



HAL
open science

Etude de l'impact des pratiques d'infiltration des eaux pluviales sur les communautés microbiennes des aquifères souterrains : influence des conditions hydrologiques et des caractéristiques de la zone non-saturée

Yohan Lebon

► To cite this version:

Yohan Lebon. Etude de l'impact des pratiques d'infiltration des eaux pluviales sur les communautés microbiennes des aquifères souterrains : influence des conditions hydrologiques et des caractéristiques de la zone non-saturée. Ecosystèmes. Université de Lyon, 2022. Français. NNT : 2022LYSE1079 . tel-04702711

HAL Id: tel-04702711

<https://theses.hal.science/tel-04702711v1>

Submitted on 19 Sep 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.



N° d'ordre : 2022LYSE1079

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

Opérée au sein de
L'université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale ED 341 :
Evolution Ecosystèmes Microbiologie Modélisation

Spécialité de doctorat : Hydroécologie

Discipline : Biologie

Par Yohan LEBON

ETUDE DE L'IMPACT DES PRATIQUES D'INFILTRATION DES EAUX PLUVIALES SUR LES COMMUNAUTES MICROBIENNES DES AQUIFERES SOUTERRAINS : INFLUENCE DES CONDITIONS HYDROLOGIQUES ET DES CARACTERISTIQUES DE LA ZONE NON-SATUREE

Soutenue le 25 mai 2022 devant le Jury composé de :

Véronica RODRIGUEZ-NAVA	Professeure, UMR 5557 LEM, Université Claude Bernard Lyon 1	Présidente
Christine DUPUY	Professeure, UMR 7266 LIENSs, Université de la Rochelle	Rapporteure
Jean M. F. MARTINS	Directeur de recherche CNRS, UMR 5001 IGE, Université Grenoble Alpes	Rapporteur
Arnaud FOULQUIER	Maître de conférences, UMR 5553 M2C, Université Grenoble Alpes	Examineur
Yannick COLIN	Maître de conférences, UMR 6143, M2C, Université de Rouen	Examineur
Florian MERMILLOD- BLONDIN	Directeur de recherche CNRS, UMR 5023 LEHNA, Université Claude Bernard Lyon 1	Directeur de thèse
Laurence VOLATIER	Chargée de recherche, UMR 5023 LEHNA, Ecole Nationale des Travaux Publics de l'Etat	Co-directrice de thèse
Clémentine FRANCOIS	Maîtresse de conférences, UMR 5023 LEHNA, Université Claude Bernard Lyon 1	Co-directrice de thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Président du Conseil Académique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-présidente du Conseil Formation

Vice-président de la Commission Recherche

Directeur Général des Services

M. Frédéric FLEURY

M. Hamda BEN HADID

M. Didier REVEL

Mme. Céline BROCHIER

M. Petru MIRONESCU

M. Pierre ROLLAND

COMPOSANTES SANTE

Département de Formation et Centre de
Recherche en Biologie Humaine
Faculté d'Odontologie

Directrice : Mme Anne-Marie SCHOTT

Doyenne : Mme Dominique SEUX

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon
Sud – Charles Mérieux
Faculté de Médecine Lyon Est – Claude
Bernard

Doyenne : Mme Carole BURILLON

Doyen : M. Gilles RODE

Institut des Sciences et Techniques de la
Réadaptation

Directeur : M. Xavier PERROT

Institut des Sciences Pharmaceutiques et
Biologiques

Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies
Département Chimie
Département GEP
Département Informatique
Département Mathématiques
Département Mécanique
Département Physique
UFR Sciences et Techniques des Activités
Physiques et Sportives
UFR Biosciences

Directeur : M. Bruno ANDRIOLETTI

Directrice : Caroline FELIX

Directrice : Mme Rosaria FERRIGNO

Directeur : M. Behzad SHARIAT

Directeur : Frédéric Lagoutière

Directeur M. Marc BUFFAT

Directeur : Jean-Claude PLENET

Directeur : M. Yannick VANPOULLE

Observatoire de Lyon

Administratrice provisoire : Mme Kathrin
GIESELER

Polytech Lyon

Directrice : Mme Isabelle DANIEL

Ecole Supérieure de Chimie Physique

Directeur : Emmanuel PERRIN

Electronique

Directeur : Gérard PIGNAULT

Institut Universitaire de Technologie de
Lyon 1

Directeur : M. Christophe VITON

Ecole Supérieure du Professorat et de
l'Education

Administrateur Provisoire : M. Pierre
CHAREYRON

Institut de Science Financière et
d'Assurances

Directeur : M. Nicolas LEBOISNE

REMERCIEMENTS

Je voudrais tout d'abord remercier mes directeurs de thèse qui ont su m'appuyer durant ces trois années et tout particulièrement lors de la dernière ligne droite. Un grand merci à Simon pour m'avoir épaulé durant mes débuts de thèse avant de partir vers d'autres horizons professionnels.

Je remercie ensuite mes collègues d'IPE et d'E3S pour la bonne ambiance au sein des équipes, et tout particulièrement mes co-bureau (Valérian, Edwige, Marie, Nicolas, Olivier, Mohammad, Manon, Samuel, Camille, et Nans). Enfin, je remercie ma famille qui m'a soutenue tout au long de mon parcours.

RESUME

En milieu urbain, les systèmes d'infiltration des eaux pluviales (bassins d'infiltrations) permettent la diminution du ruissellement et la recharge artificielle des nappes phréatiques. Ces systèmes se reposent sur un effet filtre permettant un piégeage et une dégradation des contaminants de l'eau d'infiltration durant son parcours à travers la zone non saturée (ZNS). Malgré cet effet filtre, la recharge artificielle peut conduire à des perturbations de l'écosystème souterrain. Si l'impact physico-chimique de l'infiltration a largement été étudié, les études de terrain s'intéressant à l'impact de la recharge artificielle sur les modifications de la microbiologie de la nappe sont souvent limitées à l'étude de l'influence de l'épaisseur de la ZNS. Or, la littérature suggère que d'autres facteurs liés aux caractéristiques des pluies et des bassins peuvent également moduler l'impact de l'infiltration sur la microbiologie de la nappe. Ce travail de thèse a alors pour objectif principal d'étudier l'influence des principales caractéristiques des bassins (épaisseur de la ZNS et temps de transit de l'eau d'infiltration de la surface à la nappe) et du taux de recharge de la nappe sur les modifications de la microbiologie de la nappe associées à l'infiltration.

Pour cela, les modifications de biomasse, d'activité microbienne et de compositions bactériennes (approche métabarcoding 16S) des communautés de nappes ont été mesurées au niveau de 6 bassins d'infiltrations lors d'évènements pluvieux contrastés.

Les résultats de cette thèse ont démontré que le temps de transit de l'eau de la surface vers la nappe modulait l'impact de l'infiltration sur la microbiologie de la nappe, alors que ce n'était pas le cas pour l'épaisseur de la ZNS. En effet, plus le temps de transit mesuré était court et plus l'infiltration entraînait un développement de biomasse important ainsi qu'une augmentation de la diversité bactérienne, et favorisait la présence de certains groupes bactériens. De plus, cette thèse montre que le taux de recharge de la nappe peut également avoir son importance dans la réponse des communautés microbiennes à l'infiltration : un fort taux de recharge entraînait une augmentation des flux d'eau et de solutés à proximité des biofilms stimulant leurs activités. Les perspectives de cette thèse proposent une approche en laboratoire et une approche in situ afin de mieux comprendre les mécanismes conditionnant l'assemblage des communautés des nappes et leur réponse face aux perturbations engendrées par l'infiltration.

ABSTRACT

In urban areas, stormwater infiltration systems (infiltration basins) reduce runoff and artificially recharge groundwater. These systems relied on a “filter effect” to trap and degrade contaminants from the infiltration water during its journey through the unsaturated zone. Despite this filter effect, artificial recharge can lead to disturbances of the underground ecosystem. Although the physicochemical impact of infiltration has been widely studied, field experiments investigating the impact of artificial recharge on microbiological changes in aquifers are often under investigation and limited to the study of unsaturated zone thickness influences. However, the literature suggests that other factors related to rainfall and infiltration basins characteristics can also modulate the impact of the infiltration on the groundwater microbiology. Thus, the main objective of this thesis manuscript is to study the influence of the main characteristics of the infiltration basins (unsaturated zone thickness and transit time of the infiltration water from the surface to the aquifer) and the recharge rate of the aquifer on microbiology changes of the aquifer associated with stormwater infiltration.

To assess microbiology modifications, changes in biomass, microbial activity and bacterial composition (16S metabacoding approach) of groundwater communities were measured below 6 infiltration basins during contrasting rainfall events.

The results of this thesis demonstrated that the transit time of water from the surface to the aquifer modulated the infiltration impact on the aquifer microbiology, whereas this phenomenon was not displayed for the unsaturated zone thickness. Indeed, the shorter the measured transit time was, the more the infiltration led to significant biomass development, an increase in bacteria and favoured the presence of certain bacterial groups. In addition, this thesis shows that the rate of groundwater recharge may also be important in the response of microbial communities to infiltration: indeed, a high rate of recharge led to increased fluxes of water and solutes at the vicinity of the biofilms, stimulating their activities. The perspectives of this thesis were based on a laboratory approach and an in-situ approach in order to better understand the mechanisms conditioning groundwater microbial communities assemblage and their response to the disturbances caused by infiltration.

TABLE DES MATIERES

CHAPITRE 1 : CONTEXTE SCIENTIFIQUE.....	p17
I. La ressource en eau souterraine : enjeux et pressions.....	p18
II. Fonctionnement hydrogéologique des aquifères poreux et caractéristiques physico-chimiques des nappes.....	p20
1) Les différents types de nappes et d'aquifères.....	p20
2) Fonctionnement hydrogéologique des aquifères poreux.....	p22
3) Caractéristiques physico-chimiques des nappes.....	p24
III. Biofilms : généralités et cas particulier des biofilms en milieux aquatiques souterrains.....	p25
1) Le mode de vie sous la forme de biofilm.....	p25
2) Avantages du mode de vie sous la forme de biofilm.....	p26
3) Rôles des biofilms dans la dégradation de la matière organique.....	p27
4) Processus d'assemblage des communautés	p29
5) Les biofilms des eaux souterraines.....	p31
IV. Gestion des eaux pluviales en ville et impacts sur le compartiment souterrain.....	p33
1) Systèmes d'infiltration des eaux pluviales.....	p33
2) Impacts de la recharge artificielle sur l'écosystème souterrain.....	p35
3) Facteurs influençant l'impact de la recharge artificielle de l'écosystème souterrain.....	p36
V. Objectifs de la thèse.....	p40
CHAPITRE 2 : METHODOLOGIE GENERALE.....	p44
I. Sites d'études.....	p45
II. Dispositif expérimental spécifique au suivi des eaux souterraines.....	p48
III. Design expérimental : sites et événements pluvieux étudiés.....	p49
IV. Échantillonnage et analyses des eaux souterraines	p51
V. Estimation des caractéristiques des bassins et du taux de recharge de la nappe associée aux événements pluvieux	p57
CHAPITRE 3 : CARACTERISATION DE L'IMPACT D'UN EVENEMENT PLUVIEUX SUR LES MODIFICATIONS STRUCTURELLES ET FONCTIONNELLES DES COMMUNAUTES MICROBIENNES ASSOCIEES A L'INFILTRATION DES EAUX PLUVIALES.....	p59
<u>Article 1:</u> Influence of stormwater infiltration systems on the structure and the activities of groundwater biofilms: Are the effects restricted to rainy periods?	
CHAPITRE 4 : IMPACT DES PRATIQUES D'INFILTRATION DES EAUX DE RUISSELLEMENT PLUVIALES SUR LA COMPOSITION DES COMMUNAUTES MICROBIENNES DE LA NAPPE : INFLUENCE DE L'ÉPAISSEUR DE LA ZONE NON-SATURÉE ET DU TEMPS DE TRANSIT DE L'EAU D'INFILTRATION DE LA SURFACE VERS LA NAPPE.....	p108
<u>Article 2:</u> How do infiltration transit time and vadose zone thickness modulate the impact of SIS on groundwater bacterial communities?	

CHAPITRE 5 : INFLUENCES RESPECTIVES DES CARACTÉRISTIQUES DES BASSINS ET DES FLUX D'EAU INFILTRÉS SUR LES CHANGEMENTS DE LA BIOMASSE ET DES ACTIVITÉS MICROBIENNES ASSOCIÉES AUX PRATIQUES D'INFILTRATION DES EAUX DE RUISSELLEMENT PLUVIALES.....	p141
---	------

Article 3: Aquifer recharge by stormwater infiltration basins: influences of vadose zone thickness, water transit time through vadose zone and groundwater recharge rate on nutrients and microbiology in groundwater

CHAPITRE 6 : SYNTHÈSE ET PERSPECTIVES.....	p183
I. Synthèse.....	p184
II. Perspectives.....	p190
1) Transferts bactériens et changements physico-chimiques : évaluation de leur contribution dans les modifications de la composition des communautés bactériennes dans les eaux de nappes exposées aux pratiques d'infiltration d'eaux pluviales.....	p190
2) Dynamique de réponse des communautés bactériennes de la nappe face aux perturbations engendrées par l'infiltration des eaux pluviales sur des supports déjà colonisés.....	p191
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	p194

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE 1 : CONTEXTE SCIENTIFIQUE.....	p17
Figure 1.1 : Distribution de l'eau sur Terre – Shiklamonov., 1993.....	p18
Figure 1.2 : Prélèvements d'eau douce pour l'alimentation en eau potable par région en 2016 – Aibel et al., 2019.....	p19
Figure 1.3 : Schéma d'une nappe libre et d'une nappe captive à gauche (Laboratoire SITE – EMSE) et schéma du fonctionnement hydrologique d'une nappe libre à droite (modifié de Smith et al., 2018).....	p21
Figure 1.4 : Hétérogénéité des aquifères et vitesse d'écoulement (adapté de Drogue dans Guillemin & Roux., 1992).....	p22
Figure 1.5 : Schéma de lithofaciès au sein d'un aquifère poreux (A) et schéma de la structure et des caractéristiques des pores au sein d'un lithofaciès (B) – Modifié de Slimene., 2015 et Nishiyama & Yokoyama., 2017.....	p24
Figure 1.6 : Schéma d'une matrice polymérique de biofilm et ses composantes – Gette 2013.....	p26
Figure 1.7 : Illustration simplifiée des voies métaboliques des micro-organismes souterrains organo- hétérotrophes - Foulquier et al., 2010 (modifié d'après Goldscheider et al. 2006).....	p28
Figure 1.8 : Les 4 grands processus d'assemblage des communautés selon Vellend (2010).....	p30
Fig 1.9 : Schéma d'un bassin d'infiltration et élévation du niveau de nappe sous le bassin – Bouwer., 2002.....	p34
Figure 1.10 : Schéma conceptuel du développement des 3 axes de thèse.....	p40
CHAPITRE 2 : METHODOLOGIE GENERALE.....	p44
Figure 2.1 : Carte piézométrique de l'agglomération lyonnaise (Lyon, France) et direction générale des écoulements souterrains au sein de la nappe d'accompagnement du Rhône (traits pointillés) et de la nappe de l'Est Lyonnais (traits rouges), modifié de Foulquier (2009).....	p45
Figure 2.2 : Localisation des six bassins d'infiltration (Grange-Blanche -GB ; Minerve - MIN ; IUT ; Django-Reinhardt -DJR ; Feyzin -FEY ; Pesselière -PES) situés dans le système aquifère « nappe de l'Est Lyonnais – nappe d'accompagnement du Rhône ». (Modifié de Foulquier (2009)).....	p46
Figure 2.3 : (A) Schéma des bassins d'infiltration et de la localisation des piézomètres. (B) Vue aérienne du bassin de Minerve (MIN) en pointillés rouge et identification de la localisation des piézomètres.....	p49

Figure 2.4 : Substrat artificiel pour l'échantillonnage des communautés microbiennes des nappes.....	p53
Figure 2.5 : Les différentes étapes du métabarcoding - France Génomique.....	p55
Figure 2.6 : Exemples de (A) surveillance de la conductivité électrique pour estimer le temps de transit des eaux pluviales de la surface à la nappe ; et de (B) surveillance du niveau de la nappe pour mesurer l'élévation de la nappe phréatique (en mètres au-dessus du niveau de la mer) obtenue sur le site de Django-Reinhardt (DjR).....	p58
CHAPITRE 3 : CARACTERISATION DE L'IMPACT D'UN EVENEMENT PLUVIEUX SUR LES MODIFICATIONS STRUCTURELLES ET FONCTIONNELLES DES COMMUNAUTES MICROBIENNES ASSOCIEES A L'INFILTRATION DES EAUX PLUVIALES.....	p59
Figure 1: Groundwater dissolved organic carbon concentration (mg. L-1), and biofilm biomass (μg protein. cm^{-2}), hydrolytic activities (10^{-4} μmol FDA hydrolyzed. h^{-1} . cm^{-2}) and dehydrogenase activities (10^{-5} μmol INT formazan produced. h^{-1} . cm^{-2}) measured on non-SIS-impacted and SIS-impacted zones (left and right within each individual panel, respectively) of the three SIS (Grange-Blanche –GB, white circles; IUT, grey triangles; Minerve-MIN, black diamonds) during the dry and the rainy periods (left and right panels, respectively). All replicated analyses (n=3) per well are displayed in the figure. SIS = Stormwater Infiltration Systems.....	p77
Figure 2: Aquifer biofilms metabarcoding 16S rRNA V5-V7 genetic diversity analyses. OTUs richness (top panels), Faith's phylogenetic diversity (middle panels) and Shannon diversity (bottom panels) indices measured on non-SIS-impacted and SIS-impacted zones (left and right of each individual panel, respectively) of the three SIS (Grange-Blanche –GB, white circles; IUT, gray triangles; Minerve-MIN, black diamonds) during the dry and the rainy periods (left and right panels, respectively). All replicated analyses (n=3) per well are displayed in the figure. SIS = Stormwater Infiltration Systems.....	p80
Figure 3: Venn diagrams representing the distribution of OTUs recovered from biofilms during the dry and rainy periods (left and right diagrams, respectively). Distribution is presented as the percentage of the whole OTUs pool (for each SIS and each period) being detected i) only in non-SIS-impacted zone (left of each diagram), ii) only in SIS-impacted zone (right of each panel) and iii) on both zones (shared OTUs; dark-gray overlap area). Based on read number for each OTUs, we indicate the corresponding distribution of reads within SIS (also as a percentage of the total read numbers for each period and SIS) on the bottom part of each diagram. The main percentages in bold represent the average numbers over the three SIS and the percentages in square brackets correspond to the range. SIS = Stormwater Infiltration Systems.....	p81
Figure 4: Aquifer biofilm metabarcoding 16S rRNA V5-V7 beta diversity analyses. Bray-Curtis and unnormalized weighted Unifrac distances (top and bottom panels,	

respectively) calculated between the non-SIS-impacted and the SIS-impacted zones, for each SIS (Grange-Blanche –GB, left panels; IUT, middle panels; Minerve-MIN, right panels) during the dry (gray) and the rainy (white) periods. (see 2.4.3 for details). SIS = Stormwater Infiltration Systems.....p82

Figure 5: Bacterial taxa in aquifer biofilms inferred from metabarcoding 16S rRNA V5-V7 gene reads. Relative abundance (mean of three replicates per condition) of the ten most represented bacterial orders during the dry and the rainy periods for each of the three SIS. Sequences not assigned to one of these orders are pooled in “Others”. SIS = Stormwater Infiltration System.....p84

CHAPITRE 4 : IMPACT DES PRATIQUES D’INFILTRATION DES EAUX DE RUISSELLEMENT PLUVIALES SUR LA COMPOSITION DES COMMUNAUTÉS MICROBIENNES DE LA NAPPE : INFLUENCE DE L’ÉPAISSEUR DE LA ZONE NON-SATURÉE ET DU TEMPS DE TRANSIT DE L’EAU D’INFILTRATION DE LA SURFACE VERS LA NAPPE.....p108

Figure 1. Biplots of transit time (h) and vadose zone thickness (m) for the two experiments and the 6 stormwater infiltration systems (SIS) (n=12): Django-Reinhart (DJR), Feyzin (FEY), Grange-Blanche (GB), IUT, Minerve (MIN) and Pesselière (PES).....p123

Figure 2. Left panel: influence of VZT on DOC (A) and DO (C) ratios. Right panels: influence of transit time on DOC (B) and DO (D) ratios. VZT (meters) and transit time (hours) were log₁₀-transformed. Values less than 1 on the Y-axis indicate that stormwater infiltration systems reduced DO or DOC concentrations in groundwater. Statistics displayed on the graphs (R², p-values) correspond to linear regressions performed on log (1+x) – transformed ratios. VZT = Vadose zone thickness. DJR = Django-Reinhart; FEY = Feyzin; GB = Grange-Blanche; MIN = Minerve; PES = Pesselière.....p125

Figure 3. Left panel: influence of VZT on ASV richness (A), Shannon index (C) and phylogenetic diversity (E). Right panels: influence of transit time on ASV richness (B), Shannon index (D) and phylogenetic diversity (F). VZT (meters) and transit time (hours) were log₁₀-transformed. Values less than 1 on the Y-axis indicate that stormwater infiltration systems reduced alpha diversity in groundwater. Statistics displayed on the graphs (R², p-values) correspond to linear regressions performed on log (1+x) – transformed ratios. VZT = Vadose zone thickness. DJR = Django-Reinhart; FEY = Feyzin; GB = Grange-Blanche; MIN = Minerve; PES = Pesselière.....p127

Figure 4: NMDS of bacterial community composition in the three studied locations: Non-SIS-impacted (NSI - red points), SIS-impacted (SI - green points) and surface (blue points) over six SIS in 2019. SIS = Stormwater infiltration system.....p130

Figure 5: Left panels: influence of VZT on Bray-Curtis (A), unweighted (C) and weighted unifrac (E) distances. Right panels: influence of transit time (h) on Bray-Curtis (B), unweighted (D) and weighted unifrac (F) distances. VZT (meters) and transit time (hours) were log₁₀-transformed. Statistics displayed on the graphs (R², p-values)

correspond to linear regressions performed on $\log(1+x)$ – transformed distances. DJR = Django-Reinhart; FEY = Feyzin; GB = Grange-Blanche; MIN = Minerve; PES = Pesselière.....p130

Figure 6. Left panels: influence of VZT on Bray-Curtis (A), unweighted (C) and weighted unfrac (E) transfer indexes. Right panels: influence of transit time (h) on Bray-Curtis (B), unweighted (D) and weighted unfrac (F) transfer indexes. VZT (meters) and transit time (hours) were \log_{10} -transformed. A transfer index closes to 1 indicates a low potential for bacterial transfer from the surface to the groundwater. This index decreases with the potential for bacterial transfer. Statistics displayed on the graphs (R^2 , p-values) correspond to linear regressions performed on $\log(1+x)$ – transformed ratios. DJR = Django-Reinhart; FEY = Feyzin; GB = Grange-Blanche; MIN = Minerve; PES = Pesselière.....p132

CHAPITRE 5 : INFLUENCES RESPECTIVES DES CARACTÉRISTIQUES DES BASSINS ET DES FLUX D’EAU INFILTRÉS SUR LES CHANGEMENTS DE LA BIOMASSE ET DES ACTIVITÉS MICROBIENNES SSOIÉES AUX PRATIQUES D’INFILTRATION DES EAUX DE RUISSELLEMENT PLUVIALES.....p141

Figure 1: Examples of (A) electric conductivity monitoring to estimate stormwater transit time from surface to groundwater; and of (B) groundwater table level monitoring to measure groundwater table elevation (in meters above sea level) obtained in Django-Reinhardt (DjR) site.....p159

Figure 2: Distribution of (A) vadose zone thicknesses, (B) water transit times from surface to groundwater and (C) groundwater tables elevations measured during six rain events for the five stormwater infiltration systems (SIS) (n = 21). Ln (vadose zone thickness) and Ln (water transit time) were displayed on the graphs. Codes for SIS: Min = Minerve, IUT = IUT, GB = Grange Blanche, Fey= Feyzin, DjR = Django Reinhardt..p161

Figure 3: Left panels: Influence of SIS on (A) NO_3^- , (C) PO_4^{3-} and (E) DOC concentrations measured during rain events for the five stormwater infiltration systems (n = 21). Points below the dotted lines (at 1 on the Y-axis) indicate that SIS reduced nutrient concentrations in groundwater whereas points above the dotted lines indicate that SIS produced an enrichment of nutrients in groundwater. Codes for SIS: Min = Minerve, IUT = IUT, GB = Grange Blanche, Fey= Feyzin, DjR = Django Reinhardt. Right panels: Regressions between the significant explanatory variables (vadose zone thickness, water transit time from surface to groundwater and groundwater table elevation) and modifications of (B) NO_3^- , (D) PO_4^{3-} and (F) DOC concentrations associated with SIS. SIS = Stormwater infiltration system.....p162

Figure 4: Left panels: Influence of SIS on (A) biofilm biomass, (C) dehydrogenase activity and (E) hydrolytic activity measured during rain events for the five stormwater infiltration systems (n = 21). Points below the dotted lines (at 1 on the Y-axis) indicate that SIS reduced microbial growth or activity in groundwater whereas points above the dotted lines indicate that SIS stimulated microbial biofilms in groundwater. Codes for SIS: Min = Minerve, IUT = IUT, GB = Grange Blanche, Fey= Feyzin, DjR = Django

Reinhardt. Right panels: Regressions between the significant explanatory variables (vadose zone thickness, water transit time from surface to groundwater and groundwater table elevation) and modifications of (B) biofilm biomass, (D) dehydrogenase activity and (F) hydrolytic activity associated with SIS. SIS = Stormwater infiltration system.....	p164
CHAPITRE 6 : SYNTHÈSE ET PERSPECTIVES.....	p183
Figure 6.1 : Schéma récapitulatif des résultats de la thèse. « + », « - » et « Ø » correspondent respectivement à une augmentation, à une diminution et à aucune modification de la variable considérée dans la zone impactée par les pratiques d'infiltration par rapport à la zone non-impactée. Les dissimilarités correspondent aux différences de composition entre les communautés des zones impactées et des zones non-impactées par la recharge.....	p184
Figure 6.2 : Schéma (sur la gauche) représentant l'impact d'une pluie (en bleu) sur la conductivité électrique (en rouge) de la nappe sous l'influence d'un bassin d'infiltration. Schéma théorique (sur la droite) indiquant trois scénarios de réponse des micro-organismes à ce type de perturbation avec les hypothèses de résistance (en bleu), de résilience (en rouge) ou de changement d'état (en vert) pour la composition des communautés microbiennes. Les indications de T0 à T4 correspondent aux dates d'échantillonnage des micro-organismes.....	p192

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE 1 : CONTEXTE SCIENTIFIQUE.....p17

CHAPITRE 2 : METHODOLOGIE GENERALE.....p44

Tableau 2.1 : Principales caractéristiques des six bassins d'infiltration des eaux pluviales étudiés. L'épaisseur moyenne de la ZNS présentée dans ce tableau correspond à la moyenne +/- SD mesurée sur chaque bassin d'infiltration au cours des campagnes considérées.....p47

Tableau 2.2 : Pour chaque campagne, les précipitations cumulées (mm) et l'intensité maximale des pluies (mm/h) en moyenne +/- SD mesurées sur les bassins d'infiltration considérés dans cette étude sur une période de 10 jours (Voir 2-IV échantillonnage des biofilms).....p50

CHAPITRE 3 : CARACTERISATION DE L'IMPACT D'UN EVENEMENT PLUVIEUX SUR LES MODIFICATIONS STRUCTURELLES ET FONCTIONNELLES DES COMMUNAUTES MICROBIENNES ASSOCIEES A L'INFILTRATION DES EAUX PLUVIALES.....p59

Table 1. Main characteristics of the SIS.....p68

Table S1: Dissolved organic carbon (DOC) concentration (mg. L-1), ammonium N-NH4+ concentration (µg. L-1), nitrates and nitrites N-NOx (NO3- + NO2-) concentration (mg. L-1), orthophosphate P-PO43- concentration (µg. L-1), electric conductivity (µS. cm-1), temperature (°C), dissolved oxygen (mg. L-1), pH : means +/- standard deviations measured on non-SIS-impacted (NSI) and SIS-impacted (SI) groundwaters of the 3 SIS (Grange-Blanche –GB; IUT, Minerve-MIN) during the dry and the rainy periods. SIS = Stormwater Infiltration Systems.....p91

Table S2. NGS (new generation sequencing) Illumina barcodes of the 16S rRNA gene V5-V6 sequences of each aquifer biofilm sample generated on clay beads during a 10-day dry period. See Fig. 1 for a description of the sampled sites. DNA sequences were deposited at the European Nucleotide Archive (<https://www.ebi.ac.uk/ena>) under the project accession numbers #PRJEB29925 and #PRJEB40243.....P93

CHAPITRE 4 : IMPACT DES PRATIQUES D'INFILTRATION DES EAUX DE RUISSELLEMENT PLUVIALES SUR LA COMPOSITION DES COMMUNAUTES MICROBIENNES DE LA NAPPE : INFLUENCE DE L'ÉPAISSEUR DE LA ZONE NON-SATURÉE ET DU TEMPS DE TRANSIT DE L'EAU D'INFILTRATION DE LA SURFACE VERS LA NAPPE.....p108

Table 1. Main characteristics of the studied SIS.....p123

CHAPITRE 5 : INFLUENCES RESPECTIVES DES CARACTÉRISTIQUES DES BASSINS ET DES FLUX D'EAU INFILTRÉS SUR LES CHANGEMENTS DE LA BIOMASSE ET DES ACTIVITÉS MICROBIENNES ASSOCIÉES AUX PRATIQUES D'INFILTRATION DES EAUX DE RUISSELLEMENT PLUVIALES.....p141

Table 1. Main characteristics of the five studied stormwater infiltration systems (SIS). The mean vadose zone thickness presented in this table corresponds to the mean +/- SD measured on each SIS (see 2.3 and 2.4) for the six experimental periods.....p151

Table 2. For each 10-day period considered in this study, cumulative rainfall (mm) and maximum rain intensity (mm/h) as mean +/- SD measured on the five SIS.....p153

CHAPITRE 6 : SYNTHÈSE ET PERSPECTIVES.....p183

LISTE DES ACRONYMES

ADN : **A**cide **D**éoxyribo**N**ucléique

ANOVA : **A**nalysis **O**f **V**ariance / RM-ANOVA : **R**epeated **M**easures - **A**nalysis **O**f **V**ariance

ARN : **A**cide **R**ibonucléique / ARNr : **A**cide **R**ibo**N**ucléique **R**ibosomique

ASV : **A**mplicon **S**equence **V**ariant

BSA : **B**ovine **S**erum **A**lbumin

CE : **C**onductivité **É**lectrique

COD : **C**arbone **O**rganique **D**issous

DJR : **D**jango-**R**einhardt

DO : **D**issolved **O**xygen

DOC : **D**issolved **O**rganic **C**arbon

DOM : **D**issolved **O**rganic **M**atter

ETS : **E**lectron **T**ransport **S**ystem

FDA : **F**luorescein **D**iacetate

FEY : **F**eyzin

GB : **G**range-**B**lanche

HAP : **H**ydrocarbure **A**romatique **P**olycyclique

INT : **I**odo**N**itro**T**etrazolium

MIN : **M**inerve

NGS : **N**ext-**G**eneration **S**equencing

NMDS : **N**on-metric **M**ulti**D**imensional **S**caling

NSI : **N**on-**S**IS-**I**mpacted

OD : **O**ptical **D**ensity

OTU : **O**perational **T**axonomy **U**nit

PCR : **P**olymerase **C**hain **R**eaction / qPCR : **Q**uantitative **P**olymerase **C**hain **R**eaction

PD : **P**hylogenetic **D**iversity

PER-SIMPER : **P**ermutation - **S**imilarity **P**ercentage

PES : **P**esselière

SI : **S**IS-**I**mpacted

SIS : **S**tormwater **I**nfiltration **S**ystem

VZT : **V**adose **Z**one **T**hickness

ZNS : **Z**one **N**on-**S**aturée

PROGRAMMES DE RECHERCHES SOUTENANT CE TRAVAIL

Ce travail de thèse est financé par le Ministère de la Transition écologique dans le cadre de la procédure dite « 4A thèse » de l'ENTPE et est soutenu par l'Agence Nationale de la Recherche à travers l'ANR « FROG » [ANR-16-CE32-0006 FROG] dans le cadre de l'Observatoire de Terrain en Hydrologie Urbaine (OTHU, <http://www.graie.org/othu/>).

1

CHAPITRE 1 : CONTEXTE SCIENTIFIQUE

I. La ressource en eau souterraine : enjeux et pressions

L'eau douce est une ressource vitale pour les sociétés humaines. Alors que 96,5% de l'eau sur terre est présente sous la forme d'eau salée au sein des océans, le pourcentage d'eau douce n'en représente que 2,5% (Fig.1.1). Cette eau douce est présente dans les glaciers et les calottes glaciaires permanentes, dans les eaux souterraines et dans une moindre mesure dans les lacs, les zones humides ou encore les cours d'eau. Les glaciers et les calottes glaciaires contiennent 68,7% de l'eau douce de la planète, mais les eaux souterraines (30,1% des eaux douces) sont de loin la principale source d'eau potable. C'est ainsi qu'en France, plus des deux tiers des prélèvements d'eaux pour la production d'eau potable en 2016 sont issus des eaux souterraines, le reste provenant des eaux de surfaces (rivières, lacs...) (Aubel et al., 2019) (Fig.1.2)

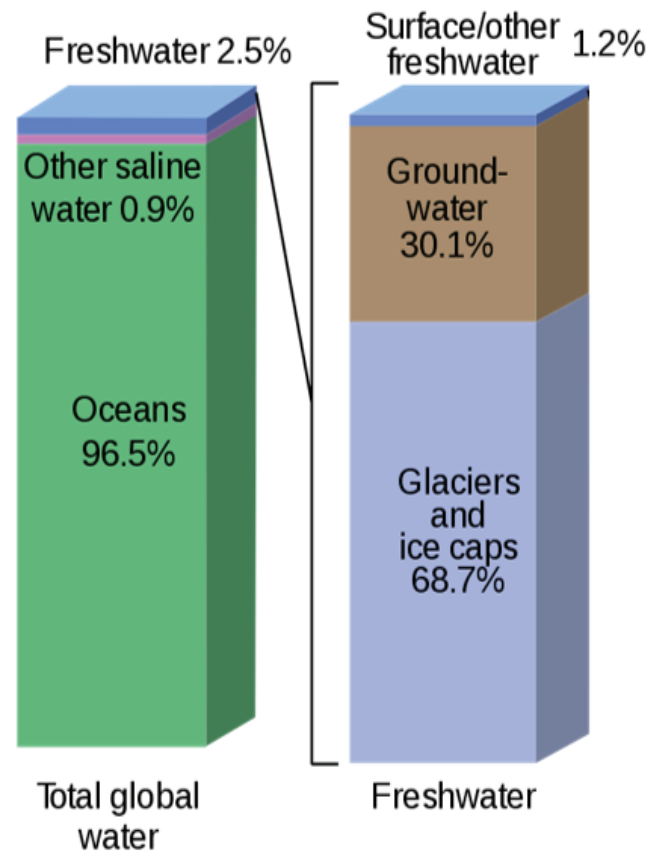


Fig 1.1 : Distribution de l'eau sur Terre - Shiklamonov., 1993

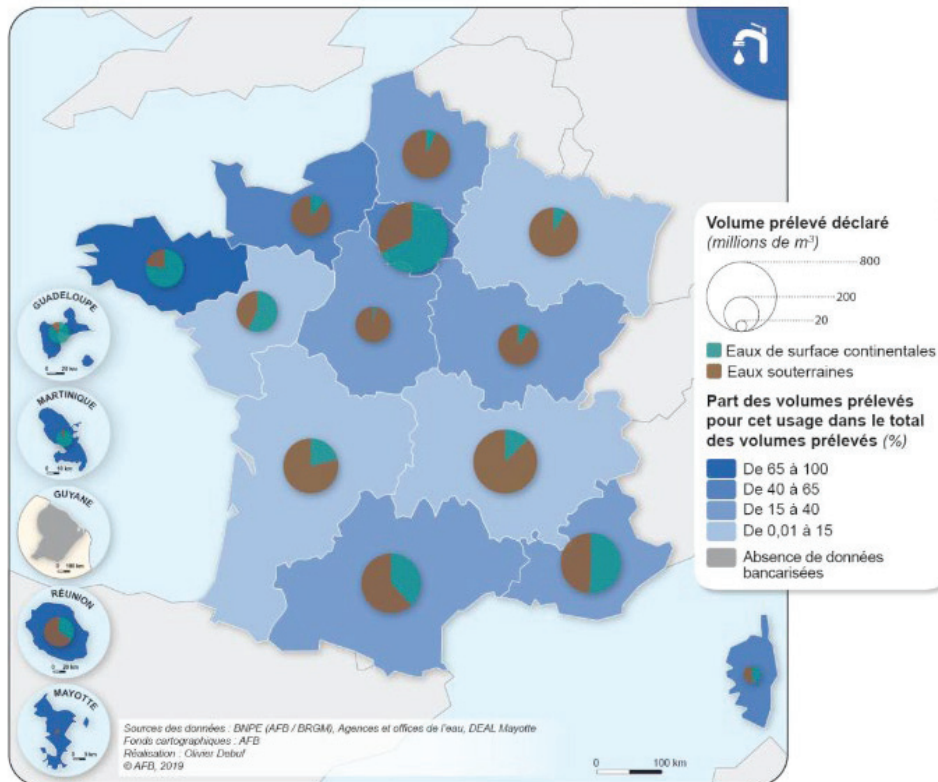


Figure 1.2 : Prélèvements d'eau douce pour l'alimentation en eau potable par région en 2016 – Aubel et al., 2019

Le volume d'eau souterraine en France est évalué à 2000 milliards de m³. Sur ces 2000 milliards de m³, environ 5 % (100 milliards de m³/an) s'écoulent vers les exutoires tandis que près de 0,3% (6 milliards de m³/an) sont prélevés pour les activités humaines (Hérivaux & Maréchal, 2019). En 2013, les prélèvements d'eau souterraine en France étaient répartis de la manière suivante : 25,6% pour l'industrie, 25,7% pour l'irrigation et 48,7% pour la production d'eau potable (Moreau, 2017).

Du fait des activités humaines, les eaux souterraines doivent faire face à plusieurs types de pressions susceptibles de menacer leur durabilité ainsi que leur qualité (Hérivaux & Maréchal, 2019). Dans le cadre d'un pompage intensif, il est possible que la recharge naturelle des eaux souterraines ne soit pas suffisante pour compenser les prélèvements réalisés. Dès lors, les prélèvements peuvent entraîner une surexploitation des eaux souterraines impactant fortement les écosystèmes souterrains (Hérivaux & Maréchal, 2019). Les activités humaines peuvent également avoir un impact considérable sur la qualité physico-chimique des eaux souterraines. En effet, un large panel de contaminants issus des activités humaines a été retrouvé dans les eaux souterraines (Li et al., 2021). Ces polluants peuvent être d'origine industrielle (e.g. hydrocarbures, métaux lourds), agricole (e.g. nitrates et pesticides), ou

encore provenir des eaux usées domestiques (pathogènes et perturbateurs endocriniens entre autres). En plus d'impacter la qualité physico-chimique des eaux souterraines, ces polluants peuvent également altérer leur microbiologie (Moreels et al., 2008 ; Korbel et al., 2022). Par exemple, Hemme et al. (2015) ont observé une diminution de la biodiversité microbienne dans des eaux souterraines contaminées par des radionucléides, des métaux lourds et des solvants. Enfin, la géothermie, les constructions souterraines ou encore les pratiques de recharge artificielle peuvent modifier les températures des eaux souterraines (Attard 2017 ; Refloch 2017 ; Vienken et al., 2019), entraînant un impact potentiel sur leur microbiologie (Briemann et al., 2011 ; Beyer et al., 2016). Du fait des enjeux sociétaux liés à la production d'eau potable et des pressions exercées sur les eaux souterraines, celles-ci constituent une ressource vulnérable à protéger.

II. Fonctionnement hydrogéologique des aquifères poreux et caractéristiques physico-chimiques des nappes

1) Les différents types de nappes et d'aquifères

Les eaux souterraines sont réparties inégalement à l'échelle mondiale dans des systèmes aquifères (Struckmeier & Richts, 2008). Un aquifère est un corps de roche perméable comportant une zone saturée suffisamment conductrice d'eau souterraine pour permettre l'écoulement significatif d'une nappe souterraine (Margat & Castany., 1977). Deux types de nappes se distinguent de par leur connectivité avec la surface : captive et libre (qualifiée également de phréatique). Les nappes captives s'étendent entre deux couches imperméables alors que les nappes libres reposent sur un substrat rocheux imperméable et sont séparées du milieu extérieur par une couche perméable appelée « zone non-saturée » (ZNS) ou « zone vadose » (Fig.1.3). La zone d'interface entre la ZNS et la nappe phréatique est appelée frange capillaire. Classiquement, l'alimentation naturelle des nappes se fait par percolation des eaux pluviales à travers la ZNS. Cette infiltration entraîne localement une élévation du niveau de nappe qui fait de la frange capillaire une zone fluctuante (Fig.1.3).

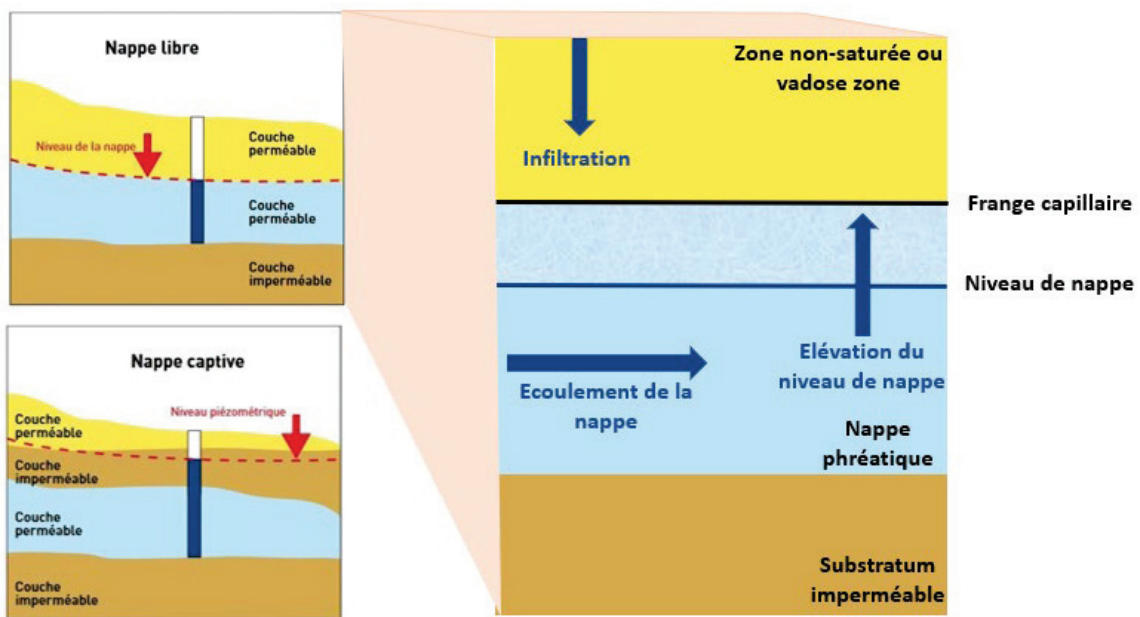


Figure 1.3 : Schéma d'une nappe libre et d'une nappe captive à gauche (Laboratoire SITE – EMSE) et schéma du fonctionnement hydrologique d'une nappe libre à droite (modifié de Smith et al., 2018)

Plusieurs types d'aquifères existent en fonction du type de roche assurant le rôle de réservoir (Hérivaux & Maréchal, 2019) (Fig.1.4). Un aquifère karstique est caractérisé par la présence de grands vides créés par la dissolution des roches carbonatées qui la composent. Au sein de la zone saturée, l'aquifère karstique est souvent caractérisé par une circulation de l'eau à une grande vitesse (quelques heures pour parcourir 1 km) par rapport aux autres types d'aquifères. Un aquifère fracturé est constitué de roches consolidées (granite, grès...) fracturées et possède une perméabilité variable en fonction de l'écoulement de l'eau à travers les connexions entre les fractures (quelques semaines ou mois pour parcourir 1 km). Un aquifère poreux est un aquifère où l'eau s'écoule au sein des pores entre les grains des roches meubles (sables, graviers...) ou dures (calcaire, craie). Dans le cadre d'un aquifère poreux, l'écoulement souterrain est généralement plus lent que dans les autres types d'aquifères décrits (1 an jusqu'à plusieurs années pour parcourir 1 km).

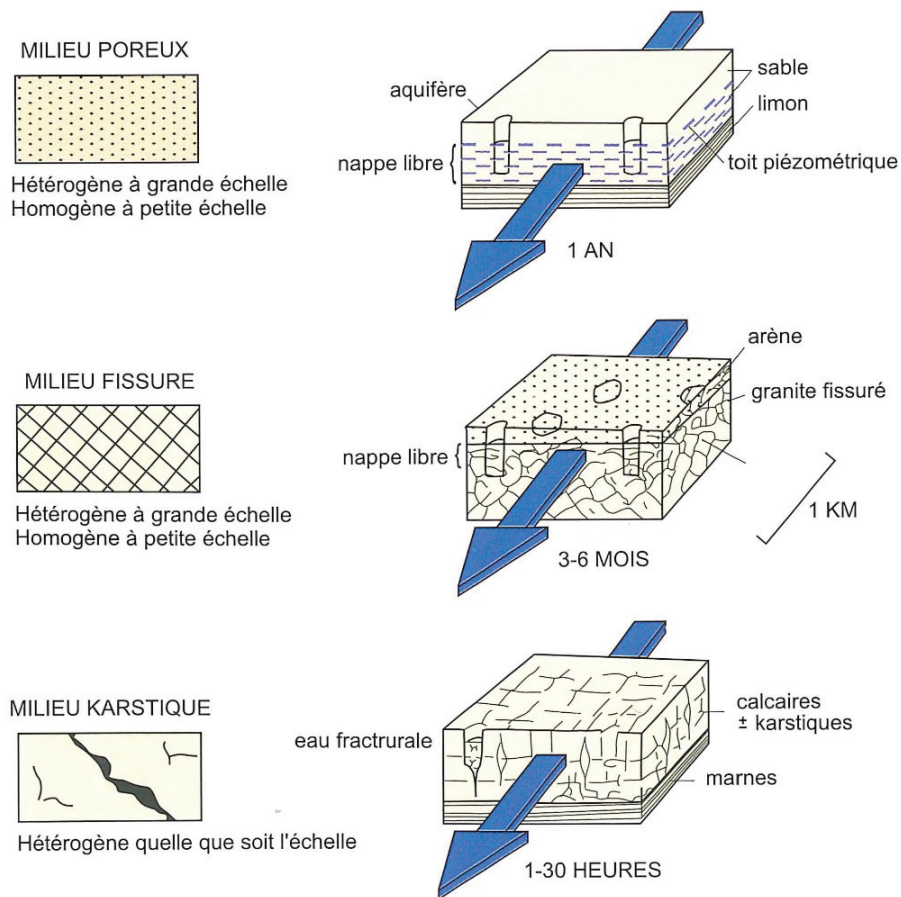


Figure 1.4 : Hétérogénéité des aquifères et vitesse d'écoulement (adapté de Drogué dans Guillemin & Roux., 1992).

Parmi ces trois types d'aquifères, les aquifères poreux localisés au sein des alluvions (sables, graviers...) déposés par les fleuves et les rivières sont les plus sollicités pour l'approvisionnement en eau, et fournissent 45% des volumes d'eau en France (Hérivaux & Maréchal., 2019). Dans le cadre de cette thèse, je vais m'intéresser uniquement aux aquifères de type poreux.

2) Fonctionnement hydrogéologique des aquifères poreux

Au sein des aquifères, les écoulements de nappes sont régis par les gradients hydrauliques ainsi que par la perméabilité du milieu. Le gradient hydraulique exprime la différence de hauteur d'eau entre deux points donnés de la surface d'une nappe, rapportée à la distance qui les sépare (Margat, 1972). Autrement dit, le gradient hydraulique représente la pente de la surface de la nappe dans le sens de son écoulement. Plus cette pente est importante et plus l'eau s'écoule rapidement à travers le milieu. La vitesse d'écoulement à travers un aquifère

est également déterminée par la perméabilité du milieu qui est fonction du volume des pores et de la connectivité entre ces pores (Roy & Lubczynski., 2005). Le volume des pores possède une influence sur les vitesses d'écoulement de la nappe. En effet, plus les pores sont volumineux, plus la proportion du volume d'eau s'écoulant dans la nappe par rapport au volume total de la roche saturée en eau (porosité efficace) est importante. Ainsi, pour un temps donné, le volume d'eau qui s'écoule au sein de la nappe est d'autant plus important que le volume des pores est important. De manière générale, les aquifères poreux sont composés principalement de sable et de graviers, ce qui en fait des milieux avec une porosité efficace importante (13-44% - Woessner & Poeter., 2020) permettant un bon écoulement de la nappe selon les gradients hydrauliques. Cependant, les aquifères ne sont pas homogènes et sont également caractérisés par leur structure, qui influence grandement les écoulements souterrains. La structure d'un milieu poreux fait référence à l'arrangement de la phase solide du milieu et des pores associés. Cet arrangement détermine la continuité du réseau poral (ou connectivité entre les pores) ce qui influence les vitesses d'écoulements à travers le milieu poreux. A l'échelle porale, le principal paramètre influant sur la connectivité entre les pores est ce qu'on appelle le rayon critique. Il correspond au rayon de la plus grande sphère pouvant traverser librement le milieu poreux (Fig.1.5 - B). Dans des systèmes d'aquifères poreux, Nishiyama & Yokoyama., (2017) ont observé des rayons critiques variant de 1,5 à 39 μm . Plus le rayon critique est grand et plus la connectivité entre les pores et la vitesse d'écoulement sont importantes. De plus, la vitesse d'écoulement dans le milieu poreux dépend également de la tortuosité du milieu (Fig.1.5 - B). La tortuosité est définie comme le rapport entre la longueur moyenne des voies d'écoulement réelles et la longueur du milieu poreux (Nishiyama & Yokoyama., 2017). Ainsi, plus la tortuosité est faible (proche de 1) et plus la vitesse d'écoulement à travers le milieu poreux est importante. A l'échelle de l'aquifère, cette connectivité entre les pores dépend grandement de l'environnement sédimentaire de dépôt et de la cimentation naturelle ultérieure des grains de sable. En effet, le substrat sédimentaire est généralement formé par un dépôt successif de différentes couches sédimentaires appelées lithofaciès (Heinz et al., 2003). Chaque lithofaciès est associé à une distribution granulométrique caractéristique (e.g. gravier avec matrice, gravier bimodal... - Fig.1.5 - A). Cette diversité granulométrique entraîne une hétérogénéité dans la distribution des tailles de pores entre chaque lithofaciès, et donc une modification de la continuité du réseau poral, de

la perméabilité et des vitesses d'écoulement, à l'échelle de l'aquifère (Goutaland 2008 ; Slimene et al., 2017)

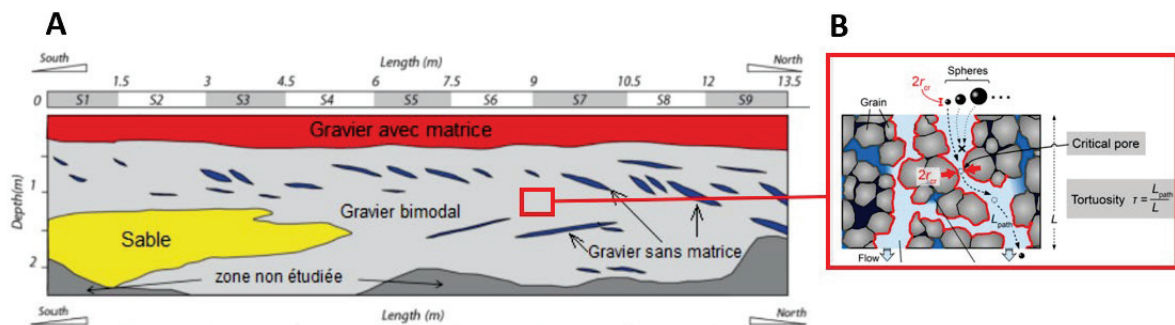


Figure 1.5 : Schéma de lithofaciès au sein d'un aquifère poreux (A) et schéma de la structure et des caractéristiques des pores au sein d'un lithofaciès (B) – Modifié de Slimene., 2015 et Nishiyama & Yokoyama., 2017

3) Caractéristiques physico-chimiques des nappes

L'absence de lumière entraîne une absence de production primaire au sein des eaux souterraines. A ce titre, le développement des organismes vivants dans les nappes est dépendant de la matière organique provenant de la surface par des processus d'infiltration. Cependant, durant l'infiltration des eaux de surface, une grande partie de la matière organique est piégée par la matrice sédimentaire et/ou dégradée par les communautés microbiennes de la ZNS. Seule une faible fraction de la matière organique s'infiltrant atteint la nappe (majoritairement sous forme de carbone organique dissous - COD), ce qui fait des nappes des milieux oligotrophes. Concrètement, les concentrations en COD dans les aquifères poreux sont le plus souvent inférieures à 2 mg.L^{-1} alors qu'elles sont souvent supérieures à 4 mg.L^{-1} dans les eaux de ruissellement pluviales (Zhou et al., 2012 ; Foulquier et al., 2010 ; Mermillod-Blondin et al., 2015).

Les nappes sont généralement caractérisées par de fortes concentrations en solides dissous qui dépendent de la composition des roches et des processus d'altération ayant lieux au sein de l'aquifère, (Gibert et al., 1994 ; Jebreen et al., 2018 ; Kanduč et al., 2019). Par exemple, les nappes des milieux carbonatés possèdent souvent des concentrations importantes en HCO_3^- et Ca^{2+} alors que les nappes des milieux salins peuvent être enrichies en Na^+ , K^+ et Cl^- ou Ca^{2+} , Mg^{2+} , SO_4^{2-} (Gibert et al., 1994). Aussi, comme la conductivité électrique (capacité à conduire

le courant électrique) est associée à la quantité d'ions en solution, les nappes sont généralement caractérisées par une conductivité électrique plus élevée que les eaux de surface (Datry., 2003). A titre d'exemple, Foulquier., 2010a) a observé des conductivités des eaux de ruissellement pluvial de l'ordre de $100 \mu\text{S cm}^{-1}$ alors que celles des eaux souterraines étaient systématiquement supérieures à $500 \mu\text{S cm}^{-1}$.

Alors que les eaux de surfaces sont soumises à des variations importantes de température au fil des saisons, les nappes présentent généralement une plus grande stabilité thermique. Cette stabilité thermique est liée au fait que le transfert de chaleur de la surface à la nappe se fait par conduction au sein de la ZNS qui possède une faible conductivité thermique (Foulquier et al., 2009 ; Ferris et al., 2021). A titre d'exemple, Benz et al. (2017) ont observé une faible variabilité thermique des nappes (avec une épaisseur de ZNS inférieure à 60m) dont les températures s'approchent de la température annuelle moyenne de l'air. Refloch (2017) a ainsi observé une stabilité thermique de la nappe d'accompagnement du Rhône au cours de la période 2015-2016 de l'ordre de $13,7 \text{ °C}$ (écart-type $\pm 0,39$), alors que les températures des eaux de surface variaient de 4 °C en période hivernale jusqu'à 26 °C au cours de l'été.

III. Biofilms : généralités et cas particulier des biofilms en milieux aquatiques souterrains

1) Le mode de vie sous la forme de biofilm

Les micro-organismes sont des êtres vivants qui ont pour unique point commun leur taille microscopique et qui forme, par conséquent, un ensemble très hétérogène (Melquiot., 2003). Ils comprennent des organismes procaryotes (bactéries et les archées) ainsi que des organismes eucaryotes unicellulaires plus faiblement représentés. Les procaryotes sont parmi les organismes les plus abondants et les plus répandus sur Terre. Les bactéries en représentent la grande majorité. Ainsi, Bar et al. (2018) a estimé que la biomasse bactérienne (70 gigatonnes de carbone) représentait la deuxième biomasse la plus importante sur terre après celle des plantes (450 gigatonnes de carbone). Les archées possèdent quant à eux une biomasse 10 fois moins importante que celle des bactéries (7 gigatonnes de carbone).

Les micro-organismes, et plus particulièrement les procaryotes, sont abondants dans la quasi-totalité des environnements, même les plus extrêmes. Ils sont aussi bien présents dans le sol et les océans que dans les sous-sols continentaux profonds ou encore les eaux souterraines.

Bien qu'une partie des micro-organismes peuvent être présents sous forme planctonique (ou libre), la majorité d'entre eux vivent sous forme de biofilm (Flemming & Wuertz., 2019). Un biofilm se définit comme un assemblage de cellules microbiennes vivant enchevêtrées au sein d'une matrice polymérique par adhésion à une surface nommée « substrat », au niveau d'une interface (liquide/air, sol/air, liquide/solide) (Characklis et Marshall, 1990). Les micro-organismes des biofilms sont extrêmement variés (bactéries, archées, eucaryotes). Ils sont caractérisés par de très fortes interactions au sein du biofilm, dans le cadre de leur complémentarité métabolique notamment. La matrice polymérique est une composante fondamentale du biofilm car elle garantit son intégrité structurelle et fonctionnelle. Cette matrice, synthétisée par les micro-organismes, est constituée principalement d'eau à laquelle s'ajoute des polysaccharides, mais également d'autres éléments comme des protéines, des lipides ou encore des acides nucléiques (Flemming et al., 2007) (Fig. 1.6).

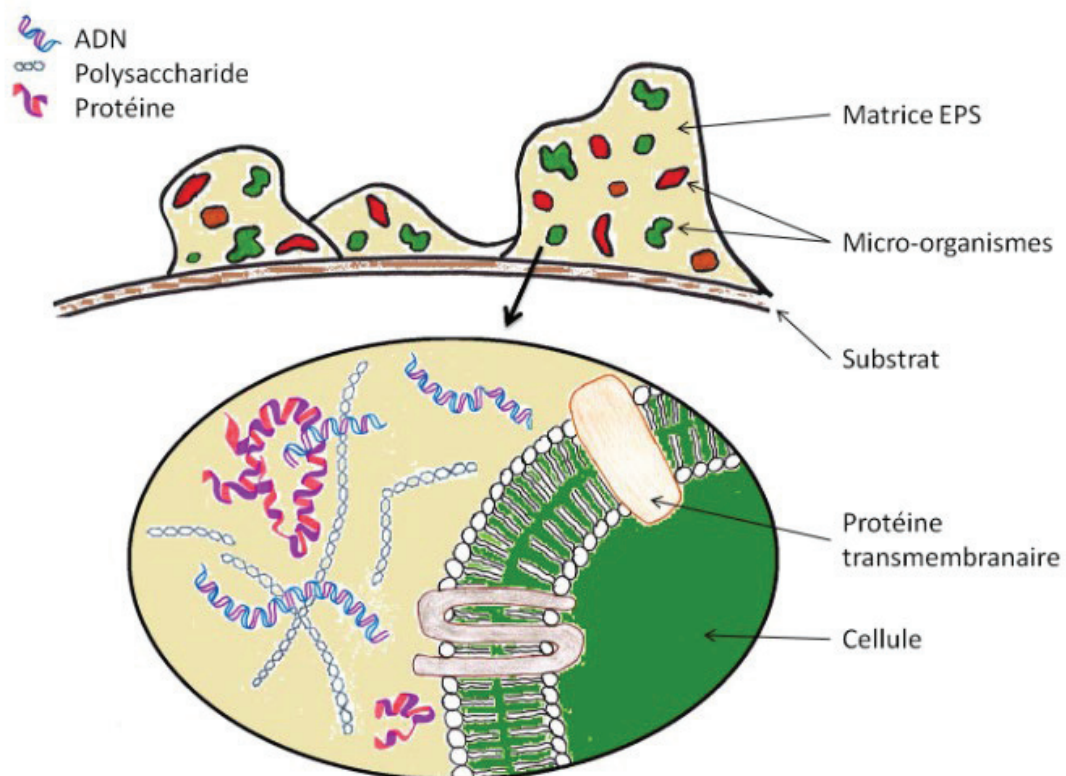


Figure 1.6 : Schéma d'une matrice polymérique de biofilm et ses composantes – Gette 2013

2) Avantages du mode de vie sous la forme de biofilm

Le mode de vie sous la forme d'un biofilm fournit un certain nombre d'avantages par comparaison au mode de vie planctonique (Flemming & Wingender., 2010). Ce mode de vie permet tout d'abord une résistance accrue des micro-organismes la composant aux perturbations environnementales (Smith et al., 2018). A titre d'exemple, les biofilms maintiennent un environnement hautement hydraté permettant une tolérance des micro-organismes à la dessiccation (McKew et al., 2011). De plus, la matrice polymérique joue le rôle de « barrière » entre le milieu extérieur et les cellules du biofilm, fournissant ainsi une protection des micro-organismes face à de nombreux contaminants comme les agents antimicrobiens ou les métaux lourds (Mah & O'Toole., 2001 ; Nocelli et al., 2016). Ce mode de vie permet également un meilleur piégeage des nutriments provenant de l'environnement, ou bien produits par les cellules du biofilm, par des processus de sorption au sein de la matrice polymérique qui est chargée négativement (Sheng et al., 2008 ; Ferris et al., 2021). En plus d'accumuler les nutriments au sein de la matrice polymérique, le mode de vie en biofilm permet une dégradation coopérative des composés organiques complexes en composés organiques plus simples, facilement assimilables (Hoffman & Decho., 1999). En effet, une grande diversité d'enzymes extracellulaires (à la surface des cellules ou libres dans la matrice polymérique) permet une hydrolyse d'une grande variété de composés organiques complexes en composés organiques de plus faibles poids moléculaires. Aussi, l'organisation en biofilm est un mode de vie conférant un avantage stratégique pour les micro-organismes la composant, aussi bien en termes de protection que de fonctionnement.

3) Rôle des biofilms dans la dégradation de la matière organique

Les micro-organismes sont dépendant d'une source d'énergie, d'un type de donneur d'électron et d'une source de carbone pour leur développement et leur fonctionnement (Ferris et al., 2021). Les organotrophes sont les micro-organismes qui dégradent la matière organique du milieu afin d'obtenir une source de carbone pour la production de leur biomasse. Les hétérotrophes métabolisent quant à eux la matière organique pour obtenir leur source d'énergie dans le cadre de leur métabolisme. La plupart du temps, les organotrophes sont aussi hétérotrophes car ils utilisent la matière organique comme source d'énergie et de carbone (Fig 1.7.). Les communautés microbiennes assurent alors un rôle écosystémique fondamental car elles sont au centre des processus de la dégradation de la matière organique. Cette dégradation est principalement réalisée lors de la respiration aérobie par les organo-

hétérotrophes (Goldschneider et al., 2006). Cependant, lorsque l'oxygène est absent ou limitant dans l'environnement, notamment en milieu souterrain, d'autres accepteurs d'électrons peuvent prendre le relais (NO_3 puis MnO_2 en l'absence de NO_3 , etc.) conduisant en une respiration anaérobie (Fig.1.7). Des micro-organismes appartenant aux autotrophes, tels que les bactéries pourpres non-sulfureuses, peuvent également participer à la dégradation de la matière organique (Garimella et al., 2017).

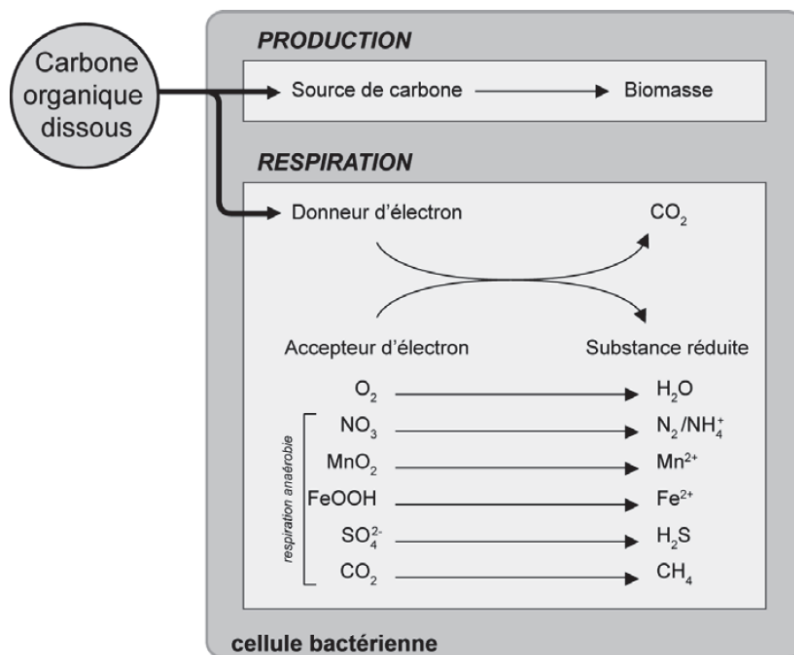


Figure 1.7 : Illustration simplifiée des voies métaboliques des micro-organismes souterrains organo- hétérotrophes - Foulquier et al., 2010 (modifié d'après Goldscheider et al. 2006)

Avec les pollutions engendrées par les activités humaines, la capacité des micro-organismes à métaboliser les contaminants en composés moins toxiques est hautement exploitée dans les processus de bioremédiation (Verma & Jaiswal., 2016 ; Sharma et al., 2019). Aussi, les micro-organismes, et plus particulièrement les hétérotrophes, sont capables de dégrader un large panel de composés organiques pouvant potentiellement présenter une menace pour les écosystèmes (Chatterji & Kumar, 2022). A titre d'exemple, les biofilms microbiens ont le potentiel de dégrader les hydrocarbures et les pesticides (Lu et al., 2011 ; Ye et al., 2018). La forte capacité des communautés à dégrader les composés organiques est liée à plusieurs facteurs. Tout d'abord, la présence de la matrice polymérique permet une dégradation

coopérative des composés organiques comme énoncé précédemment. De plus, les communautés sont capables d'une adaptation biochimique lorsqu'elles sont exposées à un nouveau composé organique. En effet, les communautés au sein des biofilms sont capables d'une augmentation relativement rapide de l'expression de gènes existants. Par exemple, Karlsson et al., 2019 ont observé une forte augmentation de l'expression relative du gène CspA (encodant pour une protéine possédant un rôle important dans la réponse aux stress environnementaux) chez *Rheinheimera* sp. BAL341 après quelques heures d'exposition à une source de pollution aux hydrocarbures et aux phosphates d'éthers. Les micro-organismes ont également souvent la capacité de développer de nouvelles voies de dégradation et ainsi de pouvoir dégrader de nouvelles molécules émergentes (Van der Meer 2006). En effet, plusieurs mécanismes peuvent permettre aux communautés microbiennes de générer de nouvelles variations et combinaisons génétiques, conduisant à des capacités de biodégradation potentiellement importantes. Parmi ces mécanismes se trouvent les mutations ou le transfert horizontal de gènes (HGT) (Medini et al., 2005).

4) Processus d'assemblage des communautés

A l'échelle de l'habitat, les communautés microbiennes présentes sont issues de plusieurs processus permettant ou non le développement d'espèces présentes dans un pool régional d'espèces (Cornell et Harrison, 2014). Les processus écologiques et évolutifs qui structurent les communautés microbiennes localement peuvent être répartis en 4 grands processus comme reporté dans Vellend (2010) : la dispersion, la sélection, la dérive et la spéciation (Fig. 1.8). La dispersion est un processus par lequel les êtres vivants vont être déplacés d'une communauté à une autre (transport par l'eau ou par l'air par exemple). Ce processus dépend alors de la connectivité entre les habitats permettant plus ou moins de transferts d'individus d'une communauté vers une autre. Dans le cas où la connectivité entre habitats est faible, on peut avoir une limitation de la dispersion augmentant l'importance d'autres processus au sein des communautés tel que la spéciation (Papke & Ward., 2008) ou la dérive (Beaton et al., 2016). Lorsque la connectivité entre habitats est forte, on peut avoir un effet important de la dispersion d'une communauté à l'autre dans l'assemblage des communautés (Leibold et al., 2004 ; Heino et al., 2015). La sélection apparaît comme le processus le plus étudié dans l'assemblage des communautés (Lindström et Langenheder, 2012). La sélection est un processus déterministe où les conditions environnementales (filtres abiotiques) et les

interactions entre espèces (filtres biotiques) sélectionnent les microorganismes pouvant se développer localement. Les principales conditions environnementales intervenant dans la sélection sont : la présence de lumière, les concentrations en nutriments et en contaminants, la température, le pH, les courants d'eau et la force ionique (Ferris et al., 2021). En dehors des conditions environnementales, les interactions entre espèces jouent également un rôle dans la sélection par des processus de compétition ou de prédation par exemple (Wanjugi & Harwood., 2013). Enfin, des études ont montré que des processus stochastiques (dérive et spéciation) jouaient aussi un rôle dans l'assemblage des communautés (Chase and Myers, 2011). La dérive est un processus stochastique lié aux changements démographiques des organismes. Aussi, ce processus est associé au taux d'extinction et de reproduction des organismes et est d'autant plus important que les espèces présentent des abondances très faibles dans la communauté. Enfin, la spéciation est un processus évolutif qui mène à l'émergence de nouveaux variants génétiques dans le milieu. Plusieurs mécanismes propres aux micro-organismes peuvent mener à cette émergence de nouveaux variants génétiques dans le milieu. Parmi eux, on peut retrouver les mutations ou le transfert horizontal de gènes (HGT) comme cité précédemment (Medini et al., 2005). La sélection du milieu détermine ensuite la persistance de ces nouveaux variants dans l'environnement.

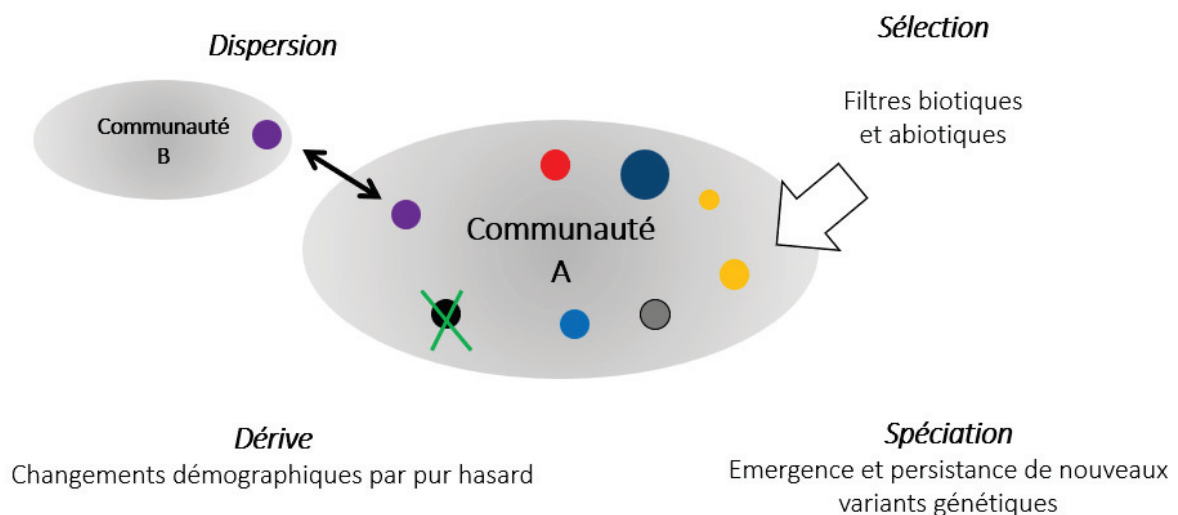


Figure 1.8 : Les 4 grands processus d'assemblage des communautés selon Vellend (2010)

5) Les biofilms des eaux souterraines

1. Micro-organismes des nappes

Il y a 40 ans, l'étude des micro-organismes se limitait aux sols et à la rhizosphère car on pensait que les conditions nécessaires à la vie ne pouvaient pas être présentes en profondeur (Ferris et al., 2021). A partir des années 1970, l'étude des micro-organismes des eaux souterraines s'est développée lorsque des problèmes de corrosion et de colmatage ont été révélés lors des prélèvements d'eau souterrains (Griebler et & Lueders., 2009). Bien que des invertébrés aquatiques (crustacés, vers, escargots, amphibiens...) peuvent être présents dans les eaux souterraines, la majorité de la vie souterraine est composée de micro-organismes dont la survie dépend des nutriments en provenance de la surface. Aussi, les communautés microbiennes au sein des nappes sont constituées en majorité d'organismes hétérotrophes adaptés à un environnement pauvre en matière organique (Griebler et & Lueders., 2009). A titre d'exemple, les communautés microbiennes des nappes sont caractérisées par un taux de croissance réduit par rapport à celles de milieux riches en nutriments leur permettant d'utiliser des gradients d'énergie extrêmement faibles et d'absorber les substances dont ils ont besoin à des niveaux de concentration très faibles (Goldscheider et al., 2006). Les phylums les plus représentés sont les Proteobacteria, les Bacteroidetes, les Actinobacteria (Griebler & Lueders., 2009 ; Shirokova & Ferris., 2013 ; Chen et al., 2019). Cependant, un microbiote « endémique » des eaux souterraines n'a pas encore été décrit (Smith et al., 2018), ce qui est probablement lié à la méconnaissance encore aujourd'hui des espèces existantes. En effet, les méthodes classiques de détermination des espèces microbiennes souterraines par des cultures en laboratoires ont montré leurs limites. Des études suggèrent ainsi que les microorganismes non-cultivables représentent plus de 90 % de la diversité totale de la plupart des populations microbiennes procaryotes (Goldscheider et al., 2006 ; Ferris et al., 2021). Les nouvelles méthodes de séquençages développées au cours de cette dernière décennie permettent d'envisager une meilleure description des microorganismes et notamment des microorganismes non-cultivables. Le fait que ces avancées récentes permettent de découvrir de plus en plus de nouvelles espèces chaque année (Anantharaman et al. 2016 ; Stocchino et al., 2017) suggère que la connaissance de la diversité des microorganismes est en pleine expansion.

2. Processus d'assemblage des communautés microbiennes des nappes

Le principal processus structurant les communautés microbiennes des nappes est la sélection (Lindström et Langenheder, 2012 ; Fillinger et al., 2019). Par exemple, Fillinger et al., 2019 ont montré que les concentrations en COD, oxygène, potassium ou encore le pH peuvent sélectionner les communautés présentes localement au sein des aquifères poreux. Comme les nappes sont oligotrophes, l'assemblage des communautés microbiennes est particulièrement sensible aux concentrations et à la qualité du COD provenant des milieux de surface (Hofmann and Griebler, 2018). Ainsi, plusieurs études suggèrent que certains groupes bactériens (comme les Alphaprotéobactéries) sont favorisés pour des concentrations faibles en COD alors que d'autres groupes (comme les Bacteroidetes) sont favorisés dans les milieux enrichis en COD (Eiler et al., 2003 ; Beyer et al., 2015 ; Voisin et al., 2020). D'autres facteurs, dépendant des caractéristiques de l'aquifère et des éléments limitants du milieu, peuvent également participer aux processus de sélection. La température est un facteur abiotique qui peut sélectionner les espèces localement (Bonte et al., 2013). En effet, chaque espèce de micro-organisme se développe dans une zone de température donnée en dehors de laquelle elle ne peut se développer. Au sein de cette zone, il existe une température de fonctionnement optimale propre à chaque micro-organisme (Ferris et al., 2021). Bien que certains micro-organismes soient capables de survivre indifféremment dans des conditions aérobies ou anaérobies, les micro-organismes sont la plupart du temps spécialisés en ce qui concerne l'accepteur d'électron qu'elles utilisent dans leurs métabolismes. Ainsi, les communautés des milieux aérobies sont significativement différentes de celles présentes en milieu anaérobie (Franklin et al., 1999).

Alors que la sélection est le principal facteur qui structure l'assemblage des communautés des nappes, d'autres processus peuvent également avoir leurs importance (Langenheder et al., 2019). A titre d'exemple, la dispersion au sein de la nappe peut jouer un rôle dans le transport de micro-organismes d'une communauté à une autre (Taylor et al., 2004 ; Lindström et Langenheder, 2012). De plus, la limitation de la dispersion, ainsi qu'une faible densité de population peuvent favoriser la dérive dans l'assemblage des communautés (Goldshreiber et al., 2006 ; Beaton et al., 2016 ; Fillinger et al., 2019).

IV. Gestion des eaux pluviales en ville et impacts sur le compartiment souterrain

1) Systèmes d'infiltration des eaux pluviales

En 2018, 55 % de la population vivait dans des zones urbaines et cette tendance devrait s'accroître pour atteindre 66 % d'ici 2050 (United Nations, 2019). Par conséquent, les zones urbaines devraient doubler de 2020 à 2050 (Angel et al, 2011). L'une des modifications majeures du paysage associée à l'urbanisation est l'augmentation de la couverture de surface imperméable (Arnold et Gibbons, 1996). L'imperméabilisation des surfaces urbaines modifie le cycle naturel de l'eau en augmentant le ruissellement des eaux pluviales lors des événements pluvieux. Cette augmentation du ruissellement en milieu urbain peut avoir plusieurs conséquences sur les sociétés humaines et sur les écosystèmes aquatiques. Tout d'abord, l'augmentation du ruissellement dans les zones imperméabilisées peut entraîner des inondations urbaines et réduire la recharge naturelle des eaux souterraines par infiltration des eaux pluviales (Mays, 2013 ; Naik et al., 2008 ; Tam et Nga 2018). De plus, le ruissellement entraîne une charge en polluants des eaux pluviales le long de leurs parcours (Müller et al., 2020), avant que ces dernières ne se déversent au niveau de leurs exutoires (cours d'eau, océans, lac, eaux souterraines). C'est dans ce contexte que les systèmes d'infiltration des eaux pluviales ont été mis en place dans les zones urbaines pour collecter et infiltrer les eaux de ruissellement pluviales urbaines afin de réduire les risques d'inondation, réduire l'incidence de la pollution urbaine sur les milieux aquatiques et recharger artificiellement les aquifères (Fletcher et al., 2015 ; Natarajan et Davis, 2015 ; Voisin.,2018).

Plusieurs types de systèmes permettant de recharger la nappe artificiellement existent (bassins d'infiltration, noues et tranchées d'infiltration, pavés drainants, jardins pluviaux, etc. – Weiss et al., 2008). Parmi ces systèmes, les bassins d'infiltration constituent la technique de recharge artificielle la plus répandue dans le Monde (Caballero et al., 2018). Dans ma thèse, je me suis intéressé à ce type d'ouvrage. Un bassin d'infiltration constitue une excavation assez étendue, dont le fond n'atteint pas la zone saturée, utilisée pour l'alimentation artificielle d'une nappe par infiltration (Margat & Castany., 1977). Cette recharge a notamment pour conséquence une élévation locale du niveau de nappe durant les périodes de recharge (Fig. 1.9).

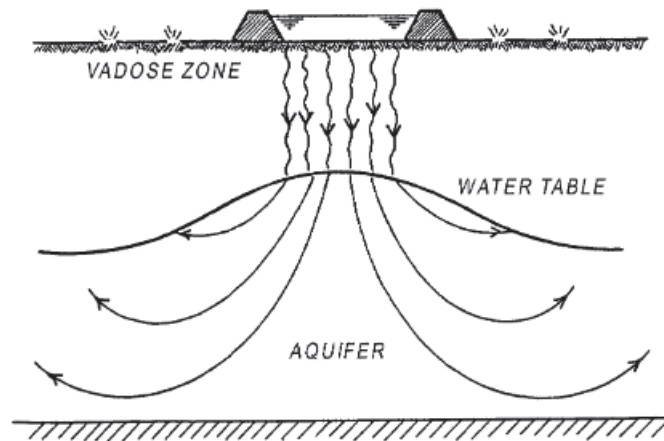


Figure 1.9 : Schéma d'un bassin d'infiltration et élévation du niveau de nappe sous le bassin – Bouwer., 2002

Représentant généralement l'exutoire final des réseaux séparatifs, leur utilisation est systématique dans le cas de grandes surfaces drainées (Datry., 2003) car ces derniers permettent la diminution du ruissellement et la recharge de la nappe à grande échelle grâce à leur capacité à drainer les eaux de ruissellement d'un large bassin versant.

Afin de prévenir une contamination de la nappe par l'infiltration des eaux de ruissellement chargées en polluants, ces systèmes se reposent sur un effet filtre permettant un piégeage et une dégradation des contaminants de l'eau d'infiltration durant son parcours à travers la ZNS. Cet effet filtre de la ZNS dépend de la capacité de rétention de particules de la ZNS par filtration mécanique et physico-chimique. Les particules les plus grossières sont interceptées à la surface des bassins tandis que la filtration entraîne le blocage de particules de plus en plus fine au sein de la ZNS en fonction de la taille et de l'arrangement des particules de substrat (Bradford & Torkzaban., 2008 ; Liu et al., 2016). Cette filtration mécanique affecte surtout les particules de grandes tailles (>30 μm) alors que les particules inférieures à 30 μm de diamètre sont plutôt soumises à une filtration physico-chimique (Le Coustumer, 2008). La filtration physico-chimique est principalement liée aux processus d'adsorption et de précipitations. L'adsorption est la fixation des particules, colloïdes ou solutés sur le substrat par divers processus (liaisons électrostatiques, de van der Waals, covalentes - Teldoldi et al., 2016). Ces processus dépendent fortement de l'affinité de la matière en suspension avec le substrat. Très actifs dans les horizons superficiels de la ZNS, ils peuvent être particulièrement efficaces dans la rétention des métaux lourds et des contaminants organiques non polaires (e.g. HAP) (Datry

et al., 2004). La précipitation joue également un rôle non négligeable dans la filtration physico-chimique. La précipitation est le passage d'une espèce de l'état dissous à l'état solide. Ce processus est particulièrement important dans la filtration des métaux lourds qui se retrouvent extraits de l'eau d'infiltration (Kumari et al., 2016). Il est fortement dépendant du pH et des conditions d'oxydo-réduction. En dehors de sa capacité de rétention, la ZNS est aussi le siège de processus de biodégradation par les communautés microbiennes participant activement à l'effet filtre. La plupart du temps, cette dégradation est réalisée en condition aérobie et est donc associée à une consommation d'oxygène (McMahon and Chapelle 2008). De plus, des processus microbiens sont également liés à la transformation de certains composés inorganiques par des réactions d'oxydo-réduction. A titre d'exemple, les communautés microbiennes peuvent réduire les perchlorates, hautement toxiques pour les écosystèmes souterrains, en ions chlorures (Höhener & Ponsin 2014). Ces processus dépendent des conditions d'oxydo-réduction, de la température et de la vitesse d'écoulement.

2) Impacts de la recharge artificielle sur l'écosystème souterrain

Alors qu'en milieu naturel les nappes sont alimentées par la percolation lente des eaux pluviales à travers la ZNS, la recharge artificielle entraîne une augmentation drastique de la connectivité hydraulique entre la surface et la nappe. Cette augmentation de connectivité entraîne alors une augmentation du transfert de nutriments, de contaminants et de micro-organismes de la surface vers la nappe (Fisher et al., 2003 ; Foulquier et al., 2010a ; Pinasseau et al., 2020), ce qui peut impacter les écosystèmes souterrains (Foulquier et al., 2009 ; Voisin et al., 2018). Dès lors, la recharge artificielle peut conduire en des perturbations physico-chimiques de la nappe, malgré l'effet filtre assuré par la ZNS (Barraud et al., 1999 ; Voisin et al., 2020). Tout d'abord, la recharge artificielle peut entraîner des fluctuations de température de la nappe en fonction des saisons ainsi que des chutes soudaines de la conductivité électrique associées à l'infiltration d'eau pluviale peu minéralisée vers des eaux souterraines fortement minéralisée (Barraud et al., 1999 ; Foulquier et al., 2009 ; Voisin et al., 2018). Puis, plusieurs études ont démontré que la recharge artificielle peut enrichir les nappes en COD et en nutriments comme les orthophosphates lorsque la ZNS n'était pas assez épaisse pour retenir la matière organique et les nutriments contenus dans les eaux de ruissellement (Pabich et al. 2001 ; Datry et al. 2005 ; Voisin et al., 2020). Un impact de la recharge artificielle sur la

concentration en oxygène des nappes a également été observé, bien que cet impact semble varier en fonction du bassin considéré et de l'oxygénation de la nappe rechargée (Datry et al., 2006 ; Foulquier., 2010a). Enfin, plusieurs études ont observé un enrichissement de la nappe en divers polluant (e.g. pesticides) provenant de la surface lors de la recharge artificielle (Fisher et al., 2003 ; Pinasseau et al., 2020).

En plus de modifier les conditions environnementales de la nappe, la recharge artificielle peut également impacter la microbiologie de la nappe, notamment à travers les pressions de sélections exercées sur les communautés microbiennes mais également à travers le transfert de bactéries de la surface vers la nappe (Voisin et al., 2018). A titre d'exemple, plusieurs études ont montré que l'augmentation de la concentration en COD de la nappe lors de la recharge artificielle était associée à une augmentation de la biomasse et de la diversité microbienne ainsi qu'à une stimulation des activités microbiennes (Foulquier et al., 2010b ; Li et al., 2012 ; Voisin et al., 2020). Plusieurs études ont aussi abordé le transfert de bactéries de la surface vers la nappe liée à la recharge artificielle, pouvant impacter les communautés microbiennes de la nappe (Colin et al., 2020 ; De Lambert et al., 2021). Colin et al., 2020 a ainsi démontré que la coalescence (mélange des communautés) des communautés microbiennes d'un bassin versant urbain avec celles d'un aquifère peut se produire et entraîner de nouveaux assemblages au sein de la nappe.

L'impact de la recharge artificielle sur la physico-chimie et la microbiologie de la nappe peut s'étaler plus ou moins sur le long terme en fonction de l'intensité et de la récurrence de la perturbation. Certains auteurs suggèrent par exemple un effet persistant de la recharge sur la concentration en COD de la nappe même en dehors des périodes de recharge (Datry et al., 2003 ; Foulquier., 2009). Concernant le transfert bactérien, Voisin et al., 2018 ont observé un transfert relativement faible de bactéries de la surface vers la nappe à l'échelle d'un évènement pluvieux (10 jours) mais suggèrent que des évènements de recharge répétées entraînerait une augmentation des transferts bactériens de la surface vers la nappe. Ainsi, la recharge artificielle peut impacter les écosystèmes souterrains à une échelle temporelle plus large que l'évènement de recharge considéré.

3) Facteurs influençant l'impact de la recharge artificielle de l'écosystème souterrain

L'impact de la recharge artificielle sur l'écosystème souterrain dépend largement de la capacité de la ZNS à agir comme filtre contre les changements induits par l'infiltration des eaux pluviales (Fritch et al., 2000 ; Pabich et al., 2001 ; Voisin et al., 2020).

Compte tenu de l'effet filtre assuré par la ZNS, plusieurs études ont montré que l'épaisseur de la ZNS pouvait moduler l'impact de la recharge sur la physico-chimie de la nappe associée à l'infiltration. Il a ainsi été observé une relation inverse entre l'épaisseur de la ZNS et l'enrichissement en COD de la nappe associée à l'infiltration d'eau pluviale (Pabish et al., 2001 ; Voisin et al., 2020). Le lien entre l'épaisseur de la ZNS et la concentration en oxygène dissous a également été étudié. Il a ainsi été observé un appauvrissement en oxygène dissous dans la nappe lorsque la ZNS était peu épaisse (< 10m) (Datry et al., 2006). Ce processus provient de l'infiltration d'une eau peu chargée en oxygène dissous après son passage dans le lit du bassin d'infiltration vers une nappe chargée en oxygène. En effet, le lit d'infiltration d'un bassin d'infiltration est le siège d'une intense respiration microbienne qui va consommer rapidement l'oxygène dissous présent dans les eaux de ruissellement pluvial (Nogaro et al. 2007). Or, quand la ZNS est peu épaisse, elle se retrouve rapidement saturée en eau lors des recharges et va conduire directement une eau faiblement chargée en oxygène vers la nappe. Au contraire, si la ZNS est épaisse, la recharge ne va pas saturer la ZNS et l'eau d'infiltration va rencontrer des pores non-saturés riches en oxygène lors de son parcours à travers la ZNS, produisant une ré-oxygénation de l'eau lors de son passage dans la ZNS (McMahon and Chapelle 2008 ; Voisin et al., 2018). Ainsi, l'épaisseur de la ZNS a une influence sur la concentration en oxygène dissous dans la nappe. Bien que l'influence de l'épaisseur de la ZNS sur l'impact physico-chimique de la recharge sur la nappe ait largement été étudiée, beaucoup moins d'études traitent de l'influence de l'épaisseur de la ZNS sur les modifications de la microbiologie de la nappe associée à l'infiltration. Il a néanmoins été démontré que l'impact de l'infiltration sur la microbiologie de la nappe était d'autant plus important que la ZNS était fine (Voisin et al., 2018 ; Voisin et al., 2020).

L'hétérogénéité physique de la ZNS, pouvant conduire à des vitesses d'écoulement contrastées pour des épaisseurs de ZNS similaires, peut remettre en cause l'influence principale de l'épaisseur de la ZNS sur les performances environnementales des bassins d'infiltration (Goutaland et al., 2013 ; Slimene et al., 2015). En effet, une vitesse d'écoulement trop rapide ne permet pas un temps de contact suffisant pour favoriser la rétention dans la

ZNS des composés apportés par les eaux d'infiltration, limitant l'effet filtre assuré par la ZNS (Pitt et al., 1999 ; Larbso et al., 2005). Plusieurs facteurs peuvent alors participer à l'hétérogénéité de la ZNS et donc influencer la vitesse d'infiltration et l'impact de la recharge artificielle sur l'écosystème souterrain. La dessiccation des sols, l'érosion, ou encore la présence de racines peuvent former des fissures au sein du substrat (Sheng et al., 2003 ; Carminati et al., 2009). Ces fissures peuvent entraîner l'apparition d'un réseau de macropores augmentant la perméabilité du substrat. La géométrie des pores peut être modifiée par les conditions chimiques environnementales qui influencent les processus de précipitation décrits précédemment. A titre d'exemple, Lee & Saunders., (2003) montrent les effets du potentiel redox (Eh) sur la précipitation minérale de différents métaux, ce qui peut influencer la perméabilité de la ZNS (Martin., 2013). Enfin, le colmatage du milieu poreux peut fortement limiter la perméabilité de la ZNS (Gette-Bouvarot., 2013 ; Jeong et al., 2018). Le colmatage physique est lié à la capacité de rétention des particules de la ZNS. Les particules peuvent s'accumuler au sein du substrat sédimentaire et réduire la connectivité des pores (Skolasińska., 2006). De la même manière, le colmatage biologique issu du développement microbien sous forme de biofilm réduit considérablement la perméabilité de la ZNS (Rosenzweig et al., 2009). En influençant le temps de transit des eaux pluviales infiltrées de la surface du bassin vers la nappe phréatique, l'hétérogénéité physique de la ZNS peut alors jouer un rôle clé sur la qualité des eaux souterraines (Vías et al., 2010 ; Andres & Sims., 2013 ; Ben Maamar et al., 2015). Malgré ce constat, très peu d'études se sont intéressées à l'influence du temps de transit de l'eau dans la ZNS sur les modifications de la microbiologie de la nappe associée à l'infiltration. Ces études évoquent le temps de transit comme facteur influençant le transfert de micro-organismes de la surface vers la nappe (Voisin et al., 2018 ; De Lambert et al., 2021). Aussi, il existe un vrai manque dans la littérature concernant l'influence du temps de transit sur les changements des conditions physico-chimiques dans la nappe lors de la recharge artificielle et de leurs conséquences sur la microbiologie. On peut ainsi s'attendre à ce qu'un temps de transit long prévienne une modification de la structure et des fonctions des communautés microbiennes de la nappe.

En dehors des deux principales caractéristiques des bassins (épaisseur de la ZNS et temps de transit), l'impact de l'infiltration sur l'écosystème souterrain pourrait également dépendre du taux de recharge de la nappe durant les événements pluvieux (Schmidt et al., 2011 ; Gorski et

al., 2020). En effet, le taux de recharge exerce une influence directe sur les flux de nutriments dissous (Legout et al., 2009; Rühle et al., 2014) ainsi que sur la remobilisation de nutriments au sein de ZNS (Gao et al., 2006; Zhuang et al., 2009). Ce taux de recharge de la nappe dépend à la fois des volumes et des flux d'eaux infiltrés qui sont associés à l'évènement pluvieux considéré (Fisher et al., 2003 ; Owor et al., 2009). En effet, à taille du bassin versant et coefficient de ruissellement égal, le volume d'eau infiltré est d'autant plus important que le cumul de pluie (mm) est important (Foulquier et al., 2010a). De plus, plus l'intensité de l'évènement est importante et plus les flux d'eau et solutés arrivant à la nappe sont importants (Owor et al., 2009 ; Andres et al., 2013). Aussi, on peut s'attendre à ce que l'impact de l'infiltration sur l'écosystème souterrain soit d'autant plus marqué que le taux de recharge est important (Stegen et al., 2016 ; Fillinger et al. 2019). Bien que le taux de recharge de la nappe soit associé aux caractéristiques des pluies, les volumes et flux d'eau infiltrés jusqu'à la nappe nécessitent de considérer localement les processus d'infiltration des eaux dans la ZNS. Etant donnée l'hétérogénéité des systèmes étudiés (cf Figure 1.5), le taux de recharge au sein d'un point de la nappe nécessite d'avoir une mesure locale de l'eau arrivant effectivement dans la nappe. Aussi, la mesure de l'élévation du niveau de nappe peut être considérée comme un bon proxy de la recharge de la nappe (Rühle et al., 2015 ; Xia et al., 2020). En effet, plus le taux de recharge est important et plus l'élévation du niveau de nappe associé à l'infiltration est importante (Wu et al., 2016), impactant potentiellement l'écosystème souterrain. Malgré cela, aucune étude de terrain n'a encore considéré l'influence de l'élévation du niveau de nappe sur la réponse microbiologique de la nappe à l'infiltration des eaux de ruissellement pluvial.

V. Objectifs de thèse

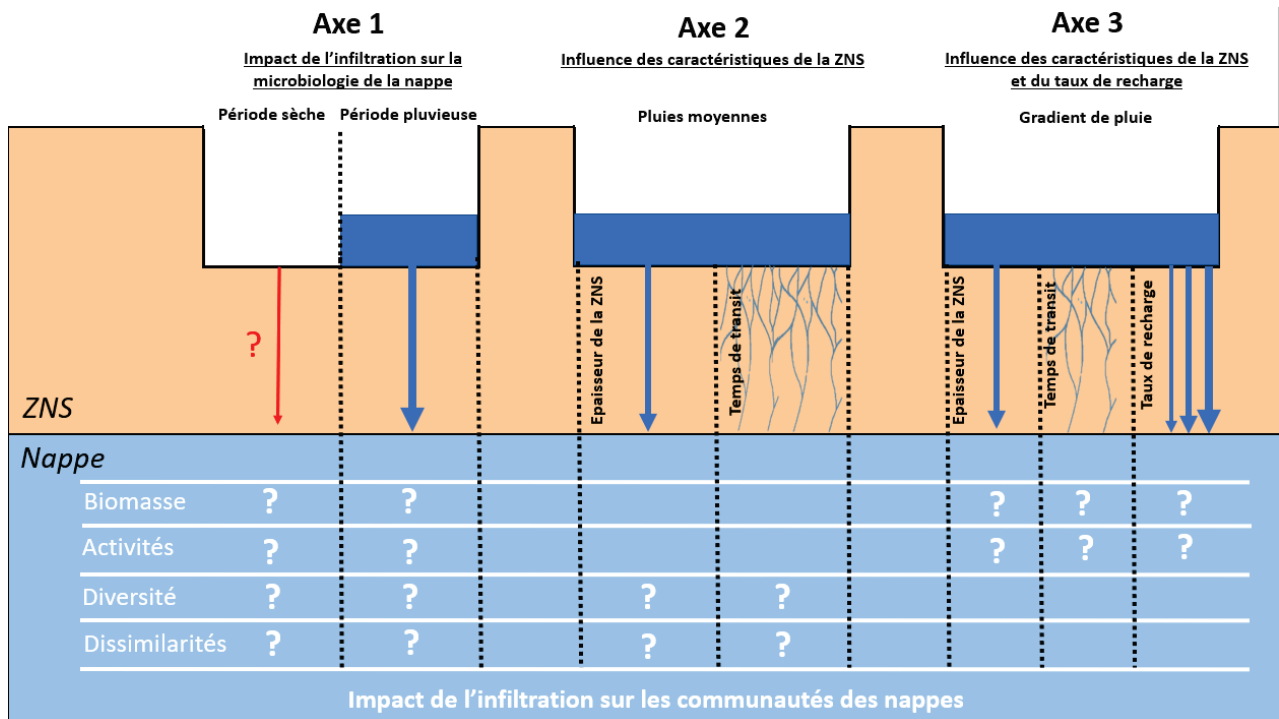


Figure 1.10 : Schéma conceptuel du développement des 3 axes de thèse

A ce jour, les études de terrain s'intéressant à l'impact de la recharge artificielle sur les modifications de la microbiologie de la nappe sont souvent limitées à l'étude de l'épaisseur de la ZNS (Voisin et al., 2018 ; Voisin et al., 2020). Bien qu'une influence de la vitesse d'infiltration à travers la ZNS soit suggérée (Voisin et al., 2018 ; Xia et al., 2020 ; De Lambert et al., 2021), une seule étude de terrain a abordé les relations entre les écoulements d'eau et les modifications de la microbiologie de la nappe associée à l'infiltration (Barba et al., 2019). De plus, cette étude était limitée à un seul site d'étude et un seul évènement pluvieux. Or, l'impact de la recharge artificielle sur la microbiologie de la nappe est supposé varier en fonction des caractéristiques des bassins (épaisseur de la ZNS et temps de transit) et du taux de recharge de la nappe lors des épisodes pluvieux.

Aussi, cette thèse a pour objectif principal de quantifier l'influence du taux de recharge des nappes associé aux évènements pluvieux et des caractéristiques des bassins sur la microbiologie de la nappe. Ce travail de recherche s'appuie sur un design expérimental original permettant pour la première fois de considérer à la fois plusieurs évènements pluvieux contrastés (associés à différents taux de recharge) et plusieurs bassins avec des caractéristiques contrastées. Alors que les caractéristiques des bassins ont été considérées à

travers l'épaisseur de la ZNS et le temps de transit, le taux de recharge de la nappe a été évalué par l'élévation du niveau de nappe associé à l'infiltration. Il a été émis l'hypothèse qu'un plus fort impact de la recharge sur la microbiologie de la nappe était attendu lorsque la ZNS était peu épaisse, le temps de transit était court et l'élévation du niveau de nappe lors de la recharge était importante.

Afin de tester cette hypothèse, 3 axes de recherches ont été développés :

Axe 1 : Caractérisation de l'impact de l'infiltration sur les modifications structurelles et fonctionnelles des communautés microbiennes associées à l'infiltration des eaux pluviales.

A ma connaissance, une seule étude de terrain a considéré conjointement une période sèche et une période de recharge afin d'étudier l'impact de recharge artificielle des nappes par infiltration sur la microbiologie de la nappe (Barba et al., 2019). Cependant, cette étude était restreinte à un seul site d'étude ce qui limite la généralité des résultats obtenus. Le premier axe de cette thèse a alors eu pour objectif de caractériser l'impact de l'infiltration sur la microbiologie de la nappe en considérant 3 bassins possédant des épaisseurs de ZNS comparables (< 3m). Pour cela, les différences de biomasses, d'activités et de structures microbiennes entre les zones impactées par l'infiltration et les zones non-impactées ont été mesurées à deux conditions météorologiques très contrastées : une période pluvieuse extrême et une période sèche. Si la recharge de la nappe lors des pluies a un effet majeur sur la microbiologie, il a été supposé des effets bien plus marqués des bassins (estimés par les différences entre la zone impactée et la zone non-impactée de chaque bassin) sur les variables microbiologiques lors de la période pluvieuse en comparaison avec la période sèche.

Axe 2 : Détermination de l'influence des caractéristiques des bassins sur les modifications de composition des communautés bactériennes souterraines associées à l'infiltration des eaux pluviales.

Peu d'études se sont intéressées à l'influence des caractéristiques des bassins sur les modifications de la microbiologie de la nappe associée à l'infiltration. Il a néanmoins été démontré que l'impact de l'infiltration sur la microbiologie de la nappe était d'autant plus important que la ZNS était fine (Voisin et al., 2020). Cependant, des études suggèrent également une influence du temps de transit de la surface vers la nappe sur la microbiologie dans les eaux souterraines (Voisin et al., 2018 ; De Lambert et al., 2021). Le deuxième axe a eu

pour objectif de déterminer l'influence de l'épaisseur de la ZNS et du temps de transit sur les modifications de la composition des communautés microbiennes souterraines associées à l'infiltration des eaux pluviales. Pour cela, deux pluies moyennes et de même intensité ont été considérées comme des répliques de l'impact de la recharge sur les systèmes d'infiltration étudiés.

Dans le cas théorique d'une perméabilité de la ZNS parfaitement homogène pour les bassins étudiés, une forte corrélation entre l'épaisseur de la ZNS et le temps de transit devrait être observée. Cependant, les bassins peuvent avoir des perméabilités contrastées du fait de leurs nombreuses hétérogénéités (Cf. IV-3). Par conséquent, il peut y avoir une absence de corrélation entre l'épaisseur de ZNS et le temps de transit de l'eau de la surface vers la nappe. Ainsi, Voisin et al. (2018) suggèrent que le temps de transit aurait plus d'influence sur les modifications microbiologiques de la nappe associée à l'infiltration que l'épaisseur de la ZNS car il intègre les hétérogénéités de la ZNS, ce qui n'est pas le cas de l'épaisseur de la ZNS. Néanmoins, peu d'étude ont eu la possibilité d'étudier conjointement l'effet de l'épaisseur de la ZNS et du temps de transit sur la microbiologie dans le contexte de recharge de nappe par des bassins d'infiltration. Dans le cadre de ma thèse, il a été possible de tester clairement l'hypothèse suggérant que le temps de transit de l'eau de la surface vers la nappe est un facteur plus important que de l'épaisseur de la ZNS pour comprendre l'impact de l'infiltration des eaux pluviales sur la composition des communautés bactériennes de la nappe.

Axe 3 : Détermination des influences respectives des caractéristiques des bassins et du taux de recharge sur les changements de la biomasse et des activités microbiennes associés à l'infiltration des eaux pluviales.

L'impact de la recharge sur l'écosystème souterrain dépend à la fois des caractéristiques des bassins (épaisseur de la ZNS, temps de transit) et du taux de recharge. Dès lors, le troisième axe a eu pour objectif de déterminer les influences respectives des caractéristiques des bassins et du taux de recharge sur les changements de la biomasse et des activités microbiennes associés à l'infiltration des eaux pluviales. Pour cela, 6 événements pluvieux contrastés ont été considérés afin d'étudier l'influence du taux de recharge sur la microbiologie de la nappe. Sur les 6 événements pluvieux considérés, 3 sont issus de campagnes réalisées pendant la thèse et 3 autres sont issus de données antérieures à la thèse

acquise par le laboratoire dans le cadre de l'Observatoire de Terrain en Hydrologie Urbaine (OTHU).

De même que pour l'axe 2, une plus grande influence du temps de transit est attendue par rapport à l'épaisseur de la ZNS sur les modifications de la biomasse et des activités microbiennes associées à l'infiltration. Il est également attendu que plus le taux de recharge est important (quantifié par l'élévation du niveau de nappe) et plus un développement de la biomasse ainsi qu'une stimulation des activités microbiennes devrait être observée. L'une des originalités de cet axe 3 a été de considérer conjointement l'influence de trois facteurs (temps de transit, épaisseur de ZNS et taux de recharge) sur la biomasse et l'activité des micro-organismes impactés par l'infiltration.

2

CHAPITRE 2 : METHODOLOGIE GENERALE

I. Sites d'études

Les expérimentations ont été réalisées au niveau de bassins d'infiltration d'eau pluviale situés au sein du système aquifère « nappe de l'Est Lyonnais – nappe d'accompagnement du Rhône » (Foulquier., 2009). La nappe de l'Est consiste en trois couloirs fluvio-glaciaires très perméables (10^{-3} - 10^{-2} m.s⁻¹) bien individualisés séparés par des buttes morainiques de faibles perméabilités (10^{-5} - 10^{-8} m.s⁻¹) : le couloir de Meyzieu, le couloir de Décines et le couloir d'Heyrieux qui se divise en deux parties (Fig. 2.1 ; Foulquier et al., 2011). Au sein de ces couloirs, l'eau s'écoule principalement d'Est en Ouest avant de venir alimenter la nappe d'accompagnement du Rhône. L'épaisseur de la ZNS sus-jacente varie de 40 m à l'amont des couloirs pour atteindre moins de 4 mètres à la périphérie de l'agglomération lyonnaise. Dans les 3 couloirs de la nappe de l'Est lyonnais et la nappe alluviale du Rhône, les prélèvements d'eau souterrains s'élèvent à 108 millions de m³ (données 2014-source base de données SAGE Est Lyonnais), ce qui en fait des ressources stratégiques pour la production en eau potable (PGRE Est Lyonnais 2017).

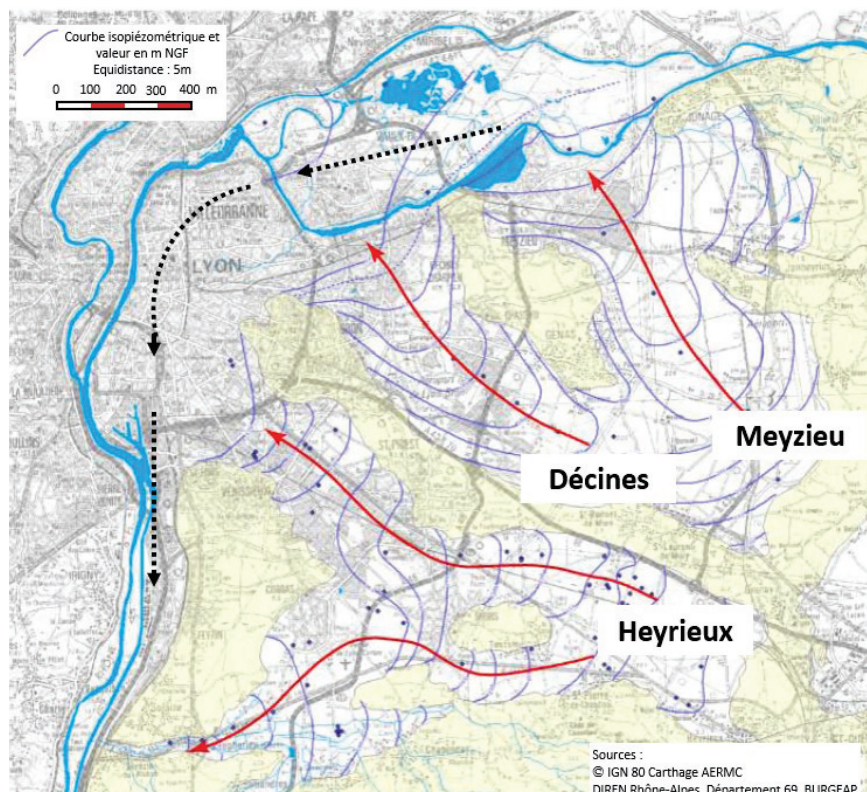


Figure 2.1 : Carte piézométrique de l'agglomération lyonnaise (Lyon, France) et direction générale des écoulements souterrains au sein de la nappe d'accompagnement du Rhône (traits pointillés) et de la nappe de l'Est Lyonnais (traits rouges), modifié de Foulquier (2009)

Six bassins d'infiltration d'eau pluviale ont été sélectionnés afin de quantifier l'influence des caractéristiques des bassins et du taux de recharge de la nappe sur les modifications physico-chimiques et microbiologiques de la nappe associées aux pratiques d'infiltration. Parmi ces six bassins, cinq sont localisés au sein de la nappe de l'Est Lyonnais (DJR, FEY, PES, MIN, GB) et un (IUT) au niveau de la nappe d'accompagnement du Rhône (Fig. 2.2).

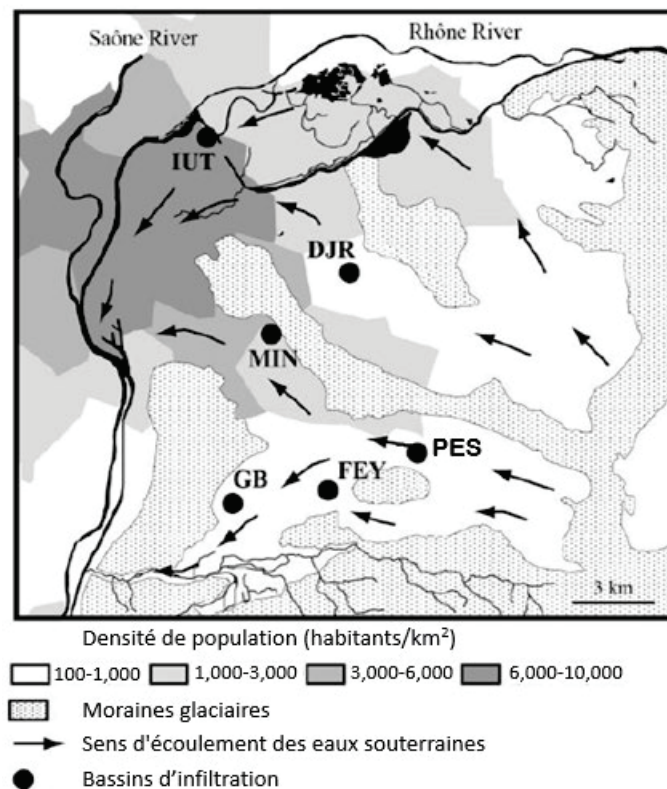


Figure 2.2 : Localisation des six bassins d'infiltration (Grange-Blanche -GB ; Minerve -MIN ; IUT ; Django-Reinhardt -DJR ; Feyzin -FEY ; Pesselière -PES) situés dans le système aquifère « nappe de l'Est Lyonnais – nappe d'accompagnement du Rhône ». (Modifié de Foulquier (2009))

Afin de tester l'hypothèse selon laquelle l'impact de la recharge artificielle est fonction de l'épaisseur de la ZNS, du temps de transit et de l'élévation du niveau de nappe (taux de recharge associés aux événements pluvieux), la sélection des bassins d'infiltration a été effectuée de manière à couvrir une large gamme d'épaisseurs de ZNS, de surface d'infiltration et de superficie de bassins versants (tableau 2.1). Plus généralement, le choix de travailler sur ces bassins s'explique par le fait qu'ils ont été instrumentés dans le cadre de l'OTHU (Observatoire de Terrain en Hydrologie Urbaine). De fait, leur fonctionnement hydrogéochimique a été finement caractérisé (Barraud et al., 2002 ; Datry et al., 2004 ; Foulquier et al., 2009).

La sélection des bassins d'infiltration étudiés lors des différentes campagnes d'expérimentation a été effectuée parmi les six bassins ci-dessus présentés. Cette sélection est adaptée aux hypothèses soulevées dans le cadre des trois axes de recherche constituant ce travail. Pour mémoire, ces trois axes de recherche sont :

- Axe 1 : Caractérisation de l'impact des pratiques d'infiltration des eaux pluviales sur les modifications structurelles et fonctionnelles des communautés microbiennes associées à l'infiltration des eaux pluviales
- Axe 2 : Détermination de l'influence des caractéristiques des bassins sur les modifications de composition des communautés bactériennes souterraines associées à l'infiltration des eaux pluviales.
- Axe 3 : Détermination des influences respectives des caractéristiques des bassins et du taux de recharge sur les changements de la biomasse et des activités microbiennes associés à l'infiltration des eaux pluviales

Le tableau 2.1 ci-dessous synthétise les caractéristiques des bassins globalement sélectionnés et précisent ceux retenus au sein de chaque axe de recherche. La méthode utilisée pour estimer l'épaisseur de la ZNS est précisée dans la section 2-V.

Bassin d'infiltration	Epaisseur moyenne de la ZNS (m)	Surface d'infiltration (ha)	Bassin versant (ha)	Axes dans lesquels les bassins ont été utilisés
Grange Blanche (GB)	1,94±0,60	0,32	300	Axes 1,2,3
Minerve (MIN)	3,68±0,20	0,42	165	Axes 1,2,3
IUT (IUT)	3,60±0,18	0,09	2,50	Axes 1,2,3
Django Reinhardt (DJR)	19,9±0,48	0,87	185	Axes 2,3

Chemin de Feyzin (FEY)	20,8±0,49	0,25	315	Axes 2,3
Pesselière (PES)	12,9±0,26	0,04	21,75	Axe 2

Tableau 2.1 : Principales caractéristiques des six bassins d'infiltration des eaux pluviales étudiés. L'épaisseur moyenne de la ZNS présentée dans ce tableau correspond à la moyenne +/- SD mesurée sur chaque bassin d'infiltration au cours des campagnes considérées.

II. Dispositif expérimental spécifique au suivi des eaux souterraines

Chaque bassin d'infiltration est équipé d'un piézomètre amont et d'un piézomètre aval positionnés le long des chemins d'écoulement des eaux souterraines (Fig. 2.3). Le piézomètre aval est situé dans une zone impactée par les bassins d'infiltration car elle reçoit le panache des eaux pluviales infiltrées au niveau du bassin d'infiltration. En d'autres termes, le piézomètre aval est situé dans une zone de recharge artificielle de la nappe par infiltration des eaux pluviales. Dans la suite du document elle sera désignée comme la « zone impactée ». Inversement, le piézomètre amont est situé dans une zone ne recevant pas le panache des eaux pluviales infiltrées au niveau du bassin. Dans la suite du document, cette zone sera appelée « zone non-impactée ».

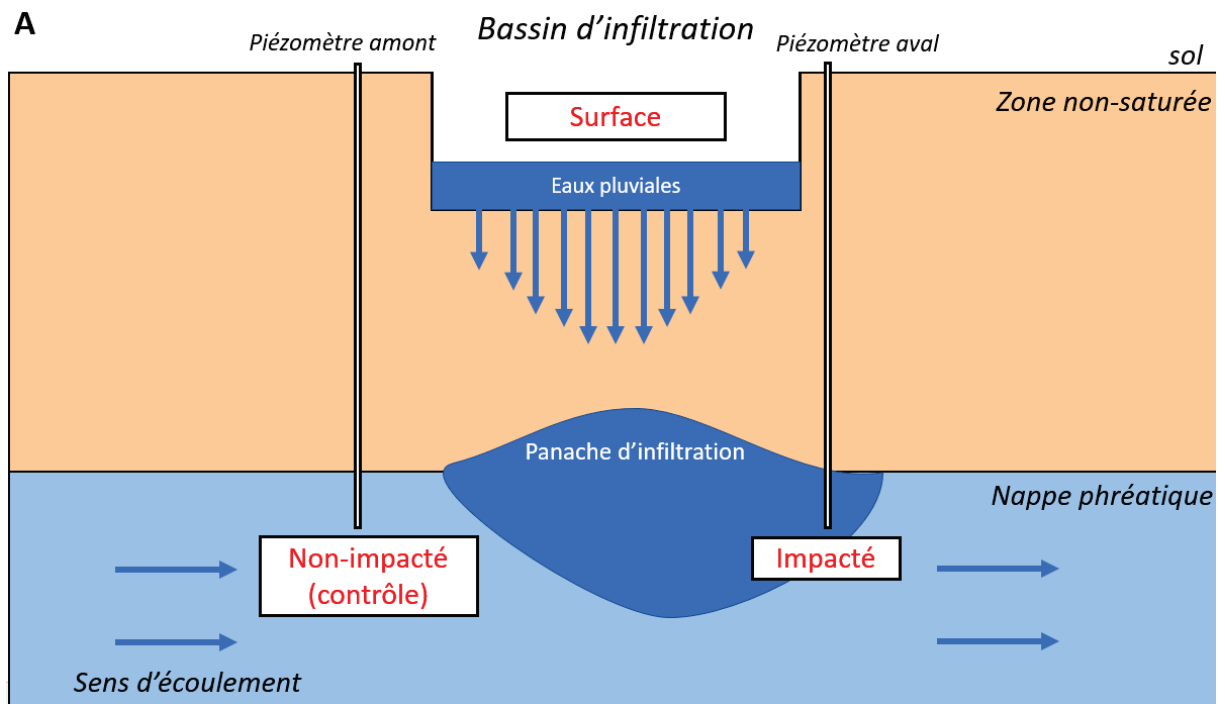


Figure 2.3 : (A) Schéma des bassins d'infiltration et de la localisation des piézomètres. (B) Vue aérienne du bassin de Minerve (MIN) en pointillés rouge et identification de la localisation des piézomètres.

III. Design expérimental : sites et évènements pluvieux étudiés

Les campagnes de terrains effectuées pour tester les hypothèses des trois axes de recherche reposent sur une sélection de bassins d'infiltration (voir section 2-1) et d'évènements pluvieux. Globalement, six campagnes de terrains ont été réalisées dans des conditions

météorologiques contrastées en septembre 2015, août 2016, décembre 2017, novembre 2018, avril 2019 et novembre 2019.

Pour une meilleure lisibilité du design expérimental global, le tableau 2.2 ci-dessous présenté propose une synthèse des événements pluvieux suivis aux cours des différents trois axes de recherche. Ces derniers ont été caractérisés au regard des quantités de pluie cumulées durant une période donnée et du pic d'intensité des pluies durant cette même période.

Campagne	Pluies cumulées sur 10 jours (mm)	Pic d'intensité des pluies (mm/h)	Axes dans lesquels les pluies ont été considérées	Commentaires
Septembre 2015	94,4±3,80	15,0±1,51	Axes 1, 3	Quantité de pluie cumulée et intensité des événements pluvieux les plus élevées
August 2016	0	0	Axes 1, 3	Période sèche
Décembre 2017	38,55±0,55	4,00±0,49	Axe 3	Quantité de pluie cumulée et intensité des pluies les plus faibles.
Novembre 2018	60,9±3,37	4,83±0,28	Axes 2,3	Pluie cumulée moyenne et faible intensité de pluie
Avril 2019	52,8±4,60	8,52±1,30	Axes 2,3	Pluie cumulée moyenne et forte intensité de pluie
Novembre 2019	66,3±1,22	6,53±0,46	Axe 2	Pluie cumulée moyenne et intensité de pluie moyenne

Tableau 2.2 : Pour chaque campagne, les précipitations cumulées (mm) et l'intensité maximale des pluies (mm/h) en moyenne +/- SD mesurées sur les bassins d'infiltration considérés dans cette étude sur une période de 10 jours (Voir 2-IV échantillonnage des biofilms).

Les caractéristiques générales des événement pluvieux étudiés sont les suivantes (tableau 2.2) :

- La campagne de septembre 2015 était caractérisée par les cumuls de pluie et les intensités pluviométriques les plus élevés. Représentant plus de 80% des pluies

accumulées sur le mois, cette campagne constitue un événement pluvieux d'ordre décennal.

- La campagne de décembre 2017 présentait des cumuls de pluie et des intensités plus de 3 fois inférieurs à la campagne de septembre 2015.
- Les trois autres campagnes associées à des événements pluvieux (novembre 2018, avril 2019, novembre 2019) étaient caractérisées par des intensités et des cumuls de pluie intermédiaires. Les événements pluvieux associés sont situés dans la moyenne annuelle.

De plus, une période sèche (août 2016) a également été considérée comme une période de contrôle sans infiltration d'eaux pluviales. Cette sélection de conditions météorologiques très contrastées était particulièrement importante pour pouvoir quantifier l'influence des flux infiltrés sur la physico-chimie et la microbiologie de la nappe.

Les données des 3 premières campagnes (Septembre 2015, Aout 2016, Décembre 2017) ont été acquises dans des travaux antérieurs à ma thèse. Les données des 3 autres campagnes (Novembre 2018, Avril 2019, Novembre 2019) ont été spécifiquement acquises dans le cadre de mon travail de thèse.

IV. Echantillonnage et analyses des eaux souterraines

Mesures en continu in situ

Au cours de chaque campagne et pour chaque bassin, la conductivité électrique (CE) et le niveau de la nappe phréatique ont été surveillés par pas de 1 h avec des sondes de terrain (LTC Levellogger® Junior, Solinst, Canada) dans les piézomètres non impactés et impactés par les bassins d'infiltration.

Mode de prélèvements et analyses ponctuelles des eaux souterraines

Pour chaque campagne de terrain et chaque bassin d'infiltration étudié, trois échantillonnages répétés dans le temps d'eau souterraine (50 cm sous la nappe phréatique) ont été effectués dans les zones non impactées (piézomètre amont) et impactées (piézomètre aval). Le prélèvement des eaux souterraines a été réalisé avec deux méthodes distinctes selon l'épaisseur de la ZNS. Pour les ZNS minces ($ZNS < 10m$), la méthode de Bou-Rouch (Bou et Rouch, 1967) a été utilisée tandis qu'une pompe électrique immergée a été employée pour

les ZNS plus épaisses (ZNS>10m), suivant Voisin et al. (2020). Les concentrations d'oxygène dissous ont été mesurées immédiatement après l'échantillonnage des eaux souterraines avec une sonde de terrain multiparamétrique (PONSEL ODEON X).

Les échantillons d'eau souterraine ont été ensuite filtrés (filtres Whatman™ GF/F de taille de pores de 0,7 µm, GE Healthcare, Boston, MA, USA) préalablement aux dosages des nutriments non organiques et organiques. Les concentrations en ammonium (N-NH₄⁺), nitrate (N-NO₃⁻), nitrite (N-NO₂⁻) et orthophosphate (P-PO₄³⁻) ont été mesurées à l'aide d'un analyseur séquentiel colorimétrique (Smartchem 200, AMS Alliance, Roma, Italie). Les concentrations en COD ont été mesurées avec un analyseur de carbone total (multi-N/C 3100, Analytik Jena, Jena, Allemagne) sur des échantillons pré-acidifiés pour une élimination du carbone inorganique. L'analyse repose sur une combustion à 900 °C et une détection du CO₂ dégagé.

Echantillonnage des biofilms

La collecte des communautés microbiennes au sein des eaux souterraines a été effectuée sur des substrats artificiels développés par Voisin et al. (2016) permettant de standardiser les conditions de colonisation. La capacité de ces substrats à permettre la colonisation d'une communauté comparable à celle développée sur des substrats naturels et représentatif des communautés présentes dans les eaux a été démontrée par ces même auteurs. Les substrats artificiels consistent en des billes d'argile expansée (diamètre compris entre 7,1 et 9 mm) préalablement chauffées à 1200 °C. Les billes d'argile sont disposées dans des sacs en nylon (11,5*4,5 cm ; Sefar Nitex 06-3300/59, Sefar AG, Heiden) d'une maille de 3,3 mm pour permettre une bonne circulation de l'eau et une colonisation homogène des billes. Chaque sac contient trente billes d'argile. Dans chaque piézomètre (zones non impactée/impactée) de chaque bassin d'infiltration, trois sachets de billes d'argiles (Fig. 2-4) ont été placés pour une incubation de dix jours (débuté la veille du début de l'événement pluvieux considéré). Ce temps d'incubation de dix jours a été fixé sur la base d'expérimentations précédemment réalisées sur ces mêmes substrats à l'échelle du laboratoire et dans des eaux souterraines (Voisin et al., 2016, 2020 ; Mermillod-Blondin et al., 2019). Il permet : (1) une colonisation microbienne suffisante des billes d'argile dans les eaux souterraines pour obtenir un développement de biofilm fiable et reproductible (Voisin et al., 2016) et (2) d'échantillonner

les microorganismes de la nappe à l'échelle d'un évènement pluvieux et de son impact sur la nappe.

A l'issue de la période d'incubation (10j), les trente billes de chaque sac ont été réparties au hasard en quatre lots destinés à l'évaluation des caractéristiques des communautés microbiennes (biomasse ; activités hydrolytique et respiratoire ; composition de la communauté bactérienne).

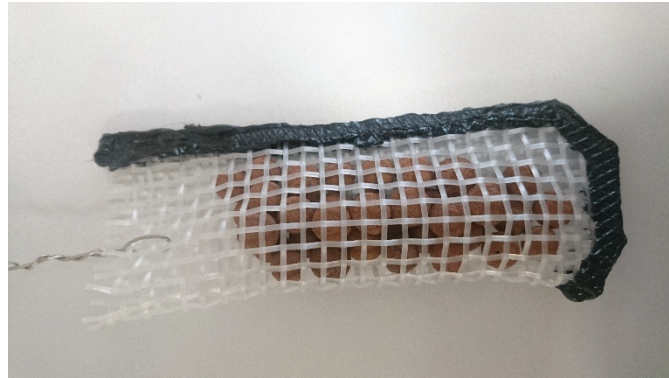


Figure 2.4 : Substrat artificiel pour l'échantillonnage des communautés microbiennes des nappes

Estimation de la biomasse microbienne

La biomasse du biofilm microbien développé sur les billes d'argile a été évaluée par la quantification de la teneur totale en protéines (Sigma Protein Assay Kit P-5656, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) en utilisant la méthode de Peterson (1977).

Mesures des activités enzymatiques microbiennes

Dans le cadre de ce travail, le fonctionnement des communautés microbiennes (biofilms) a été évalué par la mesure de deux activités enzymatiques :

- *L'estérase* impliquée dans les processus de minéralisation de la matière organique ;
- *La déshydrogénase* classiquement utilisée pour évaluer l'activité respiratoire.

Les activités enzymatiques extracellulaires, telles que l'estérase, jouent un rôle majeur dans les processus liés à la minéralisation de la matière organique. En effet, elles catalysent l'hydrolyse de macromolécules organiques en molécules de plus faibles poids moléculaire facilement et directement assimilables par les bactéries. Ces enzymes extracellulaires peuvent être associées à la cellule ou libérées dans la matrice des biofilms suite à la lyse des cellules (Chrost, 1991).

L'activité hydrolytique estérase a été sélectionnée car c'est une activité hydrolytique très globale. Elle est en effet associée à une large variété d'enzymes comme par exemple les protéases, les lipases ou les amylases (Johnon et al., 2017).

L'activité hydrolytique estérase a été estimée selon la méthode de Fontvieille et al (1992). Cette méthode consiste à utiliser le diacétate de fluorescéine (3,6-diacétyl-fluorescéine ; FDA). La production de fluorescéine associée à l'hydrolyse du FDA est mesurée par spectrophotométrie. L'activité respiratoire (déshydrogénase) a été estimée par la mesure de l'activité du système de transport d'électrons (ETS) de la chaîne respiratoire à l'aide d'un accepteur d'électrons artificiel (chlorure de 2- (p-iodophényl) -3- (p-nitrophényl) -5-phényltétrazolium ou INT) dont la réduction conduit à la production de formazan qui est mesuré par spectrophotométrie Houri-Davignon et al. (1989).

Composition des communautés bactériennes

Dans le cadre de cette thèse, la composition des communautés bactériennes de la nappe a été caractérisée par une approche de métabarcoding ADN dont le principe et les différentes étapes sont décrits ci-après.

Le barcoding moléculaire est une technique se basant sur l'amplification et le séquençage d'une portion spécifique de l'ADN (i.e. marqueur ou barcode moléculaire) d'un organisme permettant de déterminer à quelle espèce il appartient sans pour autant avoir à séquencer son génome complet. Le métabarcoding est une extension du barcoding permettant l'identification simultanée de taxons présents dans des échantillons complexes, tels que des biofilms, sur la base du séquençage à haut débit (NGS : next generation sequencing) d'un marqueur moléculaire. En plus des taxons présents, le métabarcoding permet d'estimer les abondances de ces taxons au sein de l'échantillon étudié, ce qui permet d'avoir accès à la composition des communautés (abondances relatives des différents taxons au sein de l'échantillon).

Les étapes suivies pour la détermination de la composition des communautés procaryotes (bactéries et archées) par métabarcoding sont les suivantes (Fig 2.5) : extraction du pool d'ADN, amplification d'une région spécifique de l'ADN (marqueur moléculaire), séquençage des produits PCR, et analyses bioinformatiques. Le gène codant pour le 16S est classiquement utilisé comme marqueur moléculaire pour l'analyse des communautés procaryotes car il

contient des régions hautement conservées présentes chez tous les procaryotes (nécessaires pour définir des amorces « universelles ») encadrant des régions hypervariables (permettant l'identification des différents taxons). De plus, il existe pour ce marqueur des bases de données très fournies (eg. SILVA SSU 138.1 contenant 510508 séquences non redondantes) qui permettent l'assignation taxonomique des séquences générées.

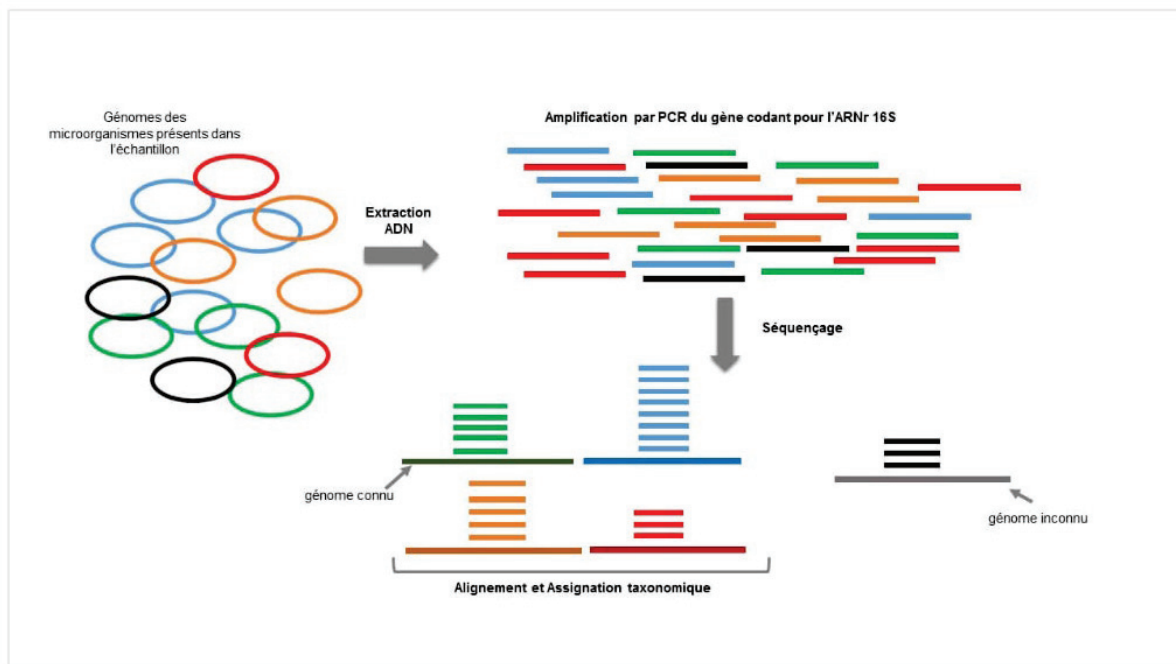


Figure 2.5 : Les différentes étapes du metabarcoding - France Génomique

Dans le cadre de ma thèse, l'ADN des micro-organismes développés sur billes d'argile a été extrait, puis, une portion du gène codant pour l'ARNr 16S a été amplifiée via des réactions en chaîne par polymérase (PCR). Deux portions différentes du gène codant pour l'ARNr 16S ont été amplifiées dans cette thèse en fonction des analyses. Dans le cadre de l'axe 1, la région hypervariable V5-V7 (utilisant la paire d'amorces 799-1193 - Beckers et al., 2016 ; Maes et al., 2016) a été amplifiée et couvre essentiellement le domaine bactérien (Schlaeppli et al., 2020). Dans l'axe 2, la région hypervariable V4-V5 (utilisant la paire d'amorces 515-926 - Caporaso et al., 2012 ; Parada et al., 2016) a été amplifiée et semble fournir une couverture simultanée du domaine archéen et bactérien (Fadeev et al., 2021). Cependant, le % d'ASV appartenant aux archées était minoritaire dans le jeu de données de l'axe 2 (0,0005% du nombre de séquences). Ainsi, dans cette thèse, le terme « procaryote » a été approximé par « bactérien » en raison du faible nombre d'archées détecté.

Une fois amplifiés, les produits PCR ont été séquencés en tirant parti des méthodes de séquençage de seconde génération (NGS) qui permettent un séquençage à haut débit et à coût réduit comparé aux techniques de séquençage de première génération. Tous les échantillons ont été séquencés sur une plateforme Illumina Miseq (en paired-end reads 2 * 300 bp) à Biofidal (Vaulx-en-Velin, France) ou MR DNA (Shallowater, TX, USA).

Des analyses bioinformatiques des données de séquençage ont ensuite permis de déterminer la composition des communautés (i.e. quelles espèces sont présentes, en quelles proportions). Après des étapes de filtre et de « nettoyage » des données brutes de séquençage (différentes selon les pipelines utilisés), un « clustering » des séquences produites en « unités biologiques » a été réalisé (en raison du polymorphisme intra-espèce bactérien et de la présence des erreurs de séquençage dans les lectures). Pour les données des séquençages utilisées dans l'axe 1 de ma thèse, un « clustering » en « operational taxonomic unit » - OTU (Blaxter et al., 2005) a été réalisé alors qu'une approche par « Amplicon sequence variant » - ASV (Callahan et al., 2016) a été privilégié pour les données de séquençage de l'axe 2. La principale différence entre ces deux méthodes réside dans la résolution de séquence obtenus. En effet, les approches de « clustering » OTU regroupent les séquences issues du séquençage autour de séquences représentatives consensus en se basant sur un seuil de dissimilarité. Basé sur un modèle d'erreur, les approches ASV possèdent une résolution de séquence beaucoup plus fine (au nucléotide près), permettant d'éviter le regroupement par similitude et de déterminer des variants de séquences exactes. Enfin, une assignation taxonomique de ces unités biologiques (OTU/ASV) s'appuyant sur une base de données de référence (SILVA dans ce travail) ainsi qu'une estimation des abondances ont été réalisées.

De par la révolution technologique apportée par les NGS, le métabarcoding constitue une méthode rapide et à coût de fonctionnement accessible afin de déterminer la composition d'une communauté microbienne, ce qui le rend applicable à de gros jeux de données. De plus, cette méthode permet d'implémenter de jour en jour les bases de données de référence, ce qui permet de les rendre de plus en plus exhaustives, augmentant l'efficacité de l'assignation taxonomique. Enfin, le métabarcoding, applicable aussi bien aux organismes cultivables que non-cultivables, peut être réalisé à partir de peu de matériel biologique ou bien à partir d'ADN relativement dégradé, ce qui augmente son champ d'application (e.g. ADN environnemental).

Cependant, plusieurs limites associées à cette technique existent. Tout d'abord, les différentes étapes d'acquisition du jeu de données peuvent entraîner l'apparition de séquences erronées (eg. erreurs de séquençage) ainsi que des contaminations (lors de l'étape d'extraction ou lors des PCR par exemple). Le métabarcoding reposant sur l'amplification de fragments de gènes cibles, de potentielles contaminations en amont de l'étape de PCR peuvent ainsi entraîner une accumulation exponentielle d'erreurs et de séquences exogènes (Semenov., 2021). De plus, le nombre de séquences associées à un OTU/ASV ne correspond pas forcément aux abondances relatives réelles à cause des différences dans la composition des génomes ciblés (Louca et al., 2018). En effet, les génomes des procaryotes peuvent contenir différents nombres de copies du gène cible (de 1 à plus de 15 copies pour le gène codant pour l'ARNr 16S - Klappenbach et al., 2001), ce qui va favoriser la surestimation de l'abondance des procaryotes en possédant plusieurs copies. Le métabarcoding est également limité par la spécificité des amorces utilisées qui ne permettent pas d'amplifier la totalité des procaryotes d'un échantillon (Hug et al., 2016). A titre d'exemple, la plupart des amorces procaryotes disponibles ne permettent pas d'amplifier efficacement les archées (Bahram et al., 2019), ce qui entraîne leur sous-représentation au sein des jeux de données. Par conséquent, les bases de données de références utilisées pour l'assignation taxonomique ne couvrent pas de façon homogène toute la diversité. Pour les groupes peu amplifiés comme les archées, l'assignation taxonomique ne va alors souvent pas jusqu'au niveau de l'espèce.

V. Estimation des caractéristiques des bassins et du taux de recharge de la nappe associé aux évènements pluvieux

Épaisseur de la ZNS

L'épaisseur de la ZNS correspond à la profondeur (en mètres) entre le sol et la nappe. Pour chaque bassin d'infiltration et chaque campagne de terrain, l'épaisseur de la ZNS a été mesurée juste avant l'évènement pluvieux considéré à l'aide de sondes de terrain indiquant le niveau de la nappe (LTC Levellogger® Junior, Solinst, Canada).

Temps de transit de l'eau d'infiltration de la surface vers la nappe

Le temps de transit de l'eau d'infiltration de la surface vers la nappe a été estimé par le temps entre le pic de pluie (mesuré au niveau d'un réseau de pluviomètres Météo-France à proximité des bassins) et la conductivité électrique minimale dans la zone impactée par la recharge

(Figure 2.6A). En effet, comme le ruissellement des eaux pluviales possède une faible conductivité électrique par rapport aux eaux de la nappe, la conductivité électrique de la nappe baisse progressivement à mesure que l'eau d'infiltration atteint la nappe (Foulquier et al., 2009). L'arrivée du pic de pluie dans la nappe correspond à la baisse maximale de la conductivité électrique mesurée dans la nappe (proportion maximale d'eau de pluie atteignant la nappe). Comme les changements de conductivité électrique de la nappe ne pouvaient être détectés qu'à partir d'événements de pluie d'intensité > 3 mm/h, le temps de transit moyen pour chaque bassin et chaque campagne a été calculé en considérant tous les événements pluvieux qui se sont produits dans les 3 mois avant et après les campagnes et qui étaient suffisamment importants pour être traités.

Taux de recharge de la nappe

Le taux de recharge de la nappe associé aux évènements pluvieux est estimé via l'élévation du niveau de nappe qui est d'autant plus important que le taux de recharge est important (Figure 2.6B - flèche noire). Cette élévation du niveau de nappe a été mesurée sur la base de mesures en continu du niveau de la nappe (sondes de terrain LTC Levellogger® Junior, Solinst, Canada)

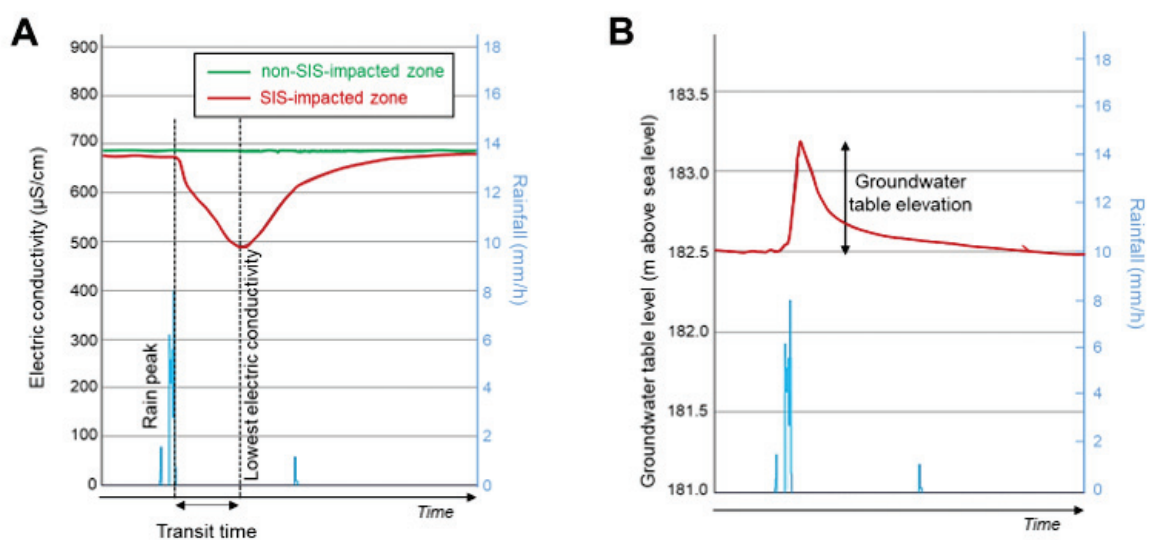


Figure 2.6 : Exemples de (A) surveillance de la conductivité électrique pour estimer le temps de transit des eaux pluviales de la surface à la nappe ; et de (B) surveillance du niveau de la nappe pour mesurer l'élévation de la nappe phréatique (en mètres au-dessus du niveau de la mer) obtenue sur le site de Django-Reinhardt (DjR).

3

CARACTÉRISATION DE L'IMPACT DES PRATIQUES D'INFILTRATION DES EAUX DE RUISSELLEMENT PLUVIALES SUR LES MODIFICATIONS STRUCTURELLES ET FONCTIONNELLES DES COMMUNAUTÉS MICROBIENNES DE LA NAPPE

Ce chapitre a pour objectif de caractériser l'impact des pratiques d'infiltration des eaux de ruissellement pluvial sur les modifications structurelles et fonctionnelles des communautés microbiennes de la nappe. Ce dernier est composé d'un article scientifique (publié dans *Science of the Total Environment* – Lebon et al., 2021) se basant sur la comparaison de deux périodes contrastées (une période sèche et une période pluvieuse de recharge effective de la nappe) au niveau de 3 bassins d'infiltration avec des ZNS fines (<3m).

Les bassins d'infiltrations ont été mis en place afin de réduire le ruissellement et recharger la nappe artificiellement (Natarajan et Davis, 2015). Cependant, cette recharge artificielle entraîne une augmentation drastique de la connectivité hydraulique entre la surface et la nappe, impactant les écosystèmes souterrains. Par exemple, Pabich et al. (2001) ont observé un enrichissement de la nappe en COD lors de la recharge artificielle associée à un évènement pluvieux. De plus, certains auteurs ont observé que l'impact de l'infiltration sur la physico-chimie de la nappe (enrichissement en COD et en orthophosphates) lors d'épisodes de recharge pouvait persister en dehors de ces épisodes de recharge (Datry et al., 2003 ; Foulquier et al., 2010). Plusieurs études ont également mis en évidence un impact des épisodes de recharge sur la microbiologie de la nappe associé aux modifications de la physico-chimie (Foulquier et al., 2010 ; Li et al., 2012). A titre d'exemple, Voisin et al. (2020) ont observé une augmentation de la biomasse et une stimulation des activités microbiennes ainsi qu'une augmentation de la diversité bactérienne associée à l'enrichissement de la nappe en COD lors d'un épisode de recharge, et plus spécifiquement pour des bassins avec une ZNS fine (<3m). Comme des effets persistants de l'infiltration d'eau pluviale sur la physico-chimie ont pu être observés, on peut alors s'attendre à un effet persistant de l'infiltration d'eau pluviale sur la microbiologie de la nappe en dehors des épisodes de recharge. Par conséquent, la comparaison de périodes pluvieuses (période de recharge effective de la nappe) et de périodes sèches (en dehors des évènements pluvieux) peut être très instructive pour évaluer dans quelles mesures les pratiques d'infiltration d'eau pluviale ont des impacts à court ou à long terme sur la microbiologie de la nappe.

Le premier article a alors pour objectif d'étudier l'impact de l'infiltration d'eau pluviale sur la microbiologie de la nappe en considérant deux conditions météorologiques contrastées : une période pluvieuse extrême (correspondant à un épisode de recharge) et une période sèche (hors période de recharge). Pour cela, les différences de biomasses et d'activités

microbiennes, ainsi que les différences de compositions bactériennes (indices de diversités et de dissimilarités) entre les zones impactées par les pratiques d'infiltration et les zones non-impactées ont été mesurées au niveau de 3 bassins d'infiltration possédant des caractéristiques comparables (ZNS < 3m). La caractérisation des compositions de communautés bactériennes a été réalisée selon une approche de metabarcoding 16S avec une clusterisation en OTU. Les concentrations en COD et en nutriments (N-NH₄⁺, N-NO₃⁻ et P-PO₄⁻) ont également été mesurées afin de caractériser le lien entre les modifications de la physico-chimie de la nappe et les modifications de sa microbiologie associées aux pratiques d'infiltration d'eau pluviale.

Cette étude montre que les pratiques d'infiltration d'eau pluviale augmentent les activités microbiennes et les diversités bactériennes (Richesse en OTU, indice de Shannon et indice de diversité phylogénétique) dans la nappe pendant l'épisode de recharge mais pas pendant la période sèche. En revanche, un impact sur le long terme des pratiques d'infiltration d'eau pluviale a été observé dans cette étude, avec :

- un enrichissement de la nappe en COD et en nutriments (N-NH₄⁺ et P-PO₄⁻) dans les zones impactées par les pratiques d'infiltration par rapport aux zones non-impactées.
- un développement de biomasse plus important dans les zones impactées par les pratiques d'infiltration que dans les zones non-impactées que ce soit en période sèche ou pluvieuse.
- des différences de composition des communautés bactériennes entre les zones impactées et non-impactées (dissimilarités) comparables durant les deux périodes (sèches/pluvieuses).

Les résultats de ce papier suggèrent alors que les effets des pratiques d'infiltration d'eau pluviale sur les concentrations en COD et en nutriments sur le long terme contrôlent la biomasse et la dissimilarité entre les communautés des zones non-impactées et impactées par les pratiques d'infiltration. Les activités du biofilm et la diversité bactérienne, quant à elles, semblent être stimulées par les flux d'eau infiltrés lors de l'épisode de recharge. Cette étude étant basée sur 3 bassins possédant des caractéristiques similaires (ZNS>3m), d'autres expérimentations de terrain avec des ZNS contrastées seraient pertinentes afin de déterminer dans quelles mesures les caractéristiques des bassins modulent l'impact des pratiques d'infiltration d'eaux pluviales sur la physico-chimie et la microbiologie de la nappe.

Article 1

Influence of stormwater infiltration systems on the structure and the activities of groundwater biofilms: Are the effects restricted to rainy periods?

Authors:

Yohan Lebon^{a,*}, Simon Navel^a, Maylis Moro^a, Jérémy Voisin^{a,b}, Benoit Cournoyer^b,
Clémentine François^a, Laurence Volatier^a, Florian Mermillod-Blondin^a

^a Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, ENTPE, UMR5023 LEHNA, F-69622,
Villeurbanne, France

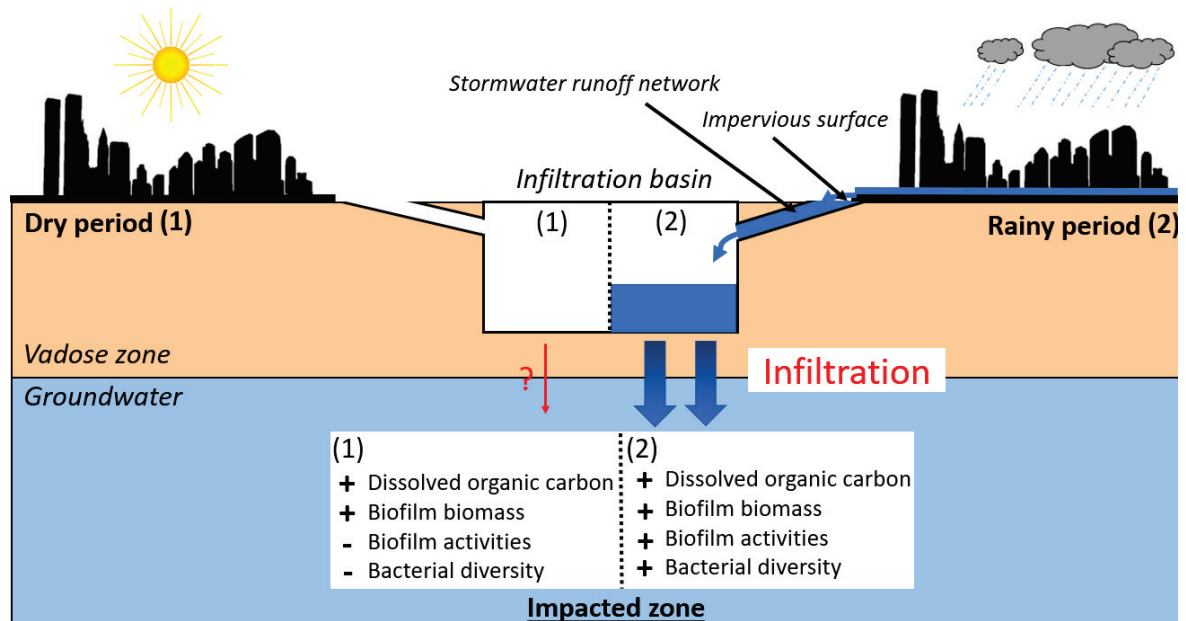
^b Univ Lyon, UMR Ecologie Microbienne (LEM), Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS
5557, INRA 1418, VetAgro Sup, 69680 Marcy L'Etoile, France.

* Corresponding author.

E-mail address: yohan.lebon@entpe.fr (Y. Lebon)

**Publié dans Science of the Total Environment
Disponible en ligne depuis le 22 septembre 2020**

GRAPHICAL ABSTRACT



HIGHLIGHTS

- Stormwater infiltration systems (SIS) produced an increase in biomass of groundwater biofilms during both dry and rainy periods.
- Bacterial community structures of groundwater biofilms were impacted similarly by SIS during both rainy and dry periods.
- Microbial activities were more stimulated by SIS during the rainy than during the dry period.
- Functional response of biofilms to SIS was influenced by stormwater reaching groundwater during rainy periods.
- The structural response of biofilms to SIS was persistent whatever the meteorological conditions.

KEYWORDS

Infiltration basin, Dissolved organic carbon, Nutrient, Microbial activity, Biofilm structure, Species sorting

ABSTRACT

Stormwater infiltration systems (SIS) have been set up to collect and infiltrate urban stormwater runoff in order to reduce flooding and to artificially recharge aquifers. Such practices produce environmental changes in shallow groundwater ecosystems like an increase in organic matter concentrations that could drive changes in structure and functions of groundwater microbial communities. Previous works suggested that SIS influence groundwater physico-chemistry during either rainy and dry period but no study has examined the impact of SIS on groundwater microorganisms during both periods. This study aimed to fill this gap by assessing SIS impacts on groundwater quality parameters in three SIS with vadose zone thickness < 3 m during two contrasting meteorological conditions (rainy / dry periods). Physicochemical (dissolved organic carbon and nutrient concentrations) and microbial variables (biomass, dehydrogenase and hydrolytic activities, and bacterial community structure) were assessed on SIS-impacted and non-SIS-impacted zones of the aquifers for the three SIS. Using clay beads incubated in the aquifer to collect microbial biofilm, we show that SIS increased microbial activities, bacterial richness and diversity in groundwater biofilms during the rainy period but not during the dry period. In contrast, the significant differences in dissolved organic carbon and nutrient concentrations, biofilm biomass and bacterial community structures (Bray-Curtis distances, relative abundances of main bacterial orders) measured between SIS-impacted and non-SIS-impacted zones of the aquifer were comparable during the two periods. These results suggest that structural indicators of biofilm like biomass were probably controlled by long-term effects of SIS on concentrations of dissolved organic matter and nutrients whereas biofilm activities and bacterial richness were temporally stimulated by stormwater runoff infiltrations during the rainy period. This decoupling between the structural and functional responses of groundwater biofilms to stormwater infiltration practices suggests that biofilms functions were highly reactive to fluxes associated with aquifer recharge events.

1. Introduction

Modern human societies increasingly rely upon groundwater for agriculture, industry and drinking water supply. For example, almost 50 % of drinking water production in the world in 2010 was obtained from aquifers (van der Gun, 2012; Smith et al., 2016). This groundwater demand is expected to drastically increase in cities due to predicted urban growth. Indeed, urban water demand will increase by 80 % by 2050 (Flörke et al., 2018). In parallel with groundwater demand, growing urbanization and the associated expansion of impervious soil surfaces increase flooding risks in urban areas during rainy periods (Konrad, 2003) and limit natural groundwater recharge with stormwater (Pitt et al., 1999). In this context, stormwater infiltration systems (SIS) such as infiltration basins have been set up in urban areas to collect and infiltrate urban stormwater runoffs for reducing flooding risks and for recharging aquifers (Fletcher et al., 2015; Natarajan and Davis, 2015).

Stormwater infiltration practices through infiltration basins can cause environmental disturbances in groundwater ecosystems, such as significant inputs of contaminants like organic compounds and dissolved organic matter (DOM), temperature fluctuations over the seasons and sudden drops in electrical conductivity associated with infiltration of low-mineralized water (Barraud et al., 1999; Datry et al., 2004; Foulquier et al., 2009, 2010). Such disturbances have been shown to impact the structure and function of groundwater microbial communities and potentially alter their roles in organic matter processing and water purification processes (Griebler and Avramov, 2015; Voisin et al., 2018). Despite these roles of microbial communities in aquifers, studies examining the impact of SIS on groundwater microorganisms remain scarce but see (Foulquier et al., 2011; Barba et al., 2019; Colin et al., 2020).

The impacts of SIS on groundwater microorganisms largely depend on the ability of the unsaturated zone or vadose zone (VZ) to act as a buffer or filter against changes induced by

stormwater infiltration (Fritch et al., 2000; Pabich et al., 2001; Foulquier et al., 2010; Voisin et al., 2020). Experiments conducted on the porous aquifer to the east of Lyon revealed significant effects of SIS on physicochemical conditions and groundwater microbiology in areas with thin (< 3 m) VZ, whereas moderate effects of SIS were observed in areas with thick (> 10m) VZ (Datry et al., 2005; Voisin et al., 2018; 2020). For SIS with thin VZ, enrichment in dissolved organic carbon (DOC) and increased microbial biomass, activities and bacterial diversity of biofilms were measured in groundwater zones impacted by recharge with stormwater runoff (Mermillod-Blondin et al., 2013). Based on this study, Voisin et al. (2018) hypothesized that the effects of SIS on groundwater microbial communities during rainfall events could be due to (1) changes in physicochemical conditions -especially the enrichment of available OM- below SIS and/or (2) the transport of microorganisms from the soil and the VZ of SIS to groundwater during recharge with stormwater runoff.

These expectations suggest that the infiltration of stormwater runoff (i.e. during rainfall events) was the main mechanism explaining changes in physicochemical conditions and bacterial community structures following a rainfall event below SIS. Nevertheless, Datry et al. (2003) and Foulquier et al. (2010) observed higher DOC and orthophosphate concentrations in SIS-impacted groundwater than in non-SIS-impacted groundwater, even during dry periods. This long-term effect could be due to an accumulation of OM over time in SIS-impacted zones of the aquifer (Foulquier et al., 2010). These findings suggest that groundwater microbial communities may be influenced by physicochemical conditions induced by infiltration basins during rainfall events but also during dry periods. Consequently, comparisons of experiments performed during dry and rainy periods could be very informative to evaluate whether stormwater infiltration associated with rainfall events have short-term or long-term impacts on groundwater microorganisms.

The present study aims to compare the impacts of infiltration basins on groundwater microbiology during a rainy and a dry period. To assess these impacts of SIS, groundwater zones impacted by stormwater infiltration were compared to non-impacted ones considered as control zones. In situ experiments were done in three SIS with vadose zone thickness < 3 m during two meteorologically contrasted periods (i.e. rainy and dry). For each SIS, groundwater samples were collected using piezometers in SIS-impacted and non-SIS-impacted zones to evaluate physico-chemical changes due to stormwater infiltration. Clay beads incubated in these monitoring wells during rainy and dry periods were used as artificial substrates to sample and monitor groundwater biofilms (Mermillod-Blondin et al., 2019; Voisin et al., 2016, 2020).

Under the above hypothesis of a significant impact of stormwater infiltration on microorganisms, differences in biomass, activities and structure of the microbial biofilms developed on clay beads between SIS-impacted and non-SIS-impacted zones of the aquifer would be higher during a rainy period than during a dry period. The alternative hypothesis would be that the physicochemical conditions and especially DOC concentration in groundwater are long-term impacted by SIS, inducing comparable differences in microbial communities between SIS-impacted and non-SIS-impacted zones of the aquifer during both rainy and dry periods.

2. Materials et Methods

2.1 Study sites

Field work was performed in three SIS located on the eastern aquifer of the Metropolitan area of Lyon characterized by highly permeable glacio-fluvial sediments (Supplementary Material 2; Foulquier et al., 2009; Voisin et al., 2020). These SIS were selected for their thin VZ (< 3 meters) and their long-term use by scientists and stakeholders for groundwater quality monitoring purposes (Datry et al., 2004; Foulquier, 2009). This selection was also made for

covering a wide range of environmental conditions (infiltration surfaces of the basins, catchment areas and land use, Table 1). Each SIS is equipped with piezometer wells in their downstream and upstream zones, along the groundwater flow. These zones are further considered as SIS-impacted and non-SIS-impacted zones respectively, because groundwater flow may convey infiltrated stormwater effects only in the direction of the downstream zone.

Table 1. Main characteristics of the SIS

SIS	Vadose zone thickness (m)	Infiltration surface (ha)	Catchment area (ha)	Surroundings areas
Grange Blanche (GB)	1.0	0.32	300	Intensive cultures (corn and wheat), small houses and roads
Minerve (MIN)	2.0	0.42	165	Urban land use (commercial centers, lawns and large roads), fire station
IUT (IUT)	2.5	0.09	2.5	Teaching and research buildings, parking lots, roads and lawns

2.2 Experimental design and sampling

Ten day *in situ* experiments were performed under two meteorological contrasted conditions: a rainy (September 2015) and a dry (September 2016) period. The rainy period was characterized by four significant rainfall events (peak > 5 mm/h) over the ten days with an accumulated rainfall of 112 mm (average over 5 piezometer) representing more than 80% of the accumulated rain over the month. Thus, the studied rainy period was particularly important in terms of accumulated rainfall, facilitating the detection of an impact of stormwater infiltration on groundwater bacterial communities.

The dry period consisted of a ten-day period preceded by more than 10 days of dry weather to prevent the short-term residual impacts of a previous rainfall event. For each meteorological condition (rainy/dry periods), groundwater microbiology and chemistry were determined at three SIS in upstream and downstream piezometer wells (respectively non-SIS-impacted and SIS-impacted zones). Three replicates of water and biofilm samples were collected for each zone of each SIS.

Expanded clay beads (clay beads having diameters between 7.1 and 9 mm and previously heated to 1,200 °C in a rotary kiln) were used as artificial substrates for sampling microbial communities in groundwater following previous studies (Voisin et al., 2016, 2020; Mermillod-Blondin et al., 2019). While several studies (Williamson et al., 2012; Zhou et al., 2012; Fillinger et al., 2018) have used natural substrates for sampling microbial communities in groundwater, use of artificial substrates does not lead to divergent results as biofilm growth and diversity measured on clay beads were comparable to those measured on natural gravel particles (Voisin et al., 2016). In each zone of each SIS, three nylon mesh bags (11.5x4.5 cm, 3.3 mm mesh size, Sefar Nitex 06-3300/59, Sefar AG, Heiden) containing thirty beads each were placed in piezometer wells (non-SIS-impacted/SIS-impacted) for an incubation of ten days. This incubation time of ten days was based on previous laboratory and field experiments (Voisin et al. 2016, 2020; Mermillod-Blondin et al. 2019) to obtain (1) a significant microbial colonization of clay beads in groundwaters and (2) a time-integrated monitoring of micro-organisms from impacted and non-impacted zones of the aquifer at the time scale of a recharge event during a storm. After retrieval, the thirty beads from each bag were randomly split into four subsets dedicated to the evaluation of microbial characteristics (i.e. biomass; hydrolytic activity; dehydrogenase activity; bacterial community structure). As clay beads from each bag were used to measure all microbial variables, mean biofilm parameters per zone were calculated from three values (corresponding to batches of clay beads from the three bags incubated in the same

zone). In addition to clay bead incubation, groundwater was sampled in the same wells using the Bou-Rouch method (Bou and Rouch, 1967) at three times for both rainy and dry periods to evaluate physico-chemical impacted associated with SIS: just before (T = 0 day), during (T = 5 days) and just after (T = 10 days) incubation of clay beads in groundwater.

2.3 Physicochemical analyses

Groundwater samples were filtered (0.7 μm pore size WhatmanTM GF/F filters, GE Healthcare, Boston, MA, USA) to remove particles. Ammonium (N-NH₄⁺), nitrate and nitrite (called N-NO₃⁻ thereafter because N-NO₂⁻ concentrations were negligible compared with N-NO₃⁻ concentrations), and orthophosphate (P-PO₄³⁻) concentrations were measured following standard colorimetric methods, using an automatic analyzer (Smartchem 200, AMS Alliance, Roma, Italy). DOC concentration was measured with a total carbon analyzer (multi-N/C 3100, Analytik Jena, Jena, Germany) based on sample combustion at 900°C and CO₂ stripping under O₂ flow, after removal of dissolved inorganic C with hydrochloric acid (250 μL HCl 35 %).

2.4 Microbial analyses

2.4.1 Microbial biomass

Biomass of microbial biofilm developed on clay beads was assessed by the quantification of total protein content (Sigma Protein Assay Kit P-5656, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), using the method of Peterson (1977) and following the protocol described in Voisin et al. (2020). Five beads were treated with 2 mL of ultrapure water and 2 mL of Lowry's reagent for 20 minutes under stirring to improve contacts between Lowry's reagent and biofilm-related proteins. Color reaction started with the addition of 0.5 mL of Folin reagent and developed for

30 minutes. Final solution was filtered (0.7 µm pore size Whatman™ GF/F filters, GE Healthcare, Boston, MA, US) to remove particles before measuring its optical density at 750 nm in a 1-cm thick cuvette with a spectrophotometer (Aquamate, ThermoSpectronic, Cambridge, GB). Conversion of measured optical densities to total protein biomass was realized using a calibration line obtained with BSA (bovine serum albumin lyophilized powder ≥ 96 %, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, US). Protein biomass was then expressed in µg per surface of clay bead in cm² (calculated from the dry weight of the subset of five beads used for the analysis and a pre-calculated mean value for the relationship between the surface and the density of clay beads) and corrected by results obtained for controls (sets of five sterile beads).

2.4.2 Microbial activities

Hydrolytic activity of microbial communities was estimated using the fluorescein diacetate (3,6-diacetyl-fluorescein; FDA) hydrolysis method (Fontvieille et al., 1992). Beads were incubated with 3 mL of a pH 7.6 phosphate buffer solution for 40 minutes to stabilize the temperature before incubation. Coloration step then started by adding 0.1 mL of FDA solution (10 mg of FDA diluted in 6 mL of acetone and 4 mL of ultrapure water) in vials stored in the dark at 15°C. During this step, colorless FDA is hydrolyzed by non-specific extracellular and membrane-bound enzymes to produce green fluorescein. Incubation was ended with the addition of 3 mL acetone when green coloration was visible (after 18-24 hours). Final supernatant was filtered (0.7 µm pore size Whatman™ GF/F filters, GE Healthcare, Boston, MA, USA) to remove particles before measuring its optical density at 490 nm in a 1-cm thick cuvette with a spectrophotometer (Aquamate, ThermoSpectronic, Cambridge, UK). Hydrolytic activity is then calculated following the equation:

$$\text{Hydrolytic activity} = (\text{OD}_{490} * 6.1) / (81.3 * t * S)$$

where hydrolytic activity is expressed in quantity of FDA hydrolyzed per hour and cm^2 of clay bead surface ($\mu\text{mol FDA} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$), OD_{490} is the optical density measured at 490 nm (cm^{-1}), 6.1 is the volume of dilution (in mL), 81.3 is the molar extinction coefficient of fluorescein ($\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), t is the incubation time (in h) and S is the total surface of the 5 clay beads used for the analysis (in cm^2). In the same way as for microbial biomass analyses, the quantity of FDA hydrolyzed per hour (i.e. hydrolytic activity) was corrected by results obtained from controls (sterile clay beads).

Dehydrogenase activity of microbial communities was estimated through measurements of 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl tetrazolium chloride (INT) to INT-formazan reduction rates (Houry-Davignon et al., 1989). Five beads were first incubated with 0.1 mL INT solution (2 % in methanol) and 4 mL filtered water (0.2 μm pore size Whatman™ nuclepore polycarbonate track-etched membrane, GE Healthcare, Boston, MA, USA) from the corresponding piezometer, in the dark at 15°C for incubation times similar to those performed for hydrolytic activity analyses (between 18 and 24 hours). The incubation was stopped by adding 0.5 mL of formol at 37 %. During this incubation, colorless INT is gradually reduced by electron transport system (ETS) and the resulting optically dense formazan is accumulating in cells. Then, we replaced the supernatant with 4 mL methanol to start a 12 hour-long extraction of INT-formazan. To ensure the collection of all microorganisms and a complete extraction, i) the supernatant was filtered with 0.2 μm pore size membrane (Whatman™ nuclepore polycarbonate track-etched membrane, GE Healthcare, Boston, MA, USA) to collect free microbial cells present in the supernatant; ii) the filter was put in the glass flask containing the clay beads and methanol was added to the flask for starting INT-formazan extraction; iii) a 2-min sonication was applied to enhance the action of methanol on microorganisms (developed on beads or retained on the membrane). Final supernatant was filtered (0.7 μm pore-size Whatman™ GF/F filters, GE Healthcare, Boston, MA, USA) to remove particles before

measuring its optical density at 480 nm in a 1-cm thick cuvette with a spectrophotometer (Aquamate, ThermoSpectronic, Cambridge, GB). Dehydrogenase activity is then calculated following the equation:

$$\text{Dehydrogenase activity} = (\text{OD}_{480} * 4) / (18 * t * S)$$

where dehydrogenase activity is expressed in quantity of INT hydrolysed per hour and cm² of clay bead surface ($\mu\text{mol INT} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$), OD₄₈₀ is the optical density measured at 480 nm (cm^{-1}), 4 is the volume of dilution (in mL), 18 is the molar extinction coefficient of INT in methanol ($\text{mL} \cdot \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), t is the incubation time (h), and S is the total surface of the five clay beads used for the analysis (in cm²). Here again, the quantity of INT-formazan produced per hour (i.e. dehydrogenase activity) was corrected by results obtained from controls (sterile clay beads).

2.4.3 Bacterial community structure

For each sample, we retrieved microbial cells by shaking (2 minutes at 2500 rpm using a vortex) fifteen clay beads in 10 mL 0.8 % NaCl and then filtered the suspended cells on a 0.2 μm pore size membrane (WhatmanTM nuclepore polycarbonate track-etched membrane, GE Healthcare, Boston, MA, USA). DNA extraction of cells collected on membranes was realized using FastDNATM Spin Kit for Soil (MP Biomedicals, Irvine, CA, USA). The amount of extracted DNA was quantified using a Nanodrop ND1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, USA).

The V5-V7 region of the 16S gene was amplified using the 799F (5'-AACMGGATTAGATACCCKG; Beckers et al., 2016) and bac1193R (5'-CRTCCMCACCTTCCTC; Maes et al., 2016) primers. All samples were sequenced on an Illumina Miseq platform (paired-end reads 2 * 300 bp) at MR DNA (Shallowater, TX, USA).

Bioinformatic processing of the merged 2x300 bp paired-end reads followed sequential steps: 1) dereplication and filtering (keeping only 300 to 500 bp –long reads containing a valid mismatch-free tag and no ambiguous base), 2) clustering into operational taxonomic units (OTUs) with SWARM (Mahé et al., 2014; two-step-procedure: local clustering threshold $d=1$ and then $d=3$), 3) removal of chimera, 4) removal of OTUs detected in only one out of three replicates from same condition, 5) abundance normalization (by rarefaction, i.e. subsampling at 50,233 reads per sample, to correct for variability in sequencing depths among samples) and 6) taxonomic affiliation against the 16S SILVA database release 132 (Quast et al., 2012), based on NCBI blastn+ (Altschul et al., 1990) and allowing for multiple affiliation. These different steps were performed within FROGS (Find Rapidly OTUs with Galaxy Solution, Escudie et al., 2018) except for step 4) realized with R version 3.5.1 (R Core Team, 2018).

Seed sequences representing each OTUs were then aligned (“AlignSeqs” function from the R package “DECIPHER” version 2.10.1; Wright, 2016) and gaps (position in the alignment with ≥ 1 % of aligned seed sequences missing the base information) were removed (“deleteGaps” function from the R package “ips” version 0.0-7; Heibl, 2008). Quality of alignment was visually checked (using SeaView, Gouy et al., 2010) prior to the construction of an optimized GTR+G+I maximum likelihood tree (built with a neighbor-joining tree as starting point). Tree was constructed by using the R packages “ape” version 5.2 (Paradis and Schliep, 2019) and “phangorn” version 2.4.0 (“NJ” and “pml” functions, Schliep, 2011).

At the community scale, alpha diversity was evaluated through the OTUs richness (function “specnumber” from the R package “phyloseq” version 1.24.2, (McMurdie and Holmes, 2013)), the Shannon diversity index (function “diversity” from the same package) and the Faith’s phylogenetic diversity index (function “pd” from the R package “picante” version 1.8 package, Kembel and Kembel, 2019).

Beta diversity (i.e. differences in bacterial composition between two communities) was evaluated with Bray-Curtis and weighted unifrac distances (Lozupone and Knight, 2005) (function “distance” from R package phyloseq version 1.24.2, McMurdie and Holmes, 2013). These distances were calculated between non-SIS-impacted and SIS-impacted zones for each SIS. As three bacterial community compositions (triplicates) were determined per zone and SIS, mean distances per SIS were obtained by averaging the nine pairwise distances calculated between each non-SIS-impacted community and each SIS-impacted community (three non-SIS-impacted communities * three SIS-impacted communities = nine pairwise distances). For the calculation of weighted unifrac distances, the optimized GTR+G+I tree obtained previously was midpoint rooted using the function “midpoint” from the R package “phangorn”.

2.5 Data deposition

Sequence data are available at the European Nucleotide Archive (<https://www.ebi.ac.uk/ena>) under the project accession numbers #PRJEB29925 and #PRJEB40243. See Table S2 for barcode information.

2.6 Data analyses

The effects of the position (“impacted zone” and “non-impacted zone”) and the meteorological condition (“dry period” and “rainy period”) on chemical and microbiological variables (mean values from the three replicated bags per zone and well) were tested using repeated-measure analyses of variance (two-way RM-ANOVA) with period as fixed factor and position as repeated factor to take into account the non-independence of impacted and non-impacted wells in each SIS. Our main hypothesis being an increased effect of the position during the rainy period, we focused on the statistical interaction between “position” and “period” in statistical

tests. All data were $\sqrt{\cdot}$ -transformed to satisfy the normality assumption verified by Shapiro's test. Sphericity assumption for RM-ANOVA was verified using Mauchly's sphericity test.

Dissimilarities in bacterial communities between SIS impacted and non-SIS-impacted zones were calculated for each SIS and period using Bray-Curtis and unnormalized weighted Unifrac distances. Values for Bray-Curtis and Unifrac distances were $\sqrt{\cdot}$ -transformed and compared using a one-way ANOVA (with period as main factor).

Based on taxonomic affiliations, we tested the influences of the position and period on the relative abundances of the ten most abundant bacterial orders (representing more than 95 % of the total number of reads) in bacterial communities using a repeated-measure analyses of variance (two-way RM-ANOVA) with period as fixed factor and position as repeated factor. This analysis has been done after a $\sqrt{\cdot}$ -transformation of the dataset (as done for other variables). All statistical tests were performed using the R software (R Core Team, 2018).

3. Results

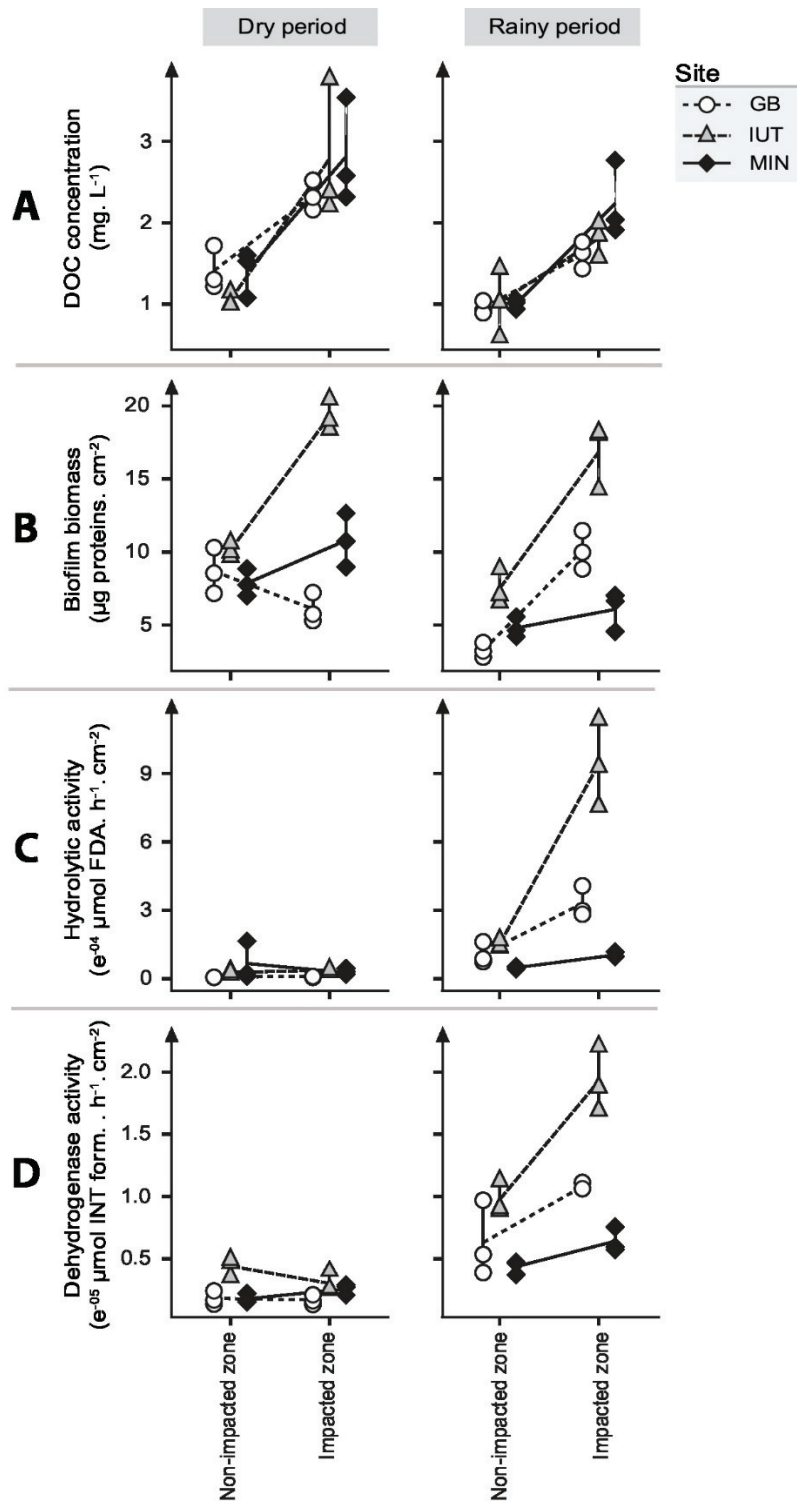


Fig. 1. Groundwater dissolved organic carbon concentration (mg. L⁻¹), and biofilm biomass (µg protein. cm⁻²), hydrolytic activities (10⁻⁴ µmol FDA hydrolyzed. h⁻¹. cm⁻²) and dehydrogenase activities (10⁻⁵ µmol INT formazan produced. h⁻¹. cm⁻²) measured on non-SIS-impacted and SIS-impacted zones (left and right within each individual panel, respectively) of the three SIS (Grange-Blanche –GB, white circles; IUT, grey triangles; Minerve-MIN, black diamonds) during the dry and the

rainy periods (left and right panels, respectively). All replicated analyses (n=3) per well are displayed in the figure. SIS = Stormwater Infiltration Systems

3.1. Groundwater physico-chemistry

For the three SIS (i.e. MIN, GB and IUT), high similarities in physico-chemical conditions were measured during the dry and the rainy periods (Fig. 1A for DOC concentration and Table S1), with comparable patterns between SIS-impacted and non-SIS-impacted zones. Indeed, DOC concentrations were significantly higher in SIS-impacted than in non-SIS-impacted zones, during both rainy and dry periods (Fig. 1A, two-way RM-ANOVA, “position” effect, $p < 0.01$). Considering the two periods, average DOC concentration values were 2.1-fold, 1.7-fold and 2.2-fold higher in SIS-impacted than in non-SIS-impacted zones for MIN, GB and IUT, respectively. The same trends were observed for N-NH_4^+ and P-PO_4^{3-} concentrations with higher values in SIS-impacted zones, although no significant statistical results were obtained due to the high variability among SIS (two-way RM-ANOVA, position effect, $0.11 > p > 0.05$ for these two variables). The inverse pattern was observed for N-NO_3^- concentrations with values which tended to be lower in SIS-impacted than in non-SIS-impacted zones (Table S1, two-way RM-ANOVA, position effect, $0.1 > p > 0.05$). Although a significant effect of the period (rainy vs. dry) was detected on DOC concentrations (Fig. 1A and Table S1, two-way RM-ANOVA mixed model, “period” effect, $p < 0.05$), the differences in DOC, P-PO_4^{3-} , N-NH_4^+ and N-NO_3^- concentrations measured between SIS-impacted and non-SIS-impacted zones were not significantly influenced by the period (two-way RM-ANOVA, interaction between “position” and “period” effects, $p > 0.3$ for all variables).

3.2. Microbial biomass and activities

As observed for DOC concentrations, significantly higher total protein contents per cm^2 of clay beads (considered as a proxy for microbial biomass) were detected in SIS-impacted than in non-SIS-impacted zones for the three SIS, during both rainy and dry periods at the unique exception

of the GB SIS during the dry period (Fig. 1B, two-way RM-ANOVA, “position” effect, $p < 0.05$, interaction between “position” and “period” effects, $p > 0.4$). For example, microbial biomasses in IUT SIS were around 2-fold higher in SIS-impacted zone than in non-SIS-impacted zone of the aquifer independently the period (Fig. 1B).

In contrast with microbial biomass patterns, dehydrogenase activity of the biofilm was only significantly higher in SIS-impacted zones than in non-SIS-impacted zones during the rainy period (Fig. 1C, two-way RM-ANOVA, interaction between “position” and “period” effects, $p < 0.05$). The same trend was observed for hydrolytic activity although statistical tests were not significant with $\alpha = 5\%$ (Fig. 1D, two-way RM-ANOVA, interaction between “position” and “period” effects, $0.10 > p > 0.05$). For example, biofilms developed in SIS-impacted zone of GB site exhibited a 3-fold higher hydrolytic activity than biofilms developed in non-SIS-impacted zone of GB during the rainy period whereas hydrolytic activities were comparable between the SIS-impacted and the non-SIS-impacted zones of GB site during the dry period (Fig. 1D).

3.3. Analyses of biofilm bacterial community structures

The sequencing of the 16S rRNA V5-V7 libraries yielded high-quality sequences distributed across 36 biofilm samples. After rarefaction-based abundance normalization (subsampling 50,233 sequences per sample), all sequences were clustered into 7,600 OTUs with the algorithm SWARM (in FROGS).

OTUs richness (i.e. number of OTUs present in a given sample) was significantly higher in SIS-impacted zones in comparison with non-SIS-impacted zones at both periods (Fig. 2, two-way RM-ANOVA, “position” effect, $p < 0.05$). Although no significant interaction between position and period effects due to the variability among SIS (two-way RM-ANOVA, interaction between “position” and “period” effects, $0.11 > p > 0.05$), differences in OTUs richness (i.e.

number of OTUs present in a given sample) between SIS-impacted and non-SIS impacted zones were lower during the dry period (mean increase of 26% in OTUs numbers per SIS) than during the rainy period (mean increase of 91% in OTUs numbers per SIS) (Fig. 2). These trends in OTUs richness were in line with those observed from the computing of relative abundances of OTUs (Shannon index) and of their phylogenetic relationships (Phylogenetic index) (Fig. 2).

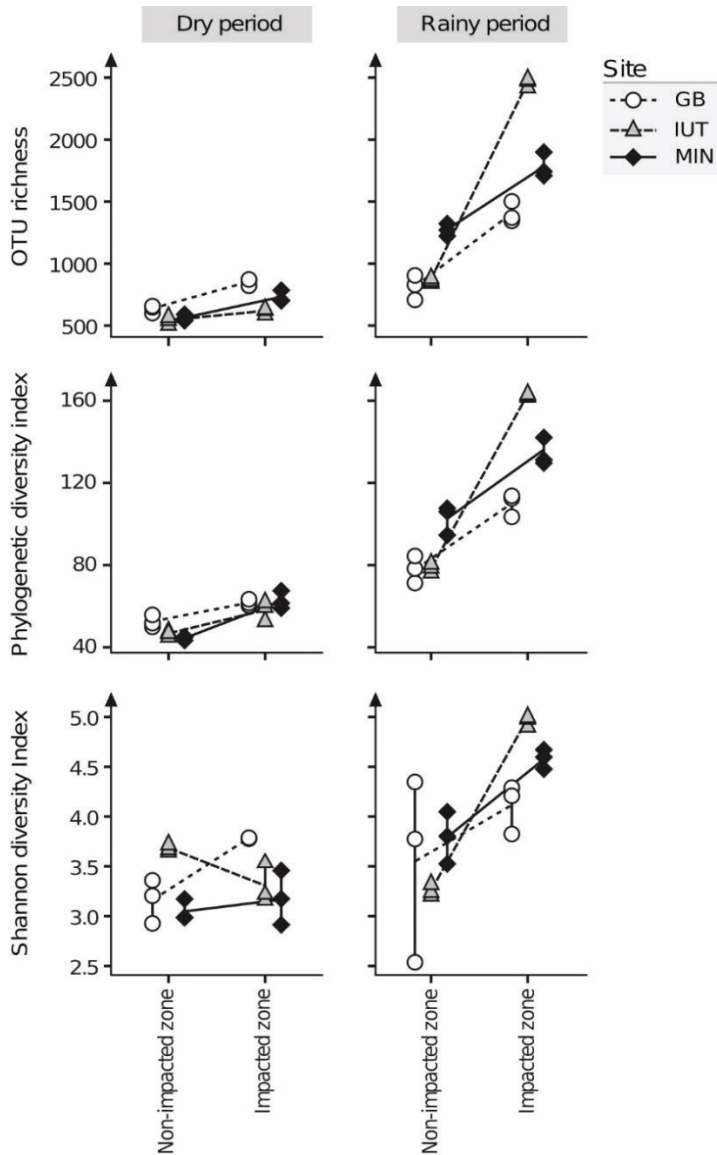


Fig. 2. Aquifer biofilms metabarcoding 16S rRNA V5-V7 genetic diversity analyses. OTUs richness (top panels), Faith's phylogenetic diversity (middle panels) and Shannon diversity (bottom panels) indices measured on non-SIS-impacted and SIS-impacted zones (left and right of each individual panel, respectively) of the three SIS (Grange-Blanche –GB, white circles; IUT, gray triangles; Minerve-MIN, black diamonds) during the dry and the rainy periods (left and right panels, respectively). All replicated analyses (n=3) per well are displayed in the figure. SIS = Stormwater Infiltration Systems

In each SIS, the biofilm groundwater bacterial richness in SIS-impacted and in non-SIS-impacted zones was predominantly associated with OTUs specifically found in each zone because less than 32 % of OTUs (maximum percentage corresponding to IUT SIS in dry period) were shared between these two zones (Fig. 3). For the three SIS, the percentages of OTUs shared between non-SIS-impacted and SIS-impacted zones (Fig. 3) were not higher during dry period (24-32 %) than during rainy period (18-30 %). These shared OTUs included the most abundant ones as they represented between 92.1 and 97.7 % of the reads in the dataset (for the two periods; see Fig3). Indeed, the sixteen most abundant OTUs out of the 7,600 OTUs in the dataset (i.e. 0.2 % of the total OTUs) represented 50 % of total reads (Supplementary material 1). Then, the higher difference in OTUs richness between SIS-impacted zones and non-SIS-impacted zones in rainy period compared to the dry period (Fig. 2) was due to a higher number of OTUs that were not numerically dominant in the dataset. These OTUs represented in average 56 % of total OTUs number but only 4.4 % of reads (Fig. 3).

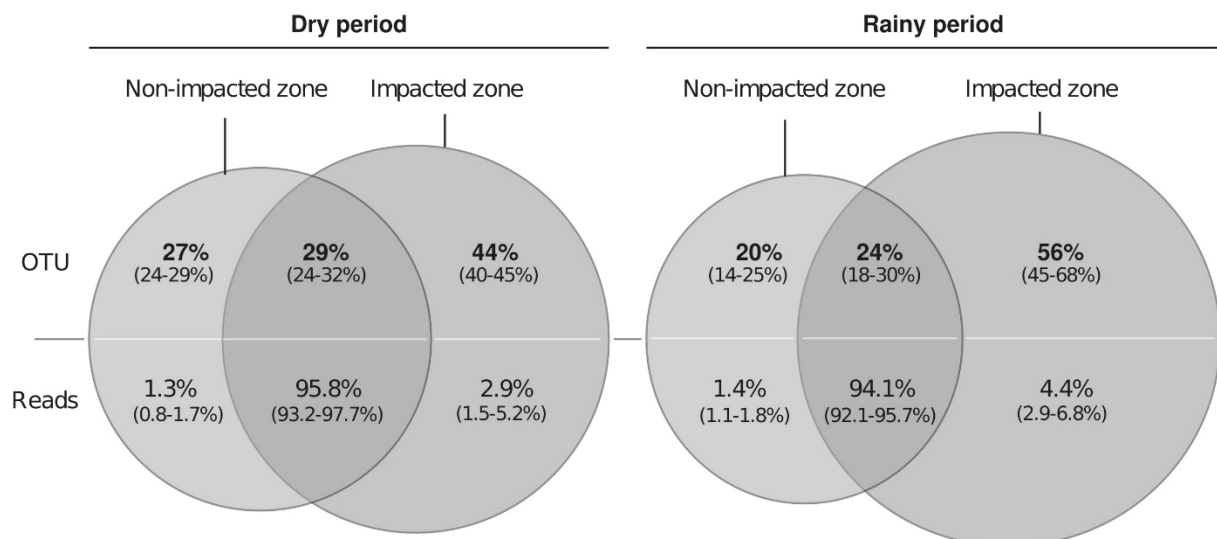


Fig. 3. Venn diagrams representing the distribution of OTUs recovered from biofilms during the dry and rainy periods (left and right diagrams, respectively). Distribution is presented as the percentage of the whole OTUs pool (for each SIS and each period) being detected i) only in non-SIS-impacted zone (left of each diagram), ii) only in SIS-impacted zone (right of each panel) and iii) on both zones (shared OTUs; dark-gray overlap area). Based on read number for each OTUs, we indicate the corresponding distribution of reads within SIS (also as a percentage of the total read numbers for each period and SIS) on the bottom part of each diagram. The main percentages in bold represent the average numbers over the three SIS and the percentages in square brackets correspond to the range. SIS = Stormwater Infiltration Systems

We did not detect any effect of the period (rainy vs dry) on the dissimilarity of bacterial community profiles from SIS-impacted and non-SIS-impacted zones, when assessed with Bray-Curtis distances (Fig. 4, one-way ANOVA, “period” effect, $p > 0.6$).

The same results were obtained when phylogenetic distances were considered using the weighted UNIFRAC unnormalized distances (Fig. 4, one-way ANOVA, “period” effect, $p > 0.2$), indicating that bacterial community structures were not more divergent between SIS-impacted and non-SIS-impacted zones during the rainy than during the dry period.

Whatever the SIS and the period considered, the Bray-Curtis and weighted UNIFRAC unnormalized dissimilarities calculated between the bacterial communities in the SIS-impacted and in the non-SIS-impacted zones were always higher than 0.46 (Fig. 4).

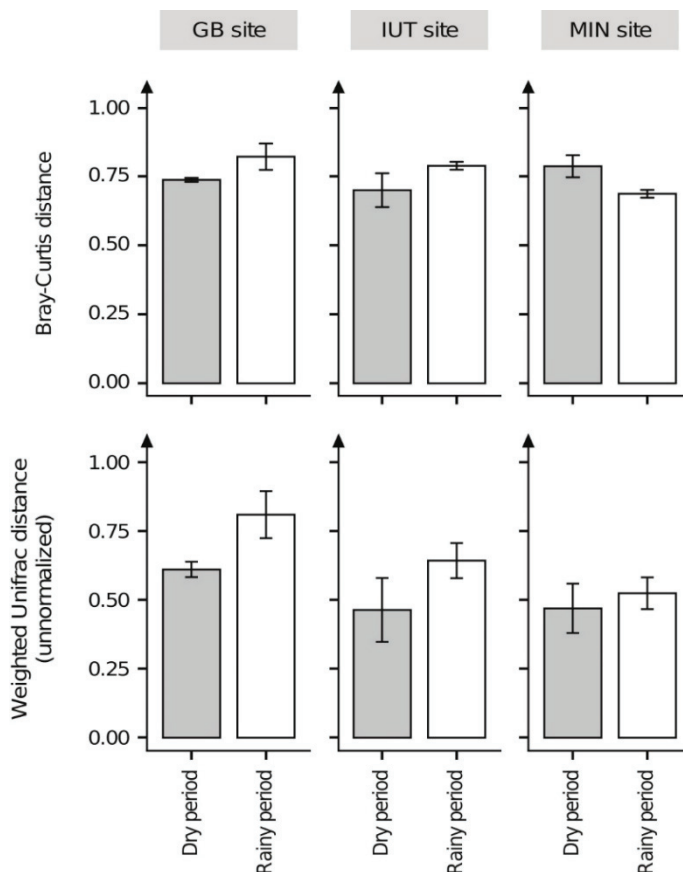


Fig. 4. Aquifer biofilm metabarcoding 16S rRNA V5-V7 beta diversity analyses. Bray-Curtis and unnormalized weighted Unifrac distances (top and bottom panels, respectively) calculated between the non-SIS-impacted and the SIS-impacted zones, for each SIS (Grange-Blanche –GB, left panels; IUT, middle panels; Minerve-MIN, right panels) during the dry (gray) and the rainy (white) periods. (see 2.4.3 for details). SIS = Stormwater Infiltration Systems

3.4. Bacterial taxonomic affiliations from aquifer biofilms

Bacterial taxa of aquifer biofilms developing on artificial substrates (clay beads) and inferred from the 16S rRNA V5-V7 dataset were dominated by *Beta-proteobacteriales* (43.5 % of reads in the dataset) and *Pseudomonadales* (21.5 % of reads), two orders of Gamma-proteobacteria (Fig. 5). Gene reads from the *Flavobacteriales* (Bacteroidia) were also detected in SIS-impacted and non-SIS-impacted zones of all SIS but with lower relative abundances (12.7 % of reads) than those allocated to the *Beta-proteobacteriales* and *Pseudomonadales*.

Although the proportion of gene reads from the *Beta-proteobacteriales* (Gammaproteobacteria) did not vary significantly with the position (non-SIS-impacted/SIS-impacted zones) (two-way RM-ANOVA, “position” effect, $p > 0.96$), the proportion of reads from the *Pseudomonadales* (Gammaproteobacteria) in the biofilms was lower in SIS-impacted zones comparing to non-SIS-impacted zones, during both dry and rainy periods (Fig. 5, two-way RM-ANOVA, “position” effect, $p < 0.01$). These lower proportions of reads from the *Pseudomonadales* in SIS-impacted zones of GB and IUT were mainly associated with increased proportions of reads from the *Flavobacteriales* (Bacteroidia). A different pattern was observed in MIN with increased proportion of reads from the *Alteromonadales* (Gamma-proteobacteria) during the dry period and increased proportion from the *Rhodobacterales* (Alpha-proteobacteria) during the rainy period in SIS-impacted zone (Fig. 5). V5-V7 reads from the *Clostridiales* (Clostridia) and *Micrococcales* (Actinobacteria) also contributed significantly to the dataset (> 1.2 % of reads for each taxon) but they were restricted to one zone of one SIS at one period: (i) reads from the *Clostridiales* (Clostridia) in the SIS-impacted zone of GB during the dry period, and (ii) reads from the *Micrococcales* (Actinobacteria) in the SIS-impacted zone of IUT during the rainy period (Fig. 5).

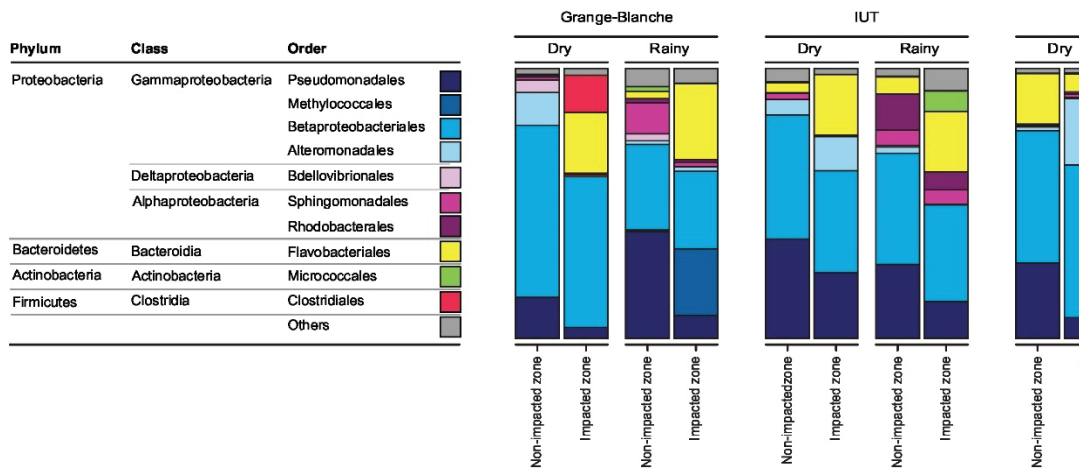


Fig. 5. Bacterial taxa in aquifer biofilms inferred from metabarcoding 16S rRNA V5-V7 gene reads. Relative abundance (mean of three replicates per condition) of the ten most represented bacterial orders during the dry and the rainy periods for each of the three SIS. Sequences not assigned to one of these orders are pooled in “Others”. SIS = Stormwater Infiltration System

4. Discussion

The present results confirmed the long-term influences of SIS on groundwater chemistry reported in previous studies (Datry et al., 2004; Foulquier et al., 2010): higher DOC, P-PO₄³⁻ and NH₄⁺ concentrations were measured in SIS-impacted groundwater than in non-SIS-impacted groundwater during both rainy and dry periods. NO₃⁻ concentrations were also lower in SIS-impacted than in non-SIS-impacted zones of the aquifer during both rainy and dry periods. These results indicate that SIS impact on groundwater chemistry was not only driven by the transfer of water, organic matter and nutrients with stormwater infiltration. For example, decreased concentrations of N-NO₃⁻ in SIS-impacted zones of the aquifer in comparison with non-SIS-impacted zones were often explained by a dilution of groundwater N-NO₃⁻ concentrations with infiltrated stormwater poor in N-NO₃⁻ (Foulquier et al. 2010, Mermillod-Blondin et al. 2013). In this situation, we can hypothesize that stimulation of biogeochemical processes like denitrification in aquifer zones impacted by SIS might explain the lower concentrations of N-NO₃⁻ measured in SIS-impacted zones than in non-SIS-impacted zones of the aquifer during dry periods. This denitrification hypothesis seems very plausible because

SIS-impacted zones were characterized by more favourable conditions for denitrification processes (higher DOC concentrations and lower dissolved oxygen concentrations, Table S1) than non-SIS impacted zones. This long-term effect (during both dry and rainy periods) of the SIS on NO_3^- concentrations but also on NH_4^+ , PO_4^{3-} and DOC concentrations could be due to the accumulation of organic matter in sediment below SIS observed by Foulquier et al. (2010) in the same SIS. For example, these authors measured an enrichment of more than 50 % in content of sedimentary organic carbon in SIS-impacted zone (around 310 mg C per kg of dry sediment in the top 30 cm below the groundwater table) of IUT SIS than in non-SIS-impacted zone of the same SIS (around 200 mg C per kg of dry sediment in the top 30 cm below the groundwater table). Sedimentary organic matter enrichment in the aquifer may then act as a source of DOC and nutrients like PO_4^{3-} and NH_4^+ but also as a zone of denitrification (as observed in slow filtration columns by Nogaro et al., 2007). Consequently, accumulation of sedimentary organic matter below SIS might have led to dissolved oxygen and NO_3^- reductions (Table S1), and NH_4^+ , PO_4^{3-} and DOC releases and enrichments in SIS-impacted zones compared to non-SIS-impacted zones of the aquifer whatever the period.

Following these long-term effects of SIS on groundwater chemistry, differences in biofilm biomass between the SIS-impacted and non-SIS-impacted zones of the aquifer were also comparable during the rainy and dry periods. Dissimilarities in bacterial community structures between SIS-impacted and non-SIS-impacted zones were relatively high at the two periods ($d > 0.46$, Figure 4) and were more likely linked to comparable differences in the main proportions of bacterial orders between zones (Figure 5). These latter results suggest that both biofilm biomass and bacterial community structures were associated with long-term effects of the SIS on groundwater chemistry. DOC being the main limiting compound for microbial growth in most aquifers (Bengtsson, 1989; Starr and Gillham, 1993; Goldscheider et al., 2006; Mermillod-Blondin et al., 2013), its enrichment increased the carrying capacity of the system in terms of

microbial biomass (Rauch-Williams and Drewes, 2006; Williamson et al., 2012; Li et al., 2013) and played a key role on bacterial community structures (as shown in other ecosystems, (Findlay et al., 2003; Li et al., 2012), which is consistent with the results of this study.

The bacterial community analyses showed a decrease in relative abundances of *Pseudomonadales* (essentially *Pseudomonas* sp. > 93 %) in SIS-impacted zones (enriched in DOC) in comparison with non-SIS-impacted zones. Such result could be due to the influence of DOC and nutrient availability on bacterial community structure of biofilms (Miura et al., 2015; Muscarella et al., 2019), *Pseudomonadales* being potentially less competitive than other bacterial groups when organic carbon availability increased in the aquifer. This hypothesis is consistent with our results showing that the impoverishment in relative abundances of *Pseudomonadales* was associated with an enrichment in *Flavobacteriales* in SIS-impacted zones in comparison with non-SIS-impacted zones of the aquifer for IUT et GB SIS. Indeed, members of the *Flavobacteriales* order are often abundant in nutrient-rich aquatic environments (Cho and Kim, 2000; Fandino et al., 2005; Marti et al., 2017; Voisin et al., 2020) and might have been favored in bacterial communities of SIS-impacted zones of the aquifer enriched in DOC. For MIN SIS, this impoverishment in relative abundances of *Pseudomonadales* in SIS-impacted zones in comparison with non-SIS-impacted zones was associated with an enrichment in relative abundances of *Alteromonadales* (essentially *Rheinheimera* > 99.6 % of all orders) in the dry period and *Rhodobacterales* (essentially *Rhodobacter* > 62 % of *Rhodobacterales* in MIN SIS) in rainy period. As observed for *Flavobacteriales*, this enrichment suggested that the members of these two groups were more competitive than *Pseudomonadales* in nutrient-rich environments (Brettar, 2006; He et al., 2019; Kumar et al., 2015). However, more specific analyses are required to validate this hypothesis that competition between *Pseudomonadales* and other bacterial groups depends on C availability in the environment. Firstly, the 16S rRNA gene (used in this study) is generally not reliable enough for taxonomic allocations at the species

level. Other metabarcoding markers are also required (e.g. *tpm* in Colin et al., 2020) to investigate competition at the species and sub-species taxonomic levels. In addition, some hypotheses for explaining trends among these biofilm bacterial communities from SIS-impacted and non-SIS-impacted groundwaters could be experimentally tested by laboratory experimentations using groundwater with contrasting DOC concentrations. Monitoring changes in bacterial community structures during the experiments would be very pertinent to determine whether C availability drives species/strains sorting towards *Flavobacteriales* or other bacterial groups.

Results of biofilm biomass and bacterial community structure support the hypothesis stating that physicochemical conditions and especially DOC concentration in groundwater are long-term impacted by SIS, inducing comparable differences in microbial communities between SIS-impacted and non-SIS-impacted zones of the aquifer during both rainy and dry periods. However, microbial activities and bacterial diversity of the biofilm gave contrasting results and supported the hypothesis that the influence of SIS on groundwater biofilms significantly depend upon meteorological conditions (rainfall events and stormwater infiltration). Indeed, microbial activities were largely modulated by meteorological conditions as increases in microbial activities in the SIS-impacted zones compared to the non-SIS-impacted zones were only observed during the rainy period. These results contrasted with previous studies (Mermillod-Blondin et al., 2013; Voisin et al., 2019b) showing a correlation between biomass and activities of groundwater biofilms. In the present study, microbial activities were not correlated with microbial biomass during the dry period: microbial biomass was significantly higher in SIS-impacted zone than in non-SIS-impacted zones whereas microbial activities were not significantly different between zones. Such disconnection between biomass and activity has been already reported in literature (Moorhead et al., 2013; Rinkes et al., 2013; Hofmann and Griebler, 2018). For example, Moorhead et al. (2013) showed that the equilibrium between

enzymatic activities and microbial biomass could be highly disconnected due to differences in the availability of nutrients in soil mesocosms (enzymatic activities being dependent on the concentration of available substrates). In the present study, rainy conditions enhanced the water flow in the SIS-impacted zones of the aquifer and then increased available DOC and phosphorus (PO_4^{3-}) fluxes supplied to the groundwater biofilm, stimulating its activity and its biomass (Mermillod-Blondin et al., 2013). The stimulation of microbial activity and biomass with hydrological fluxes has been already demonstrated in sedimentary environments (Battin, 2000; Mentzer et al., 2006; Foulquier et al., 2011; Freimann et al., 2015). In contrast, DOC enrichments in SIS-impacted zones during dry period did not influence similarly bacterial biomass and activities: biomass was significantly higher in SIS-impacted than in non-SIS-impacted zones whereas no difference between zones were detected for microbial activities. In these conditions, we can hypothesize that fluxes of water, DOC and PO_4^{3-} associated with stormwater infiltration during rainy period fed the whole biofilm biomass whereas all the biomass of the biofilm did not have access to available DOC and PO_4^{3-} concentrations under low-flow condition (dry period without stormwater infiltration). Supporting this hypothesis, Battin and Sengschmitt (1999) showed inverse responses of biofilm biomass and esterase activity to flow conditions in streambed sediments. They demonstrated that esterase activity was inhibited when low water flow conditions and extra-polymeric substances associated with biofilm biomass limited the supply of organic compounds to bacterial cells. Consequently, biofilm functioning might have been largely controlled by DOC and water fluxes, regulating metabolic pathways between anabolism (associated with biomass production) and catabolism (associated with physiological activities) (Grösbacher et al., 2018; Carlson et al., 2007; Liu et al., 2003; Liu and Tay, 2001).

As observed for microbial activities, bacterial richness and diversity were higher in biofilms from SIS-impacted zones than in biofilms from non-SIS-impacted zones only during the rainy

period. This influence of rainy conditions might have been due to a temporary increased water flow below SIS that favored the transport of surface bacteria into the groundwater system (SIS-impacted zone) and/or the remobilization of bacterial taxa living at the vadose zone - groundwater interface (Smith et al., 2018; Voisin et al., 2018). Another phenomenon could also explain the increased bacterial richness and diversity associated with rainy conditions: mobilization of organic matter in the vadose zone during stormwater infiltration in the rainy period might have enhanced the diversity of organic compounds present in groundwater, supporting a more diverse community of bacteria in the aquifer (Flynn et al., 2013; Landa et al., 2013). At this stage, more experiments (e.g., complete analysis of the diversity of organic compounds in DOC, (Her et al., 2003; Seitzinger et al., 2005) are needed to evaluate the respective influences of trophic conditions and bacterial transfers on bacterial diversity changes observed below SIS. Nevertheless, it is worth noting that bacterial diversity changes were not associated with changes in very abundant OTUs (see Figure 3). Indeed, in rainy period, the OTUs specific to the impacted zones represented in average 56 % of all OTUs, but only 4.4 % of the reads in the metabarcoding dataset. This observation does not mean that low relative abundance of taxa cannot be important in terms of biogeochemical or health issues, but these issues need more specific analyses (qPCR on genes targeting specific pathogenic bacteria or functions, Cavalca et al., 2004; Winderl et al., 2007) which are out of the scope of the present paper.

In summary, differences in biofilm structure (biomass, bacterial community structure) between SIS-impacted and non-SIS-impacted zones of the aquifer were observed during both dry and rainy periods and could be attributed to a long-term effect of the SIS, potentially through an accumulation of organic matter in the top sedimentary layer below the groundwater table. In contrast, biofilm activities were largely influenced by meteorological conditions with higher microbial activities in SIS-impacted than in non-SIS-impacted zones during the rainy period

suggesting that groundwater biofilms are able to rapidly respond to environmental changes associated with stormwater infiltration. Nevertheless, the present analysis only focused on two periods of 10 days with their specific meteorological characteristics including very strong stormwater events (as indicated in the material and methods). Thus, expanding the present study to multiple rainfall events of different intensities is needed to obtain a more complete view of the sensitivity of groundwater microbial activities to varying hydrological conditions. In addition, as changes in groundwater microbial communities can occur from months to years (Zhou et al., 2012; Fillinger et al., 2018; Herzyk et al., 2017), the long-term dynamics of microbial communities should be integrated in future studies to assess the consequences of stormwater infiltration on groundwater ecosystems.

Acknowledgements: The authors thank Antonin Vienney, Félix Vallier, Edwige Gautreau and Pierre Marmonier for their assistance and advice during field and laboratory work and the reviewers for their precious advices.

Funding: This work was supported by l'Agence Nationale de la Recherche [ANR-16-CE32-0006 FROG], Lyon Metropole and Agence de l'Eau Rhône-Méditerranée-Corse within the framework of the experimental observatory for urban hydrology (OTHU, <http://www.graie.org/othu/>) and Rhône Basin LTER (ZABR). This work was performed within the framework of the EUR H2O'Lyon (ANR-17-EURE-0018) of Université de Lyon (UdL), within the program "Investissements d'Avenir" operated by the French National Research Agency (ANR).

Table S1: Dissolved organic carbon (DOC) concentration (mg. L-1), ammonium N-NH₄⁺ concentration (µg. L-1), nitrates and nitrites N-NO_x (NO₃⁻ + NO₂⁻) concentration (mg. L-1), orthophosphate P-PO₄³⁻ concentration (µg. L-1), electric conductivity (µS. cm-1), temperature (°C), dissolved oxygen (mg. L-1), pH : means +/- standard deviations measured on non-SIS-impacted (NSI) and SIS-impacted (SI) groundwaters of the 3 SIS (Grange-Blanche –GB; IUT, Minerve-MIN) during the dry and the rainy periods. SIS = Stormwater Infiltration Systems

DRY PERIOD

Variable	IUT		MIN		GB	
	NSI	SI	NSI	SI	NSI	SI
DOC (mg. L ⁻¹)	1.05±0.1	2.79±0.9	1.40±0.3	2.81±0.7	1.41±0.3	2.33±0.2
N-NH ₄ ⁺ (µg. L ⁻¹)	11.8±4.7	20.3±16	13.8±11	13.0±2.2	16.2±7.3	139±11
N-NO ₃ ⁻ (mg. L ⁻¹)	2.55±0.1	2.36±0.1	13.5±0.5	1.26±1.1	6.68±0.1	3.5±0.2
P-PO ₄ ³⁻ (µg. L ⁻¹)	27.7±5.8	194±24	67.6±12.0	56.6±9.3	51.8±6.5	702±48
Electric conductivity (µS. cm ⁻¹)	546±2	306±31	761±15	402±44	836±5	704±2
Temperature (°C)	15.71±0.02	18.44±0.27	14.76±0.04	18.39±0.09	16.86±0.01	15.29±0.08
Dissolved oxygen (mg. L ⁻¹)	3.33±0.23	1.85±0.46	6.44±0.14	0.58±0.50	5.86±0.02	4.18±0.16
pH	7.9±0.2	8.5±0.1	7.8±0.3	8.2±0.1	7.9±0.4	7.7±0.2

RAINY PERIOD

Variable	IUT		MIN		GB	
	NSI	SI	NSI	SI	NSI	SI
DOC (mg. L-1)	1.02±0.5	1.81±0.3	1.00±0.1	2.24±0.5	0.95±0.1	1.61±0.2
N-NH ₄ ⁺ (µg. L-1)	15.7±2.9	44.2±14	13.3±2.1	23.8±7.2	12.7±6.1	181±49

N-NO ₃ - (mg. L-1)	2.56±0.2	1.70±1.3	14.2±0.3	0.83±0.6	7.23±0.3	4.10±0.6
P-PO ₄ - (µg. L-1)	16.9±8.4	94.4±46	34.5±15	44.9±20	6.65±5.1	351±113
Electric conductivity (µS. cm-1)	562±14	268±186	674±56	347±91	692±48	579±79
Temperature (°C)	15.7±0.05	17.6±0.98	15.5±0.52	19.0±0.76	18.6±0.47	15.5±0.40
Dissolved oxygen (mg. L-1)	3.3±0.2	0.7±0.66	7.7±0.26	1±1.3	6.63±0.25	4±0.66
pH	7.6±0.15	7.7±0.13	7.5±0.1	7.7±0.06	7.5±0.03	7.8±0.17

Table S2. NGS (new generation sequencing) Illumina barcodes of the 16S rRNA gene V5-V6 sequences of each aquifer biofilm sample generated on clay beads during a 10-day dry period. See Fig. 1 for a description of the sampled sites. DNA sequences were deposited at the European Nucleotide Archive (<https://www.ebi.ac.uk/ena>) under the project accession numbers #PRJEB29925 and #PRJEB40243.

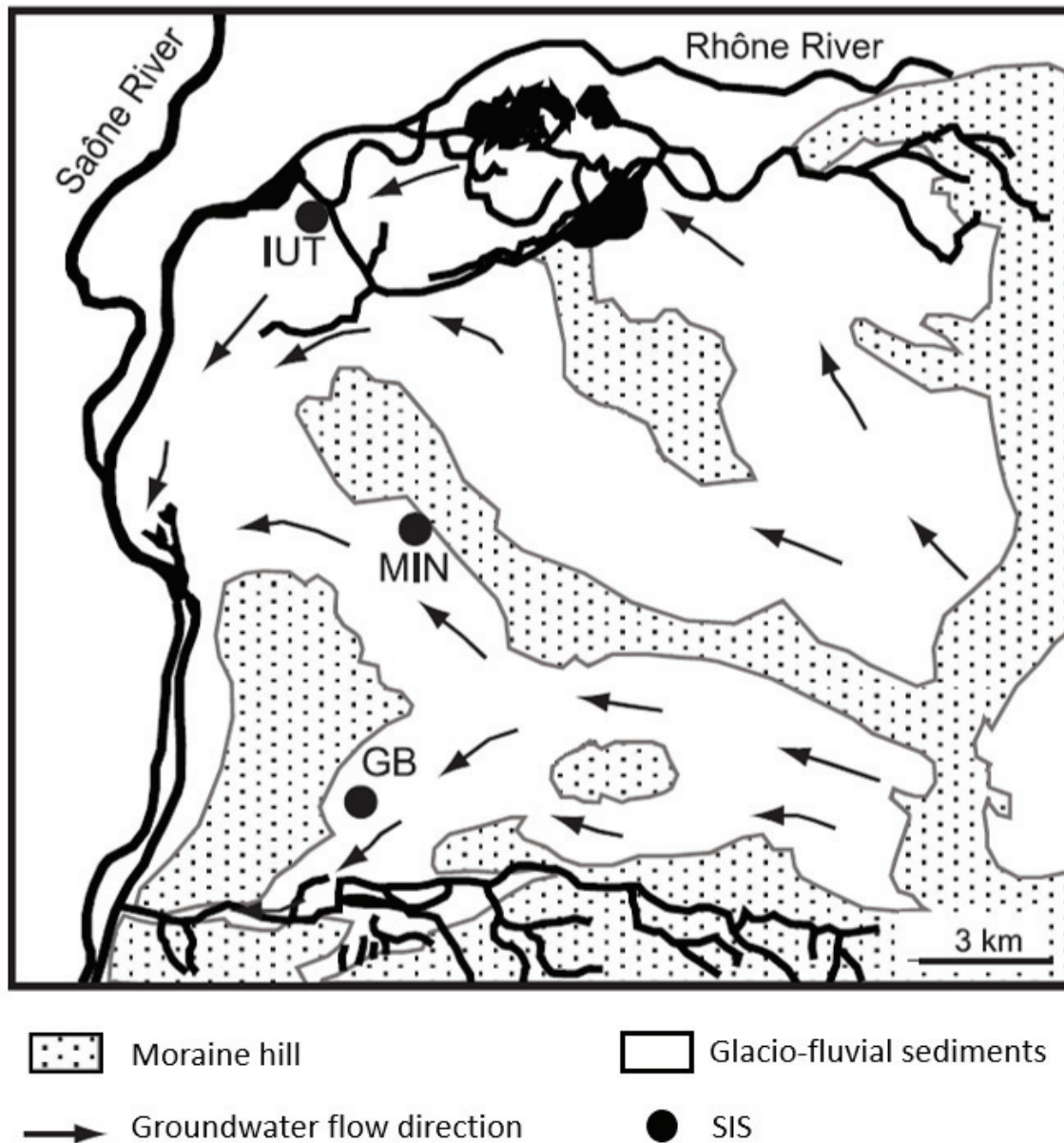
site code	Period	origin of the DNA extracts (biofilms)	sampling period (matching clay beads exposure time periods in days)	Illumina sample number and run (A = ena #ERS2912777)	barcode	Project accession number	Linker primer sequence
GB	rainy	biofilm on clay beads - N-SIS-I zone	10	A19	AACAACAA	#PRJEB29925	ACCMGGATTAGATACCKG
GB	rainy	biofilm on clay beads - N-SIS-I zone	10	A20	AACAACAC	#PRJEB29925	ACCMGGATTAGATACCKG
GB	rainy	biofilm on clay beads - N-SIS-I zone	10	A21	AACAACAG	#PRJEB29925	ACCMGGATTAGATACCKG
GB	rainy	biofilm on clay beads - SIS-I zone	10	A22	AACAACAT	#PRJEB29925	ACCMGGATTAGATACCKG
GB	rainy	biofilm on clay beads - SIS-I zone	10	A23	AACAACCA	#PRJEB29925	ACCMGGATTAGATACCKG
GB	rainy	biofilm on clay beads - SIS-I zone	10	A24	AACAACCC	#PRJEB29925	ACCMGGATTAGATACCKG
IUT	rainy	biofilm on clay beads - N-SIS-I zone	10	A28	AACAACGC	#PRJEB29925	ACCMGGATTAGATACCKG
IUT	rainy	biofilm on clay beads - N-SIS-I zone	10	A29	AACAACGG	#PRJEB29925	ACCMGGATTAGATACCKG
IUT	rainy	biofilm on clay beads - N-SIS-I zone	10	A30	AACAACGT	#PRJEB29925	ACCMGGATTAGATACCKG
IUT	rainy	biofilm on clay beads - SIS-I zone	10	A31	AACAACCTA	#PRJEB29925	ACCMGGATTAGATACCKG
IUT	rainy	biofilm on clay beads - SIS-I zone	10	A32	AACAACCTC	#PRJEB29925	ACCMGGATTAGATACCKG
IUT	rainy	biofilm on clay beads - SIS-I zone	10	A33	AACAACCTG	#PRJEB29925	ACCMGGATTAGATACCKG
MIN	rainy	biofilm on clay beads - N-SIS-I zone	10	A37	AACAAGAG	#PRJEB29925	ACCMGGATTAGATACCKG
MIN	rainy	biofilm on clay beads - N-SIS-I zone	10	A38	AACAAGAT	#PRJEB29925	ACCMGGATTAGATACCKG
MIN	rainy	biofilm on clay beads - N-SIS-I zone	10	A39	AACAAGCA	#PRJEB29925	ACCMGGATTAGATACCKG
MIN	rainy	biofilm on clay beads - SIS-I zone	10	A40	AACAAGCC	#PRJEB29925	ACCMGGATTAGATACCKG
MIN	rainy	biofilm on clay beads - SIS-I zone	10	A41	AACAAGCG	#PRJEB29925	ACCMGGATTAGATACCKG
MIN	rainy	biofilm on clay beads - SIS-I zone	10	A42	AACAAGCT	#PRJEB29925	ACCMGGATTAGATACCKG
GB	dry	biofilm on clay beads - N-SIS-I zone	10	AS28	CGATGCTA	#PRJEB40243	ACCMGGATTAGATACCKG
GB	dry	biofilm on clay beads - N-SIS-I zone	10	AS29	CGATTACG	#PRJEB40243	ACCMGGATTAGATACCKG
GB	dry	biofilm on clay beads - N-SIS-I zone	10	AS30	CGCCAATA	#PRJEB40243	ACCMGGATTAGATACCKG
GB	dry	biofilm on clay beads - SIS-I zone	10	AS25	CGAATACC	#PRJEB40243	ACCMGGATTAGATACCKG
GB	dry	biofilm on clay beads - SIS-I zone	10	AS26	CGATAAGG	#PRJEB40243	ACCMGGATTAGATACCKG
GB	dry	biofilm on clay beads - SIS-I zone	10	AS27	CGATCCTT	#PRJEB40243	ACCMGGATTAGATACCKG
IUT	dry	biofilm on clay beads - N-SIS-I zone	10	AS22	CCTTGCAT	#PRJEB40243	ACCMGGATTAGATACCKG
IUT	dry	biofilm on clay beads - N-SIS-I zone	10	AS23	CGAACCAT	#PRJEB40243	ACCMGGATTAGATACCKG
IUT	dry	biofilm on clay beads - N-SIS-I zone	10	AS24	CGAAGCTT	#PRJEB40243	ACCMGGATTAGATACCKG
IUT	dry	biofilm on clay beads - SIS-I zone	10	AS19	CCTTAACC	#PRJEB40243	ACCMGGATTAGATACCKG
IUT	dry	biofilm on clay beads - SIS-I zone	10	AS20	CCTTATGC	#PRJEB40243	ACCMGGATTAGATACCKG
IUT	dry	biofilm on clay beads - SIS-I zone	10	AS21	CCTTCCAA	#PRJEB40243	ACCMGGATTAGATACCKG
MIN	dry	biofilm on clay beads - N-SIS-I zone	10	AS34	GGGCATCA	#PRJEB40243	ACCMGGATTAGATACCKG
MIN	dry	biofilm on clay beads - N-SIS-I zone	10	AS35	GGGCCAGT	#PRJEB40243	ACCMGGATTAGATACCKG
MIN	dry	biofilm on clay beads - N-SIS-I zone	10	AS36	GGGCCTCT	#PRJEB40243	ACCMGGATTAGATACCKG
MIN	dry	biofilm on clay beads - SIS-I zone	10	AS31	CGCCTATT	#PRJEB40243	ACCMGGATTAGATACCKG
MIN	dry	biofilm on clay beads - SIS-I zone	10	AS32	CGCGAATT	#PRJEB40243	ACCMGGATTAGATACCKG
MIN	dry	biofilm on clay beads - SIS-I zone	10	AS33	CGCGATTA	#PRJEB40243	ACCMGGATTAGATACCKG

SIS-I zone = SIS-impacted zone of the aquifer ; N-SIS-I zone = non-SIS-impacted zone of the aquifer

Supplementary materials 1: Cluster's phylogeny and number of sequences per cluster in non-SIS-impacted and SIS-impacted zones of the three SIS for the dry and the rainy period (first page displayed)

Cluster	Kingdom	Phylum	Class	Order	Family	Genus	total	GB		UT		MN							
								Dry Period	Rainy Period	Dry Period	Rainy Period	Dry Period	Rainy Period						
								NSI	SI	NSI	SI	NSI	SI						
Cluster_69	Bacteria	Bacteroidetes	Bacteroidia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Flavobacterium	6238	5	109	116	1428	8	38	12	309	3080	18	232	883
Cluster_40	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	Multi-affiliation	5899	54	148	365	44	13	70	24	2701	26	238	224	1992
Cluster_70	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Methylocoales	Methylocomonaceae	Multi-affiliation	5887	0	0	139	5701	0	6	6	11	0	0	11	13
Cluster_54	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	unknown genus	5773	0	0	762	31	0	0	15	54	0	0	4704	207
Cluster_50	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Betaproteobacteriales	Burkholderiaceae	Multi-affiliation	5770	8	6	1390	51	68	58	63	1800	3	48	630	1445
Cluster_46	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Betaproteobacteriales	Rhodocyclaceae	Ferritactium	5680	106	315	69	56	16	14	42	184	10	2307	141	2420
Cluster_41	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Betaproteobacteriales	Burkholderiaceae	Multi-affiliation	5614	8	1678	32	66	16	11	26	3641	0	8	18	110
Cluster_80	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Betaproteobacteriales	Burkholderiaceae	Digenea	5556	299	160	54	167	3181	59	32	70	373	751	257	153
Cluster_63	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Multi-affiliation	Multi-affiliation	Multi-affiliation	5554	16	6	101	4297	0	36	615	332	22	36	16	77
Cluster_48	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteomonadales	Alteomonadaceae	Rheinheimera	5422	25	6	61	678	20	3757	266	1	22	127	92	367
Cluster_60	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	5173	3540	14	15	12	85	126	322	8	994	36	16	5
Cluster_43	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	5109	107	74	59	94	72	237	65	3761	208	170	160	102
Cluster_58	Bacteria	Bacteroidetes	Bacteroidia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Flavobacterium	4874	27	84	14	52	48	4325	3	36	66	38	21	160
Cluster_61	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Betaproteobacteriales	Burkholderiaceae	Multi-affiliation	4864	31	2065	396	60	76	78	605	168	25	927	42	396
Cluster_59	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Caulimicrobiales	Portococcaceae	Cl-8045	4611	0	0	576	52	0	0	5	6	0	0	2937	1035
Cluster_104	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Betaproteobacteriales	Burkholderiaceae	Mastella	4563	29	15	24	206	213	23	9	116	3332	133	45	398
Cluster_64	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Betaproteobacteriales	Rhodocyclaceae	Dactylomonas	4519	294	10	211	25	2917	917	18	8	42	51	17	9
Cluster_68	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Betaproteobacteriales	Burkholderiaceae	Mastella	4486	121	56	43	48	544	1537	57	64	1627	69	244	76
Cluster_56	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Betaproteobacteriales	Burkholderiaceae	Multi-affiliation	4475	20	918	322	955	36	37	624	254	11	257	200	801
Cluster_90	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Betaproteobacteriales	Burkholderiaceae	Digenea	4344	36	932	152	344	403	685	8	363	611	485	209	116
Cluster_72	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Methylocoales	Methylocomonaceae	Methylobacter	4244	0	0	85	4126	0	3	9	9	0	0	6	6
Cluster_78	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Betaproteobacteriales	Rhodocyclaceae	Zogooea	3991	15	2309	628	27	122	29	5	58	20	26	186	566
Cluster_65	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Betaproteobacteriales	Burkholderiaceae	Multi-affiliation	3852	33	33	219	15	481	27	25	37	1004	30	1975	23
Cluster_62	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	Pseudorhodobacter	3808	0	0	465	580	0	0	21	76	0	0	98	2588
Cluster_101	Bacteria	Bacteroidetes	Bacteroidia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Flavobacterium	3759	0	104	1862	304	55	12	5	398	70	5	80	864
Cluster_94	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteomonadales	Alteomonadaceae	Rheinheimera	3697	15	11	0	8	20	3192	0	0	13	435	0	3
Cluster_66	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	unknown genus	3530	0	0	1078	37	0	0	102	124	0	0	2103	86
Cluster_67	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	Rhodobacter	3351	5	30	56	58	0	3	86	2868	0	9	71	165
Cluster_81	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Betaproteobacteriales	Burkholderiaceae	Mastella	3315	9	642	235	225	369	25	4	112	95	983	27	589
Cluster_76	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	Acinetobacter	3257	26	278	198	137	739	796	32	391	187	52	318	103
Cluster_79	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Deltaproteobacteriales	Bacteroidaceae	Peribacter	3224	0	0	3202	9	0	0	2	6	0	0	1	4
Cluster_82	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Sphingobium	3191	39	0	2833	7	41	0	24	8	0	4	17	218

Supplementary materials 2: Location of the three Stormwater Infiltration Systems - SIS
(Grange-Blanche –GB; IUT; Minerve-MIN)



References

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J., 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, 215(3), 403-410.
[https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)

Barba, C., Folch, A., Sanchez-Vila, X., Martínez-Alonso, M., Gaju, N., 2019. Are dominant microbial sub-surface communities affected by water quality and soil characteristics? *J. Environ. Manage.* 237, 332–343. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.02.079>

Barraud, S., Gautier, A., Bardin, J.-P., Riou, V., 1999. The impact of intentional stormwater infiltration on soil and groundwater. *Water Sci. Technol.* 39, 185. [https://doi.org/10.1016/S0273-1223\(99\)00022-0](https://doi.org/10.1016/S0273-1223(99)00022-0)

Battin, T.J., 2000. Hydrodynamics is a major determinant of streambed biofilm activity: From the sediment to the reach scale. *Limnol. Oceanogr.* 45, 1308–1319. <https://doi.org/10.4319/lo.2000.45.6.1308>

Battin T.J., Sengschmitt D., 1999. Linking sediment biofilms, hydrodynamics, and river bed clogging: evidence from a large river. *Microb Ecol.* 37(3),185-196. [doi:10.1007/s002489900142](https://doi.org/10.1007/s002489900142)

Beckers, B., Op De Beeck, M., Thijs, S., Truyens, S., Weyens, N., Boerjan, W., Vangronsveld, J., 2016. Performance of 16s rDNA primer pairs in the study of rhizosphere and endosphere bacterial microbiomes in metabarcoding studies. *Front. Microbiol.* 7, 650. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00650>

Bengtsson, G., 1989. Growth and metabolic flexibility in groundwater bacteria. *Microb. Ecol.* 18, 235–248. <https://doi.org/10.1007/BF02075811>

Bou, C., Rouch, R., 1967. Un nouveau champ de recherches sur la faune aquatique souterraine. *CR Acad Sci* 265, 369–370.

Brettar, I., 2006. *Rheinheimera perlucida* sp. nov., a marine bacterium of the Gammaproteobacteria isolated from surface water of the central Baltic Sea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 2177–2183. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64172-0>

Carlson, C.A., Del Giorgio, P.A., Herndl, G.J., 2007. Microbes and the dissipation of energy and respiration: from cells to ecosystems. *Oceanography* 20, 89–100. <https://doi.org/10.5670/oceanog.2007.52>

Cavalca, L., Dell’Amico, E., Andreoni, V., 2004. Intrinsic bioremediability of an aromatic hydrocarbon-polluted groundwater: diversity of bacterial population and toluene monooxygenase genes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64, 576–587. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1449-6>

Cho, J.-C., Kim, S.-J., 2000. Increase in bacterial community diversity in subsurface aquifers receiving livestock wastewater input. *Appl. Env. Microbiol.* 66, 956–965. <https://doi.org/10.1128/aem.66.3.956-965.2000>

Colin, Y., Bouchali, R., Marjolet, L., Marti, R., Vautrin, F., Voisin, J., Bourgeois, E., Rodriguez-Nava, V., Blaha, D., Winiarski, T., Mermillod-Blondin, F., Cournoyer, B., 2020. Coalescence of bacterial groups originating from urban runoffs and artificial infiltration systems among aquifer microbiomes. *Hydrol. Earth Syst. Sci. Discuss.* 1–28. <https://doi.org/10.5194/hess-2020-39>

Datry, T., Malard, F., Gibert, J., 2005. Response of invertebrate assemblages to increased groundwater recharge rates in a phreatic aquifer. *J. North Am. Benthol. Soc.* 24, 461–477. <https://doi.org/10.1899/04-140.1>

Datry, T., Malard, F., Gibert, J., 2004. Dynamics of solutes and dissolved oxygen in shallow urban groundwater below a stormwater infiltration basin. *Sci. Total Environ.* 329, 215–229. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.02.022>

Datry, T., Malard, F., Vitry, L., Hervant, F., Gibert, J., 2003. Solute dynamics in the bed sediments of a stormwater infiltration basin. *J. Hydrol.* 273, 217–233. [https://doi.org/10.1016/S0022-1694\(02\)00388-8](https://doi.org/10.1016/S0022-1694(02)00388-8)

Escudié, F., Auer, L., Bernard, M., Mariadassou, M., Cauquil, L., Vidal, K., Maman, S., Hernandez-Raquet, G., Combes, S., Pascal, G., 2018. FROGS: Find, rapidly, OTUs with galaxy solution. *Bioinformatics* 34, 1287–1294. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx791>

Fandino, L.B., Riemann, L., Steward, G.F., Azam, F., 2005. Population dynamics of Cytophaga-Flavobacteria during marine phytoplankton blooms analyzed by real-time quantitative PCR. *Aquat. Microb. Ecol.* 40, 251–257. <https://doi.org/10.3354/ame040251>

Fillinger, L., Zhou, Y., Kellermann, C., Griebler, C., 2019. Non-random processes determine the colonization of groundwater sediments by microbial communities in a pristine porous aquifer. *Environ. Microbiol.* 21, 327–342. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14463>

Findlay, S.E.G., Sinsabaugh, R.L., Sobczak, W.V., Hoostal, M., 2003. Metabolic and structural response of hyporheic microbial communities to variations in supply of dissolved organic matter. *Limnol. Oceanogr.* 48, 1608–1617. <https://doi.org/10.4319/lo.2003.48.4.1608>

Fletcher, T.D., Shuster, W., Hunt, W.F., Ashley, R., Butler, D., Arthur, S., Trowsdale, S., Barraud, S., Semadeni-Davies, A., Bertrand-Krajewski, J.-L., others, 2015. SUDS, LID, BMPs, WSUD and more—The evolution and application of terminology surrounding urban drainage. *Urban Water J.* 12, 525–542. <https://doi.org/10.1080/1573062x.2014.916314>

Flörke, M., Schneider, C., McDonald, R.I., 2018. Water competition between cities and agriculture driven by climate change and urban growth. *Nat. Sustain.* 1, 51–58. <https://doi.org/10.1038/s41893-017-0006-8>

Flynn, T.M., Sanford, R.A., Ryu, H., Bethke, C.M., Levine, A.D., Ashbolt, N.J., Santo Domingo, J.W., 2013. Functional microbial diversity explains groundwater chemistry in a pristine aquifer. *BMC Microbiol.* 13, 146. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-146>

Fontvieille, D.A., Outaguerouine, A., Thevenot, D.R., 1992. Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of microbial activity in aquatic systems: Application to activated sludges. *Environ. Technol.* 13, 531–540. <https://doi.org/10.1080/09593339209385181>

Foulquier, A., Malard, F., Barraud, S., Gibert, J., 2009. Thermal influence of urban groundwater recharge from stormwater infiltration basins. *Hydrol. Process.* 23, 1701–1713. <https://doi.org/10.1002/hyp.7305>

Foulquier, A., Malard, F., Mermillod-Blondin, F., Datry, T., Simon, L., Montuelle, B., Gibert, J., 2010. Vertical change in dissolved organic carbon and oxygen at the water table region of an aquifer recharged with stormwater: biological uptake or mixing? *Biogeochemistry* 99, 31–47. <https://doi.org/10.1007/s10533-009-9388-7>

Foulquier, A., Mermillod-Blondin, F., Malard, F., Gibert, J., 2011. Response of sediment biofilm to increased dissolved organic carbon supply in groundwater artificially recharged with stormwater. *J. Soils Sediments* 11, 382–393. <https://doi.org/10.1007/s11368-010-0323-2>

Freimann, R., Bürgmann, H., Findlay, S.E., Robinson, C.T., 2015. Hydrologic linkages drive spatial structuring of bacterial assemblages and functioning in alpine floodplains. *Front. Microbiol.* 6, 1221. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01221>

Fritch, T.G., McKnight, C.L., Yelderman Jr, J.C., Arnold, J.G., 2000. An aquifer vulnerability assessment of the Paluxy aquifer, central Texas, USA, using GIS and a modified DRASTIC approach. *Environ. Manage.* 25, 337–345. <https://doi.org/10.1007/s002679910026>

Goldscheider, N., Hunkeler, D., Rossi, P., 2006. Microbial biocenoses in pristine aquifers and an assessment of investigative methods. *Hydrogeol. J.* 14, 926–941. <https://doi.org/10.1007/s10040-005-0009-9>

Gouy, M., Guindon, S., Gascuel, O., 2010. SeaView Version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol. Biol. Evol.* 27, 221–224. <https://doi.org/10.1093/molbev/msp259>

Griebler, C., Avramov, M., 2015. Groundwater ecosystem services: a review. *Freshw. Sci.* 34, 355–367. <https://doi.org/10.1086/679903>

Grösbacher, M., Eckert, D., Cirpka, O.A., Griebler, C., 2018. Contaminant concentration versus flow velocity: drivers of biodegradation and microbial growth in groundwater model systems. *Biodegradation* 29, 211–232. <https://doi.org/10.1007/s10532-018-9824-2>

He, Z., Ning, Z., Yang, M., Huang, G., Cui, H., Wang, H., Sun, J., 2019. The characterization of microbial communities response to shallow groundwater contamination in typical Piedmont region of Taihang Mountains in the north China Plain. *Water* 11, 736. <https://doi.org/10.3390/w11040736>

Heibl, C., 2008. Interfaces to Phylogenetic Software in R

Her, N., Amy, G., McKnight, D., Sohn, J., Yoon, Y., 2003. Characterization of DOM as a function of MW by fluorescence EEM and HPLC-SEC using UVA, DOC, and fluorescence detection. *Water Res.* 37, 4295–4303. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(03\)00317-8](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(03)00317-8)

Herzyk, A., Fillinger, L., Larentis, M., Qiu, S., Maloszewski, P., Hünninger, M., Schmidt, S.I., Stumpp, C., Marozava, S., Knappett, P.S.K., Elsner, M., Meckenstock, R., Lueders, T., Griebler, C., 2017. Response and recovery of a pristine groundwater ecosystem impacted by toluene contamination – A meso-scale indoor aquifer experiment. *J. Contam. Hydrol.* 207, 17–30. <https://doi.org/10.1016/j.jconhyd.2017.10.004>

Hofmann, R., Griebler, C., 2018. DOM and bacterial growth efficiency in oligotrophic groundwater: absence of priming and co-limitation by organic carbon and phosphorus. *Aquat. Microb. Ecol.* 81, 55–71. <https://doi.org/10.3354/ame01862>

Houri-Davignon, C., Relexans, J.C., Etcheber, H., 1989. Measurement of actual electron transport system (ETS) activity in marine sediments by incubation with INT. *Environ. Technol. Lett.* 10, 91–100. <https://doi.org/10.1080/09593338909384722>

Kembel, S.W., Kembel, M.S.W., 2019. Package ‘picante.’

Konrad, C.P., 2003. Effects of urban development on floods. US Geological Survey Tacoma. <https://pubs.usgs.gov/fs/fs07603/>

Kumar, A., Kaur, G., Kumar Singh, N., Mathan Kumar, R., Mayilraj, S., Bajaj, A., Kaur, N., Manickam, N., 2015. Taxonomic description and genome sequence of *Rheinheimera mesophila* sp. nov., isolated from an industrial waste site. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65, 3666–3673. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000471>

Landa, M., Cottrell, M.T., Kirchman, D.L., Blain, S., Obernosterer, I., 2013. Changes in bacterial diversity in response to dissolved organic matter supply in a continuous culture experiment. *Aquat. Microb. Ecol.* 69, 157–168. <https://doi.org/10.3354/ame01632>

Li, D., Alidina, M., Ouf, M., Sharp, J.O., Saikaly, P., Drewes, J.E., 2013. Microbial community evolution during simulated managed aquifer recharge in response to different biodegradable dissolved organic carbon (BDOC) concentrations. *Water Res.* 47, 2421–2430. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.02.012>

Li, D., Sharp, J.O., Saikaly, P.E., Ali, S., Alidina, M., Alarawi, M.S., Keller, S., Hoppe-Jones, C., Drewes, J.E., 2012. Dissolved organic carbon influences microbial community composition and diversity in managed aquifer recharge systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 6819–6828. <https://doi.org/10.1128/AEM.01223-12>

Liu, Y., Lin, Y.-M., Yang, S.-F., Tay, J.-H., 2003. A balanced model for biofilms developed at different growth and detachment forces. *Process Biochem.* 38, 1761–1765. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(02\)00260-1](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00260-1)

Liu, Y., Tay, J.-H., 2001. Metabolic response of biofilm to shear stress in fixed-film culture. *J. Appl. Microbiol.* 90, 337–342. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01244.x>

Lozupone, C., Knight, R., 2005. UniFrac: A new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 8228–8235. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.8228-8235.2005>

Maes, P.W., Rodrigues, P.A.P., Oliver, R., Mott, B.M., Anderson, K.E., 2016. Diet-related gut bacterial dysbiosis correlates with impaired development, increased mortality and Nosema disease in the honeybee (*Apis mellifera*). *Mol. Ecol.* 25, 5439–5450. <https://doi.org/10.1111/mec.13862>

Mahé, F., Rognes, T., Quince, C., de Vargas, C., Dunthorn, M., 2014. Swarm: robust and fast clustering method for amplicon-based studies. *PeerJ* 2, e593. <https://doi.org/10.7717/peerj.593>

Marti, R., Ribun, S., Aubin, J.-B., Colinon, C., Petit, S., Marjolet, L., Gourmelon, M., Schmitt, L., Breil, P., Cottet, M., others, 2017. Human-driven microbiological contamination of benthic and hyporheic sediments of an intermittent peri-urban river assessed from MST and 16S rRNA genetic structure analyses. *Front. Microbiol.* 8, 19. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00019>

McMurdie, P.J., Holmes, S., 2013. Phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PloS One* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>

Mentzer, J.L., Goodman, R.M., Balsler, T.C., 2006. Microbial response over time to hydrologic and fertilization treatments in a simulated wet prairie. *Plant Soil* 284, 85–100. <https://doi.org/10.1007/s11104-006-0032-1>

Mermillod-Blondin, F., Foulquier, A., Maazouzi, C., Navel, S., Negrutiu, Y., Vienney, A., Simon, L., Marmonier, P., 2013. Ecological assessment of groundwater trophic status by using artificial substrates to monitor biofilm growth and activity. *Ecol. Indic.* 25, 230–238. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2012.09.026>

Mermillod-Blondin, F., Voisin, J., Marjolet, L., Marmonier, P., Cournoyer, B., 2019. Clay beads as artificial trapping matrices for monitoring bacterial distribution among urban stormwater infiltration systems and their connected aquifers. *Environ. Monit. Assess.* 191, 58. <https://doi.org/10.1007/s10661-019-7190-0>.

Miura, T., Yamazoe, A., Ito, M., Ohji, S., Hosoyama, A., Takahata, Y., Fujita, N., 2015. The impact of injections of different nutrients on the bacterial community and its dechlorination activity in chloroethene-contaminated groundwater. *Microbes Environ.* 30, 164–171. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME14127>

- Moorhead, D.L., Rinkes, Z.L., Sinsabaugh, R.L., Weintraub, M.N., 2013. Dynamic relationships between microbial biomass, respiration, inorganic nutrients and enzyme activities: informing enzyme-based decomposition models. *Front. Microbiol.* 4, 223. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00223>
- Muscarella, M. E., Boot, C. M., Broeckling, C. D., & Lennon, J. T. (2019). Resource heterogeneity structures aquatic bacterial communities. *ISME J.* 13, 2183-2195.
- Natarajan, P., Davis, A.P., 2015. Hydrologic performance of a transitioned infiltration basin managing highway runoff. *J. Sustain. Water Built Environ.* 1, 04015002. <https://doi.org/10.1061/JSWBAY.0000797>
- Nogaro, G., Mermillod-Blondin, F., Montuelle, B., Boisson, J.-C., Bedell, J.-P., Ohannessian, A., Volat, B., Gibert, J., 2007. Influence of a stormwater sediment deposit on microbial and biogeochemical processes in infiltration porous media. *Sci. Total Environ.* 377, 334–348. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.01.093>
- Pabich, W.J., Valiela, I., Hemond, H.F., 2001. Relationship between DOC concentration and vadose zone thickness and depth below water table in groundwater of Cape Cod, USA. *Biogeochemistry* 55, 247–268. <https://doi.org/10.1023/a:1011842918260>
- Paradis, E., Schliep, K., 2019. ape 5.0: an environment for modern phylogenetics and evolutionary analyses in R. *Bioinformatics* 35, 526–528. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty633>
- Peterson, G.L., 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* 83, 346–356. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(77\)90043-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(77)90043-4)

Pitt, R., Clark, S., Field, R., 1999. Groundwater contamination potential from stormwater infiltration practices. *Urban Water* 1, 217–236. [https://doi.org/10.1016/S1462-0758\(99\)00014-X](https://doi.org/10.1016/S1462-0758(99)00014-X)

Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., Glöckner, F.O., 2012. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 41, D590–D596. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>

R Core Team., 2018. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

Rauch-Williams, T., Drewes, J.E., 2006. Using soil biomass as an indicator for the biological removal of effluent-derived organic carbon during soil infiltration. *Water Res.* 40, 961–968. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.01.007>

Rinkes, Z.L., Sinsabaugh, R.L., Moorhead, D.L., Grandy, A.S., Weintraub, M.N., 2013. Field and lab conditions alter microbial enzyme and biomass dynamics driving decomposition of the same leaf litter. *Front. Microbiol.* 4, 260. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00260>

Schliep, K.P., 2011. phangorn: phylogenetic analysis in R. *Bioinformatics* 27, 592–593. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq706>

Seitzinger, S.P., Hartnett, H., Lauck, R., Mazurek, M., Minegishi, T., Spyres, G., Styles, R., 2005. Molecular-level chemical characterization and bioavailability of dissolved organic matter in stream water using electrospray-ionization mass spectrometry. *Limnol. Oceanogr.* 50, 1–12. <https://doi.org/10.4319/lo.2005.50.1.0001>

Smith, H.J., Zelaya, A.J., De León, K.B., Chakraborty, R., Elias, D.A., Hazen, T.C., Arkin, A.P., Cunningham, A.B., Fields, M.W., 2018. Impact of hydrologic boundaries on microbial

planktonic and biofilm communities in shallow terrestrial subsurface environments. *FEMS Microbiol. Ecol.* 94, fiy191. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiy191>

Smith, M., Cross, K., Paden, M., Laban, P., 2016. Spring–managing groundwater sustainably. IUCN Gland Switz. <https://doi.org/10.2305/IUCN.CH.2016.WANI.8.en>

Starr, R.C., Gillham, R.W., 1993. Denitrification and organic carbon availability in two aquifers. *Groundwater* 31, 934–947. <https://doi.org/10.1111/j.1745-6584.1993.tb00867.x>

Van der Gun, J., 2012. Groundwater and global change: trends, opportunities, and challenges. The United Nations world water assessment program –ISBN : 978-92-3-001049-2

Voisin, J., Cournoyer, B., Marjolet, L., Vienney, A., Mermillod-Blondin, F., 2020. Ecological assessment of groundwater ecosystems disturbed by recharge systems using organic matter quality, biofilm characteristics, and bacterial diversity. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 27, 3295–3308. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06971-5>

Voisin, J., Cournoyer, B., Mermillod-Blondin, F., 2016. Assessment of artificial substrates for evaluating groundwater microbial quality. *Ecol. Indic.* 71, 577–586. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2016.07.035>

Voisin, J., Cournoyer, B., Vienney, A., Mermillod-Blondin, F., 2018. Aquifer recharge with stormwater runoff in urban areas: Influence of vadose zone thickness on nutrient and bacterial transfers from the surface of infiltration basins to groundwater. *Sci. Total Environ.* 637–638, 1496–1507. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.094>

Williamson, W.M., Close, M.E., Leonard, M.M., Webber, J.B., Lin, S., 2012. Groundwater biofilm dynamics grown in situ along a nutrient gradient. *Ground Water* 50, 690–703. <https://doi.org/10.1111/j.1745-6584.2011.00904.x>

Winderl, C., Schaefer, S., Lueders, T., 2007. Detection of anaerobic toluene and hydrocarbon degraders in contaminated aquifers using benzylsuccinate synthase (bssA) genes as a functional marker. *Environ. Microbiol.* 9, 1035–1046. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01230.x>

Wright ES (2016). Using DECIPHER v2.0 to analyze big biological sequence data in R. *The R Journal* 8, 352-359.

Zhou, Y., Kellermann, C., Griebler, C., 2012. Spatio-temporal patterns of microbial communities in a hydrologically dynamic pristine aquifer. *FEMS Microbiol. Ecol.* 81, 230–242. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01371.x>

4

IMPACT DES PRATIQUES D'INFILTRATION DES EAUX DE
RUISSELLEMENT PLUVIALES SUR LA COMPOSITION DES
COMMUNAUTÉS MICROBIENNES DE LA NAPPE :

INFLUENCE DE L'ÉPAISSEUR DE LA ZONE NON-SATURÉE ET DU TEMPS
DE TRANSIT DE L'EAU D'INFILTRATION DE LA SURFACE VERS LA
NAPPE

Le chapitre précédent a permis de caractériser l'impact des pratiques d'infiltration d'eaux pluviales sur modifications structurelles et fonctionnelles des communautés microbiennes de la nappe à l'aval de 3 bassins d'infiltration possédant des ZNS peu épaisses ($ZNS < 3m$). Le présent chapitre a pour objectif d'étudier l'influence des principales caractéristiques des bassins (épaisseur de la ZNS et temps de transit de l'eau d'infiltration de la surface vers la nappe) sur les modifications de la composition des communautés bactériennes de la nappe associé aux épisodes de recharge, en considérant 6 bassins d'infiltration avec des ZNS contrastées.

L'impact des pratiques d'infiltration sur l'écosystème souterrain dépend en grande partie de la capacité de la ZNS à atténuer les modifications de la physico-chimie de la nappe associées aux épisodes de recharge (Foulquier et al., 2010 ; Voisin et al., 2020). Plusieurs études ont ainsi démontré une influence de l'épaisseur de la ZNS sur les modifications de concentrations en COD et en oxygène dissous de la nappe lors des épisodes de recharge (Pabish et al., 2001 ; Foulquier et al., 2010 ; Voisin et al., 2020). Malgré les liens existants entre les conditions physico-chimiques et la composition des communautés bactériennes, un nombre limité d'études se sont intéressés à l'influence de l'épaisseur de la ZNS sur les modifications de composition des communautés bactériennes des nappes associées aux pratiques d'infiltration (Voisin et al., 2018, 2020). Ces études ont néanmoins démontré un plus fort impact des épisodes de recharge sur la composition des communautés de la nappe lorsque la ZNS était peu épaisse ($< 3m$) que lorsque la ZNS était épaisse ($> 10m$). Ces résultats suggèrent alors qu'une ZNS suffisamment épaisse peut prévenir l'impact des pratiques d'infiltration sur la composition des communautés bactériennes de la nappe. Cependant, plusieurs études ont observé la présence de contaminants et de bactéries allochtones dans les aquifères séparés du milieu extérieur par des ZNS très épaisses ($ZNS > 20m$) (Pinasseau et al., 2019 ; Colin et al., 2020), ce qui suggère que l'impact de l'infiltration sur la composition des communautés bactériennes de la nappe ne dépend pas uniquement de l'épaisseur de la ZNS. Ces résultats peuvent être liés à l'hétérogénéité physique de la ZNS qui peut conduire à des vitesses d'écoulements contrastées, modifiant le temps de contact entre la ZNS et l'eau d'infiltration. En effet, un temps de contact court peut limiter la rétention des bactéries et/ou la dégradation des contaminants au sein de la ZNS. Voisin et al. (2018) ont ainsi suggéré que le temps de transit des eaux de surface aux eaux souterraines pourrait avoir une influence plus importante

que l'épaisseur de la ZNS sur le transfert de bactéries de la surface vers la nappe, ce qui peut impacter la composition des communautés bactériennes de la nappe. Malgré cela, aucune étude à ce jour n'a étudié l'influence du temps de transit sur les modifications de la composition des communautés bactériennes de la nappe associée aux pratiques d'infiltration d'eau pluviales. Ce deuxième chapitre a pour objectif d'étudier conjointement l'influence de l'épaisseur de la ZNS et du temps de transit sur les modifications de la composition des communautés bactériennes de la nappe associée aux pratiques d'infiltration. Pour cela, les ratios de diversité (Richesse, indice de Shannon et indice de diversité phylogénétique) ainsi que les dissimilarités entre les communautés de surface, des zones impactées et des zones non-impactées par les bassins ont été utilisés. Ces variables ont été obtenues à partir d'une approche avancée de caractérisation de la composition bactérienne (métabarcoding 16S et clusterisation en ASV – Voir 2-IV) permettant une description précise des communautés bactériennes des nappes in situ. Les concentrations en COD et en oxygène dissous ont également été mesurés afin de caractériser le lien entre les modifications de la physico-chimie et les modifications de la composition des communautés bactériennes de la nappe associées aux épisodes de recharge. Les résultats de ce chapitre mettent en évidence une influence du temps de transit sur les modifications de la composition des communautés bactériennes de la nappe induites par les épisodes de recharge alors qu'aucune influence de l'épaisseur de la ZNS n'a été observée. Un temps de transit court favorise ainsi l'augmentation de la diversité bactérienne (Richesse et indice de Shannon) associée aux épisodes de recharge. De plus, les communautés bactériennes de la zone impactée par les pratiques d'infiltration sont plus dissimilaires aux communautés de la zone non-impactée pour les temps de transit courts (Indices de Bray-Curtis et Unweighted UNIFRAC). On peut néanmoins noter que cette augmentation de diversité et de dissimilarité avec la diminution du temps de transit n'est pas observée lorsqu'on prend en compte la phylogénie (avec l'indice PD et Weighted UNIFRAC, respectivement), ce qui suggère que cette augmentation de diversité et de dissimilarité est associée à des ASV proches phylogénétiquement. Enfin, les dissimilarités entre les communautés de surface, des zones impactées et des zones non-impactées par les pratiques d'infiltration suggèrent une augmentation du transfert bactérien de la surface vers la nappe à mesure que le temps de transit diminue. Ce chapitre de thèse étant basé sur 2 épisodes de recharges similaires (associés à des événements pluvieux moyens), il serait intéressant de

considérer plusieurs épisodes de recharge contrastés dans la même étude afin de déterminer les influences respectives des épisodes de recharges (taux de recharge) et des caractéristiques des bassins sur les modifications de la microbiologie de la nappe associées aux pratiques d'infiltration d'eaux pluviales.

How do infiltration transit time and vadose zone thickness modulate the impact of SIS on groundwater bacterial communities?

1. Introduction

More than half of the population was living in urban areas in 2018 and this proportion is expected to increase up to 68.4% by 2050 (United Nations, 2019). This urban expansion clearly leads to changes in land uses and conversion from non-urban to urban areas is expected to double from 2020 to 2050 (Angel et al, 2011). Such urban expansion constitutes a major risk of urban flooding due to increased impervious surface coverage (Jacobson et al., 2011; Kaspersen et al., 2017). In addition, the sealing of urban surfaces alters the natural groundwater recharge by reducing rainfall infiltrations (Naik et al., 2008; Tam and Nga 2018). In this context, stormwater infiltration systems -SIS- (mainly infiltration basins) were designed to mitigate flood risk in urban areas and compensate for reduced groundwater recharge. (Masetti et al., 2016; Beganskas and Fisher, 2017). Despite the hydraulic performances of SIS, many studies showed an impact of SIS on groundwater quality (Pitt et al., 1999; Pinasseau et al., 2020; De Lambert et al., 2021). Stormwater runoffs concentrate a large variety of contaminants (nutrients, heavy metals, hydrocarbons, pathogens - Grebel et al., 2013; Gasperi et al., 2014) which can be transported to groundwater during stormwater infiltration through SIS (Weiss et al., 2008). In addition, chemical changes associated with stormwater infiltration have been shown to impact groundwater microbial communities and their potential roles in water purification processes (Griebler and Avramov, 2015; Winderl et al., 2008; Foulquier et al., 2011; Lebon et al., 2021). The impacts of SIS on groundwater physico-chemistry and microbiology largely depend on the ability of the vadose zone (also referred as unsaturated zone) to trap and / or remove the contaminants transported by infiltrating stormwater (Pabich et al., 2001; Holden et al., 2005; Rauch-Williams et al., 2010). For example, common urban contaminants like hydrocarbons or heavy metals have been shown to be efficiently retained in the topsoil of infiltration basins (Winiarski et al. 2006; Tedoldi et al., 2016). However, other contaminants such as organic matter (especially dissolved organic carbon - DOC) can reach the groundwater when the vadose

zone is not thick enough to retain the organic matter supplied by stormwater infiltration (Pabich et al., 2001; Datry et al., 2006). Thus, it has been observed an inverse relationship between vadose zone thickness (VZT) and DOC concentration reaching the aquifer (Datry et al., 2006; Foulquier et al., 2010a; Voisin et al., 2020).

Aquifers being C-limited heterotrophic environments, the thickness of the vadose zone strongly impacts the composition and diversity of groundwater microbial communities by modulating the supply of DOC infiltrating from the surface. For example, Voisin et al (2020) observed that the richness of groundwater prokaryotic communities increased below SIS, and that this increase was stronger for SIS with a thin vadose zone (mean +57%) than for SIS with a thick vadose zone (mean +23%). Thus, vadose zone thickness could modulate the impact of SIS on the composition and diversity of microbial communities in the aquifers.

In addition, VZT may strongly control oxygen dynamics and thus redox-sensitive biogeochemical processes in artificially recharged groundwater. Indeed, stormwater infiltrating from the surface can initially be depleted in dissolved oxygen (DO) by the intense microbial respiration occurring in the topsoil of SIS (Datry et al., 2003; Nogaro et al. 2007; McMahon and Chapelle 2008). However, this oxygen depletion can be subsequently compensated by a re-oxygenation of stormwater during its transfer through (partially) air-filled pore spaces of the vadose zone (Foulquier et al., 2010a; McMahon and Chapelle, 2008; Szymczycha et al., 2017). Consequently, the thickness of the vadose zone may influence the oxygenation of the stormwater reaching groundwater. For example, a thin vadose zone may lead to a temporary oxygen deficit in groundwater (Foulquier et al., 2010a; McMahon and Chapelle, 2008; Szymczycha et al., 2017). Associated changes in DO concentrations (depending on VZT) can modify the redox conditions in groundwater, which have been shown to influence the composition of microbial communities (e.g. Guo et al., 2019;). Thus, VZT could modulate the impact of SIS on DO concentration in groundwater and the associated microbial communities.

Besides its impact on groundwater DO and DOC concentrations, and microbial communities, the characteristics of the vadose zone may also influence the transfer of microorganisms from the surface to groundwater. Subsurface media (i.e., soil, vadose zone sediment) act as natural filter for microorganisms through several processes like physical filtration (attachment and deposition) and straining (Murphy and Ginn, 2000), which suggests that microbial transfer would be negatively correlated with VZT. Nevertheless, the presence of allochthonous microorganisms (e.g., fecal indicator microorganisms, bacterial pathogens or viruses from human, bacteria from domestic and industrial wastes) have been reported in aquifers protected by a vadose zone thicker than 10 m (Arnaud et al., 2015; Borchardt et al., 2007). These observations suggest that microbial transfer from surface to groundwater can occur and may depend on others features than the thickness of the vadose zone. In particular, the occurrence of preferential flows (e.g., macropore flow, flow paths induced by sediment heterogeneity) can reduce the travel time of infiltrating stormwater and therefore limit the capacity of the vadose zone to retain micro-organisms. Indeed, Voisin et al. (2018) reported that stormwater transit time was an important determinant of microbial transfers through SIS. A short transit time from surface to groundwater is thus expected to increase microbial contamination of the aquifer, and thus to increase the impact of SIS on groundwater community composition. As transit time is closely linked with the transport of water and solutes from the surface to groundwater, transit time is also expected to have an influence on groundwater DOC and DO concentrations (Drewes et al., 1999; Datry et al., 2006). Thus, a shorter transit time is expected to lead to an increase of DOC concentration in groundwater and an associated decrease in DO concentration (consumption by microbial respiration).

By modulating the consequences of stormwater runoff infiltration on groundwater ecosystems, VZT and transit time are expected to influence the physico-chemical conditions in the aquifer, the composition of groundwater microbial communities as well as the potential transfer of

surface microorganisms. However, no comprehensive study has yet determined which of these two factors was the most influential on groundwater physico-chemistry and microbiology. Therefore, the present study aims to fill this gap by assessing the influence of these two factors on groundwater physico-chemical and microbial modifications induced by SIS. In situ experiments were performed in six SIS over two experimental periods. A 16S rDNA metabarcoding approach was conducted to characterize in situ the composition and diversity of groundwater prokaryotic communities. The impacts of SIS were measured by comparing SIS-impacted and non-SIS-impacted zones in the aquifer. The impact of SIS on groundwater physico-chemistry (DOC and DO concentrations) is expected to decrease with VZT and transit time. The impact of SIS on groundwater prokaryotic communities (composition and diversity indices) is also expected to decrease with VZT and transit time.

2. Materials et methods

2.1. Study sites

In situ experiments were performed in SIS located in the highly permeable eastern aquifer of Lyon (hydraulic conductivity: 10^{-3} – 10^{-2} m.s⁻¹ – Foulquier et al., 2011) designed to collect and infiltrate stormwater runoff from residential, commercial, and/or industrial areas. To determine the influence of VZT and transit time on groundwater physico-chemistry and microbiology we selected six SIS expected to represent a wide range of VZT (from less than 3 meters to more than 20 meters according to Voisin et al. 2020 -Table S1): Grange Blanche (GB), Minerve (MIN), Campus of the University Lyon 1 (IUT), Django-Reinhardt (DJR), Feyzin (FEY) and Pesselière (PES).

These SIS are equipped along the groundwater flow paths with upstream and downstream piezometers for groundwater monitoring and assessment of SIS impact on groundwater. Samplings were conducted on each SIS in upstream and downstream piezometers which were considered as non-SIS-impacted (NSI) and SIS-impacted (SI) zones, respectively. In addition,

samplings were also performed at the surface of each SIS (plastic tanks collecting stormwater runoffs) to detect the potential microbial transfers from surface to groundwater.

2.2. Experimental design and sampling

Two experimental periods of 10 days were considered: in 2018 (from 26th of October to 5th of November 2018) and in 2019 (from 25th of April to 6th of May 2019). Each experimental period started with a rainfall event. The mean cumulative rainfalls (mm) were similar during these two experimental periods which were therefore considered as duplicates (November 2018: 60.9 mm \pm 2.86; April 2019: 55.9 mm \pm 2.97).

Groundwater (non-SIS-impacted and SIS-impacted zones) and surface stormwater runoff were sampled in triplicates three times during each experimental period (at t=3 days, t=6 days and t=10 days) to determine DO and DOC concentrations. As described in Lebon et al. (2021), groundwater sampling was performed with two distinct methods depending on the VZT. The Bou-Rouch method (Bou and Rouch, 1967) was used- for SIS with thin vadose zones (less than 10m), while an immersed electric pump was employed for SIS with thicker vadose zones (VZT>10m).

Microbial communities were collected in three locations (non-SIS-impacted zone, SIS-impacted zone and surface stormwater runoff) for each SIS and experimental period (2 experimental periods * 6 SIS * 3 locations * 3 replicates) using artificial substrates previously developed and tested by Voisin et al. (2016). They consisted in nylon mech bags (11.5 \times 4.5 cm, 3.3 mm mesh size, Sefar Nitex 06-3300/59, Sefar AG, Heiden) containing fifteen expanded clay beads having diameters comprised between 7.1 and 9 mm. Clay beads and nylon bags were systematically sterilized before each experiment. Artificial substrates were immersed the day before the beginning of the focal rainfall event and collected after 10 days of incubation (Voisin et al., 2016, 2018; Lebon et al., 2021).

2.3. DO and DOC analyses

Dissolved oxygen concentrations were measured immediately after groundwater sampling with optical sensor (PONSEL ODEON X Handheld Water Quality Meter).

Groundwater samples were filtered (0.7 µm Whatman™ GF/F filters, GE Healthcare, Boston, MA, USA) for subsequent analyses of DOC. Filtered samples were treated with hydrochloric acid (250 µL HCl 35%) for dissolved inorganic C removal and DOC concentrations were measured with a total carbon analyzer (multi-N/C 3100, Analytik Jena, Jena, Germany) based on sample combustion at 900°C and CO₂ stripping under O₂ flow.

For DO and DOC, mean concentrations over the three sampling dates (at 3, 6 and 10 days) were considered for a more integrative characterization of the physico-chemical conditions during each experimental period.

2.4. Composition and diversity of bacterial communities

Microbial communities developed on clay beads were sampled and returned to the laboratory in a cool box (around 10°C) where they were stored at -20°C until DNA extraction. Samples were processed independently for each experimental period. For the 108 samples (2 experimental periods * 6 SIS * 3 locations * 3 replicates), biofilm removal from artificial substrates was performed by shaking (2 min at 2500 rpm) the fifteen clay beads contained in each sample bag in 10 mL of a 0.8% NaCl solution. The resulting suspension was then filtered on a 0.2 µm pore size membrane (Whatman™ nuclepore polycarbonate track-etched membrane, GE Healthcare, Boston, MA, USA) to retrieve microbial cells. Microbial DNA was then extracted from the filter using the FastDNA™ Spin Kit for Soil according to manufacturer's instructions (MP Biomedicals, Irvine, CA, USA).

The V4-V5 hypervariable regions of the 16S gene were amplified using the primer pair 515F 5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3' (Caporaso et al. 2011) and 926R 5'-CCGYCAATTYMTTTRAGTTT-3' (Parada et al. 2016). A first PCR (PCR1) was performed in a 25 µl reaction volume, using ca. 20ng of gDNA. Thermal cycles were as follows: 95 °C for 3

min (95 °C for 30 s, 55 °C for 30 s, 72 °C for 1 min) 35 times, and 72 °C for 5 min. For each sample, PCR1 was replicated three times then the triplicated PCR products were pooled and purified using SPRIselect beads (Beckman coulter). A second PCR (using PCR1 as DNA template) with 15 cycles was performed for sample indexing (index + P5/P7 Illumina adaptors). All samples of a given experimental period were pooled in equimolar proportions, and sequenced on an Illumina MiSeq platform with 5% PhiX (Flow Cell V3, Paired-End 2 * 300 bp) by Biofidal (Vaulx-en-Velin, France). Due to insufficient sequencing depth, eight samples from the November 2018 experimental period were re-sequenced in another Illumina MiSeq run (same specifications and same platform). One sample (Feyzin, SI zone, replicate 1, Nov.2018) had to be removed from the dataset because of its insufficient sequencing depth, despite the resequencing. Raw read number per sample varied from 75,724 to 206,343 (Nov.2018) and from 97,152 to 301,535 (Apr.2019), except for PCR controls (respectively <7,732 and <19,612 reads).

Bioinformatic processing of the raw paired-end reads was performed with DADA2 R package (Callahan et al. 2016) to infer exact amplicon sequence variants (ASV) and their relative abundances. The main steps of the workflow were as follows: (1) Inspect read quality profiles (2) Filter and trim, (3) Learn the error rates, (4) Infer the ASV, (5) Merge paired reads, (6) Construct the ASV table, (7) Remove chimeras (8) Remove cross-contaminations (9) Assign taxonomy. Each experimental period was processed independently. As eight samples of the November 2018 period had to be resequenced, the two corresponding sequencing runs were processed in parallel (to infer the two relevant error models) until the step (6), then the two sequence tables were merged using the mergeSequenceTables function. During the step (2), the R1 and R2 reads of each sequencing run were trimmed according to read quality profiles, and the sequences of the forward and reverse primers were removed. For the November 2018 samples, R1 and R2 reads were trimmed at 290 and 210 bp respectively (except for the eight

resequenced samples, where both R1 and R2 reads were trimmed at 227 bp). For the April 2019 samples, R1 reads were trimmed at 240 and 210 bp respectively. An additional step (compared to Callahan et al. 2016) was added after the chimera removal for all samples (collected in November 2018 and April 2019): cross-contaminations were removed by discarding all ASV present in only one out of the three replicates per condition. Taxonomic assignment was performed using the Silva database (v138; Quast et al 2012). Finally, because of uneven sequencing depths, an abundance normalization (rarefaction) was performed by subsampling each sample to 16,774 and 29,172 sequences (i.e. the minimum number of sequences per sample after all filtering steps) for the November 2018 and April 2019 samples, respectively.

For each experimental period, the sequences of all ASV (n=2,640 and 3,274 for November 2018 and April 2019, respectively) were aligned (“AlignSeqs” function from the R package “DECIPHER” version 2.10.1; Wright, 2015) and the positions with gaps in 90% or more of the sequences were removed using trimAl (“-gt 0.1”, Capella-Gutiérrez et al. 2009). The phylogenetic tree of ASV was inferred by fitting a GTR + G + I (Generalized Time-Reversible with Gamma rate variation) maximum likelihood tree (built with a neighbor-joining tree as starting point) (phangorn R package; Schliep, 2011).

Alpha diversity was evaluated through the ASVs richness and the Shannon diversity index (R package “phyloseq”; McMurdie and Holmes, 2013). Faith's phylogenetic diversity indices were also calculated based on ASV abundance table and phylogenetic tree (R package “picante”, Kembel et al 2010). (Dis)similarities in composition (beta diversity) between the prokaryotic communities were evaluated through Bray-Curtis distances, and normalized Unweighted and Weighted unifrac distances (R package “phyloseq”; McMurdie and Holmes, 2013). For each SIS and location (NSI and SI zones, and surface stormwater runoff), the composition of prokaryotic communities was determined in triplicates. Thus, to assess the dissimilarity

between two locations (i.e. NSI - SI; SI - surface; NSI - surface), the nine corresponding pairwise distances were considered.

2.5. Assessment of vadose zone thickness and transit time

Vadose zone thickness (VZT) and transit time were assessed based on continuous monitoring (1-hour step basis) of groundwater level and electric conductivity using field probes LTC Levelogger® Junior, Solinst, Canada) in SIS-impacted wells of each SIS, combined with pluviometry data from Météo-France. The VZT was measured as the depth (in meters) between the soil and the groundwater table before rainfall events. The transit time was estimated as the time (in hours) between the rain peak and the peak of low-mineralised stormwater reaching the aquifer corresponding to the minimum electric conductivity in the SIS-impacted zone of the aquifer (Voisin et al., 2018).

2.6. Assessment of SIS impact on groundwater physico-chemistry and microbiology

Impacts of SIS on groundwater physico-chemistry and microbiology were determined as the ratio of the SI zone over the NSI zone, for each SIS and each experimental period. These ratios were calculated for DO and DOC concentrations, and for the alpha diversity indices (ASV richness, Shannon index, phylogenetic diversity). Values greater than 1 indicated that SIS increased the studied variable.

Impact of SIS on the composition of groundwater prokaryotic communities was assessed through dissimilarity indices calculated between non-SIS impacted and SIS impacted zones. In addition, to assess a potential transfer of bacteria from the surface to groundwater during stormwater infiltration, we defined a “Transfer index” based on dissimilarity indices (Bray Curtis, Unifrac distances) between surface and groundwater (NSI and SI zones) communities:

$$\text{Transfer index: } \frac{\text{"SI-Surface distance"}}{\text{"NSI-Surface distance"}}$$

A ratio closes to 0 indicates a strong potential for bacterial transfer from the surface to the water table (low dissimilarity between Surface and SI zones). Inversely, a ratio closes to 1 indicates a

low potential for bacterial transfer from the surface to the water table (high dissimilarity between Surface and SI zones, and high dissimilarity between Surface and NSI zones).

2.7. Statistical analyses

Linear regressions were used to assess whether SIS characteristics (VZT and the transit time) modulated physico-chemical (DO, DOC) and bacterial (alpha and beta diversity indices, transfer index) modifications induced by SIS. For these analyses, VZT and transit time variables were \log_{10} -transformed to satisfy the normality assumption (verified by Shapiro's test). DOC and DO ratios, as well as alpha diversity, beta diversity and transfer indexes were $\log(1+x)$ - transformed to satisfy the normality assumption (verified by Shapiro's test).

In addition, non-metric multidimensional scaling (NMDS) based on the Bray-Curtis dissimilarities were performed to visualize similarity/dissimilarity in bacterial community composition among studied sites and locations (infiltration basins, non-SIS-impacted and SIS-impacted zones of the aquifer).

3. Results and discussion

3.1. VZT and transit time

VZT and transit time were comparable in 2018 and 2019 experimental periods, except for the transit time in FEY infiltration basin which increased from 63 hours to 132 hours between November 2018 and April 2019 (Table 1). The experimental design allowed to test a wide range of VZT and transit time conditions. VZT varied from around 2 meters to 21 meters and transit time varied from around 4 (IUT) to more than 270 hours (GB). Short transit times (<14h) were reported in IUT and MIN infiltration basins whereas other infiltration basins exhibited long transit times (>60 hours).

Linear regression analyses showed that VZT and transit time were not significantly correlated (Figure 1; $R^2= 0.06$; $p\text{-value}=0.42$). SIS with a VZT higher than 10 meters (DJR, FEY, PES) were systematically characterized by a transit time longer than 60 hours, *i.e.* comprised between

69 and 98 hours, while SIS with a VZT less than 4 meters were characterized by extremely variable transit times. In these SIS, transit time varied from less than 5 hours (IUT) to more than 250 hours (GB) probably due to large differences in hydraulic permeability between the bed of these two infiltration basins (as observed by Nogaro et al., 2009 in laboratory experiments).

Table 1. Main characteristics of the studied SIS.

SIS	Vadose zone thickness (m)	Transit time (h)
Grange Blanche (GB) 2018-2019	2.24±0.05	275± 27.0
Minerve (MIN) 2018-2019	3.76±0.05	14.03± 1.85
IUT 2018-2019	3.59±0.25	4.38± 0.62
Django -Reinhardt (DJR) 2018-2019	20.18±0.12	80.05± 4.55
Chemin de Feyzin (FEY) 2018-2019	20.99±0.11	97.5± 34.50
Pesselières (PES) 2018-2019	12.99±0.09	68.59± 2.58

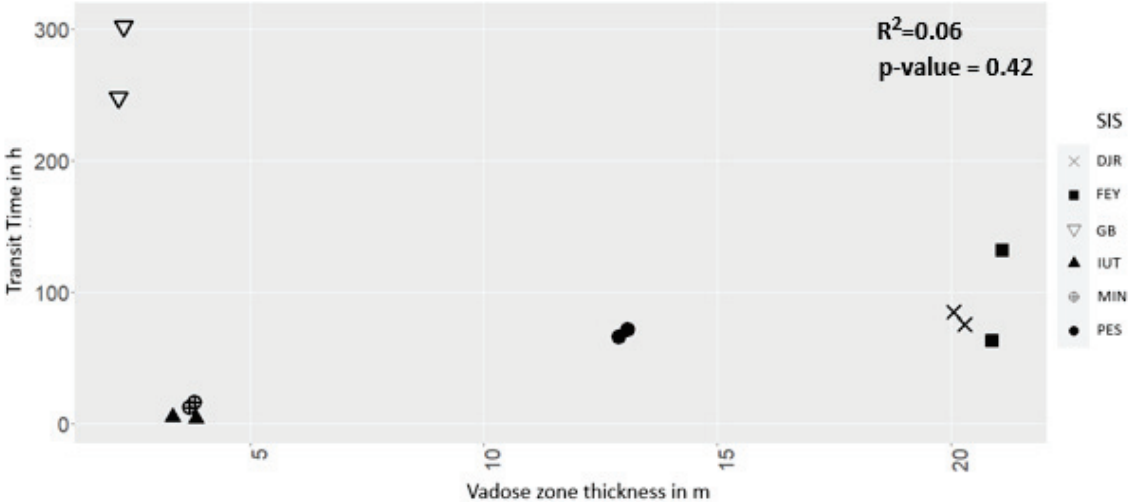


Figure 1. Biplots of transit time (h) and vadose zone thickness (m) for the two experiments and the 6 stormwater infiltration systems (SIS) (n=12): Django-Reinhardt (DJR), Feyzin (FEY), Grange-Blanche (GB), IUT, Minerve (MIN) and Pesselière (PES).

3.2. *Influence of SIS characteristics on groundwater physico-chemistry*

Linear regression analyses were used to assess whether SIS characteristics (VZT and transit time) modulated physico-chemical changes (DO, DOC) in groundwater impacted by SIS. As ratios in physico-chemistry between SIS-impacted (SI) and non SIS-impacted (NSI) zones of the aquifer were used to estimate these changes, values greater than 1 indicated that SIS increased the concentrations of DO or DOC.

The impact of SIS on DOC concentrations in groundwater (i.e. intensity of increase or decrease) varied strongly among the two experimental periods and the six studied sites. (Figure 2A-B). In contrast, DO ratios remained around 1 at the exception of values obtained from one infiltration basin (IUT) where increases in DO concentrations were observed in groundwater between the non-SIS-impacted and SIS-impacted zones of the aquifer (Figure 2C-D). Interestingly, this infiltration basin was characterized by a thin vadose zone (< 4 meters) and by the shortest transit time (< 4 hours). Linear regressions did not highlight significant correlation between DOC modifications and VZT or transit time. However, the highest enrichments in DOC concentration due to stormwater infiltration were measured for the IUT infiltration basin characterized by the shortest transit times. This result suggests that the retention of DOC supplied with stormwater runoff was linked to the contact time between infiltrated stormwater and the vadose zone. Thus, rapid infiltration (short water transit time between surface to groundwater) led to a low retention of DOC in the vadose zone and a groundwater enrichment of DOC by SIS. Several studies (Datry et al., 2005; McMahon and Chapelle, 2008; Pabich et al., 2001, Voisin et al. 2020) showed a significant impact of vadose zone thickness on DOC retention through the vadose zone as the retention time of infiltrated water in vadose zone classically increases with its thickness. However, we showed that the water transit time from surface to groundwater determining the DOC retention in the vadose zone was a more

functional indicator of DOC dynamics during stormwater infiltration than vadose zone thickness.

Linear regressions revealed that DO modifications induced by SIS were not consistently correlated with VZT (Figure 2C; $R^2=0.09$; $p\text{-value}=0.33$). However, a marginally significant ($0.05 < p\text{-value} < 0.10$) and negative correlation was detected with transit time (Figure 2D; $R^2=0.32$; $p\text{-value}=0.054$). As expected, shorter was the transit time, higher was the increase in DO concentration measured in groundwater impacted by SIS.

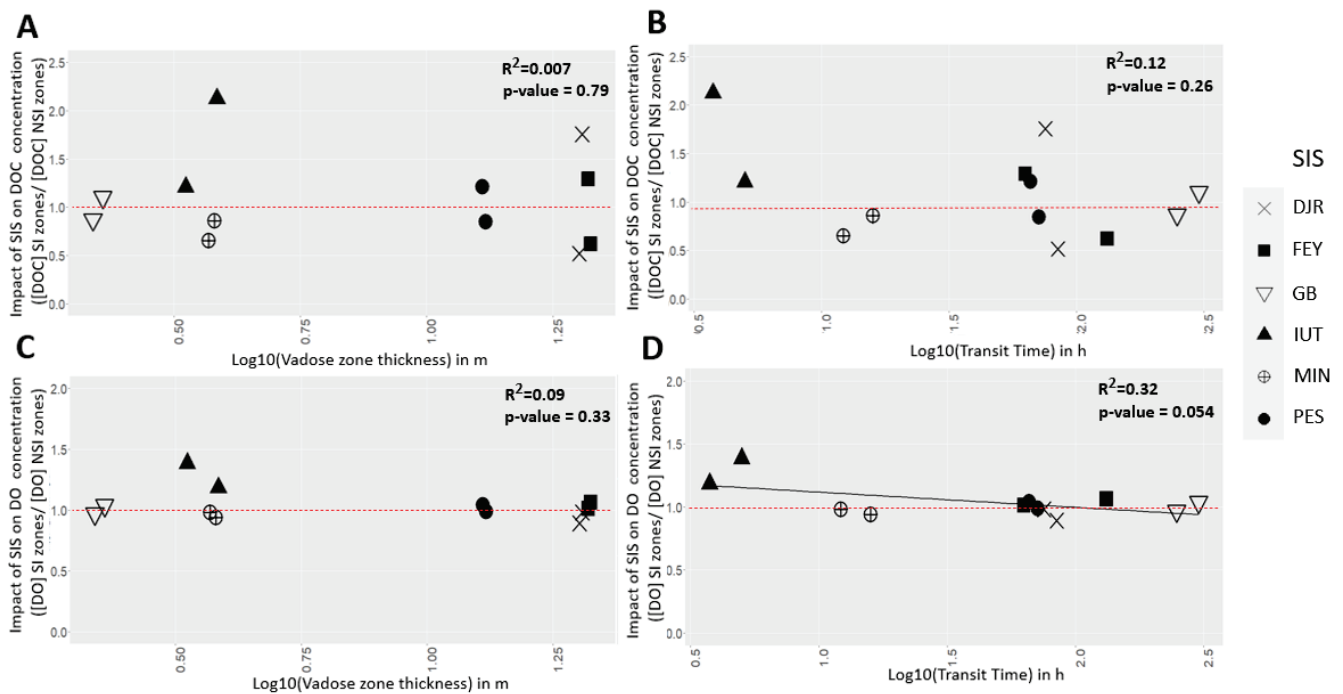


Figure 2. Left panel: influence of VZT on DOC (A) and DO (C) ratios. Right panels: influence of transit time on DOC (B) and DO (D) ratios. VZT (meters) and transit time (hours) were log_{10} -transformed. Values less than 1 on the Y-axis indicate that stormwater infiltration systems reduced DO or DOC concentrations in groundwater. Statistics displayed on the graphs (R^2 , p -values) correspond to linear regressions performed on $\log(1+x)$ – transformed ratios. VZT = Vadose zone thickness. DJR = Django-Reinhart; FEY = Feyzin; GB = Grange-Blanche; MIN = Minerve; PES = Pesselière.

3.3. *Influence of SIS characteristics on alpha diversity indices*

Overall, alpha diversity differences / changes (ASV Richness, Shannon and phylogenetic diversity indices) between non-SIS-impacted and SIS impacted zones revealed a positive effect of SIS on these indices: ratios SI/NSI were higher than 1 in around 80% of the samples.

Linear regressions showed that alpha diversity (ASV richness, Shannon diversity and phylogenetic diversity) increases due to SIS were not mediated by the VZT (Figure 3A-C-E). Similarly, phylogenetic diversity index increases were not influenced by the transit time (Figure 3F). However, influence of SIS on richness and Shannon index tended to decrease with the transit time, although correlations were not significant (Figure 3B; $R^2=0.20$ and $p\text{-value}=0.14$ for richness; Figure 3D; $R^2=0.24$ and $p\text{-value}=0.10$ for Shannon index). As expected, shorter was the transit time, higher was the increase in alpha diversity (ASV richness and Shannon indices) in groundwater bacterial communities impacted by SIS.

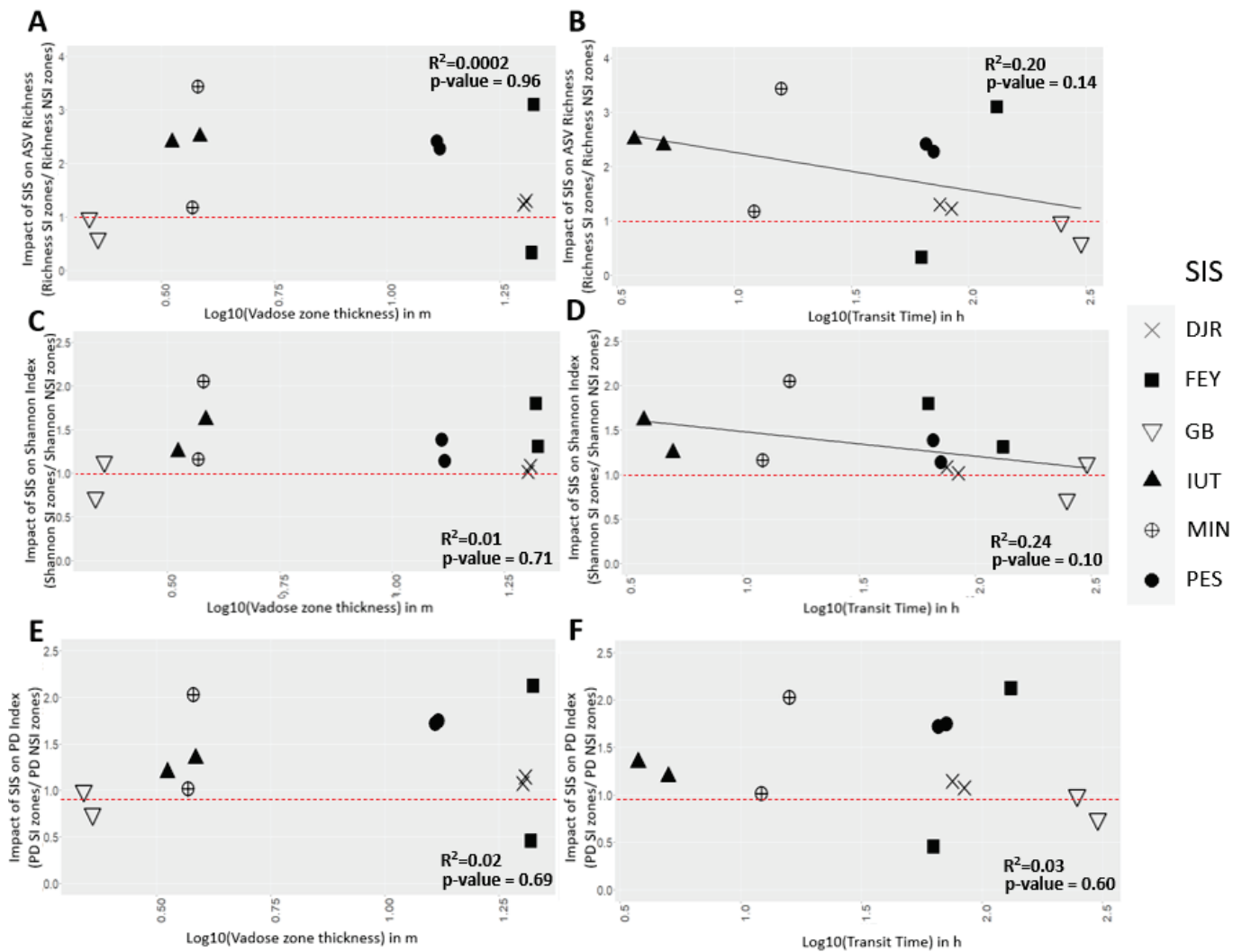


Figure 3. Left panel: influence of VZT on ASV richness (A), Shannon index (C) and phylogenetic diversity (E). Right panels: influence of transit time on ASV richness (B), Shannon index (D) and phylogenetic diversity (F). VZT (meters) and transit time (hours) were log₁₀-transformed. Values less than 1 on the Y-axis indicate that stormwater infiltration systems reduced alpha diversity in groundwater. Statistics displayed on the graphs (R², p-values) correspond to linear regressions performed on log(1+x) – transformed ratios. VZT = Vadose zone thickness. DJR = Django-Reinhart; FEY = Feyzin; GB = Grange-Blanche; MIN = Minerve; PES = Pesselière.

3.4. Influence of SIS characteristics on bacterial community composition (beta diversity)

NMDS plot based on Bray-Curtis distances (Figure 4) showed a clustering pattern of bacterial communities related to their sampling locations (2 groups). Bacterial communities sampled in surface locations formed a distinct group whereas NMDS plot did not highlight a clear separation between groundwater communities sampled NSI and SI zones. However, NMDS revealed a tendency for higher similarities (*i.e.* shorter distances) between SI and surface

communities than between NSI and surface communities, indicating that SIS impacts on groundwater communities were related to potential bacterial transfers from the surface to the groundwater or to physico-chemical changes due to the arrival of stormwater in the aquifer. Interestingly, NMDS plot suggested that bacterial transfers preferentially occurred in infiltration basins characterized by short transit times. Indeed, bacterial communities sampled in SI zones of IUT and MIN infiltration basins (transit time: 4 and 14 hours, respectively) were the closest to those sampled in surface runoff.

Bray-Curtis dissimilarities between NSI and SI communities varied from 0.3 up to 0.9 (mean \pm SD: 0.71 ± 0.15) (Figure 5A-B), indicating varying differences in terms of ASV presence and abundances between SIS-impacted and non-SIS impacted communities depending on studied sites and dates. Similar dissimilarities between NSI and SI communities were also observed when phylogenetic relationships among ASV were considered using unweighted (mean \pm SD: 0.55 ± 0.08 , Figure 5C-D) and weighted Unifrac distances (mean \pm SD: 0.16 ± 0.05 , Figure 5E-F).

Linear regression analyses showed that none of the measures of dissimilarity between SIS-impacted and non-SIS impacted communities (Bray-Curtis, unweighted and weighted Unifrac distances) was correlated with VZT (Figure 5A-C-E). In contrast, NSI-SI Bray-Curtis dissimilarities tended to decrease with transit time (marginally significant correlation; Figure 5B; $R^2=0.22$, p -value=0.13): shorter was the transit time, higher was the difference in bacterial community composition (relative abundances of ASV) between NSI and SI zones. However, when the phylogenetic relationships among ASV were also considered (weighted Unifrac distances; Figure 5F), the difference between SIS-impacted and non-SIS impacted communities did not correlate with the transit time (Figure 5F; $R^2=0.03$, p -value=0.58). This discrepancy suggests that the increased difference between NSI and SI communities under short transit time (observed with Bray-Curtis distances, Figure 5B) was driven by phylogenetically-close ASV.

Interestingly, when phylogenetic relationships among ASV were considered but not their relative abundances (unweighted Unifrac distances based on presence/absence; Figure 5D), NSI-SI dissimilarities correlated negatively with transit time ($R^2=0.30$, $p\text{-value}=0.06$), indicating that the ‘phylogenetic composition’ of NSI and SI communities increasingly diverged (eg. ASV specific to SI or NSI) when the transit time decreased. However (as stated above), this correlation was not observed when the relative abundances and phylogenetic relationships of ASV were considered (weighted Unifrac distances, Figure 5F). This suggests that the increased difference between NSI and SI communities under short transit time (observed with unweighted Unifrac distances, Figure 5D) was driven by ‘zone-specific’ (i.e. specific to NSI or SI zones) low-abundance ASV. This is interesting because an ASV transferred from the surface to the SIS-impacted groundwater would be specific to the communities sampled in the SI zones (i.e. contributing to unweighted Unifrac distance between NSI and SI communities, especially if it is phylogenetically distant from the other ASV), but would likely be present in low abundance in SIS-impacted groundwater (i.e. contributing poorly to weighted Unifrac distance). Thus, an increase of bacterial transfer from the surface to SIS-impacted groundwater under short transit time could, at least partly, could explained the patterns observed in Figure 5. Overall, these results suggested that the impact of SIS on groundwater bacterial communities was not driven by the VZT. However, we showed that a short transit time of infiltrating stormwater tended to increase the impact of SIS, i.e. the difference between NSI and SI communities, but that this difference was likely driven by low-abundance and/or phylogenetically-close ASV.

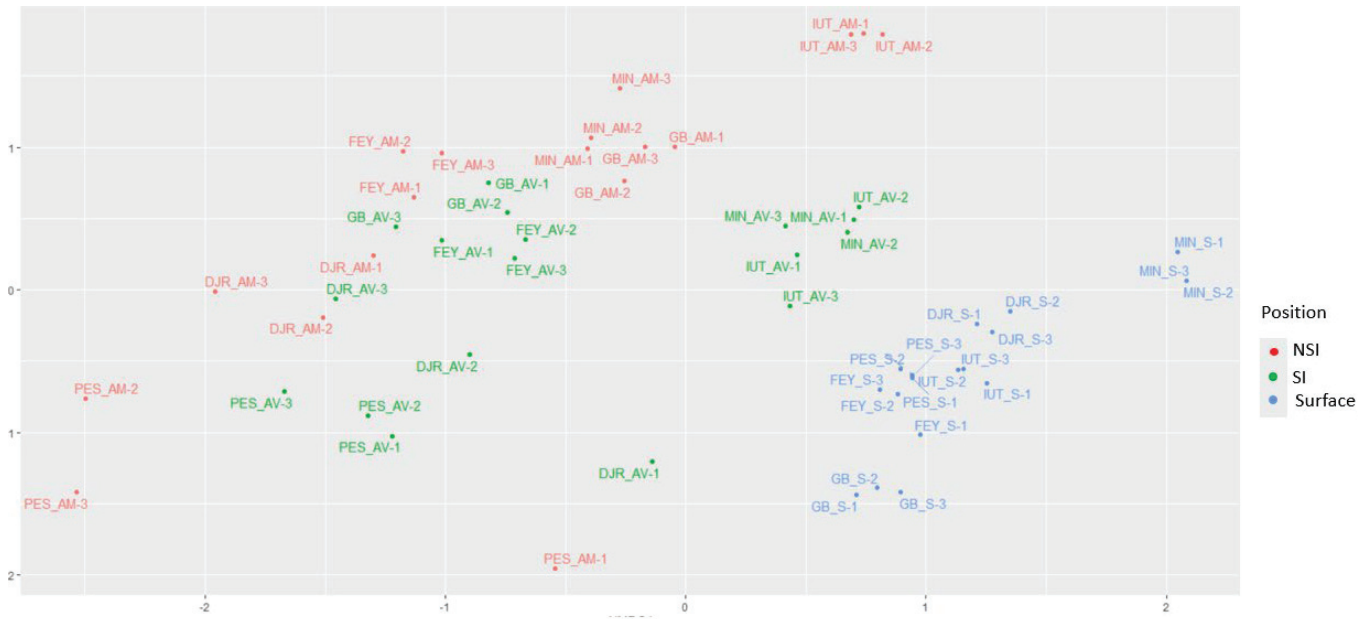


Figure 4. NMDS of bacterial community composition in the three studied locations: Non-SIS-impacted (NSI - red points), SIS-impacted (SI - green points) and surface (blue points) over six SIS in 2019. SIS = Stormwater infiltration system.

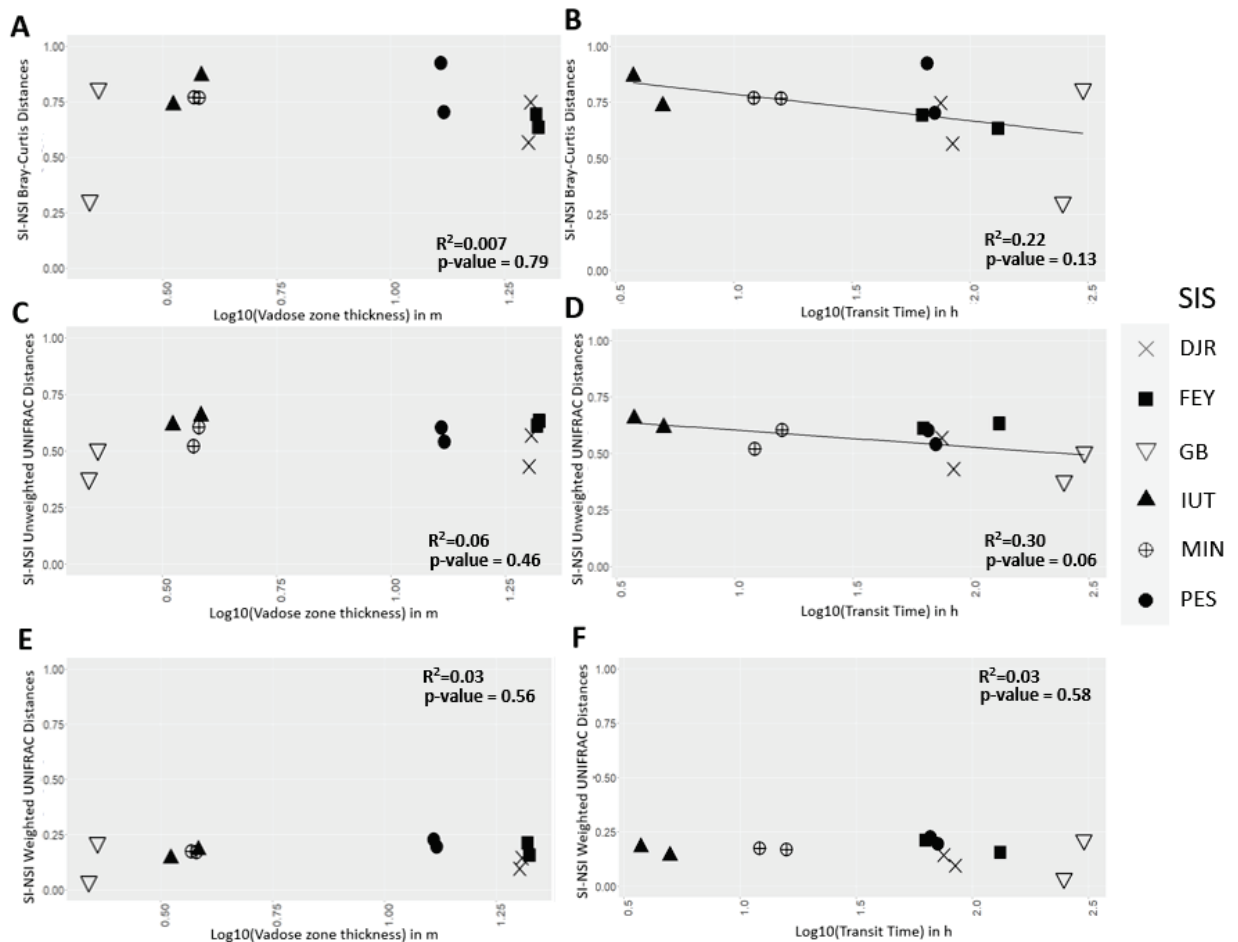


Figure 5: Left panels: influence of VZT on Bray-Curtis (A), unweighted (C) and weighted unifrac (E) distances. Right panels: influence of transit time (h) on Bray-Curtis (B), unweighted (D) and weighted unifrac (F) distances. VZT (meters) and transit time (hours) were log₁₀-transformed. Statistics displayed on the graphs (R², p-values) correspond to linear regressions performed on log (1+x) – transformed distances. DJR = Django-Reinhart; FEY = Feyzin; GB = Grange-Blanche; MIN = Minerve; PES = Pesselière.

3.5. Influence of SIS characteristics on potential transfer from the surface to the groundwater

NMDS analyses based on Bray-Curtis distances revealed that bacterial communities tend to be more similar between stormwater runoffs (surface) and SIS-impacted groundwater than between stormwater runoffs and non-impacted groundwater communities, suggesting that SIS impacts on bacterial community compositions could be partly due to bacterial transfer from the surface to the groundwater. To further examine the influence of bacterial transfer on the composition of bacterial community in SIS-impacted zones, we calculated a transfer index.

Transfer index was lower than 1 for almost all the samples (more than 80%) indicated potential bacterial transfers from stormwater runoff (surface) to SIS impacted groundwater (Figure 6). Contrary to our expectations, the prevalence of bacterial transfers did not seem to be limited in infiltration basins characterized by thicker vadose zones. However, a significant increase of transfer index was observed with transit time increasing (Bray-Curtis SI-surface transfer index: Figure 6B, R²=0.47, pvalue=0.01; Unweighted-UNIFRAC SI-surface transfer index: Figure 6D, R²=0.48, pvalue=0.01; Weighted-UNIFRAC SI-surface transfer index: Figure 6F, R²=0.63, pvalue=0.002, respectively): shorter transit times seemed to favour bacterial transfer from surface runoffs to groundwater.

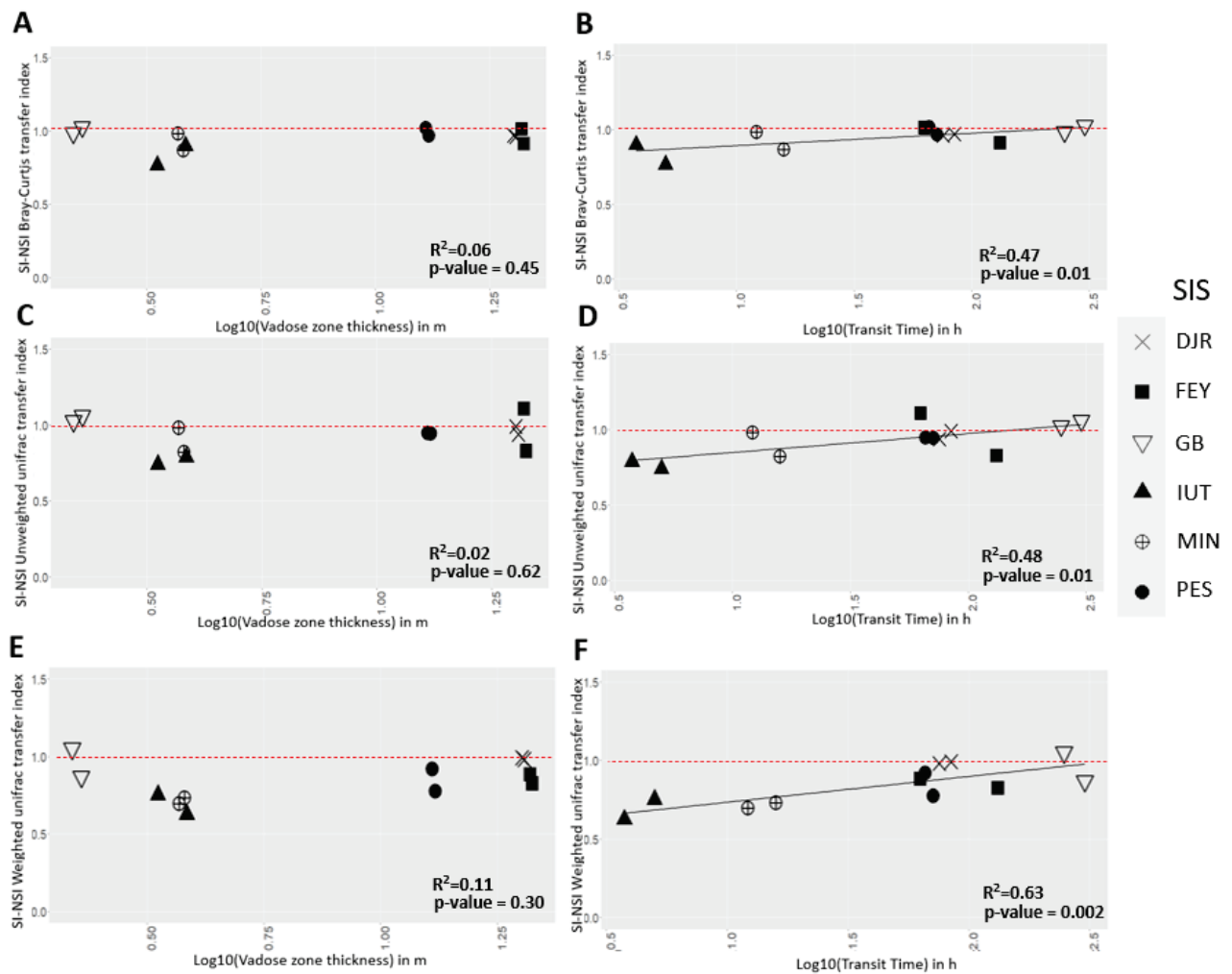


Figure 6. Left panels: influence of VZT on Bray-Curtis (A), unweighted (C) and weighted unifrac (E) transfer indexes. Right panels: influence of transit time (h) on Bray-Curtis (B), unweighted (D) and weighted unifrac (F) transfer indexes. VZT (meters) and transit time (hours) were log₁₀-transformed. A transfer index close to 1 indicates a low potential for bacterial transfer from the surface to the groundwater. This index decreases with the potential for bacterial transfer. Statistics displayed on the graphs (R^2 , p-values) correspond to linear regressions performed on log (1+x) – transformed ratios. DJR = Django-Reinhart; FEY = Feyzin; GB = Grange-Blanche; MIN = Minerve; PES = Pesselière.

Overall, the present study highlighted those changes in groundwater bacterial communities induced by stormwater infiltration basins were more dependent on the water transit time from basins to groundwater table than on vadose zone thickness. However, as transit time influenced both physico-chemistry and bacterial communities in groundwater, we cannot conclude about the respective roles of (1) physico-chemical changes and (2) bacterial transfer from surface to groundwater induced by stormwater infiltration practice on microbial modifications measured

in groundwater. Further experiments and specific analyses (e.g. source tracker approach, Scott et al. 2002; Colin et al. 2020) are clearly needed to disentangle the roles of these two processes (physico-chemical changes and microbial transfer) on groundwater microbiology impacted by stormwater infiltration practices.

References

Angel, S., Parent, J., Civco, D. L., Blei, A., & Potere, D., 2011. The dimensions of global urban expansion: Estimates and projections for all countries, 2000–2050. *Progress in Planning*, 75(2), 53-107. <https://doi.org/10.1016/j.progress.2011.04.001>

Arnaud, E., Best, A., Parker, B. L., Aravena, R., & Dunfield, K., 2015. Transport of *Escherichia coli* through a thick vadose zone. *Journal of Environmental Quality*, 44(5), 1424-1434. <https://doi.org/10.2134/jeq2015.02.0067>

Barba, C., Folch, A., Sanchez-Vila, X., Martínez-Alonso, M., & Gaju, N., 2019. Are dominant microbial sub-surface communities affected by water quality and soil characteristics? *Journal of Environmental Management*, 237, 332-343. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.02.079>.

Beganskas, S., and Fisher, A. T., 2017. Coupling distributed stormwater collection and managed aquifer recharge: Field application and implications. *Journal of Environmental Management*, 200, 366-379. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.05.058>.

Bou, C., Rouch, R., 1967. Un nouveau champ de recherches sur la faune aquatique souterraine. *CR Acad Sci* 265, 369–370.

Borchardt, M. A., Bradbury, K. R., Gotkowitz, M. B., Cherry, J. A., & Parker, B. L., 2007. Human enteric viruses in groundwater from a confined bedrock aquifer. *Environmental science & technology*, 41(18), 6606-6612. <https://doi.org/10.1021/es071110>

Callahan, B. J., McMurdie, P. J., & Holmes, S. P., 2017. Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *The ISME journal*, 11(12), 2639-2643. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.119>

Capella-Gutiérrez, S., Silla-Martínez, J. M., & Gabaldón, T., 2009. trimAl: a tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses. *Bioinformatics*, 25(15), 1972-1973. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp348>

Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Huntley, J., Fierer, N., ... & Knight, R., 2012. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *The ISME journal*, 6(8), 1621-1624. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.8>

Colin, Y., Bouchali, R., Marjolet, L., Marti, R., Vautrin, F., Voisin, J., Bourgeois, E., Rodriguez-Nava, V., Blaha, D., Winiarski, T., Mermillod-Blondin, F., Cournoyer, B., 2020. Coalescence of bacterial groups originating from urban runoffs and artificial infiltration systems among aquifer microbiomes. *Hydrol. Earth Syst. Sci. Discuss.* 1–28. <https://doi.org/10.5194/hess-2020-39>

Datry, T., Malard, F., Vitry, L., Hervant, F., Gibert, J., 2003. Solute dynamics in the bed sediments of a stormwater infiltration basin. *J. Hydrol.* 273, 217–233. [https://doi.org/10.1016/S0022-1694\(02\)00388-8](https://doi.org/10.1016/S0022-1694(02)00388-8).

Datry, T., Malard, F., Gibert, J., 2005. Response of invertebrate assemblages to increased groundwater recharge rates in a phreatic aquifer. *J. North Am. Benthol. Soc.* 24, 461–477. <https://doi.org/10.1899/04-140.1>

Datry, T., Malard, F., & Gibert, J., 2006. Effects of artificial stormwater infiltration on urban groundwater ecosystems. In *Urban groundwater management and sustainability*. pp. 331-345. Springer, Dordrecht. [10.1007/1-4020-5175-1_27](https://doi.org/10.1007/1-4020-5175-1_27)

De Lambert, J. R., Walsh, J. F., Scher, D. P., Firnstahl, A. D., & Borchardt, M. A., 2021. Microbial pathogens and contaminants of emerging concern in groundwater at an urban subsurface stormwater infiltration site. *Science of the Total Environment*, 775, 145738. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145738>

Drewes, J. E., & Fox, P., 1999. Fate of natural organic matter (NOM) during groundwater recharge using reclaimed water. *Water Science and Technology*, 40(9), 241-248. [https://doi.org/10.1016/S0273-1223\(99\)00662-9](https://doi.org/10.1016/S0273-1223(99)00662-9)

Foulquier, A., Malard, F., Mermillod-Blondin, F., Datry, T., Simon, L., Montuelle, B., & Gibert, J., 2010 (a). Vertical change in dissolved organic carbon and oxygen at the water table region of an aquifer recharged with stormwater: biological uptake or mixing? *Biogeochemistry*, 99(1), 31-47. <https://doi.org/10.1007/s10533-009-9388-7>.

Foulquier, A., Mermillod-Blondin, F., Malard, F., & Gibert, J., 2011. Response of sediment biofilm to increased dissolved organic carbon supply in groundwater artificially recharged with stormwater. *Journal of Soils and Sediments*, 11(2), 382-393. <https://doi.org/10.1007/s11368-010-0323-2>.

Gasperi, J., Sebastian, C., Ruban, V., Delamain, M., Percot, S., Wiest, L., Mirande, C., Caupos, E., Demare, D., Diallo Kessoo Kessoo, M., Saad, M., Schwartz, J. J. , Dubois, P., Fratta, C., Wolff, H., Moilleron, R., Chebbo, G., Cren, C., Millet, M., Barraud, S. & Gromaire, M. C., 2014. Micropollutants in urban stormwater: occurrence, concentrations, and atmospheric contributions for a wide range of contaminants in three French catchments. *Environmental*

Science and Pollution Research, 21(8), 5267-5281. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-2396-0>.

Grebel, J. E., Mohanty, S. K., Torkelson, A. A., Boehm, A. B., Higgins, C. P., Maxwell, R. M., Nelson, Kara L. & Sedlak, D. L., 2013. Engineered infiltration systems for urban stormwater reclamation. *Environmental Engineering Science*, 30(8), 437-454. <https://doi.org/10.1089/ees.2012.0312>.

Griebler, C., & Avramov, M., 2015. Groundwater ecosystem services: a review. *Freshwater Science*, 34(1), 355-367. <https://doi.org/10.1086/679903>.

Guo, L., Wang, G., Sheng, Y., Shi, Z., & Sun, X., 2019. Groundwater microbial communities and their connection to hydrochemical environment in Golmud, Northwest China. *Science of the Total Environment*, 695, 133848. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.133848>

Holden, P. A., & Fierer, N., 2005. Microbial processes in the vadose zone. *Vadose Zone Journal*, 4(1), 1-21. <https://doi.org/10.2113/4.1.1>.

Jacobson, C. R., 2011. Identification and quantification of the hydrological impacts of imperviousness in urban catchments: A review. *Journal of environmental management*, 92(6), 1438-1448. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2011.01.018>

Kaspersen., S, P., Høegh Ravn, N., Arnbjerg-Nielsen, K., Madsen, H., & Drews, M., 2017. Comparison of the impacts of urban development and climate change on exposing European cities to pluvial flooding. *Hydrology and Earth System Sciences*, 21(8), 4131-4147. <https://doi.org/10.5194/hess-21-4131-2017>

Kembel et al., 2010. Package 'picante.'

Lebon, Y., Navel, S., Moro, M., Voisin, J., Cournoyer, B., François, C., Volatier, L., and Mermillod-Blondin, F., 2021. Influence of stormwater infiltration systems on the structure and the activities of groundwater biofilms: Are the effects restricted to rainy periods? *Science of The Total Environment*, 755, 142451. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142451>.

Masetti, M., Pedretti, D., Sorichetta, A., Stevenazzi, S., & Bacci, F., 2016. Impact of a stormwater infiltration basin on the recharge dynamics in a highly permeable aquifer. *Water Resources Management*, 30(1), 149-165. <https://doi.org/10.1007/s11269-015-1151-3>.

McMahon, P.B., and Chapelle, F.H., 2008. Redox processes and water quality of selected principal aquifer systems. *Ground Water* 46:259–271. <https://doi.org/10.1111/j.1745-6584.2007.00385.x>.

McMurdie, P.J., Holmes, S., 2013. Phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PloS One* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>

Murphy, E. M., & Ginn, T. R., 2000. Modeling microbial processes in porous media. *Hydrogeology Journal*, 8(1), 142-158. <https://doi.org/10.1007/s100409900043>

Naik, P. K., Tambe, J. A., Dehury, B. N., & Tiwari, A. N., 2008. Impact of urbanization on the groundwater regime in a fast growing city in central India. *Environmental Monitoring and Assessment*, 146(1), 339-373. <https://doi.org/10.1007/s10661-007-0084-6>.

Nogaro, G., Mermillod-Blondin, F., Montuelle, B., Boisson, J.-C., Bedell, J.-P., Ohannessian, A., Volat, B., Gibert, J., 2007. Influence of a stormwater sediment deposit on microbial and biogeochemical processes in infiltration porous media. *Sci. Total Environ.* 377, 334–348. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.01.093>

- Nogaro, G., & Mermillod-Blondin, F., 2009. Stormwater sediment and bioturbation influences on hydraulic functioning, biogeochemical processes, and pollutant dynamics in laboratory infiltration systems. *Environmental science & technology*, 43(10), 3632-3638. <https://doi.org/10.1021/es8030787>
- Pabich, W. J., Valiela, I., & Hemond, H. F., 2001. Relationship between DOC concentration and vadose zone thickness and depth below water table in groundwater of Cape Cod, USA. *Biogeochemistry*, 55(3), 247-268. <https://doi.org/10.1023/A:1011842918260>.
- Parada, A. E., Needham, D. M., & Fuhrman, J. A., 2016. Every base matters: assessing small subunit rRNA primers for marine microbiomes with mock communities, time series and global field samples. *Environmental microbiology*, 18(5), 1403-1414. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13023>
- Pinasseau, L., Wiest, L., Volatier, L., Mermillod-Blondin, F., & Vulliet, E., 2020. Emerging polar pollutants in groundwater: Potential impact of urban stormwater infiltration practices. *Environmental Pollution*, 266, 115387. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115387>.
- Pitt, R., Clark, S., & Field, R., 1999. Groundwater contamination potential from stormwater infiltration practices. *Urban Water*, 1(3), 217-236. [https://doi.org/10.1016/S1462-0758\(99\)00014-X](https://doi.org/10.1016/S1462-0758(99)00014-X).
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., Glöckner, F.O., 2012. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 41, D590–D596. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>
- Rauch-Williams, T., Hoppe-Jones, C., & Drewes, J. E., 2010. The role of organic matter in the removal of emerging trace organic chemicals during managed aquifer recharge. *Water Research*, 44(2), 449-460. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.08.027>.

- Schliep, K.P., 2011. phangorn: phylogenetic analysis in R. *Bioinformatics* 27, 592–593. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq706>
- Scott, T. M., Rose, J. B., Jenkins, T. M., Farrah, S. R., & Lukasik, J., 2002. Microbial source tracking: current methodology and future directions. *Applied and environmental microbiology*, 68(12), 5796-5803. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.12.5796-5803.2002>
- Smith, M., Cross, K., Paden, M., Laban, P., 2016. Spring–managing Groundwater Sustainably. IUCN, Gland Switz <https://doi.org/10.2305/IUCN.CH.2016.WANI.8.en>.
- Szymczycha, B., Kroeger, K. D., Crusius, J., & Bratton, J. F., 2017. Depth of the vadose zone controls aquifer biogeochemical conditions and extent of anthropogenic nitrogen removal. *Water Research*, 123, 794-801. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.06.048>
- Tam, V. T., & Nga, T. T. V., 2018. Assessment of urbanization impact on groundwater resources in Hanoi, Vietnam. *Journal of Environmental Management*, 227, 107-116. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.08.087>.
- Tedoldi, D., Chebbo, G., Pierlot, D., Kovacs, Y., & Gromaire, M. C., 2016. Impact of runoff infiltration on contaminant accumulation and transport in the soil/filter media of sustainable urban drainage systems: A literature review. *Science of the Total Environment*, 569, 904-926. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.04.215>.
- United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division, 2019. *World Urbanization Prospects: The 2018 Revision (ST/ESA/SER.A/420)*. New York: United Nations.
- Voisin, J., Cournoyer, B., Marjolet, L., Vienney, A., & Mermillod-Blondin, F., 2020. Ecological assessment of groundwater ecosystems disturbed by recharge systems using organic matter quality, biofilm characteristics, and bacterial diversity. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(3), 3295-3308. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06971-5>.

Voisin, J., Cournoyer, B., Vienney, A., & Mermillod-Blondin, F., 2018. Aquifer recharge with stormwater runoff in urban areas: Influence of vadose zone thickness on nutrient and bacterial transfers from the surface of infiltration basins to groundwater. *Science of the Total Environment*, 637, 1496-1507. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.094>.

Weiss, P. T., LeFevre, G., & Gulliver, J. S., 2008. Contamination of soil and groundwater due to stormwater infiltration practices, a literature review.

Winderl, C., Schaefer, S., Lueders, T., 2007. Detection of anaerobic toluene and hydrocarbon degraders in contaminated aquifers using benzylsuccinate synthase (bssA) genes as a functional marker. *Environ. Microbiol.* 9, 1035–1046. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01230.x>

Winiarski, T., Bedell, J. P., Delolme, C., & Perrodin, Y., 2006. The impact of stormwater on a soil profile in an infiltration basin. *Hydrogeology Journal*, 14(7), 1244-1251. <https://doi.org/10.1007/s10040-006-0073-9>.

Wright ES (2015). "DECIPHER: harnessing local sequence context to improve protein multiple sequence alignment". *BMC Bioinformatics*, doi:10.1186/s12859-015-0749-z.

5

INFLUENCES RESPECTIVES DES CARACTÉRISTIQUES DES BASSINS ET DES FLUX D'EAU INFILTRÉS SUR LES CHANGEMENTS DE LA BIOMASSE ET DES ACTIVITÉS MICROBIENNES ASSOCIÉES AUX PRATIQUES D'INFILTRATION DES EAUX DE RUISSELLEMENT PLUVIALES

Ce chapitre a pour objectif principal d'étudier les influences respectives de l'épaisseur de la ZNS, du temps de transit de l'eau d'infiltration de la surface à la nappe et du taux de recharge sur les modifications de la biomasse et des activités microbiennes de la nappe associées aux pratiques d'infiltration. Le présent chapitre est composé d'un article scientifique (soumission prévue au printemps 2022) s'appuyant sur 6 périodes expérimentales de 10 jours caractérisées par des taux de recharge contrastés et sur 5 bassins d'infiltration possédant des épaisseurs de ZNS et des temps de transit contrastés.

L'impact des pratiques d'infiltration sur la microbiologie de la nappe dépend de la capacité de la ZNS à piéger et dégrader les contaminants contenus dans l'eau d'infiltration. Avant ce travail de thèse, les études traitant de l'influence des caractéristiques des bassins sur les modifications de la microbiologie de la nappe associée aux pratiques d'infiltration étaient centrées sur l'influence de l'épaisseur de la ZNS. Le chapitre 4 de cette thèse nous a permis de mettre en évidence une plus grande influence du temps de transit sur les modifications de la composition des communautés bactériennes associées aux pratiques de recharge que l'épaisseur de la ZNS. Cependant, on peut également s'attendre à ce que l'événement pluvieux considéré module l'impact de la recharge sur la microbiologie de la nappe. En effet, les caractéristiques de l'événement pluvieux considéré (cumul de pluie et intensité de l'épisode) déterminent le taux de recharge de la nappe. Ce dernier peut moduler l'impact de la recharge sur la microbiologie de la nappe en exerçant une influence sur les flux de nutriments (Schmidt et al., 2011 ; Gorski et al., 2020) ainsi que sur la remobilisation de nutriments au sein de la ZNS (Legout et al., 2009; Rühle et al., 2014). Ainsi, on peut s'attendre à ce que l'impact de la recharge sur la microbiologie de la nappe soit d'autant plus important que le taux de recharge est important (Stegen et al., 2016 ; Fillinger et al. 2019). Malgré l'influence des caractéristiques des bassins et de l'événement pluvieux considéré sur les modifications de la microbiologie de la nappe associée aux pratiques d'infiltration, aucune étude à ce jour n'a considéré simultanément l'influence de l'épaisseur de la ZNS, du temps de transit et du taux de recharge sur la réponse microbiologique de la nappe à l'infiltration.

L'objectif principal de cet article est alors de déterminer les influences respectives des principales caractéristiques des bassins (épaisseur de la ZNS, temps de transit) et du taux de recharge sur la microbiologie de la nappe. Afin de déterminer les influences respectives de ces facteurs, 6 périodes expérimentales de 10 jours caractérisées par des taux de recharge

contrastés ainsi que 5 bassins d'infiltration possédant des épaisseurs de ZNS et des temps de transit contrastés ont été considérés. Pour chaque bassin et période expérimentale, les impacts des bassins ont été évalués sur la physico-chimie (NO_3^- , PO_4^{3-} et COD) et la microbiologie (biomasse, activités microbiennes) des nappes. Cette étude met en évidence l'influence des caractéristiques des bassins et du taux de recharge sur les modifications physico-chimiques et microbiologiques de la nappe associées aux pratiques d'infiltration. Une relation inverse entre l'épaisseur de la ZNS et les concentrations en PO_4^{3-} dans la nappe a ainsi été observée, probablement associée à l'influence de l'épaisseur de la ZNS sur les conditions d'oxygénation de la nappe lors des épisodes de recharge. Les résultats de cette étude confirment le lien entre le temps de transit et l'enrichissement de la nappe en COD associé aux épisodes de recharge observés dans le chapitre précédent : un temps de transit court diminue l'efficacité de l'effet filtre assuré par la ZNS, ce qui favorise un enrichissement de la nappe en COD lors des épisodes de recharge. Cet enrichissement en COD a alors pour conséquence une augmentation de la biomasse qui est d'autant plus importante que le temps de transit est court. Une stimulation des activités microbiennes avec le taux de recharge a également été observée. On peut supposer que le taux de recharge lors des événements pluvieux a augmenté les flux d'eau et de solutés dans la nappe, stimulant l'activité des biofilms microbiens. Enfin, le grand nombre d'épisodes de recharge étudiés nous a permis d'observer une inhibition de la biomasse et des activités dans certains cas, ce qui peut être lié à un phénomène de dilution ou bien un apport de contaminants. Des études complémentaires sont alors nécessaires afin de mieux comprendre la réponse des communautés microbiennes aux pratiques d'infiltration, et plus particulièrement d'identifier les facteurs qui jouent un rôle dans l'inhibition des biofilms.

Aquifer recharge by stormwater infiltration basins: influences of vadose zone thickness, water transit time through vadose zone and groundwater recharge rate on nutrients and microbiology in groundwater

Authors:

Yohan Lebon^{a,b}, Clémentine François^b, Simon Navel^b, Félix Vallier^b, Ludovic Guillard^b, Pinasseau Lucie^b, Laurent Oxarango^c, Laurence Volatier^a, Florian Mermillod-Blondin^{b*}

^a Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, ENTPE, UMR 5023 LEHNA, F-69518, Vaulx-en-Velin, France

^b Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, ENTPE, UMR5023 LEHNA, F-69622 Villeurbanne, France

^c Univ. Grenoble Alpes, CNRS, IRD, Grenoble INP, IGE, 38000 Grenoble, France

* Corresponding author

E-mail address: florian.mermillod-blondin@univ-lyon1.fr (F. Mermillod-Blondin)

ABSTRACT

Stormwater infiltration systems (SIS) are designed to collect and infiltrate urban stormwater runoff into the ground for flood risk mitigation and artificial aquifer recharge. Many studies have demonstrated that infiltration practices can impact groundwater chemistry and microbiology. However, the evaluation of the main factors associated to SIS characteristics and recharge rate explaining these environmental impacts remains restricted to studies based on a limited number of SIS and/or rain events. The present study aimed to fill this gap by studying five SIS over six experimental periods characterized by contrasted meteorological conditions to test whether modifications of groundwater chemistry and microbiology induced by SIS were linked to two main factors associated with SIS (vadose zone thickness, water transit time from surface to groundwater) and one factor associated with groundwater recharge rate (assessed by groundwater table elevation during rain events). To evaluate modifications in chemistry (NO_3^- , PO_4^{3-} and dissolved organic carbon concentrations) associated with SIS, groundwater samples were collected in wells located in SIS-impacted and non-SIS-impacted zones of the five SIS during experimental periods of 10 days. During the same periods, clay beads were incubated in the same wells to measure modifications of groundwater microbial biofilms (microbial biomass, dehydrogenase and hydrolytic activities) induced by SIS. Results showed that changes in PO_4^{3-} supplied to groundwater during stormwater infiltration was negatively correlated with vadose zone thickness whereas changes in dissolved organic carbon was negatively correlated with the transit time of water from surface to groundwater). As the retention of the dissolved organic carbon in vadose zone depended on the contact time between infiltrated stormwater and the porous media, a short water transit time from surface to groundwater increased dissolved organic concentrations in the aquifer which, in turn, increased biofilm biomasses in groundwater. The groundwater recharge rate during rain events (assessed by groundwater table elevation) diluted NO_3^- concentrations in the aquifer as this nutrient was more concentrated in

groundwater than in infiltrated stormwater. Modifications of biofilm activities by SIS were also correlated with groundwater table elevations during rain events. We can suppose that groundwater recharge rate during rain events increased fluxes of water and solutes in groundwater, stimulating the activity of microbial biofilms. The present study highlighted that the three tested factors (vadose zone thickness, stormwater transit time from surface to groundwater and groundwater recharge rate) significantly influenced the impact of SIS on chemistry and/or microbiology of groundwater. Based on these conclusions, it is possible to make recommendations about the implementation of infiltration basins in urban area to limit the impact of SIS on groundwater ecosystems.

Keywords: infiltration basin, aquifer recharge, water transit time from surface to groundwater, groundwater table elevation, biofilm biomass, microbial activity, stormwater runoff

1. Introduction

Urban areas host 55% of the world's population, a proportion that is expected to increase to 66% by 2050 (United Nations, 2019). One of the major landscape modifications associated with urbanization is an increase in the impervious surface coverage (Arnold and Gibbons, 1996). The sealing of urban surfaces alters the natural water cycle by increasing stormwater runoff during rainfall events thereby generating urban flooding and reducing groundwater recharge (Mays 2013; Naik et al., 2008; Tam and Nga 2018). Stormwater management practices have been developed for 30 years in many countries to limit surface runoff and to compensate for reduced groundwater recharge (Marsalek and Chocat, 2002; Dechesne et al., 2005; Hunt et al., 2010; Natarajan and Davis, 2015; Masetti et al, 2016; Beganskas and Fisher, 2017). The practices, based on stormwater infiltration systems –SIS- (mainly infiltration basins), were mainly designed for hydrological purposes with the main objective to ensure the rapid infiltration of water drained from a given catchment area during stormwater rainfalls (Grebel et al., 2013). However, infiltrated urban stormwater can also be a major source of pollution for groundwater ecosystems with contaminants like heavy metals, hydrocarbons, pathogens, and nutrients (nitrogen, phosphorus, dissolved organic matter) (Pitt et al., 1999; Grebel et al., 2013; Gasperi et al., 2014; Mermillod-Blondin et al. 2015; Colin et al., 2020). For groundwater resource protection, it is therefore crucial to evaluate the environmental performance of stormwater infiltration systems.

The environmental efficiencies of aquifer recharge practices such as soil aquifer treatment (Amy and Drewes, 2007) or riverbank filtration (Kuehn and Mueller, 2000) have been evaluated for the removal of nutrients (Dillon et al., 2010; Vanderzalm et al., 2013), the degradation of organic chemicals (Rauch-Williams et al., 2010) or the dynamics of microorganisms (Levantesi et al., 2010; Barba et al., 2019; Fillinger et al., 2021). The environmental performance of these practices mainly depends on the ability of the soil and the

sedimentary environment to retain and metabolize contaminants during their transfer in/to the aquifer (Pabich et al., 2001; Holden and Fierer, 2005; Bekele et al., 2011; Tedoldi et al., 2016; Avishai et al., 2017). In “soil aquifer treatment” systems like stormwater infiltration systems (SIS, see Supplementary Material 1), many authors (e.g., Datry et al., 2004; Foulquier et al., 2010a) reported the crucial importance of the vadose zone (zone between the land surface and the top of the groundwater table) for the protection of the aquifer against contaminants associated with infiltrated urban stormwater. Biotic (microbial processes, Marschner and Kalbitz 2003; Shen et al. 2015) and abiotic (sorption on clay particles, soil organic matter, or/and Fe and Al oxides/hydroxides, McKnight et al. 1992; Kalbitz et al. 2000; Saidy et al. 2013) soil components are likely involved in the retention efficiency of the vadose zone. Consequently, the thicker the vadose zone, the more efficient a SIS should be to limit groundwater contamination with organic and inorganic compounds. Therefore, it has been demonstrated that SIS can enrich groundwater with dissolved organic carbon (DOC) and nutrients like orthophosphate when the vadose zone was not thick enough to retain the organic matter contained in stormwater runoff (Pabich et al. 2001; Datry et al. 2005; Voisin et al., 2020). As groundwater ecosystems are commonly carbon-limited (Malard and Hervant, 1999; Hofmann and Griebler, 2018), these increased DOC concentrations in the aquifer due to SIS can have significant ecological consequences by stimulating microbial biomass and metabolism (Starr and Gillham, 1993; Siemens et al., 2003; Mermillod-Blondin et al., 2013; Voisin et al., 2020). Thus, vadose zone thickness is recognized as a main factor mediating the impact of SIS on the chemistry and microbiology of groundwater ecosystems.

Nevertheless, the physical heterogeneity of the vadose zone that could lead to preferential flow paths can call into question the main influence of vadose zone thickness on SIS environmental performance (Goutaland et al., 2013; Slimene et al., 2015). By influencing the transit time of the infiltrating stormwater from the basin surface to the groundwater table, the physical

heterogeneity of the vadose zone may play a key role on groundwater quality (Vías et al., 2010; Andres and Sims, 2013). For example, Voisin et al. (2018) reported that the transit time from surface to groundwater might have more influence on groundwater microbiology than the vadose zone thickness because preferential flow paths could promote the transfer of nutrients through the vadose zone and limit the efficiency of trapping and metabolizing mechanisms occurring in vadose zone. Consequently, the transit time of water from surface to groundwater could be a more functional parameter than the thickness of the vadose zone to evaluate the retention processes occurring in the vadose zone. Thus, the environmental performance of the SIS would be positively correlated with the transit time of stormwater from surface to the aquifer through infiltration basins.

Besides these two main characteristics of SIS (vadose zone thickness and water transit time through the vadose zone), the response of groundwater ecosystems to aquifer recharge was also expected to differ depending on the groundwater recharge rate during rain events (Owor et al., 2009; Foulquier et al., 2010b; Wang et al., 2015; Lebon et al., 2021). Thus, evaluating the environmental performance of SIS on microorganisms needs to consider the recharge rate of stormwater effectively entering into the aquifer during rain events. Indeed, groundwater recharge rate has direct influence on dissolved nutrient fluxes (Dobson et al., 2007; Jost et al., 2015; Legout et al., 2009; Rühle et al., 2015) and can also remobilize nutrients accumulated in the vadose zone (Gao et al., 2006; Zhuang et al., 2009), two mechanisms that could stimulate the activities of groundwater microbial communities (Lebon et al., 2021).

Although the impacts of SIS on groundwater chemistry and microbiology are expected to depend on SIS characteristics (thickness of the vadose zone, transit time from surface to groundwater) and the groundwater recharge rate during rain events, no study tried yet to evaluate conjointly the significance of these three factors on SIS impacts. The present study

aims at filling this gap by considering simultaneously the vadose zone thickness, the transit time of water from infiltration basins to groundwater and the groundwater recharge rate during rain events (assessed by groundwater table elevation during rain events, Healy and Cook, 2002; Labrecque et al., 2020) as most probable factors driving the impacts of SIS on groundwater chemistry and microbiology. To determine the significance of these factors on chemical and microbial modifications under realistic conditions, field experiments were performed in five SIS over six experimental periods of 10 days characterized by contrasted groundwater recharge rates due to rain events. For each SIS and experimental period, the impacts of SIS were assessed on groundwater chemistry (dissolved nutrients NO_3^- , PO_4^{3-} and DOC) and microbiology (biofilm biomass, dehydrogenase and hydrolytic activities). Microbial variables were measured on biofilms developed on artificial substrates incubated in groundwater during the experimental periods (10 days). Based on previous studies (Foulquier et al. 2010a, Voisin et al. 2020, Lebon et al. 2021), it was possible to state hypotheses about how SIS characteristics (vadose zone thickness and/or water transit time from surface to groundwater) and groundwater table elevations associated with groundwater recharge determine the impacts of SIS on groundwater chemistry and microbiology. Yet, it has been observed that the measured impacts of SIS on nutrient concentrations and microbial biomass in groundwater were related to SIS characteristics (vadose zone thickness, Voisin et al., 2020) whereas the impact of SIS on groundwater microbial activities depended on meteorological conditions (Lebon et al., 2021). Consequently, we hypothesized that SIS characteristics (vadose zone thickness and/or water transit time) would be stronger determinants of SIS impacts on groundwater chemistry and microbial biomass than groundwater recharge rate. More precisely, the impact of SIS on these chemical and microbial variables would be inversely correlated with the vadose zone thickness and/or the transit time of stormwater from surface to groundwater table. At the opposite, groundwater recharge rates would be stronger determinants of the impact of SIS on microbial

activities in the aquifer than SIS characteristics, i.e. the stimulations of the microbial activities would be positively correlated with the groundwater table elevations during rain events.=

2. Materials et methods

2.1. Study sites

Studied stormwater infiltration systems (SIS) were located in highly permeable glaciofluvial sediments (hydraulic conductivity: 10^{-3} – 10^{-2} m.s⁻¹ – Foulquier et al., 2009) of the eastern aquifer of Lyon, France (Supplementary material 1). The five selected SIS covered a wide range of vadose zone thickness (from 1.9 to 20.8 m, Table 1). To cover a wide range of groundwater recharge rates (and associated groundwater table elevations) among SIS, we selected basins with surfaces varying from 0.09 to 0.87 ha and collecting stormwater runoff from catchment areas varying from 2.5 to 315 ha (Table 1). Each SIS was equipped with an upstream well and a downstream well along the groundwater flow (Supplementary material 1). The downstream well was located in the SIS-impacted zone of the aquifer because it intersects the plume of infiltrated runoff water occurring in the aquifer during rain events (Bahar et al., 2021). The upstream well was located outside of the plume of infiltrated runoff water (non-SIS-impacted zone of the aquifer). Based on this dedicated equipment, it was possible to evaluate the impact of each SIS on chemical and microbiological groundwater variables by comparing data obtained from SIS-impacted and non-SIS-impacted (reference) zones of the aquifer.

Table 1. Main characteristics of the five studied stormwater infiltration systems (SIS). The mean vadose zone thickness presented in this table corresponds to the mean +/- SD measured on each SIS (see 2.3 and 2.4) for the six experimental periods.

SIS	Mean vadose zone thickness over the six experimental periods (m)	Infiltration surface (ha)	Catchment area (ha)
Grange Blanche (GB)	1.94±0.60	0.32	300
Minerve (Min)	3.68±0.20	0.42	165
IUT (IUT)	3.60±0.18	0.09	2.50
Django Reinhardt (DjR)	19.9±0.48	0.87	185
Chemin de Feyzin (Fey)	20.8±0.49	0.25	315

2.2. Experimental periods

Six experiments of 10 days were performed to evaluate the impact of groundwater recharge rate on groundwater chemistry and microbiology (Table 2). These six 10-day periods were characterized by widely contrasted cumulative rainfalls and maximum rain intensities (Table 2). The experimental period of September 2015 was characterized by the highest cumulative rainfall and rain intensity whereas the experimental period of December 2017 presented more than 3-fold lower cumulative rainfall and intensity (Table 2). The three other rainy experimental periods (November 2018, April 2019, November 2019) were characterized by intermediate rain intensities and cumulative rainfalls (Table 2). In addition, a dry period in August 2016 has been also considered as a control period without groundwater recharge. This selection of widely contrasted rain event characteristics (associated with contrasted SIS characteristics) was particularly important to identify the influence of stormwater infiltration on chemistry and groundwater biofilms.

Table 2. For each 10-day period considered in this study, cumulative rainfall (mm) and maximum rain intensity (mm/h) as mean +/- SD measured on the five SIS.

Period	Cumulative rainfall (mm) during the 10-day experiment	Maximum hourly rain intensity (mm/h) during the experiment
September 2015	94.4±3.80	15.0±1.51
August 2016	0	0
December 2017	38.55±0.55	4.00±0.49
November 2018	61.0±3.28	4.80±0.28
April 2019	53.5±3.56	8.80±1.26
November 2019	66.3±1.22	6.53±0.46

2.3. Monitoring and sampling of groundwater and microbial biofilms

To evaluate factors associated with SIS characteristics (vadose zone thickness and transit time of water from surface to groundwater) and groundwater recharge rate (groundwater table elevations), electric conductivity (EC) and groundwater table level were monitored on a 1 h step basis with field probes (LTC Levellogger® Junior, Solinst, Canada) in non-SIS-impacted and SIS-impacted wells of all SIS from January 2015 to December 2019. During each experimental period of 10 days, groundwater (50 cm below groundwater table) was sampled at three occasions in non-SIS-impacted and SIS-impacted zones of each SIS to evaluate the influence of SIS on nitrate (NO_3^-), orthophosphate (PO_4^{3-}) and DOC concentrations. While stormwater runoff are poorly loaded with NO_3^- which is the predominant source of inorganic nitrogen in groundwater for the sampled sites (Voisin et al. 2018), PO_4^{3-} and DOC are mainly

supplied by stormwater runoff and can contaminate groundwater due to SIS practices (Datry et al., 2005; Mermillod-Blondin et al., 2015). Groundwater samplings were performed with the Bou-Rouch method (Bou and Rouch, 1967) for SIS with thin vadose zone (< 5 m) and with an immersed electric pump for SIS with a thick (> 5m) vadose zone (see Voisin et al. 2020 for details). Groundwater samples (1 L) were stored at 4 °C during travel back to laboratory and analyzed within 24 h for inorganic nutrients (NO_3^- and P-PO_4^{3-}). For assessing the biomass and the activities of microbial biofilms, expanded clay beads (clay beads having diameters between 7.1 and 9 mm and previously sterilized by heating to 1200 °C in a rotary kiln) were used as artificial substrates for sampling microorganisms in groundwater following previous studies (Voisin et al., 2016, 2020; Mermillod-Blondin et al., 2019). Three replicated artificial substrates (i.e. three nylon mesh bags containing thirty expanded clay beads each) were incubated in each well (non-SIS-impacted/SIS-impacted) of each SIS for the experimental period of ten days (starting just before the rain event). The rationale for a ten-day incubation period was that (1) it was long enough to develop microbial communities which are representative of biofilms developing in the aquifer (see Voisin et al., 2016 and Mermillod-Blondin et al., 2019) and (2) it corresponded to the duration of the impact induced by stormwater runoff infiltration in the aquifer (duration of electric conductivity decrease in the aquifer, Figure 1A). At the end of the artificial substrate incubation, the clay beads from each bag were collected and randomly split into three subsets to perform the three microbial analyses (i.e. biomass; hydrolytic activity; dehydrogenase activity). For each analysis, five clay beads were used per bag and the three replicated bags allowed to obtain three replicated analyses in non-SIS-impacted and in SIS-impacted zones of each SIS at each period.

2.3.1. Chemical analyses

Groundwater samples were filtered (0.7 µm pore size Whatman™ GF/F filters, GE Healthcare, Boston, MA, USA) to remove particles. Nitrate (N-NO₃⁻) and orthophosphate (P-PO₄³⁻) were measured following standard colorimetric methods, using an automatic analyzer (Smartchem 200, AMS Alliance, Frépillon, France). DOC concentration was measured with a total carbon analyzer (multi-N/C 3100, Analytik Jena, Jena, Germany) based on sample combustion at 900 °C and CO₂ stripping under O₂ flow, after removal of dissolved inorganic C with hydrochloric acid (250 µL HCl 35%).

2.3.2. Microbial biomass

Total protein content was used as a proxy of microbial biomass developed on clay beads during the experimental period of 10 days. The analysis was performed according to the protocol of Peterson (1977) described in Voisin et al. (2016). Briefly, five clay beads were treated with 2 mL of ultrapure water and 2 mL of Lowry's reagent (Sigma Protein Assay Kit P-5656, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) for 20 min under stirring to improve contact between bead surfaces and the reagent. Then, 0.5 mL of Folin reagent was added and a colored reaction developed for 30 min in the dark at 15 °C. The final solution was filtered (0.7 µm pore size Whatman™ GF/F filters, GE Healthcare, Boston, MA, US) to remove particles before the measurement of its optical density at 750 nm with a spectrophotometer (Aquamate, ThermoSpectronic, Cambridge, UK). In parallel, a calibration curve was performed with BSA standards (bovine serum albumin lyophilized powder ≥96%, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, US) to convert optical densities into total protein content. Finally, total protein content was related to bead surface (see Lebon et al., 2021 for details) and corrected by results obtained from controls (sterile clay beads) to express microbial biomass in µg of protein per cm².

2.3.3. Microbial activities

The impact of SIS on microbial activities was assessed by measuring hydrolytic and respiratory activities of biofilms developed on clay beads.

Hydrolytic activity of the biofilm was estimated using the hydrolysis of fluorescein diacetate (FDA, 3,6-diacetyl-fluorescein), a compound which can be hydrolyzed by a wide spectrum of non-specific extracellular and membrane-bound enzymes such as esterases, proteases, and lipases (Fontvieille et al., 1992). Thus, FDA hydrolysis is considered as a good proxy of hydrolytic activity involved in hydrolysis of high-molecular-weight organic compounds into smaller molecules which are available for microbial uptake. For each incubated bag, five clay beads were incubated with 3 ml of a phosphate buffer solution (pH = 7.6) and 0.1 mL of FDA solution (10 mg of FDA dissolved in 6 mL of acetone and 4 mL of ultrapure water) at 15 °C in the dark until a green coloration occurred (fluorescein production) (Voisin et al., 2018). Three mL of acetone were added to stop the incubation. Then, the supernatant was filtered to remove particles (0.7 µm pore size Whatman™ GF/F filters, GE Healthcare, Boston, MA, USA) and the optical density of the filtrate was measured at 490 nm with a spectrophotometer (Aquamate, ThermoSpectronic, Cambridge, UK). Optical density was then converted into hydrolytic activity expressed in quantity of FDA hydrolyzed per hour and cm² of clay bead surface (µmol FDA.h⁻¹.cm⁻²) following the equation reported in Lebon et al. (2021). In the same way as for microbial biomass analyses, the hydrolytic activity was corrected by subtracting results obtained from control samples (sterile clay beads).

Respiratory activity was assessed by measuring the activity of intracellular enzymes (dehydrogenase) involved in electron transfer processes, as a proxy of biofilms metabolic activities (e.g., Mermillod-Blondin et al. 2005). Measurements were performed using the reduction rate of 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl tetrazolium chloride (INT) into INT-formazan (Hourri-Davignon et al., 1989). For each sample, five clay beads were incubated

in the dark at 15 °C with 0.1 mL of INT solution (20.2 mg of INT diluted in 1 mL of methanol) and 4 mL of filtered groundwater (0.2 µm pore size Whatman™ nuclepore polycarbonate membrane, GE Healthcare, Boston, MA, USA) collected from the well where clay beads were incubated. Following the same incubation times than those performed for hydrolytic activity, the dehydrogenase activity was stopped by adding 0.5 mL of formaldehyde at 37%. Then, an extraction of accumulated INT-formazan (light red coloration) in cells was performed. For each incubated sample, supernatants were filtered with 0.2 µm pore size membrane (Whatman™ nuclepore polycarbonate membrane, GE Healthcare, Boston, MA, USA) to collect free microbial cells and the filtrate was discarded. Filters were then put back in glass flasks containing the clay beads and 4 mL of methanol were added to start the extraction of INT-formazan. To enhance the action of methanol on microorganisms, 2 minutes of sonication were applied before applying an incubation of 12 hours for INT-formazan extraction. After this incubation, supernatant was then filtered (0.7 µm pore-size Whatman™ GF/F filters, GE Healthcare, Boston, MA, USA) to remove particles before measuring its optical density at 480 nm with a spectrophotometer (Aquamate, ThermoSpectronic, Cambridge, GB). Measured optical density was converted into dehydrogenase activity expressed in quantity of INT hydrolyzed per hour and cm² of clay bead surface (µmol INT.h⁻¹.cm⁻²) following the equation described in Lebon et al. (2021). Obtained result of dehydrogenase activity was then corrected by subtracting results obtained from control samples (sterile clay beads).

2.3.4. Assessment of SIS impacts on groundwater chemistry and microbiology

The impact of each SIS on groundwater chemistry and microbial biofilms was assessed by measuring the modifications reported between the SIS-impacted zone and the non-SIS-impacted zone of the aquifer for each experimental period. The chemical and microbial biofilm modifications due to SIS were approximated by the ratios in orthophosphate, nitrate, dissolved organic carbon, total protein content (proxy of microbial biomass), hydrolytic activity and

dehydrogenase activity between SIS-impacted (SI) and non-SIS-impacted (NSI) zones for each SIS and each experimental period. These ratios can be easily interpreted as ratios greater than 1 indicated that SIS increased the concentrations of the analyzed nutrient in groundwater or stimulated the biomass or the activities of groundwater biofilms. Inversely, ratios lower than 1 indicated that SIS diluted the concentration of nutrients in groundwater or inhibited the biomass and activities of groundwater biofilms.

2.4. Estimations of SIS characteristics and rain events characteristics during the 6 experimental periods

The thickness of the vadose zone was measured as the depth (in meters) between the soil and the groundwater table for each SIS and experimental period before rain events. Data were obtained from long-term continuous measurements of groundwater table level (see section 2.3. Monitoring and sampling of groundwater and microbial biofilms). The second SIS characteristics (the time of stormwater transfer from surface to groundwater table, water transit time) was estimated as the delay between the rain peak and the peak of infiltrated stormwater reaching the aquifer in hours. As stormwater runoff had a low electric conductivity ($< 100 \mu\text{S}$) in comparison with groundwater ($> 500 \mu\text{S}$), electric conductivity in groundwater monitored with field probes in SIS was used to track the arrival of low-mineralised stormwater into the aquifer (Figure 1-A). The water transit time was thus calculated as the time between the rain peak and the minimum electric conductivity in the SIS-impacted zone of the aquifer (Figure 1-A). As changes in electric conductivity in the aquifer could be only detected from rain events having intensities $> 3 \text{ mm/h}$, we calculated an average water transit time for each SIS and each experimental period by considering all rain events that occurred close to the experimental periods (within 3 months before and after the dates) and that were significant enough to be processed. Consequently, calculated water transit time was a characteristic of each SIS associated with the dynamics of stormwater transfer from surface to groundwater through the

vadose zone. Groundwater table elevation (as a proxy of groundwater recharge rate during rain events) was measured using continuous monitoring of groundwater level with field probes in all SIS (see section 2.3. Monitoring and sampling of groundwater and microbial biofilms). These elevations corresponded to the maximum increase in groundwater level observed during each experimental period in SIS-impacted wells of all SIS (Figure 1-B – black arrow).

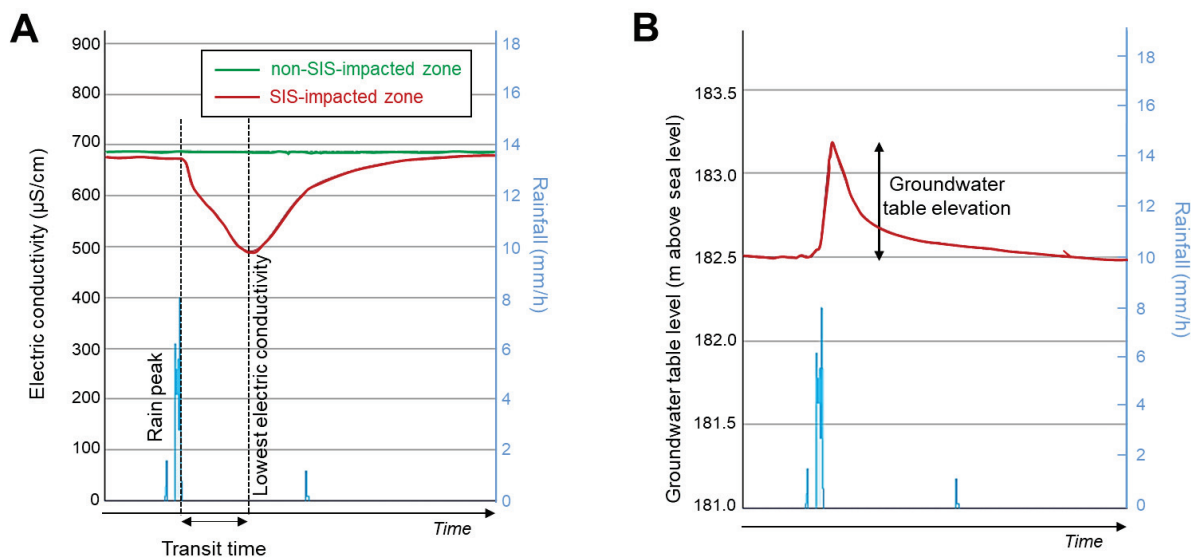


Figure 1: Examples of (A) electric conductivity monitoring to estimate stormwater transit time from surface to groundwater; and of (B) groundwater table level monitoring to measure groundwater table elevation (in meters above sea level) obtained in Django-Reinhardt (DjR) site.

2.7. Statistical analyses

Over the six experimental periods and for the five studied SIS, the obtained dataset comprised 21 points for which it was possible to measure the impacts of SIS on chemical and microbial groundwater variables and to assess the influence of the three factors associated to SIS characteristics (vadose zone thickness and transit time of water from surface to groundwater) and groundwater table elevations on these impacts. In a first step, vadose zone thicknesses, water transit times and groundwater table elevations were compared among SIS using non parametric Kruskal-Wallis tests. Multiple regressions (linear models) were performed to jointly

evaluate the contributions of the three explanatory factors (vadose zone thickness, water transit time and groundwater table elevation) on dependent variables (chemical and microbial variables associated with SIS impact). For these analyses, vadose zone thickness and water transit time were ln-transformed to satisfy the normality assumption (verified by Shapiro's test). The significance of each explanatory variable in multiple regression analyses were tested using Type II tests of analysis of variance –ANOVA- (Freund et al. 1986; Shaw and Mitchell-Olds,1993). These type II ANOVAs allowed to compare the contributions of the three explanatory variables on each dependent variable without erroneously attributing the shared variance explained by two explanatory factors to the first factor introduced in the analysis. R-squared values (Pearson correlation coefficient) were also computed to evaluate the percentage of variance in chemical and microbial variables explained by the significant explanatory variable(s). Statistical analyses (Kruskal-Wallis tests, type II ANOVAs using car package) as well as graphics were performed with R 3.4 software (R Development Core Team, 2018).

3. Results

3.1. Variability in vadose zone thickness, water transit time and groundwater table elevation among SIS

Vadose zone thickness and water transit time through the vadose zone significantly differed among the studied SIS (Figure 2, Kruskal-Wallis tests, $\chi^2=17.576$, $df = 4$, $p\text{-value} = 0.001493$ for vadose zone thickness, $\chi^2 = 17.955$, $df = 4$, $p\text{-value} = 0.00126$ for water transit time). Although water transit time was expected to increase with the vadose zone thickness, these two variables were not significantly correlated (Pearson's correlation, $R^2 = 0.089$, $p > 0.19$). It was mainly due to GB site which had a thin vadose zone like Min and IUT sites but was characterized by a water transit time comparable to thick vadose zone sites like Fey and DjR (Figure 2). In contrast with these two first variables, groundwater table elevations were not

significantly different among the studied SIS (Figure 2, Kruskal-Wallis tests, $\chi^2=6.17$, $df = 4$, $p\text{-value} > 0.18$) because they were significantly correlated with the “experimental period-specific” cumulative rainfalls reported on Table 2 (Pearson’s correlation, $R^2 = 0.30$, $p < 0.01$).

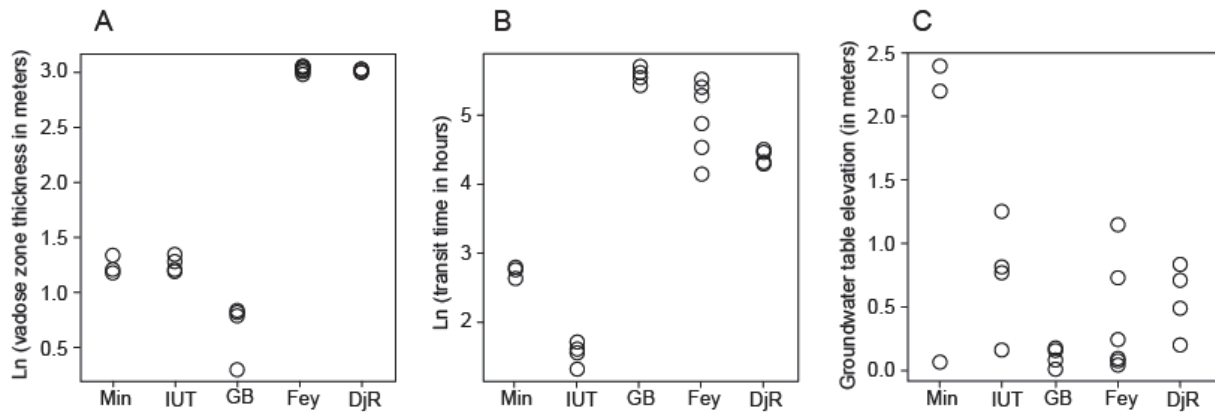


Figure 2: Distribution of (A) vadose zone thicknesses, (B) water transit times from surface to groundwater and (C) groundwater tables elevations measured during six rain events for the five stormwater infiltration systems (SIS) ($n = 21$). Ln (vadose zone thickness) and Ln (water transit time) were displayed on the graphs. Codes for SIS: Min = Minerve, IUT = IUT, GB = Grange Blanche, Fey= Feyzin, DjR = Django Reinhardt.

3.2. Impact of SIS on groundwater chemistry

Overall, SIS reduced the concentrations of NO_3^- in groundwater (i.e. NO_3^- concentration measured in SIS-impacted well was lower than the concentration measured in the corresponding non-SIS-impacted well leading to ratios < 1) at the exception of two experimental periods for GB site (i.e. ratios higher than 1, Figure 3A). Multiple regression analyses showed that NO_3^- modifications due to SIS were significantly correlated with groundwater table elevations (Type II ANOVA on linear model, $F_{(1,19)} = 9.04$, $p < 0.01$). Higher was the groundwater table elevation, higher was the reduction of NO_3^- concentration induced by SIS (Figure 3B).

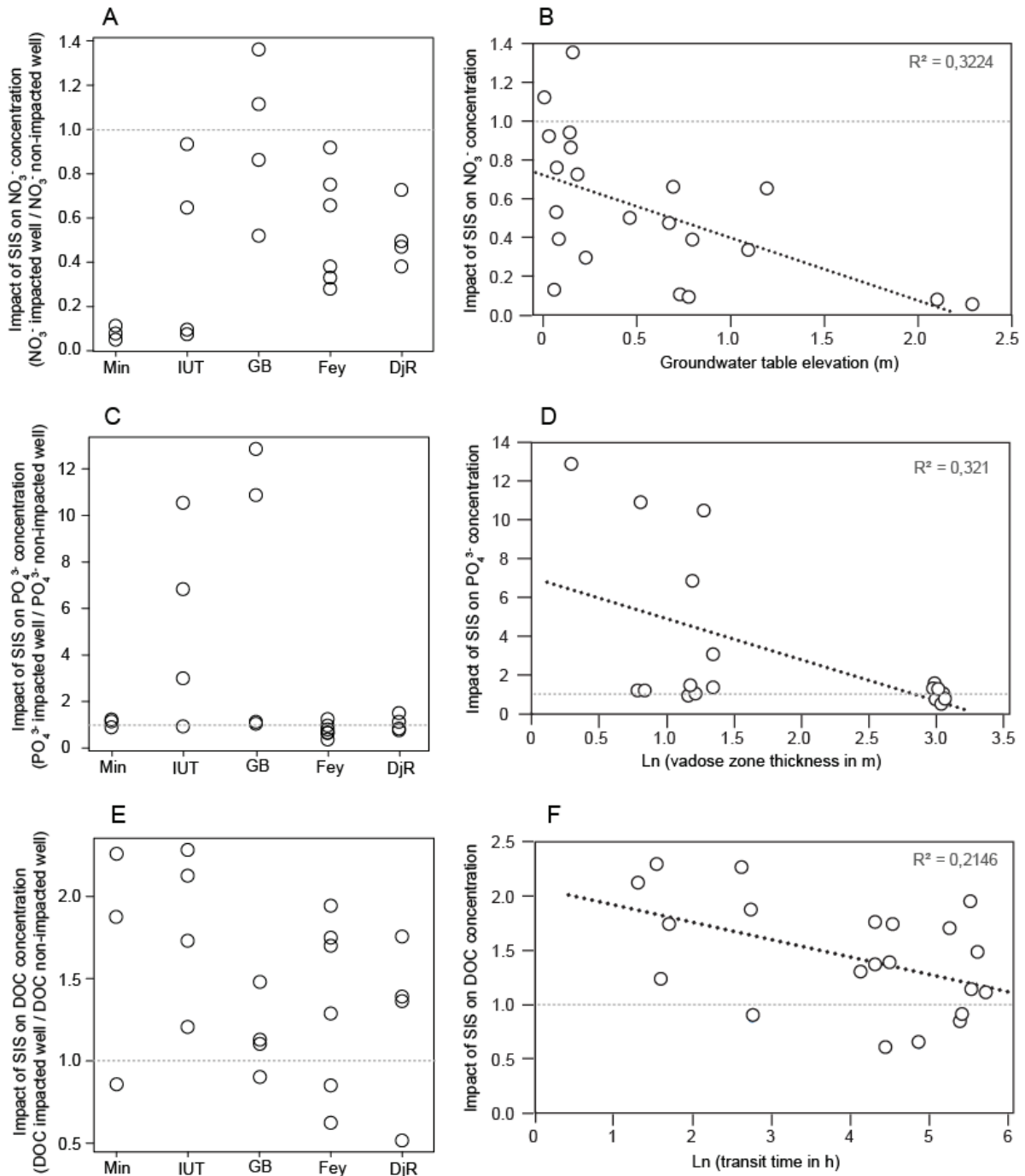


Figure 3: Left panels: Influence of SIS on (A) NO₃⁻, (C) PO₄³⁻ and (E) DOC concentrations measured during rain events for the five stormwater infiltration systems (n = 21). Points below the dotted lines (at 1 on the Y-axis) indicate that SIS reduced nutrient concentrations in groundwater whereas points above the dotted lines indicate that SIS produced an enrichment of nutrients in groundwater. Codes for SIS: Min = Minerve, IUT = IUT, GB = Grange Blanche, Fey= Feyzin, DjR = Django Reinhardt. Right panels: Regressions between the significant explanatory variables (vadose zone thickness, water transit time from surface to groundwater and groundwater table elevation) and modifications of (B) NO₃⁻, (D) PO₄³⁻ and (F) DOC concentrations associated with SIS. SIS = Stormwater infiltration system.

PO_4^{3-} concentration was not consistently impacted by SIS as most points reported on Figure 3C were close to a ratio of 1. Nevertheless, we observed high enrichments of PO_4^{3-} concentrations in groundwater below SIS at three experimental periods for IUT site and at two periods for GB site. Overall, PO_4^{3-} modifications due to SIS were negatively correlated with vadose zone thickness (Figure 3D, Type II ANOVA on linear model, $F_{(1,19)} = 8.98$, $p < 0.01$).

The impact of SIS on DOC concentrations in groundwater varied strongly in each site among experimental periods (Figure 3E). Overall, SIS increased the concentrations of DOC in groundwater as observed in 76% of occasions (points > 1 on figure 3E). Multiple regression analyses showed that DOC modifications due to SIS were negatively correlated with water transit time from surface to groundwater (Type II ANOVA on linear model, $F_{(1,19)} = 4.19$, $p < 0.05$). Highest groundwater enrichments in DOC due to SIS were observed in SIS characterized by the shortest water transit time from surface to the aquifer (Figure 3F).

3.3. Impact of SIS on groundwater microbiology

The impact of SIS on biofilm biomass varied strongly among experimental periods and among SIS (Figure 4A). The biofilm biomass modifications between non SIS-impacted and SIS impacted wells showed that only around 50% of points indicated a stimulation of biofilm biomass by SIS (11 points out of 21 had values > 1 , Figure 4A). Biofilm biomass was negatively correlated with water transit time from surface to groundwater (Figure 4B, Type II ANOVA on linear model, $F_{(1,19)} = 8.12$, $p < 0.01$). Interestingly, DOC and biofilm biomass modifications due to SIS, both influenced by water transit time, were also correlated to each other (Pearson's correlation, $R^2 = 0.198$, $p < 0.05$): highest groundwater enrichments in DOC due to SIS were associated with the highest stimulations in biofilm biomass associated with SIS.

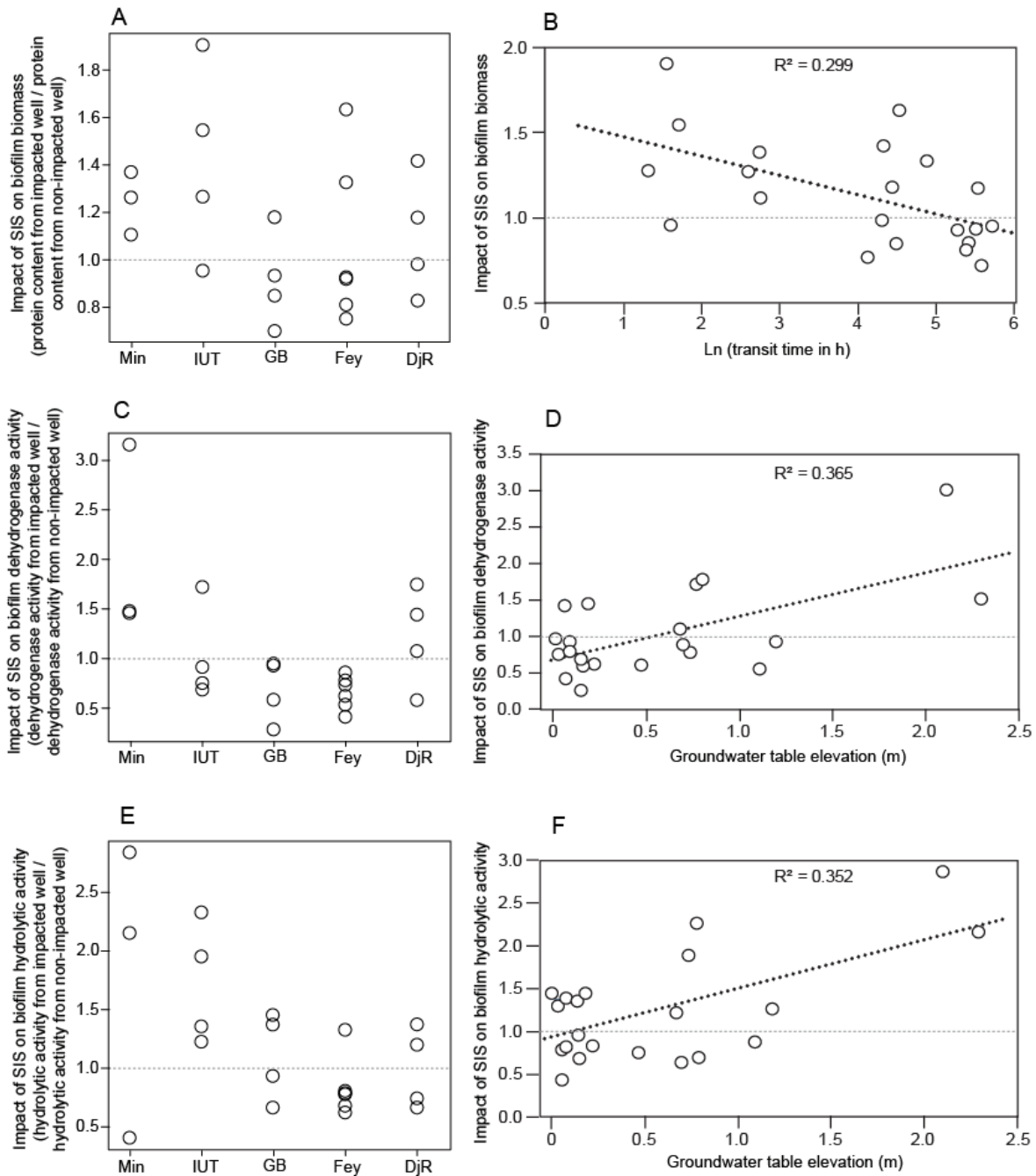


Figure 4: Left panels: Influence of SIS on (A) biofilm biomass, (C) dehydrogenase activity and (E) hydrolytic activity measured during rain events for the five stormwater infiltration systems (n = 21). Points below the dotted lines (at 1 on the Y-axis) indicate that SIS reduced microbial growth or activity in groundwater whereas points above the dotted lines indicate that SIS stimulated microbial biofilms in groundwater. Codes for SIS: Min = Minerve, IUT = IUT, GB = Grange Blanche, Fey= Feyzin, DjR = Django Reinhardt. Right panels: Regressions between the significant explanatory variables (vadose zone thickness, water transit time from surface to groundwater and groundwater table elevation) and modifications of (B) biofilm biomass, (D) dehydrogenase activity and (F) hydrolytic activity associated with SIS. SIS = Stormwater infiltration system.

The stimulations of biofilm activities by SIS represented only 33% of points for dehydrogenase activity (7 points from 21 had values > 1, Figure 4C) and around 50% of points for hydrolytic activity (11 points from 21, Figure 4E). Multiple regression analyses showed that the impacts of SIS on the two microbial activities (dehydrogenase and hydrolytic) were positively correlated with groundwater table elevation (Figure 4DF, Type II ANOVAs on linear models, $F_{(1,19)} = 10.91$, $p < 0.01$ for dehydrogenase activity, and $F_{(1,19)} = 10.33$, $p < 0.01$ for hydrolytic activity). More precisely, the strongest stimulations of dehydrogenase and hydrolytic biofilm activities due to SIS were measured where the strongest groundwater table elevations were observed (Figure 4DF).

4. Discussion

We hypothesized that SIS characteristics (vadose zone thickness, water transit time) would be stronger determinants of SIS impacts on groundwater chemistry and microbial biomass than groundwater recharge rate (estimated by groundwater table elevations, Moon et al. 2004; Labrecque et al. 2020). More precisely, the impact of SIS on dissolved nutrients (NO_3^- , PO_4^{3-} and DOC) and biofilm biomass would be inversely correlated with the vadose zone thickness and/or the transit time of stormwater from surface to groundwater table. The present study validated the significance of these SIS characteristics on the impacts of SIS on PO_4^{3-} concentrations, DOC concentrations, and biofilm biomass.

The impact of SIS on PO_4^{3-} concentrations in groundwater decreased with vadose zone thickness. This relationship was probably associated with the influence of vadose zone thickness on aerobic-anaerobic processes occurring in infiltration porous media. As shown by Nogaro et al. (2007) in experimental systems simulating water infiltration through SIS, a sharp depletion of dissolved oxygen concentrations occurred in the first cm of infiltration basins during recharge due to microbial activities. This decrease in dissolved oxygen concentrations

can be compensated by a re-oxygenation of water during its transfer in the vadose zone (Foulquier et al., 2010a; McMahon and Chapelle, 2008). Nevertheless, this re-oxygenation could not occur when the vadose zone is thin and rapidly saturated with water during stormwater runoff infiltration (Goutaland et al., 2008). In these conditions, anaerobic conditions could occur and lead to a facilitated transport of PO_4^{3-} from surface to groundwater by limiting the adsorption of P on sediments and/or produce a release of P from previously adsorbed PO_4^{3-} (Nogaro et al., 2007). Such process could explain that SIS impacts on PO_4^{3-} enrichment in groundwater were the highest in SIS with a thin vadose zone. Nevertheless, these impacts were not reproducible from a rain event to another for each SIS. For example, strong enrichments in PO_4^{3-} (more than 10-fold increases) were only observed in GB SIS at two experimental periods (Figure 3C). It means that processes leading to PO_4^{3-} enrichment by SIS also depended on local conditions during experimental periods. We can suppose that the water saturation of the soil and the vadose zone preceding the experimental periods was important to evaluate the development of aerobic-anaerobic conditions in vadose zone during rain events.

The impact of SIS on DOC concentrations reaching the aquifer was negatively correlated with the water transit time from surface to groundwater. These results highlighted that the retention of DOC supplied with stormwater runoff was linked to the contact time between infiltrated stormwater and the vadose zone. Thus, rapid infiltration (short water transit time between surface to groundwater) led to a low retention of DOC in the vadose zone and a groundwater enrichment of DOC by SIS. Several studies (Datry et al., 2005; McMahon and Chapelle, 2008; Pabich et al., 2001, Voisin et al. 2020) showed a significant impact of vadose zone thickness on DOC retention through the vadose zone as the retention time of infiltrated water in vadose zone classically increases with its thickness. However, we showed that the water transit time from surface to groundwater determining the vadose zone retention time was not always linked with vadose zone thickness. Indeed, the long water transit time observed in GB site despite its

thin vadose zone thickness clearly highlighted that a potential reduction of hydraulic conductivity in the bed of an infiltration basin limits the impact of this SIS on groundwater DOC enrichment. Thus, water transit time that takes into account hydrological transfers within SIS appears as a better indicator of the role of the vadose zone on DOC retention than the vadose zone thickness.

In correlation with DOC dynamics through SIS, the highest stimulations of biofilm biomass due to SIS were observed in SIS characterized by the shortest water transit times from surface to groundwater. As the studied aquifer was C-limited (e.g., Mermillod-Blondin et al. 2013), the ability of microorganisms to develop biomass as biofilms in groundwater was inextricably linked with the availability of DOC. Several studies (Foulquier et al. 2011, Voisin et al. 2020, Lebon et al. 2021) performed on stormwater infiltration basins already highlighted that SIS-associated DOC enrichments in groundwater stimulated biofilm biomass. We also observed a positive correlation between the SIS impacts on DOC concentrations and their impacts on biofilm biomass. Based on this relationship, our results clearly indicate that water transit time from surface to groundwater was the main factor determining the impact of SIS on microbial biomass through its influence on DOC transfer from surface to the aquifer. Thus, the assessment of the water transit time through the vadose zone should be preconized to evaluate the risks of urban stormwater infiltration practices on microbial development in groundwater.

Contrasting with the main influences of SIS characteristics (vadose zone thickness or water transit time) on SIS impacts on PO_4^{3-} and DOC concentrations in groundwater, NO_3^- concentrations in groundwater were significantly influenced by groundwater recharge rates during rain events (estimated by groundwater table elevations). As observed for electric conductivity (Figure 1), the recharge of groundwater with stormwater runoff produced a dilution of NO_3^- present in the aquifer. Stormwater runoff were poorly loaded in NO_3^- compared

with the Eastern aquifer of Lyon (Datry et al. 2004, Voisin et al. 2018). In such condition, NO_3^- in the aquifer was diluted by the flux of stormwater below infiltration basins, explaining the correlation between groundwater table elevation (groundwater recharge rate with stormwater) and modifications of NO_3^- concentrations due to SIS.

Overall, the present study based on several SIS and rain events demonstrated that changes in nutrients induced by SIS depended on the main source of nutrient in the system. For nutrients supplied to groundwater by stormwater runoff (PO_4^{3-} and DOC), SIS characteristics (vadose zone thickness and transit time of water from surface to groundwater) which reflected biogeochemical conditions and water transfer in the vadose zone influenced the impact of SIS on nutrient contamination of the aquifer. For nutrients predominantly present in groundwater like NO_3^- , the flux of stormwater recharging the aquifer determined the impact of SIS as this recharge diluted nutrients in groundwater. Thus, predicting the impacts of SIS on groundwater chemistry necessitates to consider SIS characteristics or groundwater recharge rates depending on the origin of the chemical compounds (as stressed by Pinasseau et al. 2020 for pharmaceuticals and pesticides).

The second hypothesis stating that the groundwater recharge rate during rain events (estimated by groundwater table elevation) was the main determinant of SIS impacts on microbial activity in groundwater was validated. The highest stimulations of dehydrogenase and hydrolytic activities due to SIS were measured for the highest groundwater table elevations. This microbial stimulation might have been due to an increased dissolved nutrient fluxes due to increased water flow velocities in the aquifer during recharge (Dobson et al. 2007; Rühle et al., 2014 and 2015) and/or a remobilization of nutrients accumulated in the vadose zone during groundwater table elevation (Gao et al., 2006; Zhuang et al., 2009). This second explanation based on a remobilization of nutrients and organic compounds trapped in the vadose zone during rain

events could not be validated as the impact of SIS on groundwater DOC, which is the main limiting element for microorganisms in the studied aquifer (Mermillod-Blondin et al. 2013), did not increase with groundwater table elevation due to recharge. Thus, increased water flow velocities in the aquifer during recharge was the most probable mechanism explaining the stimulations of microbial activities by increasing the fluxes of DOC fueling the groundwater biofilms. Such positive influence of the fluxes of solutes and DOC on biofilm activity has been already observed in aquifer and streambed sediments (Battin, 2000; Foulquier et al. 2011; Battin et al. 2016) but, to our knowledge, the present study is the first to highlight a link between the groundwater recharge rate and the SIS-associated modifications of microbial biofilm activities on a short temporal scale (10 days).

Surprisingly, the present study performed on 6 experimental periods with contrasted meteorological conditions demonstrated that SIS could reduce the biomass and the activities of microbial biofilms in groundwater. This result contrasts with previous studies performed on a limited number of experimental periods (1 or 2) which showed a clear stimulation of biofilm biomass and activities in SIS-impacted zones compared with non-SIS-impacted zones (Voisin et al. 2020, Lebon et al. 2021). By increasing the number of experimental periods, we observed that more than 50% of measured ratios for microbial variables between SIS-impacted and non-SIS impacted zones were lower than 1. It can be expected that this microbial inhibition was associated with the presence of biocides in SIS-impacted zone of the aquifer because these kinds of compounds are often present in urban stormwater runoff (Masoner et al. 2019) and in SIS-impacted groundwater (Pinasseau et al., 2019). However, this microbial inhibition could be also due to the fact that stormwater reaching the aquifer could be less rich in biodegradable nutrients and elemental microelements (e.g., Fe, Mg and Mn) than the aquifer. In this case and for specific campaigns and basins, the stormwater infiltration could dilute the biodegradable substrates present in groundwater, reducing the availability of nutrients for microbial growth

and activities (Brindha et al., 2019; Da Costa et al., 2020). Further experiments are clearly needed to finely decrypt the mechanisms (dilution of elemental compounds for microbial biofilms, impact of biocides...) explaining the inhibitory effect of SIS on groundwater microorganisms and their potential consequences on groundwater quality.

5. Conclusions

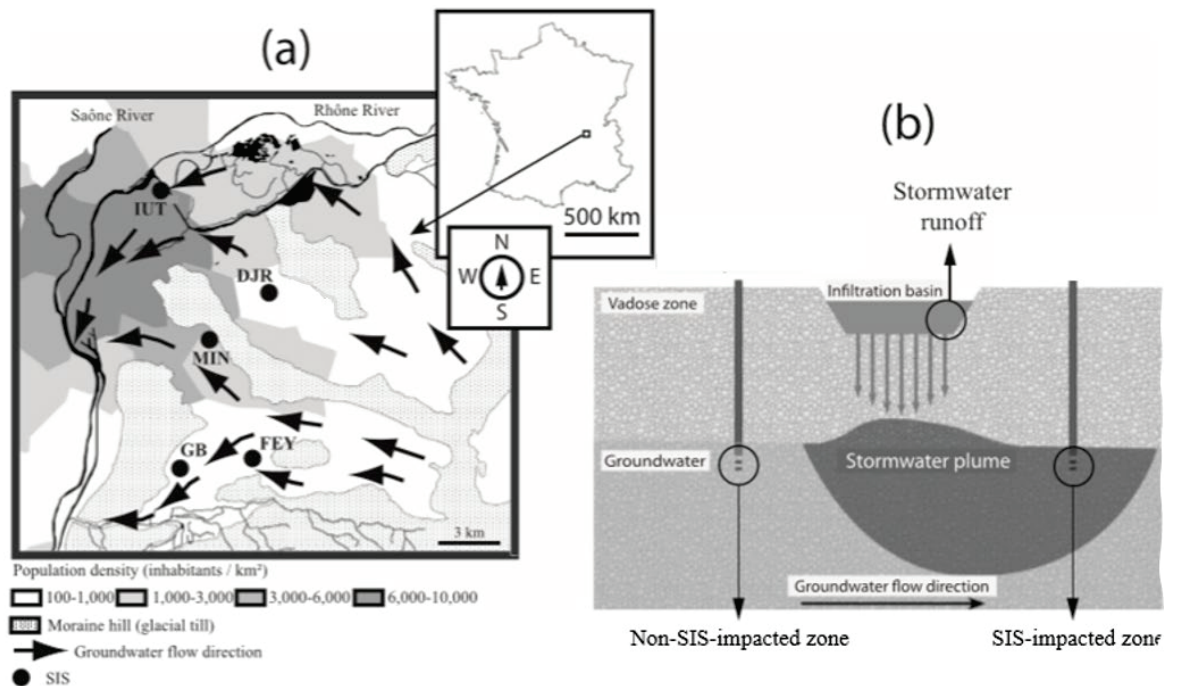
The present study clearly showed that vadose zone thickness, water transit time from surface to groundwater and groundwater recharge rate significantly influenced the impact of SIS on groundwater chemistry and/or microbiology. However, the significance of each investigated factor depended on the studied nutrient and microbial variable. SIS characteristics associated with vadose zone (vadose zone thickness and water transit time from surface to groundwater) influenced the enrichment of groundwater with nutrients supplied to SIS by stormwater runoff (PO_4^{3-} and DOC) and the resulting effects on biofilm development (increase in biofilm biomass) in groundwater. Beside, stormwater fluxes reaching the aquifer could significantly explain the dilution of NO_3^- in groundwater below SIS but also the modifications of microbial activities. Based on these conclusions, we can make recommendations about the implementation of infiltration basins in urban areas for stormwater management to limit the impact of SIS on groundwater ecosystems. Indeed, SIS with thick vadose zones and long water transit times from surface to groundwater would be favored to reduce the contamination of groundwater with nutrients supplied with stormwater runoff and their resulting effect on microbial growth in groundwater that could be associated with the presence of pathogenic bacteria (Colin et al. 2020). The installation of a homogeneous sediment layer of moderate permeability at the bottom of the infiltration basin could be also an option to increase the retention time of infiltrated stormwater in the soil and the vadose zone, favoring water purification processes and then groundwater quality protection. Recommendations could be also made to control

groundwater recharge rate during rain events: reduction of the ratio between the catchment area and the infiltration area, development of retention basins limiting the volume of infiltrated water per hour during rain event. However, the inhibitions of groundwater microbial biofilms due to SIS were commonly observed in the present study and questioned about the mechanisms explaining these microbial responses. Further experiments in environmental chemistry are clearly needed to evaluate whether these microbial inhibitions might be associated with an enrichment of the groundwater with biocides and a degradation of groundwater quality.

Acknowledgements: The authors thank Manon Vallier, Edwige Gautreau and Mohammad Wazne for their advice concerning data treatment work and Pierre Marmonier for his thorough scientific editing of the manuscript.

Funding: This work was supported by l'Agence Nationale de la Recherche [ANR-16-CE32-0006 FROG], Lyon Metropole and Agence de l'Eau Rhône Méditerranée Corse within the framework of the experimental observatory for urban hydrology (OTHU, <http://www.graie.org/othu/>) and Rhône Basin LTER (ZABR). This study received the support of the CPER “Ec’EauCampus - OTHU” for the equipment of IUT site. This work was also performed within the framework of the EUR H2O’Lyon (ANR-17-EURE-0018) of Université de Lyon (UdL), within the program “Investissements d’Avenir” operated by the French National Research Agency (ANR).

Supplementary materials 1:



Location of the five Stormwater Infiltration Systems - SIS (Grange-Blanche –GB; Minerve-MIN; IUT; Django - Reinhardt -DJR; Feyzin-FEY) located in the eastern aquifer of the Lyon metropolitan area, France (a) and experimental design (b).

References

- Amy, G., and Drewes, J., 2007. Soil aquifer treatment (SAT) as a natural and sustainable wastewater reclamation/reuse technology: fate of wastewater effluent organic matter (EfOM) and trace organic compounds. *Environmental Monitoring and Assessment*, 129(1), 19-26. [10.1007/s10661-006-9421-4](https://doi.org/10.1007/s10661-006-9421-4)
- Andres, A. S., and Sims, J. T., 2013. Assessing potential impacts of a wastewater rapid infiltration basin system on groundwater quality: a Delaware case study. *Journal of Environmental Quality*, 42(2), 391-404. <https://doi.org/10.2134/jeq2012.0273>.
- Arnold Jr, C. L., and Gibbons, C. J., 1996. Impervious surface coverage: the emergence of a key environmental indicator. *Journal of the American Planning Association*, 62(2), 243-258. <https://doi.org/10.1080/01944369608975688>.
- Avishai, L., Siebner, H., Dahan, O., and Ronen, Z., 2017. Using the natural biodegradation potential of shallow soils for in-situ remediation of deep vadose zone and groundwater.

Journal of Hazardous Materials, 324, 398-405.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.11.003>.

Bahar, T., Oxarango, L., Castebrunet, H., Rossier, Y., and Mermillod-Blondin, F., 2021. 3D modelling of solute transport and mixing during managed aquifer recharge with an infiltration basin. *Journal of Contaminant Hydrology*, 237, 103758. <https://doi.org/10.1016/j.jconhyd.2020.103758>.

Barba, C., Folch, A., Gaju, N., Sanchez-Vila, X., Carrasquilla, M., Grau-Martínez, A., and Martínez-Alonso, M., 2019. Microbial community changes induced by Managed Aquifer Recharge activities: linking hydrogeological and biological processes. *Hydrology and Earth system sciences*, 23(1), 139-154. <https://doi.org/10.5194/hess-23-139-2019>

Battin, T. J., 2000. Hydrodynamics is a major determinant of streambed biofilm activity: from the sediment to the reach scale. *Limnology and Oceanography*, 45(6), 1308-1319. <https://doi.org/10.4319/lo.2000.45.6.1308>

Battin, T. J., Besemer, K., Bengtsson, M. M., Romani, A. M., and Packmann, A. I., 2016. The ecology and biogeochemistry of stream biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, 14(4), 251-263. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.15>

Beganskas, S., and Fisher, A. T., 2017. Coupling distributed stormwater collection and managed aquifer recharge: Field application and implications. *Journal of Environmental Management*, 200, 366-379. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.05.058>.

Bekele E., Toze, S., Patterson, B., and Higginson, S., 2011. Managed aquifer recharge of treated wastewater: Water quality changes resulting from infiltration through the vadose zone. *Water Research*, 45(17), 5764-5772. doi: 10.1016/j.watres.2011.08.058.

Bou, C., and Rouch, R., 1967. Un nouveau champ de recherches sur la faune aquatique souterraine. *CR Acad. Sci*, 265, 369-370.

Brindha, K., Pavelic, P., and Sotoukee, T., 2019. Environmental assessment of water and soil quality in the Vientiane Plain, Lao PDR. *Groundwater for Sustainable Development*, 8, 24-30. <https://doi.org/10.1016/j.gsd.2018.08.005>.

Colin, Y., Bouchali, R., Marjolet, L., Marti, R., Vautrin, F., Voisin, J., Bourgeois, E., Rodriguez-Nava, V., Blaha, D., Winiarski, T., Mermillod-Blondin, F. and Cournoyer, B.,

2020. Coalescence of bacterial groups originating from urban runoffs and artificial infiltration systems among aquifer microbiomes. *Hydrology and Earth System Sciences*, 24(9), 4257-4273. <https://doi.org/10.5194/hess-24-4257-2020>
- Da Costa, L. R. D., Monteiro, J. P. P. G., and Hugman, R. T., 2020. Assessing the use of harvested greenhouse runoff for managed aquifer recharge to improve groundwater status in South Portugal. *Environmental Earth Sciences*, 79, 1-15. <https://doi.org/10.1007/s12665-020-09003-5>.
- Datry, T., Malard, F., and Gibert, J., 2004. Dynamics of solutes and dissolved oxygen in shallow urban groundwater below a stormwater infiltration basin. *Science of the Total Environment*, 329(1-3), 215-229. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.02.022>.
- Datry, T., Malard, F., and Gibert, J., 2005. Response of invertebrate assemblages to increased groundwater recharge rates in a phreatic aquifer. *Journal of the North American Benthological Society*, 24(3), 461-477. <https://doi.org/10.1899/04-140.1>
- Dechesne, M., Barraud, S., and Bardin, J. P., 2005. Experimental assessment of stormwater infiltration basin evolution. *Journal of Environmental Engineering*, 131(7), 1090-1098. [https://doi-org/10.1061/\(ASCE\)0733-9372\(2005\)131:7\(1090\)](https://doi-org/10.1061/(ASCE)0733-9372(2005)131:7(1090)).
- Dillon, P., Toze, S., Page, D., Vanderzalm, J., Bekele, E., Sidhu, J., and Rinck-Pfeiffer, S., 2010. Managed aquifer recharge: rediscovering nature as a leading edge technology. *Water Science and Technology*, 62(10), 2338-2345. <https://doi.org/10.2166/wst.2010.444>.
- Dobson, R., Schroth, M. H., and Zeyer, J., 2007. Effect of water-table fluctuation on dissolution and biodegradation of a multi-component, light nonaqueous-phase liquid. *Journal of Contaminant Hydrology*, 94(3-4), 235-248. <https://doi.org/10.1016/j.jconhyd.2007.07.007>.
- Fillinger, L., Hug, K., and Griebler, C., 2021. Aquifer recharge viewed through the lens of microbial community ecology: initial disturbance response and impacts of species sorting versus mass effects on microbial community assembly in groundwater during riverbank filtration. *Water Research*, 189, 116631. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116631>.
- Fontvieille, D. A., Outaguerouine, A., and Thevenot, D. R., 1992. Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of microbial activity in aquatic systems: application to activated sludges. *Environmental Technology*, 13(6), 531-540. <https://doi.org/10.1080/09593339209385181>.

- Foulquier, A., Malard, F., Barraud, S., and Gibert, J., 2009. Thermal influence of urban groundwater recharge from stormwater infiltration basins. *Hydrological Processes: An International Journal*, 23(12), 1701-1713. <https://doi.org/10.1002/hyp.7305>.
- Foulquier, A., Malard, F., Mermillod-Blondin, F., Datry, T., Simon, L., Montuelle, B., and Gibert, J., 2010 (a). Vertical change in dissolved organic carbon and oxygen at the water table region of an aquifer recharged with stormwater: biological uptake or mixing? *Biogeochemistry*, 99(1), 31-47. <https://doi.org/10.1007/s10533-009-9388-7>.
- Foulquier, A., Simon, L., Gilbert, F., Fourel, F., Malard, F., and Mermillod-Blondin, F., 2010 (b). Relative influences of DOC flux and subterranean fauna on microbial abundance and activity in aquifer sediments: new insights from ¹³C-tracer experiments. *Freshwater Biology*, 55(7), 1560-1576. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2010.02385.x>.
- Foulquier, A., Mermillod-Blondin, F., Malard, F., and Gibert, J., 2011. Response of sediment biofilm to increased dissolved organic carbon supply in groundwater artificially recharged with stormwater. *Journal of Soils and Sediments*, 11(2), 382-393. <https://doi.org/10.1007/s11368-010-0323-2>.
- Freund, R. J., Littell, R. C., and Specter, P. C., 1986. SAS system for linear models. SAS Institute. Inc., Cary, NC, 210. ISBN-10: 9781555444303
- Gao, B., Saiers, J. E., and Ryan, J., 2006. Pore-scale mechanisms of colloid deposition and mobilization during steady and transient flow through unsaturated granular media. *Water Resources Research*, 42(1). <https://doi.org/10.1029/2005WR004233>.
- Gasperi, J., Sebastian, C., Ruban, V., Delamain, M., Percot, S., Wiest, L., Mirande, C., Caupos, E., Demare, D., Diallo Kessoo Kessoo, M., Saad, M., Schwartz, J. J., Dubois, P., Fratta, C., Wolff, H., Moilleron, R., Chebbo, G., Cren, C., Millet, M., Barraud, S. and Gromaire, M. C., 2014. Micropollutants in urban stormwater: occurrence, concentrations, and atmospheric contributions for a wide range of contaminants in three French catchments. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(8), 5267-5281. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-2396-0>.
- Goutaland, D., Winiarski, T., Lassabatere, L., Dubé, J. S., and Angulo-Jaramillo, R., 2013. Sedimentary and hydraulic characterization of a heterogeneous glaciofluvial deposit:

- Application to the modeling of unsaturated flow. *Engineering Geology*, 166, 127-139. <https://doi.org/10.1016/j.enggeo.2013.09.006>.
- Goutaland, D., Winiarski, T., Dubé, J.-S., Bièvre, G., Buoncristiani, J.-F., Chouteau, M., and Giroux, B., 2008. Hydrostratigraphic characterization of glaciofluvial deposits underlying an infiltration basin using ground penetrating radar. *Vadose Zone Journal* 7:194–207. <https://doi.org/10.2136/vzj2007.0003>.
- Grebel, J. E., Mohanty, S. K., Torkelson, A. A., Boehm, A. B., Higgins, C. P., Maxwell, R. M., Nelson, Kara L. and Sedlak, D. L., 2013. Engineered infiltration systems for urban stormwater reclamation. *Environmental Engineering Science*, 30(8), 437-454. <https://doi.org/10.1089/ees.2012.0312>.
- Healy, R. W., and Cook, P. G., 2002. Using groundwater levels to estimate recharge. *Hydrogeology journal*, 10(1), 91-109. <https://doi.org/10.1007/s10040-001-0178-0>
- Hofmann, R., and Griebler, C, 2018. DOM and bacterial growth efficiency in oligotrophic groundwater: absence of priming and co-limitation by organic carbon and phosphorus. *Aquatic Microbial Ecology*, 81(1), 55-71. <https://doi.org/10.3354/ame01862>.
- Holden, P. A., and Fierer, N., 2005. Microbial processes in the vadose zone. *Vadose Zone Journal*, 4(1), 1-21. <https://doi.org/10.2113/4.1.1>.
- Houri-Davignon, C., Relexans, J. C., and Etcheber, H., 1989. Measurement of actual electron transport system (ETS) Activity in marine sediments by incubation with INT. *Environmental Technology*, 10(1), 91-100. <https://doi.org/10.1080/09593338909384722>.
- Hunt, W. F., Hathaway, J. M., Winston, R. J., and Jadlocki, S. J., 2010. Runoff volume reduction by a level spreader–vegetated filter strip system in suburban Charlotte, NC. *Journal of Hydrologic Engineering*, 15(6), 499-503. [https://doi-org/10.1061/\(ASCE\)HE.1943-5584.0000160](https://doi-org/10.1061/(ASCE)HE.1943-5584.0000160).
- Jost, D., Haberer, C. M., Grathwohl, P., Winter, J., and Gallert, C., 2015. Oxygen transfer in a fluctuating capillary fringe: Impact of microbial respiratory activity. *Vadose Zone Journal*, 14(5), 1-14. <https://doi.org/10.2136/vzj2014.04.0039>.

- Kalbitz, K., Solinger, S., Park, J.-H., Michalzik, B., and Matzner, E., 2000. Controls on the dynamics of dissolved organic matter in soils: a review. *Soil Sci.* 165 (4), 277e304. <https://doi.org/10.1097/00010694-200004000-00001>
- Kuehn, W., and Mueller, U. (2000). Riverbank filtration: an overview. *Journal-American Water Works Association*, 92(12), 60-69.
- Labrecque, G., Chesnaux, R., and Boucher, M. A., 2020. Water-table fluctuation method for assessing aquifer recharge: application to Canadian aquifers and comparison with other methods. *Hydrogeology Journal*, 28(2), 521-533. [10.1007/s10040-019-02073-1](https://doi.org/10.1007/s10040-019-02073-1)
- Lebon, Y., Navel, S., Moro, M., Voisin, J., Cournoyer, B., François, C., Volatier, L., and Mermillod-Blondin, F., 2021. Influence of stormwater infiltration systems on the structure and the activities of groundwater biofilms: Are the effects restricted to rainy periods? *Science of The Total Environment*, 755, 142451. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142451>.
- Legout, C., Molenat, J., and Hamon, Y., 2009. Experimental and modeling investigation of unsaturated solute transport with water-table fluctuation. *Vadose Zone Journal*, 8(1), 21-31. <https://doi.org/10.2136/vzj2007.0182>.
- Levantesi, C., La Mantia, R., Masciopinto, C., Böckelmann, U., Ayuso-Gabella, M. N., Salgot, M., Tandoi, V., Van Houtte, E., Wintgens, T. and Grohmann, E., 2010. Quantification of pathogenic microorganisms and microbial indicators in three wastewater reclamation and managed aquifer recharge facilities in Europe. *Science of the Total Environment*, 408(21), 4923-4930. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.07.042>.
- Malard, F., and Hervant, F., 1999. Oxygen supply and the adaptations of animals in groundwater. *Freshwater Biology*, 41(1), 1-30. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2427.1999.00379.x>.
- Marsalek, J., and Chocat, B., 2002. International report: stormwater management. *Water Science and Technology*, 46(6-7), 1-17. <https://doi.org/10.2166/wst.2002.0657>.
- Marschner, B., and Kalbitz, K., 2003. Controls of bioavailability and biodegradability of dissolved organic matter in soils. *Geoderma* 113 (3e4), 211e235. DOI:10.1016/S0016-7061(02)00362-2

- Masetti, M., Pedretti, D., Sorichetta, A., Stevenazzi, S., and Bacci, F., 2016. Impact of a stormwater infiltration basin on the recharge dynamics in a highly permeable aquifer. *Water Resources Management*, 30(1), 149-165. <https://doi.org/10.1007/s11269-015-1151-3>.
- Masoner, J. R., Kolpin, D. W., Cozzarelli, I. M., Barber, L. B., Burden, D. S., Foreman, W. T., Forshay K. J., Furlong E.T., Groves J.F., Hladik M.L., Hopton M.E., Jaeschke J.B., Keefe S.H., Krabbenhoft D.P., Lowrance R., Romanok K.M., Rus D.L., Selbig W.R., Williams B.H. and Bradley, P. M., 2019. Urban stormwater: An overlooked pathway of extensive mixed contaminants to surface and groundwaters in the United States. *Environmental Science & Technology*, 53(17), 10070-10081. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b02867>.
- Mays, L. W., 2013. Groundwater resources sustainability: past, present, and future. *Water Resources Management*, 27(13), 4409-4424. <https://doi.org/10.1007/s11269-013-0436-7>.
- McKnight, D.M., Bencala, K.E., Zellweger, G.W., Aiken, G.R., Feder, G.L., and Thorn, K.A., 1992. Sorption of dissolved organic carbon by hydrous aluminium and iron oxides occurring at the confluence of Deer Creek with the Snake River, Summit County, Colorado. *Environ. Sci. Technol.* 26 (7), 1388e1396. <https://doi.org/10.1021/es00031a017>
- McMahon, P.B., and Chapelle, F.H., 2008. Redox processes and water quality of selected principal aquifer systems. *Ground Water* 46:259–271. <https://doi.org/10.1111/j.1745-6584.2007.00385.x>.
- Mermillod-Blondin, F., Mauclair, L., and Montuelle, B., 2005. Use of slow filtration columns to assess oxygen respiration, consumption of dissolved organic carbon, nitrogen transformations, and microbial parameters in hyporheic sediments. *Water Research*, 39(9), 1687-1698. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.02.003>.
- Mermillod-Blondin, F., Foulquier, A., Maazouzi, C., Navel, S., Negrutiu, Y., Vienney, A., Simon, L., and Marmonier, P., 2013. Ecological assessment of groundwater trophic status by using artificial substrates to monitor biofilm growth and activity. *Ecological Indicators*, 25, 230-238. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2012.09.026>.
- Mermillod-Blondin, F., Simon, L., Maazouzi, C., Foulquier, A., Delolme, C., and Marmonier, P., 2015. Dynamics of dissolved organic carbon (DOC) through stormwater basins designed for groundwater recharge in urban area: assessment of retention efficiency. *Water Research*, 81, 27-37. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.05.031>.

- Mermillod-Blondin, F., Voisin, J., Marjolet, L., Marmonier, P., and Cournoyer, B., 2019. Clay beads as artificial trapping matrices for monitoring bacterial distribution among urban stormwater infiltration systems and their connected aquifers. *Environmental Monitoring and Assessment*, 191(2), 58. <https://doi.org/10.1007/s10661-019-7190-0>.
- Moon, S. K., Woo, N. C., and Lee, K. S., 2004. Statistical analysis of hydrographs and water-table fluctuation to estimate groundwater recharge. *Journal of Hydrology*, 292(1-4), 198-209. <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2003.12.030>
- Naik, P. K., Tambe, J. A., Dehury, B. N., and Tiwari, A. N., 2008. Impact of urbanization on the groundwater regime in a fast growing city in central India. *Environmental Monitoring and Assessment*, 146(1), 339-373. <https://doi.org/10.1007/s10661-007-0084-6>.
- Natarajan, P., and Davis, A. P., 2015. Hydrologic performance of a transitioned infiltration basin managing highway runoff. *Journal of Sustainable Water in the Built Environment*, 1(3), 04015002. <https://doi-org./10.1061/JSWBAY.0000797>.
- Owor, M., Taylor, R. G., Tindimugaya, C., and Mwesigwa, D., 2009. Rainfall intensity and groundwater recharge: empirical evidence from the Upper Nile Basin. *Environmental Research Letters*, 4(3), 035009. <https://doi.org//10.1088/1748-9326/4/3/035009>.
- Pabich, W. J., Valiela, I., and Hemond, H. F., 2001. Relationship between DOC concentration and vadose zone thickness and depth below water table in groundwater of Cape Cod, USA. *Biogeochemistry*, 55(3), 247-268. <https://doi.org/10.1023/A:1011842918260>.
- Peterson, G.L., 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* 83, 346–356, [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(77\)90043-4](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(77)90043-4).
- Pinasseau, L., Wiest, L., Fildier, A., Volatier, L., Fones, G. R., Mills, G. A., Mermillod-Blondin, F., and Vulliet, E., 2019. Use of passive sampling and high-resolution mass spectrometry using a suspect screening approach to characterise emerging pollutants in contaminated groundwater and runoff. *Science of the Total Environment*, 672, 253-263. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.489>.
- Pinasseau, L., Wiest, L., Volatier, L., Mermillod-Blondin, F., and Vulliet, E., 2020. Emerging polar pollutants in groundwater: Potential impact of urban stormwater infiltration practices. *Environmental Pollution*, 266, 115387. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115387>.

- Pitt, R., Clark, S., and Field, R., 1999. Groundwater contamination potential from stormwater infiltration practices. *Urban Water*, 1(3), 217-236. [https://doi.org/10.1016/S1462-0758\(99\)00014-X](https://doi.org/10.1016/S1462-0758(99)00014-X).
- R Development Core Team, 2018. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria URL. <https://www.R-project.org/>.
- Rauch-Williams, T., Hoppe-Jones, C., and Drewes, J. E., 2010. The role of organic matter in the removal of emerging trace organic chemicals during managed aquifer recharge. *Water Research*, 44(2), 449-460. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.08.027>.
- Rühle, F.A., N. Zentner, and C. Stumpp. 2014. Changes in water table level influence solute transport in uniform porous media. *Hydrological Processes*, 29(6), 875-888. doi:10.1002/hyp.10200.
- Rühle, F. A., von Netzer, F., Lueders, T., and Stumpp, C., 2015. Response of transport parameters and sediment microbiota to water table fluctuations in laboratory columns. *Vadose Zone Journal*, 14(5), 1-12. <https://doi.org/10.2136/vzj2014.09.0116>.
- Saidy, A.R., Smernik, R.J., Baldock, J.A., Kaiser, K., and Sanderman, J., 2013. The sorption of organic carbon onto differing clay minerals in the presence and absence of hydrous iron oxide. *Geoderma* 209-210, 15-21. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2013.05.026>
- Shaw, R. G., and Mitchell-Olds, T., 1993. ANOVA for unbalanced data: an overview. *Ecology*, 74(6), 1638-1645. <https://doi.org/10.2307/1939922>.
- Shen, Y., Chapelle, F.H., Strom, E.W., and Benner, R., 2015. Origins and bioavailability of dissolved organic matter in groundwater. *Biogeochemistry* 122 (1), 61-78. <https://doi.org/10.1007/s10533-014-0029-4>
- Siemens, J., Haas, M., and Kaupenjohann, M., 2003. Dissolved organic matter induced denitrification in subsoils and aquifers? *Geoderma* 113 (3-4), 253-271. DOI:10.1016/S0016-7061(02)00364-6
- Slimene, E. B., Lassabatere, L., Winiarski, T., and Gourdon, R., 2015. Modeling water infiltration and solute transfer in a heterogeneous vadose zone as a function of entering flow

- rates. *Journal of Water Resource and Protection*, 7(13), 1017. DOI: 10.4236/jwarp.2015.713083
- Starr, R.C., and Gillham, R.W., 1993. Denitrification and organic carbon availability in two aquifers. *Ground Water* 31 (6), 934-947. <https://doi.org/10.1111/j.1745-6584.1993.tb00867.x>
- Tam, V. T., and Nga, T. T. V., 2018. Assessment of urbanization impact on groundwater resources in Hanoi, Vietnam. *Journal of Environmental Management*, 227, 107-116. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.08.087>.
- Tedoldi, D., Chebbo, G., Pierlot, D., Kovacs, Y., and Gromaire, M. C., 2016. Impact of runoff infiltration on contaminant accumulation and transport in the soil/filter media of sustainable urban drainage systems: A literature review. *Science of the Total Environment*, 569, 904-926. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.04.215>.
- United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division, 2019. *World Urbanization Prospects: The 2018 Revision (ST/ESA/SER.A/420)*. New York: United Nations.
- Vanderzalm, J. L., Page, D. W., Barry, K. E., and Dillon, P. J., 2013. Application of a probabilistic modelling approach for evaluation of nitrogen, phosphorus and organic carbon removal efficiency during four successive cycles of aquifer storage and recovery (ASR) in an anoxic carbonate aquifer. *Water Research*, 47(7), 2177-2189. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.01.038>.
- Vías, J., Andreo, B., Ravbar, N., and Hötzl, H., 2010. Mapping the vulnerability of groundwater to the contamination of four carbonate aquifers in Europe. *Journal of Environmental Management*, 91(7), 1500-1510. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2010.02.025>.
- Voisin, J., Cournoyer, B., and Mermillod-Blondin, F., 2016. Assessment of artificial substrates for evaluating groundwater microbial quality. *Ecological Indicators*, 71, 577-586. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2016.07.035>.
- Voisin, J., Cournoyer, B., Vienney, A., and Mermillod-Blondin, F., 2018. Aquifer recharge with stormwater runoff in urban areas: Influence of vadose zone thickness on nutrient and bacterial transfers from the surface of infiltration basins to groundwater. *Science of the Total Environment*, 637, 1496-1507. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.094>.

- Voisin, J., Cournoyer, B., Marjolet, L., Vienney, A., and Mermillod-Blondin, F., 2020. Ecological assessment of groundwater ecosystems disturbed by recharge systems using organic matter quality, biofilm characteristics, and bacterial diversity. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(3), 3295-3308. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06971-5>.
- Wang, H., Gao, J. E., Zhang, M. J., Li, X. H., Zhang, S. L., and Jia, L. Z., 2015. Effects of rainfall intensity on groundwater recharge based on simulated rainfall experiments and a groundwater flow model. *Catena*, 127, 80-91. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2014.12.014>.
- Zhuang, J., Tyner, J. S., and Perfect, E., 2009. Colloid transport and remobilization in porous media during infiltration and drainage. *Journal of Hydrology*, 377(1-2), 112-119. <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2009.08.011>.

6

SYNTHESE ET PERSPECTIVES

I. Synthèse

L'objectif principal de ma thèse était d'approfondir les connaissances concernant l'impact des pratiques d'infiltration des eaux de ruissellement pluvial sur les communautés microbiennes de la nappe en milieu urbain. Plus particulièrement, mon travail visait à quantifier l'influence des caractéristiques des bassins (épaisseur de la zone non saturée –ZNS- et temps de transfert de l'eau de la surface vers la nappe) et du taux de recharge des nappes sur les modifications de la microbiologie de la nappe associées aux épisodes de recharge. La figure 6.1 ci-dessous est un schéma bilan résumant les principaux résultats découlant des 3 axes de la thèse.

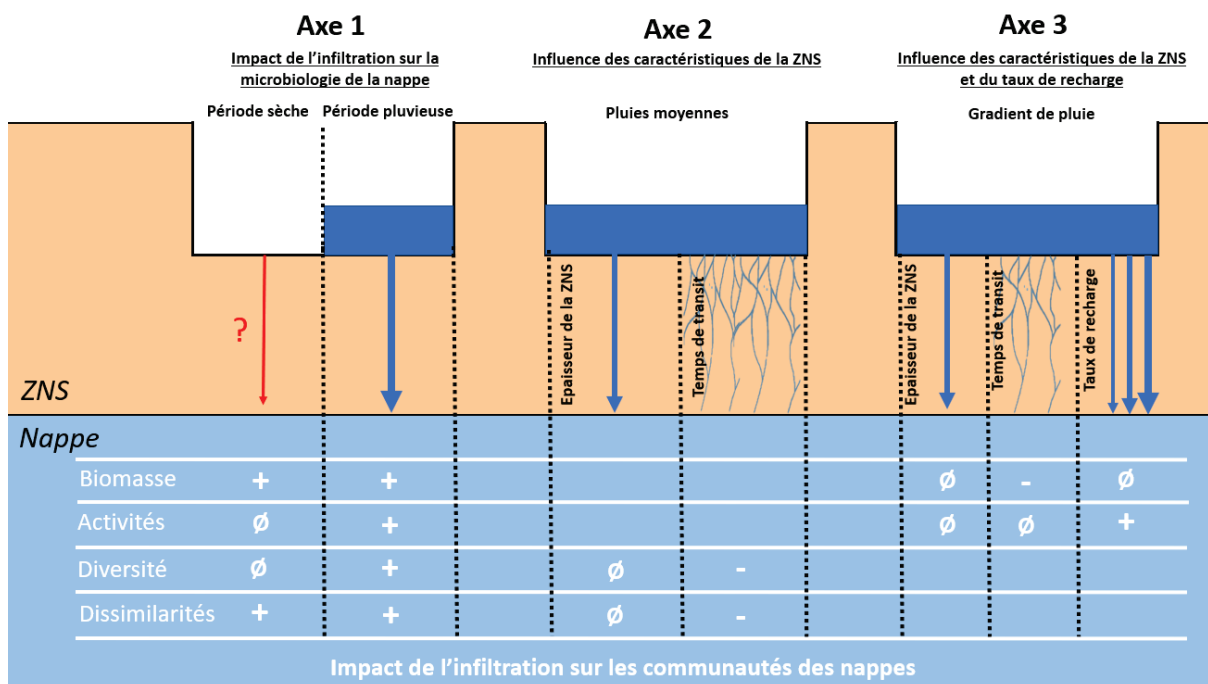


Figure 6.1 : Schéma récapitulatif des résultats de la thèse. « + », « - » et « ∅ » correspondent respectivement à une augmentation, à une diminution et à aucune modification de la variable considérée dans la zone impactée par les pratiques d'infiltration par rapport à la zone non-impactée. Les dissimilarités correspondent aux différences de composition entre les communautés des zones impactées et des zones non-impactées par la recharge.

L'axe 1 avait comme objectif de quantifier l'impact des pratiques d'infiltration sur les modifications structurelles et fonctionnelles des communautés microbiennes de la nappe. Pour cela, les changements de physico-chimie et de microbiologie de la nappe entre des zones de la nappe non-impactées et impactées par l'infiltration ont été évalués à travers la comparaison d'une période sèche et d'une période pluvieuse (période de recharge effective de la nappe) au niveau de 3 bassins d'infiltration avec une ZNS peu épaisse (ZNS < 3m).

Les résultats obtenus m'ont permis de montrer un effet persistant des bassins d'infiltration d'eaux pluviales sur la physico-chimie de la nappe. En effet, des concentrations plus importantes en carbone organique dissous (COD) et en nutriments (N-NH_4^+ et P-PO_4^-) ont été mesurées dans les zones impactées par l'infiltration par rapport aux zones non-impactées de la nappe, que ce soit en période sèche ou en période pluvieuse. De plus, cette expérimentation a aussi permis de mettre en évidence un effet persistant (ou à long terme) des pratiques d'infiltration sur la microbiologie de la nappe. Des biomasses plus importantes ont ainsi été mesurées dans les zones impactées par l'infiltration par rapport aux zones non-impactées, que ce soit en période sèche ou en période pluvieuse. Les différences de structure (dissimilarités) des communautés bactériennes entre les zones impactées et les zones non-impactées de la nappe étaient comparables pour les 2 périodes (sèche/pluvieuse), suggérant un impact à long terme des bassins d'infiltration sur les communautés bactériennes de la nappe. Comme les biofilms microbiens souterrains des nappes étudiées sont dépendants du carbone organique dissous provenant de la surface (Foulquier et al., 2011 ; Mermillod-Blondin et al 2013), les effets persistants des pratiques d'infiltration sur les biofilms observés dans l'étude citée étaient très probablement associés à l'enrichissement de la nappe en COD produit par les bassins sur le long terme. Cette hypothèse est confortée par les analyses de métabarcoding mettant en évidence une augmentation des abondances relatives d'Ordres comme les Flavobactérales dans les zones impactées par l'infiltration par rapport aux zones non impactées de la nappe que ce soit en période pluvieuse ou en période sèche. En effet, les Flavobactérales étant retrouvées en forte abondance dans les milieux aquatiques riches en nutriments (Marti et al., 2017 ; Voisin et al., 2020), ce groupe semble être favorisé dans les zones impactées de la nappe plus riches en matière organique dissoute (COD).

Contrairement à l'effet persistant des pratiques d'infiltration sur la biomasse et la structure des communautés microbiennes de la nappe, la stimulation des activités microbiennes dans les zones impactées par les pratiques d'infiltration a été uniquement mesurée lors de la période pluvieuse caractérisée par une recharge effective de la nappe. Ce résultat a permis de démontrer que ce ne sont pas les concentrations en COD et en nutriments dans les eaux qui semblent jouer un rôle prépondérant sur les activités microbiennes mais plutôt les flux d'eau et de solutés transitant vers la nappe. En effet, l'épisode de recharge augmente les flux d'eau, de COD disponible et de nutriments au sein de la nappe, favorisant l'alimentation des biofilms

microbiens en ressources nutritives et favorisant la stimulation des activités microbiennes. En dehors de la période pluvieuse, les flux de COD et de nutriments alimentant les biofilms sont beaucoup plus faibles et expliquent l'absence ou la faible stimulation des activités microbiennes en période sèche dans les zones impactées par les pratiques d'infiltration par rapport aux zones non-impactées. De la même manière que pour les activités, une augmentation de la diversité bactérienne entre les zones impactées et les zones non impactées de la nappe a été observée uniquement en période pluvieuse. Cette augmentation de diversité bactérienne peut être associée à un apport de composés organiques plus diversifiés à la nappe lors des épisodes de recharge, augmentant la diversité des groupes bactériens pouvant se développer localement (Flynn et al., 2013 ; Landa et al., 2013). Néanmoins, ce résultat peut aussi être lié à un transfert de bactéries issues de la surface (ou de la ZNS) vers la nappe lors de l'épisode de recharge, lesquelles vont augmenter la diversité bactérienne présente localement (Smith et al., 2018 ; Voisin et al., 2018). Les axes 2 et 3 de ma thèse avaient donc pour but d'approfondir la compréhension de ces processus en considérant les caractéristiques des bassins (en termes de transfert dans la zone non saturée) et les taux de recharge de la nappe pouvant conduire à ces modifications microbiologiques.

Afin d'aller plus loin sur les mécanismes de transfert pouvant expliquer l'impact des bassins d'infiltration sur la microbiologie de la nappe, l'axe 2 de ma thèse visait plus particulièrement à étudier l'influence de deux caractéristiques de la ZNS (épaisseur de ZNS et temps de transit) jouant sur les transferts chimiques et biologiques de la surface des bassins vers la nappe sur les changements microbiologiques dans la nappe. Le travail s'est basé sur l'étude de 6 bassins d'infiltration avec des ZNS contrastées afin de décrypter les influences relatives de l'épaisseur de ZNS et du temps de transit de l'eau de la surface vers la nappe. L'expérimentation a été réalisée lors de deux campagnes présentant des pluies cumulées comparables permettant de les considérer comme des répliques.

Les résultats obtenus ont clairement montré que le temps de transit de l'eau de la surface vers la nappe influençait la composition de la communauté bactérienne du biofilm, alors que ce n'était pas le cas pour l'épaisseur de la ZNS. En effet, plus le temps de transit mesuré était court (et donc le temps de rétention de l'eau dans la zone non saturée) et plus il a été observé une augmentation de la diversité bactérienne (Richesse et indice de Shannon) dans la zone impactée par les épisodes de recharge par rapport à la zone non-impactée. De la même

manière, les communautés bactériennes de la zone impactée par l'infiltration étaient d'autant plus divergentes des communautés de la zone non-impactée que le temps de transit était court (Indices de dissimilarité de Bray-Curtis et Unweighted UNIFRAC). Il faut cependant noter que cette augmentation de diversité et dissimilarité avec la diminution du temps de transit n'a pas été observée lorsque la phylogénie était prise en compte (avec l'indice PD et Weighted UNIFRAC, respectivement). Ce résultat indique que cette augmentation de diversité et de dissimilarité n'était pas liée à la présence d'ASV très divergents phylogénétiquement de la communauté en place. Comme ces changements de diversité bactérienne peuvent provenir de deux processus majeurs déjà abordés dans l'axe 1 de ma thèse (apport de composés organiques diversifiés à la nappe et/ou à un transfert de bactéries de la surface vers la nappe) qui ont pu être facilités par un temps de transit court entre la surface des bassins et la nappe, j'ai essayé d'intégrer plus particulièrement le transfert dans mes analyses en créant un indice de transfert microbien potentiel basés sur les indices de dissimilarités entre les communautés de surface, des zones impactées et des zones non-impactées par les bassins d'infiltration. Les résultats obtenus grâce à cet indice suggèrent un transfert bactérien de la surface vers la nappe d'autant plus important que le temps de transit est court, ce qui est cohérent avec des études précédentes sur des sites d'études considérés dans ma thèse (Voisin et al., 2018 ; Colin et al., 2020).

S'il apparaît que le temps de transit puisse expliquer en partie les changements de communautés bactériennes dans la nappe, le premier axe de ma thèse a mis en avant d'un épisode de recharge sur les activités microbiennes dans la nappe. Afin de prendre en compte le taux de recharge de la nappe au même titre que les caractéristiques des bassins associés à la ZNS (épaisseur de ZNS et temps de transit de la surface vers la nappe), l'axe 3 de ma thèse a eu pour objectif d'étudier les influences respectives de ces trois facteurs sur les modifications de la biomasse et des activités microbiennes de la nappe associées aux pratiques d'infiltration. Pour cela, j'ai pu utiliser un jeu de données conséquent basé sur 5 bassins d'infiltration étudiés lors de 6 périodes expérimentales de 10 jours caractérisées par des taux de recharge contrastés.

Les résultats obtenus ont confirmé l'influence significative du temps de transit sur la microbiologie de la nappe. En effet, pour des temps de transit inférieurs à 50 heures, une augmentation de la biomasse microbienne dans la zone impactée par les pratiques

d'infiltration par rapport à la zone non-impactée a été mesurée pour 85% des échantillons et cette augmentation était d'autant plus importante que le temps de transit était court. Ces résultats étaient associés à un enrichissement de la nappe en COD d'autant plus élevé que le temps de transit était court. Il a été possible d'en conclure qu'avec un temps de transit court, le temps de rétention de la matière organique dissoute apportée par les eaux de ruissellement pluvial dans la ZNS (par des phénomènes biotiques mais aussi abiotiques, Mermillod-Blondin et al. 2015) s'avérait trop court pour limiter l'enrichissement de la nappe en COD et son effet positif sur le développement du biofilm. De manière surprenante, pour des temps de transit supérieurs à 50 heures, une diminution de la biomasse dans la zone impactée par les pratiques d'infiltration par rapport à la zone non-impactée a pu être observée (sur 90% des échantillons). Ces résultats étaient probablement liés à un apport de d'eau d'infiltration moins chargée que la nappe en COD utilisable par les micro-organismes. En effet, plus le temps de transit est élevé et plus le COD de l'eau d'infiltration est retenu dans la ZNS, atteignant ainsi des concentrations en COD plus faibles que les concentrations mesurées dans la nappe. Ce phénomène pourrait ainsi expliquer l'effet négatif des pratiques d'infiltration sur le développement microbien dans la nappe. Néanmoins, un transfert de contaminants de la surface vers la nappe pourrait également être une hypothèse explicative pour l'inhibition de la biomasse microbienne dans certains cas.

Comme observé pour l'axe 1 de ma thèse, les épisodes de recharge de la nappe ont conduit en une stimulation des activités microbiennes dans la nappe. Les résultats de l'axe 3 ont permis de mettre en évidence une influence des taux de recharge sur cette stimulation. En effet, les plus fortes stimulations des activités microbiennes ont été mesurées là où les plus fortes élévations de la nappe phréatique ont été observées. Ces résultats confirment l'hypothèse selon laquelle plus les flux d'eau et de solutés dans la nappe sont importants et plus ils permettent d'alimenter les biofilms en ressources nutritives, stimulant leurs activités. Toutefois, les mêmes résultats surprenants que dans le cas de la biomasse microbienne ont été observés avec une inhibition des activités microbiennes dans les zones impactées par rapport aux zones non impactée par les pratiques d'infiltration. Contrairement à l'axe 1 de ma thèse qui n'a considéré qu'un épisode pluvieux, l'intégration de 6 épisodes pluvieux (associé à des taux de recharge de nappe contrastés) ont permis de mettre en évidence ce phénomène d'inhibition. Tout comme la biomasse, il est possible que cette inhibition soit liée à un apport

d'eau d'infiltration moins chargée que la nappe en éléments nécessaire à l'activité microbienne ou bien à l'apport de contaminants de type biocides. Des études complémentaires s'avèrent nécessaires afin d'identifier les facteurs responsables de l'inhibition des biofilms par l'infiltration des eaux de ruissellement pluvial dans la nappe.

En résumé, ma thèse a permis de démontrer que les changements microbiologiques associés aux pratiques d'infiltration des eaux de ruissellement pluvial étaient reliés à deux facteurs majeurs :

- Le temps de transfert de l'eau d'infiltration dans la zone non saturée qui joue sur la quantité de COD atteignant la nappe, permettant le développement d'une biomasse microbienne et favorisant certains groupes bactériens (Flavobactériales par exemple),
- Le taux de recharge de la nappe associé à l'évènement pluvieux considéré qui va accélérer les flux d'eau et de solutés dans la nappe, stimulant ainsi les activités microbiennes.

D'un point de vue appliqué, les travaux obtenus dans ma thèse permettent de ne plus considérer l'épaisseur de ZNS comme le facteur déterminant pour la protection des nappes (Doctrine eaux pluviales du SAGE EST LYONNAIS, 2016). En effet, considérer le temps de transit de l'eau de la surface vers la nappe permet d'avoir une vision beaucoup plus fonctionnelle de la ZNS et de sa capacité à retenir les composés organiques et les micro-organismes. Mon travail de thèse incite donc les gestionnaires de système de recharge des nappes par des eaux de surface à considérer le temps de transit comme le facteur majeur pour caractériser la performance environnementale des ouvrages plutôt que l'épaisseur de la ZNS. Aussi, favoriser des systèmes d'infiltration avec des temps de transit supérieurs à 50 heures pourrait être préconisé pour limiter la contamination des nappes de même nature que celles étudiées dans ma thèse. Néanmoins, certains résultats surprenants obtenus tels que l'inhibition du développement et des activités microbiennes par les bassins d'infiltration posent question. Des travaux complémentaires sont nécessaires pour déterminer les mécanismes responsables car ceux-ci peuvent être positifs (apport d'une eau d'infiltration moins chargée en COD que la nappe) ou négatifs (apports de biocides dans la nappe).

II. Perspectives

1) Transferts bactériens et changements physico-chimiques : évaluation de leur contribution dans les modifications de la composition des communautés bactériennes dans les eaux de nappes exposées aux pratiques d'infiltration d'eaux pluviales.

Les résultats de cette thèse ont démontré que l'infiltration pouvait engendrer des modifications de composition des communautés bactériennes de la nappe (Lebon et al., 2021). Ces modifications peuvent être associées à :

- des changements des conditions physico-chimiques, en particulier l'enrichissement en carbone organique dissous.
- au transfert de bactéries depuis la surface et la ZNS jusqu'à la nappe.

Afin de mieux comprendre la contribution de ces deux facteurs sur l'assemblage des communautés bactériennes de la nappe, une première perspective pourrait consister à exploiter l'algorithme PER-SIMPER développé par Gibert & Escarguel (2019) permettant de déterminer si une communauté est assemblée par « niche » et/ou par dispersion. En effet, les communautés assemblées par « niche » sont des assemblages dans lesquels les interactions biotiques, et plus particulièrement la compétition pour des ressources limitées, déterminent les espèces présentes au sein des communautés (Hubbell, 2001 ; Gibert & Escarguel., 2019). Dans notre cas, l'assemblage par niche peut être associé aux changements des conditions physico-chimiques liés aux pratiques d'infiltration, en particulier l'enrichissement en carbone organique dissous. L'assemblage des communautés par dispersion, quant à lui, peut être associé au transfert de bactéries de la surface vers la nappe lors des événements de recharge.

En complément de cette approche, des expérimentations réalisées en conditions contrôlées à l'échelle du laboratoire (microcosmes en colonnes expérimentales) permettraient de quantifier l'effet de ces facteurs en les testant de manière isolée et combinée. Pour cela, des colonnes expérimentales remplies de sédiments de nappe (provenant d'une zone impactée par l'infiltration) peuvent être alimentées en eau à l'aide d'une pompe péristaltique (Nogaro et al., 2007) afin de simuler un épisode de recharge de la nappe (infiltration). Les sédiments des colonnes peuvent être prélevés avant l'infiltration puis 10 jours après afin de caractériser les modifications de composition des communautés associées à l'infiltration par

métabarcoding ADN. Les colonnes peuvent être alimentées avec des eaux caractérisées par leur concentration en COD ainsi que leur composition bactérienne. Des colonnes peuvent ainsi être alimentées avec une eau de nappe (provenant du milieu où ont été prélevés les sédiments) enrichie en COD permettant de tester spécifiquement l'influence de l'enrichissement de la nappe en COD associé à l'infiltration sur la composition des communautés de la nappe. Afin d'étudier spécifiquement l'impact du transfert bactérien, l'eau de surface de bassin peut être diluée dans le but d'obtenir une eau avec des concentrations en COD du même ordre de grandeur que les concentrations retrouvées au niveau des sédiments de nappe en milieu naturel (inférieures à $2\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) et infiltrée au niveau des colonnes. En effet, on peut considérer que cette eau d'infiltration aura un effet très limité sur les conditions physico-chimiques au sein des colonnes (à cause de la dilution) alors qu'un effet de l'apport en bactéries allochtones peut potentiellement modifier la composition des communautés des colonnes. Enfin, des colonnes peuvent être alimentées avec une eau provenant de la surface de bassin (à la fois riche en COD et en bactéries allochtones), afin de tester l'effet combiné de l'enrichissement en COD et du transfert bactérien sur la composition des communautés microbiennes des nappes.

2) Dynamique de réponse des communautés bactériennes de la nappe face aux perturbations engendrées par l'infiltration des eaux pluviales sur des supports déjà colonisés.

Cette thèse a permis d'étudier l'impact des pratiques d'infiltration d'eaux pluviales sur la composition des communautés bactériennes de la nappe développées in situ la veille d'un événement pluvieux et durant 10 jours. Aussi, les résultats obtenus lors des différentes campagnes n'ont permis d'obtenir qu'une description ponctuelle des communautés bactériennes des nappes représentatives du milieu d'incubation. Etudier la dynamique de réponse des communautés microbiennes des nappes face aux perturbations engendrées par l'infiltration pourrait fortement aider à la compréhension des mécanismes en jeu dans l'évolution de leur composition. Pour cela, des supports artificiels peuvent être incubés en amont et en aval de bassins d'infiltration plus de 3 mois avant un événement pluvieux significatif afin de tester l'influence d'un épisode de recharge sur des communautés en place et non en phase exponentielle de développement. L'expérimentation consisterait à retirer les supports des piézomètres à différents intervalles de temps (juste avant, pendant et 3 mois

après perturbation (voir Fig 6.2) afin de pouvoir suivre l'évolution des compositions des communautés au cours du temps. De la même manière que dans cette thèse, des analyses par métabarcoding ADN (ciblant le gène codant l'ARNr 16S) pourront être effectuées afin de déterminer la composition des communautés.

3 scénarios peuvent être envisagés :

- Les compositions des communautés peuvent être résistantes à la perturbation : composition très peu modifiée par la perturbation (trait pointillé bleu – (1) – Fig 6.2)
- Des modifications de la composition des communautés peuvent être observées à court terme avant qu'elles ne retrouvent leur état d'avant perturbation : résilience (trait rouge – (2) – Fig 6.2).
- Les modifications de la composition des communautés peuvent être persistantes, sans retour des communautés à leur état initial durant la période d'étude (atteinte d'un état alternatif) (trait vert – (3) – Fig 6.2).

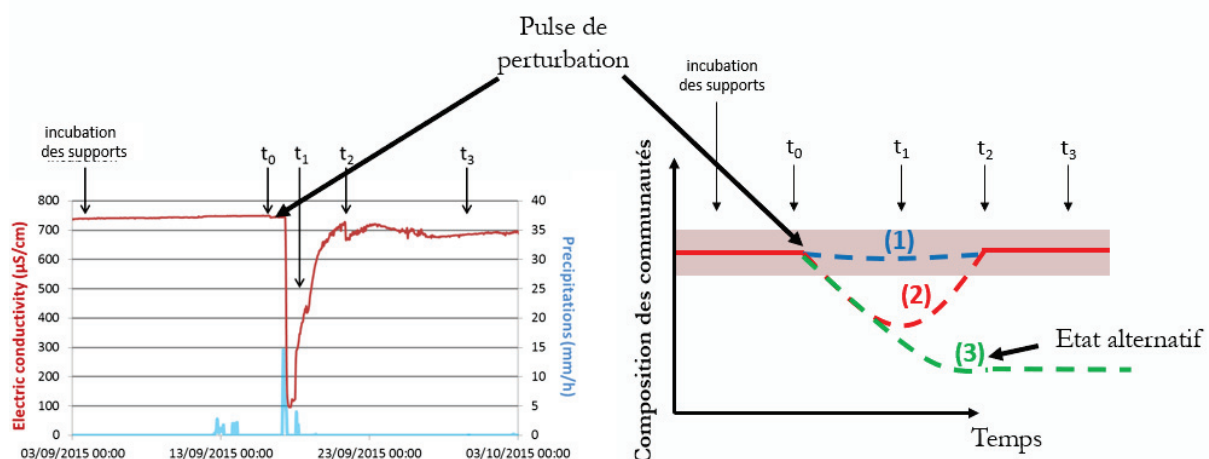


Figure 6.2 : Schéma (sur la gauche) représentant l'impact d'une pluie (en bleu) sur la conductivité électrique (en rouge) de la nappe sous l'influence d'un bassin d'infiltration. Schéma théorique (sur la droite) indiquant trois scénarios de réponse des micro-organismes à ce type de perturbation avec les hypothèses de résistance (en bleu), de résilience (en rouge) ou de changement d'état (en vert) pour la composition des communautés microbiennes. Les indications de T0 à T4 correspondent aux dates d'échantillonnage des micro-organismes.

Cette dernière hypothèse (Etat alternatif (3) – Fig 6.2) semble être la plus probable étant donné les dissimilarités importantes entre les communautés des zones impactées et non-impactées retrouvées dans cette thèse, que ce soit en période sèche ou pluvieuse. Cette hypothèse peut être appuyée par les travaux de Yan et al. (2021) qui démontrent que les

événements de recharges successifs des nappes aboutissent à des communautés de plus en plus différentes du point de temps de référence initial.

Cette expérimentation permettrait ainsi (1) d'étudier l'évolution temporelle des communautés en l'absence de perturbation (pendant la période 3 mois avant l'évènement pluvieux), (2) d'étudier l'impact de l'infiltration sur des communautés déjà établies dans le but de mieux comprendre l'impact sur le long terme (3 mois) des bassins d'infiltration sur la composition des communautés.

En complément de cette approche, une description des communautés bactériennes par métabarcoding ARN (ciblant l'ARNr 16S) peut être envisagée afin de comparer la composition des communautés « totales » et des communautés « actives » et d'observer quels taxons sont métaboliquement actifs (en termes de modification de la quantité de copies d'ARN 16S sur la quantité d'ADN 16S codant pour le même taxon).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J., 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, 215(3), 403-410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)

Amy, G., and Drewes, J., 2007. Soil aquifer treatment (SAT) as a natural and sustainable wastewater reclamation/reuse technology: fate of wastewater effluent organic matter (EfOM) and trace organic compounds. *Environmental Monitoring and Assessment*, 129(1), 19-26. <https://doi.org/10.1007/s10661-006-9421-4>

Anantharaman, K., Brown, C. T., Hug, L. A., Sharon, I., Castelle, C. J., Probst, A. J., ... & Banfield, J. F., 2016. Thousands of microbial genomes shed light on interconnected biogeochemical processes in an aquifer system. *Nature communications*, 7(1), 1-11. <https://doi.org/10.1038/ncomms13219>

Andres, A. S., and Sims, J. T., 2013. Assessing potential impacts of a wastewater rapid infiltration basin system on groundwater quality: a Delaware case study. *Journal of Environmental Quality*, 42(2), 391-404. <https://doi.org/10.2134/jeq2012.0273>.

Angel, S., Parent, J., Civco, D. L., Blei, A., & Potere, D., 2011. The dimensions of global urban expansion: Estimates and projections for all countries, 2000–2050. *Progress in Planning*, 75(2), 53-107. <https://doi.org/10.1016/j.progress.2011.04.001>

Arnaud, E., Best, A., Parker, B. L., Aravena, R., & Dunfield, K., 2015. Transport of *Escherichia coli* through a thick vadose zone. *Journal of Environmental Quality*, 44(5), 1424-1434. <https://doi.org/10.2134/jeq2015.02.0067>

Arnold Jr, C. L., and Gibbons, C. J., 1996. Impervious surface coverage: the emergence of a key environmental indicator. *Journal of the American Planning Association*, 62(2), 243-258. <https://doi.org/10.1080/01944369608975688>.

Attard G., 2017. Impacts des ouvrages souterrains sur l'eau souterraine urbaine : Application à l'agglomération lyonnais. 151, PhD thesis. Université Lyon 1, Lyon, France.

Aubel et al., 2019. Bulletin n°5 : prélèvements quantitatifs sur la ressource en eau. Agence Française pour la Biodiversité, 12.

Avishai, L., Siebner, H., Dahan, O., and Ronen, Z., 2017. Using the natural biodegradation potential of shallow soils for in-situ remediation of deep vadose zone and groundwater. *Journal of Hazardous Materials*, 324, 398-405. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.11.003>

B

Bahar, T., Oxarango, L., Castebrunet, H., Rossier, Y., and Mermillod-Blondin, F., 2021. 3D modelling of solute transport and mixing during managed aquifer recharge with an infiltration basin. *Journal of Contaminant Hydrology*, 237, 103758. <https://doi.org/10.1016/j.jconhyd.2020.103758>.

Bahram, M., Anslan, S., Hildebrand, F., Bork, P., & Tedersoo, L., 2019. Newly designed 16S rRNA metabarcoding primers amplify diverse and novel archaeal taxa from the environment. *Environmental microbiology reports*, 11(4), 487-494. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12684>

Bar-On, Y. M., Phillips, R., & Milo, R., 2018. The biomass distribution on Earth. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(25), 6506-6511. <https://doi.org/10.1073/pnas.1711842115>

- Barba, C., Folch, A., Gaju, N., Sanchez-Vila, X., Carrasquilla, M., Grau-Martínez, A., and Martínez-Alonso, M., 2019 (a). Microbial community changes induced by Managed Aquifer Recharge activities: linking hydrogeological and biological processes. *Hydrology and Earth system sciences*, 23(1), 139-154. <https://doi.org/10.5194/hess-23-139-2019>
- Barba, C., Folch, A., Sanchez-Vila, X., Martínez-Alonso, M., Gaju, N., 2019 (b). Are dominant microbial sub-surface communities affected by water quality and soil characteristics? *J. Environ. Manage.* 237, 332–343. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.02.079>
- Barraud, S., Gautier, A., Bardin, J.-P., Riou, V., 1999. The impact of intentional stormwater infiltration on soil and groundwater. *Water Sci. Technol.* 39, 185. [https://doi.org/10.1016/S0273-1223\(99\)00022-0](https://doi.org/10.1016/S0273-1223(99)00022-0)
- Barraud, S., Gibert, J., Winiarski, T., & Bertrand Krajewski, J. L., 2002. Implementation of a monitoring system to measure impact of stormwater runoff infiltration. *Water Science and Technology*, 45(3), 203-210. <https://doi.org/10.2166/wst.2002.0080>
- Battin T.J., Sengschmitt D., 1999. Linking sediment biofilms, hydrodynamics, and river bed clogging: evidence from a large river. *Microb Ecol.* 37(3),185-196. [doi:10.1007/s002489900142](https://doi.org/10.1007/s002489900142)
- Battin, T.J., 2000. Hydrodynamics is a major determinant of streambed biofilm activity: From the sediment to the reach scale. *Limnol. Oceanogr.* 45, 1308–1319. <https://doi.org/10.4319/lo.2000.45.6.1308>
- Battin, T. J., Besemer, K., Bengtsson, M. M., Romani, A. M., and Packmann, A. I., 2016. The ecology and biogeochemistry of stream biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, 14(4), 251-263. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.15>

Beaton, E. D., Stevenson, B. S., King-Sharp, K. J., Stamps, B. W., Nunn, H. S., & Stuart, M., 2016. Local and regional diversity reveals dispersal limitation and drift as drivers for groundwater bacterial communities from a fractured granite formation. *Frontiers in microbiology*, 7, 1933. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01933>

Beckers, B., Op De Beeck, M., Thijs, S., Truyens, S., Weyens, N., Boerjan, W., Vangronsveld, J., 2016. Performance of 16s rDNA primer pairs in the study of rhizosphere and endosphere bacterial microbiomes in metabarcoding studies. *Front. Microbiol.* 7, 650. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00650>

Beganskas, S., and Fisher, A. T., 2017. Coupling distributed stormwater collection and managed aquifer recharge: Field application and implications. *Journal of Environmental Management*, 200, 366-379. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.05.058>.

Bekele E., Toze, S., Patterson, B., and Higginson, S., 2011. Managed aquifer recharge of treated wastewater: Water quality changes resulting from infiltration through the vadose zone. *Water Research*, 45(17), 5764-5772. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.08.058>

Ben Maamar, S., Aquilina, L., Quaiser, A., Pauwels, H., Michon-Coudouel, S., Vergnaud-Ayraud, V., ... & Dufresne, A., 2015. Groundwater isolation governs chemistry and microbial community structure along hydrologic flowpaths. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1457. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01457>

Bengtsson, G., 1989. Growth and metabolic flexibility in groundwater bacteria. *Microb. Ecol.* 18, 235–248. <https://doi.org/10.1007/BF02075811>

Benz, S. A., Bayer, P., & Blum, P., 2017. Global patterns of shallow groundwater temperatures. *Environmental Research Letters*, 12(3), 034005.

- Beyer, A., Rzanny, M., Weist, A., Möller, S., Burow, K., Gutmann, F., ... & Kothe, E., 2015. Aquifer community structure in dependence of lithostratigraphy in groundwater reservoirs. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(24), 19342-19351. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4682-5>
- Beyer, C., Popp, S., & Bauer, S., 2016. Simulation of temperature effects on groundwater flow, contaminant dissolution, transport and biodegradation due to shallow geothermal use. *Environmental Earth Sciences*, 75(18), 1-20. <https://doi.org/10.1007/s12665-016-5976-8>
- Blaxter, M., Mann, J., Chapman, T., Thomas, F., Whitton, C., Floyd, R., & Abebe, E., 2005. Defining operational taxonomic units using DNA barcode data. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360(1462), 1935-1943. <https://doi.org/10.1098/rstb.2005.1725>
- Bonte, M., Röling, W. F., Zaura, E., van der Wielen, P. W., Stuyfzand, P. J., & van Breukelen, B. M., 2013. Impacts of shallow geothermal energy production on redox processes and microbial communities. *Environmental science & technology*, 47(24), 14476-14484. <https://doi.org/10.1021/es4030244>
- Borchardt, M. A., Bradbury, K. R., Gotkowitz, M. B., Cherry, J. A., & Parker, B. L., 2007. Human enteric viruses in groundwater from a confined bedrock aquifer. *Environmental science & technology*, 41(18), 6606-6612. <https://doi.org/10.1021/es071110+>
- Bou, C., Rouch, R., 1967. Un nouveau champ de recherches sur la faune aquatique souterraine. *CR Acad Sci* 265, 369–370.
- Bouwer, H., 2002. Artificial recharge of groundwater: hydrogeology and engineering. *Hydrogeology journal*, 10(1), 121-142. <https://doi.org/10.1007/s10040-001-0182-4>

Bradford, S. A., & Torkzaban, S., 2008. Colloid transport and retention in unsaturated porous media: A review of interface-, collector-, and pore-scale processes and models. *Vadose Zone Journal*, 7(2), 667-681. <https://doi.org/10.2136/vzj2007.0092>

Brettar, I., 2006. *Rheinheimera perlucida* sp. nov., a marine bacterium of the Gammaproteobacteria isolated from surface water of the central Baltic Sea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 2177–2183. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64172-0>

Briellmann, H., Lueders, T., Avramov, M., Griebler, C., Schreglmann, K., Ferraro, F., ... & Bayer, P., 2011. Shallow geothermal energy usage and its potential impacts on groundwater ecosystems; Oberflaechennahe Geothermie und ihre potenziellen Auswirkungen auf Grundwasseroekosysteme. *Grundwasser*, 16. DOI 10.1007/s00767-011-0166-9

Brindha, K., Pavelic, P., and Sotoukee, T., 2019. Environmental assessment of water and soil quality in the Vientiane Plain, Lao PDR. *Groundwater for Sustainable Development*, 8, 24-30. <https://doi.org/10.1016/j.gsd.2018.08.005>.

C

Caballero et al., 2018. Analyse de la faisabilité de la recharge artificielle dans le bassin RMC : contexte et analyse cartographique. BRGM-67534-FR, 166.

Callahan, B. J., McMurdie, P. J., & Holmes, S. P., 2017. Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *The ISME journal*, 11(12), 2639-2643. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.119>

Capella-Gutiérrez, S., Silla-Martínez, J. M., & Gabaldón, T., 2009. trimAl: a tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses. *Bioinformatics*, 25(15), 1972-1973. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp348>

Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Huntley, J., Fierer, N., ... & Knight, R. (2012). Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *The ISME journal*, 6(8), 1621-1624. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.8>

Carlson, C.A., Del Giorgio, P.A., Herndl, G.J., 2007. Microbes and the dissipation of energy and respiration: from cells to ecosystems. *Oceanography* 20, 89–100. <https://doi.org/10.5670/oceanog.2007.52>

Carminati, A., Vetterlein, D., Weller, U., Vogel, H. J., & Oswald, S. E., 2009. When roots lose contact. *Vadose Zone Journal*, 8(3), 805-809. <https://doi.org/10.2136/vzj2008.0147>

Cavalca, L., Dell'Amico, E., Andreoni, V., 2004. Intrinsic bioremediability of an aromatic hydrocarbon-polluted groundwater: diversity of bacterial population and toluene monooxygenase genes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64, 576–587. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1449-6>

Characklis, W. G., Marshall, K. C., & McFeters, G. A., 1990. The microbial cell. In *Biofilms*, 131-159.

Chase, J. M., & Myers, J. A., 2011. Disentangling the importance of ecological niches from stochastic processes across scales. *Philosophical transactions of the Royal Society B: Biological sciences*, 366(1576), 2351-2363. <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0063>

Chatterji, T., & Kumar, S., 2022. Biofilm in remediation of pollutants. In *Biological Approaches to Controlling Pollutants*, 399-417. Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-824316-9.00019-7>

Chen, L., Hu, B. X., Dai, H., Zhang, X., Xia, C. A., & Zhang, J., 2019. Characterizing microbial diversity and community composition of groundwater in a salt-freshwater transition zone. *Science of the total environment*, 678, 574-584. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.017>

Cho, J.-C., Kim, S.-J., 2000. Increase in bacterial community diversity in subsurface aquifers receiving livestock wastewater input. *Appl Env. Microbiol* 66, 956–965. <https://doi.org/10.1128/aem.66.3.956-965.2000>

Chrost R.J. Environmental control of the synthesis and activity of aquatic microbial ectoenzymes. In: Chrost, R.J., *Microbial enzymes in aquatic environments*. Springer-Verlag, 1991, 29-59. 10.1007/978-1-4612-3090-8

Colin, Y., Bouchali, R., Marjolet, L., Marti, R., Vautrin, F., Voisin, J., Bourgeois, E., Rodriguez-Nava, V., Blaha, D., Winiarski, T., Mermillod-Blondin, F., Cournoyer, B., 2020. Coalescence of bacterial groups originating from urban runoffs and artificial infiltration systems among aquifer microbiomes. *Hydrol. Earth Syst. Sci. Discuss.* 1–28. <https://doi.org/10.5194/hess-2020-39>

Cornell, H. V., & Harrison, S. P. (2014). What are species pools and when are they important?. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 45, 45-67.

D

Da Costa, L. R. D., Monteiro, J. P. P. G., and Hugman, R. T., 2020. Assessing the use of harvested greenhouse runoff for managed aquifer recharge to improve groundwater status in South Portugal. *Environmental Earth Sciences*, 79, 1-15. <https://doi.org/10.1007/s12665-020-09003-5>.

Datry T., 2003. Urbanisation et qualité des nappes phréatiques : réponse des écosystèmes aquatiques souterrains aux pratiques d'infiltration d'eau pluviale. PhD thesis. Université Lyon 1, Lyon, France, 234.

Datry, T., Malard, F., Vitry, L., Hervant, F., Gibert, J., 2003. Solute dynamics in the bed sediments of a stormwater infiltration basin. *J. Hydrol.* 273, 217–233.
[https://doi.org/10.1016/S0022-1694\(02\)00388-8](https://doi.org/10.1016/S0022-1694(02)00388-8)

Datry, T., Malard, F., Gibert, J., 2004. Dynamics of solutes and dissolved oxygen in shallow urban groundwater below a stormwater infiltration basin. *Sci. Total Environ.* 329, 215–229.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.02.022>

Datry, T., Malard, F., Gibert, J., 2005. Response of invertebrate assemblages to increased groundwater recharge rates in a phreatic aquifer. *J. North Am. Benthol. Soc.* 24, 461–477.
<https://doi.org/10.1899/04-140.1>

Datry, T., Malard, F., & Gibert, J., 2006. Effects of artificial stormwater infiltration on urban groundwater ecosystems. In *Urban groundwater management and sustainability*, 331-345. Springer, Dordrecht. 10.1007/1-4020-5175-1_27

De Lambert, J. R., Walsh, J. F., Scher, D. P., Firnstahl, A. D., & Borchardt, M. A., 2021. Microbial pathogens and contaminants of emerging concern in groundwater at an urban subsurface stormwater infiltration site. *Science of the Total Environment*, 775, 145738.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145738>

Dechesne, M., Barraud, S., and Bardin, J. P., 2005. Experimental assessment of stormwater infiltration basin evolution. *Journal of Environmental Engineering*, 131(7), 1090-1098.
[https://doi-org/10.1061/\(ASCE\)0733-9372\(2005\)131:7\(1090\)](https://doi-org/10.1061/(ASCE)0733-9372(2005)131:7(1090)).

Dillon, P., Toze, S., Page, D., Vanderzalm, J., Bekele, E., Sidhu, J., and Rinck-Pfeiffer, S., 2010. Managed aquifer recharge: rediscovering nature as a leading edge technology. *Water Science and Technology*, 62(10), 2338-2345. <https://doi.org/10.2166/wst.2010.444>.

Dobson, R., Schroth, M. H., and Zeyer, J., 2007. Effect of water-table fluctuation on dissolution and biodegradation of a multi-component, light nonaqueous-phase liquid. *Journal of Contaminant Hydrology*, 94(3-4), 235-248. <https://doi.org/10.1016/j.jconhyd.2007.07.007>.

Drewes, J. E., & Fox, P., 1999. Fate of natural organic matter (NOM) during groundwater recharge using reclaimed water. *Water Science and Technology*, 40(9), 241-248. [https://doi.org/10.1016/S0273-1223\(99\)00662-9](https://doi.org/10.1016/S0273-1223(99)00662-9)

E

Eiler, A., Langenheder, S., Bertilsson, S., & Tranvik, L. J., 2003. Heterotrophic bacterial growth efficiency and community structure at different natural organic carbon concentrations. *Applied and environmental microbiology*, 69(7), 3701-3709. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.7.3701-3709.2003>

Escudié, F., Auer, L., Bernard, M., Mariadassou, M., Cauquil, L., Vidal, K., Maman, S., Hernandez-Raquet, G., Combes, S., Pascal, G., 2018. FROGS: Find, rapidly, OTUs with galaxy solution. *Bioinformatics* 34, 1287–1294. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx791>

F

Fadeev, E., Cardozo-Mino, M. G., Rapp, J. Z., Bienhold, C., Salter, I., Salman-Carvalho, V., ... & Boetius, A., 2021. Comparison of two 16S rRNA primers (V3–V4 and V4–V5) for studies of arctic microbial communities. *Frontiers in microbiology*, 12, 283. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.637526>

Fandino, L.B., Riemann, L., Steward, G.F., Azam, F., 2005. Population dynamics of Cytophaga-Flavobacteria during marine phytoplankton blooms analyzed by real-time quantitative PCR. *Aquat. Microb. Ecol.* 40, 251–257. <https://doi.org/10.3354/ame040251>

Ferris, F. Grant, Natalie Szponar, and Brock A. Edwards, 2021, *Groundwater Microbiology. The Groundwater Project*, Guelph, Ontario, Canada. ISBN: 978-1-77470-005-1, 66.

Fillinger, L., Zhou, Y., Kellermann, C., Griebler, C., 2019. Non-random processes determine the colonization of groundwater sediments by microbial communities in a pristine porous aquifer. *Environ. Microbiol.* 21, 327–342. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14463>

Fillinger, L., Hug, K., and Griebler, C., 2021. Aquifer recharge viewed through the lens of microbial community ecology: initial disturbance response and impacts of species sorting versus mass effects on microbial community assembly in groundwater during riverbank filtration. *Water Research*, 189, 116631. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116631>.

Findlay, S.E.G., Sinsabaugh, R.L., Sobczak, W.V., Hoostal, M., 2003. Metabolic and structural response of hyporheic microbial communities to variations in supply of dissolved organic matter. *Limnol. Oceanogr.* 48, 1608–1617. <https://doi.org/10.4319/lo.2003.48.4.1608>

Fischer, D., Charles, E. G., & Baehr, A. L., 2003. Effects of stormwater infiltration on quality of groundwater beneath retention and detention basins. *Journal of Environmental Engineering*, 129(5), 464-471. [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)0733-9372\(2003\)129:5\(464\)](https://doi.org/10.1061/(ASCE)0733-9372(2003)129:5(464))

Flemming, H. C., Neu, T. R., & Wozniak, D. J., 2007. The EPS matrix: the “house of biofilm cells”. *Journal of bacteriology*, 189(22), 7945-7947. <https://doi.org/10.1128/JB.00858-07>

Flemming, H.C. and Wingender, J., 2010 *The Biofilm Matrix*. *Nature Reviews Microbiology*, 8, 623-633. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2415>

Flemming, H. C., & Wuertz, S., 2019. Bacteria and archaea on Earth and their abundance in biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, 17(4), 247-260. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0158-9>

Fletcher, T.D., Shuster, W., Hunt, W.F., Ashley, R., Butler, D., Arthur, S., Trowsdale, S., Barraud, S., Semadeni-Davies, A., Bertrand-Krajewski, J.-L., others, 2015. SUDS, LID, BMPs, WSUD and more—The evolution and application of terminology surrounding urban drainage. *Urban Water J.* 12, 525–542. <https://doi.org/10.1080/1573062x.2014.916314>

Flörke, M., Schneider, C., McDonald, R.I., 2018. Water competition between cities and agriculture driven by climate change and urban growth. *Nat. Sustain.* 1, 51–58. <https://doi.org/10.1038/s41893-017-0006-8>

Flynn, T.M., Sanford, R.A., Ryu, H., Bethke, C.M., Levine, A.D., Ashbolt, N.J., Santo Domingo, J.W., 2013. Functional microbial diversity explains groundwater chemistry in a pristine aquifer. *BMC Microbiol.* 13, 146. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-146>

Fontvieille, D.A., Outaguerouine, A., Thevenot, D.R., 1992. Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of microbial activity in aquatic systems: Application to activated sludges. *Environ. Technol.* 13, 531–540. <https://doi.org/10.1080/09593339209385181>

Foulquier A., 2009. *Écologie fonctionnelle dans les nappes phréatiques: liens entre flux de matière organique, activité et diversité biologiques..* PhD thesis. Université Lyon 1, Lyon, France, 276.

Foulquier, A., Malard, F., Barraud, S., Gibert, J., 2009. Thermal influence of urban groundwater recharge from stormwater infiltration basins. *Hydrol. Process.* 23, 1701–1713. <https://doi.org/10.1002/hyp.7305>

- Foulquier, A., Malard, F., Mermillod-Blondin, F., Datry, T., Simon, L., Montuelle, B., Gibert, J., 2010 (a). Vertical change in dissolved organic carbon and oxygen at the water table region of an aquifer recharged with stormwater: biological uptake or mixing? *Biogeochemistry* 99, 31–47. <https://doi.org/10.1007/s10533-009-9388-7>
- Foulquier, A., Simon, L., Gilbert, F., Fourel, F., Malard, F., and Mermillod-Blondin, F., 2010 (b). Relative influences of DOC flux and subterranean fauna on microbial abundance and activity in aquifer sediments: new insights from ¹³C-tracer experiments. *Freshwater Biology*, 55(7), 1560-1576. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2010.02385.x>.
- Foulquier, A., Mermillod-Blondin, F., Malard, F., Gibert, J., 2011. Response of sediment biofilm to increased dissolved organic carbon supply in groundwater artificially recharged with stormwater. *J. Soils Sediments* 11, 382–393. <https://doi.org/10.1007/s11368-010-0323-2>
- Franklin, R. B., Taylor, D. R., & Mills, A. L., 1999. The distribution of microbial communities in anaerobic and aerobic zones of a shallow coastal plain aquifer. *Microbial ecology*, 38(4), 377-386. <https://doi.org/10.1007/s002489900179>
- Freimann, R., Bürgmann, H., Findlay, S.E., Robinson, C.T., 2015. Hydrologic linkages drive spatial structuring of bacterial assemblages and functioning in alpine floodplains. *Front. Microbiol.* 6, 1221. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01221>
- Freund, R. J., Littell, R. C., and Specter, P. C., 1986. SAS system for linear models. SAS Institute. Inc., Cary, NC, 210. ISBN-10: 9781555444303
- Fritch, T.G., McKnight, C.L., Yelderman Jr, J.C., Arnold, J.G., 2000. An aquifer vulnerability assessment of the Paluxy aquifer, central Texas, USA, using GIS and a modified DRASTIC approach. *Environ. Manage.* 25, 337–345. <https://doi.org/10.1007/s002679910026>

G

Gao, B., Saiers, J. E., and Ryan, J., 2006. Pore-scale mechanisms of colloid deposition and mobilization during steady and transient flow through unsaturated granular media. *Water Resources Research*, 42(1). <https://doi.org/10.1029/2005WR004233>.

Garimella, S., Kugle, K., Kssoju, A., & Merugu, R., 2017. Current status on single cell protein (SCP) production from photosynthetic purple non sulfur bacteria. *J. Chem. Pharma. Sci*, 10, 915-922. ISSN: 0974-2115

Gasperi, J., Sebastian, C., Ruban, V., Delamain, M., Percot, S., Wiest, L., Mirande, C., Caupos, E., Demare, D., Diallo Kessoo Kessoo, M., Saad, M., Schwartz, J. J., Dubois, P., Fratta, C., Wolff, H., Moilleron, R., Chebbo, G., Cren, C., Millet, M., Barraud, S. and Gromaire, M. C., 2014. Micropollutants in urban stormwater: occurrence, concentrations, and atmospheric contributions for a wide range of contaminants in three French catchments. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(8), 5267-5281. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-2396-0>.

Gette-Bouvarot M., 2013. Rôle du compartiment biologique dans les processus de colmatage et décolmatage de bassins d'infiltration. PhD thesis. Université Lyon 1, Lyon, France, 297.

Gibert et al., 1994. *Groundwater Ecology*, 571. ISBN: 978-0-08-050762-0

Gibert, C., & Escarguel, G., 2019. PER-SIMPER—A new tool for inferring community assembly processes from taxon occurrences. *Global Ecology and Biogeography*, 28(3), 374-385. <https://doi.org/10.1111/geb.12859>

Goldscheider, N., Hunkeler, D., Rossi, P., 2006. Microbial biocenoses in pristine aquifers and an assessment of investigative methods. *Hydrogeol. J.* 14, 926–941.
<https://doi.org/10.1007/s10040-005-0009-9>

Gorski, G., Dailey, H., Fisher, A. T., Schrad, N., & Saltikov, C., 2020. Denitrification during infiltration for managed aquifer recharge: Infiltration rate controls and microbial response. *Science of the Total Environment*, 727, 138642.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138642>

Goutaland, D., 2003. Caractérisation hydrogéophysique d'un dépôt fluvioglaciaire : évaluation de l'effet de l'hétérogénéité hydrodynamique sur les écoulements en zone non-saturée. PhD thesis. Université Lyon 1, Lyon, France, 241.

Goutaland, D., Winiarski, T., Dubé, J.-S., Bièvre, G., Buoncristiani, J.-F., Chouteau, M., and Giroux, B., 2008. Hydrostratigraphic characterization of glaciofluvial deposits underlying an infiltration basin using ground penetrating radar. *Vadose Zone Journal* 7:194–207.
<https://doi.org/10.2136/vzj2007.0003>.

Goutaland, D., Winiarski, T., Lassabatere, L., Dubé, J. S., and Angulo-Jaramillo, R., 2013. Sedimentary and hydraulic characterization of a heterogeneous glaciofluvial deposit: Application to the modeling of unsaturated flow. *Engineering Geology*, 166, 127-139.
<https://doi.org/10.1016/j.enggeo.2013.09.006>.

Gouy, M., Guindon, S., Gascuel, O., 2010. SeaView Version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol. Biol. Evol.* 27, 221–224.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msp259>

Grebel, J. E., Mohanty, S. K., Torkelson, A. A., Boehm, A. B., Higgins, C. P., Maxwell, R. M., Nelson, Kara L. and Sedlak, D. L., 2013. Engineered infiltration systems for urban stormwater reclamation. *Environmental Engineering Science*, 30(8), 437-454. <https://doi.org/10.1089/ees.2012.0312>.

Griebler, C., & Lueders, T., 2009. Microbial biodiversity in groundwater ecosystems. *Freshwater biology*, 54(4), 649-677. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2008.02013.x>

Griebler, C., Avramov, M., 2015. Groundwater ecosystem services: a review. *Freshw. Sci.* 34, 355–367. <https://doi.org/10.1086/679903>

Grösbacher, M., Eckert, D., Cirpka, O.A., Griebler, C., 2018. Contaminant concentration versus flow velocity: drivers of biodegradation and microbial growth in groundwater model systems. *Biodegradation* 29, 211–232. <https://doi.org/10.1007/s10532-018-9824-2>

Guillemin, C., & Roux, J. C., 1992. 13.-Pollution des nappes souterraines en France-Bilan des connaissances et des impacts. Analyse et recommandations du groupe de travail de l'Académie des Sciences. *Journées de l'hydraulique*, 22(3), 1-20.

Guo, L., Wang, G., Sheng, Y., Shi, Z., & Sun, X., 2019. Groundwater microbial communities and their connection to hydrochemical environment in Golmud, Northwest China. *Science of the Total Environment*, 695, 133848. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.133848>

H

He, Z., Ning, Z., Yang, M., Huang, G., Cui, H., Wang, H., Sun, J., 2019. The characterization of microbial communities response to shallow groundwater contamination in typical Piedmont region of Taihang Mountains in the north China Plain. *Water* 11, 736. <https://doi.org/10.3390/w11040736>

Healy, R. W., and Cook, P. G., 2002. Using groundwater levels to estimate recharge. *Hydrogeology journal*, 10(1), 91-109. <https://doi.org/10.1007/s10040-001-0178-0>

Heibl, C., 2008. Interfaces to Phylogenetic Software in R

Heino, J., Melo, A. S., Siqueira, T., Soininen, J., Valanko, S., & Bini, L. M., 2015. Metacommunity organisation, spatial extent and dispersal in aquatic systems: patterns, processes and prospects. *Freshwater Biology*, 60(5), 845-869. <https://doi.org/10.1111/fwb.12533>

Heinz, J., Kleineidam, S., Teutsch, G., & Aigner, T., 2003. Heterogeneity patterns of Quaternary glaciofluvial gravel bodies (SW-Germany): application to hydrogeology. *Sedimentary geology*, 158(1-2), 1-23. [https://doi.org/10.1016/S0037-0738\(02\)00239-7](https://doi.org/10.1016/S0037-0738(02)00239-7)

Hemme, C. L., Tu, Q., Shi, Z., Qin, Y., Gao, W., Deng, Y., ... & Zhou, J., 2015. Comparative metagenomics reveals impact of contaminants on groundwater microbiomes. *Frontiers in microbiology*, 6, 1205. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01205>

Her, N., Amy, G., McKnight, D., Sohn, J., Yoon, Y., 2003. Characterization of DOM as a function of MW by fluorescence EEM and HPLC-SEC using UVA, DOC, and fluorescence detection. *Water Res.* 37, 4295–4303. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(03\)00317-8](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(03)00317-8)

Hérivaux, C., Maréchal, J.C., 2019. Prise en compte des services dépendants des aquifères dans les démarches d'évaluation des services écosystémiques - Rapport final. BRGM, 107. (hal-02865261)

Herzyk, A., Fillinger, L., Larentis, M., Qiu, S., Maloszewski, P., Hünninger, M., Schmidt, S.I., Stumpp, C., Marozava, S., Knappett, P.S.K., Elsner, M., Meckenstock, R., Lueders, T., Griebler, C., 2017. Response and recovery of a pristine groundwater ecosystem impacted by

toluene contamination – A meso-scale indoor aquifer experiment. *J. Contam. Hydrol.* 207, 17–30. <https://doi.org/10.1016/j.jconhyd.2017.10.004>

Hoffman, M., & Decho, A. W., 1999. Extracellular enzymes within microbial biofilms and the role of the extracellular polymer matrix. In *Microbial extracellular polymeric substances* (pp. 217-230). Springer, Berlin, Heidelberg. [10.1007/978-3-642-60147-7_12](https://doi.org/10.1007/978-3-642-60147-7_12)

Hofmann, R., Griebler, C., 2018. DOM and bacterial growth efficiency in oligotrophic groundwater: absence of priming and co-limitation by organic carbon and phosphorus. *Aquat. Microb. Ecol.* 81, 55–71. <https://doi.org/10.3354/ame01862>

Höhener, P., & Ponsin, V., 2014. In situ vadose zone bioremediation. *Current opinion in biotechnology*, 27, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.08.018>

Houri-Davignon, C., Relexans, J.C., Etcheber, H., 1989. Measurement of actual electron transport system (ETS) activity in marine sediments by incubation with INT. *Environ. Technol. Lett.* 10, 91–100. <https://doi.org/10.1080/09593338909384722>

Hubbell, S. P., 2011. *The unified neutral theory of biodiversity and biogeography* (MPB-32). Princeton University Press, 371. <https://doi.org/10.1515/9781400837526>

Hug, L. A., Baker, B. J., Anantharaman, K., Brown, C. T., Probst, A. J., Castelle, C. J., ... & Banfield, J. F., 2016. A new view of the tree of life. *Nature microbiology*, 1(5), 1-6. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.48>

Hunt, W. F., Hathaway, J. M., Winston, R. J., and Jadlocki, S. J., 2010. Runoff volume reduction by a level spreader–vegetated filter strip system in suburban Charlotte, NC. *Journal of Hydrologic Engineering*, 15(6), 499-503. [https://doi-org/10.1061/\(ASCE\)HE.1943-5584.0000160](https://doi-org/10.1061/(ASCE)HE.1943-5584.0000160).

J

Jacobson, C. R., 2011. Identification and quantification of the hydrological impacts of imperviousness in urban catchments: A review. *Journal of environmental management*, 92(6), 1438-1448. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2011.01.018>

Jebreen, H., Wohnlich, S., Banning, A. et al. Recharge, geochemical processes and water quality in karst aquifers: Central West Bank, Palestine. *Environ Earth Sci* 77, 261., 2018. <https://doi.org/10.1007/s12665-018-7440-4>

Jeong, H. Y., Jun, S. C., Cheon, J. Y., & Park, M., 2018. A review on clogging mechanisms and managements in aquifer storage and recovery (ASR) applications. *Geosciences Journal*, 22(4), 667-679. <https://doi.org/10.1007/s12303-017-0073-x>

Johnson, J., Sudheer, P. D., Yang, Y. H., Kim, Y. G., & Choi, K. Y., 2017. Hydrolytic activities of hydrolase enzymes from halophilic microorganisms. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 22(4), 450-461. <https://doi.org/10.1007/s12257-017-0113-4>

Jost, D., Haberer, C. M., Grathwohl, P., Winter, J., and Gallert, C., 2015. Oxygen transfer in a fluctuating capillary fringe: Impact of microbial respiratory activity. *Vadose Zone Journal*, 14(5), 1-14. <https://doi.org/10.2136/vzj2014.04.0039>.

K

Kalbitz, K., Solinger, S., Park, J.-H., Michalzik, B., and Matzner, E., 2000. Controls on the dynamics of dissolved organic matter in soils: a review. *Soil Sci.* 165 (4), 277e304. <https://doi.org/10.1097/00010694-200004000-00001>

Kanduč, T., Šlejkovec, Z., Vreča, P. et al. The effect of geochemical processes on groundwater in the Velenje coal basin, Slovenia: insights from mineralogy, trace elements and isotopes signatures. *SN Appl. Sci.* 1, 1518., 2019. <https://doi.org/10.1007/s42452-019-1561-6>

Karlsson, C. M., Cerro-Gálvez, E., Lundin, D., Karlsson, C., Vila-Costa, M., & Pinhassi, J., 2019. Direct effects of organic pollutants on the growth and gene expression of the Baltic Sea model bacterium *Rheinheimera* sp. BAL 341. *Microbial Biotechnology*, 12(5), 892-906. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13441>

Kaspersen., S, P., Høegh Ravn, N., Arnbjerg-Nielsen, K., Madsen, H., & Drews, M., 2017. Comparison of the impacts of urban development and climate change on exposing European cities to pluvial flooding. *Hydrology and Earth System Sciences*, 21(8), 4131-4147. <https://doi.org/10.5194/hess-21-4131-2017>

Kembel, S.W., Kembel, M.S.W., 2019. Package ‘picante.’ Version 1.8 package.

Klappenbach, J. A., Saxman, P. R., Cole, J. R., & Schmidt, T. M., 2001. rrndb: the ribosomal RNA operon copy number database. *Nucleic acids research*, 29(1), 181-184. <https://doi.org/10.1093/nar/29.1.181>

Konrad, C.P., 2003. Effects of urban development on floods. US Geological Survey Tacoma. <https://pubs.usgs.gov/fs/fs07603/>

Korbel, K. L., Greenfield, P., & Hose, G. C., 2022. Agricultural practices linked to shifts in groundwater microbial structure and denitrifying bacteria. *Science of The Total Environment*, 807, 150870. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150870>

Kuehn, W., and Mueller, U., 2000. Riverbank filtration: an overview. *Journal-American Water Works Association*, 92(12), 60-69. <https://doi.org/10.1002/j.1551-8833.2000.tb09071.x>

Kumar, A., Kaur, G., Kumar Singh, N., Mathan Kumar, R., Mayilraj, S., Bajaj, A., Kaur, N., Manickam, N., 2015. Taxonomic description and genome sequence of *Rheinheimera mesophila* sp. nov., isolated from an industrial waste site. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65, 3666–3673. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000471>

Kumari, D., Qian, X. Y., Pan, X., Achal, V., Li, Q., & Gadd, G. M., 2016. Microbially-induced carbonate precipitation for immobilization of toxic metals. *Advances in applied microbiology*, 94, 79-108. <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2015.12.002>

L

Labrecque, G., Chesnaux, R., and Boucher, M. A., 2020. Water-table fluctuation method for assessing aquifer recharge: application to Canadian aquifers and comparison with other methods. *Hydrogeology Journal*, 28(2), 521-533. <https://doi.org/10.1007/s10040-019-02073-1>

Landa, M., Cottrell, M.T., Kirchman, D.L., Blain, S., Obernosterer, I., 2013. Changes in bacterial diversity in response to dissolved organic matter supply in a continuous culture experiment. *Aquat. Microb. Ecol.* 69, 157–168. <https://doi.org/10.3354/ame01632>

Langenheder, S., & Lindström, E. S., 2019. Factors influencing aquatic and terrestrial bacterial community assembly. *Environmental microbiology reports*, 11(3), 306-315. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12731>

Larsbo, M., Roulier, S., Stenemo, F., Kasteel, R., & Jarvis, N., 2005. An improved dual-permeability model of water flow and solute transport in the vadose zone. *Vadose Zone Journal*, 4(2), 398-406. <https://doi.org/10.2136/vzj2004.0137>

Le Coustumer, S. M., 2008. Colmatage et rétention des éléments traces métalliques dans les systèmes d'infiltration des eaux pluviales. INSA, Lyon, 427.

Lebon, Y., Navel, S., Moro, M., Voisin, J., Cournoyer, B., François, C., Volatier, L., and Mermillod-Blondin, F., 2021. Influence of stormwater infiltration systems on the structure and the activities of groundwater biofilms: Are the effects restricted to rainy periods? *Science of The Total Environment*, 755, 142451. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142451>.

Lee, M. K., & Saunders, J. A., 2003. Effects of pH on metals precipitation and sorption: Field bioremediation and geochemical modeling approaches. *Vadose Zone Journal*, 2(2), 177-185. <https://doi.org/10.2113/2.2.177>

Legout, C., Molenat, J., and Hamon, Y., 2009. Experimental and modeling investigation of unsaturated solute transport with water-table fluctuation. *Vadose Zone Journal*, 8(1), 21-31. <https://doi.org/10.2136/vzj2007.0182>.

Leibold, M. A., Holyoak, M., Mouquet, N., Amarasekare, P., Chase, J. M., Hoopes, M. F., ... & Gonzalez, A., 2004. The metacommunity concept: a framework for multi-scale community ecology. *Ecology letters*, 7(7), 601-613. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2004.00608.x>

Levantesi, C., La Mantia, R., Masciopinto, C., Böckelmann, U., Ayuso-Gabella, M. N., Salgot, M., Tandoi, V., Van Houtte, E., Wintgens, T. and Grohmann, E., 2010. Quantification of pathogenic microorganisms and microbial indicators in three wastewater reclamation and managed aquifer recharge facilities in Europe. *Science of the Total Environment*, 408(21), 4923-4930. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.07.042>.

Li, D., Sharp, J.O., Saikaly, P.E., Ali, S., Alidina, M., Alarawi, M.S., Keller, S., Hoppe-Jones, C., Drewes, J.E., 2012. Dissolved organic carbon influences microbial community composition and diversity in managed aquifer recharge systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 6819–6828. <https://doi.org/10.1128/AEM.01223-12>

- Li, D., Alidina, M., Ouf, M., Sharp, J.O., Saikaly, P., Drewes, J.E., 2013. Microbial community evolution during simulated managed aquifer recharge in response to different biodegradable dissolved organic carbon (BDOC) concentrations. *Water Res.* 47, 2421–2430. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.02.012>
- Li, P., Karunanidhi, D., Subramani, T., Srinivasamoorthy, K., 2021. Sources and consequences of groundwater contamination. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 80(1), 1-10. <https://doi.org/10.1007/s00244-020-00805-z>
- Lindström, E. S., & Langenheder, S., 2012. Local and regional factors influencing bacterial community assembly. *Environmental Microbiology Reports*, 4(1), 1-9. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2011.00257.x>
- Liu, Y., Tay, J.-H., 2001. Metabolic response of biofilm to shear stress in fixed-film culture. *J. Appl. Microbiol.* 90, 337–342. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01244.x>
- Liu, Y., Lin, Y.-M., Yang, S.-F., Tay, J.-H., 2003. A balanced model for biofilms developed at different growth and detachment forces. *Process Biochem.* 38, 1761–1765. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(02\)00260-1](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00260-1)
- Liu, Q., Cui, X., Zhang, C., & Huang, S., 2016. Experimental investigation of suspended particles transport through porous media: particle and grain size effect. *Environmental technology*, 37(7), 854-864. <https://doi.org/10.1080/09593330.2015.1088578>
- Louca, S., Doebeli, M. & Parfrey, L.W., 2018. Correcting for 16S rRNA gene copy numbers in microbiome surveys remains an unsolved problem. *Microbiome* 6, 41. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0420-9>

Lozupone, C., Knight, R., 2005. UniFrac: A new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 8228–8235.
<https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.8228-8235.2005>

Lu, X. Y., Zhang, T., & Fang, H. H. P., 2011. Bacteria-mediated PAH degradation in soil and sediment. *Applied microbiology and biotechnology*, 89(5), 1357-1371.
<https://doi.org/10.1007/s00253-010-3072-7>

M

Maes, P.W., Rodrigues, P.A.P., Oliver, R., Mott, B.M., Anderson, K.E., 2016. Diet-related gut bacterial dysbiosis correlates with impaired development, increased mortality and Nosema disease in the honeybee (*Apis mellifera*). *Mol. Ecol.* 25, 5439–5450.
<https://doi.org/10.1111/mec.13862>

Mah, T. F. C., & O'Toole, G. A., 2001. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in microbiology*, 9(1), 34-39. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(00\)01913-2](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(00)01913-2)

Mahé, F., Rognes, T., Quince, C., de Vargas, C., Dunthorn, M., 2014. Swarm: robust and fast clustering method for amplicon-based studies. *PeerJ* 2, e593, 13.
<https://doi.org/10.7717/peerj.593>

Malard, F., and Hervant, F., 1999. Oxygen supply and the adaptations of animals in groundwater. *Freshwater Biology*, 41(1), 1-30. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2427.1999.00379.x>.

Margat, 1972. Terminologie hydrogéologique, BRGM, 139.

Margat & Castany., 1977. Dictionnaire français d'hydrogéologie, BRGM, 249.

Marsalek, J., and Chocat, B., 2002. International report: stormwater management. *Water Science and Technology*, 46(6-7), 1-17. <https://doi.org/10.2166/wst.2002.0657>.

Marschner, B., and Kalbitz, K., 2003. Controls of bioavailability and biodegradability of dissolved organic matter in soils. *Geoderma* 113 (3e4), 211e235. DOI:10.1016/S0016-7061(02)00362-2

Marti, R., Ribun, S., Aubin, J.-B., Colinon, C., Petit, S., Marjolet, L., Gourmelon, M., Schmitt, L., Breil, P., Cottet, M., others, 2017. Human-driven microbiological contamination of benthic and hyporheic sediments of an intermittent peri-urban river assessed from MST and 16S rRNA genetic structure analyses. *Front. Microbiol.* 8, 19. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00019>

Martin, R., 2013. Clogging remediation methods to restore well injection capacity. *Clogging Issues Associated with Managed Aquifer Recharge Methods*, 207-211.

Masetti, M., Pedretti, D., Sorichetta, A., Stevenazzi, S., and Bacci, F., 2016. Impact of a stormwater infiltration basin on the recharge dynamics in a highly permeable aquifer. *Water Resources Management*, 30(1), 149-165. <https://doi.org/10.1007/s11269-015-1151-3>.

Masoner, J. R., Kolpin, D. W., Cozzarelli, I. M., Barber, L. B., Burden, D. S., Foreman, W. T., Forshay K. J., Furlong E.T., Groves J.F., Hladik M.L., Hopton M.E., Jaeschke J.B., Keefe S.H., Krabbenhoft D.P., Lowrance R., Romanok K.M., Rus D.L., Selbig W.R., Williams B.H. and Bradley, P. M., 2019. Urban stormwater: An overlooked pathway of extensive mixed contaminants to surface and groundwaters in the United States. *Environmental Science & Technology*, 53(17), 10070-10081. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b02867>.

Mays, L. W., 2013. Groundwater resources sustainability: past, present, and future. *Water Resources Management*, 27(13), 4409-4424. <https://doi.org/10.1007/s11269-013-0436-7>.

McKew, B. A., Taylor, J. D., McGenity, T. J., & Underwood, G. J., 2011. Resistance and resilience of benthic biofilm communities from a temperate saltmarsh to desiccation and rewetting. *The ISME journal*, 5(1), 30-41. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.91>

McKnight, D.M., Bencala, K.E., Zellweger, G.W., Aiken, G.R., Feder, G.L., and Thorn, K.A., 1992. Sorption of dissolved organic carbon by hydrous aluminium and iron oxides occurring at the confluence of Deer Creek with the Snake River, Summit County, Colorado. *Environ. Sci. Technol.* 26 (7), 1388e1396. <https://doi.org/10.1021/es00031a017>

McMahon, P.B., and Chapelle, F.H., 2008. Redox processes and water quality of selected principal aquifer systems. *Ground Water* 46:259–271. <https://doi.org/10.1111/j.1745-6584.2007.00385.x>.

McMurdie, P.J., Holmes, S., 2013. Phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PloS One* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>

Medini, D., Donati, C., Tettelin, H., Massignani, V., & Rappuoli, R. (2005). The microbial pan-genome. *Current opinion in genetics & development*, 15(6), 589-594. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2005.09.006>

Melquiot., 2003. 1.001 mots et abréviations de l'environnement et du développement durable, 192. ISBN : 2-9520542-0-7

Mentzer, J.L., Goodman, R.M., Balser, T.C., 2006. Microbial response over time to hydrologic and fertilization treatments in a simulated wet prairie. *Plant Soil* 284, 85–100. <https://doi.org/10.1007/s11104-006-0032-1>

Mermillod-Blondin, F., Mauclaire, L., and Montuelle, B., 2005. Use of slow filtration columns to assess oxygen respiration, consumption of dissolved organic carbon, nitrogen transformations, and microbial parameters in hyporheic sediments. *Water Research*, 39(9), 1687-1698. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.02.003>.

Mermillod-Blondin, F., Foulquier, A., Maazouzi, C., Navel, S., Negrutiu, Y., Vienney, A., Simon, L., Marmonier, P., 2013. Ecological assessment of groundwater trophic status by using artificial substrates to monitor biofilm growth and activity. *Ecol. Indic.* 25, 230–238. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2012.09.026>

Mermillod-Blondin, F., Simon, L., Maazouzi, C., Foulquier, A., Delolme, C., and Marmonier, P., 2015. Dynamics of dissolved organic carbon (DOC) through stormwater basins designed for groundwater recharge in urban area: assessment of retention efficiency. *Water Research*, 81, 27-37. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.05.031>.

Mermillod-Blondin, F., Voisin, J., Marjolet, L., Marmonier, P., Cournoyer, B., 2019. Clay beads as artificial trapping matrices for monitoring bacterial distribution among urban stormwater infiltration systems and their connected aquifers. *Environ. Monit. Assess.* 191, 58. <https://doi.org/10.1007/s10661-019-7190-0>.

Miura, T., Yamazoe, A., Ito, M., Ohji, S., Hosoyama, A., Takahata, Y., Fujita, N., 2015. The impact of injections of different nutrients on the bacterial community and its dechlorination activity in chloroethene-contaminated groundwater. *Microbes Environ.* 30, 164–171. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME14127>

Moon, S. K., Woo, N. C., and Lee, K. S. , 2004. Statistical analysis of hydrographs and water-table fluctuation to estimate groundwater recharge. *Journal of Hydrology*, 292(1-4), 198-209. <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2003.12.030>

Moorhead, D.L., Rinkes, Z.L., Sinsabaugh, R.L., Weintraub, M.N., 2013. Dynamic relationships between microbial biomass, respiration, inorganic nutrients and enzyme activities: informing enzyme-based decomposition models. *Front. Microbiol.* 4, 223. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00223>

Moreau et al., 2017. Les prélèvements d'eau douce en France : les grands usages en 2013 et leur évolution depuis 20 ans, 26.

Moreels, D., Crosson, G., Garafola, C., Monteleone, D., Taghavi, S., Fitts, J., et al., 2008. Microbial community dynamics in uranium contaminated subsurface sediments under biostimulated conditions with high nitrate and nickel pressure. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 15, 481–491. doi:10.1007/s11356-008-0034-z

Müller, A., Österlund, H., Marsalek, J., & Viklander, M., 2020. The pollution conveyed by urban runoff: A review of sources. *Science of the Total Environment*, 709, 136125. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.136125>

Murphy, E. M., & Ginn, T. R., 2000. Modeling microbial processes in porous media. *Hydrogeology Journal*, 8(1), 142-158. <https://doi.org/10.1007/s100409900043>

Muscarella, M. E., Boot, C. M., Broeckling, C. D., & Lennon, J. T., 2019. Resource heterogeneity structures aquatic bacterial communities. *ISME J.* 13, 2183-2195.

N

Naik, P. K., Tambe, J. A., Dehury, B. N., and Tiwari, A. N., 2008. Impact of urbanization on the groundwater regime in a fast growing city in central India. *Environmental Monitoring and Assessment*, 146(1), 339-373. <https://doi.org/10.1007/s10661-007-0084-6>.

Natarajan, P., Davis, A.P., 2015. Hydrologic performance of a transitioned infiltration basin managing highway runoff. *J. Sustain. Water Built Environ.* 1, 04015002. <https://doi.org/10.1061/JSWBAY.0000797>

Nishiyama, N., & Yokoyama, T., 2017. Permeability of porous media: Role of the critical pore size. *Journal of Geophysical Research: Solid Earth*, 122(9), 6955-6971. <https://doi.org/10.1002/2016JB013793>

Nocelli, Natalia, Pablo C. Bogino, Erika Banchio, et Walter Giordano. 2016. « Roles of Extracellular Polysaccharides and Biofilm Formation in Heavy Metal Resistance of Rhizobia ». *Materials* 9(6): 418. <https://doi.org/10.3390/ma9060418>

Nogaro, G., Mermillod-Blondin, F., Montuelle, B., Boisson, J.-C., Bedell, J.-P., Ohannessian, A., Volat, B., Gibert, J., 2007. Influence of a stormwater sediment deposit on microbial and biogeochemical processes in infiltration porous media. *Sci. Total Environ.* 377, 334–348. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.01.093>

Nogaro, G., & Mermillod-Blondin, F. (2009). Stormwater sediment and bioturbation influences on hydraulic functioning, biogeochemical processes, and pollutant dynamics in laboratory infiltration systems. *Environmental science & technology*, 43(10), 3632-3638. <https://doi.org/10.1021/es8030787>

O

Owor, M., Taylor, R. G., Tindimugaya, C., and Mwesigwa, D., 2009. Rainfall intensity and groundwater recharge: empirical evidence from the Upper Nile Basin. *Environmental Research Letters*, 4(3), 035009, 7. <https://doi.org/10.1088/1748-9326/4/3/035009>.

P

Pabich, W.J., Valiela, I., Hemond, H.F., 2001. Relationship between DOC concentration and vadose zone thickness and depth below water table in groundwater of Cape Cod, USA. *Biogeochemistry* 55, 247–268. <https://doi.org/10.1023/a:1011842918260>

Papke R.T, Ward D.M., 2008. The importance of physical isolation to microbial diversification. *FEMS Microbiol Ecol* 48: 293-303. [10.1016/j.femsec.2004.03.013](https://doi.org/10.1016/j.femsec.2004.03.013)

Parada, A. E., Needham, D. M., & Fuhrman, J. A., 2016. Every base matters: assessing small subunit rRNA primers for marine microbiomes with mock communities, time series and global field samples. *Environmental microbiology*, 18(5), 1403-1414. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13023>

Paradis, E., Schliep, K., 2019. ape 5.0: an environment for modern phylogenetics and evolutionary analyses in R. *Bioinformatics* 35, 526–528. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty633>

Peterson, G.L., 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* 83, 346–356. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(77\)90043-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(77)90043-4)

Pinasseau, L., Wiest, L., Fildier, A., Volatier, L., Fones, G. R., Mills, G. A., Mermillod-Blondin, F., and Vulliet, E., 2019. Use of passive sampling and high-resolution mass spectrometry using a suspect screening approach to characterise emerging pollutants in contaminated groundwater and runoff. *Science of the Total Environment*, 672, 253-263. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.489>.

Pinasseau, L., Wiest, L., Volatier, L., Mermillod-Blondin, F., and Vulliet, E., 2020. Emerging polar pollutants in groundwater: Potential impact of urban stormwater infiltration practices. *Environmental Pollution*, 266, 115387. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115387>.

Pitt, R., Clark, S., Field, R., 1999. Groundwater contamination potential from stormwater infiltration practices. *Urban Water* 1, 217–236. [https://doi.org/10.1016/S1462-0758\(99\)00014-X](https://doi.org/10.1016/S1462-0758(99)00014-X)

Plan de Gestion de la ressource en eau : Nappe de l'Est Lyonnais.,2017, 140.

Q

Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., Glöckner, F.O., 2012. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 41, D590–D596. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>

R

R Core Team., 2018. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

Rauch-Williams, T., Drewes, J.E., 2006. Using soil biomass as an indicator for the biological removal of effluent-derived organic carbon during soil infiltration. *Water Res.* 40, 961–968. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.01.007>

Rauch-Williams, T., Hoppe-Jones, C., and Drewes, J. E., 2010. The role of organic matter in the removal of emerging trace organic chemicals during managed aquifer recharge. *Water Research*, 44(2), 449-460. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.08.027>.

Refloch A., 2017. Compréhension expérimentale et numérique des chemins de l'eau sur l'ensemble du champ captant de la Métropole de Lyon. PhD thesis. Université Grenoble Alpes, Grenoble, France, 262.

Rinkes, Z.L., Sinsabaugh, R.L., Moorhead, D.L., Grandy, A.S., Weintraub, M.N., 2013. Field and lab conditions alter microbial enzyme and biomass dynamics driving decomposition of the same leaf litter. *Front. Microbiol.* 4, 260. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00260>

Rosenzweig, R., Shavit, U., & Furman, A. (2009). The influence of biofilm spatial distribution scenarios on hydraulic conductivity of unsaturated soils. *Vadose zone journal*, 8(4), 1080-1084. <https://doi.org/10.2136/vzj2009.0017>

Roy, J., & Lubczynski, M. W. (2005). MRS multi-exponential decay analysis: aquifer pore-size distribution and vadose zone characterization. *Near Surface Geophysics*, 3(4), 287-298. <https://doi.org/10.3997/1873-0604.2005024>

Rühle, F.A., N. Zentner, and C. Stumpp. 2014. Changes in water table level influence solute transport in uniform porous media. *Hydrological Processes*, 29(6), 875-888. doi:10.1002/hyp.10200.

Rühle, F. A., von Netzer, F., Lueders, T., and Stumpp, C., 2015. Response of transport parameters and sediment microbiota to water table fluctuations in laboratory columns. *Vadose Zone Journal*, 14(5), 1-12. <https://doi.org/10.2136/vzj2014.09.0116>.

S

Saidy, A.R., Smernik, R.J., Baldock, J.A., Kaiser, K., and Sanderman, J., 2013. The sorption of organic carbon onto differing clay minerals in the presence and absence of hydrous iron oxide. *Geoderma* 209-210, 15-21. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2013.05.026>

Schlaeppli, K., Ronchi, F., Leib, S. L., Erb, M., & Ramette, A., 2020. Evaluation of primer pairs for microbiome profiling from soils to humans within the One Health framework. *Molecular ecology resources*, 20(6), 1558-1571. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13215>

Schliep, K.P., 2011. phangorn: phylogenetic analysis in R. *Bioinformatics* 27, 592–593. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq706>

Schmidt, C. M., Fisher, A. T., Racz, A. J., Lockwood, B. S., & Huertos, M. L., 2011. Linking denitrification and infiltration rates during managed groundwater recharge. *Environmental science & technology*, 45(22), 9634-9640. doi: 10.1021/es2023626.

Scott, T. M., Rose, J. B., Jenkins, T. M., Farrah, S. R., & Lukasik, J., 2002. Microbial source tracking: current methodology and future directions. *Applied and environmental microbiology*, 68(12), 5796-5803. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.12.5796-5803.2002>

Seitzinger, S.P., Hartnett, H., Lauck, R., Mazurek, M., Minegishi, T., Spyres, G., Styles, R., 2005. Molecular-level chemical characterization and bioavailability of dissolved organic matter in stream water using electrospray-ionization mass spectrometry. *Limnol. Oceanogr.* 50, 1–12. <https://doi.org/10.4319/lo.2005.50.1.0001>

Semenov, M. V., 2021. Metabarcoding and metagenomics in soil ecology research: achievements, challenges, and prospects. *Biology Bulletin Reviews*, 11(1), 40-53. <https://doi.org/10.1134/S2079086421010084>

Sharma, A., Sharma, T., Sharma, T., Sharma, S., & Kanwar, S. S., 2019. Role of microbial hydrolases in bioremediation. *Microbes and Enzymes in Soil Health and Bioremediation*, 149-164. 10.1007/978-981-13-9117-0_7

Shaw, R. G., and Mitchell-Olds, T., 1993. ANOVA for unbalanced data: an overview. *Ecology*, 74(6), 1638-1645. <https://doi.org/10.2307/1939922>.

Shen, Y., Chapelle, F.H., Strom, E.W., and Benner, R., 2015. Origins and bioavailability of dissolved organic matter in groundwater. *Biogeochemistry* 122 (1), 61-78. <https://doi.org/10.1007/s10533-014-0029-4>

Sheng, Z., Helm, D. C., & Li, J., 2003. Mechanisms of earth fissuring caused by groundwater withdrawal. *Environmental & Engineering Geoscience*, 9(4), 351-362. <https://doi.org/10.2113/9.4.351>

Sheng, G. P., Zhang, M. L., & Yu, H. Q., 2008. Characterization of adsorption properties of extracellular polymeric substances (EPS) extracted from sludge. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 62(1), 83-90. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2007.09.024>

Shiklamonov, I., 1993. Chapter "World fresh water resources" in Peter H. Gleick (editor), 1993, *Water in Crisis: A Guide to the World's Fresh Water Resources*, 15.

Shirokova, V. L., & Ferris, F. G., 2013. Microbial diversity and biogeochemistry of a shallow pristine Canadian Shield groundwater system. *Geomicrobiology Journal*, 30(2), 140-149. <https://doi.org/10.1080/01490451.2011.654378>

Siemens, J., Haas, M., and Kaupenjohann, M., 2003. Dissolved organic matter induced denitrification in subsoils and aquifers? *Geoderma* 113 (3-4), 253-271. [https://doi.org/10.1016/S0016-7061\(02\)00364-6](https://doi.org/10.1016/S0016-7061(02)00364-6)

Skolasińska, K., 2006. Clogging microstructures in the vadose zone—laboratory and field studies. *Hydrogeology Journal*, 14(6), 1005-1017. <https://doi.org/10.1007/s10040-006-0027-2>

Slimene, E. B., Lassabatere, L., Winiarski, T., and Gourdon, R., 2015. Modeling water infiltration and solute transfer in a heterogeneous vadose zone as a function of entering flow rates. *Journal of Water Resource and Protection*, 7(13), 1017. <https://doi.org/10.4236/jwarp.2015.713083>

Slimene, E. B., Lassabatere, L., Šimůnek, J., Winiarski, T., & Gourdon, R., 2017. The role of heterogeneous lithology in a glaciofluvial deposit on unsaturated preferential flow—a numerical study. *Journal of Hydrology and Hydromechanics*, 65(3), 209-221. DOI:10.1515/johh-2017-0004

Smith, M., Cross, K., Paden, M., Laban, P., 2016. Spring—managing groundwater sustainably. IUCN Gland Switz, 135. <https://doi.org/10.2305/IUCN.CH.2016.WANI.8.en>

Smith, H.J., Zelaya, A.J., De León, K.B., Chakraborty, R., Elias, D.A., Hazen, T.C., Arkin, A.P., Cunningham, A.B., Fields, M.W., 2018. Impact of hydrologic boundaries on microbial planktonic and biofilm communities in shallow terrestrial subsurface environments. *FEMS Microbiol. Ecol.* 94, 191. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiy191>

Starr, R.C., Gillham, R.W., 1993. Denitrification and organic carbon availability in two aquifers. *Groundwater* 31, 934–947. <https://doi.org/10.1111/j.1745-6584.1993.tb00867.x>

Stegen, J. C., Fredrickson, J. K., Wilkins, M. J., Konopka, A. E., Nelson, W. C., Arntzen, E. V., ... & Tfaily, M. (2016). Groundwater–surface water mixing shifts ecological assembly processes and stimulates organic carbon turnover. *Nature communications*, 7(1), 1-12. <https://doi.org/10.1038/ncomms11237>

Stocchino, G. A., Sluys, R., Kawakatsu, M., Sarbu, S. M., & Manconi, R., 2017. A new species of freshwater flatworm (Platyhelminthes, Tricladida, Dendrocoelidae) inhabiting a

chemoautotrophic groundwater ecosystem in Romania. *European Journal of Taxonomy*, 342, 1-21. <https://doi.org/10.5852/ejt.2017.342>

Struckmeier & Richts, 2008. *Groundwater Resources of the World*. 1/40 000 000. BGR/UNESCO

Szymczycha, B., Kroeger, K. D., Crusius, J., & Bratton, J. F., 2017. Depth of the vadose zone controls aquifer biogeochemical conditions and extent of anthropogenic nitrogen removal. *Water Research*, 123, 794-801. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.06.048>

T

Tam, V. T., and Nga, T. T. V., 2018. Assessment of urbanization impact on groundwater resources in Hanoi, Vietnam. *Journal of Environmental Management*, 227, 107-116. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.08.087>.

Taylor, R., Cronin, A., Pedley, S., Barker, J., & Atkinson, T., 2004. The implications of groundwater velocity variations on microbial transport and wellhead protection—review of field evidence. *FEMS Microbiology Ecology*, 49(1), 17-26. <https://doi.org/10.1016/j.femsec.2004.02.018>

Tedoldi, D., Chebbo, G., Pierlot, D., Kovacs, Y., and Gromaire, M. C., 2016. Impact of runoff infiltration on contaminant accumulation and transport in the soil/filter media of sustainable urban drainage systems: A literature review. *Science of the Total Environment*, 569, 904-926. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.04.215>.

U

United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division, 2019. World Urbanization Prospects: The 2018 Revision (ST/ESA/SER.A/420). New York: United Nations, 126.

V

Van der Gun, J., 2012. Groundwater and global change: trends, opportunities, and challenges. The United Nations world water assessment program –ISBN : 978-92-3-001049-2, 44.

Van der Meer, J. R., 2006. Environmental pollution promotes selection of microbial degradation pathways. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 4(1), 35-42. <https://doi.org/10.1890/1540-9295>

Vanderzalm, J. L., Page, D. W., Barry, K. E., and Dillon, P. J., 2013. Application of a probabilistic modelling approach for evaluation of nitrogen, phosphorus and organic carbon removal efficiency during four successive cycles of aquifer storage and recovery (ASR) in an anoxic carbonate aquifer. *Water Research*, 47(7), 2177-2189. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.01.038>.

Vellend, M., 2010. Conceptual synthesis in community ecology. *The Quarterly review of biology*, 85(2), 183-206. DOI:10.1086/652373

Verma, J. P., & Jaiswal, D. K., 2016. Book review: advances in biodegradation and bioremediation of industrial waste. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1555. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01555>

Vías, J., Andreo, B., Ravbar, N., and Hötzl, H., 2010. Mapping the vulnerability of groundwater to the contamination of four carbonate aquifers in Europe. *Journal of Environmental Management*, 91(7), 1500-1510. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2010.02.025>.

Vienken, T., Kreck, M., & Dietrich, P., 2019. Monitoring the impact of intensive shallow geothermal energy use on groundwater temperatures in a residential neighborhood. *Geothermal Energy*, 7(1), 1-14. <https://doi.org/10.1186/s40517-019-0123-x>

Voisin, J., Cournoyer, B., Mermillod-Blondin, F., 2016. Assessment of artificial substrates for evaluating groundwater microbial quality. *Ecol. Indic.* 71, 577–586. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2016.07.035>

Voisin, J., Cournoyer, B., Vienney, A., Mermillod-Blondin, F., 2018. Aquifer recharge with stormwater runoff in urban areas: Influence of vadose zone thickness on nutrient and bacterial transfers from the surface of infiltration basins to groundwater. *Sci. Total Environ.* 637–638, 1496–1507. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.094>

Voisin, J., Cournoyer, B., Marjolet, L., Vienney, A., Mermillod-Blondin, F., 2020. Ecological assessment of groundwater ecosystems disturbed by recharge systems using organic matter quality, biofilm characteristics, and bacterial diversity. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 27, 3295–3308. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06971-5>

W

Wang, H., Gao, J. E., Zhang, M. J., Li, X. H., Zhang, S. L., and Jia, L. Z., 2015. Effects of rainfall intensity on groundwater recharge based on simulated rainfall experiments and a groundwater flow model. *Catena*, 127, 80-91. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2014.12.014>.

Wanjugi, P., & Harwood, V. J., 2013. The influence of predation and competition on the survival of commensal and pathogenic fecal bacteria in aquatic habitats. *Environmental Microbiology*, 15(2), 517-526. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2012.02877.x>

Weiss, P. T., LeFevre, G., & Gulliver, J. S., 2008. Contamination of soil and groundwater due to stormwater infiltration practices, a literature review, 45.

Williamson, W.M., Close, M.E., Leonard, M.M., Webber, J.B., Lin, S., 2012. Groundwater biofilm dynamics grown in situ along a nutrient gradient. *Ground Water* 50, 690–703. <https://doi.org/10.1111/j.1745-6584.2011.00904.x>

Winderl, C., Schaefer, S., Lueders, T., 2007. Detection of anaerobic toluene and hydrocarbon degraders in contaminated aquifers using benzylsuccinate synthase (bssA) genes as a functional marker. *Environ. Microbiol.* 9, 1035–1046. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01230.x>

Woessner, W., & Poeter, E., 2020. 8.5 Examples of Flow Systems. *Hydrogeologic Properties of Earth Materials and Principles of Groundwater Flow*. ISBN: 978-1-7770541-2-0, 205.

Wu, L. Z., & Selvadurai, A. P. S., 2016. Rainfall infiltration-induced groundwater table rise in an unsaturated porous medium. *Environmental Earth Sciences*, 75(2), 1-11. <https://doi.org/10.1007/s12665-015-4890-9>

Wright ES, 2015. "DECIPHER: harnessing local sequence context to improve protein multiple sequence alignment". *BMC Bioinformatics*, doi:10.1186/s12859-015-0749-z.

X

Xia, X., Stewart, D. I., Cheng, L., Wang, K., Li, J., Zhang, D., & Ding, A., 2020. Changes in groundwater bacterial community during cyclic groundwater-table variations. *Hydrological Processes*, 34(25), 4973-4984. <https://doi.org/10.1002/hyp.13917>

Y

Yan, L., Hermans, S. M., Totsche, K. U., Lehmann, R., Herrmann, M., & Küsel, K., 2021. Groundwater bacterial communities evolve over time in response to recharge. *Water Research*, 201, 117290. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117290>

Ye, X., Dong, F., & Lei, X., 2018. Microbial resources and ecology-microbial degradation of pesticides. *Natural Resources Conservation and Research*, 1(1). <http://dx.doi.org/10.24294/nrcr.v1i1.242>

Z

Zhou, Y., Kellermann, C., Griebler, C., 2012. Spatio-temporal patterns of microbial communities in a hydrologically dynamic pristine aquifer. *FEMS Microbiol. Ecol.* 81, 230–242. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01371.x>

Zhuang, J., Tyner, J. S., and Perfect, E., 2009. Colloid transport and remobilization in porous media during infiltration and drainage. *Journal of Hydrology*, 377(1-2), 112-119. <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2009.08.011>.