

Les bactéries indicatrices de contamination fécale dans les eaux du bassin de la Seine

Tamara Garcia Armisen, Philippe Mercier et Pierre Servais

*Ecologie des Systèmes Aquatiques,
Université Libre de Bruxelles,
Campus Plaine, CP 221,
1050 Bruxelles, Belgique
e-mail : pservais@ulb.ac.be*

Les bactéries indicatrices de contamination fécale dans les eaux du bassin de la Seine	1
1. Introduction.....	3
2. Aspects réglementaires	4
3. Développements méthodologiques	6
4. Apports d' <i>E. coli</i> et d'entérocoques intestinaux par les sources ponctuelles et diffuses	14
5. Etude des processus de devenir des bactéries fécales en rivières	18
6. Evaluation de la qualité microbiologique de certaines rivières du bassin.....	20
7. Modélisation de la dynamique des coliformes dans le bassin de la Seine	21
8. Références bibliographiques	24

1. Introduction

La haute densité de population du bassin de la Seine et les activités agricoles impliquent des apports très importants de micro-organismes (pathogènes ou pas) d'origine fécale dans les eaux de surface. Ceci entraîne une qualité microbiologique médiocre de la plupart des rivières du bassin ce qui rend la baignade impossible dans la plupart de ces rivières. A l'heure actuelle, divers mouvements souhaitent une reconquête de la baignabilité dans diverses zones du bassin ce qui implique une amélioration de la qualité microbiologique des eaux du bassin. D'autre part, les eaux de surface sont couramment utilisées dans le bassin de la Seine pour la production d'eau potable. Ainsi, en Ile-de-France, une part dominante de l'eau potable est produite à partir des eaux de la Seine, la Marne et l'Oise. Dans un contexte où les normes de qualité microbiologique sur les eaux potabilisables vont être revues dans le sens d'un accroissement de sévérité, il est également important d'envisager des mesures visant à améliorer la qualité de la ressource. La définition de mesures à prendre pour améliorer la qualité microbiologique des eaux du bassin passe par une bonne connaissance du niveau actuel de qualité, des sources de micro-organismes d'origine fécale et de leur écologie dans le milieu aquatique ; ceci fait l'objet de la problématique « qualité microbiologique » développée lors de la phase actuelle du programme PIREN Seine.

Les travaux réalisés en 2003 ont porté sur :

(1) les aspects réglementaires liés à l'introduction d'une nouvelle norme de qualité des eaux de baignade. Une nouvelle norme Européenne de qualité des eaux de baignade basée sur le dénombrement des *Escherichia coli* et des entérocoques intestinaux comme indicateurs de contamination fécale en remplacement des coliformes totaux et fécaux sera vraisemblablement d'application en 2005. Nous avons tenté d'évaluer si cette modification de norme modifiera l'évaluation de la qualité microbiologique des eaux de surface ;

(2) du développement méthodologique. Nous avons utilisé sur des échantillons naturels la technique d'hybridation in situ avec une sonde oligonucléotidique spécifique pour le dénombrement des *E. coli* ;

(3) la poursuite de collectes de données sur les apports ponctuels de bactéries fécales aux rivières via les rejets de stations d'épuration et sur les apports diffus par lessivage des sols avec une attention particulière aux indicateurs qui seront repris dans la future norme de qualité microbiologique des eaux de baignade (*Escherichia coli* et entérocoques intestinaux) ;

(4) l'étude d'un processus contrôlant le devenir des bactéries fécales en rivières : la sédimentation ;

(5) l'acquisition de données de terrain (profils longitudinaux des abondances en bactéries fécales dans la Marne et dans la Vesle) ;

(6) la validation des prédictions des teneurs en coliformes fécaux dans certaines rivières du bassin de la Seine calculées par l'applicatif du modèle SENEQUE.

2. Aspects réglementaires

Les normes de qualité microbiologique des eaux de surface seront prochainement modifiées à l'échelle européenne. Ainsi la norme impérative de qualité des eaux de baignade, basée jusqu'à présent sur le dénombrement des coliformes totaux (CT) et des coliformes fécaux (CF), utilisera dorénavant les indicateurs que sont les *Escherichia coli* (EC) et les entérocoques intestinaux (EI). Le tableau 2.1 reprend la norme actuelle et le projet de nouvelle norme européenne de qualité des eaux de baignade.

Tableau 2.1. a) Qualité microbiologique requise pour les eaux de baignade (Directive du Conseil des Communautés européennes du 8/12/1975 (n° 76/160))

b) Projet de norme européenne de qualité microbiologique des eaux de baignade.

a)

	Norme guide ^a	Norme impérative ^b
Coliformes totaux	500 / 100 ml	10000 / 100ml
Coliformes fécaux	100 / 100 ml	2000 / 100 ml
Streptocoques fécaux	100 / 100 ml	

b)

	Norme guide ^a	Norme impérative ^b
<i>Escherichia coli</i>	250 / 100 ml	500 / 100 ml
Entérocoques intestinaux	100 / 100 ml	200 / 100 ml

^a qu'il faut s'efforcer de respecter, ^b à ne jamais dépasser

Le tableau 2.1 montre que la recherche des coliformes totaux est abandonnée car ceux-ci sont considérés comme peu spécifique de flore intestinale. Le dénombrement des *Escherichia coli* remplace celui des coliformes fécaux car les *Escherichia coli* qui constituent la majeure partie des CF semble être mieux corrélé au risque sanitaire (Fewtrell and Bartram, 2001). Finalement, une norme impérative est ajoutée pour les entérocoques intestinaux.

Afin d'estimer l'impact de cette modification de norme sur l'évaluation de la qualité microbiologique des eaux du bassin de la Seine, nous avons, dans un premier temps, comparé les dénombrements de CF et de EC effectués selon les méthodes normatives sur des échantillons différemment contaminés provenant de rivières du bassin de la Seine. Le dénombrement des CF a été effectué par la technique de filtration sur membrane avec le milieu gélosé Tergitol et TTC tandis que le dénombrement de EC a été réalisé par la méthode du nombre le plus probable (NPP) miniaturisée qui est basée sur la détection après incubation de l'activité de la glucuronidase, enzyme spécifique des EC (méthode également connue sous le nom de « Microplaque 96 puits »). Comme attendu, les deux dénombrements sont bien corrélés (Figure 2.1). Sur base de nos résultats, le rapport moyen entre EC et CF est de 0.67 ce qui signifie que les EC représentent en moyenne 67 % des CF. Cette valeur est très proche de la valeur proposée par l'USEPA (Environmental Protection Agency) qui est de 0.63 (cad que 63 % des CF sont des EC). Ceci signifie que la norme impérative des eaux de baignade actuelle de

2000 CF/100 ml correspond à environ à 1340 EC/100 ml. Cela indique donc que la future norme avec une valeur impérative à 500 EC/100 ml sera plus sévère que la norme actuelle tandis que la norme guide où la valeur de 100 CF/100 ml sera remplacée par 250 EC/100 ml sera moins sévère mais il faut noter que les niveaux correspondants aux normes guides ne sont qu'exceptionnellement rencontrés dans le bassin de la Seine.

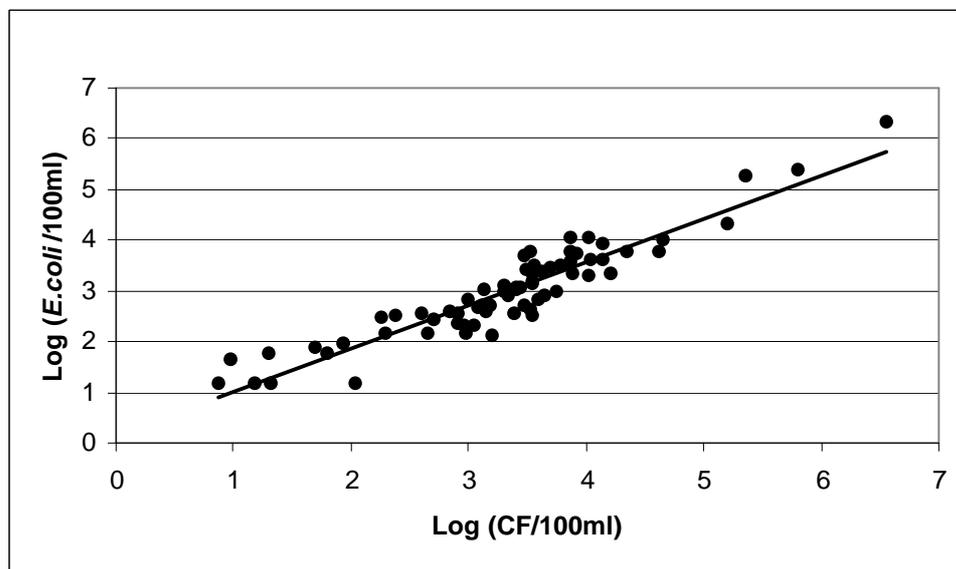


Figure 2.1. Relation en coordonnées logarithmique entre la teneur en *Escherichia coli* et en CF d'échantillons d'eau de rivières du bassin de la Seine diversement contaminées. Droite de corrélation : $Y = 0.85 X + 0.17$, $n = 70$, $r^2 = 0.87$.

Pour évaluer quel était l'impact de l'introduction d'une norme impérative pour les EI, nous avons utilisé les données collectées sur l'estuaire de Seine par la Cellule Antipollution du SNS de Rouen. L'analyse des données microbiologiques de 1999 à 2001 montrent que sur 356 échantillons collectés, 141 (soit 40 %) présentaient une teneur en EC inférieure à la norme impérative de 500 EC/100 ml. Parmi ces 141 échantillons, 37 présentaient une teneur en EI supérieure à la norme impérative de 200 EI/100 ml. Ce signifie que 26 % des échantillons considérés comme corrects par rapport au paramètre EC ne l'étaient pas par rapport au paramètre EI.

L'analyse réalisée ci-dessus montre clairement que la nouvelle norme impérative de qualité des eaux de baignade sera plus sévère que la norme actuelle de par le remplacement de la valeur de 2000 CF/100 ml par la valeur de 500 EC/100 ml et de par l'addition d'une norme impérative pour les EI.

3. Développements méthodologiques

Les méthodes classiques d'énumération des coliformes dans les eaux naturelles sont basées sur la mise en culture des échantillons dans ou sur des milieux nutritifs sélectifs (AFNOR, 2001). En raison de certaines limitations des méthodes traditionnelles, diverses autres techniques de détection des coliformes ont été développées ces dernières années, principalement des méthodes basées sur leurs propriétés enzymatiques ou des techniques de biologie moléculaire. Une des méthodes basées sur les propriétés enzymatiques des coliformes ne nécessite pas de mise en culture des échantillons. Elle a fait l'objet de développements méthodologiques dans le cadre du PIREN et a été appliquée avec succès aux eaux de surface (George et al., 2000) et aux eaux usées (George et al., 2001b). Cette méthode est basée sur la mesure d'une activité enzymatique spécifique d' *E.coli* (activité β -D glucuronidase), souche qui constitue la part prépondérante des coliformes fécaux en milieu aquatique naturel (George et al., 2000). Cette mesure, en plus de sa rapidité, offre l'avantage de prendre en compte les bactéries viables mais non-cultivables (George et Servais, 2002). Elle peut aujourd'hui être employée pour le contrôle en temps réel de la qualité microbiologiques des eaux potabilisables ou des eaux de baignade.

Des méthodes de biologie moléculaire sont, par ailleurs, développées actuellement pour caractériser les micro-organismes présents dans les eaux de rivières. Le FISH (Fluorescent In Situ Hybridization), qui se base sur l'utilisation de sondes oligonucléotidiques spécifiques de séquences pertinentes, semble l'une des techniques les plus prometteuses. Dans le cadre des travaux du PIREN en 2002, nous avons mis au point une méthode d'hybridation in situ (FISH) pour le dénombrement des *E.coli* dans les milieux naturels (Servais et al., 2003) sur base de travaux réalisés pour des applications de cette méthode aux eaux de distribution (Delabre et al., 2001, Lepeuple et al., 2003). Cette méthode se base sur l'utilisation d'une sonde oligonucléotidique marquée avec un fluorochrome, qui s'hybride de manière spécifique avec une séquence complémentaire présente chez *E. coli*. L'hybridation est précédée d'une étape de revivification (DVC : Direct Viable Count) qui permet à la fois de ne prendre en compte que les *E. coli* viables mais aussi d'accroître le contenu en ARN des cellules à hybrider ce qui facilite leur détection en microscopie à épifluorescence après hybridation. Un exemple de photographie de préparation microscopique est présenté à la figure 3.1.

En 2003, cette méthode a été appliquée à des échantillons de rivières du bassin de la Seine et à des échantillons d'eau d'entrée et de sortie de stations d'épuration. Les résultats de ce travail ont montré que les teneurs en *E. coli* mesurées par une méthode de mise en culture (méthode du nombre le plus probable (NPP) en microplaques) et par la procédure DVC-FISH étaient bien corrélées mais que les dénombrements par la méthode DVC-FISH donnaient systématiquement des résultats supérieurs. Le rapport entre les deux types de dénombrement (DVC-FISH/NPP) passent d'une valeur de 2 pour les eaux fortement contaminées à des valeurs proches de 100 pour les eaux peu contaminées. Ceci met en évidence une forte sous-estimation (jusqu'à un facteur 100) de l'abondance des *E. coli* viables par les méthodes de mise en culture dans les milieux peu contaminés.

Les résultats de ce travail méthodologique sont décrits dans le texte qui suit. Ces travaux ont fait l'objet d'une présentation au colloque « Health Related Microbiology » de l'International Water Association qui s'est tenu en septembre 2003 à Cape Town (Afrique du Sud). Le texte de cette présentation est repris ci-dessous.

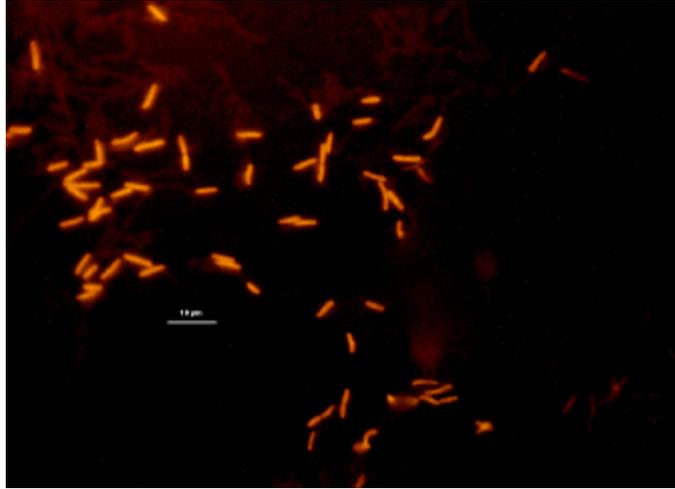


Figure 3.1 Photographie de bactéries visualisées en microscopie à épifluorescence après la procédure DVC-FISH. Les bactéries fluorescentes allongées sont les E. coli. (Echantillon d'eau usée traitée)

Combining direct viable count (DVC) and fluorescent in situ hybridization (FISH) to enumerate viable *E. coli* in rivers and waste waters

Tamara Garcia Armisen and Pierre Servais

Ecologie des Systèmes Aquatiques, Université Libre de Bruxelles, Campus de la Plaine, CP221, Boulevard du Triomphe, B-1050 Bruxelles, Belgium

e-mail: tgarciaa@ulb.ac.be; pservais@ulb.ac.be

Abstract

In this study, a combination of the direct viable count procedure (DVC) and the FISH method was used to monitor by epifluorescence microscopy the abundance of viable *E. coli* in river and wastewater samples. The DVC procedure consists in exposing bacterial cells to a revivification medium containing antibiotics preventing cellular division and thus inducing an elongation of the viable cells. The FISH was performed using the "Colinsitu" probe, specific for *E. coli* 16S r-RNA. Accuracy and detection limit of the epifluorescence microscopic DVC-FISH procedure was investigated. The method was then applied to river and waste water samples. A good correlation was found in log-log plot between the abundance of *E. coli* enumerated by a classical culture based method (MPN method) and the DVC-FISH procedure. However, the DVC-FISH procedure gave systematically higher numbers. The ratio between both enumerations (DVC-FISH/MPN) which indicates also the ratio between viable and culturable *E. coli*, ranged between 2 and more than 30. It increased with decreasing abundance of culturable *E. coli*.

Keywords: *E. coli*, fluorescent in situ hybridization, rivers, waste waters

Introduction

Enumeration of *E. coli* is now more and more used to assess microbiological water quality. Classical methods for enumerating *E. coli* are based on culture methods in liquid (most probable number) or solid (plate counts) media. These methods are time-consuming (usually a minimum of 24 h of incubation is needed) and do not allow to detect all the indicator bacteria in natural environments. Indeed, when released in natural waters, fecal bacteria were shown to lose their ability to grow on culture media while preserving their viability (Colwell et al. 1985; Grimes and Colwell 1986). The presence of these viable but non culturable (VBNC) bacteria in the environment could be important from a sanitary point of view as some authors suggested that pathogenic VBNC bacteria could maintain their virulence (Pommepuy et al. 1996).

In this study, a combination of the direct viable count procedure (DVC)(Kogure et al., 1979) and the fluorescent in situ hybridization (FISH) method was used to monitor by epifluorescence microscopy the abundance of viable *E. coli* in river and waste water samples. The DVC procedure consists in exposing bacterial cells to a revivification medium containing antibiotics preventing cellular division and thus inducing an elongation of the viable cells. The FISH was performed using the “Colinsitu” probe (Régnauld et al., 2000), specific for *E. coli* 16S r-RNA. The introduction of the DVC stage allows, on one hand, to have in the viable (elongated) cells a sufficient rRNA content to be detectable after the FISH procedure by epifluorescence microscopy and, on the other hand, to distinguish viable *E. coli* from non viable *E. coli*. The results obtained by the DVC-FISH procedure were compared to those obtained on the same samples by the standardized most probable number (MPN) microplate method (detection of the β -D-glucuronidase activity of *E. coli* after 36 to 48 h incubation at 44 °C).

Materials & Methods

River water samples were collected in different rivers of the Seine river hydrographical network (France), from small rivers upstream to any domestic waste water discharge to the Seine river highly contaminated downstream the Parisian area. Waste water samples were collected at the entrance and at the outlet of different French waste water treatment plants. The treatment in these plants included primary settling followed by activated sludge process. All samples were collected in sterile 2 liters bottles, kept at 4°C and analyzed within 12 h.

Standardized miniaturized MPN method (ISO 9308-3) using microplates (BIO-RAD) was used for the enumeration of culturale *E. coli*. In this method based on the defined substrate approach (Edberg et al., 1989), 200 μ l of the sample and of several decimal dilutions were added in each of the 96 wells of the microplate containing the substrate (4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide) in dehydrated form. This substrate is hydrolyzed by the β -D-glucuronidase (an enzyme specific of *E.coli*) and then released a fluorescent compound (MUF) which can be detected under ultraviolet light. The microplates were incubated for 36 to 48 h at 44°C and the presence of *E.coli* was evaluated in each well by detection of fluorescence. The number of positive (fluorescent) wells allows to calculate the *E. coli* abundance using a statistical analysis based on Poisson’s law.

The DVC-FISH procedure used in this study for *E.coli* enumeration is based on the procedure proposed by Regnauld et al. (2000) with some modifications. Water samples (1 to 100 ml) were filtered through 0.2 μ m polycarbonate membrane (25 mm diameter). For the DVC procedure, the membrane was put on an absorbent pad previously soaked with 0.6 ml of TCS broth supplemented with yeast extract (0.6% w/v), nalidixic acid (10 μ g/ml) and ciprofloxacin (1 μ g/ml) and incubated at 30 °C for 4 h. Bacteria were then fixed with PFA (3% w/v). For the FISH procedure, the membrane was transferred on a new pad soaked with 300 μ l of hybridization buffer and then covered with 300 μ l of hybridization buffer containing probes. The hybridization was performed for 2 h at 42 °C. The “Colinsitu” probe (Regnauld et al., 2000) labeled with CY3 dye at the 5'-end was used. The specificity of this probe for *E.coli* 16 S rRNA was clearly demonstrated by Regnauld et al. (2000) and thus not tested in the present study. Eubacterial probe EUB338 labeled with FITC at its 5' end

was used as a control. After hybridization, the filter was removed, covered with 2 ml of pre-warmed washing buffer and incubated at 51 °C for 20 min. The filter was then mounted on glass slide and observed by epifluorescence microscopy. DVC-FISH positive events were enumerated on 100 microscopic fields. To avoid to take into account false positive signals (autofluorescent particle), each DVC-FISH positive event was controlled to be a bacteria by checking its labeling by the EUB338 probe.

Results and discussion

Accuracy and detection limit of the epifluorescence microscopic DVC-FISH procedure was first investigated. For this, a pure strain of *E. coli* isolated from natural water was cultivated in a rich medium; during the exponential phase, cells were harvested by centrifugation, washed three times with sterile physiological solution and then spiked at 4 different concentrations (3×10^2 to 3×10^5 /100 ml) in natural water containing 1.5×10^8 /100 ml autochthonous bacteria and no *E. coli*. Enumeration of *E. coli* was performed in triplicates, just after spiking, by both methods (MPN and DVC-FISH). In Figure 1, the abundance measured the DVC-FISH method was plotted against the abundance estimated by the MPN method. A significant correlation with a slope close to 1 was observed in the log-log plot indicating that both methods gave similar data. This demonstrated the ability of the DVC-FISH procedure proposed in this paper to enumerate low numbers of viable *E. coli* among a large abundance of non targeted cells. The relative error (in %) was calculated for each *E. coli* enumeration performed by both methods (Table 1). For the MPN procedure, the relative error did not depend on the number of *E. coli* enumerated and was 20 % on average which is quite usual for this type of method. For the DVC-FISH method, the relative error decreased with increasing abundance of viable *E. coli*. The very high relative error for the concentration of 300 *E. coli*/100 ml is due to the very low number of positive events detected on the 100 microscopic fields observed for the enumeration. As 100 ml was filtered and as the ratio between the filtration surface on the membrane and the number of microscopic fields is around 10000, it means that with a concentration of 300 *E. coli*/100 ml, 3 positive events are expected on the 100 microscopic fields observed for the enumeration. Data of table 1 also shows that when the abundance reached 3000 *E. coli*/100 ml the relative error of the DVC-FISH method was similar to the average relative error with the MPN method; for higher abundance, the DVC-FISH method was more accurate than the culture method. On the basis of these data, we can propose a value of around 3000 viable *E. coli*/100 ml as detection limit, with an acceptable relative error, for the DVC-FISH procedure.

The DVC-FISH procedure was then used on river and waste water samples. For these samples, the filtered volume depends on the suspended matter (SM) content of the water because in some cases it was not possible to filter 100 ml due to the fouling of the membrane by the SM. A good correlation was found between the abundance of *E. coli* enumerated by the MPN method and the DVC-FISH procedure in a log-log plot (Figure 2). However, the DVC-FISH procedure gave systematically higher numbers than the MPN method at the opposite to what was observed with the pure strain of *E. coli* in exponential growth phase spiked in natural water (Figure 1). In a previous study, using a DVC-FISH procedure for *E. coli* enumeration in drinking water, Delabre et al. (2001) also found higher abundance with the FISH procedure than with a culture based method. In our data, the ratio between both enumerations

(DVC-FISH/MPN) ranged between 2 and more than 30. It increased with decreasing abundance of culturable *E. coli* (Figure 3). If we assume that the difference between estimates by both methods is due to VBNC *E. coli* detected by the DVC-FISH procedure and not by the MPN method, the ratio DVC-FISH/MPN indicates the ratio between viable *E. coli*, on one hand, and culturable *E. coli*, on the other hand. Our observations thus suggested that the proportion of viable but non culturable *E. coli* increased in weakly contaminated waters probably because of the more stressing conditions (low nutrients concentration, for example) for *E. coli* found in these waters.

Conclusion

Our results demonstrated that an epifluorescence microscopic DVC-FISH procedure can be used to enumerate viable *E. coli* in rivers and waste waters. This method, at the opposite to the culture based methods, allows to obtain a result within a working's day schedule but is presently too time consuming to be considered for routine microbiological water analysis. In natural samples, the comparison of the DVC-FISH method with a culture based method used for the routine microbiological control of surface waters suggested the presence of a large proportion of viable *E. coli* not detected by the classical methods. The presence in some samples of a significant numbers of viable *E. coli* cells not detectable by the standardized culture based methods should question scientists on the real signification of the routine microbiological water quality analysis by classical methods and the deduced estimation of the sanitary risk.

Acknowledgements

Tamara Garcia Armisen benefits from a doctoral grant of the "Fonds pour la Formation à la Recherche dans l'Industrie et l'Agriculture" (FRIA) (Belgium). This study was a part of the PIREN Seine program of the CNRS (France). The authors thank Adriana Anzil and Philippe Mercier for their help during the field work and Karine Delabre (Anjou Recherche) for interesting discussions on the DVC-FISH protocol.

References

- Colwell, R. R., Brayton, P. R., Grimes, D.J., Roszak, D.B., Huq, S.A. and Palmer, L.M. (1985). Viable but non-culturable *Vibrio cholerae* and related pathogens in the environment: Implications for release of genetically engineered micro-organisms. *Biotechnology*, 3: 817-820.
- Delabre, K., Dile, V., De Roubin, M.R., Gatel, D., Poty, F. and Cavard, J., (2001). New analytical tools for distribution system surveillance. In: *Proceedings of AWWA-Annual Conference, Washington, D.C. CD-Rom*.
- Edberg, S.C., Allen, M.J. and Smith, D.B. (1988). National field evaluation of a defined substrate method for the simultaneous enumeration of total coliforms and *Escherichia coli* from drinking water: comparison with the standard multiple tube fermentation method. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 1595-1601.
- Grimes, D.J.R. and Colwell, R. (1986). Viability and virulence of *Escherichia coli* suspended by membrane chamber in semitropical ocean water. *FEMS Microbiology Letters* 34: 161-165.
- Kogure, K., Simidu, U. and Taga, N. (1979). A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria. *Can. J. Microbiol.* 25: 415-420.

Pommepuy, M., Butin M, Gourmelon M. Colwell R.R and Cormier, M. (1996). Retention of enteropathogenicity by viable but nonculturable *Escherichia coli* exposed to seawater and sunlight. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 4621-4626

Regnault, B., Martin-Delautre, S., Lejay-Collin, M., Lefèvre, M., and Grimont, P.A.D. (2000). Oligonucleotide probe for the visualization of *Escherichia coli*/*Escherichia fergusonii* cells by *in situ* hybridization: specificity and potential application. *Res. Microbiol.* 151: 521-533.

Table 1. Relative error on the enumeration of *E. coli* (spiked in natural waters containing $1.5 \times 10^8/100$ ml autochthonous bacteria) by the MPN and the DVC-FISH methods.

Number of spiked <i>E. coli</i> (/100 ml)	Relative error with MPN method (%)	Relative error with DVC-FISH method (%)
300	12	170
3000	21	20
30000	35	7
300000	15	5

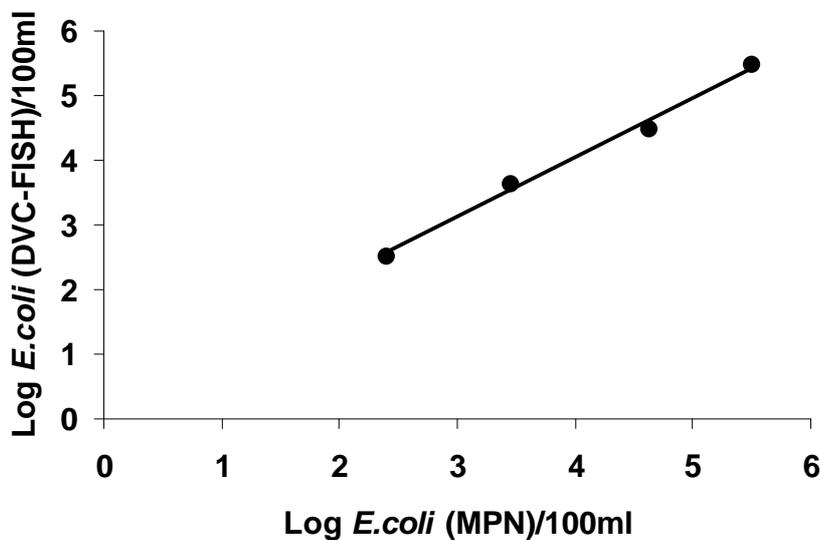


Figure 1. *E. coli* enumerated by the DVC-FISH procedure plotted against *E. coli* enumerated by the MPN method in natural water containing $1.5 \times 10^8/100$ ml autochthonous bacteria spiked with various concentrations of *E. coli*. Correlation straight line : $y = 0.93x + 0.35$ ($n = 4$, $r^2 = 0.99$)

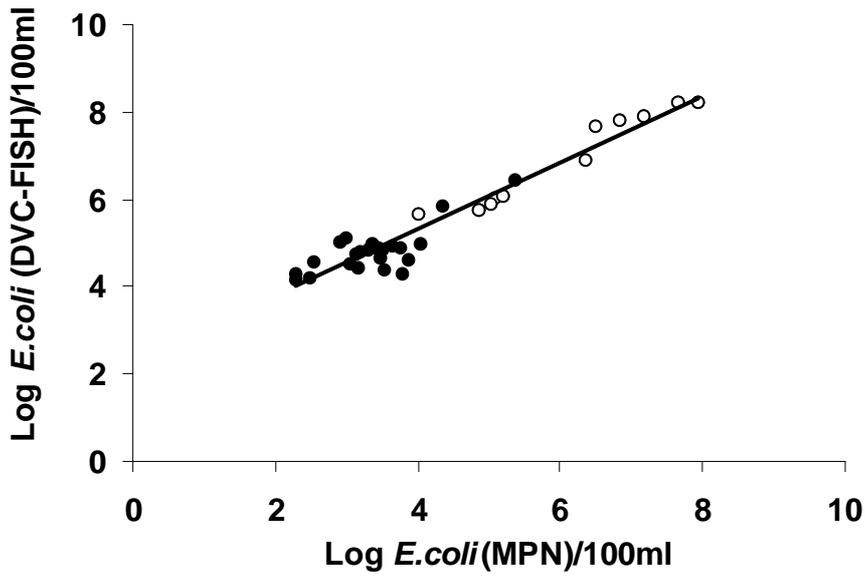


Figure 2. *E. coli* enumerated by the DVC-FISH procedure plotted against *E. coli* enumerated by the MPN method in river water (●) and waste water (○) samples. Correlation straight line : $y = 0.76x + 2.25$ ($n = 35$, $r^2 = 0.94$)

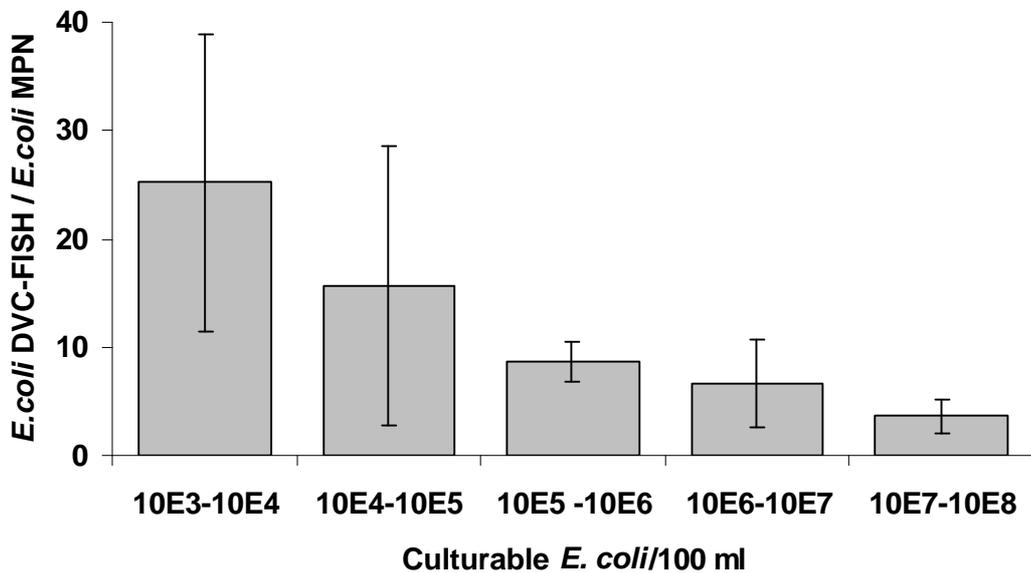


Figure 3. Ratio of the *E. coli* enumerated by the DVC-FISH method and the MPN method plotted for different ranges of culturable *E. coli* (MPN enumeration).

4. Apports d'*E. coli* et d'entérocoques intestinaux par les sources ponctuelles et diffuses

Dans les bassins versants anthropisés, les rejets d'eaux usées domestiques constituent, à priori, la source principale de contamination fécale du milieu naturel. La plupart des rejets domestiques urbains sont aujourd'hui traités en station d'épuration (STEP), dont l'objectif est d'éliminer les matières en suspension et la matière organique des effluents et, pour les plus performantes d'entre elles, la pollution azotée et éventuellement phosphorée. Bien que les eaux usées transportent aussi de nombreux germes fécaux (parmi lesquels certains sont pathogènes), très peu de STEPs sont à l'heure actuelle équipées de traitements spécifiquement conçus pour éliminer ces micro-organismes. En plus des rejets localisés des STEPs, qui peuvent être considérés comme des sources ponctuelles, le milieu naturel reçoit également des micro-organismes fécaux par des sources diffuses de contamination, (lessivage des sols). Des premières données avaient été acquises sur l'importance de ces types d'apport lors de la phase précédente du programme PIREN Seine (George et Servais, 2002 ; George et al., 2002, 2004) ; ces travaux avaient porté sur les apports de coliformes fécaux aux rivières du bassin de la Seine. En 2003, nous avons étendu l'étude des apports ponctuels et diffus aux deux types de bactéries fécales qui serviront prochainement pour le contrôle de la qualité microbiologique des eaux de baignade (*Escherichia coli* et entérocoques intestinaux). Comme pour les coliformes fécaux (George et al., 2004), les résultats montrent la prédominance à l'échelle du bassin des apports ponctuels (rejets de STEPs) sur les apports diffus (lessivage des sols).

Les travaux réalisés sur ce thème en 2003 sont synthétisés dans le texte suivant qui fera l'objet d'une présentation au Colloque Mondial de l'International Water Association en septembre 2004 à Marrakech.

Respective Contributions of Point and Non Point Sources of *E. coli* and Enterococci in a Large Urbanised Watershed (The River Seine, France)

Tamara Garcia Armisen and Pierre Servais

Ecologie des Systèmes Aquatiques, Université Libre de Bruxelles, Campus de la Plaine, CP221, Boulevard du Triomphe, B-1050 Bruxelles, Belgium. e-mail: tgarciaa@ulb.ac.be; pservais@ulb.ac.be

Abstract

Because large rivers of the river Seine watershed show a low microbiological water quality, the main sources of fecal contamination were investigated. The inputs of the point (wastewaters outfalls) and non point (soil leaching) sources of fecal bacteria (*E. coli* and Intestinal Enterococci) were quantified. Raw and treated wastewaters and small streams upstream from any wastewater outfall were investigated. Data were used to evaluate the respective contribution of point and non-point sources on the global load in the watershed. The results obtained for this large urbanized watershed, taking into account the use of the soil and the high population density of the area, shows the predominant importance of the point sources at the whole watershed scale.

Keywords: Fecal contamination, *Escherischia coli*, Intestinal Enterococci, wastewaters, soil leaching, river Seine watershed

The water quality and ecological functioning of the different rivers of the Seine watershed (France) have been extensively studied during the last ten years within the framework of two French multidisciplinary scientific programs (the PIREN Seine and Seine-Aval programs). Quantification of fecal contamination indicators such as total and fecal coliforms have repeatedly demonstrated the low microbiological quality of all the large rivers of the watershed (George et al., 2001). The purpose of the present work was to identify which were the main sources of this fecal contamination in such a large urbanised watershed. We thus compared the respective contribution of point sources (wastewater outfalls) and the non-point sources (soil leaching). *Escherichia coli* and Intestinal Enterococci (IE) were used as fecal indicators since these micro-organisms have been recently selected by the European Union as indicators to define mandatory quality of bathing waters.

In order to quantify the contribution of treated wastewaters to the fecal bacterial load, mean daily samples were collected in raw and treated waters of six wastewater treatment plants (WWTPs). The treatment in these WWTPs included primary settling followed by an activated sludge process with sometimes nitrification. *E. coli* and IE were enumerated using standardised miniaturised most probable number (MPN) methods (ISO 1899-1 and 9308-3). In raw waters, mean *E. coli* and IE abundances ranged between $9.0 \cdot 10^6$ to $8.6 \cdot 10^7$ /100 ml to 10^6 to $2.3 \cdot 10^6$ /100 ml, respectively (Figure 1). The Log removal by water treatment ranged between 1.3 to 2.4 for *E. coli* and between 0.6 to 2.7 for IE. For both fecal indicators, the large Achères WWTP plant (8

millions equivalent inhabitants) close to Paris was the less efficient while the newly built Reims WWTP was the most efficient.

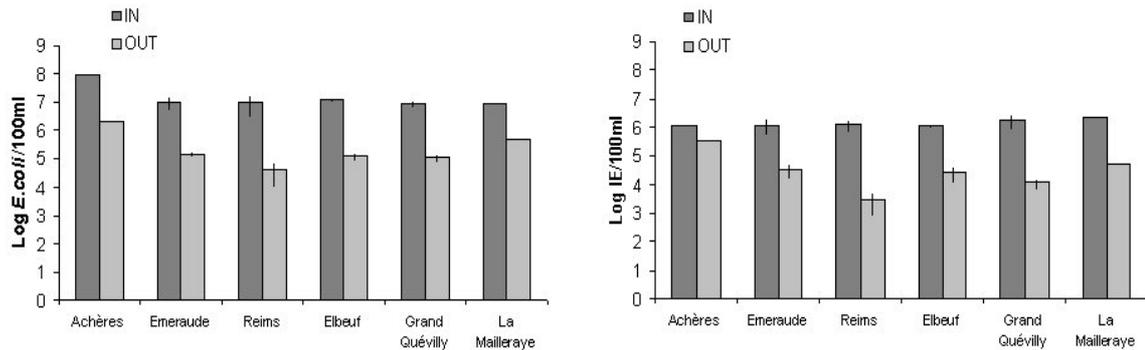


Figure 1. Abundance of *E. coli* and IE per 100 ml of raw (In) and treated (Out) wastewaters in the various WWTPs located in the Seine watershed. For WWTPs that were sampled several times, the geometric mean value and the range between maximum and minimum values (vertical bar) are presented.

In order to compare the output of the different WWTPs, *E. coli* and IE measured in treated wastewater were expressed in terms of specific load per inhabitant and per day, *i. e.* the daily numbers of *E. coli* and IE discharged through wastewater by one inhabitant-equivalent. Specific loads were calculated according to Servais et al. (1999) considering a daily charge in biological oxygen demand (BOD) of 54 g per inhabitant and per day as proposed by the WHO (1982). For each WWTP, the daily wastewater volume per inhabitant ($\text{m}^3 \text{inh}^{-1} \text{day}^{-1}$) was calculated by dividing the value of 54 ($\text{g inh}^{-1} \text{day}^{-1}$) by the average BOD concentration in raw wastewater (mg l^{-1}). The specific load in treated wastewater was calculated by multiplying the *E. coli* or IE abundance by the daily wastewater volume per inhabitant. The specific loads ranged between $5.8 \cdot 10^7$ (Reims) to $5.7 \cdot 10^9$ (Achères) *E. coli* $\text{inh}^{-1} \text{day}^{-1}$ and between $4.1 \cdot 10^6$ (Reims) to $8.6 \cdot 10^8$ (Achères) IE $\text{inh}^{-1} \text{day}^{-1}$. These loads at WWTPs outlet depended on the abundance in the raw waters and on the treatment efficiency in the different WWTPs. The geometric mean of the specific loads for the six sampled WWTPs were $3.6 \cdot 10^8$ *E. coli* $\text{inh}^{-1} \text{day}^{-1}$ and $5.6 \cdot 10^7$ IE $\text{inh}^{-1} \text{day}^{-1}$.

In order to assess the contribution of non-point (non domestic) sources to the fecal contamination of the rivers in the Seine watershed, small streams (order 1 or 2) located in rural areas were sampled upstream from any wastewater outfall in two different regions of the watershed: the upper river Oise sub-bassin (12 streams investigated four times) and the Normandy (Andelle, Epte and Risle subwatersheds, 17 streams sampled two times). These small streams were classified depending on the coverage of their own watersheds: forest areas, cultivated areas and grazed areas. Data presented in figure 2 show the impact of land use on microbiological water contamination. In both regions, the small streams flowing through pastures were systematically more contaminated than those flowing through forests or cultivated areas. The level of fecal contamination due to soil leaching in different types of areas were in the same range in the two investigated regions but a little higher in Normandy.

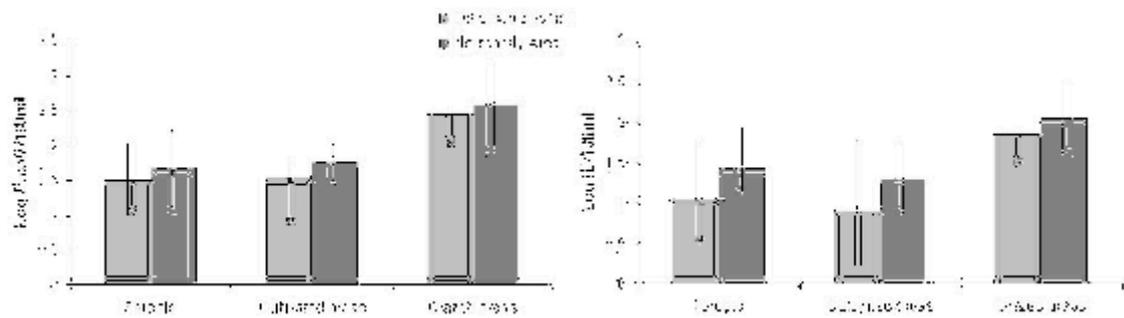


Figure 2. Comparison of *E. coli* and IE in small streams collected in the Oise subwatershed (grey bars) and in Normandy (black bars) and flowing through forest, cultivated or grazed areas. Data were expressed as geometric mean values for each category and vertical bars represented the range between minimal and maximal values.

To be able to roughly compare the respective contribution of point and non point sources to fecal contamination in the whole watershed, we made the following calculations. For non point sources, geometric means of *E. coli* abundance were calculated for streams flowing through forest, cultivated or grazed areas on the basis of the data collected in our surveys (*E. coli*/100ml: forests 39; cultures 47; pastures 334). Taking into account the proportion of forests (25 %), cultures (51 %) and pastures (17%) in the Seine watershed, it was possible to calculate a weighted mean *E. coli* abundance of 90/100 ml for the whole watershed. This concentration was then multiplied by the average specific discharge of the rivers of this watershed ($7.4 \text{ l km}^{-2} \text{ sec}^{-1}$) to give the amount of *E. coli* released per km^2 per sec by non-point sources ($6697 \text{ E. coli km}^{-2} \text{ sec}^{-1}$). For point sources, we considered that wastewaters from the entire population living in the watershed were treated by the activated sludge process, the more common wastewater treatment used in France. *E. coli* released per inhabitant per second through activated sludge-treated effluents have been evaluated to $4170 \text{ E. coli km}^{-2} \text{ sec}^{-1}$, which means $959100 \text{ E. coli km}^{-2} \text{ sec}^{-1}$ for an average population density of 230 inhabitants per km^2 . Point sources were thus 144 times more important than soil leaching. Similar calculations were performed for IE; in this case, point sources were 75 times higher than non point sources.

Our results show that, at the scale of a large urbanised watershed, the input of fecal micro-organisms by non-point sources is much lower than the inputs by point sources. However, it should be kept in mind that these global calculations do not give any information on the *local* impact of diffuse non human sources which can have a major importance on the microbiological quality of small rivers.

References

- George I., Petit M., Theate C., Servais P. 2001. Distribution of coliforms in the Seine river and estuary (France) studied by rapid enzymatic methods and plate count. *Estuaries* 24: 994-1002.
- Servais P. Garnier J., Demarteau N., Brion N. and Billen G. 1999. Supply of organic matter and bacteria to aquatic ecosystems through wastewater effluents. *Water Research* 33: 3521-3531.

5. Etude des processus de devenir des bactéries fécales en rivières

Le pouvoir auto-épurateur des eaux de surface vis-à-vis des bactéries d'origine entérique est un fait largement reconnu depuis des décennies. Ainsi, on considère généralement qu'une fois rejetées en rivière, les bactéries d'origine fécale disparaissent rapidement car elles ne sont pas adaptées à cet environnement qui leur est étranger. Cette disparition résulte de l'action combinée de divers paramètres physico-chimiques et biologiques qui interagissent entre eux. Lors de travaux antérieurs, nous avons étudié et quantifier la vitesse de mortalité des *Escherichia coli* en Seine grâce à une technique originale basée sur le marquage radioactif de bactéries fécales et le suivi de leur disparition dans des eaux naturelles (George et al., 2001c; Menon et al., 2003). Il a ainsi été montré que le brotage par les protozoaires était le processus principal responsable de la mortalité bactérienne et que la lyse spontanée ou induite par des virus contribuait également à l'élimination des bactéries fécales des rivières. A côté des facteurs biologiques, des facteurs physiques, comme la dilution des eaux usées en milieu naturel ouvert (rivières, milieux côtiers) ou la sédimentation des bactéries fécales, peuvent également participer à la disparition des germes fécaux de la colonne d'eau en aval des rejets d'eaux usées.

En 2003, nous nous sommes attachés à l'étude de la sédimentation, un des processus responsables de la disparition des bactéries fécale de la colonne d'eau de la rivière. L'attachement des bactéries fécales aux matières en suspension (MES) joue un rôle majeur dans ce processus de sédimentation. Les travaux entrepris visaient, d'une part, à quantifier l'importance de la fraction des *E. coli* liée aux MES et, d'autre part, à mesurer la vitesse de sédimentation des bactéries fécales fixées aux MES.

Pour quantifier l'importance de la fraction des *E. coli* attachée au MES la technique de mesure de l'activité glucuronidasique spécifique des *E. coli* a été utilisée (George et al., 2000, 2001a,b,c). Sur des échantillons collectés dans diverses rivières du bassin, l'activité glucuronidasique a été mesurée à la fois sur l'ensemble des *E. coli* (activité glu mesurée sur la fraction retenue sur une membrane de 0.2 µm de porosité) et sur les *E. coli* attachés aux MES (activité glu mesurée sur la fraction retenue sur une membrane de porosité 5 µm). Cinq µm est considéré dans ces expériences comme la porosité limite séparant les *E. coli* libres (non attachés aux MES) de ceux qui sont adsorbés sur des particules organiques ou minérales (Servais et al., 2003). Le pourcentage d'activité dans la fraction > 5 µm s'est avéré d'autant plus élevé que la concentration en MES de l'échantillon était élevée (Figure 5.1). Une fraction non négligeable des coliformes est donc bien liée aux MES et elle augmente avec la concentration en MES de l'eau.

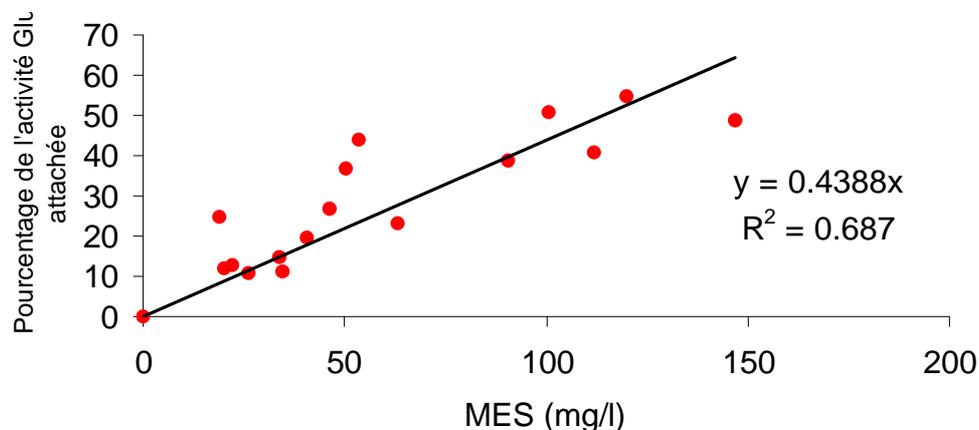


Figure 5.1: Relation entre l'activité GLU dans la fraction supérieure à 5 µm et la concentration en MES.

Pour mesurer la vitesse de sédimentation des *E. coli*, nous avons utilisé des colonnes de sédimentation représentées Figure 5.2. Des échantillons d'eau de rivières caractérisés par teneurs en MES différentes ont été analysés. Le protocole utilisé est une adaptation d'un protocole développé pour mesurer la vitesse de décantation du phytoplancton marin. Les colonnes sont remplies de 4 litres de l'échantillon et une première mesure d'abondance en bactéries fécales est réalisée au $t = 0$ dans l'échantillon homogène (fraction libre et fraction attachée). Après incubation, le culot de sédimentation est récupéré et la concentration en bactéries fécales est déterminée. Un échantillon de contrôle est conservé sous agitation afin de vérifier l'absence de croissance ou de mortalité des bactéries pendant l'incubation. La vitesse de sédimentation est calculée sur base des teneurs en bactéries dans la colonne avant sédimentation, de la teneur dans la culot, du temps d'incubation et de la hauteur de la colonne:



Figure 5.2. Colonnes de sédimentation. Le robinet supérieur indiqué par une flèche permet de récupérer à l'issue de l'expérience la phase en suspension et le robinet inférieur indiqué par une flèche permet de récupérer à l'issue de l'expérience la fraction décantée.

Sur chaque prélèvement, les coliformes fécaux (CF) ont été dénombrés sur milieu gélosé Tergitol-TTC. Par ailleurs, l'activité glucuronidasique totale (mesure effectuée après filtration de l'échantillon sur une membrane de porosité $0.2 \mu\text{m}$) et l'activité glucuronidasique des CF attachés aux MES (mesure effectuée après filtration de l'échantillon sur une membrane de porosité $5 \mu\text{m}$) ont été réalisées sur chaque échantillon. Ces dernières mesures nous permettent de calculer la fraction des bactéries fécales attachées aux MES et la vitesse de décantation de celles-ci. Le calcul tient compte de deux populations de *E. coli*, une fraction non attachée aux MES qui ne sédimente pas et une fraction attachée aux MES qui sédimente. Une expérience de contrôle avec une suspension bactérienne dans une eau libre de MES nous a permis de vérifier que les bactéries non attachées aux MES ne sédimentent pas.

Pour une vingtaine d'échantillons d'eau de rivières dont les MES étaient comprises entre 20 et 150 mg/l ; nous obtenons une vitesse moyenne de sédimentation des *E. coli* attachés aux MES de 0.042 m/h avec une déviation standard de 0.018 m/h . Actuellement dans le modèle SENEQUE une vitesse constante de sédimentation de 0.02 m/h est utilisée pour l'ensemble des bactéries fécales (libres et attachées aux MES) puisque un seul compartiment de bactéries fécales est considéré. Dans l'avenir, nous pourrions considérer deux stocks de bactéries fécales, un pool de bactéries libres (non attachées aux MES) qui ne sédimentent pas et un pool de bactéries attachées aux MES qui sédimentent à une vitesse de 0.042 m/h .

6. Evaluation de la qualité microbiologique de certaines rivières du bassin

Pour compléter les données de terrain nécessaires à la validation du travail de modélisation, deux campagnes d'échantillonnage ont été réalisées sur la Vesle en 2003. Les résultats des profils longitudinaux de qualité microbiologiques des eaux de la Vesle ainsi que des données acquises sur les eaux d'entrée et de sortie de la station d'épuration de Reims sont présentés dans la partie du présent rapport consacré au « Site Atelier Vesle ». Par ailleurs, un profil longitudinal a été réalisé en juillet 2003 sur la Marne (de l'amont de Langres à la confluence avec la Seine). Les résultats de dénombrements des coliformes fécaux sur milieu gélosé spécifique et ceux des nombres les plus probables (NPP) de *Escherichia coli* estimés par la méthode « Microplaque 96 puits » (voir section 2) sont repris à la figure 6.1. On observe des valeurs assez élevées dès l'aval de Langres (Km 10) ; les abondances en CF et en EC restent par la suite relativement stables jusqu'à la confluence avec la Seine. On observe néanmoins deux maxima, le premier à l'aval de Saint Diziers (Km 200) et dans l'agglomération parisienne. Comme mis en évidence à la section 2 de ce rapport, les teneurs en EC sont en général légèrement inférieures à celles de CF.

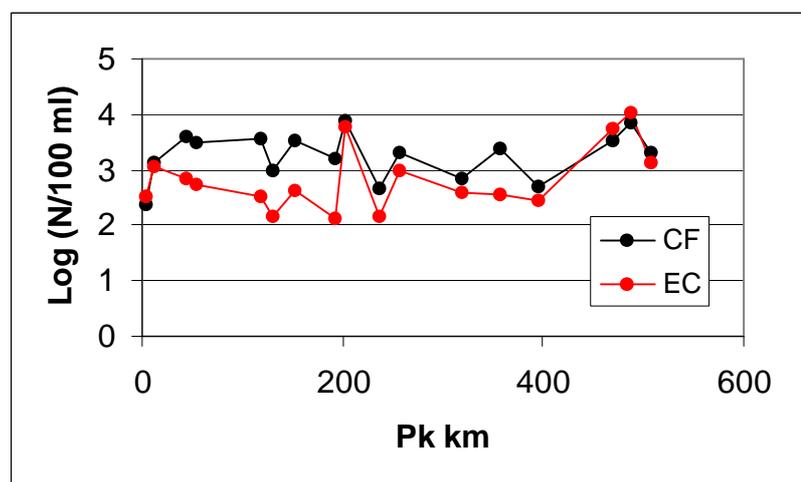


Figure 6.1. Abondances des CF et des EC le long de la Marne en juillet 2003 (Echelle logarithmique pour les dénombrements et échelle kilométrique sur l'axe horizontal avec la confluence Marne - Seine au km 512).

7. Modélisation de la dynamique des coliformes dans le bassin de la Seine

Les connaissances acquises sur les sources et le devenir des coliformes fécaux (CF) en rivière ont été intégrées dans un des modèles biogéochimiques et écologiques existant sur le bassin hydrographique de la Seine. Plus précisément, un compartiment décrivant la dynamique des CF a été intégré à l'applicatif SENEQUE issu du modèle SENEQUE (Billen *et al.* 1994) et actuellement opérationnel sur le bassin de la Marne, de l'Oise de la Seine amont et de l'Eure. L'ajout d'un compartiment « coliformes fécaux » aux modèles du PIREN avait pour objectif de pouvoir prédire par des modèles les abondances en bactéries fécales à diverses échelles spatiales et temporelles.

Une nouvelle variable d'état, l'abondance en coliformes fécaux (CF) cultivables, a été ajoutée dans l'applicatif SENEQUE; cette variable est intitulée FEC, elle est exprimée en CF/l et présentée sur les graphiques en log CF/l. La manière dont les apports diffus et ponctuels de CF sont pris en compte dans la modèle ont été décrits par Servais et al. (2003). Du point de vue processus, le modèle considère une mortalité des CF du premier ordre dépendante de la température, prend en compte la sédimentation des CF avec une vitesse de sédimentation uniforme (qui s'applique à l'ensemble du compartiment) avec une vitesse de chute de 0.02 m/h.

L'essentiel du travail de modélisation réalisé en 2003 a consisté à valider l'applicatif SENEQUE par comparaison des calculs du modèle avec des résultats expérimentaux.

Des simulations ont été réalisées à l'aide de l'applicatif SENEQUE sur l'axe fluvial de la Vesle. Un exemple est présenté à la figure 7.1. Il s'agit dans le cas présenté d'une simulation en conditions estivales de l'abondance en CF le long de la Vesle entre l'amont de Reims et la confluence avec l'Aisne. Cette simulation est comparée aux données expérimentales acquises en 2002 (Servais et al., 2003). La figure montre que le calcul du modèle reproduit bien les données expérimentales. A la fois les niveaux d'abondances en CF et l'allure de la décroissance à l'aval de Reims sont bien reproduits. Des profils longitudinaux ont également été réalisés sur la Vesle en 2003 (voir la partie du présent rapport consacré au « Site Atelier Vesle »), soit après la complète mise en service de la nouvelle station d'épuration de Reims. Les résultats expérimentaux ont montré que la mise en service de cette nouvelle STEP avait permis de diminuer les apports en CF dans la Vesle à hauteur de Reims. La figure 7.2 montre que le modèle SENEQUE simule correctement la situation tel qu'observée en 2003.

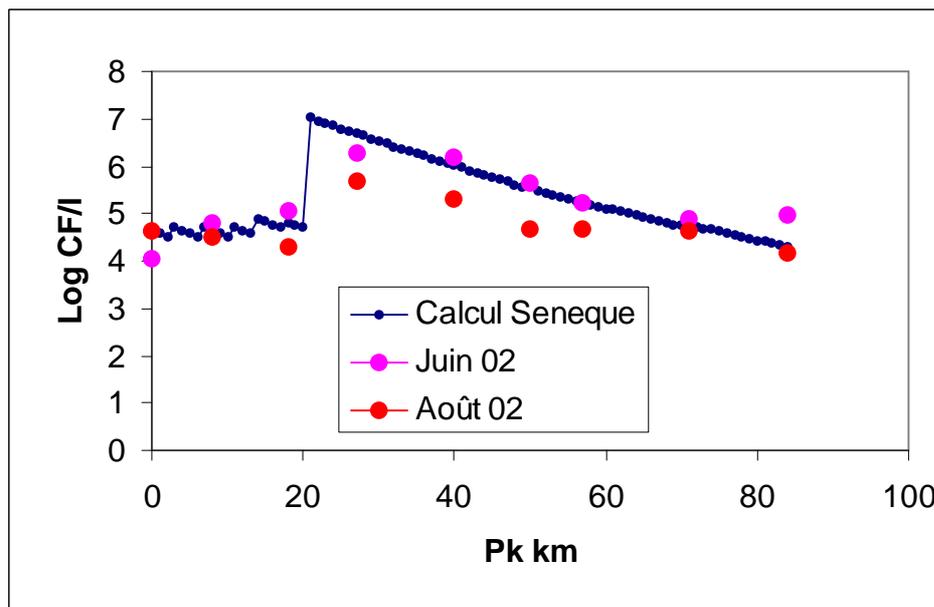


Figure 7.1: Abondance en CF cultivables dans laVesle. Résultats de modélisation obtenus avec l'applcatif SENEQUE et résultats expérimentaux de 2002. Sur cette figure Reims se situe au Pk 20 et la confluence Vesle – Oise au Pk 84.

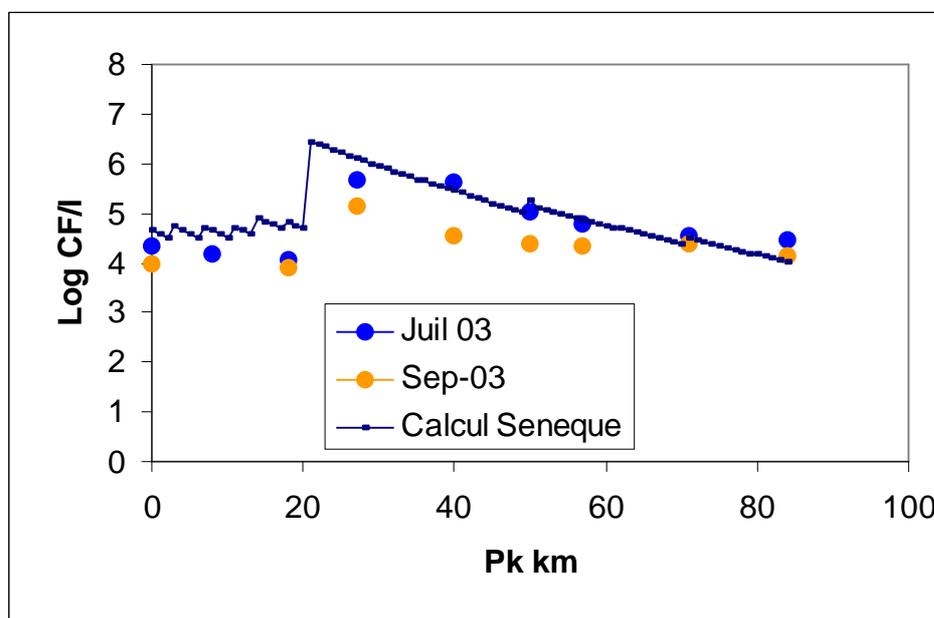


Figure 7.2: Abondance en CF cultivables dans laVesle. Résultats de modélisation obtenus avec l'applcatif SENEQUE et résultats expérimentaux de 2003. Sur cette figure Reims se situe au Pk 20 et la confluence Vesle – Oise au Pk 84.

Des simulations d'abondance en CF ont également été réalisées sur l'axe fluvial de la Marne. La figure 7.3 compare les résultats expérimentaux acquis sur quatre profils longitudinaux réalisés en mars 1998, septembre 1998 (George et al., 2001c), juin 2002 (Servais et al., 2003) et juillet 2003 dans des conditions de débits moyens à faibles avec deux simulations réalisées l'une pour des conditions de débit faible (simulation en rouge sur la figure 7.3) et l'autre pour des conditions de débit moyen (simulation en bleu sur la figure 7.3). La figure montre qu'à de rares exceptions les données expérimentales se situent dans l'enveloppe formée par les deux simulations. Le modèle simule donc correctement les niveaux de concentration en CF mesurés dans la Marne..

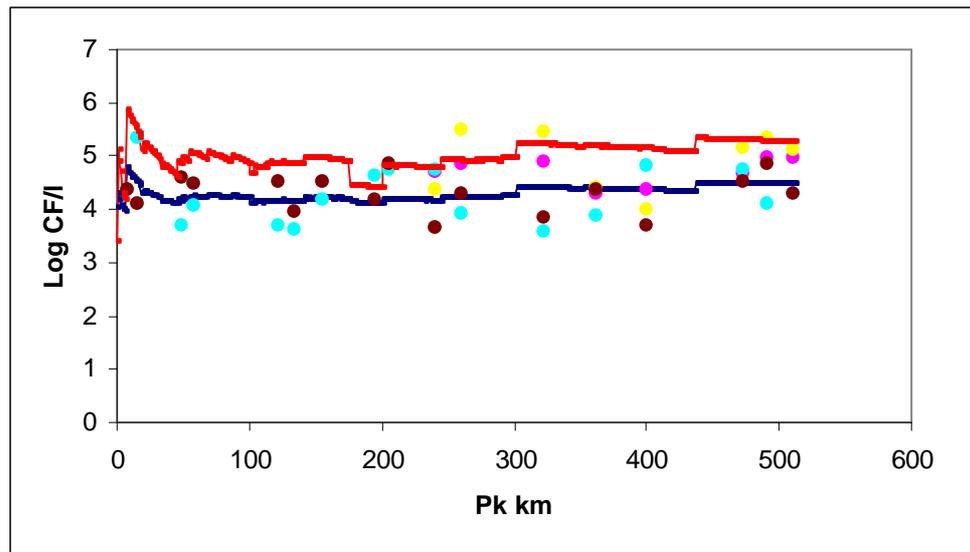


Figure 7.3: Abondance en CF cultivables dans la Marne. Résultats de modélisation obtenus avec l'appli SENEQUE (débit faible en rouge et débit moyen en bleu) et résultats expérimentaux (mars 1998, septembre 1998 (George et al., 2001c), juin 2002 (Servais et al., 2003) et juillet 2003). Sur cette figure la confluence Marne – Seine se situe au Pk 514.

Les deux exemples de comparaison de simulations et de données expérimentales (sur la Vesle et la Marne) montrent que les modèles sont maintenant à même de décrire correctement les fluctuations des bactéries indicatrices de contamination fécale que sont les coliformes fécaux.

8. Références bibliographiques

- Agence française de normalisation (AFNOR) (2001). Eaux - méthodes d'essais. *Recueil de normes françaises*. 6th édition. Paris, la Défense, France, 695 pages.
- Billen G., Garnier J. and Hanset P. (1994). Modelling phytoplankton development in whole drainage networks: the RIVERSTRAHLER model applied to the Seine river system. *Hydrobiologia* 289: 119-137.
- Delabre K., Dile V., Roubin M.R., Gatel D., Poty F. and Cavard J. 2001. New analytical tools for distribution system surveillance. In American Water Works association WQTC Proceedings CD Rom.
- Fewtrell, L and Bartram, J. 2001. Water quality: guidelines, standards and health. World Health Organization Water Series. IWA Publishing, London (U.K.)
- George I., Petit M., Servais P. (2000). Use of enzymatic methods for rapid enumeration of coliforms in freshwaters. *Journal of Applied Microbiology* 88(3): 404-413.
- George, I., Petit, M., Theate, C. and P. Servais. (2001a) Use of rapid enzymatic assays to study the distribution of fecal coliforms in the Seine river (France). *Water Science and Technology*. 43(12) : 77-80
- George I., Crop P. and Servais P. (2001b). Use of β -D-galactosidase and β -D-glucuronidase activities for quantitative detection of total and fecal coliforms in wastewater. *Canadian Journal of Microbiology* 47(7): 670-675.
- George I., Petit M., Theate C., Servais P. (2001c). Distribution of coliforms in the Seine river and estuary (France) studied by rapid enzymatic methods and plate count. *Estuaries* 24(6b): 994-1002.
- George I. et Servais P. (2002). Sources et dynamique des coliformes dans le bassin de la Seine. Rapport de synthèse. *Programme PIREN Seine. Février 2002*.
- George I., Crop P., Servais P. (2002). Fecal coliforms removal by wastewater treatment plants studied by plate counts and enzymatic methods. *Water Research*, 36: 2607-2617
- George, I., Anzil, A. & Servais, P. (2004). Quantification of fecal coliform inputs to aquatic systems through soil leaching. *Wat. Res.* 38. 611-618.
- Lepeuple, A. S., Delabre, K., Giloupe, S., Intertaglia, L. and de Roubin M.-R., 2003. Laser scanning detection of FISH-labelled *Escherichia coli* from water samples. *Water Sci. Technol.* 47: 123-129
- Menon P., Billen G & Servais P. (2003) Mortality rates of autochthonous and fecal bacteria in natural aquatic ecosystems. *Water Research*. 37 : 4151-4158
- Servais P., Garcia Armisen T., Mercier P., Lizin P. et Anzil A. (2003). Etude et modélisation de la qualité microbiologique des eaux du bassin de la Seine. *Rapport PIREN Seine Février 2003*.