314-341.
- Stevens, Lawrence E. "The springs biome, with an emphasis on arid regions." (2020): 354-370.
- Stevens, L. E., Schenk, E. R., & Springer, A. E. (2021). Springs ecosystem classification. *Ecological Applications*, 31(1), e2218.
- Stevenson, R. J., & Hashim, S. (1989) Variation in diatom community structure among habitats in sandy streams. *Journal of phycology*, 25(4), 678-686.
- Stevenson, R. J., Pan, Y., & Van Dam, H. (1999). Assessing environmental conditions in rivers and streams with diatoms. *The diatoms: applications for the environmental and earth sciences*, 1(4).
- Stevenson, J. (2014). Ecological assessments with algae: a review and synthesis. *Journal of Phycology*, 50(3), 437-461.
- Sullivan, R., Fassolitis, A. C., Larkin, E. P., Read Jr, R. B., & Peeler, J. T. (1971). Inactivation of thirty viruses by gamma radiation. *Applied microbiology*, 22(1), 61-65.
- Sullivan MJ. 1982. Similarity of an epiphytic and edaphic diatom community associated with *Spartina alterniflora*. *Trans Am Micros Soc.* 101(1): 84–90. doi:10.2307/3225573
- Suriya, J., Chandra Shekar, M., Nathani, N. M., Suganya, T., Bharathiraja, S., & Krishnan, M. (2017). Assessment of bacterial community composition in response to uranium levels in sediment samples of sacred Cauvery River. *Applied microbiology and biotechnology*, 101, 831-841.
- Sutcliffe, B., Chariton, A. A., Harford, A. J., Hose, G. C., Greenfield, P., Elbourne, L. D., ... & Paulsen, I. T. (2017). Effects of uranium concentration on microbial community structure and functional potential. *Environmental microbiology*, 19(8), 3323-3341.
- Suttle, C. A. (2007). Marine viruses—major players in the global ecosystem. *Nature reviews microbiology*, 5(10), 801-812.
- Suzuki, Y., & Banfield, J. F. (2004). Resistance to, and accumulation of, uranium by bacteria from a uranium-contaminated site. *Geomicrobiology journal*, 21(2), 113-121.
- Sylvestre, F., Beck-Eichler, B., Duleba, W., & Debenay, J. P. (2001). Modern benthic diatom distribution in a hypersaline coastal lagoon: the Lagoa de Araruama (RJ), Brazil. *Hydrobiologia*, 443, 213-231.
- Tabak, H. H., Lens, P., Van Hullebusch, E. D., & Dejonghe, W. (2005). Developments in bioremediation of soils and sediments polluted with metals and radionuclides–1. Microbial processes and mechanisms affecting bioremediation of metal contamination and influencing metal toxicity and transport. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 4, 115-156.
- Taberlet, P., Coissac, E., Hajibabaei, M., & Rieseberg, L. H. (2012). Environmental dna. *Molecular ecology*, 21(8), 1789-1793.
- Tan, C. L. (2016). Big gaps and short bridges: A model for solving the discontinuity problem. *Answers Research Journal*, 9(6), 149-162.

- Targett N.M., Bishop S.S., McConnell O.J. & Yoder J.A., 1983. Antifouling agents against the benthic marine diatom, *Navicula salinicola* Homarine from the gorgonians *Leptogorgia virgulata* and *L. setacea* and analogs. *Journal of Chemical Ecology*, **9**(7): 817-829. <https://doi.org/10.1007/BF00987807>
- Taukulis F.E. & John J., 2006. Diatoms as ecological indicators in lakes and streams of varying salinity from the wheatbelt region of Western Australia. *Journal of the Royal Society of Western Australia*, **89**(1): 17-25.
- Taxböck, L., Karger, D. N., Kessler, M., Spitale, D., & Cantonati, M. (2020). Diatom species richness in Swiss springs increases with habitat complexity and elevation. *Water*, *12*(2), 449.
- Tazaki, K. (2013). Clays, micro-organisms and biomineralization. In *Developments in clay science* (Vol. 5, pp. 613-653). Elsevier.
- Thomas, R., Berdjeb, L., Sime-Ngando, T., & Jacquet, S. (2011). Viral abundance, production, decay rates and life strategies (lysogeny versus lysis) in Lake Bourget (France). *Environmental microbiology*, *13*(3), 616-630.
- Thonat A., (2014) Notice explicative de la carte géologique de Massiac au 1/50 000. 0765. Edition BRGM. 138P
- Thomas, R., Berdjeb, L., Sime-Ngando, T., & Jacquet, S. (2011). Viral abundance, production, decay rates and life strategies (lysogeny versus lysis) in Lake Bourget (France). *Environmental microbiology*, *13*(3), 616-630.
- Townsend, S. A., & Gell, P. A. (2005). The role of substrate type on benthic diatom assemblages in the Daly and Roper Rivers of the Australian wet/dry tropics. *Hydrobiologia*, *548*, 101-115.
- Trabert, Z. (2017). The diatom genus *Gomphonema* from the Republic of Macedonia. *Acta Botanica Hungarica*, *59*(1-2), 276-277.
- Trobajo, R., Rovira, L., Mann, D. G., & Cox, E. J. (2011). Effects of salinity on growth and on valve morphology of five estuarine diatoms. *Phycological Research*, *59*(2), 83-90.
- Truchot, P. (1878). Dictionnaire des eaux minérales du département du Puy-de-Dôme, par P. Truchot... A. Delahaye.
- Truesdale, G. A., Downing, A. L., & Lowden, G. F. (1955). The solubility of oxygen in pure water and sea-water. *Journal of Applied Chemistry*, *5*(2), 53-62.
- Tseng, C.-H., P.-W. Chiang, F.-K. Shiah, Y.-L. Chen, J.-R. Liou, T.-C. Hsu, S. Maheswararajah, I. Saeed, S. Halgamuge, et S.-L. Tang. (2013). Microbial and viral metagenomes of a subtropical freshwater reservoir subject to climatic disturbances. *The ISME journal*, *7*(12), 2374-2386.
- Tuomi, P., Fagerbakke, K. M., Bratbak, G., & Heldal, M. (1995). Nutritional enrichment of a microbial community: the effects on activity, elemental composition, community structure and virus production. *FEMS microbiology ecology*, *16*(2), 123-134.
- Tudesque, L. (2011). Analyse temporelle et spatiale des composantes chimiques, hydromorphologiques et diatomiques en relation avec les changements globaux (Doctoral dissertation, Université de Toulouse, Université Toulouse III-Paul Sabatier).
- Uddin, S., Behbehani, M., Al-Ghadban, A. N., Sajid, S., Kumar, V. V., Al-Musallam, L., ... & Alam, F. (2018). 210Po concentration in selected diatoms and dinoflagellates in the northern Arabian Gulf. *Marine pollution bulletin*, *129*(1), 343-346.

- Uralbekov, B., Smodis, B., & Burkitbayev, M. (2011). Uranium in natural waters sampled within former uranium mining sites in Kazakhstan and Kyrgyzstan. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 289(3), 805-810.
- Van Dam H., Mertens A. & Sinkeldam J., (1994): A coded checklist and ecological indicator values of freshwater diatoms from The Netherlands. *Netherlands Journal of Aquatic Ecology*, 28, 117-131.
- Van Dam, H, Mertens, A, & Sinkeldam, J. (1994). A coded checklist and ecological indicator values of freshwater diatoms from the Netherlands. *Netherlands Journal of Aquatic Ecology* 28, 117–133.
- Van der Kamp, G. (1995). The hydrogeology of springs in relation to the biodiversity of spring fauna: a review. *Journal of the Kansas Entomological Society*, 4-17.
- Vasselon, V., Domaizon, I., Rimet, F., Kahlert, M., & Bouchez, A. (2017). Application of high-throughput sequencing (HTS) metabarcoding to diatom biomonitoring: Do DNA extraction methods matter?. *Freshwater Science*, 36(1), 162-177.
- Verlinde, M., Gorny, J., Montavon, G., Khalfallah, S., Boulet, B., Augeray, C., Larivière, D., Dalencourt, C., Gourgiotis, A., (2019). A new rapid protocol for <sup>226</sup>Ra separation and preconcentration in natural water samples using molecular recognition technology for ICP-MS analysis. *Journal of environmental radioactivity*, 202, 1-7.
- Vidaković, D., Šovran, S., & Krizmanić, J. (2015). Diatoms of the genus *Gomphonema* Ehrenberg from the peat bog at Pešter plateau. In 18th Symposium for Biology Students in Europe (pp. 50–50). SymBioSE.
- Videvall, E., Burraco, P., & Orizaola, G. (2022). Impact of ionizing radiation on the environmental microbiomes of Chernobyl wetlands. *bioRxiv*, 2022-01.
- Virtanen, L., & Soininen, J. (2012). The roles of environment and space in shaping stream diatom communities. *European Journal of Phycology*, 47(2), 160-168.
- Vokueva, S., & Denisov, D. (2021). Diatom assemblages in surface sediments of Lake Imandra (Russia, Murmansk region). *Polish Polar Research*, 42(4), 249-268.
- Vukovic-Nagy, B., Fox, B. W., & Fox, M. (1974). The release of a deoxyribonucleic acid fragment after x-irradiation of *Micrococcus radiodurans*. *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine*, 25(4), 329-337.
- Mold, R. J. (Ed.). (2012). *Ecology of halophytes*. Elsevier.
- Wagaw, S., Mengistou, S., Getahun, A., Wosnie, A., & Enawgaw, Y. (2022). Diatom community structure in relation to physico-chemical factors in a tropical soda Lake Shala and inflowing hot-springs, Ethiopia. *International Journal of Aquatic Biology*, 10(5), 349-363.c
- Waring, G. A., & Blankenship, R. R. (1965). *Thermal springs of the United States and other countries of the world: a summary* (Vol. 492). US Government Printing Office.
- Webb, T. (2017). *Paleoecology*, Reference Module in Life Sciences, Elsevier,
- Weigand, H., Beermann, A.J., Čiampor, F., Costa, F.O., Csabai, Z., Duarte, S., Geiger, M.F., Grabowski, M., Rimet, F., Rulik, B., Strand, M., Szucsich, N., Weigand, A.M., Willassen, E., Wyler, S. A., Bouchez, A., Borja, A., Čiamporová-Zaťovičová, Z., Ferreira, S., Dijkstra, K.D.B., Eisendle, U., Freyhof, J., Gadawski, P., Graf, W., Haegerbaeumer, A., van der Hoorn, B.B., Japoshvili, B., Keresztes, L., Keskin, E., Leese, F., Macher, J.N., Mamos, T., Paz, G., Pešić, V., Pfannkuchen, D.M.,



- Pfannkuchen, M.A., Price, B.W., Rinkevich, B., Teixeira, M.A.L., Várбірó, G., Ekrem, T., (2019). DNA barcode reference libraries for the monitoring of aquatic biota in Europe: Gap-analysis and recommendations for future work. *Science of the Total Environment*, 678, 499-5
- Weinbauer, M. G. (2004). Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS microbiology reviews*, 28(2), 127-181.
- Werum M. & Lange-Bertalot H., 2004. Werum, M. (2004). Diatoms in springs from Central Europe and elsewhere under the influence of hydrogeology and anthropogenic impacts. *Iconographia diatomologica*, 13, 1-480.
- Wetzel, C. E., Ector, L., Van de Vijver, B., Compere, P., & Mann, D. G. (2015). Morphology, typification and critical analysis of some ecologically important small naviculoid species (Bacillariophyta). *Fottea/Czech Phycological Society.-Praha, Czech Republic, 2007, currens*, 15(2), 203-234.
- Whitman, W. B., Coleman, D. C., & Wiebe, W. J. (1998). Prokaryotes: the unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(12), 6578-6583.
- Wigington, C. H., D. Sonderegger, C. P. D. Brussaard, A. Buchan, J. F. Finke, J. A. Fuhrman, J. T. Lennon, M. Middelboe, C. A. Suttle, C. Stock, W. H. Wilson, K. E. Wommack, S. W. Wilhelm & J. S. Weitz, (2016). Re-examination of the relationship between marine virus and microbial cell abundances. *Nature microbiology*, 1(3), 1-9.
- Wilhelm, S. W., & Suttle, C. A. (1999). Viruses and nutrient cycles in the sea: viruses play critical roles in the structure and function of aquatic food webs. *Bioscience*, 49(10), 781-788. Williamson, S. J., Cary, S. C., Williamson, K. E., Helton, R. R., Bench, S. R., Winget, D., & Wommack, K. E. (2008). Lysogenic virus-host interactions predominate at deep-sea diffuse-flow hydrothermal vents. *The ISME journal*, 2(11), 1112-1121.
- Witkowski A., Pilzen M., Kort R., Rhiel E., Wawrzyniak- Wydrowska B., Lange-Bertalot H., Bak M. & Daniszewska G., 2004. Investigations on the seasonal succession of Wadden Sea inhabiting diatoms at Dangast (North Sea, German Bight) over a one year period. *Vie et Milieu*, 54(2-3): 181-189.
- Wojtal, A. Z., & Sobczyk, Ł. (2012). The influence of substrates and physicochemical factors on the composition of diatom assemblages in karst springs and their applicability in water-quality assessment. *Hydrobiologia*, 695, 97-108.
- Serieyssol, K. K. (2013). Species composition and distribution of diatom assemblages in spring waters from various geological formation in southern Poland.
- Zakeri, F., Sadeghizadeh, M., Kardan, M. R., Zahiri, H. S., Ahmadian, G., Masoumi, F., ... & Noghabi, K. A. (2012). Differential proteome analysis of a selected bacterial strain isolated from a high background radiation area in response to radium stress. *Journal of proteomics*, 75(15), 4820-4832.
- Żelazna-Wieczorek, J. (2011). *Diatom Flora in Springs of Łódź Hills (Central Poland): Biodiversity, taxonomy, and temporal changes of epipsammic diatom assemblages in springs affected by human Impact*. Gantner.
- Żelazna-Wieczorek, J., Olszyński, R. M., & Nowicka-Krawczyk, P. (2015). Half a century of research on diatoms in athalassic habitats in central Poland. *Oceanological and Hydrobiological Studies*, 44(1), 51-67.

Zeng, T., Zhang, S., Gao, X., Wang, G., Lens, P. N., & Xie, S. (2018). Assessment of bacterial community composition of anaerobic granular sludge in response to short-term uranium exposure. *Microbial ecology*, 76, 648-659.

Zimmerman, G. M., Goetz, H., & Mielke Jr, P. W. (1985). Use of an improved statistical method for group comparisons to study effects of prairie fire. *Ecology*, 66(2), 606-611.

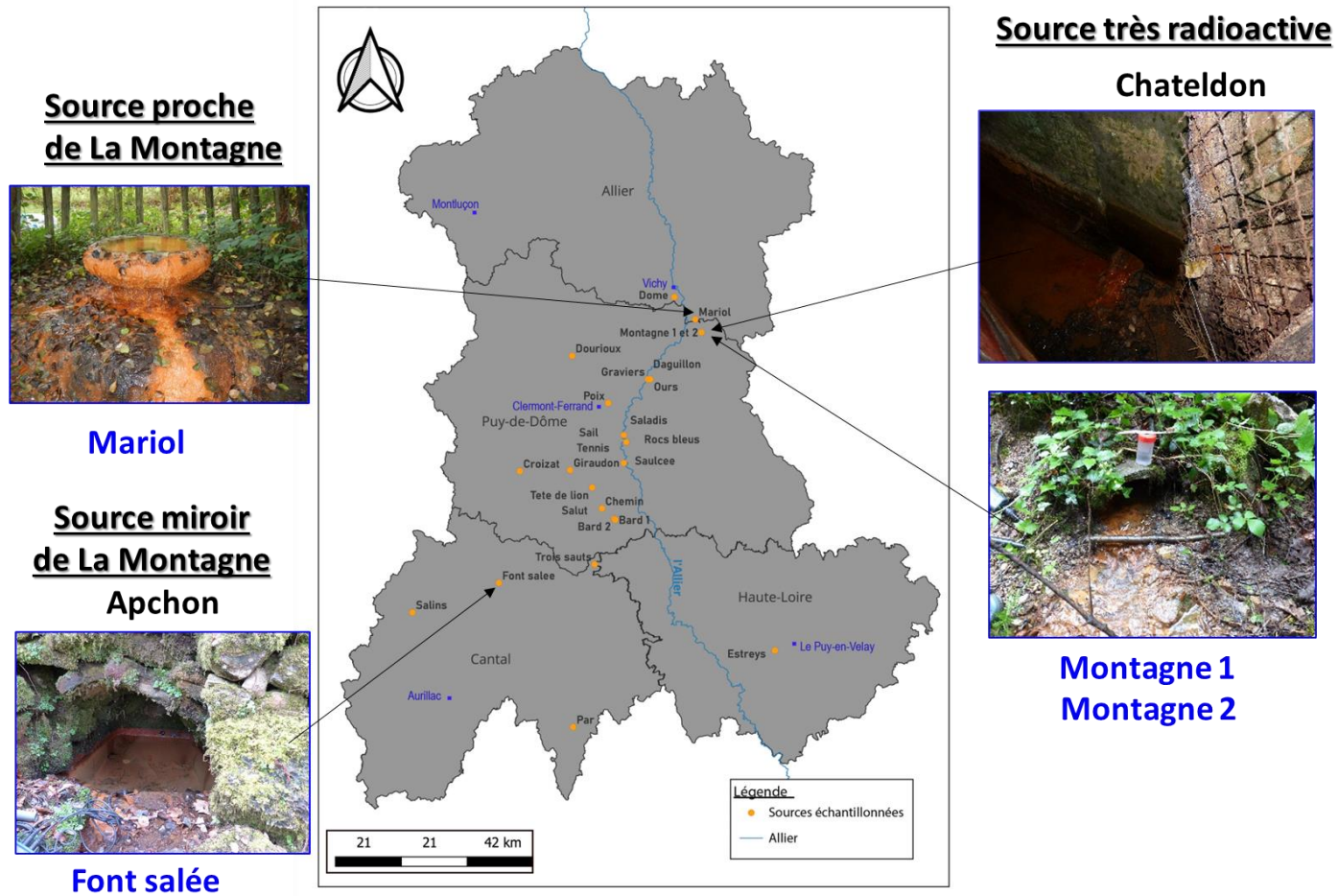
Zotina, T., Dementyev, D., & Alexandrova, Y. (2021). Long-term trends and speciation of artificial radionuclides in two submerged macrophytes of the Yenisei River: A comparative study of *Potamogeton lucens* and *Fontinalis antipyretica*. *Journal of Environmental Radioactivity*, 227, 106461.

## Annexes

### Annexe 1: Sources étudiées durant la thèse

Les sources gérées par le Conservatoire des espèces naturelles (CEN) sont indiquées par une photographie avec un cadre vert.

A



B

**Dourioux**



**Polignac**



**Les Estreys**

C

**Source présentant un gradient de radioactivité**

**Leyvaux**

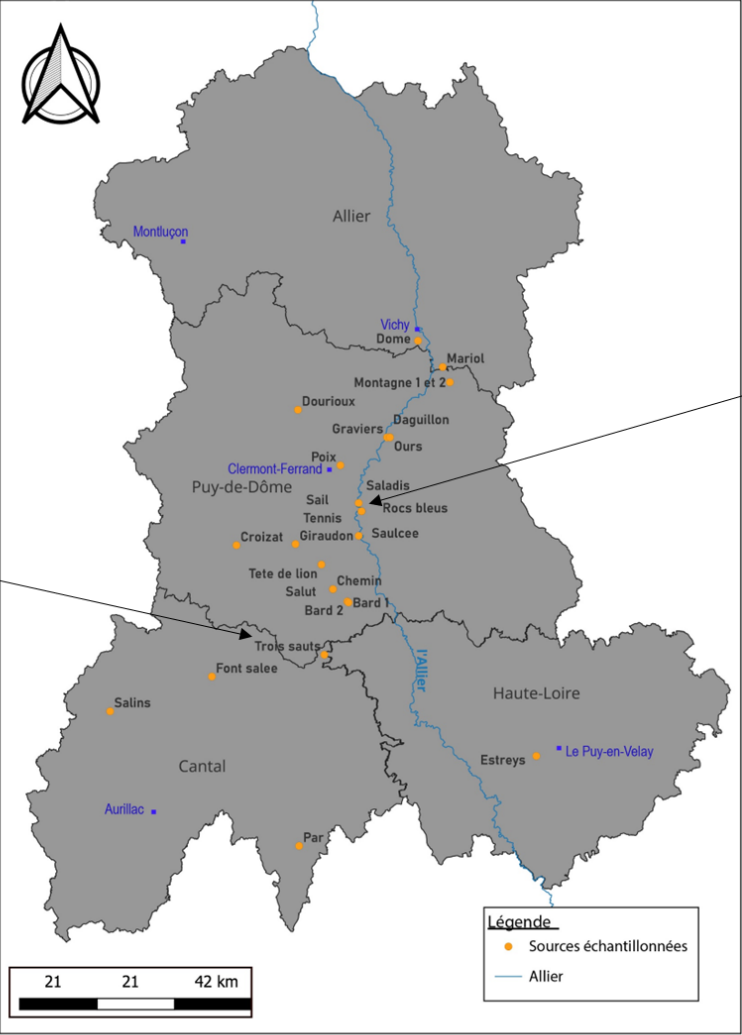


**Trois sauts**

**Mirefleurs**



**Sail**



D

**Martres de Veyre**

**Rocs bleus**



**Saladis**



**Boudes**

**Bard 1**



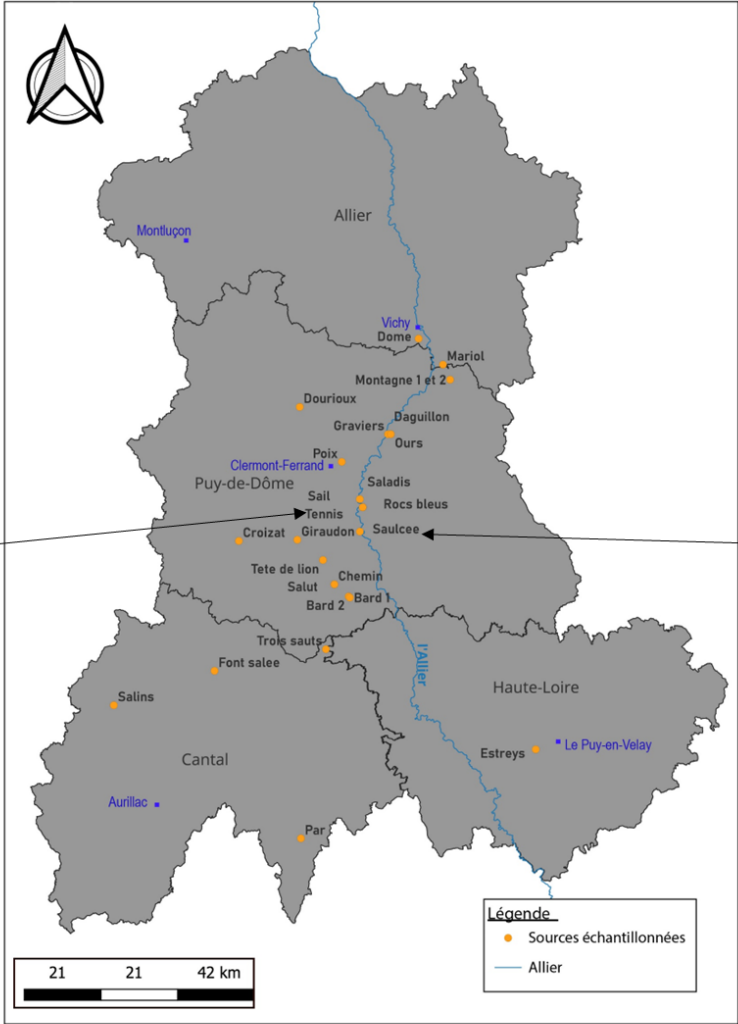
**Bard 2**

E

Sainte-Marguerite



Tennis



Coudes



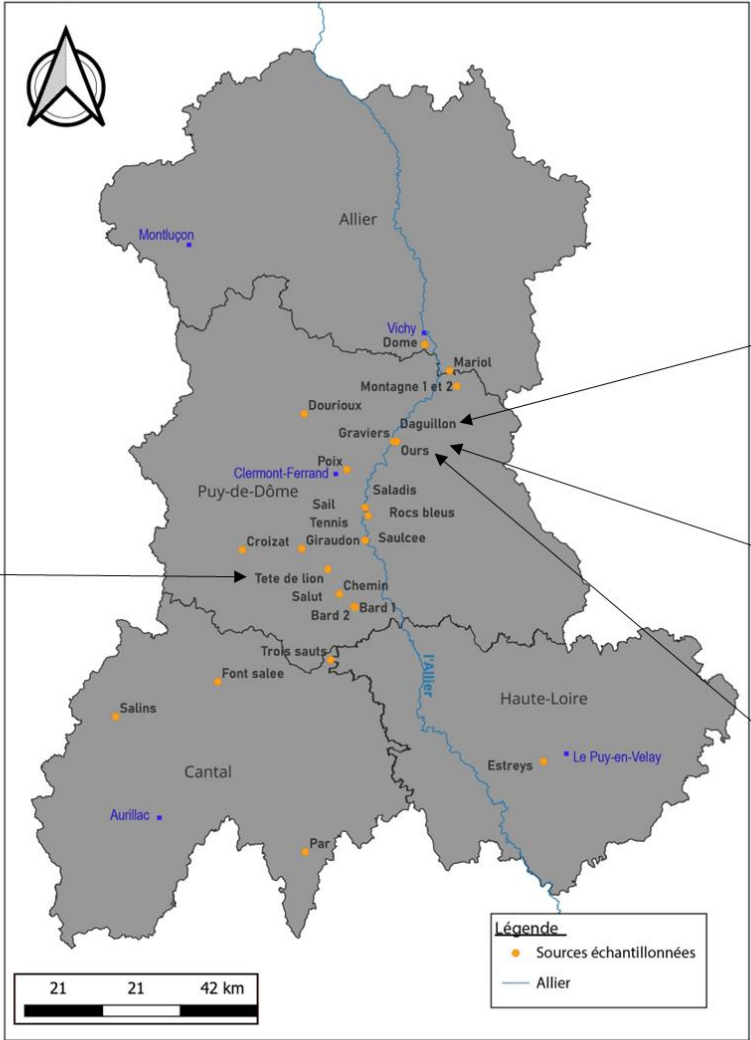
Saucée

F



Saint-Floret

Tête de lion



Joze

Daguillon



Les Graviers



Ours

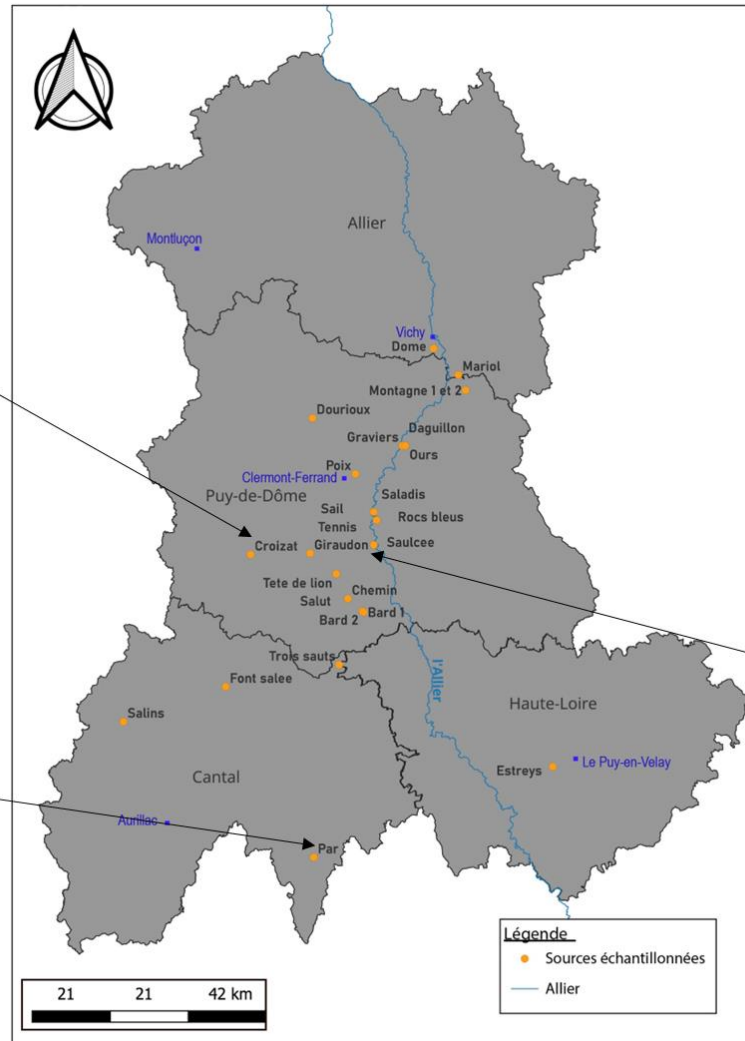


G

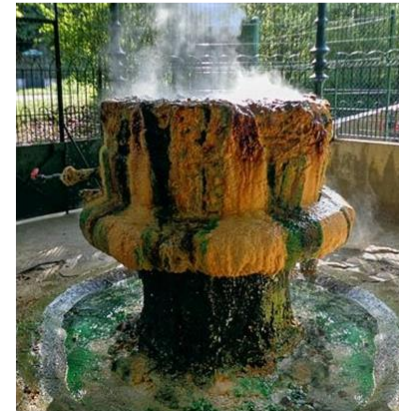
### Mont Dore Croizat



### Chaudes-Aigues Par



### Ambrest Dôme



### Saint-Nectaire Giraudon



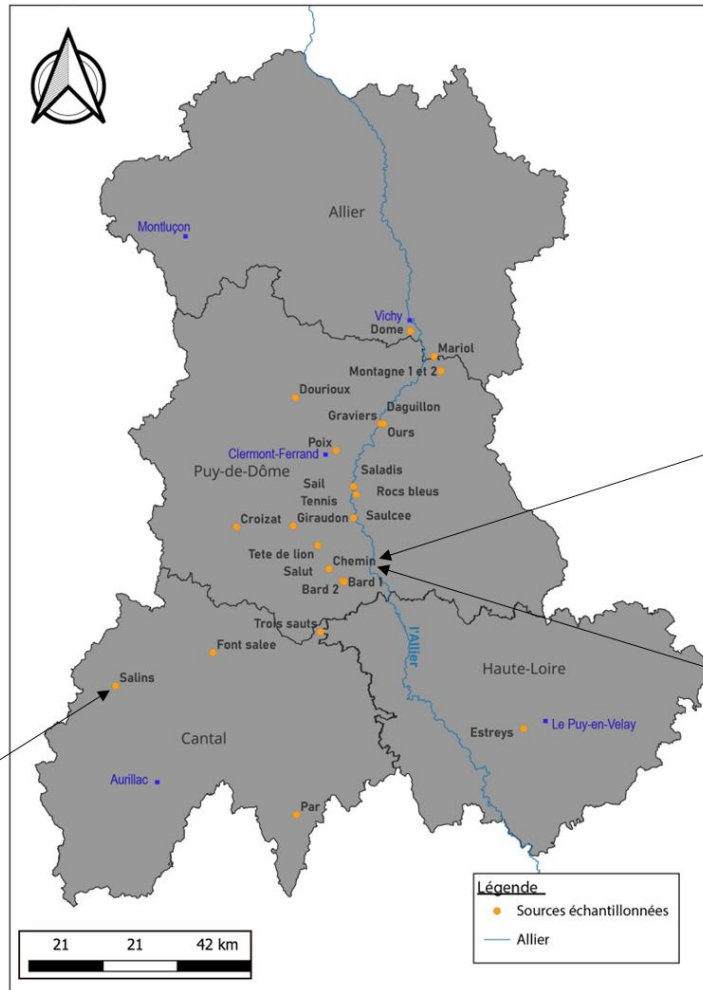
H

Source très minéralisée

Clermont-Ferrand  
Poix



Salins



Autres sources non radioactives

Ternant  
Salut



Chemin