

Fiche projet Accord Cadre ZABR – Agence de l'eau

2022-n°action-BIOKARST

Développement de BIO-indicateurs pour la qualité des eaux souterraines en milieu KARSTique

INTITULE DU PROJET : Développement de BIO-indicateurs pour la qualité des eaux souterraines en milieu KARSTique (BIOKARST)

Responsable scientifique du projet :

- Nom : MERMILLOD-BLONDIN
- Prénom : Florian
- Organisme du contact : CNRS UMR 5023 LEHNA
- Fonction : Directeur de Recherche CNRS
- Courriel : florian.mermillod-blondin@univ-lyon1.fr

EQUIPES DE RECHERCHES ZABR CONCERNÉES et CONTACT SCIENTIFIQUE DE L'EQUIPE
(*Equipe membre ou associée de la ZABR*)

CNRS UMR 5023 LEHNA, Université Claude Bernard Lyon 1, Florian MERMILLOD-BLONDIN
CNRS UMR 5204 EDYTEM, Université Savoie Mont-Blanc, Yves PERRETTE
CNRS UMR 5151 HSM, IMT Mines Alès, Anne JOHANNET

AUTRES PARTENAIRES

(*Préciser leur degré d'implication et leur accord*)

- Recherche :
1- CNRS UMR 5280, ISA, Laure Wiest – expertise sur les analyses de pesticides et antibiotiques
2- Comité Départemental Spéléologie Ardèche (CDS07), Judicaël ARNAUD- expertise et suivis hydrologiques sur les sites cévenols
- Institutionnels :
Grand Chambéry, co-financement d'une bourse de thèse (+ ½ bourse de l'EUR H₂O), équipement en hydrologie de deux sites (sources karstiques utilisées pour l'eau potable)

THEMATIQUE NATURE ET OPERATION (*ne rien compléter*)

- Thématique : Etude recherche et réseau de suivi
- Nature du projet : Etude générale et recherche
- Type d'opération : Recherche et innovation
- **Intitulé de l'opération** : Développement de BIO-indicateurs pour la qualité des eaux souterraines en milieu KARSTique

LOCALISATION DU PROJET: (*se remplit automatiquement -Ne rien remplir*)

- **Commune principale et numéro INSEE** : à compléter
- **Sous bassin versant**
- **Nom du cours d'eau**
- Contrat (si intégré dans un contrat de rivière, un SAGE ou un autre contrat avec l'agence de l'eau)

RESUME DU PROJET GLOBAL

Les eaux souterraines sont les principales sources d'eau potable dans les pays européens. Si les directives européennes sur l'eau ont favorisé l'utilisation d'indicateurs biologiques pour évaluer la qualité écologique des eaux de surface, cela n'a pas été le cas pour eaux souterraines. Pour combler ce manque, le projet BIOKARST vise à proposer et tester des indicateurs biologiques basés sur des approches moléculaires pour évaluer la qualité des eaux karstiques par définition peu accessibles. Pour cela, des substrats artificiels permettant d'échantillonner des communautés microbiennes seront déployés dans des systèmes karstiques caractérisés par des usages des sols (et sources de pollution) distincts afin de rechercher des indicateurs microbiens de contamination des eaux. Cette méthodologie a déjà été utilisée avec succès en milieu poreux sur les sites de l'OTHU (Observatoire de Terrain en Hydrologie Urbaine) mais il est nécessaire d'évaluer son efficacité dans des systèmes karstiques caractérisés par une dynamique hydrologique beaucoup plus variable spatialement et temporellement. L'incubation des substrats artificiels sera réalisée sur des stations karstiques ($n = 15$) dont la dynamique hydrologique est connue (ex : système karstique de la Doria, cuvette de Saint-André de Cruzière) et caractérisées par trois conditions de contamination (5 stations faiblement contaminées, 5 stations contaminée par des rejets urbains – ex : réseau situé sous la Féclaz, site du Moulin de Pichedru dans les Cévennes - et 5 stations contaminées par des pollutions agricoles – ex : réseau des fermes dans les Bauges-). Des analyses des HAPs (Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques), des métaux, de pesticides, d'antibiotiques et des nutriments seront couplées à des approches de métabarcoding sur les communautés bactériennes pour détecter les liens entre la contamination et les structures spécifiques des communautés bactériennes. Etant donnée la variabilité hydrologique des systèmes karstique, une deuxième expérimentation visera à quantifier la réponse des communautés microbiennes au régime hydrologique et aux perturbations liés aux crues (augmentation des flux d'eau et de composés drainés sur le bassin versant). Pour cela, des analyses seront réalisées dans trois sources (sources de la Dhuys, de La Touvière dans le massif des Bauges et exutoire de la cuvette de Saint-André de Cruzière en Ardèche) durant une année hydrologique à l'aide des substrats artificiels incubés sur sites. Cette analyse temporelle à la fois en chimie et microbiologie des eaux ainsi que sur les supports artificiels permettra d'évaluer la capacité de notre méthodologie à enregistrer des contaminations dans les eaux. Ce projet sera co-développé avec des partenaires institutionnels (Grand Chambéry), des spécialistes des flux d'eau et de contaminants dans les milieux karstiques (EDYTEM, HSM, CDS07), des chimistes (EDYTEM, ISA) et des écologues microbiologistes des eaux souterraines (LEHNA). Ce projet pourra s'appuyer sur la thèse de Lina FABRE débutée en février de cette année et financée par Chambéry Métropole et l'EUR H₂O Lyon. Les résultats de cette étude devraient permettre de proposer des outils pertinents pour l'évaluation de la qualité des eaux karstiques dans différents contextes (urbains et agricoles) et applicables sur l'ensemble du territoire de la ZABR.

ENCART 2023-BIOKARST-EQUIPE 1 : UMR 5023 LEHNA (CNRS-UCBL-ENTPE) – Villeurbanne – Florian Mermilliod-Blondin

◦ Tâche de l'équipe dans le projet

Les tâches de cette équipe s'étendent de la conceptualisation du projet, sa réalisation et sa valorisation en raison de ses compétences en écologie et microbiologie des écosystèmes aquatiques souterrains. Les expérimentations seront réalisées sur les sites des Bauges et des Cévennes en lien étroit avec les équipes 2 et 3. Les mesures microbiologiques et de nutriments, leurs analyses et leurs valorisations seront réalisées à l'UMR LEHNA (CNRS-UCB Lyon 1- ENTPE). Le temps imparti de chaque personne impliquée sera de : 45 jours pour Florian Mermilliod-Blondin, porteur du projet, DR UMR LEHNA ; 35 jours pour Clémentine François, MCU UMR LEHNA ; 35 jours pour Lara Konecny, AI UMR LEHNA ; 25 jours pour Félix Vallier, TECH UMR LEHNA

ENCART 2023-BIOKARST- EQUIPE 2 : UMR 5204 EDYTEM (CNRS-USMB) – Le Bourget du Lac – Yves Perrette

◦ Tâche de l'équipe dans le projet

Les tâches de cette équipe s'étendent de la conceptualisation du projet, sa réalisation et sa valorisation en

raison de ses compétences en chimie environnementale, en géographie, géomorphologie et hydrologie des milieux karstiques. Les expérimentations seront réalisées sur les sites des Bauges et des Cévennes en lien étroit avec les équipes 1 et 3. Les mesures de contaminants (HAP, métaux lourds, pesticides, antibiotiques) seront réalisées à l'UMR EDYTEM (CNRS-USMB). Le temps imparti de chaque personne impliquée sera de : 36 jours pour Yves Perrette, porteur du projet, DR UMR EDYTEM ; 18 jours pour Nathalie Cottin, IE UMR EDYTEM ; 12 jours pour Emmanuel Malet, IE UMR EDYTEM ; 12 jours pour Violaine Naffrechoux, IE UMR EDYTEM.

ENCART 2023-BIOKARST- EQUIPE 3 : UMR 5151 HSM (IMT Mines Alès) – Alès – Anne Johannet

- Tâche de l'équipe dans le projet

Les tâches de cette équipe s'étendent de la conceptualisation du projet, sa réalisation et sa valorisation en raison de ses compétences en géomorphologie et hydrologie des milieux karstiques. Les expérimentations seront réalisées sur les sites des Cévennes en lien étroit avec les équipes 1 et 2. Les mesures hydrologiques ainsi que leurs analyses seront réalisées à l'UMR 5151 (IMT Mines Alès). Le temps imparti de chaque personne impliquée sera de : 25 jours pour Anne Johannet, porteuse du projet, PEX UMR HSM ; 10 jours pour un ingénieur hydrométéorologue en cours de recrutement à l'IMT Mines Alès ; 10 jours pour un MCU hydrométéorologue en cours de recrutement à l'IMT Mines Alès.

CONTEXTE SCIENTIFIQUE

- **Contexte général**

Les eaux souterraines sont une source essentielle d'eau potable et d'irrigation largement menacée par l'agriculture intensive, les activités industrielles et l'urbanisation (Griebler & Avramov 2015). La protection des ressources en eaux souterraines est ainsi reconnue comme un enjeu majeur dans les pays industrialisés (EU Groundwater Directive 2006/118/EC). Le développement d'une stratégie de protection efficace nécessite une évaluation intégrative et approfondie de la qualité des eaux souterraines (Danielopol et al. 2004, Griebler et al. 2010). À ce jour, l'évaluation de la qualité des eaux souterraines a été basée essentiellement sur des paramètres chimiques (par exemple, Wendland et al. 2005). Néanmoins, compte tenu de la grande variété des polluants (et de leurs combinaisons possibles) et d'éventuelles contaminations accidentelles, avoir une vision exhaustive est souvent une tâche difficile, longue et coûteuse. Par conséquent, les indicateurs biologiques qui peuvent intégrer l'état des eaux souterraines dans le temps apparaissent comme des outils prometteurs pour le bio-monitoring (Steube et al., 2009). Au cours des deux dernières décennies, les descripteurs basés sur les micro-organismes (biomasse, activités et diversité, Korbel & Hose 2011, Schurig et al. 2014) et la faune (abondance des invertébrés et diversité, Mösslacher, 2000 ; Hahn, 2006) ont été proposés pour évaluer la santé de l'écosystème des eaux souterraines. Si les invertébrés benthiques sont couramment utilisés pour évaluer l'intégrité écologique des cours d'eau et rivières (ex. Péru & Dolédec 2010), la pertinence de l'utilisation des invertébrés pour l'évaluation écologique des eaux souterraines est discutable car les relations entre les communautés d'invertébrés et les conditions environnementales sont souvent complexes (ex. Dumas et al. 2001). Le développement d'indicateurs biologiques basés sur les communautés microbiennes est donc apparu comme la voie la plus prometteuse (Morse et al. 2021). Cependant, la plupart des études sur les microorganismes en milieu souterrain ont été réalisées sur des échantillons d'eau pour des raisons techniques, alors que la plupart des micro-organismes se développent sous forme de biofilms (attachés aux surfaces) et ne sont pas sous forme planctonique. Dans ce contexte, le présent projet vise à développer des indicateurs biologiques basés sur les biofilms microbiens échantillonnés sur substrats artificiels pour évaluer la qualité des eaux souterraines en milieu karstique.

- **Contexte ZABR :**

- **Thématique ZABR :** Flux Polluants, Ecotoxicologie, Ecosystèmes (FPEE)

- **Site Atelier ou Observatoire ZABR :** Bassin du Rhône, Rivières cévenoles

- **Besoin de connaissance Agence de l'eau :** Ce projet s'inscrit dans les questions suivantes :

- 1- Quelle vulnérabilité des eaux souterraines aux pollutions émises en surface et dans les sols ?

2- Quelles caractéristiques des milieux aquifères du bassin ?

FINALITE ET ATTENDUS OPERATIONNELS

• Objectifs scientifiques

L'objectif général de ce projet est de développer des indicateurs biologiques basés sur les biofilms microbiens échantillonnés sur des substrats artificiels pour évaluer la qualité des eaux souterraines en milieu karstique. Les actions proposées s'organisent selon trois axes. L'axe 1 est basé sur une sélection de sites (15 sites) caractérisés par des usages des sols et des niveaux de contaminations en nutriments, HAPs, métaux, pesticides et antibiotiques contrastés permettant d'obtenir un plan factoriel complet avec trois types de niveau d'anthropisation (faible contamination, contaminations agricoles et contaminations urbaines) avec 5 stations par condition. Sur la base de cette sélection, l'axe 2 concernera l'incubation de substrats artificiels dans les 15 sites permettant d'évaluer la biomasse, les activités et les structures de communautés bactériennes. Cet axe permettra de définir de potentiels bio-indicateurs bactériens des niveaux d'anthropisation des sites. Enfin, l'axe 3 s'intéressera plus particulièrement à la dynamique temporelle des communautés bactériennes dans les réseaux karstiques. L'analyse au cours du temps des microorganismes retrouvés sur substrats artificiels permettra de définir si l'utilisation de substrat artificiels est efficace pour enregistrer des changements microbiologiques. Ce travail sera réalisé sur 3 sites (sources à l'exutoire de réseaux karstiques) et des événements de crues seront ciblés pour évaluer à la fois les changements microbiologiques dans les eaux et sur les biofilms développés sur les substrats artificiels. Ces résultats microbiologiques seront couplés à une analyse des débits (ou à défaut des hauteurs d'eau) et des flux d'eaux estimés dans ces systèmes karstiques équipés afin d'évaluer les liens entre hydrologie et transferts bactériologiques.

• Attendus opérationnels

Ce travail est par essence pluridisciplinaire et fera appel à des compétences en écologie et microbiologie des écosystèmes aquatiques souterrains (UMR 5023 LEHNA), en chimie environnementale (UMR 5204 EDYTEM, UMR ISA), en géographie, géomorphologie et hydrologie des milieux karstiques (UMR 5151 HSM, UMR 5204 EDYTEM, CDS07). Il permettra ainsi de répondre à des questions opérationnelles sur (1) les relations entre les activités humaines et la contamination des eaux, (2) l'importance de l'hydrologie dans la contamination des eaux, et (3) le développement d'un outil de bio-évaluation de la qualité des eaux souterraines karstiques basé sur les microorganismes.

Le transfert des résultats vers les opérationnels sera facilité par la forte implication de Chambéry Métropole dans le projet. En effet, Chambéry Métropole contribue au ½ financement de la thèse de Lina Fabre qui sera impliquée à 100% de son temps sur le projet. De plus, la métropole de Chambéry prend d'ores et déjà en charge l'équipement pour les mesures hydrologiques réalisées sur deux sources (La Dhuys et La Touvière) qui seront 2 des 3 sources cibles pour le troisième axe du projet. La troisième « source » à l'exutoire de la cuvette de Saint André de Cruzière (réseau cévenol) est en cours d'équipement par le Comité Départemental de Spéléologie 07. Le projet présenté ici a aussi reçu le soutien de l'EUR H2O (deuxième ½ financement de la bourse de thèse de Lina Fabre).

En parallèle avec le travail proposé ici, des liens sont à tisser avec le laboratoire chrono-environnement de Besançon qui, dans le cadre du projet TRANSKARST, travaille aussi sur la dynamique des contaminants dans les systèmes karstiques. Mettre en connexion les deux projets permettrait d'échanger sur les travaux réalisés et de pouvoir envisager des travaux communs sur la base des résultats issus de ces deux projets.

DESCRIPTIF DETAILLE

• Méthodologie

Axe 1 : Sélection de sites (15 sites) caractérisés par des usages des sols et des niveaux de contaminations en nutriments, hydrocarbures aromatique polycycliques, métaux, pesticides et antibiotiques contrastés.

Ce travail sera réalisé à partir de cartes d'occupation des sols (analyses GIS) suivis d'analyses chimiques réalisées sur les sédiments collectés dans les réseaux. Néanmoins, des réseaux suivis par les partenaires du projet (UMR 5204 EDYTEM, UMR 5151 HSM et CD Spéléo 07) sont d'ores et déjà ciblés car ils font déjà l'objet de suivis. Ainsi, les réseaux des fermes et de la Doria sur le massif des Bauges ont été sélectionnés de par la connaissance hydrologique du système et des niveaux de contaminations en HAPs et métaux de plusieurs sites (ex. site situé sous la Féclaz présentant une forte contamination urbaine en HAPs et sites des Fermes contaminés par des rejets agricoles, Figure 1). De la même manière, des sites dans les massifs karstiques cévenols ont aussi été ciblés tels que la cuvette de Saint-André de Cruzière (ex. : site de la résurgence du

moulin de Pichegrus recevant des rejets urbains couplé à des sites peu contaminés comme l'Aven de Carle ou le captage AEP de Saint Paul le Jeune). Les analyses de nutriments et contaminants seront réalisées sur des sédiments argileux collectés sur les parois dans chaque site car ces sédiments permettent à la fois d'évaluer le niveau « trophique » du milieu (concentrations en carbone organique total, en azote total et en phosphore total) et de piéger des contaminants présents sur les sites (exemple pour les HAPs et métaux lourds dans Perrette et al. 2015). Concernant les pesticides et les antibiotiques, le but sera de travailler sur des composés caractéristiques des types de contamination sur les sites. Les composés ciblés seront la carbendazime (fungicide), le glyphosate (herbicide), le prosulfocarb (herbicide), le chlorpyrifos (insecticide), le S-metolachlore (herbicide), le Bromacil (herbicide), et des antibiotiques (bactéricides) et leurs composés de dégradation utilisés classiquement en élevage bovin (par exemple la pénicilline, gentamicine et cloxacilline).

Réseau hydrographique karstique

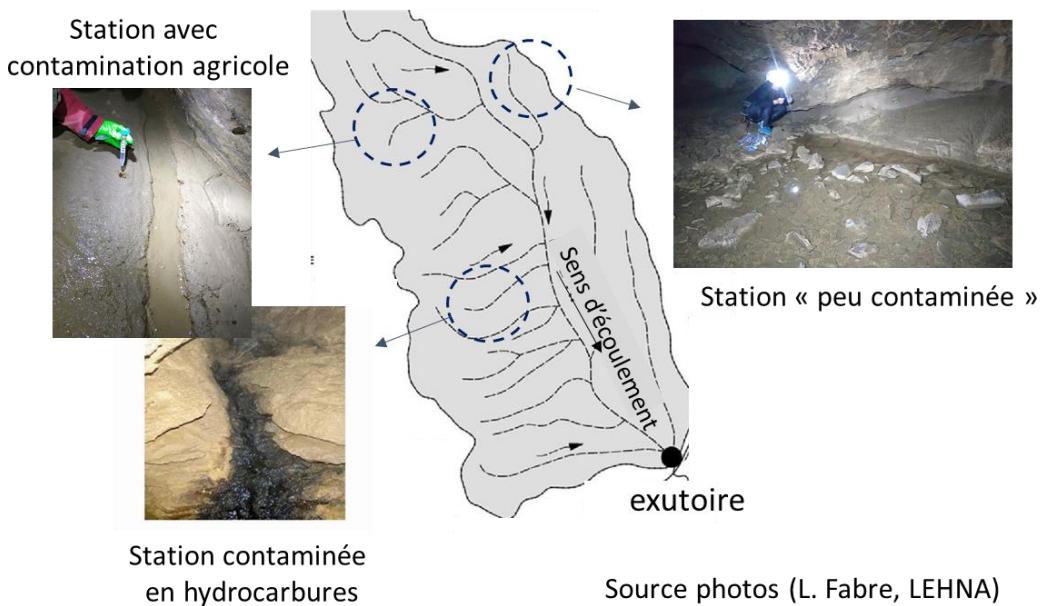


Figure 1 : Exemple de 3 sites sélectionnés dans le massif des Bauges présentant des niveaux et types de contaminations différentes

Axe 2 : Incubation de substrats artificiels afin d'évaluer la biomasse, les activités et les structures de communautés microbiennes

Des substrats artificiels permettant d'échantillonner des communautés microbiennes seront déployés sur les 15 sites karstiques définis dans l'axe 1. Ces substrats artificiels sont des billes d'argile stérilisées d'un diamètre de 8 mm (Voisin et al. 2016) qui seront incubées pendant 2 mois (un temps d'incubation adapté aux milieux oligotrophes) en triplicat dans chaque site pour échantillonner les communautés microbiennes. Cette méthodologie a été appliquée avec succès en milieu poreux sur les sites de l'OTHU (Voisin et al. 2020, Lebon et al. 2021) mais il est nécessaire d'évaluer leur efficacité dans des systèmes karstiques. Des mesures de biomasse et de deux activités microbiennes seront réalisées sur les billes afin d'évaluer le niveau « trophique » du milieu souterrain. Etant donné que les écosystèmes souterrains sont oligotrophes, les contaminations par des eaux de surface devraient stimuler le développement de biofilm microbien sur les billes. La caractérisation de la structure des communautés bactériennes développées sur billes par une approche moléculaire de métabarcoding 16S sur les communautés bactériennes permettra de détecter les liens entre la contamination et les structures spécifiques des communautés bactériennes. Les analyses statistiques de type co-inertie permettront de définir de potentiels taxons bio-indicateurs des conditions environnementales sur les sites.

Axe 3 : Dynamique temporelle des communautés bactériennes dans les réseaux karstiques

Le fonctionnement des systèmes karstiques est en partie déterminé par des crues qui vont conduire en une augmentation des infiltrations et ruissellement des eaux de surface vers les écosystèmes souterrains. En fonction de la saison hydrologique (exemple en Figure 2), il est donc attendu des changements de la microbiologie des eaux dans le système karstique. Cet axe de recherche aura donc deux objectifs majeurs : (1) définir la dynamique temporelle des communautés bactériennes au cours d'un cycle hydrologique sur trois

sources karstiques et (2) évaluer la capacité des biofilms microbiens développées sur substrats artificiels à enregistrer les changements microbiologiques lors de crues.

A



B

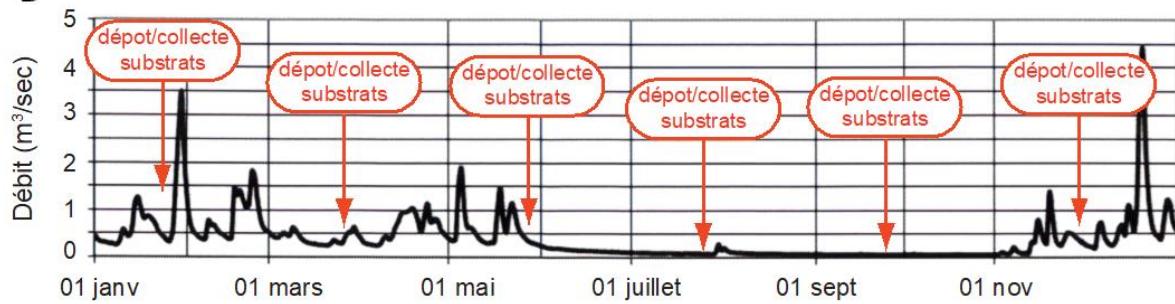


Figure 2 : Dynamique saisonnière de l’occupation des sols à la surface (A) et exemple de la dynamique hydrologique à l’aval d’un système karstique (B)

Pour répondre à ces objectifs, des substrats artificiels seront incubés sur trois sources (source de la Dhuis et source de La Touvière dans le massif des Bauges, exutoire de la cuvette de Saint-André de Cruzière dans les Cévennes) équipées de sondes LTC pour évaluer les variations hydrologiques au niveau des systèmes étudiés. Les substrats seront collectés tous les 2 mois au cours d’une année (Figure 2B). A chaque temps, des analyses microbiologiques (structure de communauté par metabarcoding 16S) seront réalisées sur les substrats collectés afin d’en évaluer la dynamique saisonnière. En parallèle, des mesures seront réalisées sur les eaux pour caractériser les changements saisonniers de la physico-chimie (conductivité électrique, turbidité, concentrations en nitrate, ammonium, phosphate et carbone organique dissous). Si la quantité de sédiments récoltés aux exutoires des systèmes est suffisante (apports potentiels lors des crues), ils seront caractérisés : granulométrie, charge en nutriments et métaux lourds. Ces caractérisations permettront de caractériser les zones du bassin versant remobilisées lors des crues. Les chroniques obtenues permettront d’évaluer les liens entre hydrologie (variations des hauteurs d’eau et potentiellement des débits – s’il est possible de réaliser des courbes de tarage propres sur les sites-), physico-chimie et microbiologie sur les 3 sites.

A l'échelle de crues, des substrats seront incubés au moins 2 mois avant un épisode de crue significatif (en été par exemple comme indiqué sur la Figure 2B) puis collectés avant et après un épisode de crue (avec trois réplicats collectés à chaque temps) pour évaluer la réponse des communautés microbiennes à la fois d'un point de vue structurel (biomasse et structure des communautés) que fonctionnel (dynamique des activités microbiennes) (Figure 3). En parallèle, des analyses de la structure des communautés bactériennes seront réalisées sur les eaux pour déterminer si les changements microbiologiques détectés sur les eaux sont enregistrés par les substrats artificiels.

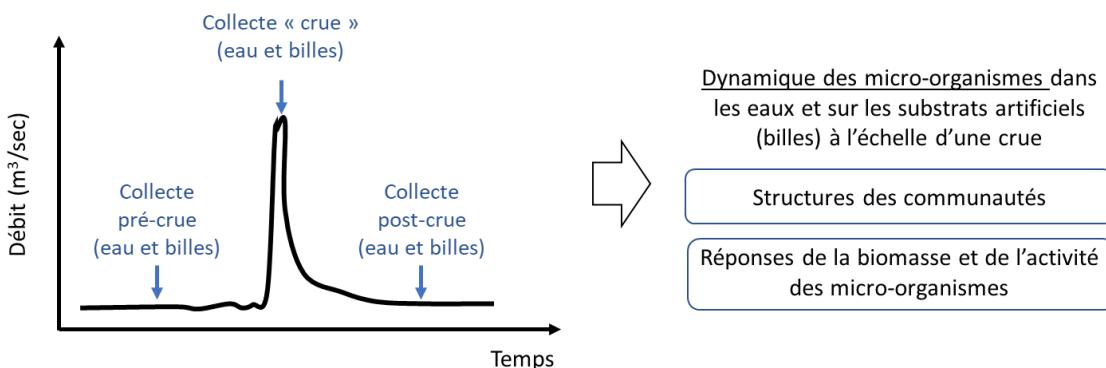


Figure 3 : Plan expérimental permettant d'évaluer la réponse des communautés microbiennes à un évènement de crue

LIVRABLES :

Deux livrables sont prévus en fin de projet :
Un rapport technique sur l'utilisation des outils développés
Une liste de taxons bactériens indicateurs de contaminations

DUREE DU PROJET :

- Date de début : janvier 2023
- Date de fin : janvier 2025

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Danielopol, D.L., Gibert, J., Griebler, C., Gunatilaka, A., Hahn, H.J., Messana, G., Notenboom, J., Sket, B., 2004. Incorporating ecological perspectives in European groundwater management policy. *Environ. Conserv.* 31, 185–189.
- Dumas, P., Bou, C., Gibert, J., 2001. Groundwater macrocrustaceans as natural indicators of the Ariège alluvial aquifer. *Int. Rev. Hydrobiol.* 86, 619–633.
- European Union Groundwater Directive (2006) Directive 2006/118/EC of the European Parliament and of the Council of 12 December 2006 on the protection of groundwater against pollution and deterioration. Official Journal of the European Union, L, 372, 19-31.
- Griebler, C., Avramov, M., 2015. Groundwater ecosystem services: a review. *Freshw. Sciences* 34, 355–367.
- Griebler, C., Stein, H., Kellermann, C., Berkhoff, S., Briemann, H., Schmidt, S., Selesi,D., Steube, C., Fuchs, A., Hahn, H.J., 2010. Ecological assessment of groundwater ecosystems—Vision or illusion? *Ecol. Eng.* 36, 1174–1190.
- Hahn, H.J., 2006. The GW-fauna-index: a first approach to a quantitative ecological assessment of groundwater habitats. *Limnologica* 36, 119–137.
- Korbel, K.L., Hose, G.C., 2011. A tiered framework for assessing groundwater ecosystem health. *Hydrobiologia* 661, 329–349.
- Lebon Y., Navel S., Moro M., Voisin J., Cournoyer B., François C., Volatier L., Mermilliod-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.
- Morse, K. V., Richardson, D. R., Brown, T. L., Vangundy, R. D., & Cahoon, A. B. (2021) Longitudinal metabarcodes analysis of karst bacterioplankton microbiomes provide evidence of epikarst to cave transport and community succession. *PeerJ*, 9, e10757.
- Mösslacher, F., 2000. Advantages and disadvantages of groundwater organisms for biomonitoring. *Verh. Int. Ver. Limnol.* 27, 2725–2728.
- Perrette Y., Poulenard J., Protière M., Fanget B., Lombard C., Miège C., Quiers M., Naffrechoux E. & Pépin-Donat B. (2015) Determining soil sources by organic matter EPR fingerprints in two modern speleothems. *Organic Geochemistry*, 88, 59-68.
- Peru, N., Dolédec, S., 2010. From compositional to functional biodiversity metrics in bioassessment: a case study using stream macroinvertebrate communities. *Ecol. Indic.* 10, 1025–1036.
- Schurig, C., Melo, V.A., Miltner, A., Kaestner, M., 2014. Characterisation of microbial activity in the framework of natural attenuation without groundwater monitoring wells?: A new direct-push probe. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21,9002–9015.
- Steube, C., Richter, S., Griebler, C., 2009. First attempts towards an integrative concept for the ecological assessment of groundwater ecosystems. *Hydrogeol. J.* 17, 23–35.
- Voisin J., Cournoyer B., Marjolet L., Vienney A. & Mermilliod-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: 3295-3308.
- Voisin J., Cournoyer B. & Mermilliod-Blondin F. (2016) Assessment of artificial substrates for evaluating groundwater microbial quality. *Ecological indicators*, 71, 577-586.
- Wendland, F., Hannappel, S., Kunkel, R., Schenk, R., Voigt, H.J., Wolter, R., 2005. A procedure to define natural groundwater conditions of groundwater bodies in Germany. *Water Sci. Technol.* 51: 249–257.